

表 1 測定を行った水質基準項目の消毒副生成物

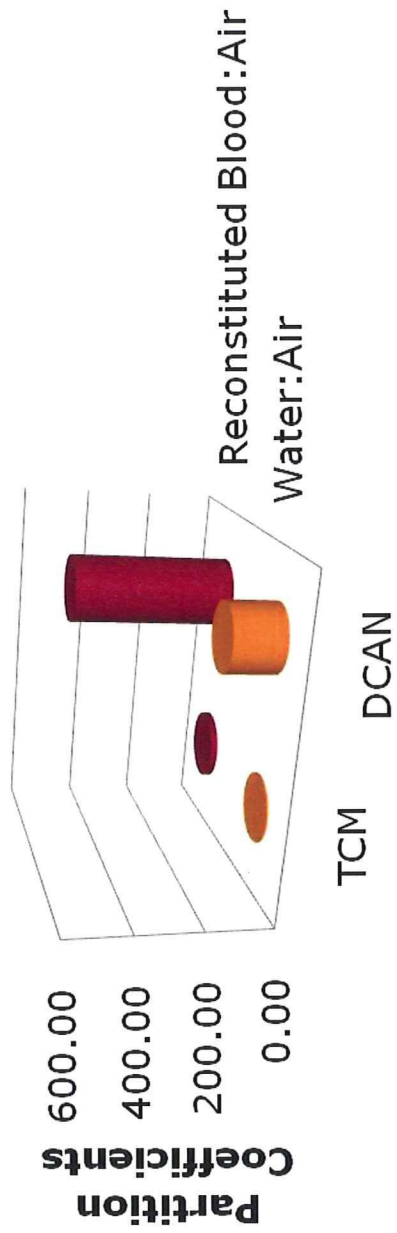
番号	項目	基準値 (mg/L)	水質検査方法	番号	項目	基準値 (mg/L)	水質検査方法
基22	クロロホルム	0.06	パージ・トラップGC/MS法	基09	シアン化物イオン 及び塩化シアン	シアンの量に 関して、0.01	水質検査方法
基24	ジブロモクロロメタン	0.1	パージ・トラップGC/MS法	基25	臭素酸	0.01	IC・ポストカラム 吸光度 法
基28	ブロモジクロロメタン	0.03	パージ・トラップGC/MS法	基21	クロロ酢酸	0.02	IC・ポストカラム 吸光度 法
基29	ブロモホルム	0.09	パージ・トラップGC/MS法	基23	ジクロロ酢酸	0.04	溶媒抽出・GC/MS法
基26	総トリハロメタン	0.1		基27	トリクロロ酢酸	0.2	溶媒抽出・GC/MS法
基20	塩素酸	0.6	イオンクロマト法	基30	ホルムアルデヒド	0.08	溶媒抽出・GC/MS法

表2 モデル浴槽水中の消毒副生成物（水質基準項目の化合物, mg/L）

	クロロホルム	ジブロモホルム	ブロモシロム	ブロモホルム	総トリハロメタン	クロロ酢酸	ジクロロ酢酸	トリクロロ酢酸	シアン及び ヒドロシアン	臭素酸	ホルムアルデヒド	塩素酸
CB 1	<0.006	<0.01	<0.003	<0.009	<0.01	<0.002	<0.004	<0.02	<0.001	<0.001	<0.008	<0.06
CB 2	<0.006	<0.01	<0.003	<0.009	<0.01	<0.002	<0.004	<0.02	0.116	<0.001	<0.008	0.20
CB 3	<0.006	<0.01	<0.003	<0.009	<0.01	<0.002	<0.004	<0.02	0.118	<0.001	<0.008	0.39
CB 5	<0.006	<0.01	<0.003	<0.009	<0.01	<0.002	<0.004	<0.02	0.126	<0.001	0.009	0.44
CB 6	<0.006	<0.01	<0.003	<0.009	<0.01	<0.002	0.008	<0.02	0.130	<0.001	0.014	0.58
CB 7	<0.006	<0.01	<0.003	<0.009	<0.01	0.003	0.012	<0.02	0.136	<0.001	0.018	0.81
CB 8	<0.006	<0.01	<0.003	<0.009	<0.01	0.004	0.018	<0.02	0.128	<0.001	0.017	0.93

表3 モデル浴槽水中のジハロアセトニトリル類 (µg/L)

CB 1	ジクロロアセトニトリル			<2.0
	<0.05	ブromoクロロアセトニトリル	ジブromoアセトニトリル	
CB 2	<0.05	<0.5	<0.5	<2.0
CB 3	0.06	<0.5	<0.5	<2.0
CB 5	0.07	1.1	<2.0	<2.0
CB 6	0.15	1.0	3.0	3.0
CB 7	0.18	1.4	4.9	4.9
CB 8	0.16	1.7	5.8	5.8



	TCM	DCAN
Water:Air	5.25	156
Reconstituted Blood:Air	19.6	488

図2 クロロホルム及びジクロロアセトニトリルの再構成血液・空気分配係数

フローサイトメトリーを用いたレジオネラ症予防のための浴槽水モニタリング技術

研究協力者: 田栗利紹 長崎県環境保健研究センター
研究分担者: 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者: 泉山信司 国立感染症研究所 寄生動物部
研究分担者: 杉山寛治 静岡県環境衛生科学研究所
研究協力者: 小田康雅 シスメックス株式会社

(研究要旨) 公衆浴場における水質衛生の保持は水系感染症防止のために必要であり、これにより入浴施設産業の安全と安心が守られている。浴槽水の塩素消毒は、レジオネラ症を含む細菌感染症の予防のために推奨されてきた入浴施設の衛生管理方法であるが、温泉などの場合、様々な阻害因子が塩素の消毒効果に影響を与える一方で、これまでレジオネラ汚染の迅速評価に有効な細菌計測方法は無かった。今回、我々は、フローサイトメトリー(FCM)を適用することにより、2 分間という短時間で浴槽水中の細菌を定量解析して塩素の消毒効果を評価する監視システムを開発した。5 種類の異なる泉源水と 3 種類の細菌株を用いた添加回収実験により、本システムの定量限界が 1 mL あたり 3000 個未満であることと、計測値が 3000 counts mL⁻¹ 未満を満たした試料が温泉の泉質や細菌の種類と関係なく不活化されていることを証明した。これらの結果から、本方法の閾値を 3000 counts mL⁻¹ と決定した。フィールド調査では、149 系統の循環式浴槽水において、この閾値による判定結果は、レジオネラ属菌検査(検出限界 100 cfu L⁻¹)の定性結果に対して、敏感度(Sensitivity)および特異度(Specificity)はそれぞれ 95%および 84%であり、89.5%という高い判定一致率を示した。これらのことから、我々の FCM システムは浴槽水衛生管理のための新たな基準を作り出すとともに、入浴施設におけるレジオネラ症リスクの低減に寄与することができる。

A. 研究目的

レジオネラ属菌は、ヒトのレジオネラ症の原因菌であり、本邦のレジオネラ症集団感染事故では入浴施設がその感染源として知られている。浴槽水の塩素消毒は、レジオネラ症を含む細菌感染症予防のために入浴施設で用いられている主要な衛生管理方法である。国や県のガイドラインによればその殺菌効果を得るためには遊離残留塩素濃度として 0.2~0.4 mg/L で 2 時間維持することとなっており、この処置は試験室内や清浄な浴槽水内では大変有効である。しかし、現地の入浴施設では、多様な泉質からなる温泉水が Fe²⁺、Mn²⁺、および NH₄⁺ のような塩素と反応する化学物質を含むだけでなく、入浴者によ

る皮垢の蓄積や生物膜を起源とする微生物群の存在により塩素量が減少させられるためにその効力を維持することは容易ではない。

フローサイトメトリー(FCM)は液体試料に含まれる微生物を単細胞レベルで解析する技術の一つであり、迅速な多変量解析を特徴として様々な分野で応用されてきた。^{1, 2)} 微生物分野では、対象微生物の連続的な変動を高速、高再現性、かつ定量的に解析できることから、飲料水、下水、海水、および食品分野などで菌数測定や工程管理への適用が試みられている。³⁻⁶⁾ ここで、全国入浴施設のレジオネラ属菌汚染調査に於いて、レジオネラ属菌が細菌数と定性的に相関することが報告され^{7, 8)}、レジオネラの自然汚

染が一定条件で生ずる細菌汚染と連動して起こることがモデル循環浴槽において実証された。⁹⁾ さらに、我々は、FCMにより浴槽水中の細菌をリアルタイムでモニタリングでき、計測された全細菌数がレジオネラ汚染の指標として有効であることを、モデル実験施設で実証した。¹⁰⁾

今回、このモデル実験結果を裏付けるための基礎実験として、FCM測定における全細菌数測定能力と泉質の影響を調査した。さらに、現地施設の浴槽水清浄度の評価に適用してその有効性を確かめた。

B. 研究方法

B-1. 試料水

塩化物泉/炭酸水素塩泉、塩化物泉、酸性泉、単純泉、および井水を利用する公衆浴場から採取した泉源水を供試した(表1)。これらの施設は全て塩素管理がなされていた。pHの測定は、比色法で実施した。Fe²⁺、Mn²⁺、NH₄⁺はパックテスト(理研化学)で計測した。遊離塩素濃度は市販DPD 試薬(ハック社)を用いて測定した。従属栄養細菌数の計測は、適切に希釈した試料の0.1 mLをR2A寒天平板(Becton Dickenson)に塗布して、井上ら⁹⁾の方法により42°Cで7日間培養した後に、形成集落を1 mLあたりのcolony forming unit (cfu)で示した。レジオネラ属菌検査は、0.45µm孔径ポリカーボネートメンブレンフィルター(HTTP, ミリポア)を用いたろ過濃縮法により処理して、0.1 mlをGVPC培地(日本ビオメュー)に接種して37°Cで7~10日間培養した。10日間まで検出されない試料を検出限界(100 cfu/L)未満と判定した。

B-2. 使用菌株、培地、発育条件

表2に供試菌株を示した。*Legionella pneumophilla* (ATCC 33152)はアムコ社から購入し、BCYE培地(ビオメュー)を用いて37°Cで発育させた。*Escherichia coli* (IFO 3972)は、発酵研究所から購入し、普通寒天培地(栄研化学)

で37°C、一晚培養した。*Rhizobium radiobacter* (JCM 20371)は理化学研究所から購入し、R2A培地(栄研化学)で30°C、一晚で培養した。全ての菌株は、0.85%滅菌生理食塩水で終濃度約10⁸ cfu/mLに調製した後に、さらに37°C、24時間で培養し、試験には10倍希釈液(10⁷ cfu/mL)を用いた。

B-3. FCM

FCMによる全細菌数測定は、Oyaneら¹¹⁾の方法に準拠して、出力6.5 mWの半導体レーザーを装備したフローサイトメータ、BACTANA (Sysmex)を用いた。必要に応じて、スケール除去のためにストマフィルターでろ過した。専用チューブ(SU-40, Sysmex)に入れた約200 µLの浴槽水試料を専用サンプルテーブルにセットして測定を開始すると、自動計測によりその50 µLが、希釈、染色、測定 of the engineeringを経て約2分間以内に処理された。これらのデータはパソコンに送付され専用ソフト BACTAnalyzer (Sysmex)で解析された。蛍光色素 BactQuick Dye (Sysmex)はmyristyl trimethyl ammonium bromideを0.1%含む希釈液により適切に希釈されて試験に供された。その最大吸収波長と最大励起波長はそれぞれ630/660nmであった。メーカー使用説明書¹²⁾に準拠して、細菌細胞から得られる前方散乱光強度(FSC)と蛍光強度(FL)を2つの指標として散布図を作り、後述の方法により細菌数を計数した。

B-4. FCM 解析方法

本研究の対象水は塩素消毒を条件としている。塩素消毒による細菌細胞の変化をFCM測定により調べた。Pheら¹³⁾に習い、0.85%リン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH7.2)で作成した約10⁵ cfu/mLの大腸菌懸濁液を初期遊離塩素濃度0.1~3.0 mg/Lに調製して常温で90分間反応させた。この結果、塩素処理前に検出された粒子と蛍光が、十分な塩素処理後には特異領域(図1実線括弧内)からほぼ消失することが判明した。

この特異領域内の粒子数を 1 mL あたりの細菌数として算出した。

B-5. 細菌数定量

考案した測定方法の検出能力を決定するために、最初に、Hammesら⁶⁾の方法に準拠して自然状態の温泉水を測定した。即ち、生菌が検出された単純アルカリ泉と井水を、フィルターろ過したそれぞれの原水で適切に希釈して(0.1%~100%の範囲)、上述の方法で3回繰り返しFCM測定した。次に、FCM測定に対する泉質の影響を精査するために、5種類の泉源水と対照としたPBSを用いて、3標準菌株の添加回収実験を行った。それぞれの原水は予め0.2 μ m孔径メンブレンフィルター(ミリポア)で3回ろ過した。上述の標準菌株を原水それぞれに加えてFCMにより 1.0×10^5 counts/mLに調製した疑似試料を原液として、100、10、5、3、2、1、および0.5%となるように適切に希釈して、FCMで3回繰り返し測定した。

B-6. 塩素消毒効果判定

市販の次亜塩素酸ナトリウム(和光純薬)を最終遊離塩素濃度が20mg/Lとなるように加え、必要に応じて塩素水を追加して、室温で90分間同濃度を維持させた。塩素処理前後の各懸濁液を、FCM、蛍光顕微鏡、および培地法で計測して成績を比較した。蛍光顕微鏡法では、黒色メンブレン(K020N025A, アドバンテック東洋)に各懸濁液の1 mLをろ過して、BacLight LIVE/DEAD bacterial viability kit (Molecular Probes)で染色した。使用説明書に準拠して、蛍光試薬混合液の3 μ Lを加えて室温で15分間染色させた後、落射型顕微鏡 ECLYPSE E800 (Nikon)で直接細菌数を計測した。培養法は、0.05%チオ硫酸ナトリウム(和光純薬)で中和した後に、塩素処理前の試料は10倍希釈法、塩素処理後の試料は、100倍濃縮ろ過法にてそれぞれ処理した。レジオネラ菌の測定にはBCYE_a培地、大腸菌および*R. radiobacter*の測定には

R2A 平板をそれぞれ用いて、生菌数を測定した。

B-7. フィールド調査

長崎県内の様々な泉質を利用した66公衆浴場施設の、系統の異なる浴槽水(塩化物泉24試料、炭酸水素塩泉26試料、単純温泉10試料、酸性泉6試料、井水22試料、水道水61試料)から採水した149試料を供試した。遊離残留塩素濃度を測定した後、ポリプロピレン試料管に採取して、0.05%チオ硫酸ナトリウム溶液(和光純薬)で中和した後、全細菌数、従属栄養細菌数、およびレジオネラ属菌数を上述の方法により測定した。

B-8. 統計解析

全ての実験は2連以上の操作で実施した。平均値の検定は t 検定、クロス対応表の検定は χ^2 二乗検定に因った。

C. 研究結果

C-1. 温泉の塩素阻害物質

塩化物泉と単純酸性泉は、それぞれ10 mg/Lの NH_4^+ と1 mg/Lの Mn^{2+} 、および20 mg/Lの NH_4^+ と10 mg/Lの Fe^{2+} を含んでいた(表1)。これらの浴槽水では塩素作用の阻害が観察され、不十分な消毒状態でさえ残留塩素が検出されていた。

C-2. FCM法による定量限界

単純アルカリ泉と井水に含まれていた細菌数のFCM測定において、両者ともに高い直線性を示した。10,000 counts/mL以上の測定値における変動係数は全て5%未満であったが、それを下回ると徐々に変動係数は増大し1000 counts/mLまでは10%前後、100 counts/mLになると50%を超えていたため、以降本研究では変動係数=10%を正確性の基準とした。単純アルカリ泉と井水の細菌測定における変動計数が平均値の10%未満を示した最小値はそれぞれ 2390 ± 191 (平均値 \pm 標準偏差) counts/mLと

2890±255 counts/mL であった。疑似サンプルの回収実験に於いても全ての標準曲線は高い直線性を示し($R^2=0.989\sim0.999$)、測定値のバラツキの傾向は自然水の成績と変わらなかった。*L. pneumophila* を各種温泉水に添加した疑似試料において、変動係数が10%未満の最小値は、塩化物泉／炭酸水素塩泉、塩化物泉、単純酸性泉、単純アルカリ泉、井水、およびPBSの順に、それぞれ2110±98、2330±165、2090±120、2110±98、2500±240、そして2230±1414 counts/mLであった。*E. coli*の場合は、同様にそれぞれ2780±191、3000±240、2390±98、2330±105、2690±115、そして2310±201 counts/mLであった。*R. radiobacter*の場合は、それぞれ2260±98、2500±170、2060±196、2090±120、2210±75、そして2090±120 counts/mLであった(図2)。

C-3. 塩素消毒効果判定

十分な塩素処理を行うと、散乱光強度と蛍光強度により特定された細胞集団は(図1a)、特異領域から消失した(図1b)。含有する大量の塩素阻害物質のために、温泉水を用いた疑似試料は高濃度塩素(終濃度20 mg/mL)で十分に処理した。塩素処理後のFCM測定値は、*L. pneumophila* を各種温泉水に添加した疑似試料において、塩化物泉／炭酸水素塩泉、塩化物泉、単純酸性泉、単純アルカリ泉、井水、およびPBSの順に、それぞれ1515±262、1830±707、250±113、585±120、250±113、そして327±6 counts/mLであった。*E. coli*の場合は、同様にそれぞれ2280±675、667±335、1280±1510、777±92、1387±916、そして387±98 counts/mLであった。*R. radiobacter*の場合は、それぞれ2667±602、777±92、1667±598、1500±500、947±387、そして1277±254 counts/mLであった。前述した定量限界とこれらの成績から判断して、塩素効果を指標とするFCM測定値の閾値を1 mLあたり3000個と決定

した。これら塩素処理後試料の蛍光顕微鏡像では、ほとんどの細胞は死菌を示す赤色に染まっていた上に、退色、断片化や変性が認められた。生菌数は、全て検出限界以下(100 cfu/L)であった。

C-4. フィールド調査

系統の異なる浴槽水149試料について、レジオネラ菌の定性結果ごとにFCMによる全細菌数の度数分布を示した(図3a)。149試料のうち、測定値が本システムの閾値である3000個未満を示した93試料のほとんどからレジオネラ菌は検出されなかった(陰性一致率97.8%，図3a)。全細菌数が1mlあたり3000個を超えた56試料ではレジオネラ菌の陽性率が増加し39試料からこの菌が検出された(陽性一致率69.6%，図3a)。これらをクロス集計表でまとめてレジオネラ検査と対比した時の敏感度は95%で、特異度は84%であり(図3a挿入図)、レジオネラ検査との判定一致率は89.5%であった。一方で、現在、入浴施設の管理基準となっている遊離塩素濃度を指標として度数分布を作成した(図3b)。法定管理基準の下限値0.2 mg L⁻¹を閾値とすると、閾値以上の119試料のうちレジオネラが陽性を示した試料は24試料であり、遊離塩素濃度が管理基準の上限値0.4 mg L⁻¹を超えた試料でもレジオネラが検出された。レジオネラ検査と遊離塩素濃度のクロス集計表では、遊離塩素濃度が0.2 mg L⁻¹以上の時のレジオネラ検査との陰性一致率は79.8%であり、同じく0.2 mg L⁻¹未満の陽性一致率は56.7%であった(図3b挿入図)。本検査法のレジオネラ検査に対する敏感度は41%で、特異度は88%であり、判定一致率は64.5%にすぎなかった(図3b挿入図)。

D. 考察

FCMは、微生物分野では、高い測定速度と再現性、並びに多変量解析能により、対象微生物数の連続変化を定量的、多面的に解析できる

ことから、飲料水、下水、海水、および食品分野などで工程管理への適用が試みられ、それら技術の有効性が認められているが、³⁻⁶⁾ 測定機器の高額さと測定技術の煩雑さにより実用分野は限られてきた。^{1, 2)} 今回測定に用いたフローサイトメータは、測定工程を完全自動化した上で、単波長レーザーから得られた散乱光強度と蛍光強度による解析に絞り込み、定量ポンプ方式の採用と独自開発の染色色素及び界面活性剤の適用により高再現性と短時間測定が可能とされている。¹¹⁾

天然温泉水や模擬試料を用いた実験において、FCM 測定は生菌数との間に高い直線性を示したが、その測定精度は原試料の細菌含有量により異なった。即ち、10,000 counts/mL 以上の試料の変動係数は全て 5%未満で、一般的に報告されている FCM の測定精度と同等であったが、⁶⁾ それを下回ると徐々に変動係数は増大し 1000 counts mL⁻¹ までは 10%前後、100 counts mL⁻¹ になると 50%を超えていた。これらの原因として 2 分間という解析時間の短さが挙げられたが、図 3 の結果から見ても、本システムを塩素消毒効果の決定手段として使用する限り、その実用性に問題は無いと考えられた。また、本システムと同等のフローサイトメータ(標準誤差 10%; 最大解析時間 5 分間)を用いた報告において、FCM 数は生菌数と 10² から 10⁷ cfu/mL の範囲で高い相関を示しており、¹⁴⁾ 最適化されれば、我々の FCM システムもこの既報告例と変わらない測定精度を期待できる。

模擬試料の回収実験において、変動係数が 10%を超えない最低値は泉質差や菌株差の影響を受けなかった(P<0.05)。また、10⁵ 個の細菌を含む試料の消毒後の測定値は、最大でも 1mL あたり 2,667 個にすぎず、変動係数に差を認めたものの、その他は全て 3,000 個未満であった。さらに、フィールド調査の成績をみると、明らかに 1mL あたり 3,000 個を閾値としてレジオネ

ラ菌検査結果が陽性群と陰性群に分けられていた(図 3a)。これらのことから、本 FCM システムにおける塩素消毒効果の閾値は、泉質差や菌株差と関係なく一定であり、定量的かつ再現性のよい測定値が期待できると考えられた。即ち、我々の FCM システムは一定の閾値によって細菌の塩素消毒効果を適正に評価できるということであり、この基準がレジオネラ属菌清浄化の基準と一致するということであろう。昨年度の成績¹⁰⁾もこの事象を支持している。今後さらなるフィールド調査によりこの仮説が証明されることを期待する。一方で、今回調査した遊離残留塩素濃度測定方法による成績では、その適正濃度(≧ 0.2mg L⁻¹)を維持していてもレジオネラ属菌が検出される事例があったことは明らかであり(図 3b)、レジオネラ汚染が見逃されていた可能性も否定できない。単純に管理基準値を上げることで改善は期待できるけれども、真陽性とともにも偽陽性も増加するために根本原因の解決とはならず(図 3b)、この問題解決には本測定方法のさらなる検証が必要と考えられた。

疑似試料の回収実験において、FCM 数が生菌数よりも低い値を示す傾向が認められた(図 2)。一般的に、FCM による全細菌数は生菌数よりも高いと考えられている。⁶⁾ 今回のこの現象は、y 軸近辺に分布するノイズや不活化粒子群とのオーバーラップを避けることのできる領域を設定したことが理由の一つとして考えられた(図 1)。このオーバーラップに因る減数割合は添加菌数 10 万個の場合に、*E. coli* で全細菌数の最大約 20%、*L. pneumophila* と *R. radiobacter* で最大約 50%と計算された。

今回、温泉水などの塩素阻害が多く認められる浴槽水の消毒効果を判定する方法として、FCM 適用により新たな評価システムを開発した。回収実験の結果は、この FCM システムが泉質や菌種の影響を受けずに細菌数を定量できることから、浴槽水の清浄度を評価する一定の基準

を設定できることを示していた。また、フィールド調査の結果から、この一定基準は細菌汚染だけでなくレジオネラ属菌の汚染指標としても有用であることが確認された。本システムは短時間測定であることから、生菌数検査で判断しがたい消毒直後の細菌の変化を持続的に判定できる可能性もあり、現地での衛生管理への適用が強く期待される。

E. 結論

添加回収実験により、FCMの定量限界が 1 mLあたり 3000 counts 未満であり、FCMで 3000 counts/mL 未満を満たした試料が、温泉の泉質や細菌の種類によらず不活化されていることが明らかとなった。今回開発した FCM システムによる浴槽水の衛生管理方法の閾値は、3000 counts/mL と決定された。149 系統の循環式浴槽水を用いたフィールド調査において、この閾値による判別結果は、レジオネラ属菌検査(検出限界 100 cfu/L)による定性結果と、95%の感度と 84%の特異度で一致した。これらのことと昨年度の報告書結果¹⁰⁾を考え併せると、本 FCM システムは、浴槽水衛生管理のための新たな基準を作り出すことができ、入浴施設におけるレジオネラ症リスクの低減に寄与できる。

F. 参考文献

- 1) Álvarez-Barrientos, A. *et al.*, Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 167-195. (2000)
- 2) Davey, H. M. and Kell, D. B., Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial population: the importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* 60, 641-696. (1996)
- 3) Falcioni, T. *et al.*, Comparison of disruption procedures for enumeration of activated sludge floc bacteria by flow cytometry. *Cytometry Part B.* 70B, 149-153. (2006)
- 4) Grégori, G. *et al.*, Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4662-4670. (2001)
- 5) Laplace-Builhé, C. *et al.*, Application of flow cytometry to rapid microbial analysis in food and drinks industries. *Biol. Cell* 78, 123-128. (1993)
- 6) Hammes *et al.*, Flow-cytometric total bacterial counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Res.* 42, 269-277. (2008)
- 7) 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)「温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究」平成 18 年度総括・分担研究報告書 研究代表者: 倉文明 (2007)
- 8) 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)「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 18 年度総括・分担研究報告書 研究代表者: 井上博雄 (2007)
- 9) Ohata, K. *et al.*, Growth of *Legionella* in Non-sterilized, Naturally Contaminated Bath Water in a Facility Which Mechanically Circulates and Purifies the Water, In *Legionella; state of the art 30years after its recognition*, (Edited by Nicholas P. Cianciotto *et al.*), ASM press, Washington, D.C. (2006)
- 10) 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)「公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究」平成 20 年度総括・分担研究報告書 研究代表者: 遠藤卓郎 (2009)
- 11) Oyane, I. *et al.*, Comparison between the effects of ultrasound and γ -rays on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*: Analyses of cell membrane permeability and DNA

or RNA synthesis by flow cytometry. *Ultrason. Sonochem.* **16**, 532-536. (2009)

12) シスメックス株式会社、BACTANA 使用説明書 (2006)

13) Phe, M. H. *et al.*, Nucleic acid fluorochromes and flow cytometry prove useful in assessing the effect of chlorination on drinking water bacteria. *Water Res.* **39**, 3618-3628. (2005)

14) Pinder, A.C. *et al.*, Validation of flow cytometry for rapid enumeration of bacterial concentrations in pure cultures. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 92-100. (1990)

G. 健康危険情報 なし

H. 研究発表

Taguri T., Oda Y., Sugiyama K., Izumiyama S., Kura F., Using flow cytometry to monitor the risk of legionellosis in bath water, 7th International conference for Legionella infections (Legionella 2009). Paris. October 2009.

I. 知的所有権の取得状況 なし

表1. 使用した温泉水の性状

	塩化物/炭酸水素塩泉	塩化物泉	単純酸性泉 ^a	単純アルカリ泉 ^a	井水
pH ^b	7.4	7.0	2.6	7.0	7.0
陽イオン含有量 (mg l ⁻¹) ^c					
NH ₄ ⁺ (as NH ₄ -N)	1.0	10.0	20.0	0.5	0.2
Mn ²⁺	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
Fe ²⁺	<0.2	0.2	10.0	<0.2	<0.2
遊離残留塩素濃度 ^d	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
従属栄養細菌数 (cfu ml ⁻¹) ^e	<200	<200	<200	13,350	153,000
レジオネラ属菌数 (cfu 100 ml ⁻¹) ^f	<10	<10	<10	<10	<10
浴槽水の消毒の有無	yes ^g	yes	yes	yes	yes

^a 不溶性物質濃度が1000 mg kg⁻¹ 未満の温泉と定義される温泉, ^b 比色法により測定, ^c パックテストにより測定

^d ジメチル-*p*-フェニレンジアミン法により測定, ^e R2A 培地法により測定, ^f 100倍ろ過濃縮法により測定, ^g 塩素消毒が行われていた施設

表2. 供試菌株

菌種名	菌株名	血清群	別名
<i>Legionella pneumophila</i>	Philadelphia-1	SG 1	ATCC 33152
<i>Escherichia coli</i>	IFO 3972		ATCC 8739
<i>Rhizobium radiobacter</i>	JCM 20371		ATCC 19358

略語: ATCC, American Type Culture Collection.; IFO, Institute of Fermentation Osaka; JCM, Japan Collection of Microorganism

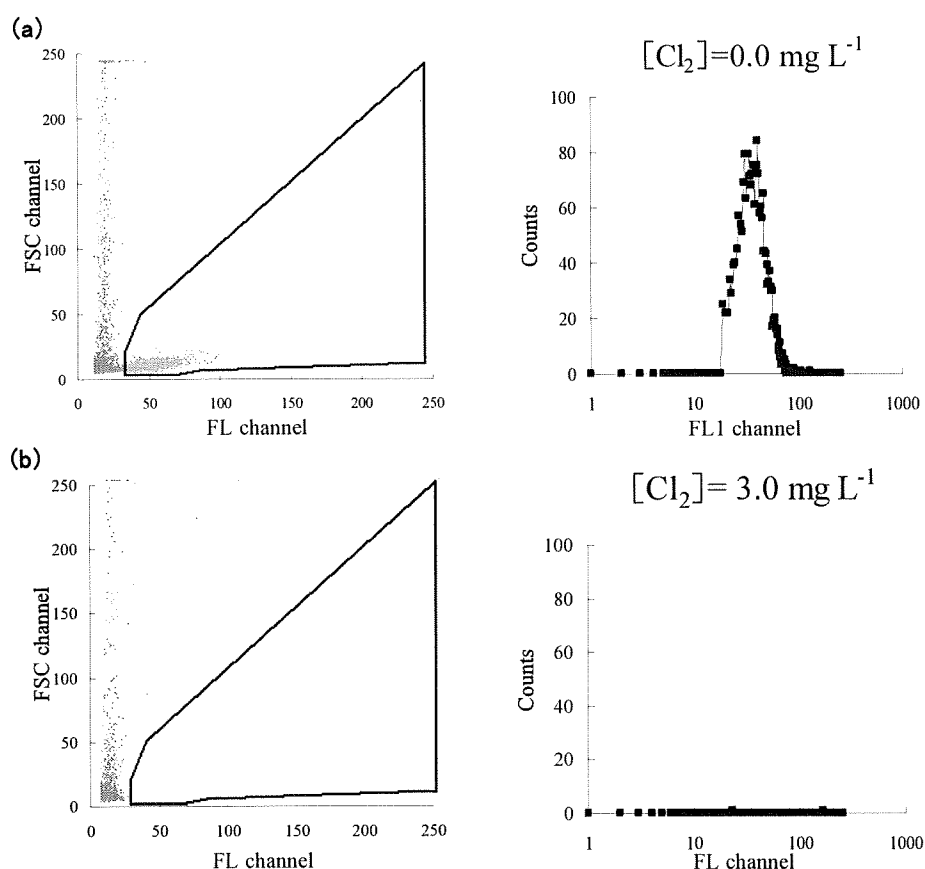


図1 - フローサイトメトリー解析により得られた浴槽水散布図の比較

散布図は蛍光強度 (FL) と前方散乱光強度 (FSC) で解析、次亜塩素酸ナトリウムにより初期遊離塩素濃度 (a) 0 mg L⁻¹ および (b) 3 mg L⁻¹ で処理した大腸菌 (約 10⁵ cfu mL⁻¹) 添加 PBS 溶液の散布図と特異領域 (実線) 内細胞に対応した蛍光強度の度数分布 (反応条件; pH 7.2, 25°C, 90分)。

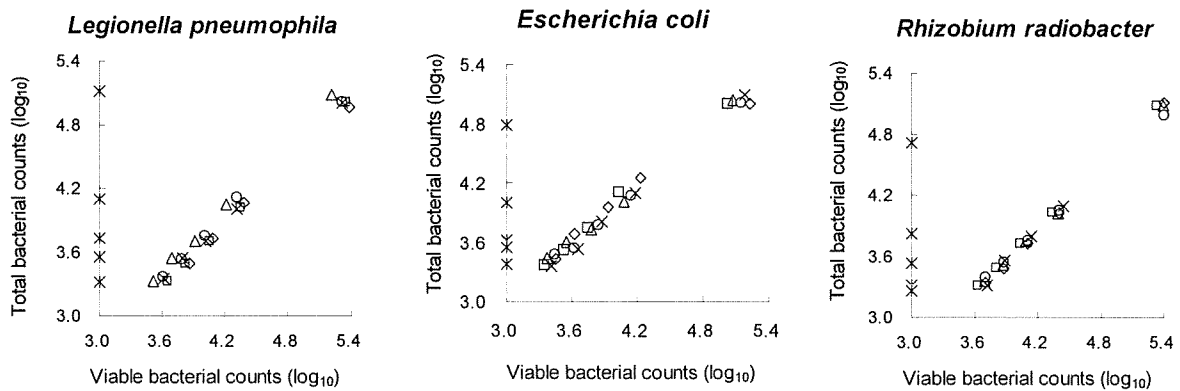


図2 - フローサイトメリーによる全細菌数測定に対する温泉泉質の影響

Legionella pneumophila、*Escherichia coli*、および*Rhizobium radiobacter*が、塩化物/炭酸水素塩泉(Δ)、塩化物泉(○)、単純酸性泉(*), 単純アルカリ泉(□)、井水(◇)、およびリン酸緩衝生理食塩水(×)に加えられた。各試料は、約 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、5000、3000、そして2000 counts mL^{-1} に調製され、フローサイトメリー法と生菌数測定法で測定された。

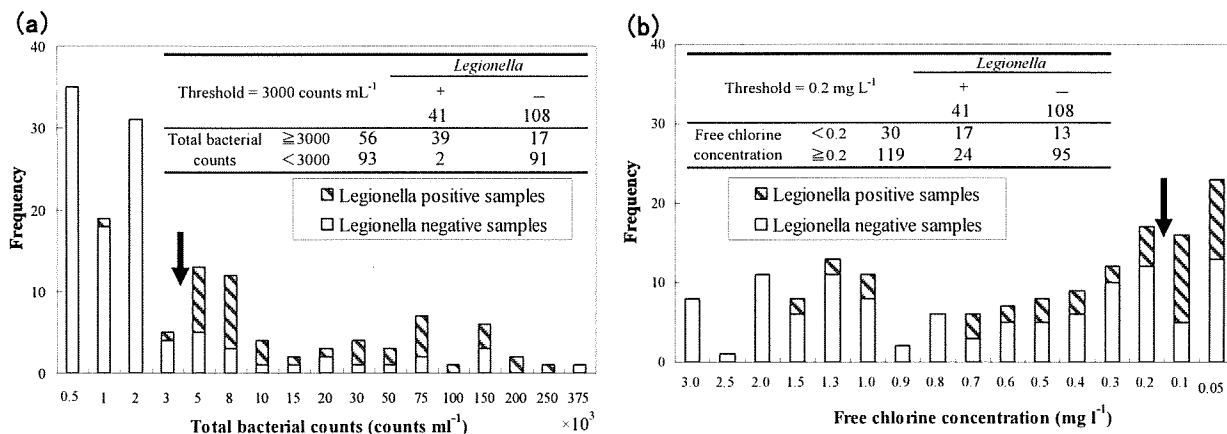


図3 - レジオネラ属菌定性結果で分別した各種検査法における度数分布の比較

(a) フローサイトメリーにより計測された全細菌数と (b) ジエチル-p-フェニレンジアミン法による遊離残留塩素濃度。矢印は各検査法の閾値を示す。挿入図は、各種検査法判定結果とレジオネラ属菌検査結果のクロス集計表を示す。

厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）
分担研究報告書

公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究

レジオネラ属菌に対する殺菌・消毒剤の効果判定方法の検討

分担研究者 秋山 茂 北里大学医療衛生学部 専任講師
坂上 吉一 近畿大学農学部 教授

研究要旨： 浴場水を介したレジオネラ症の発生が散見され、公衆衛生上の社会問題になっている。厚生労働省は浴場水の衛生管理の徹底を指示しているが、レジオネラ属菌の微生物生態の特殊性から効果的な消毒方法が確立されていないのが現状である。それを確立するためには、消毒剤の効果判定を適確に行うことが重要であることから、これまで行われてきた消毒剤の殺菌効力評価法に関する文献的調査を実施したうえで、数多く考案されている殺菌力評価法をレジオネラ属菌に適用するための試験法について検討してきた。その結果、作用させた菌量の減少量で評価する評価法が適用可能であることが示唆されたことから、2株の *Legionella pneumophila* を用いて各種殺菌消毒剤の効力を評価した。

A. 研究目的： 浴場水を介したレジオネラ症の発生を防止するためには、浴場水中のレジオネラ属菌を殺菌する必要がある。そのためには殺菌消毒剤を用いるか、オゾンや電気分解水、銀や銅などの持つオリゴダイナミー、酸化チタンの光触媒作用、紫外線などの利用が提案されている。しかし、それらの殺菌効力の評価方法は一様ではなく、その効力を比較することが出来ない。殊に殺菌消毒剤の効力の評価方法は種々考案されており、諸外国では公定法として定められている方法もあるが、我が国では公定法を定めていない。従って、薬剤によるレジオネラ属菌の消毒法を提案するに当たっては、消毒剤の殺菌効力を適確に比較できる評価法が必要であることから、現在までに提案された殺菌効力評価法を整

理し、石炭酸係数測定法に準拠した方法、改良 Kelsey-Sykes 法、ヨーロッパ標準殺菌効力試験法などが評価法として妥当ではないかと提案した。しかし、ヨーロッパ標準殺菌効力試験法以外の評価方法は、供試菌の生死を液体培地で確認していることから、そのままではレジオネラ属菌を供試菌として試験することは出来ないため、薬剤作用後の生死を如何に確認するかを解決しなければならなかった。そこで、固形培地上で菌の生死を確認したところ石炭酸係数測定法に準拠した方法と改良 Kelsey-Sykes 法では、液体培地における評価と固形培地における評価は必ずしも一致しなかった。従って、レジオネラ属菌のような液体培地中での発育が悪い菌を用いて薬剤の効力を評価するには、作用後の

菌の生死を判断するのではなく、作用させた菌量がどの程度減少するかを測定し、その減少量から薬剤の有効性を評価するヨーロッパ標準殺菌効力試験法が適しているとの結論を得た。本年度はこの試験法で各種殺菌消毒剤のレジオネラ属菌に対する殺菌効力を評価した。

B. 研究方法：

1) 供試菌株と菌液の調製

Legionella pneumophila 血清型1型(SG-1)及び6型(SG-6)をレジオネラGVPC α 寒天培地に画線塗抹し、37°C、5日間培養したものを滅菌生理食塩液に懸濁し、660nmにおける吸光度を調整し、 $1.5 \sim 5.0 \times 10^8$ CFU/mlの菌液とする。

2) 被検薬剤と試験薬液の調製

被検薬剤は、10%塩化ベンザルコニウム液(逆性石けん液)、15%塩酸アルキルジアミノエチルグリシン製剤(両性界面活性剤)、6%次亜塩素酸ナトリウム製剤である。

試験薬液の調製は、必要とする濃度の1.25倍の溶液(例えば、 $10 \mu\text{g/ml}$ の液について試験しようとする場合には $12.5 \mu\text{g/ml}$ の液)を調製し、その8mlを作用試験管に入れる。そこに滅菌した精製水1mlと菌量を調製した供試菌液1mlを加える。菌液を加えると同時にストップウォッチを作動させ、一定時間毎に1mlを取りだし、薬剤の不活化剤9mlに加え薬効を停止させた後、不活化中の生残菌数を測定する。試験操作の模式図を図-1に示した。通常は、その1mlについて混釈培養法を用いるが、表面集落を形成させる必要があることから、0.1mlをGVPC α 寒天培地の表面に塗抹した。37°C、5日間培養後、発育したコロニー数を計数し、

希釈倍数を乗じて作用液中の生残菌数を求めた。初期菌数から作用後の生残菌数を差し引き減少菌量とした。初期菌数から5Log以上の減少があった作用条件を有効と判断する。

3) 中和剤

表-1に示した組成を加温溶解し高圧蒸気滅菌した。

C. 研究結果・考察

1. 供試菌液調製用検量線

吸光度の異なる供試菌の懸濁液を作製し、各吸光度における生菌数を測定した結果を表-2に示した。表-2をもとにした菌液調整用の検量線を図-2に示した。SG-1株もSG-6株も生菌数と吸光度は直線関係を示し、この検量線から試験の都度、ほぼ一定の菌量の懸濁液を調製することが出来た。

2. 生残菌数に及ぼす不活化剤の影響

不活化中に菌量を調製した菌液を加え、5、10、20、30分後の生菌数を測定した結果を表-3に示した。何れの処理時間においても初期菌数との差は見られず、不活化剤による菌数の減少は認められなかった。

3. 逆性石けんの効果

10%逆性石けん製剤(オスバン10%消毒液®)の各作用濃度における各作用時間後の生残菌数を求め、初期菌数からの対数減少量を表-4に示した。菌株によって生菌数の対数減少量に相違が見られ、菌株によって逆性石けんに対する抵抗性に違いが認められた。SG-1株よりSG-6株の方が逆性石けんに対する抵抗性は弱かった。常用濃度としている100倍希釈液(1mg/ml)を作用させた場合、

SG-1 株は 2.5 分の作用で対数減少量は 4.972 で殺菌効果があると判断される 5 Log に僅かに達しなかったが、SG-6 株では 6.745 以上の減少があり効果があった。同様に 500 倍液 (0.2mg/ml) の 10 分作用で SG-1 株には無効であったが SG-6 株には有効であった。1000 倍液 (0.1mg/ml) では抵抗性の弱いと思われる SG-6 株を 15 分間作用させても無効であった。

4. 両性界面活性剤の効果

15%塩酸アルキルジアミノエチルグリシン製剤 (両性界面活性剤: ニッサンアノン #300®) の各作用濃度における各作用時間後の生残菌数を求め初期菌数からの対数減少量を表-5 に示した。

両性界面活性剤に対しては菌株による抵抗性の相違はさほど見られなかったものの、製剤の常用濃度である 100 倍希釈液 (1.5mg/ml) の 2.5 分作用で見ると、逆性石けんに対しては SG-1 株の方が SG-6 株よりも抵抗性が強かったのに対して、両性界面活性剤に対しては逆に SG-6 株の方が SG-1 株より抵抗性があった。この作用条件以外の作用条件における両菌株の減少量には違いが見られず、抵抗性に差は認められなかった。両性界面活性剤によるレジオネラ属菌の殺菌には、常用濃度 (1.5mg/ml) で 5 分以上の作用が必要であった。常用濃度の 1/2 の濃度 (0.75mg/ml) でも 15 分間作用させれば 5Log 以上の減少が見られ、レジオネラ属菌の殺菌に有効な作用条件であった。しかし、常用濃度の 1/10 の濃度 (0.15mg/ml) では 15 分作用させても 1.590Log 以下の減少量しか得られず殺菌効果は期待できなかった。

D. 結論

新規薬剤の評価法には、作用させた菌量の減少量で評価するヨーロッパ標準殺菌効力試験法の改良型が適していた。

なお、OECD による新規消毒剤の効果検証に係るガイドライン (2009 Draft OECD Guidance Document for Demonstrating Efficacy of Pool and Spa Disinfectants) によると、新規消毒剤としての評価を得るには以下の特性を有することが条件とされている。

1. 浴槽水中で残留性が保証され、可能であれば自動注入装置が存在すること
2. 浴槽水として快適な pH 範囲、あるいは浴槽水中に含まれるイオンの種類やその他の成分量に関わらず消毒効果が保証されること
3. 消毒剤の濃度測定方法が確立されており、野外検査用のキットの存在が望まれる。
4. 濃度不足が生じたり病原微生物の発生が認められたりした際に追加注入が可能なこと
5. 通常使用に向けた薬剤の安全使用濃度が定められており、(その半分の濃度で消毒効果が保証されること、また、その 2 倍濃度で入浴者の健康に影響しないこと)
6. 消毒薬が複数の成分から成る場合には総合の薬効に対してそれぞれの薬効 (比率) が示されていること
7. その他

併せて、消毒効果判定に向けた詳細な実験条件も提示されている。また、遊離残留塩素消毒を参照消毒剤と位置付け、新規消毒剤はこれと同等かそれ以上の消毒効果を持つものであるべきと規定されている。

E. 研究発表

(1) 論文発表

なし

(2) 学会発表

なし

(2) 実用新案登録

なし

(3) その他

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 特許取得

なし

ヨーロッパ標準試験法(EN法)

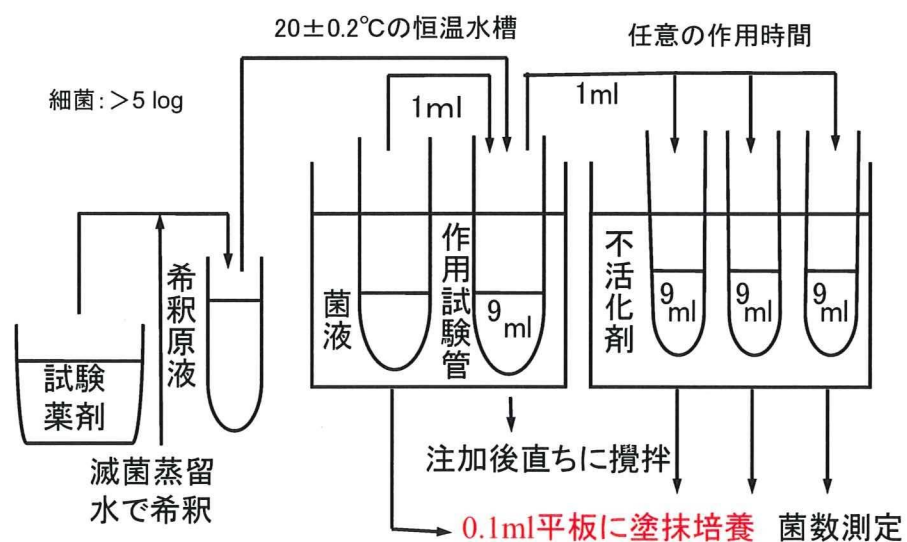


図-1 ヨーロッパ標準殺菌効力試験法の模式図

表-1 試験法で規定する不活化剤組成

リン酸緩衝液 pH7.2	1000 ml
ポリソルベート80	30 g
大豆レシチン	10 g
L-ヒスチジン	1 g
ポリペプトン	1 g
チオ硫酸ナトリウム	6 g
塩化ナトリウム	8.5 g

表-2 *Legionella pneumophila*菌液の吸光度と生菌数

<i>Legionella pneumophila</i>			
SG-1株		SG-6株	
吸光度	生菌数(cfu/ml)	吸光度	生菌数(cfu/ml)
0.05	2.0×10^8	0.12	1.0×10^8
0.09	2.5×10^8	0.16	1.3×10^8
0.16	4.0×10^8	0.34	3.2×10^8
0.24	6.3×10^8	0.40	6.3×10^8

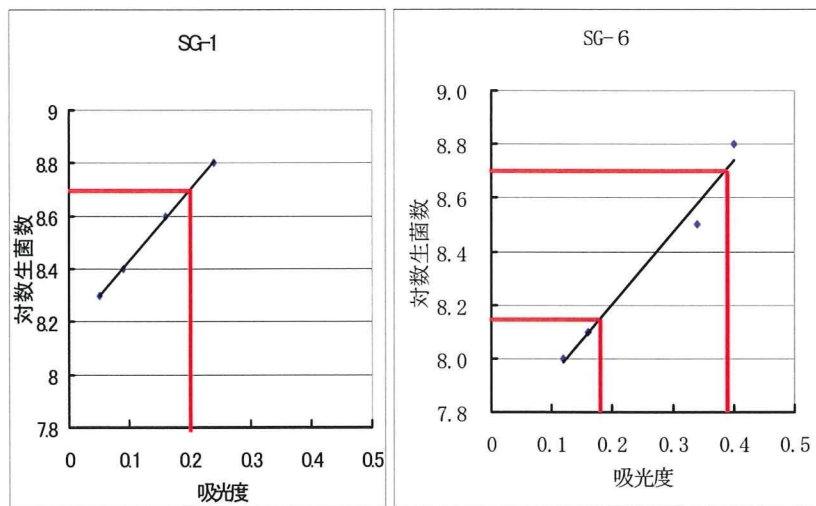


図-2 レジオネラ属菌の菌量調製用検量線

表-3 不活化剤中における
*Legionella pneumophila*の生菌数の変化

処理時間	<i>Legionella pneumophila</i>	
	SG-1株 生菌数 (cfu/ml)	SG-6株 生菌数 (cfu/ml)
0分	3.4×10^8	2.4×10^8
5	3.8×10^8	2.6×10^8
10	3.2×10^8	2.4×10^8
20	2.8×10^8	2.4×10^8
30	3.4×10^8	2.8×10^8

表-4 塩化ベンザルコニウム処理による
*Legionella pneumophila*生菌数の対数減少量の変化

作用時間		2.5	5.0	10.0	15.0 (分)
SG-1株 (7.653)	1.0mg/ml	4.972	>6.699	>6.699	>6.699
	0.2mg/ml	<1.699	<2.699	4.423	>6.699
	0.1mg/ml	<0.699	<0.699	<0.699	1.699
SG-6株 (7.699)	1.0mg/ml	>6.745	>6.745	>6.745	>6.745
	0.2mg/ml	<1.745	<2.745	>6.745	>6.745
	0.1mg/ml	<1.745	<1.745	3.180	3.785

作用液中の初期菌数

(7.653): 4.5×10^7 cfu/ml

(7.699): 5.0×10^7 cfu/ml

表-5 両性界面活性剤処理による
*Legionella pneumophila*生菌数の対数減少量の変化

作用時間		2.5	5.0	10.0	15.0 (分)
SG-1株 (7.544)	1.5 mg/ml	5.039	>6.590	>6.590	>6.590
	0.75mg/ml	<1.590	<2.590	3.097	>6.590
	0.15mg/ml	<0.590	<0.590	<1.590	<1.590
SG-6株 (7.544)	1.5 mg/ml	4.200	>5.590	>5.590	>5.590
	0.75mg/ml	<1.590	<1.590	3.503	5.590
	0.15mg/ml	<0.590	<0.590	<0.590	<1.590

作用液中の初期菌数 (7.544): 3.5×10^7 cfu/ml