

(OCFU/mL)であった。源泉と浴槽水の物質を以下に示す。

項目	源泉	浴槽水
pH (25℃)	8.2	8.8
電気伝導率 (mS/m)	55	61
全硬度	19	23
Ca 硬度	13	15
Mg 硬度	6	8
M アルカリ度	300	380
塩化物イオン	9	20
硫酸イオン	<5	<5
シリカ	52	53
アンモニウムイオン	4.7	3.6
鉄	<0.05	NT
マンガン	<0.05	NT
COD	1.3	NT

(単位：mg/L)

その後、2010年2月18日採水の同浴槽水において、レジオネラ属菌不検出

(10CFU/100mL 未満)、一般細菌数、従属栄養細菌数とも不検出(OCFU/mL)であり、継続的に細菌類の不検出状態を維持できている。

本浴槽においては、ポーラログラフ式の全残留塩素濃度の測定計器(イワキ製 CL-310W-IA 型)による連続測定を行なっている。その状況を図9に示す。

本浴場施設では、全残留塩素濃度の常時 3mg/L 以上の維持に加え、徹底的な殺菌洗浄を毎日行なうことにより、温泉浴槽水中の細菌類を、レジオネラ属菌のみならず一般細菌数、従属栄養細菌数までも不検出状態に維持することが出来ている。

#### D. 結論

①結合型塩素剤として、モノクロラミンとクロラミンBを比較した結果、クロラミンBは微生物類の増殖抑制効果は認め

られるが、すでに存在している微生物、バイオフィルムを形成している水系においては殺菌効果が弱く、実用的に使用が難しいと判断された。

②モノクロラミンは、バッチ式試験条件では次亜塩素酸 Na と遜色ない殺菌効果が認められた。

③すでに微生物汚染があるモデル浴槽水系において、浴槽水中にモノクロラミンを 2mg/L 以上の濃度で連続的に維持することで、レジオネラ属菌、アメーバを不検出にできた。また、一般細菌数、従属栄養細菌数もほぼ不検出に近くすることが出来た。

④モデル浴槽において、モノクロラミン 2mg/L 以上を連続的に維持することで、バイオフィルムを殺菌することが出来た。

⑤モノクロラミン液は 2.7%濃度では短時間出で pH が低下するので、調製後直ちに使用する。24 時間程度保管して使用する場合は、クロラミン濃度を 1000mg/L (塩素濃度として) 程度にする必要がある。

⑥アンモニウムイオンを含む温泉浴槽水の管理方法として、全残留塩素濃度 3mg/L 以上を常時維持、及び毎日の循環殺菌洗浄の併用により、レジオネラ属菌、一般細菌数、従属栄養細菌数を不検出状態で運用できている。

⑦全残留塩素濃度のポーラログラフ式計器による連続測定により、管理の高度化、自動化が行なわれることが期待されている。

#### E. 研究発表

なし

#### F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

図1 モデル循環式浴槽水の写真

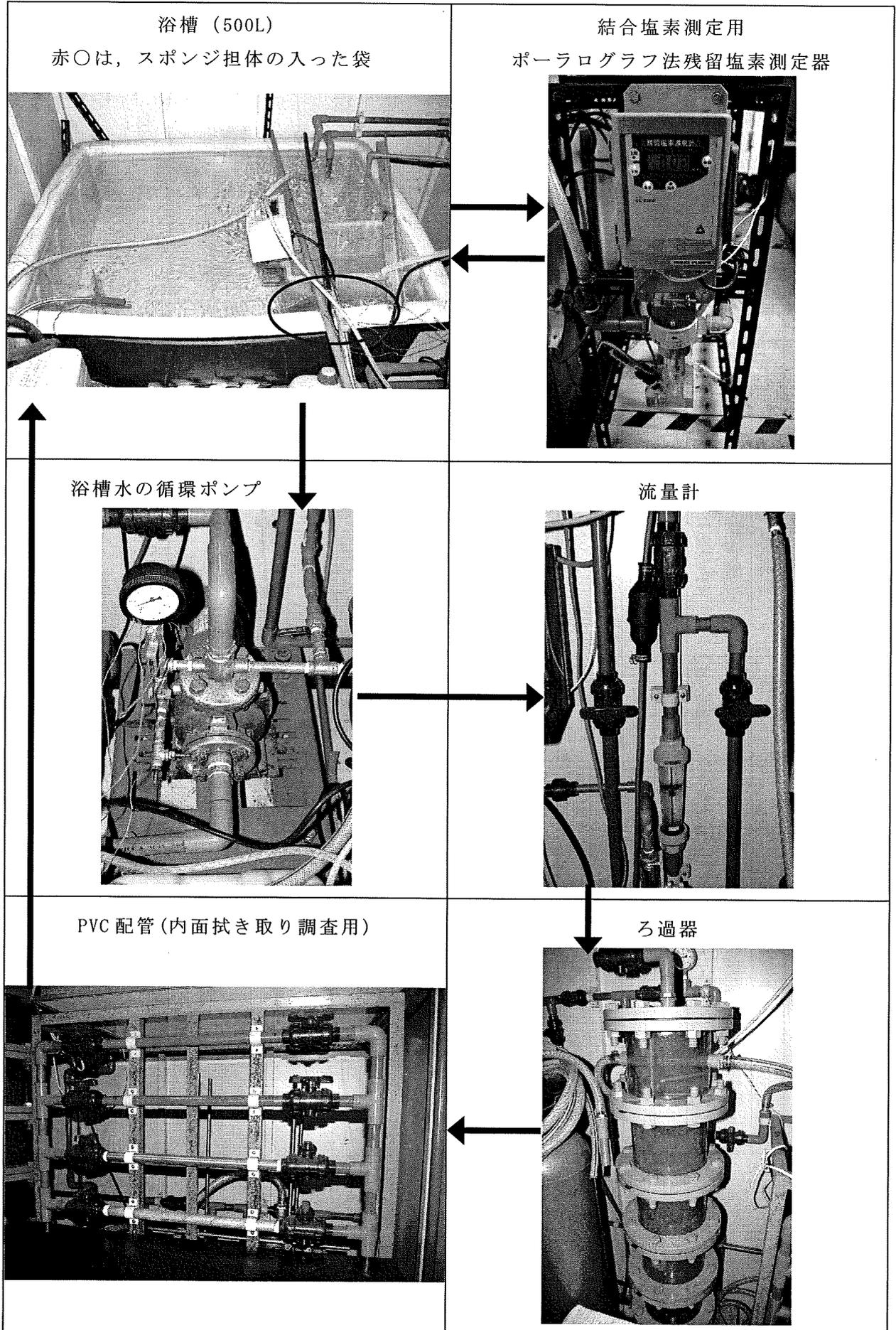


表 1 バイオフィルム抑制試験、水中の細菌数等の推移

項目	①無処理			②次亜塩素酸Na			③クロラミンB		
	試験水			試験水			試験水		
	一般細菌 (CFU/mL)	従属栄養 (CFU/mL)	ATP ( p mol/L)	一般細菌 (CFU/mL)	従属栄養 (CFU/mL)	ATP ( p mol/L)	一般細菌 (CFU/mL)	従属栄養 (CFU/mL)	ATP ( p mol/L)
12/6 0 日									
12/7 1 日	2700	5100	32	0	0	10	0	250	22
12/10 4 日	460000	520000	190	1	0	8	250	1500	16
12/13 7 日	560000	890000	350	0	0	8	1	7900	28
12/17 11 日	300000	1800000	690	7	10	3	0	2700	13
12/20 14 日	180000	230000	820	0	2	45	0	1400	21
12/25 19 日	75000	480000	630	3	5	120	4	700	23
12/27 21 日	91000	1200000	840	1	1	10	100	1000	19

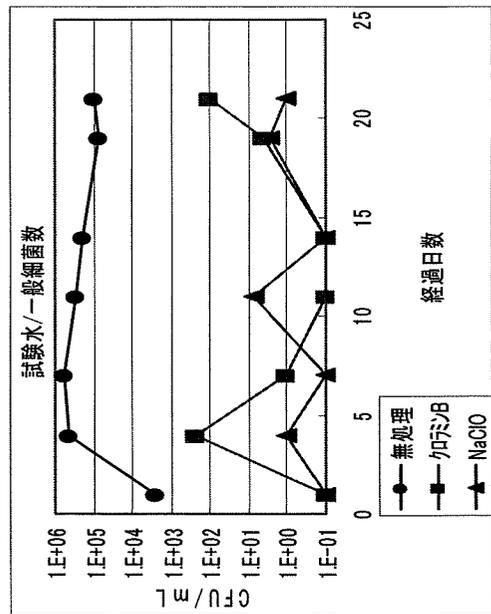


図 2. 一般細菌数の推移

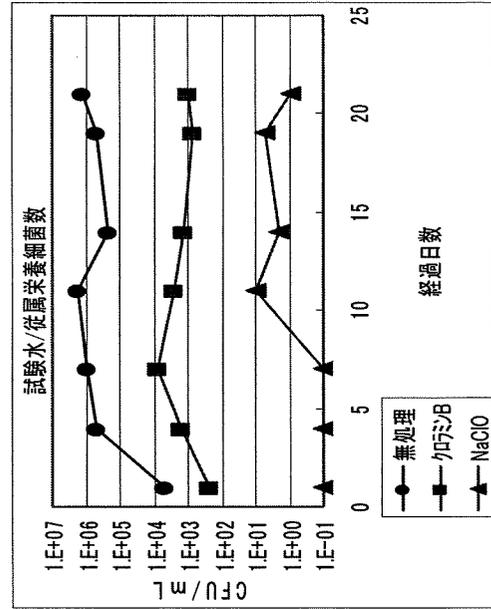


図 3. 従属栄養細菌数の推移

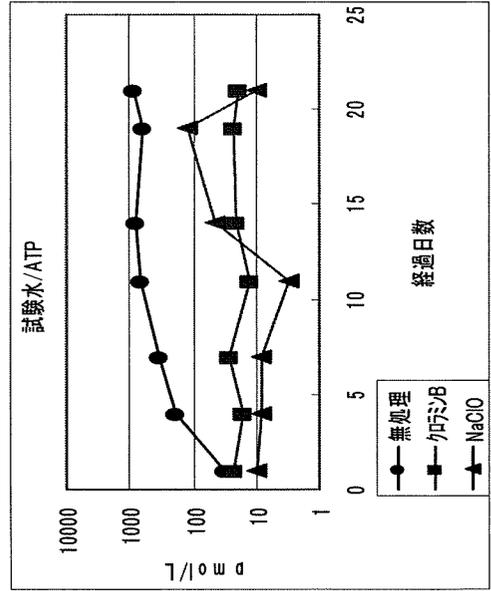


図 4. ATP 値の推移

表 2 バイオフィルム抑制試験、シリコンゴムの細菌数等の推移

項目	①無処理				②次亜塩素酸 Na				③クロラミン B			
	シリコンゴム板				シリコンゴム板				シリコンゴム板			
	一般細菌 (CFU/mL)	従属栄養 (CFU/mL)	ATP ( p mol/L)									
12/6 0 日												
12/7 1 日	3000	3400	19	3	2	15	0	14	17			
12/10 4 日	3200000	4100000	6900	1	25	16	560	7500	17			
12/13 7 日	520000	800000	640	1200	3600	15	8400	14000	26			
12/17 11 日	640000	860000	640	75	190	11	540	2000	130			
12/20 14 日	120000	640000	640	0	40	17	34	1400	46			
12/25 19 日	32000	150000	480	51	150	21	850	2100	23			
12/27 21 日	130000	360000	410	25	42	27	49	330	16			

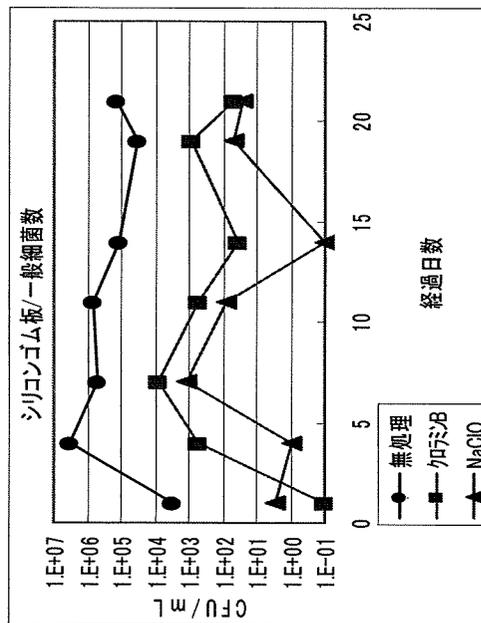


図 5. 一般細菌数の推移

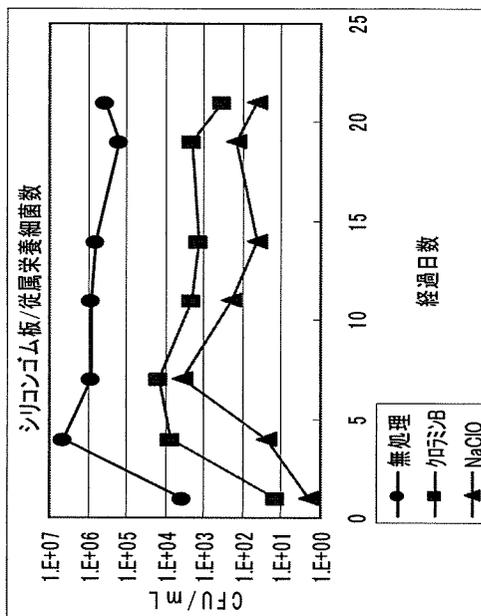


図 6. 従属栄養細菌数の推移

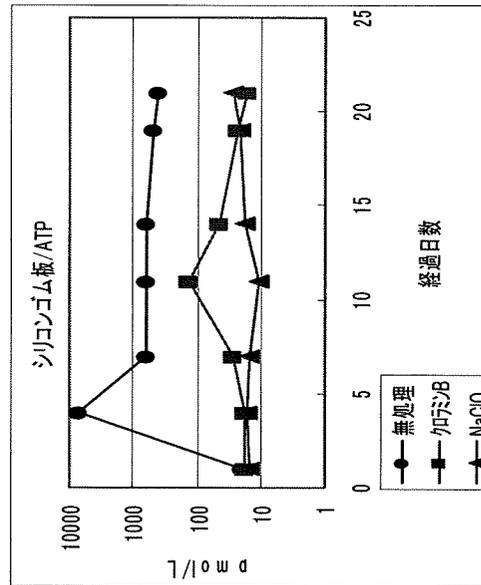


図 7. ATP 値の推移

表 3 試験終了時の水質分析結果

試料名	無処理	NaClO	クロラミンB
pH	7.9	7.8	7.7
電気伝導率 (mS/m)	29	50	32
全硬度 (CaCO <sub>3</sub> )	77	70	69
カルシウム硬度 (CaCO <sub>3</sub> )	50	43	42
マグネシウム硬度 (CaCO <sub>3</sub> )	27	27	27
塩化物イオン	38	87	54
酸消費量 (pH4.8) (CaCO <sub>3</sub> )	52	69	37
シリカ	3	3	3
過マンガン酸カリウム消費量	27	32	140

単位：pH, 電気伝導率 (mS/m) を除き mg/L

表 4. バッチ試験のレジオネラ属菌数

接触時間	無処理	レジオネラ属菌数(CFU/100mL)		
		モノクロラミン 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )	NaClO 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )	クロラミンB 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )
接触前	5100	5100	5100	5100
30分	3800	<10	<10	2100
1時間	5400	<10	<10	5200
3時間	1900	<10	<10	3200
24時間	400	<10	<10	0

表 5. バッチ試験の一般細菌数

接触時間	無処理	一般細菌数(CFU/mL)		
		モノクロラミン 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )	NaClO 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )	クロラミンB 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )
接触前	2300	2300	2300	2300
30分	2300	6	9	16
1時間	2500	7	<1	15
3時間	4000	7	<1	16
24時間	53000	<1	<1	15

表 6. バッチ試験の従属栄養細菌数

接触時間	無処理	従属栄養細菌数(CFU/mL)		
		モノクロラミン 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )	NaClO 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )	クロラミンB 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )
接触前	7100	7100	7100	7100
30分	7700	33	6	200
1時間	10000	33	6	150
3時間	12000	20	6	120
24時間	870000	<1	<1	140

表 7. バッチ試験のアメーバ数

接触時間	アメーバ数(PFU/100mL)			
	無処理	モノクロラミン 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )	NaClO 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )	クロラミンB 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )
接触前	1200	1200	1200	1200
30分	600	<2	<2	36
1時間	800	<2	<2	8
3時間	500	<2	<2	6
24時間	200	<2	<2	<2

表 8. バッチ試験の A T P

接触時間	ATP(p mol/L)			
	無処理	モノクロラミン 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )	NaClO 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )	クロラミンB 3mg/L(as Cl <sub>2</sub> )
接触前	97	97	97	97
30分	100	2	1	43
1時間	120	10	6	33
3時間	130	1	0	23
24時間	560	17	11	19

表 9. バッチ試験の残留塩素濃度の挙動

接触時間	残留塩素(mg/L asCl <sub>2</sub> )							
	無処理		モノクロラミン		NaClO		クロラミンB	
	全塩素	遊離塩素	全塩素	遊離塩素	全塩素	遊離塩素	全塩素	遊離塩素
接触前	0	0	2	0.5	0	2~3	3	0.5
30分			2~3	0.5	0	1.4~2~3	3	0.5
1時間	0	0	3	0.5~0.7	0	2~3~3	3	0.5
3時間			2~3~3	0.4	0	2~3~3	3	0.4
24時間	0	0	0.7	0	0	0.2	3	0

表 10. 第 1 回目モデル循環式浴槽試験 (モノクロラミン) の浴槽水

接触時間	レジオネラ属 菌数 (CFU/100mL)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)	全塩素 (mg/L asCl <sub>2</sub> )	遊離塩素 (mg/L asCl <sub>2</sub> )
接触前	850	97	19000	39	0	
10分	200	12	97	75	2~3	0.4~0.7
30分	<10	10	61	39	2~3~3	0.7~0.7
1時間	<10	2	110	41	3	0.5
3時間	<10	2	78	33	3	0.3
24時間	<10	<1	31	2	1.6	<0.1

表 1 1. 第 2 回目モデル循環式浴槽試験 (クロラミンB) の浴槽水

接触時間	レジオネラ属 菌数 (CFU/100mL)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)	全塩素 (mg/L asCl <sub>2</sub> )	遊離塩素 (mg/L asCl <sub>2</sub> )
接触前	6200	4000	140000	105	0	
10分	3900	1400	37000	72	3	0
30分	2200	2100	23000	39	2.8→3	0→0
1時間	1400	1100	20000	29	3	0
3時間	3000	1600	16000	19	2.7→3	0→0
24時間	650	7100	130000	33	2	0→0

表 1 2. 第 1 回目モデル循環式浴槽試験 (モノクロラミン)  
のスポンジ担体のデータ

接触時間	レジオネラ 属 (CFU/mL)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)
接触前	60	580	520000	2500
10分	-	-	-	330
30分	-	-	-	160
1時間	-	-	-	130
3時間	-	-	-	260
24時間	<10	6	130	11

表 1 3. 第 2 回目モデル循環式浴槽試験 (クロラミンB)  
のスポンジ担体のデータ

接触時間	レジオネラ 属 (CFU/mL)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)
接触前	690	3900	340000	4850
10分	-	-	-	5090
30分	-	-	-	3940
1時間	-	-	-	2890
3時間	-	-	-	2140
24時間	<10	1500	420000	1190

表 1 4. 第 3 回目循環式浴槽試験の浮遊性微生物と残留塩素

接触時間	ATP (p mol/L)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)	レジオネラ属 菌数 (CFU/100mL)	アメーバ数 (PFU/100mL)	全塩素 (mg/L asCl <sub>2</sub> )
接触前	192	12000	15000	39000	10	2.0
1時間	33	9100	15000	30	0	1.7→2.0
3時間	8	8100	9200	10	-	2.0
5時間	4	8800	12000	10	0	1.7→2.2
1日後	2540	1300000	1200000	30	44	<0.1→2.0
2日後	2470	560000	900000	30	100	0.5→2.5
3日後	1350	620000	550000	30	12	<0.1→2.0

注:一般細菌数の0は1未満、レジオネラ属菌数の0は10未満、アメーバ数の0は2未満を示す。

図 8. 第 3 回目循環式浴槽試験の浮遊性微生物

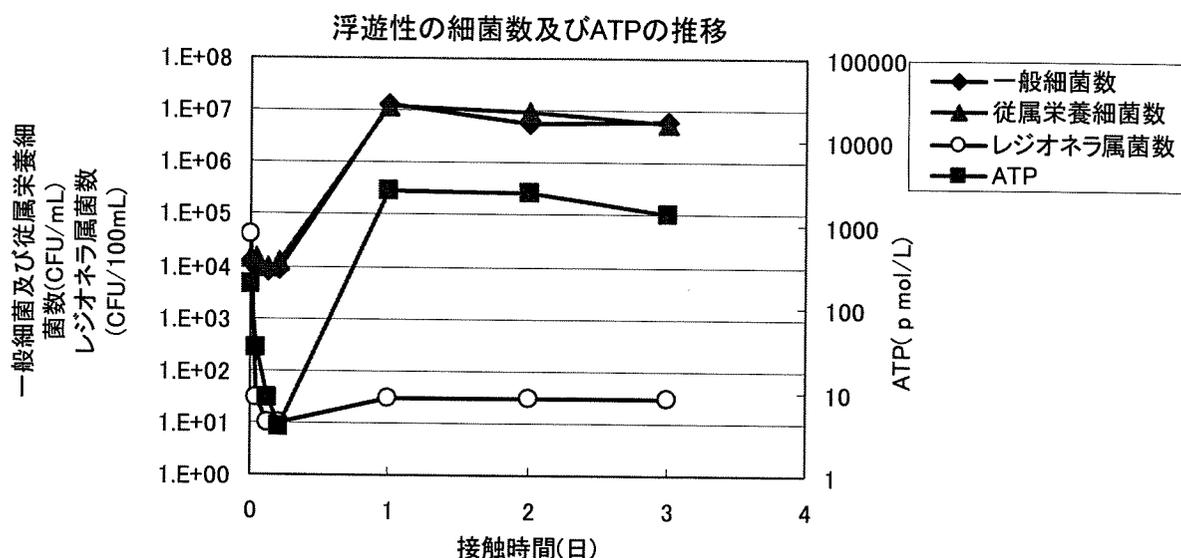


表 1 5. 第 3 回目循環式浴槽試験のスポンジ担体の微生物

接触時間	ATP (p mol/L)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)	レジオネラ属 菌数 (CFU/mL)	アメーバ数 (PFU/mL)
接触前	89740	1300000	1900000	85000	400
1時間	8690	940000	1700000	10	340
3時間	6680	790000	1600000	0	-
5時間	4760	810000	1700000	10	150
1日後	8950	4900000	6800000	0	40
2日後	2340	2000000	4100000	0	40
3日後	3950	2200000	3900000	20	17

注:一般細菌数の0は1未満、レジオネラ属菌数の0は10未満、アメーバ数の0は2未満を示す。

図 9. 第 1 回目循環式浴槽試験のスポンジ担体の微生物

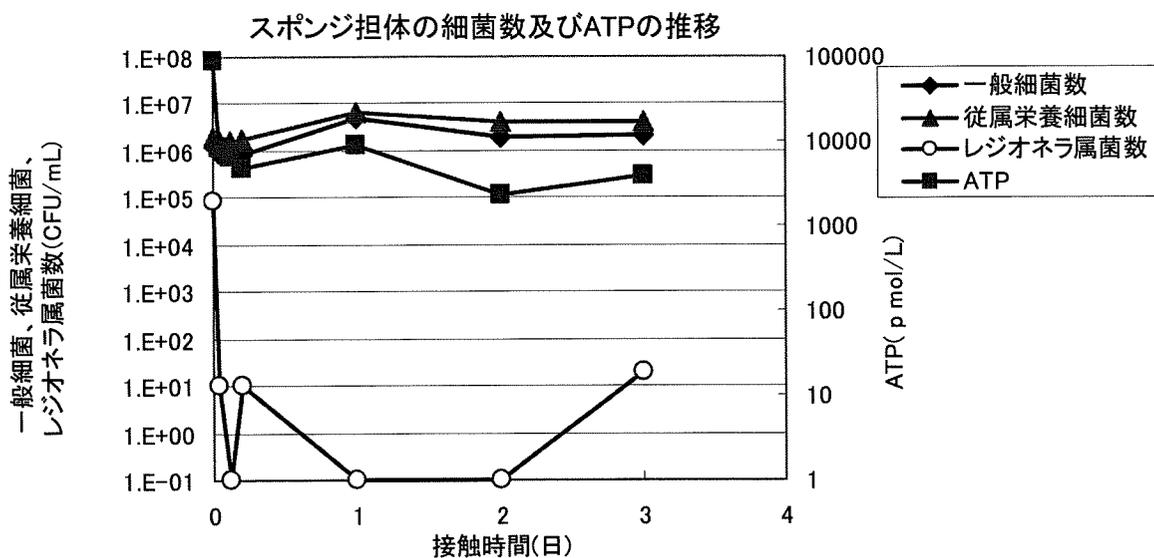


表 16. 第 3 回目循環式浴槽試験のPVC配管の微生物

接触時間	ATP (p mol/L)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養細菌数 (CFU/mL)	レジオネラ属菌数 (CFU/mL)	アメーバ数 (PFU/mL)
接触前	120	890	30000	50	140
3日後	31	240	380	0	0

注:一般細菌数の0は1未満、レジオネラ属菌数の0は10未満、アメーバ数の0は2未満を示す。

図 10. 第 1 回目循環式浴槽試験のPVC配管の微生物

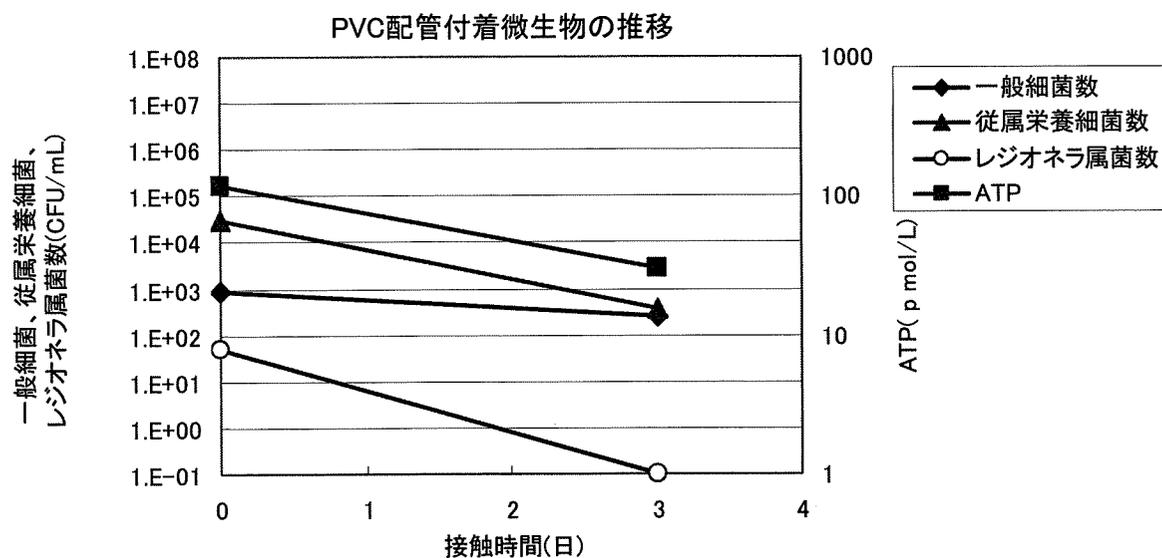


表 1 7 . 第 4 回目循環式浴槽試験の浮遊性微生物と残留塩素

接触時間	ATP (p mol/L)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)	レジオネラ属 菌数 (CFU/100mL)	アメーバ数 (PFU/100mL)	全塩素 (mg/L asCl <sub>2</sub> )
接触前	226	31000	130000	2300	400	2.0
1時間	60	5500	11000	10	0	2.0
3時間	63	770	1500	0	-	1.6→2.1
5時間	54	18	36	0	0	2.0
1日後	19	1	3	0	0	1.0→2.0
2日後	15	2	2	0	0	2.4
3日後	8	0	0	0	0	2.5

注:一般細菌数及び従属栄養細菌数の0は1未満、レジオネラ属菌数の0は10未満、アメーバ数の0は2未満を示す。

図 1 1 . 第 2 回目循環式浴槽試験の浮遊性微生物

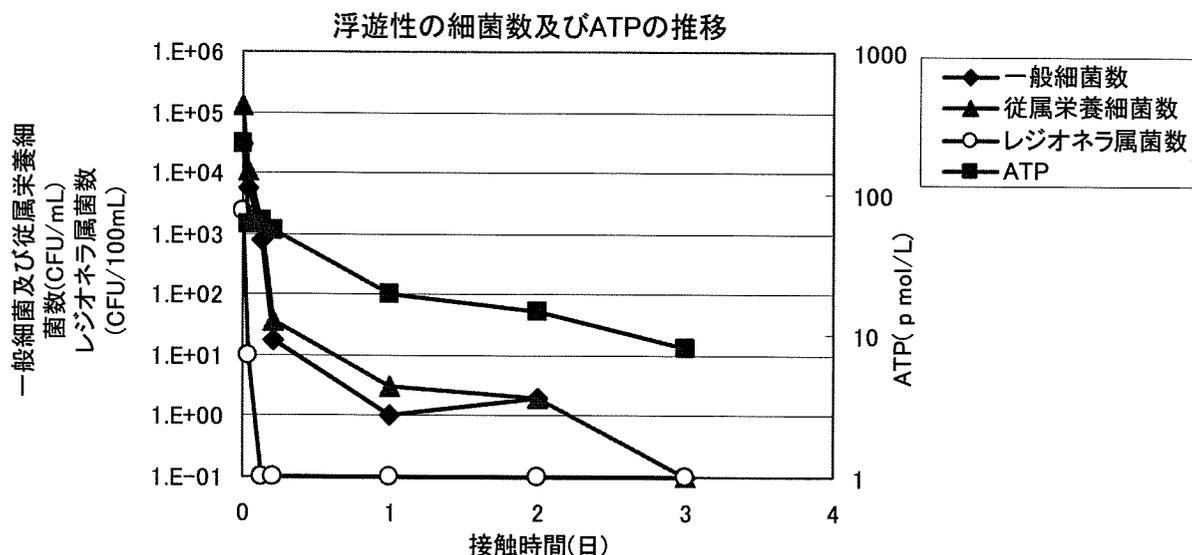


表 1 8 . 第 4 回目循環式浴槽試験のスポンジ担体の微生物

接触時間	ATP (p mol/L)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)	レジオネラ属 菌数 (CFU/mL)	アメーバ数 (PFU/mL)
接触前	113000	5000000	8600000	9900	1300
1時間	10030	280000	1100000	0	1
3時間	598	23000	210000	0	2
5時間	339	2600	17000	0	3
1日後	143	150	200	0	0
2日後	94	29	71	0	0
3日後	36	10	26	0	0

注:一般細菌数の0は1未満、レジオネラ属菌数の0は10未満、アメーバ数の0は1未満を示す。

図 1 2 . 第 2 回目循環式浴槽試験のスポンジ担体の微生物

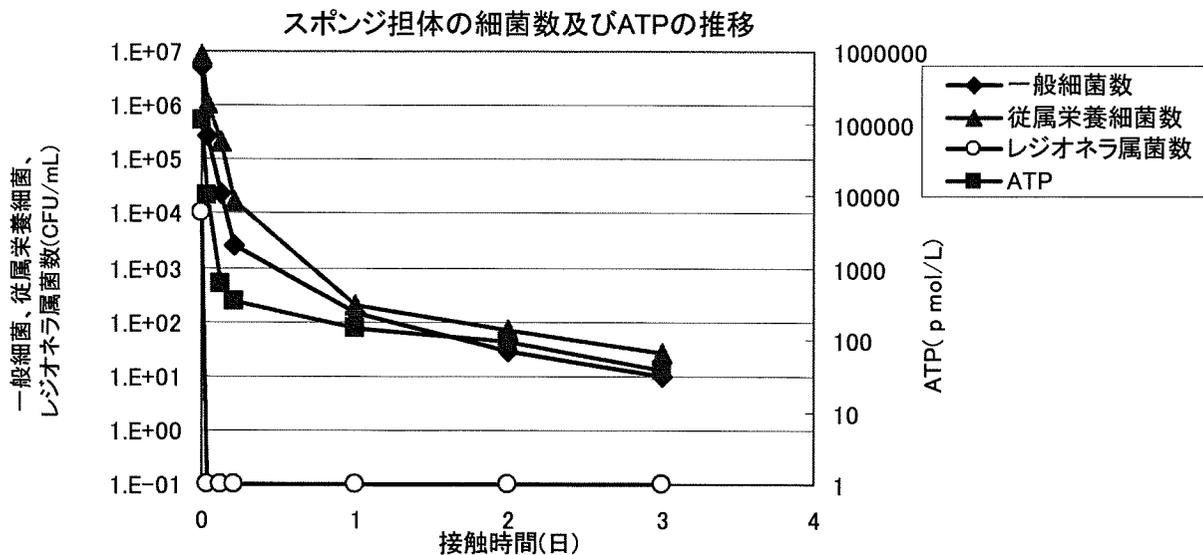


表 1 9 . 第 4 回目循環式浴槽試験のPVC配管の微生物

接触時間	ATP (p mol/L)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養細菌数 (CFU/mL)	レジオネラ属菌数 (CFU/mL)	アメーバ数 (PFU/mL)
接触前	991	400000	450000	1400	20
3日後	1	0	19	0	0

注:一般細菌数の0は1未満、レジオネラ属菌数の0は10未満、アメーバ数の0は1未満を示す。

図 1 3 . 第 2 回目循環式浴槽試験のPVC配管の微生物

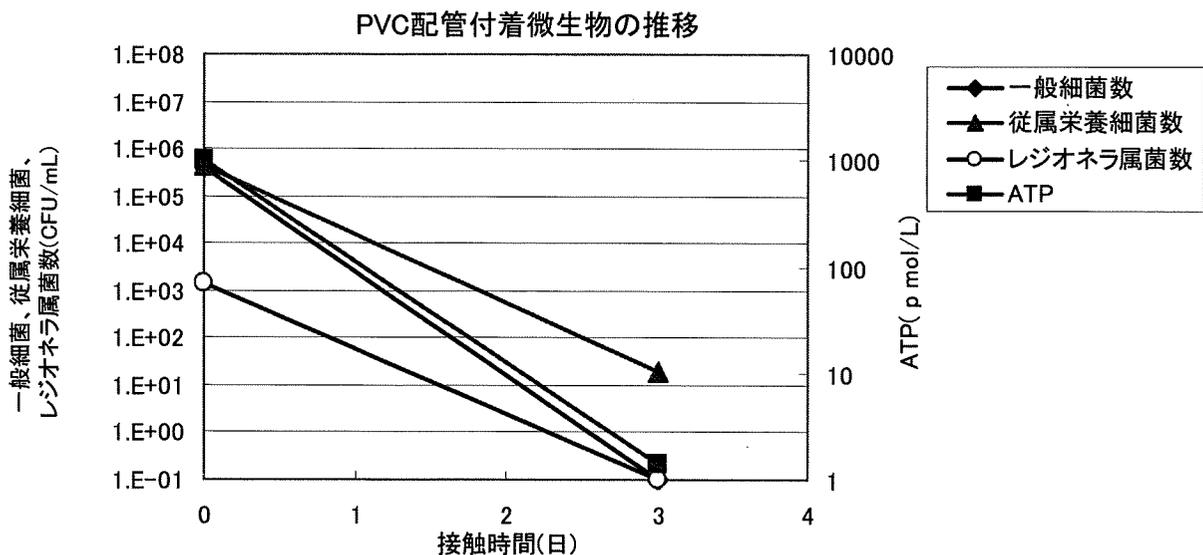


図 1 4 . 循環式浴槽試験（2回目）の全残留塩素濃度の測定結果

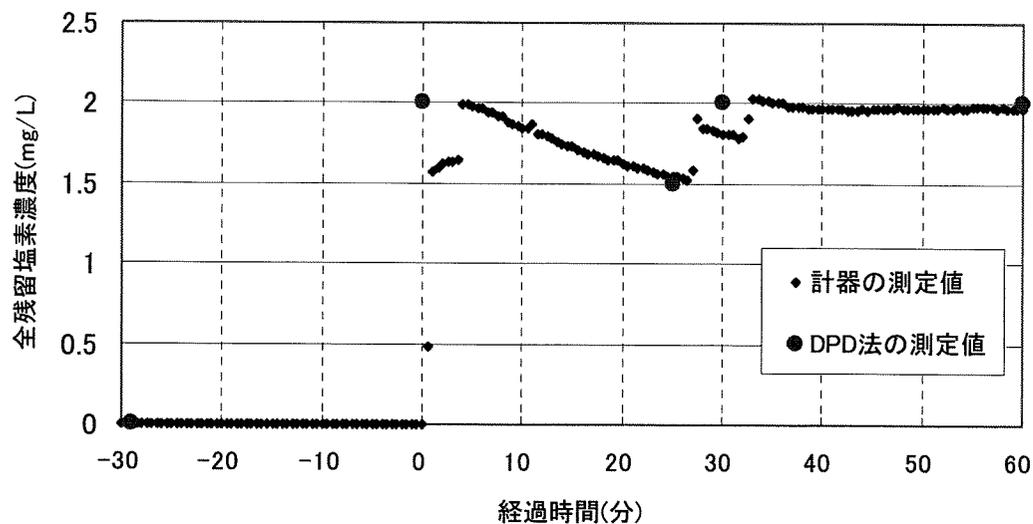


図 1 5 . 実際の温泉浴槽水の全残留塩素濃度の連続測定の様子



中央の計器が全残留塩素濃度を測定する計器であり、連続測定している。  
左右の計器は、遊離残留塩素濃度を測定する計器である。

公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究  
フローサイトメ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) 入浴施設において、フローサイトメリー (FCM) を、レジオネラを含む細菌汚染の迅速評価に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できる監視システムを開発した。添加回収実験と細菌不活化実験により、本システムの閾値を 3000 counts mL<sup>-1</sup> と決定した。モデル実験では、循環系統中の浴槽水とろ過槽水のフローサイトメリーで計数された粒子数は、従属栄養細菌の消長とほとんど重なる推移を示し、閾値によりレジオネラ菌の存在を探知できた。フィールド調査におけるこの閾値による判定結果は、レジオネラ属菌培養検査(検出限界 100 cfu L<sup>-1</sup>)の定性結果に対して、感度が 95%、特異度が 84%であり、全体として 89.5%という高い有効性を示した。これらのことから、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

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、フローサイトメリー (FCM) を入浴施設の衛生管理に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。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。次に、モデル実験においてレジオネラ菌を自然発生させ、最後に、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. 試料水と使用菌株

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)。表 2 に供試菌株を示した。

##### B-2. FCM 測定と添加回収実験

FCM による全細菌数測定は、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(図 1)。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 PBS を用いて、3 標準菌株の添加回収実験を行った。

##### B-3. 細菌不活化実験

次亜塩素酸ナトリウムにより室温で 20mg/L× 90 分間反応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た。

##### B-4. モデル実験

実験用循環式浴槽にて、徹底した清浄化操作、低濃度塩素管理下の入浴、塩素消失、および塩素再消毒の工程により、レジオネラを含む汚染微生物を自然発生させて、その消長を観察した。培養検査として従属栄養細菌数検査、アメーバ検査、およびレジオネラ属菌検査を実施し、スクリーニング検査としては、フローサイトメトリー、ATP 検査、およびレジオネラ属菌の定量PCRを実施し、理化学検査として遊離残留塩素濃度と全残留塩素濃度を測定した。

#### B-5. 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、循環系統の異なる浴槽水から採水した 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測定した。

### C. 研究結果

#### C-1. 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(図 2)。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全て 3000 counts mL<sup>-1</sup> 未満を示した。

#### C-2. 細菌不活化実験

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)。塩素処理後の FCM 測定値は、3 種類の細菌を 6 試料水に添加した疑似試料において、全て 3000 counts mL<sup>-1</sup> 未満を示し、蛍光顕微鏡検査や培養検査でも不活化された結果であった。

#### C-3. モデル実験

循環系統中の浴槽水とろ過槽水のフローサイトメトリーで計数された粒子数は、従属栄養細菌の消長とほとんど重なる推移を示し、閾値によりレジオネラ菌の存在を探知できた(図 3)。

#### C-4. フィールド調査

系統の異なる浴槽水 149 試料のうち、測定値が

1mL あたり 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ず、3000 個を超えた 56 試料では 39 試料からレジオネラ菌が検出された(図 4a)。これらをレジオネラ検査と対比した時の感度は 95%で、特異度は 84%であり(図 4a 挿入図)、同検査スクリーニングの有効度は 89.5%であった。一方で、入浴施設の管理基準である遊離塩素濃度を指標として度数分布を作成し(図 4b)、法定管理基準の下限値 0.2 mg L<sup>-1</sup> を閾値とすると、本検査法のレジオネラ検査に対する感度は 41%で、特異度は 88%であり、有効度は 64.5%にすぎなかった(図 4b 挿入図)。

### D. 考察

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、10<sup>5</sup> 個の細菌を含む試料の消毒後の測定値は、全て 3000 個未満であった。フィールド調査の成績をみると、明らかに 1mL あたり 3000 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 4a)。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のではないかと考えられた。

### E. 結論

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<sup>-1</sup> と決定された。添加回収実験、細菌不活化実験、モデル実験およびフィールド調査の成績は、この閾値により泉質や菌種の影響を受けずに浴槽水の清浄度を評価でき、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を示していた。本システムは、短時間測定であることから、現地での衛生管理への適用が強く期待される。

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

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

<sup>d</sup> ジメチル-*p*-フェニレンジアミン法により測定, <sup>e</sup> R2A 培地法により測定, <sup>f</sup> 100倍ろ過濃縮法により測定, <sup>g</sup> 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

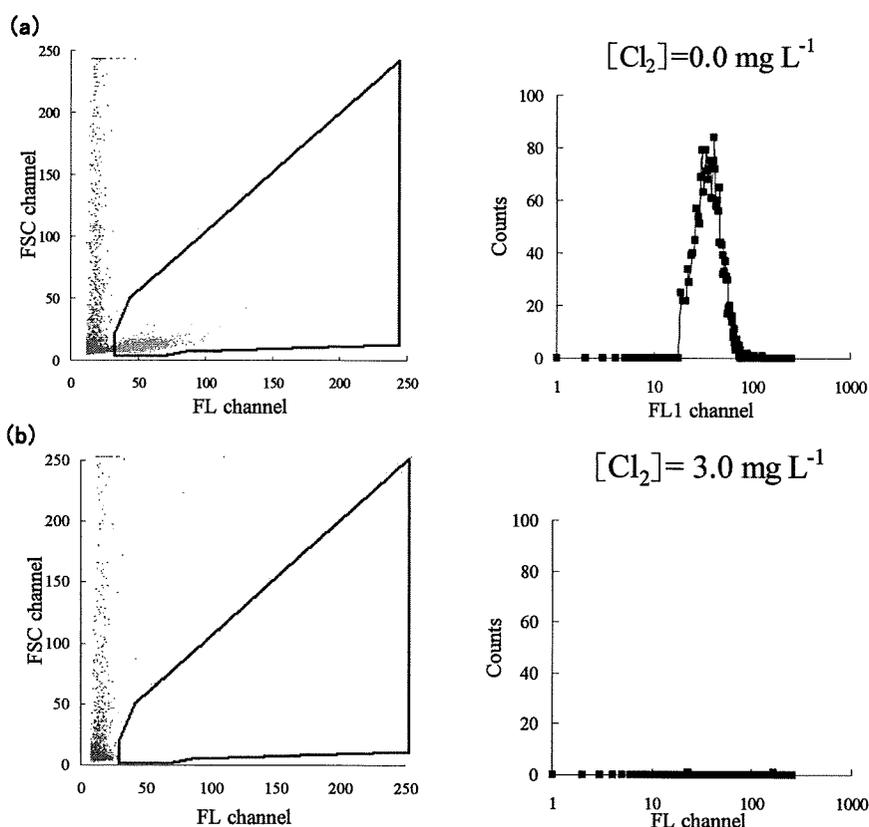


図1 - フローサイトメトリー解析により得られた浴槽水散布図の比較

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<sup>-1</sup> および (b) 3 mg L<sup>-1</sup> で処理した大腸菌 (約10<sup>5</sup> cfu mL<sup>-1</sup>) 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)。

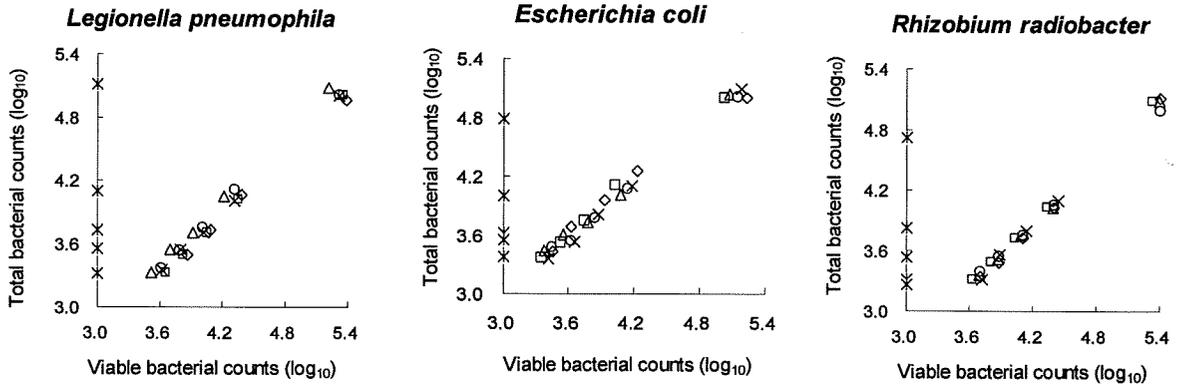


図2 - フローサイトメトリーによる全細菌数測定に対する温泉水質の影響  
*Legionella pneumophila*、*Escherichia coli*、および*Rhizobium radiobacter*が、塩化物/炭酸水素塩泉(Δ)、塩化物泉(○)、単純酸性泉(\*), 単純アルカリ泉(□)、井水(◇)、およびリン酸緩衝生理食塩水(×)に加えられた。各試料は、約 $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、5000、3000、そして2000 counts mL<sup>-1</sup>に調製され、フローサイトメトリー法と生菌数測定法で測定された。

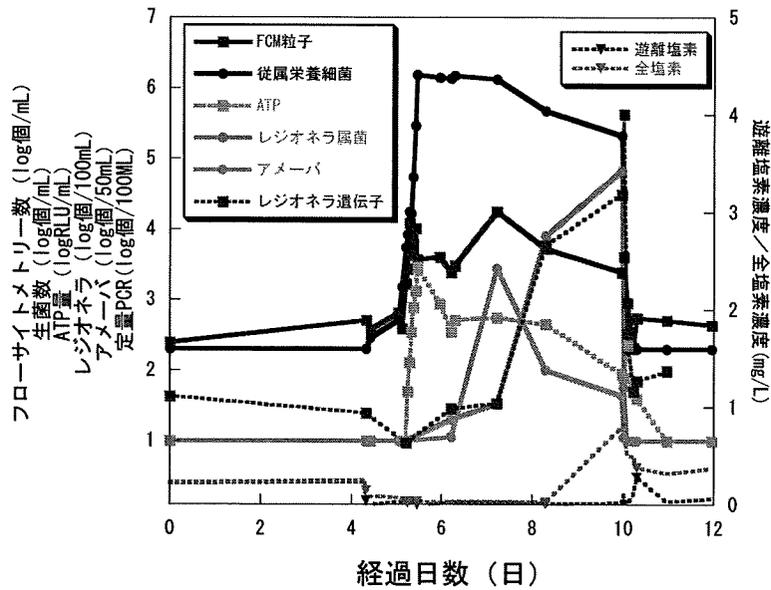


図3 各種検査結果の推移 (実験2)

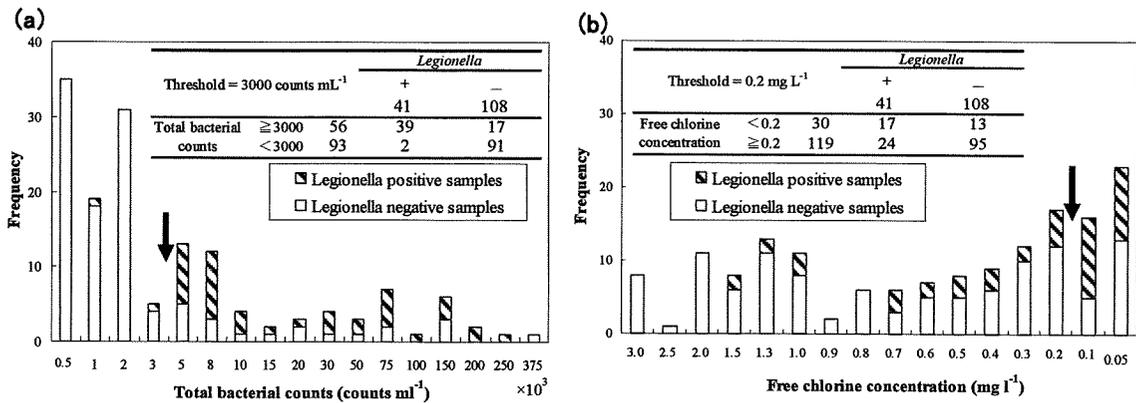


図4 - レジオネラ属菌定性結果で分別した各種検査法における度数分布の比較  
 (a) フローサイトメトリーにより計測された全細菌数と (b) ジエチル-p-フェニレンジアミン法による遊離残留塩素濃度。矢印は各検査法の閾値を示す。挿入図は、各種検査法判定結果とレジオネラ属菌検査結果のクロス集計表を示す。

## 分担研究

公衆浴場等におけるレジオネラ汚染防止に係わる消毒法に関する研究  
－消毒剤の種類と浴槽への適用について－

坂上 吉一 所属： 近畿大学農学部  
秋山 茂 所属： 北里大学医療衛生学部

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学的生態の特殊性から、効果的な消毒方法が確立されていないのが現状である。確固たる消毒法を確立するためには、消毒剤の有効性を見直すことが重要性である。本研究では、市販されている各種消毒剤および抗菌剤の中から、レジオネラの消毒に適用出来る可能性を有すると考えられるヒノキチオールおよび過酢酸を選定し、レジオネラの殺菌実験を実施した。なお、得られた結果をもとに、浴槽および配管の消毒剤としての適用性について考察した。

**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効果的に殺菌消毒する必要がある。また、配管等に発生する可能性があるバイオフィルムの形成を適宜予防することも必要不可欠である。その対策として、殺菌消毒剤の適正使用、オゾン水や電気分解水の使用、銀や銅イオンなどの使用、酸化チタンの光触媒作用による手法ならびに紫外線による方法などの利用が提案されている。その中で消毒剤の使用は価格面ならびに使用面等を考慮したとき、最善な方法の一つであると考えられる。

平成19年度は、消毒剤の種類と浴槽への適用と題して、消毒剤の種類と特徴等について調査し、浴槽および配管等の消毒に使用することを想定した適切な消毒剤の選定を目指した。

次に、平成20年度および21年度においては、奈良県内の温泉施設で分離されたレジオネラ属菌を使用し、循環式モデル浴槽を使用し、選定した薬剤であるヒノキチオールおよび過酢酸を使用し、循環式モデル実験装置内でのレジオネラ属菌に対する殺菌力について検証した。

**B. 研究方法：**平成19年度で調査並びに選定した消毒剤および抗菌剤を使用し、循環式モデル浴槽におけるレジオネラ属菌の増殖阻止効果を詳細に検証した。以下に、各年度における検討結果を示す。

## 「消毒剤の種類と浴槽への適用」(平成 19 年度)

### はじめに

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消毒する必要がある。また、配管等に発生する可能性があるバイオフィルムの形成を適宜予防する対策も必要である。そのためには殺菌消毒剤の適正使用、オゾン水や電気分解水の使用、銀や銅イオンなどの使用、酸化チタンの光触媒作用による手法ならびに紫外線による方法などの利用が提案されている。

その中で消毒剤の使用は価格面ならびに使用面等を考慮したとき、最善な方法の一つと考えられる。

そこで最終的に消毒剤を使用する浴槽および配管等の消毒方法を提案することをめざし、今回消毒剤に対する理解を深める意味を含めて、消毒剤の種類と特徴について述べるとともに、浴槽および配管の消毒に対する適用性等について、諸文献を踏まえて解説する。

### 消毒剤の種類

現在日本国内で市販されている主要な消毒剤はアルコール系、アルコール配合剤、アルデヒド系、ハロゲン化合物(塩素系、ヨウ素系)、界面活性剤系(陽イオン、両性)、ビグアナイド系、フェノール類および過酸化剤等に分類される。

スポルディングの分類<sup>1)</sup>によれば、消毒剤はその活性の強さから、高水準、中水準および低水準に分類される。高水準の消毒剤は、アルデヒド系および過酸化剤(過酢酸、他)が、中水準の消毒剤は、ハロゲン化合物(塩素系、ヨウ素系)、アルコール、アルコール配合剤およびフェノール類が該当する。また、低水準の消毒剤としては、界面活性剤系(陽イオンおよび両性系)およびビグアナイド系消毒剤が該当する。

### 主要な消毒剤の特徴

クロルヘキシジン製剤(ビグアナイド系消毒剤)、逆性石けん(陽イオン界面活性剤系消毒剤)および両性界面活性剤系消毒剤は、一般細菌や酵母様真菌に効果を示す低水準消毒剤である。クロルヘキシジン製剤は皮膚に残留し、消毒効果が持続するが、粘膜への使用により、ショックの発現が報告されている。陽イオン界面活性剤系消毒剤および両性界面活性剤系消毒剤は、皮膚に対する刺激性が少なく、においも殆どないため、皮膚や粘膜の消毒に用いられる。また、金属やリネンに対する腐蝕作用が少ないため、器具や環境の消毒にも汎用される。しかし、微生物汚染を受けやすい点が欠点である。この点はクロルヘキシジン製剤でも同様である。

ヨウ素系消毒剤は、ほとんどの細菌・ウイルスに対して効果を示す中水準消毒剤である。皮膚に残留し、消毒効果が持続する。金属に対して腐蝕作用があり、またヨード過敏症があらわれることがある。塩素系消毒剤も、中水準消毒剤であるが、長時間作用させると、芽胞菌に対して効果を発揮する。有機物との接触に

より分解され、また、比較的短時間で成分が揮発するため、低毒性である(換気には注意が必要)。しかし、金属に対して腐蝕作用があるので、金属器具には使用できない。なお、酸との混合で、塩素ガスが発生するので注意が必要である。蓋付きの浸漬容器を用い、換気をよくして使用する必要がある。

高水準消毒剤であるグルタール製剤(グルタルアルデヒド、他)は、人体には適用できなく、器具類(医療分野では内視鏡等)の消毒に汎用される。

### レジオネラ属菌の低減化対策に関する研究報告(国内の文献)

レジオネラ属菌に対する殺菌効果について取り上げた報告(消毒剤、その他)は多い。今回、国内における主要な研究報告について概説する。

上田<sup>2)</sup>は四級アンモニウム塩製剤(10ppm)と次亜塩素酸ナトリウム溶液 0.2ppmの併用で、反応1時間後にはレジオネラ属菌が死滅したと報告している。宮本ら<sup>3)</sup>は、レジオネラ属菌の除菌対策として(1)給湯水を75℃で24時間循環させながら末端給湯類で放水を1年に1回行うこと、(2)貯湯槽の清掃、(3)給湯水温を66℃に上げて維持管理することを実施し、汚染は検出限界以下(5CFU/100mL)になったと報告している。新里<sup>4)</sup>は、定着したレジオネラ属菌を除去するには、貯湯槽の清掃のみならず、加熱処理の併用が効果的であると報告している。レジオネラ属菌は60℃、1分間で99%が死滅するため、給湯温度は給湯系のどの部位においても55℃以上に保持し、給湯使用量のピークにおいても50℃を下まわらないように監視することが必要であると報告している。小出ら<sup>5)</sup>は、温水タンクの水温を70℃に設定したところレジオネラ属菌は検出されなくなったとしている。また、給湯系を含む院内感染の防止対策では、アメリカ疾病予防センター(CDC)の作成した指針があり、患者が発生したことがある病院では、給水系の末端蛇口で50℃以上または20℃以下、残留塩素濃度1から2ppm(mg/L)を保つなどの対策を要求していると報告している。江崎ら<sup>6)</sup>は、レジオネラ属菌は発育に時間がかかるため、毎日消毒をおこなえば増殖を抑えることができる(1日1回、遊離残留塩素濃度2mg/Lの次亜塩素酸ナトリウムの添加により、レジオネラ属菌の増殖を抑制。)と報告している。石井<sup>7)</sup>は、レジオネラ属菌が共存する原生動物のシストに50ppm濃度の次亜塩素酸ナトリウムを用いた場合も生存が確認されていることを示している。給湯水の場合、構造上細菌膜(バイオフィーム)ができやすい環境となり、そこに原生動物が加われば、レジオネラ属菌が生息できると考えられる。これを防ぐため週に1回ほどは60℃前後の熱い湯を流すこともレジオネラ属菌の予防対策になると思われるとしている。なお、レジオネラ属菌の増殖する環境ではその生態系を崩すような対策が必要であり、こまめな清掃や水処理剤などの添加により菌数の減少も可能であると報告している。宮田ら<sup>8)</sup>は、24時間循環風呂業者16社中6社がすでにレジオネラ防除対策として何らかの形で熱を利用していることを報告している。また、杉山ら<sup>9)</sup>や桶田ら<sup>10)</sup>は、熱水循環をすることでレジオネラ属菌を防除できると報告している。一方、縣<sup>11)</sup>は、レジオネラ属菌の殺菌処理に際しては、「実態の把握」、「処理プログラムの検討」、「処理効果の検証」などの目的で定期的なレジオネラ属菌数の検査を行うことが望ましい。また、菌数の検査結果を処理プログラムにフィードバックすることで、

殺菌剤の過剰な投入、環境への無用な排出を防ぐことが出来ると同時に、適切なレジオネラ属菌抑制が実現されると報告している。

### 浴槽用消毒剤および配管用消毒剤としての使用の可能性

レジオネラ属菌の消毒を考えたとき、浴槽用と配管用を分けて考えることが最善である。日本国内外の文献等を考慮したとき、消毒剤の組み合わせ(併用)により、より有効性が高まる可能性も考えられる。

たとえば次亜塩素酸ナトリウムとアルコール(エタノールまたはイソプロ)の併用で、バイオフィーム形成菌の増殖を十分に抑える可能性がある。いったんバイオフィームが形成されると、かなり強い消毒剤でないと効かなくなる。従って、配管等にバイオフィームが形成される以前の日常の対策が重要である。

次に、過酢酸は「におい」の問題はあるが、比較的低毒性で効果があると考えられる。しかも、使用後の環境生態系への影響は比較的少ない消毒剤である。配管にバイオフィームが形成される前に、定期的に殺菌効果の強い消毒剤で処理することはレジオネラの増殖防止に有効と考えられ、過酢酸の導入を視野に入れることも重要と考えられる。また、低濃度の過酢酸(数 ppm から数 10ppm)の使用もデータはないものの有効と考えられる。

塩素系消毒剤によるレジオネラ属菌の殺菌については、有機物の存在下では殺菌効果が著しく低下することを考慮する必要がある。

定期的な消毒剤での殺菌処理と熱殺菌(60-70℃)による手法を適宜交互に(定期的に行うことも有効であると考えられる。レジオネラは発育に時間がかかるため、毎日消毒をおこなえば増殖を抑えることができる(1日1回、遊離残留塩素濃度 2mg/L の次亜塩素酸ナトリウムの添加により、レジオネラ属菌の増殖を抑制できる。)

近年、モノクロラミンが、配管末端への到達濃度が良好であり、バイオフィームへの浸透性が遊離塩素より良好であるとされている。今後この点について具体的に検証する必要があるものと考えられる。また、週に1回程度 60-70℃前後の熱湯を配管に注入することで、バイオフィームの形成がある程度抑制される可能性が考えられる。最近、「copper-silver ionisationによる方法」や「highly charged copper-based biocides」による方法が報告されているが、今後の検討課題であると考えられる。

### まとめ

浴槽水および配管におけるレジオネラ属菌の殺菌消毒について種々の文献等を踏まえて、解説した。今後、実験等による検証作業等が必要ではあるが、現時点では配管の消毒に関してはバイオフィームの形成を抑える薬剤として過酢酸等が有効ではと判断している。

また、浴槽水に消毒に関しては、従来からの次亜塩素酸ナトリウムだけでなくモノクロラミンや安定化二酸化塩素による消毒が有効であると考えられる。また、薬剤の併用も有効な手段の一つと考えられる。さらに過酢酸については、医療分野で適用される濃度(0.2%)では若干の「におい」の問題があるが、低濃度(数 ppm