

## 資料

## 温泉水におけるレジオネラ属菌の生態及び 繁殖防止方法に関する調査研究 (第II報)

吉 國 謙一郎 中 山 浩一郎<sup>1</sup> 御供田 陸 代  
石 谷 完 二 新 川 奈緒美 藏 元 強  
宮 田 義 彦

### 1 はじめに

初年度に実施した地域別(泉質別)の実態調査, レジオネラ属菌の生態調査, 銀ゼオライト粒剤(以下, 「銀ゼオ」という。)における消毒効果試験の調査結果から, レジオネラ属菌及び一般細菌に対する銀イオンの消毒(殺菌)効果が強いことを確認した。また, 残留効果の持続及び消毒スピードが速いことも確認した。(詳細については, 本誌第5号を参照)

2年目は当センター内に, 一般に使用されている浴槽(ユニットバス)2個(約200L)を準備して, 24時間風呂装置, 一方には簡易循環装置を設置して, 実際に温泉水を循環させ, 入浴を行い調査・試験を実施した。

調査内容は, 昨年度の結果をもとに, 銀イオンにおける消毒効果試験を主体に行い, 銀ゼオ量, 設置場所等の検討も加えて調査した。また, 未消毒状況下での細菌(レジオネラ属菌も含む)の増殖・繁殖状況およびアメーバの検出状況等についても調査して, 若干の知見を得たので第II報として報告する。

### 2 調査および検査方法

#### 2.1 循環風呂における細菌の繁殖状況

2台の浴槽を利用して, 24時間風呂装置にはNa-炭酸水素塩泉を, 簡易循環装置には水道水をそれぞれ約200L入れ, 共にろ材は, 筒状のセラミック製ろ材を使用し, 温度を41℃に設定して循環した。また, 循環直後に市販の次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)で残留塩素濃度を0.4mg/Lになるよう調整した。しかし, 水漏れ, 機器の不都合も重なり, 入浴を開始できたのは循環開始から1週間後であった。この時点での残留塩素濃度は, 両方の浴槽水からも確認できなかったことから, 再度, 0.1~0.2mg/Lの範囲になるよう調整して, 入浴を2日間行った。その後, 入浴をやめ, 6日目以降, 一般細菌数およびレジ

オネラ属菌検査を平日について可能な限り毎日行い, 約3ヶ月間の動向を調査した。また, アメーバの検査についても調査期間内に3回実施した。

検査方法は, 一般細菌数が標準寒天平板菌数測定法により48時間後に測定し, レジオネラ属菌は「新版レジオネラ防止指針」に準じ, ろ過濃縮後, 酸処理法で実施した。アメーバの検査は, 国立感染症研究所によるアメーバの分離・検出マニュアルに従い検査を実施した。

#### 2.2 24時間風呂における銀イオンの消毒効果試験1

銀イオンの消毒効果試験1を開始するにあたり, 前回の調査で浴槽壁, 配管等にバイオフィルムの付着が多数認められたことから, 配管を交換するとともに, 浴槽壁等については, NaClOにて十分な清掃を行った。

両浴槽共にNa-炭酸水素塩泉200Lを使用し, 24時間風呂では銀イオンによる消毒効果試験を, 簡易循環装置は, 開始時に塩素の管理・消費試験を行い, その後は塩素注入をストップして, レジオネラ属菌増殖を図る目的で, 湯温を41℃に設定して, 約2ヶ月間循環した。

使用したろ材の種類は, 24時間風呂では循環浴場施設で広く利用されている川砂, 砂利(それぞれ2種類, 図1)を, 簡易循環装置では, 砂利(1種類)とセラミック製ろ材を使用した。

消毒効果試験における銀ゼオ量は, 昨年度の結果を基に, 菌の発育が最少量で阻止された0.0005%量から開始して, その後の結果次第で増量することを検討した。また, 銀ゼオの設置場所についても, 開始時は濾過器の吸水口近く(図1で細かい砂の上)にガーゼで包んで設置して, 移動することで消毒効果の差を検討した。

一方, 簡易循環装置における塩素消費試験は, NaClO注入後, 経時的及び入浴直後の残留塩素濃度の測定(DPD法)を行い, 残塩としての残留効果の推移を調査した。

2. 3 24時間風呂における銀イオンの消毒効果試験 2

消毒効果試験 1 の結果を踏まえて、銀ゼオ量を水量に対して 0.005% 量になるよう計量して (200 L に対して 10 g)、濾過器の排出口近くに銀ゼオを設置 (図 1) した。また、採水後、直ちに循環を開始できるようにろ材 (川砂 2 種類、砂利 2 種類) 等の準備を行い (川砂、砂利は使用前に洗浄してオートクレーブにて滅菌)、検査は、入浴前、入浴直後、入浴後 2 時間の一般細菌数の動向 (平日は検査が可能な限り実施) 及びレジオネラ属菌検査 (調査開始時、途中、終了時併せて 8 回実施) を行った。また、同時に浴槽内のバイオフィルムの有無、温泉水の変化等についても調査した。

なお、2 月 1 日と調査終了時の 3 月 14 日の検水については、タカラバイオ㈱の協力を得て、リアルタイム PCR 法でのレジオネラ属菌の検索を行った。

3 調査結果

3. 1 循環風呂における細菌の繁殖状況

24時間風呂 (Na-炭酸水素塩泉) からレジオネラ属菌が検出された報告も多いことから、当センターに設置した 24 時間風呂からもレジオネラ属菌の分離が可能であると考えられたが、約 3 ヶ月の調査期間中には、培養法にてレジオネラ属菌を検出することはなかった。

また、簡易循環装置 (水道水) での調査では、循環開始後、36 日目に 10CFU/100ml のレジオネラ属菌を確認し、37 日目に 90CFU/100ml、38 日目に 60CFU/100ml のレジオネラ属菌を検出した。しかし、検出されたのはこの 3 日間だけで、39 日目以降、調査終了時まで確認されず、繁殖に至らなかった。検出されたレジオネラ属菌は、*Legionella pneumophila* 以外の市販血清に含まれないレジオネラ属菌 (PCR 検査にて確認) であった。

一方、一般細菌数の動向は、残留塩素の消費が進むにつれ細菌数は急増して、温泉水で最大  $1.3 \times 10^6$  CFU/1ml、水道水は  $7.3 \times 10^5$  CFU/1ml まで増加し、両浴槽ともに

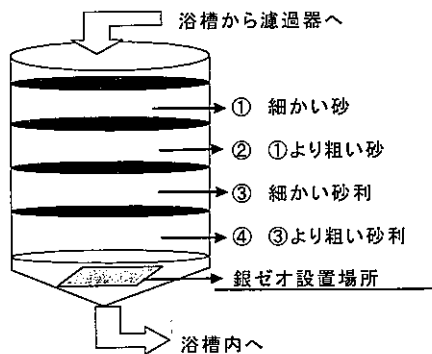


図 1 濾過器内の銀ゼオ設置場所

バイオフィルムの付着が確認された。

アメーバの検査は、循環後、3 回実施 (14 日目、20 日目、28 日目) して、両浴槽水から確認 (表 1) した。

表 1 アメーバの検査結果 (plaque/50ml)

	14 日目	20 日目	28 日目	確認したアメーバ
水道水	1	4	4	<i>Acanthamoeba, Vannella</i>
温泉水	(-)	未実施	1	<i>Hartmannella</i>

3. 2 24時間風呂における銀イオンの消毒効果試験 1

表 2 に示した①は簡易循環装置での一般細菌数、残留塩素濃度、入浴の有無を、②は 24 時間風呂における一般細菌数、入浴の有無を示した。温泉水は、両浴槽共に Na-炭酸水素塩泉を循環した。

①は塩素消費試験及びレジオネラ属菌の自然繁殖を、②は 24 時間風呂における銀ゼオの消毒効果の検討を目的として調査を行った。循環まで 8 日間が経過したため、循環前の一般細菌数は①が  $1.2 \times 10^6$  CFU/1ml、②が  $1.7 \times 10^4$  CFU/1ml と増加した中での循環スタートとなった。

増殖した細菌の消毒は、塩素消毒の方が即効性を認めたが、循環後 1 日で残留塩素濃度は 0.1mg/l となり、以降、消費されるスピードが加速された。塩素の消費と共に細菌の増殖は急上昇することを確認した。

なお、循環後 6~7 日目 (10 月 14 日、10 月 15 日) に実施した塩素の消費試験及び入浴後の経時的な残塩の推移 (表 2) から塩素管理が困難であることが判明した。

一方、銀ゼオ 0.0005% 量による消毒は、塩素消毒と比較して急激な細菌数の減少もなかったが、増加傾向も認められなかった。

10 月 21 日に銀ゼオの設置場所を濾過器の最上部からろ材の砂利の中間 (図 1 では③と④の間) に移動し、細菌の動向を比較したところ、若干の減少傾向を認めたが、場所移動による効果に大差はなかった。さらに 3 日後、銀ゼオを包んでいたガーゼを目の細かなネット網に換え、同時に、設置場所を濾過器の最下部 (排出口近く、図 1) に変更したところ、変更 3 日目 (10 月 29 日) には、61CFU/1ml まで細菌数の減少が認められた。

11 月 9 日には、銀ゼオ量を 1 オーダー多い 0.005% に増量して調査を行い、細菌数が 50CFU/1ml 以下に減少したことから、11 月 11 日以降、24 時間風呂においても入浴を開始した。その結果、11 月 9 日以降の一般細菌数は、入浴しているにもかかわらず、調査終了時 (12 月 17 日) まで、50CFU/1ml を超えることはなかった。

循環後 2 ヶ月を過ぎた 12 月 13 日、浴槽水の色に若干の変色 (茶色) を確認したが、細菌数に大きな変動は認め

表2 消毒効果試験1の調査結果

月日	経時的条件	一般細菌数 ①CFU/1ml	残塩mg/l	入浴	一般細菌数 ②CFU/1ml	入浴	備考及び問題点
10.8	循環前	1200000	0		17000		①は簡易循環装置、②は2.4時間風呂 ①②の細菌数に差が認められたのは保存状況の違い
	循環後	1000000	0		2600		
	消毒後4h	20	0.2		140		
10.9	消毒後6h	10	0.2	○	40		消毒開始①塩素②銀ゼオ
	消毒後1日	0	0.1	○	2360		
10.10	消毒後2日	-	0.1	○			塩素を足す (0.4mg/l)
10.11	消毒後3日	-	0.05	○	4400		
10.12	消毒後4日	30	0.05↓	○	5500		
10.13	消毒後5日	250	0.05↓	○	110		
10.14	消毒後6日	1400000	0	○	1500		塩素を足して (0.79mg/l) から入浴 入浴後1時間で0.79mg/lから0.07mg/lに減
	入浴後1h		0.07				
	入浴後5h		0.04				
10.15	翌朝		0.02				塩素を足す (0.93mg/l)
	30min		0.21				30分で0.93mg/lが0.21mg/lに低下
	1h		0.04	○			1時間で0.04mg/lに減少したため塩素を再注入 (1.45mg/l) して入浴
	入浴直後		0.73				入浴直後、残塩が半減
	入浴後1h	160	0.16		1700		
	入浴後2h		0.03				
	入浴後3h		0.02				入浴後3時間の残塩は、ほとんど検出されず
10.16	翌朝	-	0.01		-		
10.17		-	-		-		
10.18		680000	0		3000		
10.19		400000	0		1500		
10.20		210000	0		2000		
10.21		51000			200		②銀ゼオの位置を変える (ろ材の砂利と砂利の間に入れる)
10.22		150000			450		
10.25		100000			950		
10.26		88000			480		②銀ゼオを包んでいたガーゼを目の細かな初網に交換
10.27		10000			111		
10.28		73000			108		
10.29		55000			61		
11.1		70000			62		
11.2		90000			55		
11.4		51000			56		
11.5		47000			52		
11.8		54000			58		
		41000			38		②銀ゼオ量を1オーダー多い0.005%に変更 (200Lに対し10g)
11.9					22		
					33		
					31		
					41		
					41		
11.10		-			-		
11.11		61000			10	○	②細菌数が減少したため、入浴開始。10CFU/1mlは入浴後2h
11.12		75000			19	入浴前	
					22	入浴後2h	
11.15		140000			14	入浴前	
					10	入浴後2h	
11.16		180000			11	入浴前	
					11	入浴後2h	
11.17		180000			12	入浴前	
					11	入浴後2h	
11.18		110000			12	入浴前	
					11	入浴後2h	
11.19		-			11	入浴前	
					5	入浴後2h	
11.24		260000			10	入浴前	
					10	入浴後2h	
11.25		290000			5	入浴前	
					5	入浴後2h	
11.26		220000			3	入浴前	
					3	入浴後2h	
11.29		330000			9	入浴前	
					5	入浴後2h	
11.30		-			2	入浴前	
					2	入浴後2h	
12.1		120000			1	入浴前	
					1	入浴後2h	
12.2		130000			1	入浴前	
					1	入浴後2h	
12.3		140000			2	入浴前	
					2	入浴後2h	
12.6		150000			2	入浴前	①の消毒を銀ゼオで開始 (配管として使用したビニル管はハイフィルムで茶色)
	銀ゼオ1h後	190000			2	入浴後2h	①の銀ゼオ量は0.005%で、直接浴槽内に設置
	銀ゼオ2h後	73000					
	銀ゼオ3h後	60000					
	銀ゼオ4h後	48000					
12.7	銀ゼオ5h後	11000					
12.7	銀ゼオ1日	240			1	入浴前	
					2	入浴後2h	
12.8	銀ゼオ2日	84			17	入浴前	
					11	入浴後2h	
12.9	銀ゼオ3日	54			10	入浴前	
					8	入浴後2h	
12.10	銀ゼオ4日	25			10	入浴前	
					10	入浴後2h	
12.13	銀ゼオ5日	343			15	入浴前	②の浴槽水が若干茶色 ①の細菌数が増加
					15	入浴後2h	
12.14	銀ゼオ6日	960			14	入浴前	
					20	入浴後2h	
12.15	銀ゼオ7日	892			16	入浴前	
					35	入浴後2h	
12.16	銀ゼオ8日	1800			28	入浴前	
					20	入浴後2h	
12.17	銀ゼオ9日	2100			22	入浴前	②の浴槽水に着色が認められた以降、細菌数が若干ではあるが増加傾向
					32	入浴後2h	①の細菌数が5日間連続で増加傾向 注) -: 検査未実施

られなかった。また、浴槽壁等において、バイオフィルムの付着は、調査終了時まで確認されなかった。

一方、塩素消毒において入浴を開始した簡易循環装置は、塩素管理が困難になった10月16日以降、NaClOの注入をストップして、一般細菌数の動向を調査した。注入をやめた3日後（10月18日）には、 $6.8 \times 10^6$  CFU/1mlと調査期間内で最も多い菌数を確認した。それ以降、 $10^4$  レベル未満に減少することはなく、また、浴槽壁、配管等にバイオフィルムの付着も認められた。しかし、レジオネラ属菌は、12月5日まで培養法にて確認されなかった。このことから、細菌繁殖後における銀ゼオの消毒効果試験を12月6日より開始した。表2に示したとおり、12月6日の銀ゼオ投入前の細菌数は $1.5 \times 10^5$  CFU/1mlであったが、投入後2時間で $7.3 \times 10^4$  CFU/1ml、5時間で $1.1 \times 10^4$  CFU/1mlに減少し、24時間では240CFU/1mlまで減少した。以降4日目（25CFU/1ml）まで減少傾向が続いたが、5日目以降は、逆に増加傾向に転じて、調査終了時点の12月17日には $2.1 \times 10^3$  CFU/1mlまで増加した。

これは、循環水の細菌は銀イオンで消毒されたにもかかわらず、浴槽、簡易濾過装置、配管等で形成されたバイオフィルム内の細菌までは、消毒効果が届かず、減少を示した細菌数が、再度、増加傾向を示す結果となった可能性が疑われた。

3.3 24時間風呂における銀イオンの消毒効果試験2  
消毒効果試験1の結果から、銀ゼオ量は水量に対して0.005%に、設置場所はろ過器の最下部（排出口近く）に設置して、再度、Na-炭酸水素塩泉（源泉）で細菌が繁殖しないように、採水した当日から循環・調査できるように準備した。

今回は、消毒効果試験2として、入浴直後の検査を加えて、入浴前、入浴直後、入浴後2時間の一般細菌数の推移及びレジオネラ属菌検査を実施した。循環前の一般細菌数は、110CFU/1mlで2日目が58CFU/1ml、3日目が2CFU/1mlと細菌数の減少を確認し、1月18日から入浴を開始した。

表3 消毒効果試験2の調査結果

検査日	一般細菌数 入浴前(CFU/1ml)	一般細菌数 入浴直後(CFU/1ml)	一般細菌数 入浴後2h(CFU/1ml)	レジオネラ属菌 (CFU/100ml)	備 考
1.14	110			検出限界未満	温度39℃、残塩0
1.15	58				約15時間後のデータ
1.17	2				
1.18	1	200	3		入浴開始（約5分間）
1.19	4	403	3		
1.20	25	298	2		
1.21	7	60	7		
1.24	2	1214	3		
1.25	5	141	6		
1.26	2	71	2	検出限界未満	
1.27	19	376	3		
1.28	9	93	2		
1.31	33	615	3		
2.1	2	538	11	検出限界未満	リアルタイムPCRで約10CFU/100mlのレジオネラ属菌
2.2	50	138	3		
2.3	14	269	0		
2.4	155	359	80		
2.7	2	1572	22		
2.14	6	1440	6		1ヶ月経過するが着色無し
2.15	8	588	25		
2.16	2	655	4		
2.17	2	690	3		
2.18	3	470	3		
2.21	5	918	10		
2.22	3	564	5		
2.23	12	443	10	検出限界未満	
2.24	4	362	29		
2.25	10	470	9		
3.1	5	72	17		入浴直後の検査が30分経過
3.2	12	800	9		
3.3	32	636	12		
3.4	49	531	18	検出限界未満	
3.7	48	360	6		
3.8	10	128	20		
3.9	12	1000	15		
3.10	18	1164	46		
3.11	25	1414	10	検出限界未満	
3.14	28	870	14	検出限界未満	リアルタイムPCRで約5CFU/100mlのレジオネラ属菌
3.15	未実施	未実施	未実施	検出限界未満	調査終了

注) 検出限界未満：10CFU/100ml未満

調査開始後の検査結果を表3に、一般細菌数の動向を図2に、入浴直後からの経時的推移を図3に示した。入浴直後の細菌数は、多いときは1000CFU/1mlを超えることもあったが、2時間後には大幅な細菌数の減少を示した。また、経時的試験においても、入浴直後の細菌数が多くても、1時間経過すれば有効に消毒されることを確認した。

また、レジオネラ属菌は、全ての検査(培養法で8回)で検出されなかったが、リアルタイムPCR検査(2回実施)において、レジオネラ属菌遺伝子を確認した。これは、培養法が陰性であったことから、死菌の可能性が疑われたが、混入した菌が銀イオンにより消毒されたのか、採水した源泉に遺伝子が存在していたのか、判明には至らなかった。いずれにしても、レジオネラ属菌は、我々の身近に存在し、繁殖の機会を窺っていると思われる。

#### 4 考察およびまとめ

今年度は、初年度の結果を踏まえて、24時間風呂における試験を主体に調査を行った。消毒されない循環湯は、簡単に細菌の繁殖場所となり、併せてアメーバの定着場所ともなった。また、塩素消毒で管理された循環湯も、管理が不十分だと急激に細菌の増殖・繁殖が進行す

ることも確認した。しかし、塩素管理は困難で、入浴及びろ材の通過等の要因で、急激に消費されると思われる。

銀イオンによる消毒効果試験では、使用した銀ゼオ粒剤の質量、設置場所等を検討した結果、水量に対して0.005%量を濾過器の排出口近くに設置することで、消毒効果が最も高くなった。また、入浴後の増加した細菌を消毒するスピードが速いこと、長期間にわたり消毒効果が持続することも確認した。しかし、いったん増加した細菌の消毒には、一時的に細菌が消毒され減少したものの、数日後には増加に転じた。これは、バイオフィーム等の影響で細菌数が増加したと考えられた。このことから、すべての器具類の清掃・洗浄は必須条件であると考えられる。今回調査に使用した温泉水はNa-炭酸水素塩泉であり、他の泉質においても今回の調査と同様に、有効に消毒効果が確認されるのかが、今後の課題である。

#### 参考文献

- 1) 財団法人ビル管理教育センター；新版レジオネラ症防止指針，(平成11年11月)
- 2) 宮本比呂志，吉田真一；レジオネラ属菌の菌株による病原性の差異，臨床と微生物，25(1)，17～23(1998)
- 3) 国立感染症研究所，他；病原微生物検出情報 月報 24(2)，1～10(2003)
- 4) 岡田美香，河野喜美子，他；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，感染症学雑誌，79(6)，365～374(2005)

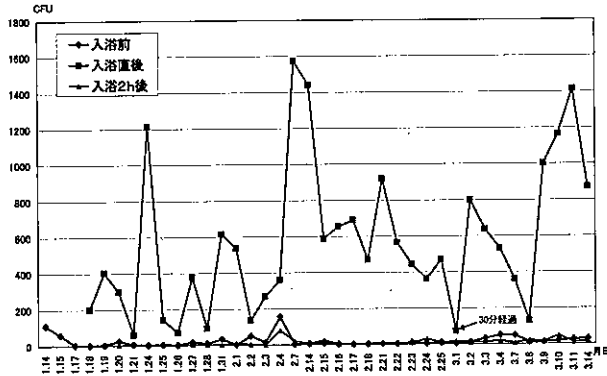


図2 一般細菌数の動向

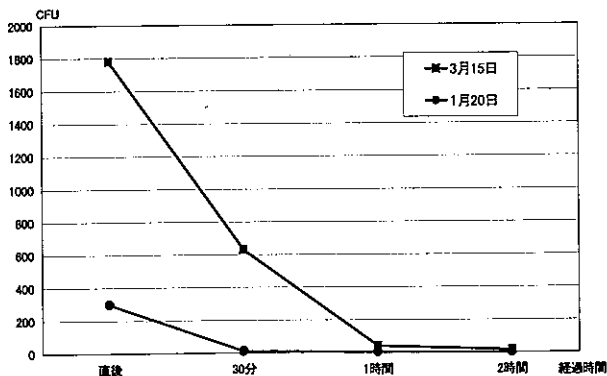


図3 一般細菌数の経時的推移