

## 資料

## 銀イオンによるレジオネラ属菌の消毒方法及び迅速検査法の確立

吉 國 謙一郎<sup>1</sup> 上 野 伸 広 御供田 睦 代  
 石 谷 完 二 新 川 奈緒美<sup>2</sup> 藏 元 強  
 宮 田 義 彦

## 1 はじめに

2003～2004年度の調査研究により、銀ゼオライト粒剤（以下、「銀ゼオ」という。）は、銀イオンの解離により、温泉水のレジオネラ属菌等に対して、消毒及び繁殖防止に役立つことが確認された（詳細については、本誌第5、6号を参照）。

今年度から新たに3年計画で、銀ゼオにおける温泉浴槽水消毒の実用化を目指して、実際に温泉施設等への協力を依頼し、詳細な消毒方法の検討を行うこととなった。

また、現在広く利用されている塩素消毒は、温泉の成分等によっては消毒効果が小さいことも判明していることから、塩素の消費試験についても調査を行った。

一方、温泉水が原因と考えられる事件発生時には、迅速な対応が求められている。しかし、現在の培養検査は、結果報告まで1週間程度の期間を有し、行政対応の遅れも指摘されている。このことから、事件発生時等に早急な行政対応が可能となるよう、リアルタイムPCR法による迅速検査方法について検討した。

## 2 調査および検査方法

## 2. 1 泉質別における銀ゼオによる消毒効果の検討

24時間風呂における銀ゼオによる消毒について、単純温泉水での入浴前、直後、入浴2時間後の一般細菌数の動向を2施設の単純温泉水（源泉水）を使用して調査した（調査方法は、本誌第6号を参照）。

## 2. 2 施設における銀イオンによる消毒方法の検討

銀イオンによる消毒方法に理解および協力が得られた温泉施設（1施設）について調査を実施した。この施設の泉質は塩化物温泉で、2 t、12 t、15 tの3個のタン

クに採水した源泉（大型タンクローリー車で輸送）を貯湯して、浴槽水として使用している。また、営業時間内に2～3回の源泉水採水、輸送、貯湯を繰り返している。調査前の消毒方法は、固形塩素剤を朝夕2回、男女それぞれの浴槽内に投与し、営業前には毎日浴槽内の清掃も実施している。

事前調査として営業終了後の浴槽水を採水し、レジオネラ属菌数、一般細菌数、大腸菌検査等を実施し、銀ゼオによる消毒開始後と比較した。

なお、銀ゼオの設置場所は、12 t、15 tタンクの底に、使用する量は以前の調査研究結果より、水量に対して0.005%量になるよう計量して設置した。

## 2. 3 温泉水における塩素消費試験

泉質によっては、塩素濃度の管理が困難であると言われている。このことから、水道水、塩化物温泉、単純温泉を利用して、施設等で広く使用されている塩素(NaClO)を投入後、経時的に残留塩素（以下、「残塩」という。）濃度を測定した。また、循環式温泉施設で利用されているろ材等を加えることで、消費時間に変化が認められるのか、残塩濃度を測定し、ろ材と残塩濃度の関係についても調査を実施した。

## 2. 4 レジオネラ属菌の迅速検査方法による検討

環境中のレジオネラ属菌検査を実施している検査機関から、検査実施済みの検体の提供を受け、培養法とリアルタイムPCR法の比較検討を行った。機器は、タカラバイオ社製のSmart cycloerV2.0bを、試薬も同社のキットを使用して実施した。

1 鹿児島県立大島病院

〒894-0015

鹿児島県奄美市名瀬真名津町18-1

2 鹿児島県川薩保健所

〒895-0041

鹿児島県薩摩川内市隈之城町228番地

### 3 調査結果

#### 3.1 泉質別における銀ゼオによる消毒効果の検討

泉質別における24時間風呂を使用した一般細菌数の動向を表1に示した。この調査結果から、銀ゼオは塩化物温泉には効果が弱く、泉質によって消毒効果が異なることが確認できた。塩化物泉においては、含まれる塩分濃度、金属イオン等の違いによる多様の泉種があり、それぞれについて検討していく必要がある。

#### 3.2 施設における銀イオンによる消毒方法の検討

事前調査の結果を表2に、銀ゼオ設置前、設置後の経時的結果を表3、表4に示した。設置前の条件として、塩素による消毒は通常の朝夕2回実施とし、銀ゼオ設置後のデータと比較した。

銀ゼオ設置後の結果は、入浴者数が多いにもかかわらず、設置前と比較して消毒効果が認められた。しかし、継続して銀ゼオによる消毒調査を実施したが、レジオネラ属菌については、数的には少ないものの、消長を繰り返す結果となった。

このため、すべてのタンクの清掃、加えて2tタンクへの銀ゼオ設置、さらに温泉水と銀ゼオの接触機会を増やすため、12tと15tタンク内にポンプ装置を設置してレジオネラ属菌の動向を観察した。

ポンプ設置後の経時的調査結果を表5に示した。一般細菌数および大腸菌等については、良好な結果を得ることができたが、レジオネラ属菌については、すべての検査から検出限界未満という結果を得ることができなかった。この原因として、泉質（塩化物温泉）と温泉施設の複雑な配管構造等が考えられた。泉質については24時間風呂での調査結果から、塩化物温泉に対し消毒効果が弱いことを確認している（表1）。施設の配管構造については、3個のタンクを結んでいる配管およびタンクと浴槽を結んでいる配管が複雑に組み込まれているため、バイオフィルムの発生箇所に清掃が行き届かず、銀イオン消毒が有効に働かないことが考えられた。また、営業終了後、配管およびタンク内に、温泉水が滞留していることも原因として考えられた。

表1 泉質別における24時間風呂を使用した一般細菌数の動向

(単位:CFU/1mL)

経過 日数	炭酸水素塩泉			塩化物温泉			単純温泉1			単純温泉2		
	入浴前	直後	2h後	入浴前	直後	2h後	入浴前	直後	2h後	入浴前	直後	2h後
1	1	200	3	31	651	74	3	150	1	4	25	2
2	4	403	3	16	416	48	1	233	1	0	23	3
3	25	298	2	334	1360	840	1	54	0	2	22	2
4	7	60	7				3	28	0			
5												
6				50	1700	40				1	20	1
7	2	1214	3	多数	884	116	0	20	3	1	28	5
8	5	141	6	1280	1680	1672	3	35	1	5	20	2
9	2	71	2	多数	多数	多数	0	55	1	3	20	50
10	19	376	3	多数	多数	多数	2	82	2	3	10	4
11	9	93	2				0	51	1			
12												
13				327	1234	542				2	20	21
14	33	615	3	675	1384	1336	0	93	5	1	12	2
15	2	538	11	多数	多数	多数	1	27	7	1	10	3
16	50	138	3	多数	多数	多数	4	76	4	1	17	2
17	14	269	0	多数	多数	多数	4	32	1	2	12	2
18	155	359	80	検査中止			2	40	1			
19												
20												
21	2	1572	22							8	28	5
22							2	268	2	2	37	75
23							2	239	2	8	118	14
24							5	197	2	1	82	10
25							0	100	1			
26												
27										1	50	24
28	6	1440	6				0	100	32	1	41	2
29	8	588	25				0	377	22	2	20	4
30	2	655	4				1	480	25	3	55	20

表2 温泉施設における事前調査結果

男女別	一般細菌数 24h(CFU/1mL)	一般細菌数 48h(CFU/1mL)	大腸菌群	大腸菌	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	血清群	アメーバ (PFU/50mL)	備考
男浴槽水	4.3×10 <sup>4</sup>	1.3×10 <sup>5</sup>	+	+	130	LpSG1, SG4	4	
女浴槽水	2.6×10 <sup>4</sup>	1.2×10 <sup>5</sup>	+	+	150	LpSG1, SG4	4	
男浴槽水	1.0×10 <sup>5</sup>	1.8×10 <sup>5</sup>	+	-	140	LpSG1, SG4	250	
女浴槽水	2.8×10 <sup>5</sup>	2.9×10 <sup>5</sup>	+	+	360	LpSG1	300	アメーバ <i>Hartmannella</i>
男浴槽水	3.2×10 <sup>5</sup>	4.5×10 <sup>5</sup>	+	+	170	LpSG1, SG10, NA	50	
女浴槽水	2.7×10 <sup>5</sup>	4.0×10 <sup>5</sup>	+	+	460	LpSG1, SG10, NA	150	
男浴槽水	2.0×10 <sup>5</sup>	2.1×10 <sup>5</sup>	+	-	210	LpSG1, SG4	未実施	
女浴槽水	1.1×10 <sup>3</sup>	1.2×10 <sup>3</sup>	-	-	170	LpSG1, SG4, SG10	未実施	

表3 銀ゼオ設置前における経時的検査結果 午後11時現在の入浴者数 男：80人 女：69人

採水時間	男女別	残塩 (mg/L)	一般細菌数 24h(CFU/1mL)	一般細菌数 48h(CFU/1mL)	大腸菌群	大腸菌	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	血清群	アメーバ (PFU/50mL)	備考
営業前 (9時30分)	男	0.02	720	810	+	-	100	LpSG1, SG4	50	マイクロを9時に投入
	女	0.02	600	610	+	-	120	LpSG1, SG4	100	
営業2h後 (11時30分)	男	0.02	2180	2930	+	+	30	LpSG1, SG4		
	女	0.02	1910	3410	+	-	40	LpSG1		
営業4h後 (13時30分)	男	0.02	24100	170100	+	+	40	LpSG1, NA		
	女	0.02	22500	95900	+	+	110	LpSG1, SG4		
営業6h後 (15時30分)	男	0.01	72000	105000	+	+	160	LpSG1, NA		
	女	0.02	52000	57000	+	+	160	LpSG1		
営業8h後 (17時30分)	男	0.01	125000	134000	+	+	280	LpSG1	400	
	女	0.02	325000	395000	+	+	200	LpSG1, SG10	250	
営業10h後 (19時30分)	男	0.03	100000	106000	-	-	検出限界未満			マイクロを19時に投入
	女	0.05	47	84	-	-	検出限界未満			
営業12h後 (21時30分)	男	0.04	60	102	-	-	検出限界未満			
	女	0.48	4	5	-	-	検出限界未満			
営業14h後 (23時30分)	男	0.02	5100	12100	+	-	150	LpSG1, SG4		
	女	0.05	37	72	-	-	10	LpSG4		
営業終了後 (AM2時)	男	未実施	200000	210000	+	-	210	LpSG1, SG4		
	女	未実施	1100	1200	-	-	170	LpSG1, SG4, SG10		

表4 銀ゼオ設置後における経時的検査結果 午前0時現在の入浴者数 男：134人 女：112人

採水時間	男女別	残塩 (mg/L)	一般細菌数 24h(CFU/1mL)	一般細菌数 48h(CFU/1mL)	大腸菌群	大腸菌	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	血清群	アメーバ (PFU/50mL)	備考
営業前 (9時30分)	男	0.05	26	35	-	-	検出限界未満		検出されず	マイクロを9時に投入
	女	0.03	36	46	-	-	20	LpSG4, NA	検出されず	
営業2h後 (11時30分)	男	0.07	38	63	-	-	検出限界未満			
	女	0.02	103	133	-	-	20	LpSG4, NA		
営業4h後 (13時30分)	男	0.03	283	315	+	+	20	LpSG1		
	女	0.02	605	675	-	-	10	NA		
営業6h後 (15時30分)	男	0.01	7700	8700	+	+	検出限界未満			
	女	0.02	16000	23000	+	+	30	LpSG1, SG4		
営業8h後 (17時30分)	男	0.01	37300	46400	+	+	60	LpSG4, NA	150	
	女	0.02	70000	105000	+	+	70	LpSG1, SG4	100	
営業10h後 (19時30分)	男	0.07	35	103	-	-	検出限界未満			マイクロを18時に投入
	女	0.05	3	5	-	-	検出限界未満			
営業12h後 (21時30分)	男	0.05	125	205	-	-	検出限界未満			
	女	0.03	21	76	-	-	20	LpSG1		
営業14h後 (23時30分)	男	0.04	6000	8500	-	-	検出限界未満			
	女	0.02	78	178	-	-	検出限界未満			
営業終了後 (AM2時)	男	0.01	432400	442800	-	-	検出限界未満			
	女	0.02	5130	5500	+	-	検出限界未満			

注) 検出限界未満：10CFU/100mL未満

LP: *Legionella pneumophila*

NA: 市販の抗血清に非凝集

表5 ポンプ設置後における経時的検査結果

2/21 時間	番号	採水場所	残塩濃度 (mg/L)	一般細菌数(/1mL)		大腸菌群 (/10mL)	大腸菌 (/10mL)	レジオネラ属菌数 (/100mL)	備考
				24h	48h				
9:30	1	2tタンク		0	75	陰性	陰性	180	
	2	12tタンク		23	708	陰性	陰性	1060	
	3	15tタンク		12	109	陰性	陰性	290	
	4	湯口(男)	0.01	0	89	陰性	陰性	80	
	5	男浴槽	0.03	275	多い	陰性	陰性	20	9:45ハイクロン投入直後に採水
	6	女浴槽	0.02	多い	多い	陰性	陰性	70	ハイクロン未確認
11:30	7	湯口(男)	0.02	0	51	陰性	陰性	110	
	8	男浴槽(6人)	0.03	15	18	陰性	陰性	0	
13:30	9	女浴槽(8人)	0.15	31	34	陰性	陰性	0	
	10	湯口(男)	0.02	2	63	陰性	陰性	210	
15:30	11	男浴槽(2人)	0.64	12	13	陰性	陰性	0	残塩濃度が高い?原因不明
	12	女浴槽(10人)	0.03	16	16	陰性	陰性	0	
17:30	13	2tタンク		2	12	陰性	陰性	100	
	14	12tタンク		35	183	陰性	陰性	330	
	15	15tタンク		11	139	陰性	陰性	140	
	16	湯口(男)	0.02	0	15	陰性	陰性	110	
	17	男浴槽(5人)	0.03	23	51	陰性	陰性	10	
	18	女浴槽(4人)	0.02	11	25	陰性	陰性	0	
19:30	19	湯口(男)	0.02	0	9	陰性	陰性	40	
	20	男浴槽(16人)	0.01	6	290	陰性	陰性	70	
21:30	21	女浴槽(13人)	0.02	1	76	陰性	陰性	0	
	22	湯口(男)	0.02	0	5	陰性	陰性	40	18:00ハイクロン投入
	23	男浴槽(26人)	0.07	3	65	陰性	陰性	0	
	24	女浴槽(17人)	0.06	2	33	陰性	陰性	10	
23:30	25	2tタンク		0	15	陰性	陰性	60	
	26	12tタンク		0	167	陰性	陰性	450	
	27	15tタンク		0	カビ混入	陰性	陰性	80	
	28	湯口(男)	0.02	0	13	陰性	陰性	20	
	29	男浴槽(18人)	0.05	6	7	陰性	陰性	0	
	30	女浴槽(18人)	0.05	0	10	陰性	陰性	0	
2:00	31	湯口(男)	0.02	0	8	陰性	陰性	90	
	32	男浴槽(11人)	0.05↓	3	35	陰性	陰性	0	
9:30	33	女浴槽(9人)	0.05↓	0	50	陰性	陰性	0	
	34	男浴槽	0.05↓	387	453	陰性	陰性	0	検査は22日の10:30に実施
	35	女浴槽	0.05↓	85	102	陰性	陰性	0	
	36	湯口(男)	0.05↓	0	15	陰性	陰性	90	

◇ 15:30の12tタンクはタンクローリーから注水の途中であり、若干増水していた。

◇ 9:30と17:30の湯口及び男女浴槽については、アメーバの検査を実施した。湯口は両時間共に陰性であったが、9:30は男女浴槽ともにアメーバを認めた。また、17:30は男浴槽のみアメーバが確認された。

3. 3 温泉水における塩素消費試験

水道水を使用した調査では、当センターで使用している水道水5LにNaClOを少量加えて、42℃の高温槽で1時間静置し、調整水をフラスコに500mlずつ分注した。調整直後の残塩は0.82mg/Lで、1時間静置後は0.77mg/Lであった。これに循環式および24時間風呂でよく使用されているろ材8種類(表6)をそれぞれ投入し、経時的に残塩を計測した。

表6、図1に示したとおり、ろ材を入れない水道水に比べ、各種ろ材を入れた水道水の残塩濃度は、若干の差はあったものの、1時間で急激に低下したことから、循環式風呂等で使用しているろ材は塩素消費を妨げている

要因の一つであると推察される。

また、ろ材を入れていないコントロール水は、4時間経過後の残塩濃度も、0.71mg/Lと高い残塩濃度であった。

表6 水道水におけるろ材使用時の塩素消費試験

	調整直後	(単位:mg/L)		
		1時間	2時間	4時間
砂利(大)	0.82	0.03	0.02	ND
砂利(小)		0.03	0.02	ND
粗い砂(川砂)		0.06	0.02	ND
細かい砂(川砂)		0.08	0.07	ND
セラミック製の筒状のろ材		0.05	0.04	ND
セラミック製の球状のろ材		0.03	0.03	ND
活性炭		0.06	0.06	ND
化学繊維		0.03	0.03	ND
コントロール(ろ材無し)	0.82	0.77	0.74	0.71

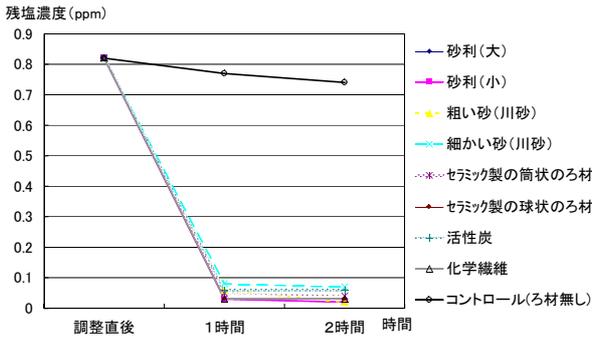


図1 水道水におけるろ材使用時の塩素消費試験

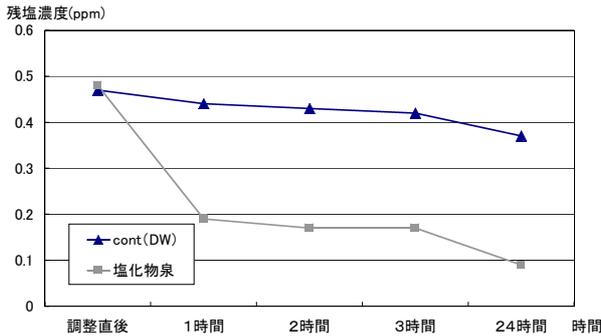


図2 塩化物温泉における塩素消費試験

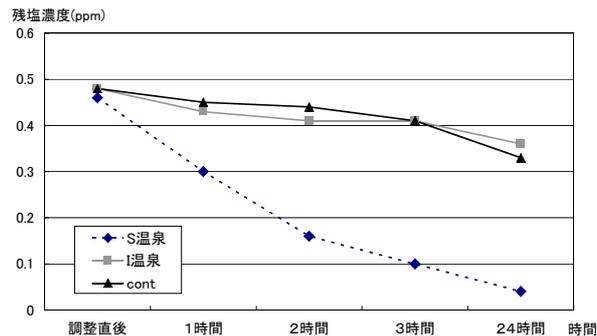


図3 単純温泉における塩素消費試験

一方、温泉水を使用した調査では、ろ材等は使用せずコントロール水（精製水にNaClOを加えて調整した）と残塩濃度を経時的に比較した。

図2に塩化物温泉（1施設の源泉水）、図3に単純温泉（2施設の源泉水）による塩素消費試験結果を示した。

塩化物温泉では、1時間値の残塩濃度が約半分に消費されたが、2時間～3時間値は、1時間値とほとんど同様な結果であった（図2）。しかし、実験に供した塩化物温泉水では、NaClOを加えることにより金属イオンが化学反応を呈し、茶色の変色と混濁が認められるようになり、時間経過とともに沈殿物が確認された。

単純温泉の試験では、I温泉水はコントロール水と同様な消費スピードを示したが、S温泉水は3時間の残塩濃度が0.1mg/L以下に減少した（図3）。このことから、泉質は同じでも温泉に含まれる成分等の違いで、塩素が消費されるスピードが異なることを確認した。

### 3. 4 レジオネラ属菌の迅速検査方法による検討

環境中からのレジオネラ属菌培養検査を実施している検査機関より、検査済み検体（24検体の温泉水）の提供を受けて、培養法とリアルタイムPCR法の比較検討を実施した。リアルタイムPCR法のプライマーはレジオネラ属菌が5S, *Legionella pneumophilla*はmip遺伝子を使用した。検査結果は、検水中の阻害物質（主に金属イオン）、レジオネラ属菌の死菌等の要因で培養検査との相関は得られなかった。

## 4 考察

今年度は温泉施設での銀ゼオによる消毒方法について調査・検討を開始した。

一般細菌数、大腸菌には有効な消毒効果が認められ、またレジオネラ属菌に対しても、銀ゼオの設置前と比較すると、検出限界未満の回数も増加し、消毒効果が確認できた。

迅速検査定量法については、培養検査との相関を得られなかったが、事件等の発生時、検体が搬入された当日に結果が判明するため、迅速な行政対応を行う上での指標となり得ると考える。今後、迅速検査方法についても、さらに検体数を増やし、検討および解析を継続して行いたい。

## 謝辞

今回の調査に協力していただいた、サンケイ化学（株）、ならびにタカラバイオ（株）に対し深謝いたします。

## 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)
- 5) 吉國謙一郎，中山浩一郎，他；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），本誌，6，75～79(2005)