

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(第Ⅱ報)

久保園 祥子 上野 伸広 松山 茂樹
 御供田 睦代¹⁾ 石谷 完二 藏元 強
 宮田 義彦

1 はじめに

昨年、第Ⅰ報として銀ゼオライト(サンケイ化学株式会社開発、以下、銀ゼオ)による泉質別における消毒効果、温泉施設における消毒方法の検討等について報告した¹⁾。

既報では、温泉施設の一般細菌、大腸菌に対する銀ゼオの消毒効果は認められたが、レジオネラ属菌については一時的な減少は認められたものの、完全に抑えることはできなかった。この原因として泉質や複雑な配管等が考えられたため、今年度は不必要な配管の除去と清掃を実施し、銀ゼオの消毒効果を確認した。また、温泉施設での実地試験の結果を基に、再度基礎実験を行ったので報告する。

一方、温泉水が原因と考えられる事例発生時には、迅速な対応が求められるが、現在の培養法では結果報告までに7～10日の日数を要する。このことから、事例発生時に早急な行政対応ができるよう、リアルタイムPCR法による迅速検査法について検討を行ったので、併せて報告する。

なお、本研究は当センター調査研究事業として、2005年度より、3カ年計画で実施するものである。

2 調査および検査方法

2.1 温泉施設における銀ゼオによる消毒方法の検討
 前年度に引き続き、温泉施設(1施設)について実地試験を実施した¹⁾。

レジオネラ属菌検査についてはろ過濃縮・酸処理法で実施し、アメーバ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した。

1. 1. 1 未使用配管等の除去

15 t タンクから12 t タンクへの配管途中に使用してい

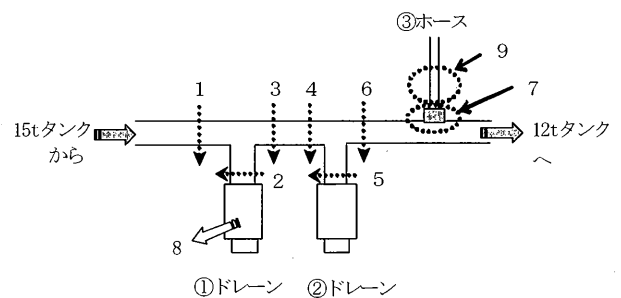


図1 未使用配管および検査箇所

ない配管類(コック付ドレイン①、②と、以前使用されていた12 t タンク水位測定用のホース③)が接続されていた。これらを除去し、除去前後の貯湯槽、浴槽水、ドレイン等の一般細菌、レジオネラ属菌等について調査した。

未使用配管および検査箇所を図1に示した。検査対象は、No. 1～7の各ドレインとホース内の拭き取り、No. 8の①ドレイン内に貯留していた水(約95ml)、No. 9の③ホース内に詰められていた紙状の物質について調査した。

2. 1. 2 施設清掃前後の調査

ドレイン除去後、温泉水を運搬するタンクローリー車のホース、貯湯槽(12 t、15 t タンク)、配管等の清掃を実施し、その前後および2週間後に一般細菌、レジオネラ属菌等について調査を行った。

2. 2 基礎実験

2.1の調査結果を基に、当センター内で水槽を用いて実施した。水道水を入れた60 L水槽を塩素除去のため二昼夜循環後(35℃設定)、試験当日に調整したレジオネラ試料を混和させ、その後銀ゼオやろ過器を設置し、経時的に採水、検査を行った。

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. 2. 1 銀ゼオの設置場所の検討

銀ゼオを循環装置内、循環水排出口にそれぞれ設置して経時的に採水、検査を実施した。

2. 2. 2 実験装置の洗浄方法の検討

これまでの試験において、銀ゼオ設置前のレジオネラ属菌数にばらつきがみられ、装置への残留銀イオンや残留塩素等の影響が考えられたため、その改善を目的に装置(水槽、循環装置等)の洗浄方法について検討した。

次亜塩素酸ナトリウム(以下「次亜塩素酸Na」という)処理、チオ硫酸ナトリウム(以下「チオ硫酸Na」という)処理、超音波洗浄の洗浄方法について、それぞれの処理を施した水槽にレジオネラ試料を混和し、一定時間後におけるレジオネラ属菌数の比較を行った。

2. 2. 3 粒剤の形状の検討

従来の円柱状銀ゼオ(図2)は使用中に崩れやすいという欠点があったため、新たな球状の銀ゼオ(図3)を開発(サンケイ化学株式会社)し、それぞれの効果について比較検討した。

水槽にレジオネラ試料を混和後、従来の円柱状銀ゼオと新たな球状の銀ゼオをそれぞれ設置、経時的に採水、検査を実施した。



図2 円柱状銀ゼオ

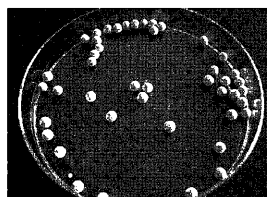


図3 球状銀ゼオ

2. 2. 4 ろ過器によるレジオネラ属菌への影響

レジオネラ試料を混和した水槽を3台使用し、2台はろ過器を設置し、1台はろ過器不設(対照用)とした。ろ過器設置後、経時的に採水、検査を実施した。ろ過器の構造を図4に示した。

また、ろ過器を設置した水槽については、2週間後にろ材中のレジオネラ属菌及びアメーバの検査を実施した。

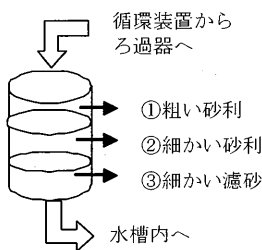


図4 ろ過器の構造

2. 2. 5 ろ過器と銀ゼオ併用によるレジオネラ属菌への影響

ろ過器と銀ゼオを併用して経時的検査を実施した。銀ゼオはろ過器の下部に設置し(図5)、使用した銀ゼオ

は水量の0.01%とした。また、使用したろ過器については、それぞれのろ材中のレジオネラ属菌、アメーバの検査を実施した。

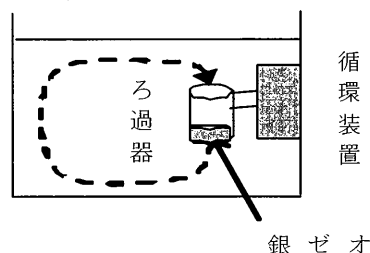


図5 試験2. 2. 5の実験装置

2. 3 迅速検査法の検討

2007年2月に導入されたリアルタイムPCR装置(Roche社, Light Cycler2.0)を使用して、試薬の検討を行った。

検体は温泉水由来の凍結保存株を使用し、プライマー・プローブセットは、レジオネラ属菌の16S rRNA遺伝子領域を増幅およびハイブリダイゼーションするものを用いた。

3 結果

3. 1 温泉施設における銀ゼオによる消毒方法の検討

3. 1. 1 未使用配管等の除去

①、②ドレン内の拭き取り検査ではレジオネラ属菌は認められなかったが、③ホース口、①内の貯留水、また③ホース内紙状物質から多数のレジオネラ属菌およびアメーバが検出された。しかし、未使用配管除去前後の貯湯槽及び浴槽水の検査では、レジオネラ属菌数に大きな変化は認められなかった(表1)。

3. 1. 2 施設清掃前後の調査

清掃後、一時的にレジオネラ属菌は検出限界未満となったが(表2)、2週間後に再び検出されるようになった(表3)。一方、浴槽横に設置してあった‘塩入れ木箱’の拭き取り検査でレジオネラ属菌、アメーバが検出された(表2, 網掛け)。

また、この時期から検出されるレジオネラ属菌の血清群の多様化がみられた。

3. 2 基礎実験

3. 2. 1 銀ゼオの設置場所の検討

銀ゼオを循環装置内に設置した水槽Aでは、48時間後にレジオネラ属菌は検出限界未満となった。銀ゼオを排出口に設置した水槽Bでは、3時間後に検出限界未満となった(表4)。このことから、銀ゼオの設置場所は循環水の排出口が適していることがわかった。

表1 ドレイン除去前後の検査結果

	採水場所	一般細菌 (cfu/ml)		大腸菌群 (コリテート)	大腸菌 (コリテート)	レジオネラ属菌数 (cfu/100ml)	アメーバ	備考	
		24時間	48時間						
未使用配管 除去前	2tタンク	0	43	-	-	50	未検査	L. pSG1, 10	
	15tタンク	13	118	-	-	50	未検査	L. pSG1, 5	
	12tタンク	5	151	-	-	210	未検査	L. pSG1, 4	
	12tドレーン口	6600	24160	-	-	340	未検査	L. pSG1, 5	
	男浴槽	4	13	-	-	検出限界未満	未検査		
	男湯口	1	56	-	-	50	未検査	L. pSG1, 2, 4	
未使用配管 除去時 拭き取り	1 ①ドレーン前	未検査	未検査	未検査	未検査	検出限界未満	-		
	2 // 内					検出限界未満	-		
	3 // 後					検出限界未満	-		
	4 ②ドレーン前					検出限界未満	-		
	5 // 内					検出限界未満	-		
	6 // 後					検出限界未満	-		
	7 ③ホース口					2.8 cfu/cm ²	1.4 pfu/cm ²	L. pSG1	緑膿菌(少)
	8 ①ドレーン内貯留水					7000	168 pfu/ml	L. pSG1	雑菌(2+)
	9 ③ホース内紙状物質					1756 cfu/g	61000 pfu/g	L. pSG1, 4, 5	
	10 対照用ドレーン					検出限界未満	-		
未使用配管 除去後	男浴槽		8728	+	-	280	未検査	L. pSG1, 3 L spp	
	男湯口	2	60	-	-	60	未検査	L. pSG1	
	2tタンク	0	43	-	-	60	未検査	L. pSG1	
	12tタンク	3	239	-	-	280	未検査	L. pSG1	
	15tタンク	6	87	-	-	50	未検査	L. pSG1, 5	

表2 施設清掃前後の検査結果

検査日	採水場所	一般細菌 (cfu/ml)		大腸菌群 (コリテート)	大腸菌 (コリテート)	レジオネラ属菌数 (cfu/100ml)	アメーバ	備考
		24時間	48時間					
清掃前	タンクローリーホース口		10336	-	-	20	未検査	L. p SG2
	タンクローリードレーン口	6	377	-	-	60	未検査	L. p SG1, 10 L. spp
	2tタンク	0	28	-	-	250	未検査	L. p SG1, 2, 3 L. spp
	12tタンク	3	326	-	-	550	未検査	L. p SG1
	15tタンク	16	87	-	-	100	未検査	L. p SG1, 10 L. spp
	女浴槽	27	40	-	-	検出限界未満	未検査	
	女湯口	0	27	-	-	140	未検査	L. p SG1, 5
タンクローリーホース, タンク内清掃実施								
清掃1日後	2tタンク	8	8	-	-	検出限界未満	未検査	
	12tタンク	2	4	-	-	検出限界未満	未検査	
	15tタンク	22	32	-	-	検出限界未満	未検査	
	浴槽	4	7	-	-	検出限界未満	未検査	残塩濃度 0.05mg/L
	湯口	4	8	-	-	検出限界未満	未検査	
拭き取り	浴槽仕切り板 (側面&溝)	未検査	未検査	未検査	未検査	1.6 cfu/cm ²	多数	L. p SG1
	塩入れ木箱の下					68.8 cfu/cm ²	0.24pfu/cm ²	L. p SG1, 3 L. spp
清掃10日後	タンクローリー内		160	-	-	検出限界未満	未検査	
	タンクローリーホース (12t側)		40500	-	-	検出限界未満	未検査	
	タンクローリードレーン口		680	-	-	60	未検査	L. p SG10, L. spp, L. p SG不明1コ
	2tタンク		286	-	-	70	未検査	L. p SG1, 5 L. spp
	12tタンク		824	-	-	60	未検査	L. p SG1, 9, 10
	15tタンク		487	-	-	180	未検査	L. p SG1, 5, 15
	女浴槽		>10000	+	-	220	未検査	L. p SG1 L. spp
	女湯口		225	-	-	80	未検査	L. p SG1, 4, 5, 10

注) 検出限界未満 : 10cfu/100ml未満
 L.p: Legionella pneumophila
 SG: serogroup

表3 清掃2週間後の経時的検査結果

検査日	番号	採水場所	一般細菌 (/ml)		大腸菌群 (コリレート)	大腸菌 (コリレート)	レジオネラ属菌数 (cfu/100ml)	備考	
			24時間	48時間					
清掃 2週間後	朝9:30	1	2tタンク	20	173	-	-	80	
		2	12tタンク	490	2530	-	-	440	
		3	15tタンク	24	120	-	-	30	
		4	男浴槽	24800	29760	+	-	190	
		5	〃	217	2090	-	-	検出限界未満	次亜塩素酸Na投入前
		6	男湯口	18	128	-	-	70	次亜塩素酸Na投入後30分
	昼13:45	7	2tタンク	232	320	-	-	70	
		8	12tタンク	850	1390	-	-	220	
		9	15tタンク	400	690	-	-	110	
		10	女浴槽	5	6	-	-	検出限界未満	
		11	女湯口	6	117	-	-	40	
	夕16:30	12	2tタンク	253	445	-	-	70	
		13	12tタンク	2400	2800	-	-	220	
		14	15tタンク	470	720	-	-	110	
		15	男浴槽	>10000	24000	+	+	60	現時点までの入浴者数20名
		16	男湯口	570	730	-	-	110	

3. 2. 2 実験装置の洗浄方法の検討

次亜塩素酸Na処理, チオ硫酸Na処理, 超音波洗浄の3種類すべての処理を併用した場合のみ, レジオネラ属菌数の減少が認められなかった(表5)。このことから, 実験装置の洗浄には3種類を併用することで, 残留銀イオンや残留塩素の影響を回避することができた。

3. 2. 3 粒剤の形状の検討

どちらの粒剤も銀ゼオ設置30分後にはレジオネラ属菌は検出限界未満となり, 粒剤の形状による消毒効果に差は認められなかった(表6)。また, 球状の銀ゼオが水流の抵抗が少なく, 流量を確保することができた。

表4 銀ゼオ設置前後の検査結果

(単位: cfu/100ml)

水槽No.	銀ゼオ設置場所	銀ゼオ設置前	設置1時間後	3時間後	6時間後	24時間後	48時間後
A	循環装置内	86900	96500	62000	62000	1360	検出限界未満
B	排出口	1310	32700	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
C	不設	121000	86000	82000	105000	128000	76000

表5 実験装置の洗浄方法による検査結果

(単位: cfu/100ml)

水槽No.	次亜塩素酸Na処理のみ	次亜塩素酸Na処理 チオ硫酸Na処理	次亜塩素酸Na処理 チオ硫酸Na処理 超音波洗浄
D	940	13600	134400
E	9400	100	122000
F (対照)	22400	20400	240000

表6 粒剤の形状による検査結果

(単位: cfu/100ml)

水槽No.	粒剤の形	流量 (L/min)	銀ゼオ設置前	銀ゼオ設置30分後	1時間後	3時間後	6時間後	24時間後
G	円筒状 (旧)	1.3	134400	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
H	球型 (新)	4.2	122000	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
I	無し	7.6	240000	186000	168000	228000	226000	100000

3. 2. 4 ろ過器によるレジオネラ属菌への影響

ろ過器を設置することによって緩やかにレジオネラ属菌の減少がみられた。しかし, 2週間後のレジオネラ属菌検査で水槽Jでは 10^5 cfu/100ml以上, 水槽Kでは検出限界未満と, 異なる結果となった(表7)。

2週間後の循環水中のレジオネラ属菌数では異なる結果となったが, 水槽Jのろ材中にはレジオネラ属菌, アメーバとも多数確認され, 水槽Kのろ材についても小敵ながらそれらを認めた(表8)。

このことから, ろ過器にレジオネラ属菌が取り込まれている可能性が考えられたため, ろ過器を1回通過させたことによるレジオネラ属菌数の変化を調査した。滅菌水道水にレジオネラ試料を混和し, ろ過器を1回通過させたところ, 約60~99%のレジオネラ属菌数の減少を認めた(表9)。この結果より, ろ過器(ろ材)中にレジオネラ属菌が取り込まれることが確認された。

3. 2. 5 ろ過器と銀ゼオライト併用によるレジオネラ属菌への影響

ろ過器と銀ゼオを併用した水槽M~Oでは, 設置1時間後にレジオネラ属菌は検出限界未満となった。銀ゼオのみの水槽Pでは設置24時間後でレジオネラ属菌は検出限界未満となった。ろ過器のみの水槽Q~Xでは徐々に

表7 ろ材使用時の経時的検査結果

(単位: cfu/100ml)									
水槽No.	ろ過器	ろ過器設置前	設置1時間後	4時間後	24時間後	72時間後	1週間後	2週間後	
J	あり	796000	10600	640	140	100	100	>100000	
K	あり	596000	15000	780	100	40	20	検出限界未満	
L	なし	422000	612000	724000	280000	246000	160000	66000	

表8 2週間後ろ材の検査結果

水槽No.	レジオネラ属菌 (cfu/g)	アメーバ (pfu/g)
J	5.9×10^6	2.8×10^2
K	3.3×10	1.7

表9 ろ材1回通過での検査結果

(単位: cfu/100ml)		
	ろ材通過前	ろ材通過後
ろ材1	3120000	346000
ろ材2		13000
ろ材3	4608000	1480000
ろ材4		672000

表10 ろ材と銀ゼオ併用時の経時的検査結果

(単位: cfu/100ml)							
水槽No.	ろ過器	銀ゼオライト	設置前	設置1時間後	24時間後	48時間後	1週間後
M	あり	あり	396000	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	
N	あり	あり	1048000	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	
O	あり	あり	170000	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
P	なし	あり	442000	60000	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
Q	あり	なし	1012000	122000	600	180	
R	あり	なし	36200	74000	200	40	
X	あり	なし	754000	18600	2220	800	160

レジオネラ属菌は減少したが、完全に検出を抑えるには至らなかった(表10)。このことから、ろ過器と銀ゼオを併用することでレジオネラ属菌に対して最も顕著な消毒効果が得られた。

なお、使用したろ過器のろ材検査では、銀ゼオを併用した水槽においてレジオネラ属菌、アメーバともに検出は認められなかった。

3. 3 迅速検査法の検討

リアルタイムPCR装置が2007年2月に導入され、現在、試薬やプロトコール等検討中である。

4 考察及びまとめ

1) 温泉施設における銀ゼオによる消毒方法の検討では銀ゼオを設置することによりレジオネラ属菌数が減少することは確認できたが、施設の複雑な配管や今回の

調査のように不必要な配管へのバイオフィームの定着等の影響もあり、清掃後銀ゼオを使用しても完全にレジオネラ属菌の繁殖を抑えることはできなかった。また、調査の途中から分離されるレジオネラ属菌の種類も多様化については、この時期複数の源泉を利用して来たことの影響が推察された。このように既存の温泉施設においては施設の設備、管理がレジオネラおよびアメーバの発生要因となり得るため、日常の衛生管理の重要性が再確認できた。

2) 温泉施設での実地試験をふまえて基礎実験を行い、設置場所、粒剤の形状等による銀ゼオのより効果的な使用方法が明らかになった。

また、ろ過器と銀ゼオを併用することでレジオネラ属菌やアメーバの抑制効果が確認できた。しかし、今回の試験は1~2週間という短期間の試験であったため、今後、長期間に渡る継続的な消毒効果について検討する必要がある。さらに、銀ゼオに対するアメーバの感受性調査を実施するなど、基礎データを集積した後、再度実地試験を行ってより効果的な銀ゼオの使用方法を検討する必要がある。

3) 事例発生時のリアルタイムPCR法による検査診断は早急な行政対応の指標となり得るので、今後更なる試薬の検討を行う予定である。

謝辞

今回の調査に協力していただいたサンケイ化学(株)に対し深謝いたします。

参考文献

- 1) 吉國謙一郎, 上野伸広, 他; 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, 本誌, 7, 63~67(2006)
- 2) 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)
- 3) 佐藤卓, 藤井伸一郎; リアルタイム-PCRを用いたレジオネラ属菌の迅速検査法の開発(第II報), 岩手県環境保健研究センター年報, 4, 66~69(2004)