

ノート

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Ⅲ報)

養 田 祥 子 吉 國 謙 一 郎 上 野 伸 広
 松 山 茂 樹¹ 本 田 俊 郎 石 谷 完 二²
 藏 元 強³ 宮 田 義 彦

要 旨

現在多くの浴場施設で実施されている塩素消毒に代わる消毒法として、銀イオンによる消毒について検討を行った。その結果、銀イオンは泉質によって効果が異なること、実験室内の試験では浴槽壁、ろ過器中へのバイオフィルムの定着を抑え、レジオネラ属菌及び一般細菌に対する消毒効果が高いこと等が確認された。しかし、温泉施設によってその配管構造、管理方法は多様であるため、それぞれに適応するようさらなる検討を重ね、より効果的な使用法の確立が望まれた。

また、レジオネラ属菌の迅速検査法としてリアルタイムPCR法について検討を行ったところ、公衆衛生上の汚染指標として利用可能であると考えられたが、泉質によっては阻害物質除去の課題が残った。

キーワード：銀イオン、レジオネラ属菌、リアルタイムPCR法

1 はじめに

循環式温泉浴場施設利用によるレジオネラ症の患者及び集団感染事例などが社会問題となっており、本県においても2002年、2003年にレジオネラ症集団感染事例が発生し、温泉施設の衛生管理の重要性が認識された。

現在、多くの温泉施設では塩素系薬剤による消毒を中心に行っているが、泉質、pH等の諸条件により管理が難しく、また塩素臭が温泉の商品価値を低下させる等の問題点も多い。

そこで我々は、本県特有の資源であるシラスを利用しゼオライトを合成、これに銀を担持させたもの（銀ゼオライト、以下「銀ゼオ」という。）を使用し、温泉の成分、通常の施設衛生管理法に順応した銀イオンでの消毒法を検討した。

また、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が、現在実施している培養法は、

結果判明に1週間程度の期間を要するため、迅速な対応を可能とするリアルタイムPCR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の消毒効果の検討

24時間風呂を用い、3泉質（炭酸水素塩泉、塩化物温泉、単純温泉）、4施設の温泉水を使用して、入浴前、直後、入浴2時間後の一般細菌数の増減を調査した。

2. 2 温泉施設における銀ゼオ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）において、銀ゼオの有効性調査を実施した。

この施設の泉質は塩化物温泉で、2t、12t、15tの3種類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

鹿児島県環境保健センター

1 鹿児島県大隅地域振興局保健福祉環境部
 2 鹿児島県立大島病院
 3 鹿児島県鹿児島地域振興局保健福祉環境部

〒892-0853 鹿児島市城山町1-24（城山庁舎）
 〒893-0011 鹿屋市打馬二丁目16-6
 〒894-0015 奄美市名瀬真名津町18-1
 〒899-2501 日置市伊集院町下谷口1960-1

業時間内に7~8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入しており、営業前には毎日浴槽内の清掃も実施していた。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、12t、15t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。また、調査結果次第では、設置場所、設置量の変更を検討しながら調査を実施した。

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次亜塩素酸ナトリウム(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による消費時間の変化を調べるため、残塩濃度を測定し、ろ材と残塩濃度の関係について調査を実施した。

2. 4 基礎的試験

2. 4. 1 銀ゼオの設置場所の検討

60L水槽を用い、レジオネラ試料(10⁵CFU/100mL程度)を投入後、設置位置を循環装置内と循環水排出口にそれぞれ設置し、経時的に採水、検査を実施した。

2. 4. 2 銀ゼオ使用量の検討

60L水槽を用い、銀ゼオの使用量を0.005%、0.01%としてレジオネラ試料を投入後、経時的に採水、検査を実施した。

2. 4. 3 銀ゼオ粒剤の形状の検討

従来の円柱状銀ゼオは使用中に崩れやすい傾向にあったため、球状の銀ゼオを開発し(サンケイ化学株式会社)、それぞれの効果について検討した。

水槽にレジオネラ試料を投入し、それぞれの銀ゼオを設置後、経時的に採水、検査を実施した。

2. 4. 4 ろ過器のレジオネラ属菌への影響

60L水槽にレジオネラ試料を投入し、ろ過器の設置の有無でレジオネラ属菌数を経時的に検査した。また、使用したろ過器について、ろ材中のレジオネラ属菌、アメ

ーバの検査を実施した。

2. 4. 5 ろ過器と銀ゼオ使用によるレジオネラ属菌への影響

60L水槽にレジオネラ試料を投入し、ろ過器、銀ゼオ使用によるレジオネラ属菌数の経時的変化を調査した。銀ゼオはろ過器の下部に設置し、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、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。

2. 4. 6 換水による銀ゼオの持続性試験

60L水槽に水道水を入れ(2日間循環して塩素除去実施)、循環水排出口に銀ゼオを設置し、4週間に渡って1日1回換水を続けた。使用した銀ゼオ量は6g(0.01%/wt)で、試験中の銀ゼオ交換はせず、試験終了まで同一の銀ゼオを使用した。換水開始から1週間後、2週間後、4週間後にレジオネラ試料を混和し、経時的にレジオネラ属菌数を検査した。

2. 4. 7 24時間風呂における銀ゼオの持続性試験

24時間風呂に200L水道水を入れ、2日間循環させ水道水中の塩素を除去した後、次の①~④の行程で3回試験を実施した。浴槽水は試験が1回終了する毎に入れ替えを行った。

- ①入浴
- ②レジオネラ試料混和
- ③銀ゼオを設置
- ④一般細菌、レジオネラ属菌の経時的検査



図1 24時間風呂設置状況

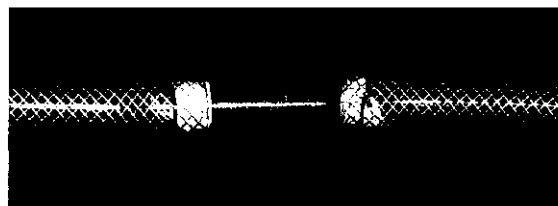


図2 銀ゼオ設置部

図1は試験に使用した24時間風呂装置で、循環装置から浴槽への配管途中に銀ゼオを設置した(図2)。使用した銀ゼオ量は20g (0.01%/wt) で、設置部分は銀ゼオの失活を防ぐためアルミホイルで遮光した。銀ゼオは試験開始から終了まで同一銀ゼオを連続して使用した。

2. 5 迅速検査法

2. 5. 1 対象

検量線作成用としてレジオネラ属菌 (*Legionella pneumophila* SG1) ATCC標準株を、環境由来検体として他の検査機関より提供を受けた温泉水等の19検体を用いた。

レジオネラ属菌ATCC標準株は37℃で2日間培養後、McF3.0程度の菌液を調整し、10倍希釈系列溶液として使用した。

2. 5. 2 検体の濃縮

検量線用ATCC標準株溶液、環境由来検体をそれぞれ500mLメンブランフィルターで吸引ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水5mLの入った50mLチューブに入れ、強く振ってフィルター上の菌をふるい落とし、濃縮試料とした。

2. 5. 3 菌数測定

検量線用標準株については、濃縮試料を酸処理後、その100 μ LをWYO α 培地にコンラージ棒で塗布し、37℃7日間培養して菌数の測定を行った。

環境由来検体については、提供を受けた検査機関の検査結果を参考とした。

2. 5. 4 核酸抽出法

濃縮試料1mLを12000rpmで5分遠心後、上清を捨て沈渣に5%キレックス溶液を5滴添加した。99℃5分加熱処理後、急冷、12000rpmで1分遠心し、その上清をエタノール沈殿後、TEバッファー10 μ Lで溶解し、測定試料とした。

2. 5. 5 リアルタイムPCR法

リアルタイムPCR試薬は市販のCycleavePCR Legionella (5SrRNA) Detection kit (タカラバイオ社)を用い、測定装置はLightCycler (Roche社)を使用した。テンプレートは核酸抽出試料4 μ L、反応系は20 μ Lとした。レジオネラ属菌の5SrRNA (蛍光物質FAM)を530nm、インターナルコントロール (蛍光物質ROX)を610nmで測定した。

3 結果

3. 1 泉質別における銀ゼオの消毒効果の検討

泉質別における24時間風呂を使用した一般細菌数の増減を表1に示す。炭酸水素塩泉、単純温泉については2ヶ月間有効な消毒効果が得られたが、塩化物温泉では効果が弱く、泉質によって消毒効果が様でないことが確認された。しかし、同様な泉質でも源泉水に含まれる塩分濃度あるいは金属イオン等の違いで、銀ゼオが有効に働く可能性も示唆された。

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

3. 2 温泉施設における銀ゼオによる消毒方法の検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に示す。設置前の条件として、塩素による消毒は通常通り朝夕2回行ってもらい、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、検出を抑えることはできなかった。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目的で、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。

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 ⁴	1.3×10 ⁵	+	+	130	L.pSG1, SG4	4	
女浴槽水	2.6×10 ⁴	1.2×10 ⁵	+	+	150	L.pSG1, SG4	4	
男浴槽水	1.0×10 ⁵	1.8×10 ⁵	+	-	140	L.pSG1, SG4	250	
女浴槽水	2.8×10 ⁵	2.9×10 ⁵	+	+	360	L.pSG1	300	アメーバHartmannella
男浴槽水	3.2×10 ⁵	4.5×10 ⁵	+	+	170	L.pSG1, SG10, NA	50	
女浴槽水	2.7×10 ⁵	4.0×10 ⁵	+	+	460	L.pSG1, SG10, NA	150	
男浴槽水	2.0×10 ⁵	2.1×10 ⁵	+	-	210	L.pSG1, SG4	未実施	
女浴槽水	1.1×10 ³	1.2×10 ³	-	-	170	L.pSG1, 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	L.pSG1, SG4	50	ハクロンを9時に投入
	女	0.02	600	610	+	-	120	L.pSG1, SG4	100	
営業2h後 (11時30分)	男	0.02	2180	2930	+	+	30	L.pSG1, SG4	/	
	女	0.02	1910	3410	+	-	40	L.pSG1		
営業4h後 (13時30分)	男	0.02	24100	170100	+	+	40	L.pSG1, NA	/	
	女	0.02	22500	95900	+	+	110	L.pSG1, SG4		
営業6h後 (15時30分)	男	0.01	72000	105000	+	+	160	L.pSG1, NA	/	
	女	0.02	52000	57000	+	+	160	L.pSG1		
営業8h後 (17時30分)	男	0.01	125000	134000	+	+	280	L.pSG1	400	
	女	0.02	325000	395000	+	+	200	L.pSG1, SG10	250	
営業10h後 (19時30分)	男	0.03	100000	106000	-	-	検出限界未満		/	ハクロンを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	L.pSG1, SG4	/	
	女	0.05	37	72	-	-	10	L.pSG4		
営業終了後 (AM2時)	男	未実施	200000	210000	+	-	210	L.pSG1, SG4	/	
	女	未実施	1100	1200	-	-	170	L.pSG1, 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		/	ハクロンを9時に投入
	女	0.03	36	46	-	-	20	L.pSG4, NA		
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	L.pSG4, NA		
営業4h後 (13時30分)	男	0.03	283	315	+	+	20	L.pSG1	/	
	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	L.pSG1, SG4		
営業8h後 (17時30分)	男	0.01	37300	46400	+	+	60	L.pSG4, NA	150	
	女	0.02	70000	105000	+	+	70	L.pSG1, SG4	100	
営業10h後 (19時30分)	男	0.07	35	103	-	-	検出限界未満		/	ハクロンを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	L.pSG1		
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			

表5 ポンプ設置後における経時的検査結果

時間	番号	採水場所	残塩濃度 (mg/L)	一般細菌数(CFU/ml)		大腸菌群 (コロラート)	大腸菌 (コロラート)	レジオネラ属菌数 (CFU/100ml)	備考
				24時間	48時間				
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	検出限界未満	
	9	女浴槽(8人)	0.15	31	34	陰性	陰性	検出限界未満	
13:30	10	湯口(男)	0.02	2	63	陰性	陰性	210	
	11	男浴槽(2人)	0.64	12	13	陰性	陰性	検出限界未満	残塩濃度が高い?原因不明
15:30	12	女浴槽(10人)	0.03	16	16	陰性	陰性	検出限界未満	
	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	検出限界未満	
	19	湯口(男)	0.02	0	9	陰性	陰性	40	
17:30	20	男浴槽(16人)	0.01	6	290	陰性	陰性	70	
	21	女浴槽(13人)	0.02	1	76	陰性	陰性	検出限界未満	
19:30	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	検出限界未満	
	24	女浴槽(17人)	0.06	2	33	陰性	陰性	10	
21:30	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	検出限界未満	
	30	女浴槽(18人)	0.05	0	10	陰性	陰性	検出限界未満	
23:30	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	検出限界未満	
	33	女浴槽(9人)	0.05↓	0	50	陰性	陰性	検出限界未満	
2:00	34	男浴槽	0.05↓	387	453	陰性	陰性	検出限界未満	検査は22日の10:30に実施
	35	女浴槽	0.05↓	85	102	陰性	陰性	検出限界未満	
9:30	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。

ポンプ設置後の経時的調査結果を表5に示す。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完全に除去することはできなかった。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た(表1)。施設の配管構造については、3種類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まれているため、バイオフィルムの発生箇所清掃が行き届かず、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。

ポンプ設置後もレジオネラ属菌の完全な抑制に至らなかったことから、15tタンクから12tタンクへの配管途中

の使用していない配管類を除去し、除去前後の一般細菌・レジオネラ属菌数等について調査した(検査箇所は図3)。また、配管除去後、温泉水を運搬するタンクローリーのホース、貯湯槽、使用している配管の清掃を実施し、その前後および2週間後についても同様な調査を行った。

未使用の配管類(ドレーン①、ドレーン②、ホース③)除去前後の調査結果を表6に示す。ドレーン①、②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、ホース③内拭き取り、ドレーン①内の貯留水、ホース③内の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。これらの場所がレジオネラ属菌、アメーバ等の温床と考えられたが、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。

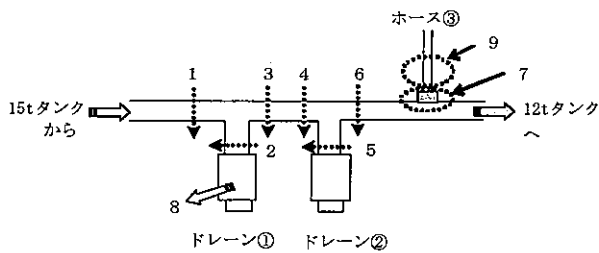


図3 未使用配管及び検査箇所

- No. 1~7 : 各ドレイン及びホース内拭き取り
- No. 8 : ドレイン①内貯留水 (約95mL)
- No. 9 : ホース③内紙状物質

清掃実施前後の調査結果を表7に示す。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、2週間後再び検出されるようになった(表8)。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7、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。

表6 未使用配管除去後の検査結果

	採水場所	一般細菌(CFU/100ml)		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	未実施	L.pSG1,10
	12tタンク	5	151	-	-	210	未実施	L.pSG1,4
	15tタンク	13	118	-	-	50	未実施	L.pSG1,5
	12tドレイン口	6600	24160	-	-	340	未実施	L.pSG1,5
	男浴槽	4	13	-	-	検出限界未満	未実施	
	男湯口	1	56	-	-	50	未実施	L.pSG1,2,4
未使用配管除去時拭き取り	1 ドレイン①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 ドレイン②前					検出限界未満	-	
	5 // 内					検出限界未満	-	
	6 // 後					検出限界未満	-	
	7 ホース③口					2.8 CFU/cm ²	1.4 PFU/cm ²	L.pSG1 緑膿菌(少)
	8 ドレイン①内貯留水					7000	168 PFU/ml	L.pSG1 雑菌(2+)
	9 ホース③内紙状物質					1756 CFU/g	61000 PFU/g	L.pSG1,4,5
	10 対照用ドレイン					検出限界未満	-	
未使用配管除去後	男浴槽		8728	+	-	280	未実施	L.pSG1,3 L.spp
	男湯口	2	60	-	-	60	未実施	L.pSG1
	2tタンク	0	43	-	-	60	未実施	L.pSG1
	12tタンク	3	239	-	-	280	未実施	L.pSG1
	15tタンク	6	87	-	-	50	未実施	L.pSG1,5

注) 検出限界未満 : 10CFU/100mL未満

L.p: *Legionella pneumophila*

SG: serogroup

L.spp: *Legionella pneumophila*以外のレジオネラ属菌

PFU: Plaque Forming Unit

表7 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 (コラート)	大腸菌 (コラート)	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	未検査	未検査	未検査	未検査	68.8 CFU/cm ²	0.24 PFU/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

L.spp:Legionella pneumophila以外のレジオネラ属菌

PFU:Plaque Forming Unit

表8 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(CFU/ml)		大腸菌群 (コラート)	大腸菌 (コラート)	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	NaClO投入前
		6 男湯口	18	128	-	-	70	NaClO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. 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℃の恒温槽で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9）をそれぞれ投入し、経時的に残塩を計測した。

表9、図4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毒を妨げている要因の一つであると推察された。

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

表9 水道水におけるろ材使用時の塩素消費試験

	(単位: mg/L)			
	調整直後	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

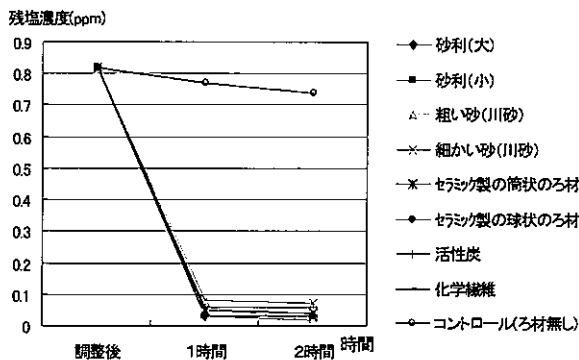


図4 水道水におけるろ材使用時の塩素消費試験

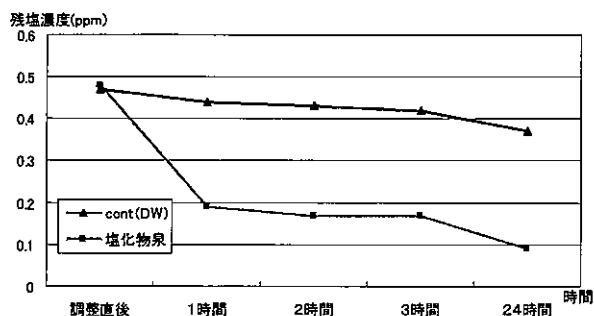


図5 塩化物温泉における塩素消費試験

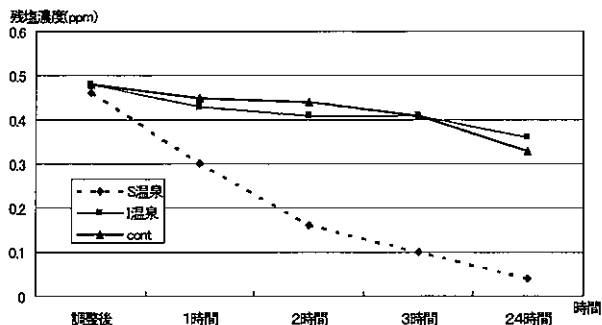


図6 単純温泉における塩素消費試験

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を加えて調整したもの）と残塩濃度を経時的に比較した。

図5に塩化物温泉（1施設の源泉水）、図6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。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6）。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 基礎的試験

3. 4. 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10）。このことから、銀ゼオの設置場所は循環装置の排出口が適していることがわかった。

表10 銀ゼオ設置前後の検査結果

水槽No.	銀ゼオ設置場所	(単位: CFU/100mL)					
		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	98500	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11 銀ゼオ使用量別における検査結果

(単位:CFU/100mL)						
水槽No.	銀ゼオ使用量	銀ゼオ設置前	設置30分後	1時間後	3時間後	24時間後
D	0.01%	559000	検出限界未満	検出限界未満	20	検出限界未満
E	0.01%	501000	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
F	0.005%	47000	250	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
G	0.005%	900000	78700	74000	35900	検出限界未満
H	不設	494000	62000	29900	33740	401000

3. 4. 2 銀ゼオ使用量の検討

銀ゼオ使用量は0.01%で設置後30分には10⁵CFU/100 mLレベルのレジオネラ属菌数は検出限界未満となり、有効な消毒結果が得られた(表11)。

3. 4. 3 銀ゼオ粒剤の形状の検討

どちらの粒剤も銀ゼオ設置30分後にはレジオネラ属菌数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12)。また、球状の銀ゼオが水量の抵抗が少なく、流量を確保できた。

3. 4. 4 ろ過器の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数の減少がみられた。しかし、2週間後のレジオネラ属菌検査で水槽Lでは10⁵CFU/100mL以上、水槽Mでは検出限界未満と、異なる結果となった(表13)。

さらにろ材の検査を実施したところ、水槽Lのろ材中にはレジオネラ属菌、アメーバが多数確認され、水槽Mのろ材についても少数ながらそれらを認めた(表14)。

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、試験水をろ過器に1回通過させて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15, 図7)。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ていることが確認された。

3. 4. 5 ろ過器と銀ゼオ使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O~Qでは、銀ゼオ設置後1時間後にレジオネラ属菌数は検出限界未満となった(表16)。銀ゼオのみの水槽Rでは設置24時間後でレジオネラ属菌数は検出限界未満となった。ろ過器のみの水槽S~Uでは緩やかなレジオネラ属菌の減少は認められたが、完全に検出を抑えるには至らなかった。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。

表12 銀ゼオ粒剤の形状による検査結果

(単位:CFU/100mL)									
水槽No.	形状	銀ゼオ設置前	設置30分後	1時間後	2時間後	3時間後	6時間後	24時間後	
I	円筒状(旧)	940	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	検出限界未満	
J	球状(新)	9400	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	検出限界未満	
K	不設	22400	78000	68000	18200	108000	46800	4400	

表13 ろ過器設置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	
L	あり	796000	10600	640	140	100	100	>100,000	
M	あり	596000	15000	780	100	40	20	検出限界未満	

表14 2週間後のろ材検査結果

水槽No.	レジオネラ属菌 (CFU/g)	アメーバ (PFU/g)
L	5.9 × 10 ⁶	2.8 × 10 ²
M	3.3 × 10	1.7

表15 ろ過器1回通過によるレジオネラ属菌検査結果

(単位:CFU/100mL)		
	ろ過器通過前	ろ過器通過後
ろ過器1	3120000	346000
ろ過器2		13000
ろ過器3	4608000	1480000
ろ過器4		672000

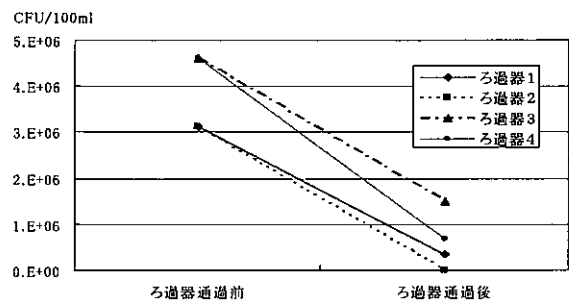


図7 ろ過器1回通過によるレジオネラ属菌数の変化

表16 ろ過器と銀ゼオ使用時の経時的検査結果

(単位:CFU/100mL)							
水槽No.	ろ過器	銀ゼオ	設置前	設置1時間後	24時間後	48時間後	1週間後
O	あり	あり	396000	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	あり	あり	1048000	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
Q	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
R	なし	あり	442000	60000	検出限界未満	検出限界未満	検出限界未満
S	あり	なし	1012000	122000	600	180	検出限界未満
T	あり	なし	36200	74000	200	40	検出限界未満
U	あり	なし	754000	18600	2220	800	160

また、使用したろ過器のろ材検査では、ろ過器のみの水槽S~Uでレジオネラ属菌が検出されたが（アメーバは検出されず）、銀ゼオを併用した水槽O~Qではレジオネラ属菌、アメーバともに検出は認められなかった。

表17 換水試験結果

(単位:CFU/100mL)

	水槽No.	銀ゼオ設置前	3時間後	24時間後
1週間後	1	150000	検出限界未満	検出限界未満
	2	92000	検出限界未満	検出限界未満
2週間後	1	62000	80	検出限界未満
	2	40000	検出限界未満	検出限界未満
4週間後	1	20	40	検出限界未満
	2	60000	20	検出限界未満

3. 4. 6 換水による銀ゼオの持続性試験

検査結果を表17に示す。水槽を2台使用し、同様の検査を実施した。

換水1週間後の検査では $10^4 \sim 10^5$ CFU/100mLレベルのレジオネラ属菌が3時間で検出限界未満となった。換水2週間後、4週間後となるにつれてレジオネラ属菌の消毒に時間的な差はあるものの、24時間以内には検出限界未満となり、換水による銀ゼオの持続性は4週間まで確認できた。

3. 4. 7 24時間風呂における銀ゼオの持続性試験

一般細菌の経時的検査結果を図8、レジオネラ属菌の経時的検査結果を図9に示す。

1回目の試験では、装置の不備のため24時間後のレジオネラ属菌数が増加したが、2回目、3回目の試験では一般細菌、レジオネラ属菌共に銀ゼオによる消毒効果が認められ、入浴による有機物質の存在下において浴槽水中のレジオネラ属菌を抑え、かつ浴槽壁へのバイオフィルム付着も確認されなかった。

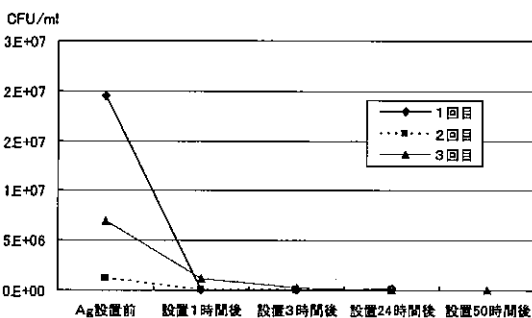


図8 一般細菌の経時的検査結果

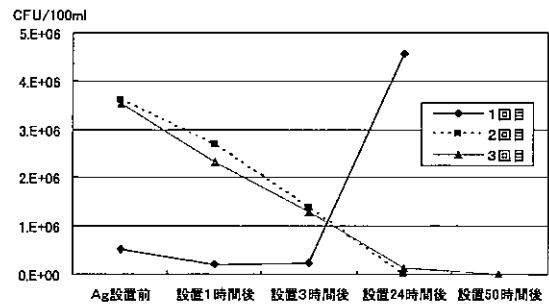


図9 レジオネラ属菌の経時的検査結果

表18 リアルタイムPCR法と培養法の比較

	リアルタイムPCR		
	+	-	計
培養法	+	5	7(2)
	-	5	12(2)
計	10	9(4)	19(4)

()内数値はPCR反応阻害を認めた検体数

3. 5 迅速検査法

レジオネラ属菌の迅速検査法としてリアルタイムPCR法を実施した結果を表18に示す。培養法では19検体中7検体(36.8%)、リアルタイムPCR法では10検体(52.6%)が陽性となった。両者の不一致は19検体中7検体(36.8%)であった。

培養法が陽性でリアルタイムPCR法が陰性の2検体は、いずれもインターナルコントロールに十分な反応が見られず、反応阻害を認めた。

リアルタイムPCR法は、培養法に比べ短時間で結果が判明するものの、死菌の影響以外にも阻害物質の有無が、結果に影響することを確認した。

4 考察

4. 1 基礎的試験

銀ゼオの設置場所は、循環水排出口への設置が最も消毒効果が高く、この使用量は水量に対して0.01%量で十分な消毒効果が得られた。

銀ゼオ粒剤の形状は、円柱状から球状に改良することで、循環中の型くずれを防止し、消毒効果を維持しながら、円柱状以上の流量を確保することができた。

ろ過器は、ろ材中にレジオネラ属菌が取り込まれ、これに銀ゼオを設置することで、レジオネラ属菌及びアメーバの定着を抑えることを確認した。

換水による銀ゼオの消毒効果期間は、4週間後まで持続することを確認した。

24時間風呂における調査では、入浴による有機物質の

存在下においても、銀ゼオの有効な消毒効果とバイオフィルムの定着を抑制した。

4. 2 泉質別における銀ゼオの消毒効果

今回の調査では、炭酸水素塩泉及び単純泉においては、安定した消毒効果が認められたものの、塩化物泉には効果が弱く、泉質によって消毒効果が異なることを確認した。しかし、泉質は同じでも源泉水に含まれる成分等の違いによって消毒効果が異なる可能性も推察された。なお、pHによる消毒効果の差異は、今回調査した温泉水（中性～高アルカリ性）では認められず、塩素が有効に働かないと言われる高アルカリ性（pH9～10）の温泉水に対しても安定した消毒効果を認めた。

4. 3 ろ材の塩素消費試験

循環式風呂等で使用されているろ材（川砂、砂利等）は、塩素濃度を低下させることが確認され、消毒効果を妨げている要因の一つであると推察された。

4. 4 温泉施設における銀ゼオの消毒効果

今回の調査では、協力の得られた施設の温泉水の泉質が塩化物泉であったことと、貯湯タンク3個を経由して湯口までの配管構造が複雑で、度重なる清掃でも配管中のすべてのバイオフィルムを除去することができなかったことにより、完全なレジオネラ属菌の抑制には至らなかった。これは、一時的には消毒効果が認められるものの、一定時間経過後、配管等に残ったバイオフィルム等からレジオネラ属菌が排出される可能性が示唆された。

また、この施設では、営業時間終了後は浴槽に温泉水を貯めたまま営業開始前（翌朝）まで放置していることや、複雑な配管に滞留している温泉水が、バイオフィルム及びレジオネラ属菌の温床となっていると思われた。

一方、大腸菌等の一般細菌に対しては、一定の消毒効果を認めた。

4. 5 迅速検査法

一部の検体でPCR阻害反応を認めた。これは、温泉成分等に含まれる金属イオン等の影響と考えられた。阻害物質の除去を目的にキレックスを使用したか、完全に除去できなかったものと思われた。また、核酸抽出において検出感度を高めるために、エタノール沈殿処理でさらに濃縮を行った（検出限界2.5CFU/100mL）ことにより、阻害物質の影響を受けやすくなったことも考えられた。

今後は、温泉成分に含まれるPCR反応への阻害物質除去について、更なる検討が必要である。

一方、培養法が陰性で、リアルタイムPCR法が陽性となった5検体のうち、培養法の検出感度（10CFU/100mL）を上回る数値を示した1検体は、死菌に反応したと思われる。このことは、過去の汚染を反映したものとして、公衆衛生上、重要な結果と考えられた。

検討したCycleavePCR Legionella (5SrRNA) Detection kit（タカラバイオ社）は、インターナルコントロールが測定でき、阻害反応の確認が可能ではあったが、当センターで使用している測定装置LightCycler（Roche社）では、陽性検体のインターナルコントロールの確認ができなかった。これは、機器と試薬の相性によるものか、機器の使用方法で解決できるものか、更に検討が必要と思われた。

5 まとめ

実験室内及び24時間風呂における調査では、銀ゼオは浴槽壁、ろ過器中へのバイオフィルムの定着を抑え、レジオネラ属菌と一般細菌に対する消毒効果及び繁殖予防効果が高いことを確認した。これにより、既存の温泉浴場施設における調査を行ったが、完全にレジオネラ属菌を抑制することはできなかった。この原因として、様々な配管構造、管理方法等により既に定着・蓄積しているバイオフィルムを完全に取り除くことができなかったことが考えられた。

また、塩素による消毒効果も、泉質、pH、ろ材、入浴等の要因で消費されるスピードが速くなり、短時間で残塩濃度が低下することを確認した。このため、大量の塩素を注入することで塩素臭の強い温泉水となり、商品価値を低下させることが推定された。また、これらの要因で、営業時間を通して一定の残塩濃度を保ち続けるには、管理が困難であることも予想された。

一方、泉質に含まれる成分（金属イオン等）の影響で、塩素消毒することにより着色を引き起こし、その後、沈殿物の形成が見られる温泉水も存在した。

現在の温泉浴場施設は、浴槽及びこの材質（木材、タイル、石等）も多種多様化してきている。これに伴い配管構造もさらに複雑化してきていることも推察され、このような中で、銀ゼオ・塩素の単独消毒だけでは、レジオネラ属菌の完全除去は困難であると考えられた。

今後は、バイオフィルムの除去（特に配管）方法についても検討していくことが重要であり、特に、配管中に温泉水を滞留させない方法について、工夫が必要と思われた。

最後に、2003～2007年度にかけて、銀ゼオライトによる消毒方法を中心に調査・研究してきた結果、泉質によ

り消毒効果の差は認められたものの、銀イオンの強い殺菌効力とその効果が長期間持続することを確認した。しかし、バイオフィルムの存在が消毒効果の安定性を低下させることも判明した事により、安心安全な温泉を提供するためには、循環式、掛け流し式温泉を問わず、徹底した清掃でバイオフィルムを付着させない事が最も重要であると思われた。次に、泉質、成分、施設の構造等に応じた消毒方法（塩素、銀イオン、その他）について検討し、適切な消毒方法を選択していくことが、温泉中のレジオネラ属菌繁殖防止に繋がると考えた。

一方、迅速検査法については、直ちに培養法に代替できるものではないが、今回検討したリアルタイムPCR法は、短時間でレジオネラ属菌の存在を知り得ることが可能であり、汚染の指標として利用可能と思われた。

謝辞

銀ゼオの製造、改良に携わり、この調査の共同研究者であるサンケイ化学（株）、検査方法等において技術指導を頂いたタカラバイオ（株）、鹿児島大学医学部細菌学教室 小田紘教授に深謝致します。

また、県内の温泉水を提供して頂いた温泉施設関係者並びにレジオネラ属菌の検査時の問題点等について意見交換を行った（社）薬剤師会試験センターに深謝致します。

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）
- 6) 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）
- 7) 久保園祥子，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（第Ⅱ報），本誌，8，102～106（2007）

A sterilization method of the *Legionella* genus germs by silver ion and establishment of quick laboratory procedure(Ⅲ)

Shoko MINODA, Ken-ichiro YOSHIKUNI, Nobuhiro UENO

Shigeki MATSUYAMA, Toshiro HONDA, Kanji ISHITANI

Tsuyoshi KURAMOTO, Yoshihiko MIYATA

(Kagoshima Prefectural Institute for Environmental Research and Public Health, 1-24
Shiroyama-cho, Kagoshima-shi, 892-0853, JAPAN)

Abstract

We examined a disinfection method of *Legionella* genus germs by silver ion as a disinfection method of taking the place of chlorination executed in a lot of bathhouse facilities now. Consequently, it was confirmed that the effect of the disinfection method by the silver ion was different by the spring quality, and in a laboratory it was restrained fixation of the biofilm to the bathtub wall and the filtration machine by the silver ion, its effect was high for *Legionella* genus germs and general bacteria, and so on. But, the piping structure and management method are variety by the bathhouse facilities, and further examination is necessary to establish more effective directions.

Also we examined about real-time PCR as a quick laboratory procedure of *Legionella* species. It was thought that it was possible to use as a pollution index on public health, though the problem of the removal of the inhibitor remains.

Key Words : silver ion, *Legionella* genus germs, real-time PCR