

新たに開発した次亜塩素酸処理循環浴槽システムの レジオネラ属菌・大腸菌群および一般細菌の制御

住谷 敬太¹, 木村 哲也¹, 齋藤 利明¹, 高田 勇人²,
吉住 正和², 横田 陽子², 藤田 雅弘², 小畑 敏²,
森田 幸雄^{2,3}, 野田 雅博⁴, 新井 孝雄¹,
小澤 邦寿², 木村 博一^{2,4}

Controls of *Legionella* spp., Coliforms and Viable Bacteria on Circulating Hot Water Bath Equipped with a Newly Developed Hypochlorite Treatment System

Keita SUMIYA¹, Tetsuya KIMURA¹, Toshiaki SAITO¹, Hayato TAKADA²,
Masakazu YOSHIKAZUMI², Yoko YOKOTA², Masahiro FUJITA², Satoshi KOBATAKE²,
Yukio MORITA^{2,3}, Masahiro NODA⁴, Takao ARAI¹, Kunihisa KOZAWA²
and Hirokazu KIMURA^{2,4}

¹ Yamato Co. Ltd, 118 Huruichi-machi, Maebashi-shi, Gunma 371-0844, Japan

² Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science,
378 Kamioki-machi, Maebashi-shi, Gunma 371-0052, Japan

³ Tokyo Kasei University, 1-18-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8602, Japan

⁴ Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases,
4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan

I S S N 0385-5201

防 菌 防 黴 誌

Bokin Bobai

Shinkousan Bldg., 13-38, Nishi-Hon-machi 1-chome, Nishi-ku, Osaka, 550-0005, JAPAN.

THE SOCIETY FOR ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL AGENTS, JAPAN.

【調査論文】

新たに開発した次亜塩素酸処理循環浴槽システムの レジオネラ属菌・大腸菌群および一般細菌の制御

住谷 敬太¹, 木村 哲也¹, 齋藤 利明¹, 高田 勇人²,
吉住 正和², 横田 陽子², 藤田 雅弘², 小畑 敏²,
森田 幸雄^{2,3}, 野田 雅博⁴, 新井 孝雄¹,
小澤 邦寿², 木村 博一^{2,4}

Controls of *Legionella* spp., Coliforms and Viable Bacteria on Circulating Hot Water Bath Equipped with a Newly Developed Hypochlorite Treatment System

Keita SUMIYA¹, Tetsuya KIMURA¹, Toshiaki SAITO¹, Hayato TAKADA²,
Masakazu YOSHIZUMI², Yoko YOKOTA², Masahiro FUJITA², Satoshi KOBATAKE²,
Yukio MORITA^{2,3}, Masahiro NODA⁴, Takao ARAI¹, Kunihisa KOZAWA²
and Hirokazu KIMURA^{2,4}

¹ Yamato Co. Ltd, 118 huruichi-machi, Maebashi-shi, Gunma 371-0844, Japan

² Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science,
378 Kamioki-machi, Maebashi-shi, Gunma 371-0052, Japan

³ Tokyo Kasei University, 1-18-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8602, Japan

⁴ Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases,
4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan

To control harmful microorganisms such as *Legionella* spp. in a circulating hot water bath, we manufactured a circulating hot water bath equipped with a newly developed hypochlorite treatment system. This bath system is composed of a circulating hot water bath unit, a filter unit, and a hypochlorite treatment unit. Using this bath system, we monitored the proliferation of *Legionella* spp., coliforms and viable bacteria in a filter unit and/or circulating water for 3 months as an index of microorganism control. In addition, consumption of potassium permanganate, turbidity, and pH were monitored as an index of chemical water quality. As a result, significant suppression of the growth of *Legionella* spp., coliforms and viable bacteria in a filter unit and/or circulating hot water was found. In addition, there was no significant deterioration in the chemical water quality. The results suggested that the bath system used in this study could control the growth of harmful bacteria and may be applicable for the microbial control of circulating hot water for relatively long periods. (Accepted 8 August 2011)

Key words : Circulating hot water bath (循環式浴槽) / Coliforms (大腸菌群) / Hypochlorite treatment system (次亜塩素酸処理システム) / *Legionella* spp. (レジオネラ属菌) / Viable bacteria (一般細菌).

¹ ㈱ヤマト 〒371-0844 群馬県前橋市古市町118 ☎027-290-1865

² 群馬県衛生環境研究所 〒371-0052 群馬県前橋市上沖町378 ☎027-232-4881

³ 東京家政大学 〒173-8602 東京都板橋区加賀1-18-1 ☎03-3961-8214

⁴ 国立感染症研究所 〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1 ☎042-561-0771

緒 言

近年、循環式浴槽を用いた温浴施設等においてレジオネラ感染症等が問題となっている¹⁻³⁾。わが国においては、「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」や「公衆浴場における水質基準等に関する指針」等により、レジオネラ症を防止する策が講じられている^{4,5)}。

次亜塩素酸は、レジオネラ属菌のみならず水中に存在する種々の病原体の殺滅に極めて有効である⁶⁾。さらに、次亜塩素酸は、循環式温浴施設の濾過装置および循環配管部のレジオネラ属菌の制御にも効果的であると報告されている⁷⁻⁹⁾。今回、我々は、新たにレジオネラ属菌制御のための次亜塩素酸処理循環浴槽システムを開発した。また、本システムを既存の温浴施設に設置し、長期間(3ヶ月)におけるレジオネラ属菌、大腸菌群および一般細菌の制御を中心とした実証研究を行った。以下にその内容を報告する。

実 験 方 法

1. 新たに開発した次亜塩素酸処理循環浴槽シス

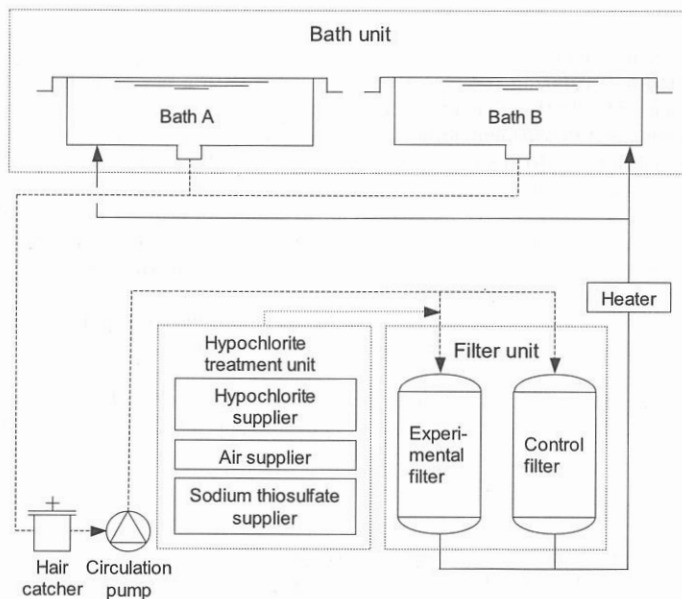


Fig.1. A schematic illustration of a circulating hot water bath equipped with a newly developed hypochlorite treatment system.

テムの概要

新たに開発した本システムを群馬県内のA温浴施設(入浴者数1,000人/日規模)に設置し、実証研究を行った。本システムの模式図をFig.1に示す。本システムは、主に循環浴槽ユニット(Bath unit)、濾過ユニット(Filter unit)および次亜塩素酸処理ユニット(Hypochlorite treatment unit)から構成されている。

1) 循環浴槽ユニットの概要

循環浴槽ユニットは、総湯量 8.3m^3 (水温 42°C)となる浴槽A(男子浴槽, 湯量 4.15m^3)および浴槽B(女子浴槽, 湯量 4.15m^3)で構成されている。浴槽水を循環ポンプ装置により、流量 $16.6\text{m}^3/\text{h}$ で循環した。これは、計算上、2ターン/hの濾過処理を行う循環量である。また、入浴に伴うオーバーフロー温水は回収せずに排水し、浴槽の水位調整は水位計により制御し、その分井戸水を供給した(浴槽補給水: 浴槽を常時満水状態に保つために必要な補給水量は、1日あたり全浴槽容量の1.3~2.0倍、あるいは $70\sim 80\text{L}/\text{人}\times 1$ 日最大入浴人員¹⁰⁾)。

2) 濾過ユニットの概要

濾過ユニットの模式図(A)と外観(B)を Fig. 2 に示す。次亜塩素酸処理を行う濾過ユニットと次亜塩素酸未処理対照濾過ユニットは、循環水中の微生物が十分に除去可能になるように、耐圧槽内に5層の濾過層を作製した。濾材は、市販製品(株トーケミ)を用いた。濾過層の構成は、第1層(0.6mm径シリカサンド、厚さ31.2cm、総量 0.12m^3)、第2層(1mm径シリカサンド、厚さ15.6cm、総量 0.06m^3)、第3層(2~4mm径支持砂利、厚さ15.6cm、総量 0.06m^3)、第4層(4~8mm径支持砂利、厚さ15.6cm、総量 0.06m^3)および第5層(12~20mm径、厚さ15.6cm、総量 0.06m^3)とした。

3) 次亜塩素酸処理ユニットの概要

次亜塩素酸処理ユニットは、次亜塩素酸液(ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム液)供給装置、空気供給装置およびチオ硫酸ナトリウム供給装置から構成され、このユニットを濾過ユニットに連結した。なお、次亜塩素酸処理システムが作動している間は、試験系のための閉鎖循環回路により、濾過装置に次亜塩素酸が作用するようにした。残

留塩素はチオ硫酸ナトリウムによって中和後排出した。塩素濃度のモニタリングは、市販の自動遊離残留塩素濃度測定装置(テクノエコー(株))によって行った。さらに、実験期間中に濾過装置内に蓄積するレジオネラ属菌、アメーバおよび一般細菌の変動を測定するため、次亜塩素酸処理を行わない対照系濾過ユニットを別途設置した。なお、この対照系濾過ユニットは、実験期間中に蓄積した病原体が浴槽循環水を汚染しないように閉鎖循環回路系内に設置した。

2. 本システムの次亜塩素酸処理法および衛生管理

1) 次亜塩素酸処理法

濾過装置の次亜塩素酸処理は以下のとおり行った。まず、営業終了後、毎日、濾過装置内の遊離残留塩素が 50mg/L となるよう、次亜塩素酸の原料であるジクロロイソシアヌル酸ナトリウム液を注入した。この時、短絡循環配管を経由して、濾過装置内の塩素濃度を均一化させた。その後、空気供給装置によりエアーを下部から注入し、濾過層内を流動状態とするばっ気攪拌洗浄を30分間行った。洗浄水は、チオ硫酸ナトリウムを十分

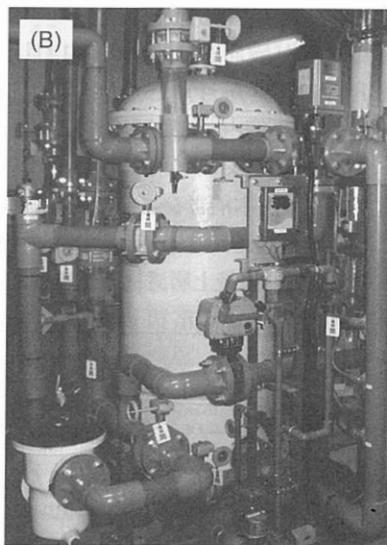
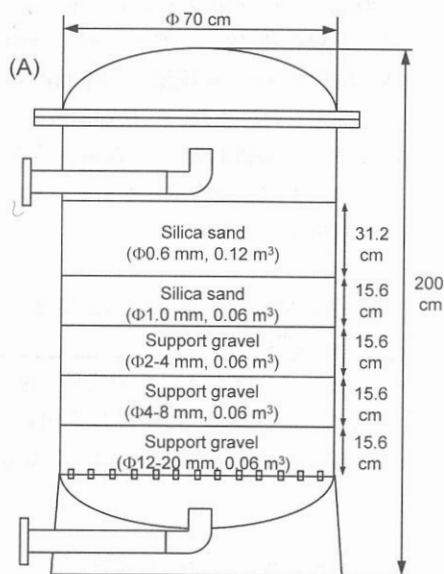


Fig.2. A schematic illustration(A) and photograph(B) of the filter unit of the present system.

添加し、残留塩素を中和しながら排水した。また、週1回、遊離残留塩素が10mg/Lとなるようにジクロロイソシアヌル酸ナトリウム液を注入し、浴槽全体の循環消毒を2時間行った。この時、循環浴槽の水位を調整している連通管にも同様の処理を行った。洗浄水は、チオ硫酸ナトリウムを添加しながら1時間循環し、洗浄水中の残留塩素を十分に中和後排水した。最後に、逆洗浄と洗浄を行い、チオ硫酸ナトリウムなどを除去した。なお、以上の全工程は、電気計装により全自動で制御した。

2) 本システムの衛生管理

本システムの衛生管理の主な条件を以下に示す。営業時間中、濾過装置の通水速度は、33m/hとした。遊離残留塩素濃度の管理は、ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム液を濾過装置に入る直前に注入し、自動遊離残留塩素測定装置により0.7mg/Lに制御した。営業終了後、濾過装置の洗浄は、電動5方弁(術ワイ・エム・コントロール)を用いて流路の切り替えを行い、逆洗浄を5分間、通水速度41m/h、洗浄を1分間、通水速度33m/hとして毎日実施した。また、浴槽の清掃および完全換水も毎日行った。

3. 実験期間および微生物学的検証材料

本システムの実証試験期間は、2009年12月1日～2010年3月3日(3か月)とした。微生物学的検証材料は、試験期間中、試験開始日(0日)、13日、49日、71日、83日および91日後に、当該温浴施設の営業終了後、本消毒システムの高濃度塩素供給前に次亜塩素酸処理濾過装置および対照系濾過装置から、濾過器の最上層濾材を採取した。また、浴槽水も浴槽Aおよび浴槽Bから上述のスケジュールで採水した。

4. レジオネラ属菌、アメーバ、大腸菌群および一般細菌の分析

濾材における前処理は、濾材50gと500mLの滅菌リン酸塩希釈溶液(pH7.2, 食塩不含)をストマッカー袋に入れ混和後、超音波洗浄機(40kHz)により、超音波処理(120W・24秒

間)^{1,1,2)}を行い、その上清を細菌測定に用いた。濾材中の微生物分析値は、濾材の乾燥重量(g-ds)あたりに換算した。

レジオネラ属菌の測定は、第3版レジオネラ症防止指針に準拠した¹⁾。以下に、手順を簡単に述べる。滅菌遠心管に検水200mLを入れ、6,000 r/min, 15°C, 30分間遠心した。上清を捨て、1 mLの滅菌蒸留水で管壁内をよく洗い、沈渣を懸濁した。0.2M HCl-KCl緩衝液(pH2.2)と濃縮検水とを等量混合し、室温で20分間放置した。前処理検体100 μLをGVPC寒天培地(シスメックス・ビオメリュウ(株))に塗布した。接種後、シャーレは裏返して36±1°Cで5～7日間培養した。レジオネラ属菌が疑われるコロニーを、BCYEα寒天培地(システイン無添加)とBCYEα寒天培地(システイン添加)(シスメックス・ビオメリュウ(株))の順に、双方に画線塗布した。36±1°Cで2～3日間培養し、BCYEα寒天培地(システイン添加)にのみ発育したコロニーをレジオネラ属菌とした¹⁾。アメーバ数の測定は、新版レジオネラ症防止指針に準拠した¹³⁾。濾材前処理後の上清1 mLを、大腸菌塗布無栄養寒天培地(60°Cで1時間の熱処理により不活化した大腸菌(DH1株)を塗布した1.5% Bacto-agar培地(日本ベクトン・ディッキンソン(株)))に接種し、風乾後42±1°Cで3～4日間培養し、形成されたプラークを確認し、倒立顕微鏡下でアメーバを同定した。また、一般細菌数は、上水試験方法に準じて分析した¹⁴⁾。なお、大腸菌群数については、下水試験方法に準拠して分析し、浴槽水のみ解析を行った¹⁵⁾。

5. 過マンガン酸カリウム消費量、濁度およびpHの測定

過マンガン酸カリウム消費量(酸性法)、濁度(積分球式光電光度法)およびpH(ガラス電極法)はそれぞれ上水試験方法に準拠して測定した¹⁴⁾。

6. 濾材表面の電子顕微鏡観察

濾材の観察は、実験開始後、71日目のみ実施した。濾材の処理は、以下の要領で行った。まず、

濾材を2.5%グルタル・アルデヒド (pH7.4) に浸漬し、細胞組織固定を行った。その後、0.1M カゴジイト緩衝液 (pH7.4) により洗浄し、エタノール (50~99.5%) 脱水、自然乾燥後、イオン蒸着処理を行った。観察は、走査型電子顕微鏡 S-3500N (株)日立製作所) にて行った。

実験結果

1. レジオネラ属菌, アメーバ, 大腸菌群および一般細菌数の変動

Fig. 3 A に次亜塩素酸処理濾過器, 対照濾過器 (次亜塩素酸未処理) の濾材中および浴槽水におけるレジオネラ属菌数の経日変化を示す。まず、浴槽水と次亜塩素酸処理濾過器の濾材からは調査期間中レジオネラ属菌は検出されなかった。一方、対照濾過器の濾材からは、実験開始49日以降、レジオネラ属菌が検出されるようになった。また、このときに見られた菌数の増加は急激であり、最大で 2.6×10^2 CFU/g-ds まで達した。

Fig. 3 B に次亜塩素酸処理濾過器, 対照濾過器 (次亜塩素酸未処理) の濾材中におけるアメーバ数の経日変化を示す。次亜塩素酸処理濾過器の濾材からは、調査期間中、21PFU/g-ds 以下に抑制されていた。一方、対照濾過器の濾材からは、実験開始49日目に 660 PFU/g-ds のピークが確認されたが、71日目には 100 ± 10 PFU/g-ds 程度に低減し、その後アメーバ数はほぼ一定であった。

Fig. 3 C に次亜塩素酸処理濾過器, 対照濾過器 (次亜塩素酸未処理) の濾材中および浴槽水における一般細菌数の経日変化を示す。試験開始15日後には両実験系の濾材とも、一般細菌数が増加し次亜塩素酸処理濾過器および対照濾過器ともに 2.9×10^5 CFU/g-ds であった。しかし、その後、次亜塩素酸処理濾過器の一般細菌数は減少傾向がみられ、91日後は 6.6×10^3 CFU/g-ds であった。一方、対照濾過器においては、一般細菌の増加がみられ、91日後は 5.2×10^6 CFU/g-ds であった。また、浴槽水 A および B からそれぞれ $0.9 \times 10^1 \sim 3.4 \times 10^4$ CFU/mL, $1.1 \times 10^1 \sim 5.4 \times 10^4$ CFU/mL の一般細菌が検出された。大腸菌群は試験期間中、浴槽水から検出されなかった。

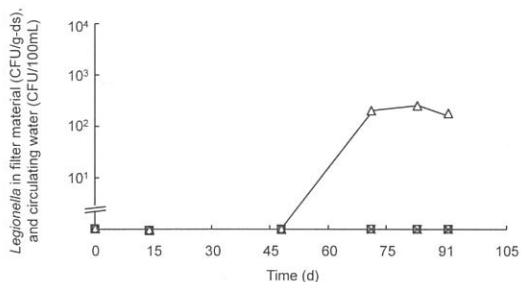


Fig.3A. Time course of the growth of *Legionella* spp. in the present study. ×, filter material treated with hypochlorite; Δ, Control (no treatment with hypochlorite); ○, circulating water from Bath A; □, circulating water from Bath B.

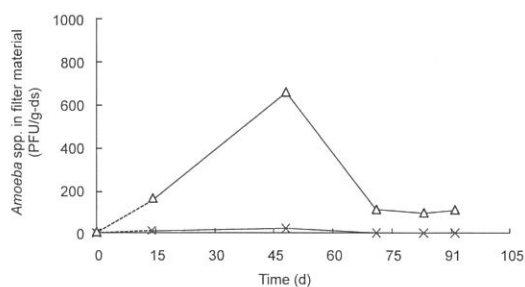


Fig.3B. Time course of the growth of *Amoeba* spp. in the present study. ×, filter material treated with hypochlorite; Δ, Control (no treatment with hypochlorite).

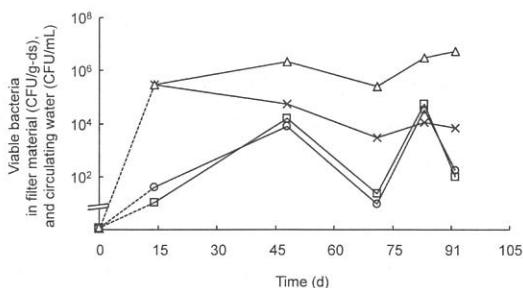


Fig.3C. Time course of viable bacteria counts in the present study. ×, filter material treated with hypochlorite; Δ, Control (no treatment with hypochlorite); ○, circulating water from Bath A; □, circulating water from Bath B.

2. 浴槽水の過マンガン酸カリウム消費量, 濁度および pH

試験期間中の浴槽 A, B における過マンガン酸カリウム消費量と濁度を Fig. 4 A と Fig. 4 B に示す。過マンガン酸カリウム消費量は、浴槽

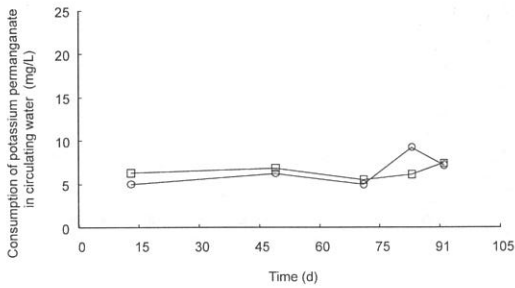


Fig.4A. Time course of the consumption of potassium permanganate. ○, circulating water from Bath A; □, circulating water from Bath B.

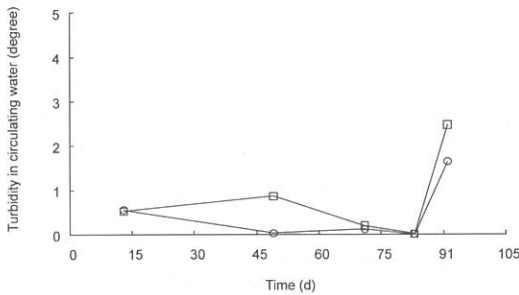


Fig.4B. Turbidity over Time. ○, circulating water from Bath A; □, circulating water from Bath B.

A, B 共に試験期間中 7 ± 2 mg/L 程度, 濁度は試験開始91日後にのみ1度を超えた。また, pHは 8.3 ± 0.2 程度で一定であった。

3. 濾材表面の電子顕微鏡観察

次亜塩素酸処理濾過器と対照濾過器の濾材の電子顕微鏡写真を Fig. 5 A および Fig. 5 B に示す。実験開始後, 71日目では, 次亜塩素酸処理系の濾材からは, ごく少数の細菌様物質しかみられなかった。一方, 対照濾材表面には比較的多くの細菌様物質が観察された。

考 察

循環浴槽を有する温浴施設などにおいて, 有害細菌, 特にレジオネラ属菌が循環浴槽水, 循環浴槽あるいは循環浴槽の付帯設備や装置(配管内および濾過装置等)で増殖し, 入浴者へ感染し, 健康被害を与えることは社会的問題となっている¹⁻³⁾。したがって, 循環浴槽水や循環浴槽の付

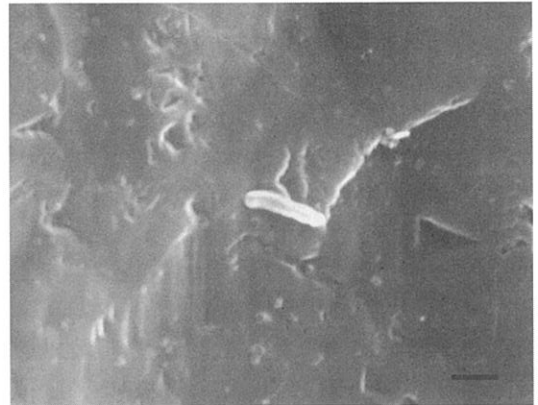


Fig.5A. Photograph of the material surface of the filter treated with hypochlorite by scanned electron microscopy. Scale bar=1 μ m.

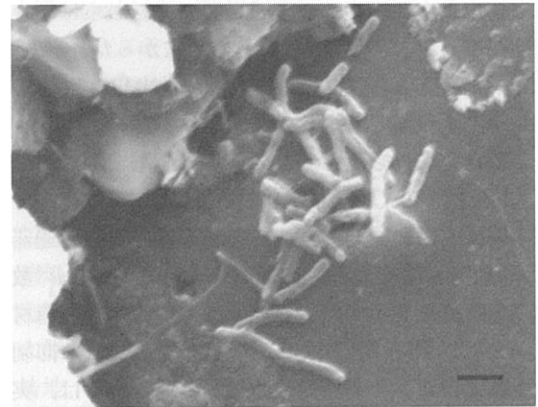


Fig.5B. Photograph of the material surface of the filter untreated with hypochlorite by scanned electron microscopy. Scale bar=1 μ m.

帯設備に存在するレジオネラ属菌等の病原細菌の増殖制御は重要であると考えられる。今回, 我々は, 新たに開発した次亜塩素酸処理循環浴槽システムによるレジオネラ属菌, アメーバ, 大腸菌群および一般細菌の制御を主体とした実証研究を行った。その結果, 本システムによって, 循環浴槽水あるいは濾過装置内のこれらの細菌は, 比較的長期間, 効果的に制御されることが明らかになった。また, 温浴に適した水質も維持されることも明らかになった。

本システムに類似した循環浴槽設備はすでに考案・応用されている⁷⁻⁹⁾。しかし, 本システムのように, 効率的に濾過装置の塩素処理が可能で, かつレジオネラ属菌を制御可能なシステムは少な

いと思われる。本研究では、遊離残留塩素濃度は浴槽 A, B 共に $0.7 \pm 0.2 \text{ mg/L}$ 程度を維持, 毎日の濾過器の逆洗浄および洗浄と浴槽の清掃および完全換水を実施し, 濾過装置内のレジオネラ属菌の変動を調査した。その結果, 次亜塩素酸未処理の対照濾過装置の濾材からは71日目以降にレジオネラ属菌が最大 $2.6 \times 10^2 \text{ CFU/g-ds}$ まで検出された (Fig. 3 A)。一方, 次亜塩素酸処理ユニットにより, 濾過装置を処理した実験系においては, レジオネラ属菌は検出されなかった。よって, 法令に基づく衛生管理のみでは, 濾過装置内の長期間のレジオネラ属菌制御が困難であることが示唆された。

レジオネラ属菌の制御のためには, レジオネラ属菌宿主アメーバとバイオフィルムの抑制が重要であると考えられている¹⁶⁾。本実験における対照系濾過器内濾材の分析結果からは, 14日目に一般細菌数が $2.9 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$ まで急速に増加 (Fig. 3 C), 続いて49日目にアメーバ数が660 PFU/g-ds まで増殖 (Fig. 3 B), その後71日目以降にレジオネラ属菌数が最高値である $2.6 \times 10^2 \text{ CFU/g-ds}$ を示した (Fig. 3 A)。これらのことは, 従来の知見¹⁶⁾と同様にアメーバを主とするレジオネラ属菌の生態系が濾過器内濾材に形成されたことによるものと思われる。一方, 本システムを適用した濾過器内濾材は, 定期的な次亜塩素酸ばっ気搅拌消毒が行われたことで, 濾材中の一般細菌およびアメーバの増殖が抑制され (Fig. 3 B, Fig. 3 C), レジオネラ属菌の生態系が形成されなかったためレジオネラ属菌が検出されなかったと考えられた。

次に, 本研究において, 実験開始後, 浴槽水や濾過装置から一定以上の一般細菌数が検出された。しかし, その数値は既報に比し, 特に大きな数値ではないと思われた^{7-9, 16)}。

公衆浴場における衛生等管理要領⁵⁾では「浴槽の消毒に当たっては, 塩素系薬剤を使用し, 浴槽水中の遊離残留塩素濃度を頻繁に測定して, 通常 0.2 ないしは 0.4 mg/L 程度を保ち, かつ, 遊離残留塩素濃度は最大 1.0 mg/L を超えないよう努めること」となっている。本研究期間中, 浴槽水の遊離残留塩素濃度は浴槽 A, B 共に 0.7 ± 0.2

mg/L であり, 通常は若干高いものの要領の最大値である 1.0 mg/L を超えることはなかった。

本研究のような長期間における循環浴槽水や濾過器中に存在するレジオネラ属菌等の動向に関する実証研究は少ない。また, 本システムのような全自動制御による衛生管理 (浴槽水中の遊離残留塩素濃度 $0.7 \pm 0.2 \text{ mg/L}$ を常時維持, 定期的な濾過器および循環配管内の次亜塩素酸処理) と, 法令に基づいた衛生管理とを対照的に実施したような実証データの報告は少ないと思われる。法令に基づく衛生管理のみでは長期間の営業によってレジオネラ属菌が濾過器内に潜むことが明らかとなり浴槽水中に混入する可能性があるため, 本研究で開発したような次亜塩素酸処理システムを用い, レジオネラ属菌の増殖が十分に抑制された濾過器および配管内壁部を維持し, 衛生的な浴槽水を循環し続けることが重要であると思われる。今後, さらに, レジオネラ症防止のために, 循環浴槽の付帯濾過器などのレジオネラ属菌等の制御に関する研究を行う必要がある。

結 論

レジオネラ属菌など, 有害細菌制御のための次亜塩素酸処理循環浴槽システムを新たに開発し, 温浴施設において実証研究を行った。その結果, 本システムは, 温浴施設濾過装置内におけるレジオネラ属菌などの制御に効果的であることが示唆された。

文 献

- 1) Stout, J.E., and Yu, V.L. (1997) Legionellosis. *N. Engl. J. Med.*, 337, 682–687.
- 2) 岡山昭彦 (2005) レジオネラ症: 国内におけるアウトブレイク. *臨床と微生物*, 32, (4), 360–364.
- 3) Kurosawa, H., Fujita, M., Kobatake, S., Kimura, H., Oshima, M., Nagai, A., Kaneko, S., Iwasaki, Y., and Kozawa, K. (2010) A Case of *Legionella* Pneumonia Linked to a Hot Spring Facility in Gunma Prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 63, 78–79.
- 4) 厚生労働省 (2001) 循環式浴槽におけるレジオ