

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：56401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00808

研究課題名（和文）低濃度オゾン水によるレジオネラ属菌の高度処理を備えた循環式浴槽の開発

研究課題名（英文）A Study on the Circulation Bath with Advanced Treatment for the Inactivation of Legionella by Low Levels of Ozonated Water.

研究代表者

土居 俊房 (DOI, Toshifusa)

高知工業高等専門学校・ソーシャルデザイン工学科・嘱託教授

研究者番号：20197990

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は「オゾン水を用いた安全で安心な循環式浴槽を開発する」ことであり、オゾン水による細菌の不活化に及ぼす浴槽水の汚れ（有機物）の影響を明らかにした。模擬有機物としてアルブミン、ペプトン、でんぷん、SDSを選定し、低濃度オゾン水による大腸菌の不活化に及ぼす模擬有機物の影響を明らかにした。また、家庭の浴槽水を用いて低濃度オゾン水による大腸菌およびレジオネラ属菌の不活化実験を行い、不活化率99.9%以上を達成するオゾン注入率および溶存オゾン濃度を明らかにした。さらに、細菌の核酸に結合し蛍光を発する試薬とフローサイトメトリーを用いて迅速にレジオネラ属菌の生菌数が測定できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オゾン水による循環式浴槽中のレジオネラ属菌の不活化に関する研究において、有機物の存在を考慮した既往の研究はなく、本研究の学術的な特色で独創的な点はレジオネラ属菌の不活化に及ぼす浴槽水の汚れ（有機物）の影響を検討したことである。

本研究ではオゾン水を活用した安心・安全な循環式浴槽を提供できることを明らかにした。また、本研究の成果は規模の小さな浴槽にも適用できるため、災害が発生時の避難所などに移動式のものを提供できる。さらに、避難所では感染症の拡大も問題になっているが、特に、インフルエンザウイルス、ノロウイルス、新型コロナウイルスなどの浴槽を介して感染が広がる可能性のある感染症の対策にも有効である。

研究成果の概要（英文）：This study was carried out to develop the safe and secure recirculating-type bath system and clarify the effect of contaminants in bathwater on the inactivation of Legionella pneumophila using ozonated water.

First, albumin, peptone, starch and sodium dodecyl sulfate (SDS) were selected as simulated organic matter, the effect of these simulated organic matters on the inactivation of Escherichia coli was reported. Second, the inactivation of E. coli and L. pneumophila were tested by ozonated bath water in the recirculating-type bath. And the ozone injection rate and the dissolved ozone concentration that achieve the inactivation rate of 99.9% or more were clarified. Furthermore, it was reported that the viable count of L. pneumophila can be rapidly measured by using a fluorescent reagent combined with their nucleic acid and the flow cytometry.

研究分野：水環境工学

キーワード：レジオネラ属菌 大腸菌 オゾン水 不活性化 浴槽

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化社会による老人福祉施設や健康志向による温泉施設の増加に伴い、Fig.1 に示す循環式浴槽（文献 1）の需要が増加している。循環式浴槽は濾過器に浴槽水を通し清澄を保つ構造であり、その利点は温泉水や水道水の使用量および再加温のための熱エネルギーの節約、浴槽の洗浄にかかる労力の軽減、随時入浴できるなどである。反面、衛生管理が不十分な施設では濾過器でレジオネラ属菌が増殖し、入浴者がレジオ

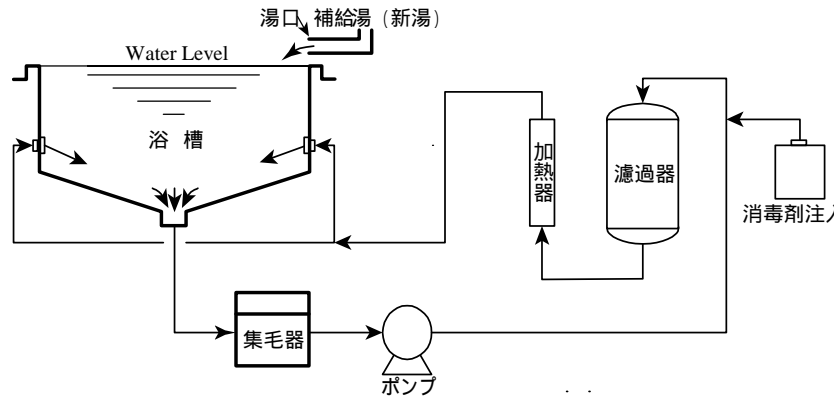


Fig.1 代表的な循環式浴槽のフロー（文献 1）

ネラ肺炎を発症する危険がある。この肺炎は重症化しやすく致命率の高いことが知られている。2002 年 7 月に宮崎県日向市の温泉施設で国内最大のレジオネラ肺炎集団感染事故が起こり、入浴者 19,773 名のうち 295 名が発症し、34 名が確定診断され、そのうち 7 名が死亡した（文献 2）。その後、2003 年に厚生労働省は公衆浴場において塩素による衛生管理（遊離残留塩素濃度 0.2 ~ 0.4mg/L）の徹底を推奨している（文献 3）。欧米に比べ日本国内でのレジオネラ症の頻度は低いとされてきたが、近年その報告数が増加してきている。その原因の一つは、塩素系殺菌剤の殺菌力が弱く、0.3 mg/L 遊離塩素でレジオネラ属菌を 99%不活化するためには 30 分以上の接触時間が必要（参考文献 4）で即効性に欠けることである。また、塩素に耐性を持つ菌が発生していることが指摘され、さらに、目にしみる、皮膚の炎症など塩素がもたらす人体への影響（文献 5）や環境への残留毒性が危惧されている。

一方、厚生労働省はレジオネラ属菌の殺菌方法として塩素以外にオゾンと紫外線を推奨している（文献 6）。特に、オゾンは殺菌力、即効性、残留毒性のないことから循環式浴槽の殺菌剤として注目されている。しかし、高濃度（0.1 ppm 以上）のオゾンガスは人体への影響が大きく危険であるため浴槽水の溶存オゾン濃度の低濃度化およびその不活化効果の検証が重要である。この分野の海外の研究例はなく、また、国内の研究例は中室らのみで、フラスコ実験でオゾン水（純水）によるレジオネラ属菌の不活化に及ぼす温度と pH について検討している（文献 7）が、循環系では検討していない。また、実際の浴槽水には入浴者の垢、浴用洗剤などの有機物が存在するため溶存オゾン濃度が低下し、それに伴い細菌の不活化力も低下することが予想される。しかし、有機物の存在下で、かつ、低濃度のオゾン水に関するこの分野の海外および国内の研究例はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は「オゾン水を用いた安全で安心な循環式浴槽を開発する」ことであり、特に、オゾン水による細菌の不活化に及ぼす浴槽水の汚れ（有機物）の影響を明らかにすることである。そこで、模擬有機物としてアルブミン、ペプトン、でんぷん、SDS を選定し、低濃度オゾン水による大腸菌の不活化に及ぼす模擬有機物の影響を明らかにした。また、家庭の浴槽水を用いて、低濃度オゾン水による大腸菌およびレジオネラ属菌の不活化実験を行い、不活化率 99.9% 以上を達成するオゾン注入率および溶存オゾン濃度を明らかにした。さらに、細菌の核酸に結合することで蛍光を発する試薬とフローサイトメトリーを用いて迅速にレジオネラ属菌の生菌数が測定できることを明らかにした。

3. 研究の方法

供試菌は大腸菌 *Escherichia coli* O6 JCM 5491 株およびレジオネラ属菌 *Legionella pneumophila* ATCC 33152 株を用いた。大腸菌は Nutrient Broth (Bacto) 液体培地で培養（37℃, 150rpm, 19 ± 1 時間）し、培養液 40mL を 3 回遠心分離し、生理食塩水に置換したものを不活化実験で用いた。また、レジオネラ属菌は GVPC 寒天培地（ニッスイ）で 37℃, 4 日間、培養を行い、培養したレジオネラ属菌を生理食塩水に懸濁し、遠心分離（2900 g × 15min）を 3 回を行い生理食塩水で置換したものを不活性化実験で用いた。

RO 水または 4 人が入浴後の家庭用浴槽水を用いて、2mM-リン酸緩衝液（pH 7.0）50L を調製し、これを Fig.1 に示す実験装置に入れ、温度 40℃、流量 5.0 L/min で循環した。エゼクタを用いて酸素ガスを供給後、大腸菌またはレジオネラ属菌を 40mL 添加した。さらに、酸素ガスを

40 分間注入後,オゾンガス(濃度 20mg/NL)を所定流量で注入した。このとき気相及び液相中の溶存オゾン濃度を紫外線吸収式オゾンモニタで測定した。ここで,溶存オゾン濃度はバルブを切り替えることにより,エゼクタ入り口(A)および出口(B),第1および第2気液分離器の出口(C,D)の4カ所で測定した。また,10分毎にエゼクタ入口から循環水を採取し,生菌数を測定した。ここで,レジオネラ属菌のサンプルは夾雑菌を抑制するために 0.2M HCL-KCL (pH2.2)で酸処理を行った。

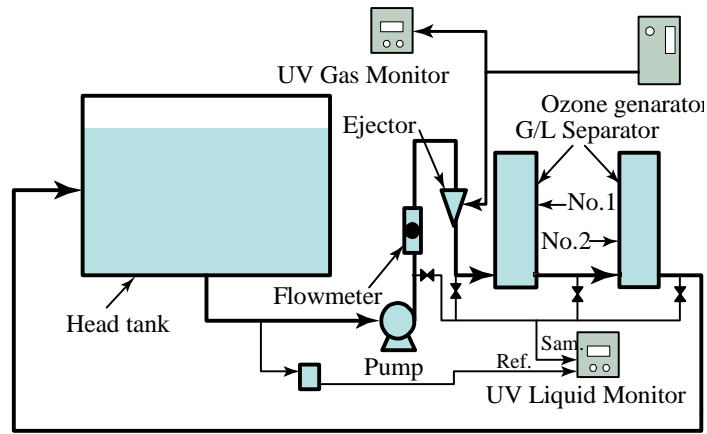


Fig.2 Schematic diagram of experimental apparatus

大腸菌はデスオキシコレート寒天培地を用いて混釈後, 37 °C, 19h 培養を行い菌数の測定をした。また,レジオネラ属菌はGVPC 寒天培地で 37 °C, 4 日間, 培養を行い菌数の測定をした。なお,循環液の TOC, NPOC および TN を島津製 TOC 計を用いて測定した。

また,フローサイトメトリー分析は Bacterial Viability and Counting Kit (サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック)および LSRFortessa X-20 (ベクトン・ディッキンソン)を用いて行った。サンプル, 987 μL に SYTO9 , 1.5 μL と Propidium iodide (PI), 1.5 μL で染色し,室温,遮光下で 15 分放置した。さらに,染色した細胞サンプルに高分子微粒子懸濁液 10 μL (1 × 10⁶counts/mL)を加え,良く攪拌後,フローサイトメトリーで分析した。

4. 研究成果

(1) 低濃度オゾン水による大腸菌の不活化に及ぼす有機物の影響

RO 水で調製した 2mM-リン酸緩衝液に 4 種類の模擬有機物 (SDS, アルブミン, ペプトン, デンプン)を個々に溶解した。オゾンガス注入率 (= オゾンガス濃度 20mg/NL × 0.076NL/min ÷ 循環水量 5L/min) 0.30mg-O₃/L 一定で通気したときの循環水中の大腸菌の生菌数の経時変化を Fig.3 に示す。アルブミンおよび SDS は 10 分後に不活化率が 99.9%以上である。一方,ペプトンは 40 分後の不活化率が 99.9%以上,またデンプンは 40 分後の不活化率が 99.9%である。この結果は,ペプトンとデンプンはオゾンとの反応が優先的に起こったことを示し,一方,アルブミンと SDS はオゾンとの反応はあまり起こらず,細菌の不活化が起こっている。

また,アルブミンと SDS のエゼクタ出口の溶存オゾン濃度は 0.2mg/L と比較的高く,その結果,大腸菌は非常に良く不活化されている。逆に,デンプンは 0.03mg/L と非常に低く,大腸菌の不活化の速度も緩やかである。しかし,ペプトンの溶存オゾン濃度は 0.16mg/L と比較的高いにもかかわらず,大腸菌の不活化の速度はデンプンとほぼ同じで小さく,大腸菌の不活化の速度と溶存オゾン濃度が比例していない。

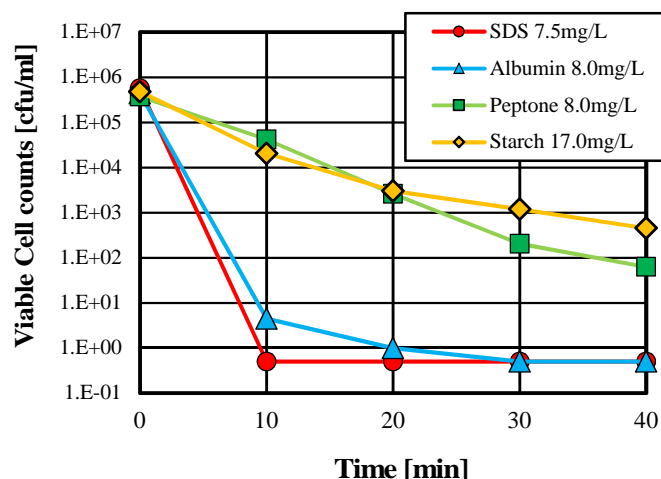


Fig.3 Inactivation of *E. coli* cells in RO water at I.R. 0.3mg-O₃/L and pH 7.

(2) 低濃度オゾン水による大腸菌の不活化に及ぼす浴槽水の影響

今回の実験に用いた家庭用浴槽水 (BW) の不揮発性全有機炭素 (NPOC) は 1.0±0.2mg/L (n=18), 全窒素 (TN) は 4.6±1.9mg/L (n=13) であった。この浴槽水を用いて調整した 2mM リン酸緩衝

液に大腸菌を添加し、注入率 0.1mg/L のオゾンガスで不活化した。大腸菌の不活化率は 20 分後に 97.7%，40 分後に 99.9% 以上であった。比較対象として浴槽水の替りに RO 水 (ROW) を用いて同様な実験を行った。RO 水の場合は、10 分後に不活化率は 99.9% 以上になった。両者の差は浴槽水の汚れの違いで、汚れ (有機物) を酸化するのに溶存オゾンが消費されたため大腸菌の不活化率が低下したと思われる。

オゾン注入率は、オゾンガス注入開始から約 10 分で 0.1mg-O₃/L に達した。RO 水のエゼクタ出口の溶存オゾン濃度は、20 分で 0.1mg-O₃/L に達し、その後も徐々に上昇した。一方、浴槽水のエゼクタ出口の溶存オゾン濃度は非常にゆっくり上昇し、50 分で 0.04mg-O₃/L になった。

本研究の不活化率の目標値は、実験装置の空間時間が 10 分で、かつオゾン注入率 (オゾンガス濃度) が設定値になるまでに約 10 分必要なことから「オゾンガス注入開始から 20 分で 99.9% 以上」とした。

浴槽水中の大腸菌の不活化に及ぼすオゾン注入率の効果を Fig.4 に示す。オゾンガスなし (酸素ガス) の場合は、菌添加から 40 分間菌の減少はほとんどない。オゾンガス注入から 20 分後の大腸菌の不活化率は、オゾン注入率 0.10mg-O₃/L () で 97.7%，オゾン注入率 0.30mg-O₃/L () で 99.8%，オゾン注入率 0.49mg-O₃/L () で 99.9% 以上である。したがって、浴槽水における大腸菌の不活化 (20 分で 99.9% 以上) に必要なオゾン注入率は、0.3 ~ 0.5mg-O₃/L である。

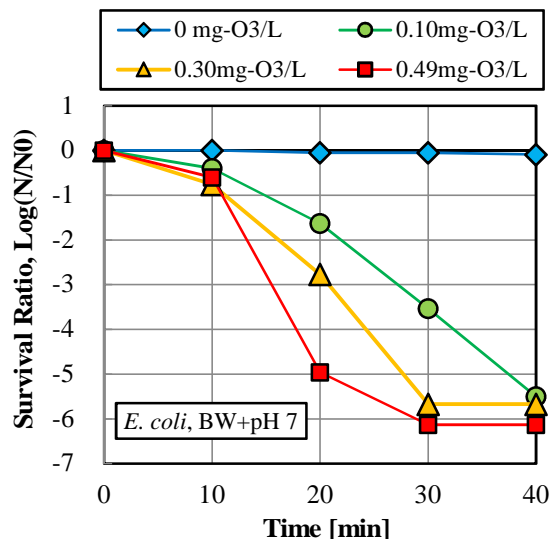


Fig.4 Inactivation of *E. coli* cells in bath water at pH 7.

(3) 低濃度オゾン水によるレジオネラ属菌の不活化に及ぼす浴槽水の影響

浴槽水中のレジオネラ属菌の不活化に及ぼすオゾン注入率の効果を Fig.5 に示す。オゾンガスなし (酸素ガス) の場合は、菌添加から 40 分間菌の減少はほとんどない。オゾンガス注入から 20 分後のレジオネラ属菌の不活化率は、オゾン注入率 0.10mg-O₃/L () で 81.5%，0.31mg-O₃/L () で 96.0%，0.48mg-O₃/L () で 99.9% 以上である。

したがって、浴槽水におけるレジオネラ菌の不活化 (20 分で、99.9% 以上) に必要なオゾン注入率は、0.5mg-O₃/L である。

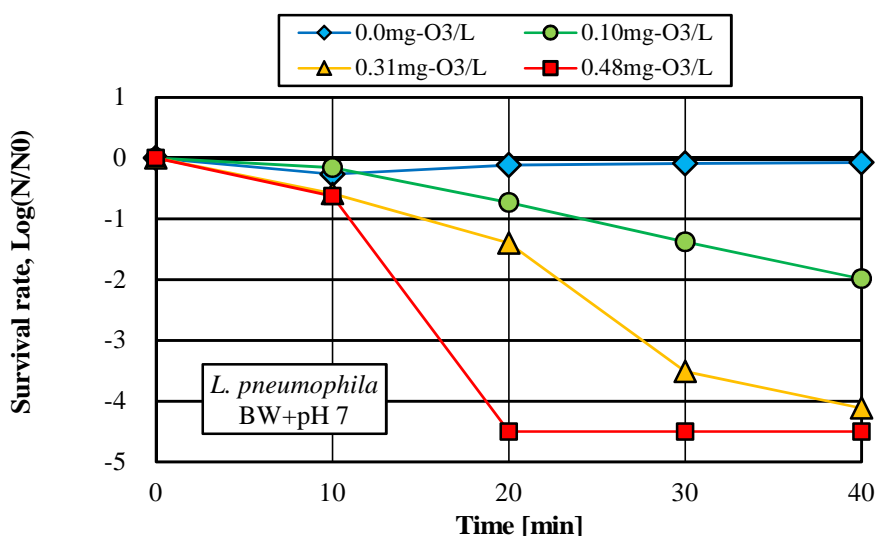


Fig.5 Inactivation of *L. pneumophila* cells in bath water at I.R. 0.10 mg-O₃/L and pH 7.

オゾン注入率 0.48mg-O₃/L の場合、オゾン注入率はオゾンガス注入開始から約 10 分で 0.48mg-O₃/L に達した。エゼクタ出口の溶存オゾン濃度は、20 分で 0.22mg-O₃/L に達し、その後も上昇した。また、エゼクタ入口の値は 40 分まで濃度の上昇は見られず、50 分で 0.016mg-O₃/L に達した。安心・安全な浴槽システムを構築するためには、浴槽水の溶存オゾン濃度を出来るだけ低くする必要はあるが、レジオネラ属菌の不活化のためには、オゾン注入率を 0.5mg-O₃/L、浴槽水の溶存オゾン濃度を 0.02~0.05mg-O₃/L に制御すべきである。

(4) フローサイトメトリーを活用したレジオネラ属菌の迅速測定法の検討

0.85% NaClを加えた浴槽水に大腸菌を添加し、オゾン注入率 0.49mg-O₃/L で不活化を行い、フローサイトメトリーおよびコロニーカウントにより生菌数を測定した。コロニーカウントは、大腸菌群を選択的にカウントできる培地を使用しているため浴槽水に含まれている一般細菌の影響を受けずに測定できた。一方、フローサイトメトリーは、浴槽水に含まれている一般細菌も区別せずに測定するため生菌の総数が多くなった。また、フローサイトメトリーの測定下限が 5×10^2 count/mL のため、 1×10^3 count/mL 以下の菌濃度は測定できなかった。しかし、この結果からオゾンで不活化できない細菌が存在することがわかる。

次に浴槽水にレジオネラ属菌を添加し、オゾン注入率 0.49mg-O₃/L で不活化を行い、フローサイトメトリー () およびコロニーカウント () により生菌数を測定した結果を Fig.6 に示す。フローサイトメトリーのサンプルは遠心濃縮 (200 倍濃縮) 後、酸処理 (2 倍希釈) を行い 100 倍濃縮した。その結果、フローサイトメトリーの測定下限は、10 count/mL まで向上し、コロニーカウントとフローサイトメトリーの測定の精度は同程度といえる。コロニーカウントは 4 日以上培養時間が必要であるのに対して、フローサイトメトリーはサンプルの前処理を含めて、2 時間程度で測定できるため迅速な測定法といえる。

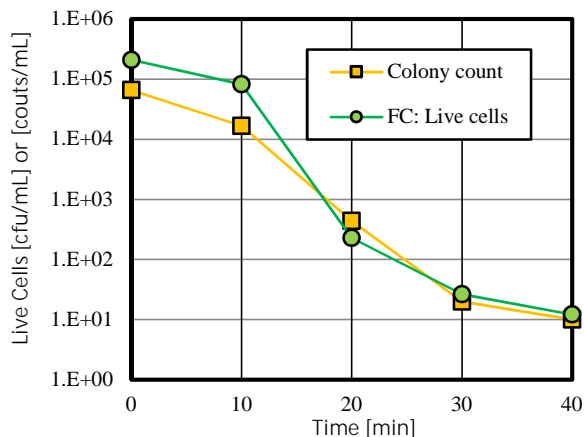


Fig.6 Inactivation of *L. pneumophila* cells in bath water, when measured by Flow cytometry and Colony count at I.R. 0.49 mg-O₃/L.

< 引用文献 >

- 1) 厚生労働省健康局生活衛生課長健衛発第 9 5 号 (平成 13 年 9 月 11 日), 入手先 (ホームページ) <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/seikatsu-eisei25/> (参照 2016.10.20)
- 2) 藪内英子, 縣邦雄, 日向市の新設温泉施設を感染源とするレジオネラ症集団発生, 感染症学雑誌, 78(2), 90-98 (2004)
- 3) 厚生労働省健康局長健発第 0214004 号 (平成 15 年 2 月 14 日), 入手先 (ホームページ) <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/seikatsu-eisei25/> (参照 2016.10.20)
- 4) 厚生労働省健康局生活衛生課長健衛発第 0824001 号 (平成 18 年 8 月 24 日), 入手先 (ホームページ) <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/seikatsu-eisei25/> (参照 2016.10.20)
- 5) Domingue E L, et al., Appl Environ Microbiol 54(3), 741-747(1988)
- 6) 佐々木英祐, 他, 化学療法の領域 20(4), 615-619 (2004)
- 7) 中室克彦, 土井 均, 肥塚利江, 枝川亜希子, Legionella の低濃度オゾン水殺菌効果に及ぼす温度及び pH の影響, 防菌防黴誌, 40(2), 75 - 79 (2012)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 土居俊房, 栄枝真央
2. 発表標題 循環式浴槽における低濃度オゾン水によるLegionella pneumophilaの不活性化に及ぼす浴槽水の影響
3. 学会等名 化学工学会 第85年会（大阪）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栄枝真央, 土居俊房, 片岡佐誉, 坂本修士
2. 発表標題 浴槽水のオゾン処理における大腸菌の不活化モニタリングのための フローサイトメトリーの評価
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第46回年次大会（大阪）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshifusa Doi, Maoh Sakaeda, Sayo Kataoka, Syuji Sakamoto
2. 発表標題 Applying flow cytometry to estimate inactivation efficiency of Escherichia coli and autochthonous bacteria during ozonation of bathtub water
3. 学会等名 NIT-NUU Bilateral Academic Conference 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土居俊房, 栄枝真央
2. 発表標題 循環式浴槽における低濃度オゾン水による大腸菌の不活化に及ぼす浴槽水の影響
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土居俊房, 栄枝真央
2. 発表標題 循環式モデル浴槽における低濃度オゾン水による大腸菌の不活化に及ぼす家庭浴槽水の影響
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第45回年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Doi, M. Sakaeda, A. Nakagawa
2. 発表標題 Effect of the Organic Compounds the Inactivation of Escherichia coli by Low Levels of Ozonated Water
3. 学会等名 日本防菌防黴学会, 第44回年次大会 (Sep. 27, 2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考