

【報文】

低濃度オゾン水の *Legionella* に対する殺菌効果

中室 克彦^{1*}, 土井 均²,
肥塚 利江², 枝川亜希子²

Bactericidal Effect of Low-Level Dissolved Ozone to *Legionella pneumophila*

Katsuhiko NAKAMURO^{1*}, Hitoshi DOI¹,
Toshie HIZUKA² and Akiko EDAGAWA²

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University,
45-1, Nagaotoge-cho, Hirakata, Osaka 573-0101, Japan

² Department of Environmental Health, Osaka Prefectural Institute of Public Health
1-3-69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

This study was conducted to determine the disinfection efficacy of low-levels of dissolved ozone on *Legionella pneumophila*. Eight strains were used: one standard strain, five strains from the environment, and two clinical strains. The results of laboratory batch-type experiments showed that the dissolved ozone concentration of 0.034mg/l completely killed *L.pneumophila* after one minute of exposure and the dissolved ozone concentration of 0.005mg/l achieved a 99% sterilization rate after one minute of exposure.

Experiments to estimate on the CT values and the disinfection efficacy of ozone indicated that the CT values of ozone to kill 99.99% of eight strains of *L.pneumophila* were 0.007~0.013 mg · min/l (Average ± standard deviation: 0.011±0.002 mg · min/l).

(Accepted 13 February 2009)

Key words : Low-levels of dissolved ozone (低濃度オゾン水)/Bactericidal effect (殺菌作用)
/*Legionella* (レジオネラ)/CT value (CT値).

緒 言

Legionella は淡水環境や土壌中に広く生息する^{1,2)}。その中で *L. pneumophila* は、主にレジオネラ肺炎およびポンティアック熱などのヒトのレジオネラ感染症を起こす肺炎起因菌である^{3,4)}。

近年、本菌による集団感染事例が各地で起こり公衆衛生上の問題となっている。冷却塔水⁵⁾、循環式浴槽水⁶⁾、給湯水^{7,8)}などの人工的環境水が感染源になることが多く、特に、循環式浴槽水を用いた入浴施設では大規模な集団感染事例が起こっ

ている⁹⁾。

そのため厚生労働省は公衆浴場等の入浴施設におけるレジオネラ感染症防止対策を各自治体に到達した^{10,11)}。これを受け自治体は公衆浴場などの入浴施設に関する条例を整備し、浴槽水の水質基準に *Legionella* に関して、「レジオネラ属菌は10CFU/100ml未満であること」という基準を設け、衛生管理を徹底させるとともに浴槽水の塩素消毒を義務づけた¹²⁾。しかし、浴槽水における塩素消毒は、アンモニアや有機物などの汚濁成分が大きく変動する多数の入浴時の濃度管理が難し

¹ 摂南大学薬学部 〒572-0042 大阪府枚方市長尾峠町45番1号 ☎072-866-3122

² 大阪府立公衆衛生研究所生活環境部 〒537-0025 大阪市東成区中道1-3-69 ☎06-6972-1321

く十分な消毒効果が得られない場合がある。そのため、これらの問題を解決する努力とともに、塩素に代わる種々の代替消毒剤についての検討が行われている。オゾンもその代替消毒剤の一つであり、強い酸化力による *Legionella* に対する殺菌効果が期待される。

オゾンの利用に際しては臭気や人体への影響を考慮して低濃度での使用が要求される。しかし、オゾンの低濃度領域における *Legionella* に対する殺菌効果を定量的に評価した詳細な研究報告はほとんどなく十分には明らかになっていない。

本研究においては、オゾン水による *Legionella* に対する殺菌効果をより正確に求めるため、オゾン消費を考慮した実験を実施した。すなわち、実験に用いる精製水や菌懸濁液中の培地成分などの由来によるオゾン消費を考慮するために高感度オゾン測定器を用いてオゾン濃度を連続的に測定し、減衰曲線を把握することによって、低濃度領域におけるオゾン水の *Legionella* に対する正確な殺菌効果を CT 値（経時的オゾン濃度と処理時間の積：mg・min/l）として評価する試みを行ったので報告する。

実験方法

1. オゾン処理実験水の調製

精製水（TOC：0.17mg/l）2 l を 2 l 褐色試薬瓶に入れ、これにリン酸塩溶液¹³⁾ 2 ml を加えて pH を 7.2 に調整した後、高圧蒸気滅菌を行った。これをマグネチックスターラー（アズワン社製、RSH-1D）の上に載せた 20℃ の恒温水槽内に置いた。適量のオゾン水（15～30ml）を加えて攪拌（360rpm）を行い、溶存オゾン濃度計（荏原実業㈱製、オゾンモニタ EL-55-RD、定量限界：0.001mg/l）に通水しながらオゾン濃度を測定した。試料水が 1 l になったところで通水を止め、その時のオゾン濃度を測定し、オゾン処理実験水の初期濃度とした。

なお、オゾン水は精製水製造装置（オルガノ社製精製水器 DC-210）で生成した精製水（TOC：0.29mg/l）を原水とし、オゾン水生成器（アイ電子工業㈱製、電解式オゾン水生成器 AOD-TH、

生成オゾン水濃度：0～4mg/l）を用いて生成した。

2. 試験菌液の調製

L. pneumophila は、ATCC33152 基準株、環境分離株 5 株（S050818, Y060117-1, J060125-1, A060126-2, N080619）、臨床分離株 2 株（LG2006-2, LG2006-4）の 8 菌株を用いて試験を行った。使用菌株は B-CYE α 寒天培地（栄研化学）に画線塗抹し、36℃、4 日間培養した。その一白金耳をリン酸塩緩衝稀釈水¹³⁾ 10ml に懸濁して 3,000rpm で 20 分間遠心分離操作を行い、上澄みを捨てた。再度リン酸塩緩衝稀釈水 10ml を加えて同様の操作を行った。得られた沈渣に 660nm の吸光度が 0.65 になるようにリン酸塩緩衝稀釈水を加えて約 2×10^8 CFU/ml の *L. pneumophila* 試験菌液を調製した。

3. オゾン処理実験

調製済のオゾン処理実験水 1 l を 20℃ の恒温水槽に置き、これに *L. pneumophila* 試験菌液 1 ml を加えて攪拌し、経時的に 1 ml ずつを 1 mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液 10 μ l 入りの滅菌済み試験管に採取した。この試験溶液 100 μ l を B-CYE α 寒天培地（ビオメリュー）に塗布し、36℃、5 日間培養した。発育コロニー数を数えて生残菌数を算出した。

4. 殺菌効果の判定

殺菌効果は 99.99% 殺菌するための CT 値（経時的オゾン濃度と処理時間の積：mg・min/l）により判定した。すなわち初期濃度から経時的にオゾン濃度を測定し、オゾン濃度の減衰曲線を紙面に作図した。紙面に作図した減衰曲線の経過時間とオゾン濃度で囲まれた部分を切り取った紙の重量（sg）を求め、初期濃度（ I' mg/l）と経過時間（ T' min）に囲まれた長方形の重量（ S_g ）に対する比（ s/S ）から次式 $CT = I' \times T' \times s/S$ を用いて CT 値（mg・min/l）を求めた。ここで求められた CT 値を横軸に、生残率の対数値を縦軸にとり回帰直線を求めた。この回帰直線を用いて元の菌数の 99.99% を殺菌するための CT 値

(以下99.99% CT 値) を求め、殺菌効果を評価した。

実験結果

1. 低濃度オゾン水および菌液添加時のオゾン水の減衰曲線

0.005~0.025mg/l の低濃度領域における水温 20°C, pH7.2 のオゾン水の減衰曲線を図 1 に示す。

いずれの初期オゾン濃度においても時間の経過とともに直線的な減少が認められ、濃度が高いほど減少率は大きい傾向にあった。これらの半減期は3.3~5.8分で、オゾンの初期濃度が高い方が半減期は長かった。また、これと同様の実験条件において、オゾン処理実験水 1 l に試験菌液 1 ml を添加した時のオゾン濃度の減衰曲線を図 2 に示す。菌液の添加により初期の段階で急速なオゾン濃度の減少が認められ、その後、徐々に減少速度が小さくなる傾向が認められた。試験菌液添加 2 分30秒以降においては、その減衰の傾きが菌液

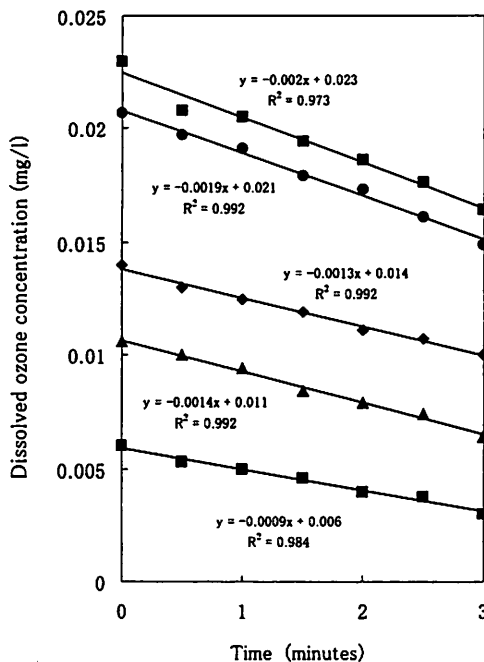


Fig. 1. Ozone decay in phosphate buffer solution at pH7.2 and 20°C

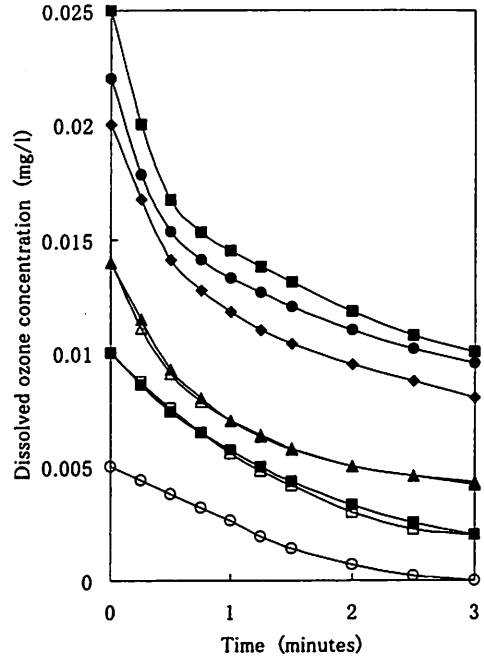


Fig. 2. Ozone decay in phosphate buffer solution with *Legionella* suspension at pH7.2 and 20°C

を加えなかった図 1 の場合とほぼ同様のオゾン濃度の減衰挙動を示した。

2. オゾンの *Legionella* に対する殺菌効果

オゾンの初期濃度の違いによる *L. pneumophila* に対する殺菌効果を検討するため、0~0.034mg/l のオゾン水に *L. pneumophila* を約 2×10^6 CFU/ml になるように添加し、経時的な殺菌効果を検討した結果を図 3 に示す。オゾン濃度の増加とともに殺菌効果が増大し、0.034mg/l においては強い殺菌効果を示し、 10^6 CFU/ml オーダーの菌数が 30 秒後には 10^2 CFU/ml オーダーにまで減少し、1 分後には不検出になり完全に殺菌されることを示した。

一方、非常に低濃度の 0.005mg/l においても 10^6 CFU/ml オーダーの菌数が 1 分後に 10^1 CFU/ml オーダーに減少し、データは示していないが 1 分30秒後には 10^1 CFU/ml オーダーまで減少した。

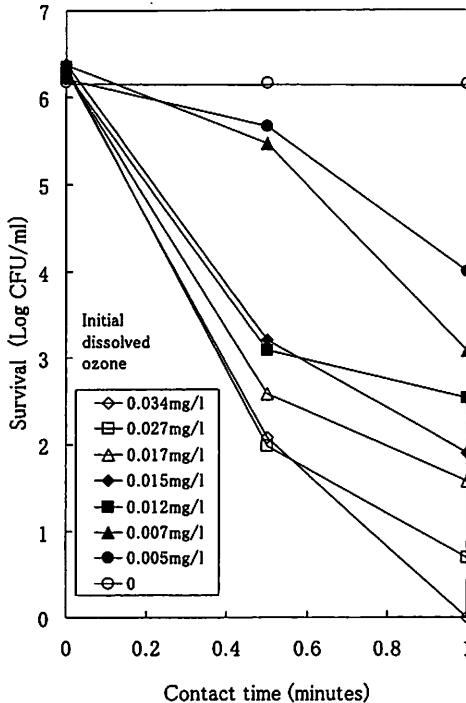


Fig. 3. Bactericidal effect of different initial dissolved ozone concentration on *L.pneumophila* ATCC33152 at pH7.2 and 20°C

3. *Legionella* 各菌株に対するオゾンの CT 値による 99.99% 殺菌効果の評価

L. pneumophila の ATCC 基準株 1 株, 環境分離株 5 株, 臨床分離株 2 株の 8 菌株に対するオゾンの殺菌効果試験を行い, これらの殺菌効果の評価するための 99.99% CT 値を求めた。

これら算出した各菌株に対するオゾンの 99.99% CT 値およびオゾン初期濃度と反応時間の積 (IC'T 値) も併せて表 1 に示す。99.99% CT 値

は環境分離株 5 株は 0.007~0.013mg・min/l, 臨床分離株 2 株は 0.013 と 0.011mg・min/l を示した。しかし, オゾン初期濃度と反応時間より求めた IC'T 値は, オゾン消費を加味したときの CT 値よりも大きい値を示した。

8 菌株の 99.99% CT 値は 0.007~0.013mg・min/l で平均±標準偏差が 0.011 ± 0.002 mg・min/l であった。このように, 低濃度領域においてもオゾン水は *Legionella* に対して強い殺菌作用を示した。

考 察

消毒剤の効果を評価するには, 一般に消毒剤濃度 (C : mg/l) に作用時間 (T : min) を乗じた CT 値で示される。その場合, 消毒剤濃度は消毒剤の添加初期濃度で示されることが多い。しかしオゾンは強い酸化力を有するため, 殺菌効果試験時にオゾンと試薬や培地等に由来する被酸化性物質および細菌との接触反応においてオゾン消費が生じるため, 消毒剤の添加初期濃度では真の殺菌濃度を正確に把握することはできない。

著者らは低濃度オゾン水による *Legionella* に対する正確な殺菌効果の評価するために, 殺菌に消費されたと考えられるオゾン消費以外の自己分解や不純物によるオゾン消費を最小限に抑え, 経時的にオゾン濃度を測定することによって実際の殺菌に寄与するオゾン量を求めることにより殺菌効果の評価を試みた。

すなわち, 試薬などに由来する不純物を出来るだけ混入させないように, 被酸化性物質となる有機物質含有量の少ない試験水 (TOC : 0.17mg/l)

Table 1. The CT values of dissolved ozone for a 99.99% kill of *L. pneumophila*

Bacteria strain (Serogroup)	Origine	99.99% CT (mg・min/l)	99.99% IC'T (mg・min/l)
<i>L.pneumophila</i> ATCC33152 (SG1)	ATCC	0.011	0.015
<i>L.pneumophila</i> S050818 (SG1)	Circulating bathtub	0.007	0.009
<i>L.pneumophila</i> Y060117-1 (SG1)		0.012	0.016
<i>L.pneumophila</i> J060125-1 (SG1)		0.007	0.010
<i>L.pneumophila</i> A060126-2 (SG5)		0.010	0.013
<i>L.pneumophila</i> N080619 (SG1)	Cooling tower	0.013	0.017
<i>L.pneumophila</i> LG2006-2 (SG1)	Clinical specimen	0.013	0.017
<i>L.pneumophila</i> LG2006-4 (SG1)		0.011	0.015
Average ± standard deviation		0.011 ± 0.002	0.014 ± 0.003

を用い、供試菌株はリン酸塩緩衝稀釈水で2回洗浄を行った。さらに、0.001mg/lまで測定可能な高感度溶存オゾン濃度計を用いて低濃度溶存オゾンの減衰曲線を正確に求め、低濃度オゾン水の *Legionella* に対する殺菌効果を評価した。

基準株、環境分離株および臨床分離株の8菌株を対象に低濃度オゾン水の殺菌効果について検討した結果、オゾン消費を考慮した時の殺菌効果を示す99.99% CT 値の平均が0.011mg・min/lで標準偏差が0.002mg・min/lであった。由来の異なる菌株間の相違はほとんど認められず、いずれの菌株に対しても低濃度領域 (CT 値が0.011mg・min/l) においてオゾン水が *Legionella* に対して強い殺菌作用を示すことが明らかになった。

Domingue ら¹⁴⁾は水温25°C、pH8.0の条件で0.07~0.33mg/lのオゾン濃度のオゾン水を用いて *Legionella* 環境分離株に対する殺菌効果を検討した。その結果、0.13mg/l以下のオゾン濃度では30分間反応させても *Legionella* に対する殺菌効果は認められず、少なくとも0.20mg/lに達するまでは不活化できないと報告している。彼らの実験でも夾雑物質によるオゾン消費の影響を避けるためにオゾン消費の少ない試験液を調製し、供試菌の洗浄を3回行っている。しかし、オゾン濃度は添加時の初期濃度しか測定しておらず、処理経過によるオゾン濃度の減衰を考慮して殺菌効果を評価していない。そのため、著者らが行った結果よりも不活化オゾン濃度が40倍も高くなっているが、これは殺菌効果実験時の試験水や試薬溶液等のオゾン消費に起因するオゾン濃度の減少によることが考えられる。

今回の実験において、オゾン水の初期濃度0.005mg/l、CT値として0.01mg・min/lレベルの低濃度領域でも *Legionella* に対して殺菌作用のあることが判明した。今回は夾雑物の存在しない *Legionella* 単独でのオゾン処理実験であるが、オゾン消費物質などが存在した場合においても、共存物によるオゾン消費を十分把握すればオゾン消費により要求されるオゾン量以上の殺菌に必要なオゾン量を加算することによって殺菌に必要なオゾン濃度を決定することが可能であると考えられる。したがって、種々の物質が共存した場

合のオゾン水の *Legionella* に対する殺菌効果を評価するためには、対象とする水を用いて本研究で行った方法でオゾン減衰曲線を作成し、 $CT=IC' \times T' \times S/S$ からCT値を求めることによって *Legionella* に対する殺菌に必要なオゾン濃度を求めることが可能になると考える。

結 論

低濃度領域におけるオゾン水のオゾン消費を考慮した *Legionella* に対する殺菌効果について検討した結果、以下のことが明らかとなった。

- (1) オゾン水への *Legionella* 菌液の添加によって初期の段階で菌に由来する急速なオゾン消費が認められた。
- (2) オゾン消費を最小限にした時の殺菌効果実験において、0.034mg/lのオゾン濃度で30秒間に99.99%殺菌が可能な強い殺菌作用が認められ、0.005mg/lの低濃度においても1分30秒後において99.999%の殺菌効果が確認できた。
- (3) 8種類の *L. pneumophila* 菌株に対するオゾンの99.99% CT値は平均±標準偏差が0.011±0.002mg・min/lで基準株、環境分離株および臨床分離株の菌株間の相違はほとんど認められなかった。

文 献

- 1) Fliermans, C. B., Cherry, W.B., Orrison, L.H., Smith, S.J., Tison, D.L., and Pope, D.H. (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 9-16.
- 2) Fliermans, C. B., Cherry, W. B., Orrison, L. H., and Thacker, L. (1979) Isolation of *Legionella pneumophila* from non-epidemic related aquatic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 1239-1242.
- 3) Meyer, R. D., and Finegold, S. M. (1980) Legionnaires' disease. *Annu. Rev. Med.*, 31, 219-232.
- 4) Stout, J. E., and Yu, V. L. (1997) Legionellosis. *N. Engl. J. Med.*, 337, 682-687.
- 5) Dondero, T. J., Rendtorff, R. C., Mallison, G.

- F., Weeks, R. M., Levy, J. S., Long, E. W., and Schaffner, W. (1980) An Outbreak of Legionnaires' disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower. *N. Engl. J. Med.*, 302, 365-370.
- 6) 大野 章 (2003) 繰り返すレジオネラ集団感染, *モダンメディア*, 49, 273-278.
- 7) Linden E. W., Robert W. D., Kenneth M.S., Lori J. S., Lillian O., Steven K., and David A. J. (1988) Investigation of *Legionella pneumophila* in drinking water. *J. A. W. W. A.*, 80, 87-93.
- 8) Edagawa A., Kimura A., Doi H., Tanaka H., Tomioka K., Sakabe K., Nakajima C. and Suzuki Y. (2008) Detection of culturable and nonculturable *Legionella* species from hot water system of public buildings in Japan. *Appl. Microbiol.*, 105, 2104-2114.
- 9) 岡田美香, 河野喜美子, 倉文明, 前川純子, 渡辺治雄, 八木田健司, 遠藤卓郎, 鈴木泉 (2005) 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 I. 発生状況と環境調査, *感染症誌*, 79, 365-374.
- 10) 循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルについて, 健発第95号 (平成13年9月11日)
- 11) 公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について, 健発第0214004号 (平成15年2月14日)
- 12) 大阪府公衆浴場法施行条例, 平成16年10月29日改正
- 13) 財団法人日本水道協会 (2001) 上水試験方法 (2001年版) 日本水道協会, 東京
- 14) Domingue E. L., Tyndall R.L., Mayberry W. R. and Pancorbo O. C. (1988) Effects of three oxidizing biocides on *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 741-747.