

—受託研究—

粘土鉱物系抗菌剤による温浴水中のレジオネラ属菌抑制(第2報※) (安全性と快適性を兼ね備えた温泉水等の衛生保持技術の開発)

環境・機能材料科 阿部 久雄・木須 一正・増元 秀子
環境保健研究センター 田栗 利紹

要 約

実際の温泉水など循環水中のレジオネラ属菌の増殖を1カ月以上に亘り連続的に抑制するために、粘土鉱物のモンモリロナイトと有機金属錯体を複合化した粘土鉱物系抗菌剤の適用効果について検討した。粘土鉱物系抗菌剤(粘土/カフェイン銀錯体複合)を水懸濁液(1,000mg/L)中で水と接触させると、水中の溶出銀濃度は1時間後に4mg/Lに達した。塩素イオンが10~500mg/L共存すると溶出銀濃度は0.1~1mg/Lに止まるものの、同条件下の硝酸銀水溶液における銀濃度0.01~0.1mg/Lと比べると約10倍安定であることが分かった。レジオネラ属菌を接種した各種温泉水5種において粘土鉱物系抗菌剤4種の抗菌活性を評価したところ、カフェイン銀錯体を導入した抗菌剤の活性が最も強く、最小殺菌濃度は炭酸水素塩泉で3.12mg/L、塩化物泉で6.25mg/Lであった。カフェイン銀錯体導入試料を造粒し、1週間毎に換水する条件で温泉水等に接触させたところ、5種すべての温泉水等においてレジオネラ属菌が接触から13日目までに検出下限(10cfu/100ml)以下まで抑制された。

キーワード：銀、カフェイン、抗菌、レジオネラ、温浴、循環水

1. はじめに

近年、冷却塔やプール、浴場など、循環水中のレジオネラ属菌の感染によるレジオネラ症(肺炎・ポンティアック熱)が社会問題化しており、その対策技術が必要とされている。関連施設では、通常、塩素処理による殺菌が行われるが¹⁾、配管や濾過装置などでの発生を完全に抑制することは難しく、一定時間が経過するとレジオネラ属菌がしばしば検出される。長崎県で開発された粘土鉱物系抗菌剤^{2)~4)}は水中における抗菌力の持続性に優れており、レジオネラ属菌に対しても有効なことから、循環水中にはじめから投与し塩素殺菌と併用することにより、水循環設備中でレジオネラ属菌の発生を抑制することが期待される。

著者らは既報⁵⁾において、レジオネラ属菌を実際に接種した冷却水、温浴水の模擬循環水に、粘土鉱物系抗菌剤を接触させ、24~48時間以内に検出限界以下にまで抑制できることを明らかにした。一方、実際の循環水には抗菌剤の能力を阻害する成分が含まれることも予想される。また、循環水は一定

期間毎に換水が行われ、循環水中に溶解している銀イオンなどの抗菌成分は換水により初期状態に戻されるため、抗菌剤の持続性が求められる。さらに循環水へ抗菌剤が流出しないようにする工夫が必要であるが、循環水と抗菌剤の接触が長期に及ぶ場合には、接触方法の最適化が必要である。本研究では循環水中のレジオネラ属菌に対する抗菌剤の適用が、30日を越えるような比較的長期に及ぶ際に必要となる、抗菌剤の溶出特性、安定性、循環水との接触方法等について検討したので報告する。

2. 実験方法

2-1 抗菌剤及び温泉水

実験には粘土鉱物のモンモリロナイト(以下粘土)の層間にカフェイン銀錯体、イミダゾール銀錯体、ヒノキチオール銅錯体及びヒノキチオール銀をそれぞれ導入して作製した粘土鉱物系抗菌剤(以下抗菌剤)を用いた。また実際の温泉水として、わが国で一般的な炭酸水素塩泉、塩化物泉、酸性泉の各温泉水と、その他に井水、水道水を用いた。温泉水

※平成22年度長崎県窯業技術センター研究報告、pp.23-27(2011)を第1報とする。

等の物性等は後述する。

2-2 抗菌剤の溶出特性及び溶出成分の安定性評価

抗菌剤（粉体）及びその造粒試料の溶出特性評価に当たっては、抗菌剤を純水に懸濁させて基本的な溶出特性を調べた。また、抗菌剤を循環水中に流出させない方法として、抗菌剤を透水性の不織布包材に封入し、包材を通して純水もしくは温泉水等と接触させた。実際の消毒環境や温泉水中の塩素イオンを想定し、種々の濃度の塩素イオン、次亜塩素酸ナトリウムを加えた水溶液中において抗菌剤の溶出特性を調べた。水中の水溶性の銀濃度測定に当たっては、試料溶液中の不溶成分を孔径 $0.2\mu\text{m}$ のフィルターで除粒子し、原子吸光分光光度計で測定した。

2-3 実際の温泉水における抗菌剤の評価

各種温泉水に対する抗菌剤の抗菌活性は、温泉水等にレジオネラニューモフィラ（*Legionella pneumophila* American Type Culture Collection 33152。以下レジオネラ属菌）を懸濁させ、最小殺菌濃度（Minimum Bactericidal Concentration, MBC）として評価した。また、抗菌剤の長期安定性（1カ月以上）を検証するために、温泉水等を 40°C に加熱し、次亜塩素酸ナトリウムを所定濃度に維持したものに、抗菌剤の粉体もしくは造粒体を透水性不織布包材を通して接触させ、水中の銀濃度と抗菌活性の推移を観察した。温泉水等を7日間隔で換水することにより、換水を伴う場合の抗菌剤の持続性を評価した。

3. 結果及び考察

3-1 抗菌剤の溶出特性

(1) 塩素イオンが共存するときの抗菌剤の銀溶出

抗菌剤によるレジオネラ属菌抑制が有効なことを既に確認しているが、抗菌剤からの有効成分の溶出特性やその安定性については不明の点が多く、はじめに抗菌剤からの溶出特性について検討した。

抗菌剤のうちカフェイン銀錯体導入試料（タイプC）、ヒノキチオール銅錯体導入試料（タイプHCU）、ヒノキチオール銀錯体導入試料（タイプHAG）を、純水中にいずれも 1000mg/L の濃度で分散させ、塩化ナトリウムを塩素イオンとして $10\sim 500\text{mg/L}$ 添加したときの銀溶出の変化を、それぞれ図1～図3に示す。タイプCからの銀溶出に及ぼす塩素イオン濃度の影響は小さく、銀濃度は $0.1\sim 1\text{mg/L}$ の範囲にあったが、タイプHAGの溶出銀濃度は、塩素

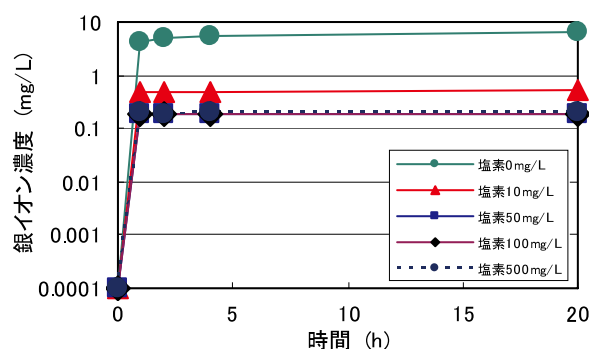


図1 塩素イオン共存時の銀濃度（抗菌剤タイプC）

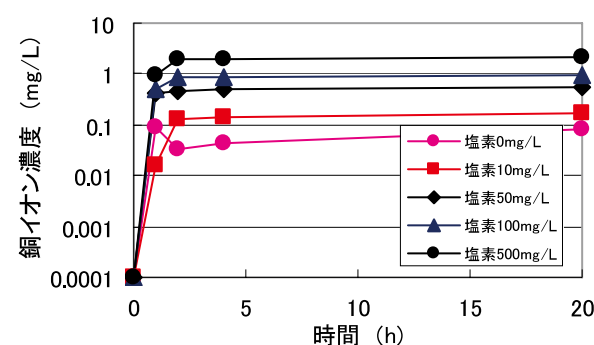


図2 塩素イオン共存時の銀濃度（抗菌剤タイプHCU）

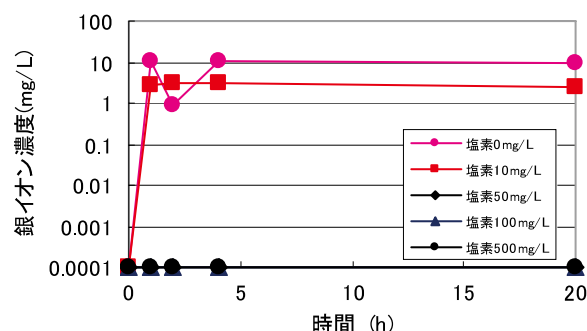


図3 塩素イオン共存時の銀濃度（抗菌剤タイプHAG）

イオン 10mg/L のとき $2\sim 3\text{mg/L}$ であったが、塩素イオンが 50mg/L 以上共存すると銀濃度はほぼ 0mg/L となった。また、タイプHCUからの溶出銅濃度は、塩素イオン 10mg/L のときの 0.2mg/L から、塩素イオン 500mg/L のとき 2mg/L になるなど、塩素イオン濃度の増加により高くなる傾向を示した。このように、供試金属錯体/粘土複合材料のなかでは、カフェイン銀錯体、ヒノキチオール銅錯体による溶出金属濃度が安定していた。

(2) 抗菌剤の溶出成分の安定性

抗菌剤タイプCの有効成分であるカフェイン銀錯体水溶液（銀イオンとして 10mg/L ）に塩化ナトリウム水溶液を塩素イオンとして $10\sim 500\text{mg/L}$ の範囲で添

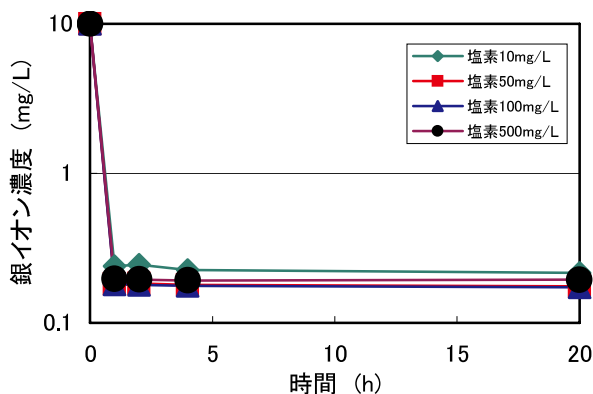


図4 カフェイン銀錯体水溶液の銀濃度
(塩素イオン10～500mg/L共存時)

加したときの水溶液中の銀濃度の変化を図4に示す。

銀イオン濃度はいずれも約0.2mg/Lへ減少し、その後安定した。また、銀イオンとして100mg/Lを含むカフェイン銀錯体水溶液に塩化ナトリウム水溶液を塩素イオンとして1000～8000mg/Lの範囲で段階的に加えると、銀イオン濃度は0.2～0.7mg/Lへ減少したが(図5)、この濃度は4日後まで維持されることを確認した。一方、硝酸銀水溶液(銀として10mg/L)に塩素イオンを10～500mg/Lの範囲で段階的に加えたときの水溶液中の銀濃度の変化を図6に示す。銀イオン濃度は0.01～0.1mg/Lへ大幅に減少した。この銀イオン濃度は同条件でのカフェイン銀錯体水溶液中の銀濃度の1/10であることから(図6)、銀イオンは単独で存在するよりも錯体(カフェイン銀錯体)として存在する方が塩素イオンに対して安定であるのではないかと考えられる。

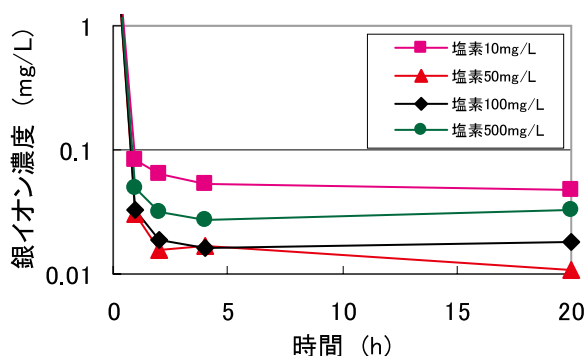


図6 硝酸銀水溶液の銀濃度
(塩素イオン20～500mg/L共存時)

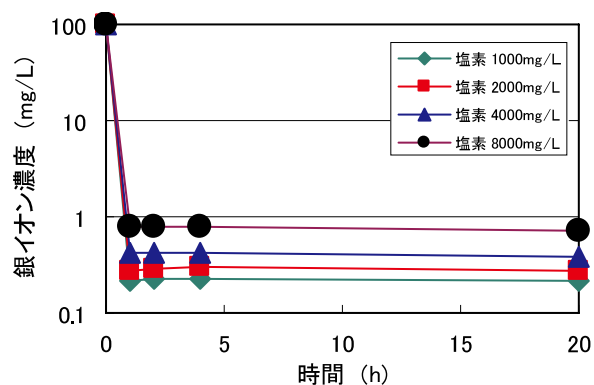


図5 カフェイン銀錯体水溶液の銀濃度
(塩素イオン1000～8000mg/L共存時)

(3)抗菌剤の長期徐放性

抗菌剤タイプCを純水中に1000mg/Lの濃度で懸濁させたときの、水中の銀濃度の変化を図7に示す。銀濃度は初期段階で約2.5mg/Lを示し、時間の対数に対して概ね直線的に増加し、30日後に7.5mg/Lに達した。このようにカフェイン銀錯体を導入した抗菌剤タイプCの純水への溶出は徐々に安定的に進行する。一方、同条件で求めた抗菌剤タイプHCU(ヒノキチオール銅錯体を導入)の懸濁液における銅濃度変化を図8に示すが、銅濃度の増加は少なく不安定であることが分かる。

3-2 循環水と複合材料の接触方法の検討

(1)透水性包材を通した温泉水等への接触

前項までの実験は水中に抗菌剤粉体を分散させて

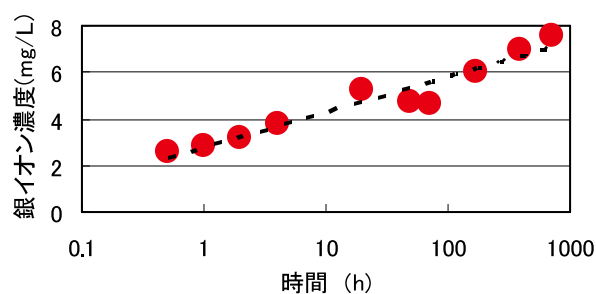


図7 抗菌剤タイプCからの純水への銀溶出

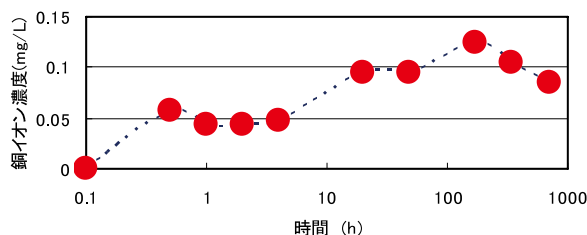


図8 抗菌剤タイプHCUから純水への銀溶出

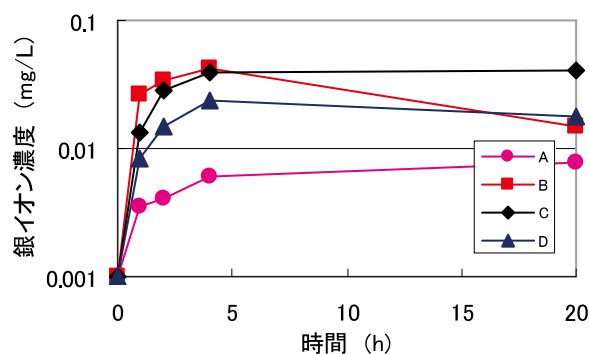


図9 抗菌剤タイプHCUから純水への銀溶出

行われたが、関連施設では抗菌剤粉体が流出することは施設の管理上望ましくない。また、定期的に水換えが行われることから、抗菌剤は一定の場所に止まり繰り返し利用することが望ましい。そこで、抗菌剤からの溶出成分のみを水中に循環させるため、抗菌剤を透水性包材を通して循環水に接触させる既報⁵⁾の方法により評価した。タイプC粉体0.5gを透水性の異なる4種類の包材(A,B,C:不織布-PE系、D:不織布-PET系)袋にヒートシールにより封入し、純水中に懸吊・接触させたときの銀濃度の変化を図9に示す。抗菌剤粒子からの銀溶出は、純水との接触直後は比較的速やかに起こったが、やがてどの包材の場合も銀濃度の増加が停止した。包材の種類により20h後の銀濃度は0.006~0.04mg/Lであった。銀濃度は各包材の違いを反映したものであるが、同じ条件の懸濁液の銀濃度である約5mg/Lの1/100に過ぎず、いずれの包材も溶出銀の透過を阻害していることが考えられる。

(2)粘土複合材料の造粒による効果

前記のように包材が溶出銀の透過を阻害したと考えられたため、溶出銀の透過を早める一方法として、

水透過が早い不織布と抗菌剤粉体の造粒の組合せを試みた。すなわち抗菌剤タイプCにシリカ及びセメントを加えて造粒した試料を、透水速度が早い包材(不織布PE系:E)に封入し、純水接触後の銀濃度を測定した。造粒体中の抗菌剤量が1,000mg/Lになるように包材袋に封入し、比較のため抗菌剤粉体を同様に封入して求めた水中の銀濃度変化を併せて図10に示す。粉体、造粒体ともに接触開始から1日後の銀濃度は低いが、粉体では2~3日後に銀濃度が2.7mg/Lに達したのに比べ、造粒体は3日後に0.7mg/Lと初期の立ち上がりが遅いものの、10日後の換水直前にはそれぞれ3.7、2.2mg/Lに達した。一方、換水後は造粒体の銀溶出が早くなり、換水10日後に造粒体からの溶出銀が6.2mg/Lに達したのに比べ、粉体からの溶出銀は0.3mg/Lに止まった。このように抗菌剤粉体を造粒し、透水速度が早い不織布包材に封入することにより、換水を行う関連施設の循環水に適用することができると考えられる。

(3)塩素イオン及び次亜塩素酸イオンの影響

図10には前項の実験結果と併せ、塩素イオン100mg/Lまたは次亜塩素酸ナトリウム50 μ g/Lを共存させたときの、前記抗菌剤粉体または造粒体からの溶出銀濃度の変化を示した。塩素イオンが共存すると、粉体及び造粒品からの溶出する銀濃度は換水と関係なく0.1mg/Lに満たなかった。一方、次亜塩素酸ナトリウムが50 μ g/L共存するときの溶出銀濃度は、換水前は粉体が1.2mg/L、造粒体が1.7mg/Lであったが、換水後は粉体0.35mg/L、造粒体4.9mg/Lと、純水接触のときと同様の傾向を示し、次亜塩素酸ナトリウムの影響は小さいことが分かった。

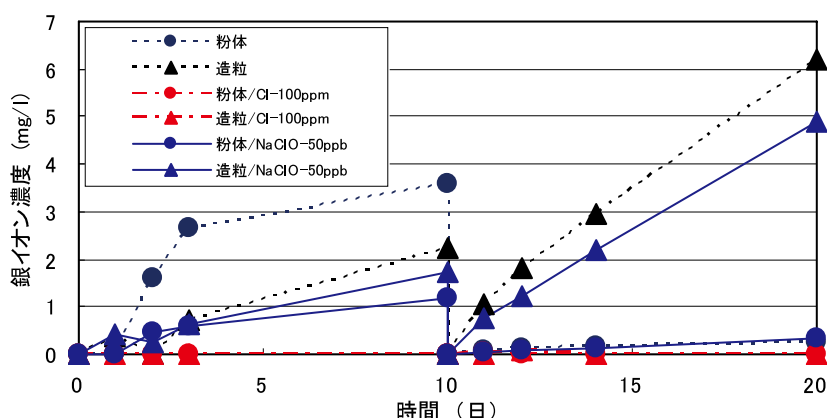


図10 塩素イオン、次亜塩素酸イオン共存時における水中の銀濃度の変化(造粒の効果)

3-3 実際の温泉水におけるレジオネラ属菌抑制

(1) 温泉水における供試抗菌剤の抗菌活性

実験に用いた各種温泉水の水質を表1に示す。各種温泉水のうち炭酸水素塩泉、塩化物泉には10,000～15,000mg/Lの塩素イオンを含む。これらの温泉水等に懸濁させたレジオネラ属菌に対する4種類の抗菌剤及び市販抗菌剤の最小殺菌濃度(MBC)を表2に示す。抗菌剤のタイプC(カフェイン銀錯体導入)、タイプH(ヒノキチオール銅錯体導入)は、水道水中の抗菌活性はいずれも6.25mg/Lであったが、塩化物泉ではそれぞれ6.25mg/L、12.5mg/L、炭酸水素泉では3.12mg/L、25mg/L、アルカリ泉で6.25mg/L、>25mg/Lなど、いずれもタイプCが優れていた。銀イオンのみを溶出する市販抗菌剤のMBCは、水道水においては粘土鉱物系抗菌剤との差は僅かであったが、炭酸水素塩泉で100mg/L、塩化物泉で25mg/Lと、効果が著しく減退することが分かった。以上の結果から、その後の実験はタイプCを主に用いて実施した。

(2) 換水を伴う長期に亘るレジオネラ属菌抑制

40℃に加熱し次亜塩素酸濃度を0.2～1.0mg/Lに維持して温泉水等5種(炭酸水素塩泉、塩化物泉、単純アルカリ泉、井水及び水道水)各12Lに対して、抗菌剤タイプCを透水性包材に封入して適用したところ、包材の表面に有色の不溶物が沈積し、温泉水中の銀イオン濃度を測定しても検出限界以下になるなど、包材の閉塞が懸念された。そこで、抗菌剤からの溶出成分の透過が阻害されないように、抗菌剤にシリカ、セメント等を加えて造粒し、これを目開

きが大きな不織布の袋に入れて以後の実験に用いた。抗菌剤3gを含む造粒体を、上記と同条件で各種温泉水に接触させたときのレジオネラ属菌抑制効果を図11に示す。いずれの温泉水も7日ごとに全量を換水して抗菌剤からの溶出成分を一旦排除し、抗菌剤を新たな温泉水と接触させているが、抗菌剤との接触0～13日後にはレジオネラ属菌が検出されなくなった。試験は1カ月間以上に亘り実施されたが、抗菌剤によるレジオネラ属菌の抑制はその後も継続することを40日目まで確認した。このように、タイプCの造粒体を実際の温泉水に接触させることにより、長期のレジオネラ属菌抑制が可能となることが明らかとなった。

4. まとめ

温泉水など実際の循環水等において、レジオネラ属菌を長期に抑制することを目的として、粘土鉱物系抗菌剤の適用効果について検討し以下の知見が得られた。

(1) 粘土鉱物系抗菌剤のうちカフェイン銀錯体、ヒノキチオール銅錯体を導入した試料は、供試料中、レジオネラ属菌に対する抗菌活性が優れていたが、特に前者は実験に用いた温泉水等すべてにおいて優れており、最小殺菌濃度は炭酸水素塩泉：3.12mg/L、塩化物泉：6.25mg/Lであった。

(2) 硝酸銀水溶液中の銀イオンは塩素イオンが存在すると、10mg/Lから0.01～0.1mg/Lまで減少したが、同条件でカフェイン銀錯体水溶液の銀濃度は0.1～1mg/Lと1桁安定であった。

表1 各種温泉水の成分

試料名	炭酸水素塩泉	塩化物泉	アルカリ泉	単純酸性泉	井水	水道水
pH ^a (20℃)	8.6	7.4	8.3	2.2	7.9	7.8
TOC ^b (mg/L)	1.9	5.3	1.5	1.4	6.3	0.5
アンモニア態窒素 ^c (mg)	2.4	5.4	0.0	13.0	0.03	<0.01
ヨウ化物イオン(mg/L)	3.7	1.1	0.1	0.3	NT ^e	NT
臭化物イオン(mg/L)	4.0	4.9	<0.1	<0.1	NT	NT

^aガラス電極法、^b全有機炭素計測定法、^cインドフェノール法、^d未鉱泉分析法、^e未試験(not teste)

表2 各種温泉水中のレジオネラ属菌^aに対する抗菌活性^b

試料名	有効成分	炭酸水素塩泉	塩化物泉	アルカリ泉	井水	水道水
抗菌剤(タイプC)	カフェイン銀	3.12	6.25	6.25	6.25	6.25
抗菌剤(タイプI)	イミダゾール銀	12.5	12.5	6.25	NT ^c	12.5
抗菌剤(タイプHCU)	ヒノキチオール銅	25	12.5	>25	NT	6.25
抗菌剤(タイプCU)	カフェイン銅	100	200	>25	NT	25
市販抗菌剤	銀	100	25	>25	NT	12.5

^aLegionella pneumophila ATCC 33152、^b最小殺菌濃度(MBC)、LA：Laboratory Accident、^c未試験(not tested)

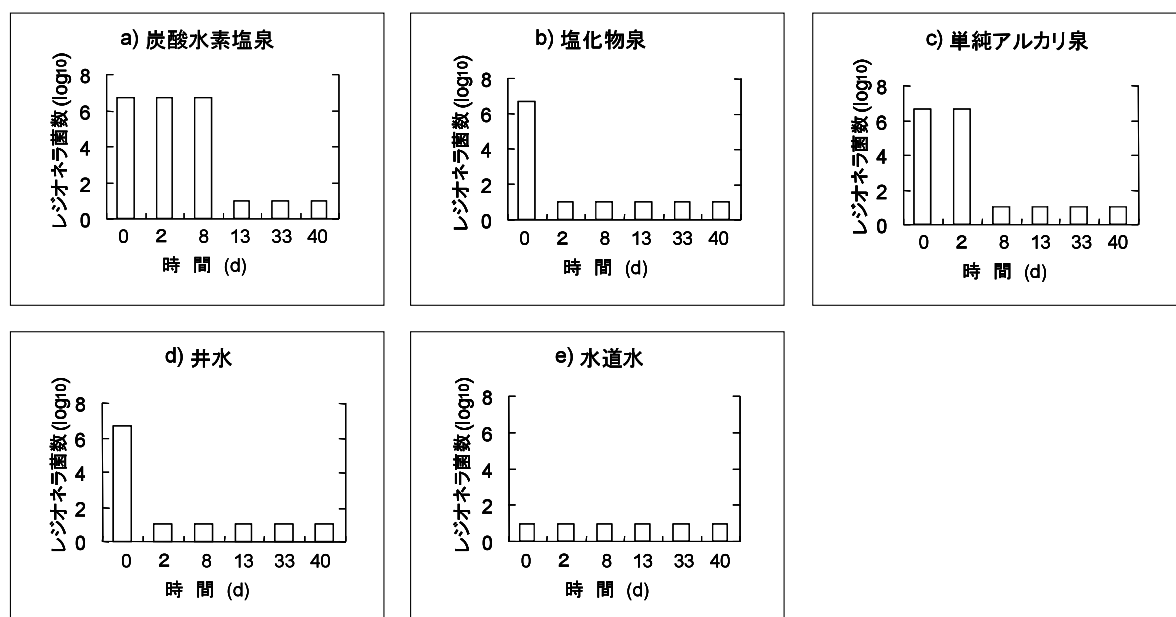


図11 抗菌剤（タイプC）による各種温泉水におけるレジオネラ属菌抑制

(3) 抗菌剤粉末を透水性不織布包材に封入すると、水中への初期の銀溶出は速やかであるが、換水後は極端に低下した。一方、抗菌剤の造粒体を透水性の早い包材に封入すると、換水後の銀溶出を安定化することができた。

(4) 造粒したカフェイン銀錯体／粘土複合試料を、1週間毎に換水する条件で5種類の温泉水等に接触させたところ、すべての温泉水等において、接触から13日目までにレジオネラ属菌を検出下限以下まで抑制することができた。この効果はその後も30日以上持続した。

謝 辞

本研究は（独）科学技術振興機構の平成23年度研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム フィージビリティスタディ【FS】「安全性と快適性を兼ね備えた温泉水等の衛生保持技術の開発」の一部として行われたことを記し、深く感謝の意を表する。

参考文献

- 1) 厚生労働省健康局生活衛生課、「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」（健衛発第95号）、2001年9月11日
- 2) 阿部久雄、田栗利紹、大橋文彦、陶磁器製品用抗菌剤の製造方法、特許第3579636
- 3) 阿部久雄、木須一正、田栗利紹、他3名、生理活性機能をもつ粘土鉱物系複合材料の製造方法、特許第4759662
- 4) 阿部久雄、田栗利紹、松尾和敏、他4名、粘土鉱物系抗微生物材料、特開2009-242337
- 5) 阿部久雄、木須一正、増元秀子、田栗利紹、「抗菌・防カビ機能をもつ粘土鉱物系複合材料の作製と循環水におけるレジオネラ属菌抑制」、平成22年度長崎県窯業技術センター研究報告、23-27、2011