

## 緑膿菌およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する 蔵王温泉水の殺菌効果

市瀬 貴規<sup>1)</sup>・山下 隆夫<sup>1)</sup>・大谷 勝実<sup>2)</sup>・本間 弘樹<sup>2)</sup>

### Bactericidal Effect of Spring Water in Zao-Spa Against *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Takanori ITINOSE<sup>1)</sup>, Takao YAMASHITA<sup>1)</sup>, Katsumi OOTANI<sup>2)</sup>, Hiroki HOMMA<sup>2)</sup>

**Abstract :** The present study examined the bactericidal effect of spring water in Zao-Spa against *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The Viability of *P. aeruginosa* and MRSA were examined by incubating in 0.9-90% spring water for 5 min at 25°C or 45°C. *P. aeruginosa* was detected in 0.9% spring water but not in 9-90% spring water after incubation for 5 min at 45°C. On the other hand, the organisms were detected in 0.9% and 9% spring water but not in 45% and 90% spring water after incubation for 5 min at 25°C. MRSA was detected in 0.9% and 9% spring water but not in 45% and 90% spring water after incubation for 5 min at 45°C. In contrast, MRSA were detected in 0.9-90% spring water after incubation for 30 min at 25°C. Although the viability of *P. aeruginosa* and MRSA in spring water depends on the temperature and concentration of spring water, these results suggest that the spring water showed strong bactericidal activity against *P. aeruginosa* and MRSA

**Key Words:** Zao Spa, *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA, bactericidal effect, spring water

### 緒 言

山形県山形市にある蔵王温泉は、西暦 110 年頃に日本武尊の東征に従った吉備タガエが毒矢で傷ついてただれた体を、温かい湯で湯浴みしたところ、ただれが数日でなくなり、たちどころに傷は全快したという話が残っており、多賀由から転じて古くは高湯と呼ばれ<sup>1)</sup>、含硫化水素強酸性明ばん緑ばん泉の火山温泉として<sup>2)</sup> 切り傷、やけど、慢性皮膚病などに効能があるとして広く知られている<sup>3)</sup>。

緑膿菌、黄色ブドウ球菌は通常的生活環境中に存在して皮膚病その他の感染症の原因菌として知られており、特に近年では多剤耐性緑膿菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) による皮膚病も報告されている<sup>4), 5), 6)</sup>。そこで、本研究では緑膿菌と MRSA に対する蔵王温泉による殺菌効果について検討した。

### 材料及び方法

#### 1) 温泉水

温泉水は山形市蔵王温泉下湯共同浴場の屋外に

1) 山形県立保健医療大学 保健医療学部 看護学科  
〒990-2212 山形市上柳 260  
Department of Nursing, Yamagata Prefectural University  
of Health Sciences  
260 Kamiyanagi, Yamagata 〒990-2212

2) 山形県衛生研究所  
〒990-0031 山形市十日町一丁目 6-6  
The Yamagata Prefectural Institute of Public Health  
1-6-6 Toukamachi, Yamagata 〒990-0031

併設されている温泉供給場所より採取し、1500×g、10 分間遠心を行った。さらに上清を 121℃、10 分間オートクレーブを行った後に 100% 温泉水として使用した。さらに 100% 温泉水は滅菌蒸留水で 50%, 10%, 1% に希釈して使用した。

## 2) 被験菌および培地

被験菌として緑膿菌および MRSA の臨床分離株を使用した。菌の継代培養は 1% 牛胎児血清 (Equitech-Bio Inc, TX, USA) を含む RPMI-1640 培養液 (インビトロジェン株式会社, 東京) を用い 37℃、72 時間間隔で継代培養して維持した。菌数測定用培地として普通寒天培地「ニッスイ」(日水製薬株式会社, 東京) を用いてシャーレ (アズワン, 東京) に作製した平板培地を用いた。

## 3) 殺菌効果の検討

被検菌液は  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  を含まない 0.02 M pH 7.3 のリン酸緩衝生理食水を用いて継代培養 72 時間の菌液を  $10^4$  および  $10^6$  に希釈して用いた。温泉水との作用は、恒温槽であらかじめ 25℃ 又は 45℃ に温度調節した各種濃度の温泉水 900  $\mu\text{l}$  に、それぞれの被検菌液の 100  $\mu\text{l}$  を加え、攪拌混和しながら 5 分間作用させた。続いてリン酸緩衝生理食塩水で 2 倍に希釈し、その 50  $\mu\text{l}$  を滅菌したコンラージ棒を用いて平板培地に塗布した。これらの平板培地を 37℃ で 72 時間培養した後に、平板培地上に現れた集落数を計測し生残菌数として colony forming unit/ml (cfu/ml) を算出した。

## 結 果

### 1. 温泉水の pH

滅菌蒸留水で 1-50% に希釈した温泉水および 100% 温泉水の 900  $\mu\text{l}$  に菌数の調整に用いたリン酸緩衝生理食塩水を 100  $\mu\text{l}$  加えて攪拌した後に pH を測定した。温泉濃度はリン酸緩衝生理食塩水を加えた後の最終濃度として表した。今回使用した 100% 温泉水の pH は 1.71, 9% に希釈した温泉水でも 2.97 を示し、0.9% に希釈した温泉水でリン酸緩衝生理食塩水の pH に近い 7.14 の値を示した。滅菌蒸留水に 1/10 量のリン酸緩衝生理食塩水を加えた 0% 温泉水の pH は 6.7 を示した (表 1)。

### 2. 緑膿菌に対する殺菌効果

本実験に使用した温泉水を採水した時 (2007 年 10 月 10 日, 14:00) の源泉の温度は 50-51℃ であったが、入浴に使われている公衆浴場の温泉水は 45-46℃ であることから、45℃ の温泉水に緑膿菌を 5 分間作用させた後に生残菌数を測定した。

緑膿菌液を  $10^6$  に希釈したのを用いて 3 回実験して検討した結果、滅菌蒸留水と作用させた後の生残菌数は 80-160 cfu/ml であるのに対し、0.9% 温泉水と作用させた後の生残菌数は 240-320 cfu/ml が認められ、実験のすべてにおいて、滅菌蒸留水での作用結果より多かった。他方、9-90% の温泉水に 5 分間作用させた結果、生残菌はいずれの濃度の温泉水からも検出されなかった。次に  $10^4$  に希釈した緑膿菌液を用いて検討した結果、滅菌蒸留水と作用させた後の生残菌数は 2,300-4,340 cfu/ml であるのに対し、0.9% 温泉水と作用させた後の生残菌数は 1,640-7,460 cfu/ml が認められ、3 回実験の内 2 回は滅菌蒸留水での作用結果より多かった。9-90% の温泉水に作用させた後の生残菌はいずれの濃度の温泉水からも検出されなかった (表 2)。

温泉水が室温で使われることもあることを想定して、室温に近い 25℃ の 0.9-90% 温泉水による殺菌効果を検討した。0.9-9% 温泉水と  $10^6$ ,  $10^4$  に希

表 1 使用した温泉水の pH

温泉水の濃度 (%)	0	0.9	9	45	90	100
pH	6.70	7.14	2.97	2.09	1.82	1.71

表 2 緑膿菌を 45℃ 温泉水に 5 分間作用させた後の生残菌数

実験 番号	菌液の 種類*	温泉水の濃度 (%)				
		0	0.9	9	45	90
1	A 液	160	320	0	0	0
	B 液	3,440	7,460	0	0	0
2	A 液	160	280	0	0	0
	B 液	4,340	1,640	0	0	0
3	A 液	80	240	0	0	0
	B 液	2,300	4,680	0	0	0

\* : A 液は継代培養を行っている菌液をリン酸緩衝生理食塩水で  $10^6$  に希釈して調整した。  
B 液は継代培養を行っている菌液をリン酸緩衝生理食塩水で  $10^4$  に希釈して調整した。

表3 緑膿菌を 25°C 温泉水に 5 分間作用させた後の生残菌数

実験 番号	菌液の 種類*	温泉水の濃度 (%)				
		0	0.9	9	45	90
1	A液	120	160	140	0	0
	B液	6,660	5,420	2,400	0	0
2	A液	240	520	40	0	0
	B液	6,080	9,480	3,100	0	0
3	A液	340	500	160	0	0
	B液	5,940	2,140	2,680	0	0

\*: A液は継代培養を行っている菌液をリン酸緩衝生理食塩水で $10^6$ に希釈して調整した。  
B液は継代培養を行っている菌液をリン酸緩衝生理食塩水で $10^4$ に希釈して調整した。

表4 MRSA を 45°C 温泉水に 5 分間作用させた後の生残菌数

実験 番号	菌液の 種類*	温泉水の濃度 (%)				
		0	0.9	9	45	90
1	A液	580	520	60	0	0
	B液	6,560	5,680	1,440	0	0
2	A液	600	780	40	0	0
	B液	7,360	7,740	840	0	0
3	A液	160	560	280	0	0
	B液	3,860	4,980	1,720	0	0

\*: A液は継代培養を行っている菌液をリン酸緩衝生理食塩水で $10^6$ に希釈して調整した。  
B液は継代培養を行っている菌液をリン酸緩衝生理食塩水で $10^4$ に希釈して調整した。

積した緑膿菌液を 5 分間作用させた結果, 9%の温泉水に作用させた後の生残菌数は減少するものの, すべての菌を殺菌する効果は認められなかった。他方, 45%, 90%温泉水に作用させた結果, どの温泉水からも生残菌は全く検出されなかった(表3)。

### 3. 温泉水による MRSA に対する殺菌効果

MRSA に対する蔵王温泉水の殺菌効果の検討は, 最初に, 45°C の 0.9-90%温泉水と $10^6$ または $10^4$ に希釈した菌液を 5 分間作用させた後に生残菌数を測定した。いずれの菌液においても 0.9%の温泉水よりも 9%温泉水に作用させた方が生残菌数は減少しているものの, すべての MRSA を殺菌する効果は認められなかった。他方, 45%および 90%温泉水に作用させた結果ではいずれの実験においても生残菌は全く検出されなかった(表4)。

表5 MRSA を 25°C 温泉水に 5 分間作用させた後の生残菌数

実験 番号	菌液の 種類*	温泉水の濃度 (%)				
		0	0.9	9	45	90
1	A液	800	400	600	700	240
	B液	2,580	3,200	1,820	2,160	1,100
2	A液	700	980	640	600	280
	B液	5,120	7,040	6,020	3,560	2,260
3	A液	1,920	620	560	1,500	960
	B液	8,460	7,980	3,220	6,220	4,060

\*: A液は継代培養を行っている菌液をリン酸緩衝生理食塩水で $10^6$ に希釈して調整した。  
B液は継代培養を行っている菌液をリン酸緩衝生理食塩水で $10^4$ に希釈して調整した。

表6 MRSA を 25°C で 5-30 分間 90% 温泉水に作用させた後の生残菌数

実験 番号	被検水	作用時間 (分)			
		5	10	20	30
1	温泉水	7,980	7,420	3,740	320
	滅菌蒸留水	13,660	14,220	14,330	13,640
2	温泉水	12,060	8,240	1,340	60
	滅菌蒸留水	18,540	17,960	19,660	19,080
3	温泉水	6,120	5,420	1,060	0
	滅菌蒸留水	18,020	14,560	17,660	17,940

緑膿菌で検討したように, 温泉水を室温に近い温度で使用することも考えられることから, 室温に近い 25°C の温泉水が MRSA に対してどのような殺菌効果を示すのかについて検討した。MRSA を 0.9-90%の温泉水に 5 分間作用させた結果, 温泉水の濃度が高い方が, 生残菌数は少ないが, 90%の温泉水との作用でも生残菌が検出された(表5)。

25°C の 90%温泉水に 5 分間作用させても完全な殺菌効果が認められないことから, 継代培養を行っている菌液をリン酸緩衝生理食塩水で $10^4$ に希釈した菌液を用いて, 25°C の 90%温泉水で作用時間を 30 分まで延長した場合の殺菌効果について検討した。その結果, 作用時間が長くなるに従い生残菌数は減少し, 滅菌蒸留水での結果と比較しても生残菌数は著しく減少した。しかしながら, 3 回実験の結果, 2 回は 30 分間温泉水と作用させてもすべての菌を殺菌する効果は認められなかった(表6)。

## 考 察

日本の温泉は泉質によって区分され、9種類が療養泉として利用され、温泉の効果は泉質により人体への効果もそれぞれ異なることが報告されている<sup>7)</sup>。蔵王温泉は酸性・含鉄・硫黄-アルミニウム-硫酸塩・塩化物温泉の火山性温泉として知られており、温泉水の成分は総イオン 400-7,000 mg/ml で  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$  の各イオンの他に  $\text{H}_2\text{SiO}_3$ ,  $\text{HBO}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  が含まれ、pH 1.3 前後である<sup>2)</sup>。蔵王温泉の効能は高湯温泉誌<sup>1)</sup>によれば、西暦 110 年頃に傷ついでただれた体を温泉で治癒して以来、温泉は黴毒二依て生スル諸病、腺病性諸病、白癬、頑固ノ潰瘍、疥癬、禿瘡、髭疹、濕瘡、下腹充血、乾疹、痔疾、肝臓病、痛風、デン風、密尿病、慢性呼吸器加答兒、痲疾、尿石、子宮諸病、挫傷、關節痛、癩麻質斯性神經痛、常習便秘、創傷、貧血依て生スル諸病、萎黄病、胃潰瘍、慢性腸胃加答兒、胃擴張、癩病、水膨、火膨に効能があるとされている(原文の通りに記載)。現在、蔵王温泉の適応症として、きりきず、やけど、慢性皮膚病、虚弱児童、慢性婦人病、月経障害、糖尿病、高血圧症、動脈硬化症、神経痛、筋肉痛、関節痛、五十肩、運動麻痺、関節のこわばり、うちみ、くじき、慢性消化器病、痔疾、冷え症、が温泉浴場に掲示されている。しかし、蔵王温泉がどのような病原体に対し、どのような増殖阻止または殺菌作用を示すのかについての報告は見あたらない。そこで、本研究でグラム陰性菌である緑膿菌を用いて蔵王温泉の殺菌作用を検討した結果、45°C で 9%以上の温泉水に 5 分間作用させることにより温泉水中の緑膿菌はすべて殺菌されることが認められ、25°C では 45%以上の濃度の温泉水で完全な殺菌作用が認められた。緑膿菌は 45°C の 0.9%温泉水および滅菌蒸留水では生残しており、殺菌作用は温度によるのではなく、温泉水に含まれる成分が温度と関連して関与していると考えられる。

次にグラム陽性菌の MRSA について殺菌効果を検討したところ、すべての MRSA を完全に殺菌する効果を示したのは 45°C、45%以上の温泉水に作用させた場合に限って認められ、25°C での作用では温泉水の濃度が濃くなるに従い生残菌数は減

少するが、90%温泉水で 30 分間作用させてもすべての菌は殺菌されないことが認められ、特に、MRSA に対しては温泉水の温度が室温レベルに下がると殺菌効果が著しく低下することが判明した。温度低下により殺菌効果も低下することについてはどのような成分が関与しているのかは不明であるが、生残菌が存在することから、温泉使用後に生残菌が増殖することも考えられ、除菌、殺菌目的で温泉を使用する時は温度に十分な注意が必要であると考えられる。

病原体に対する温泉の効能については酸性泉、硫黄泉は抗菌作用を示すが、アルカリ性の温泉では菌が生存し、泉質によっては含有する有機物により菌の発育に栄養を与えることもあるとの報告<sup>8)</sup>があり、抗菌作用は泉質によって左右されると考えられる。緑膿菌に対して抗菌作用を示す温泉として草津温泉<sup>8)</sup>、黄色ブドウ球菌、MRSA に対して抗菌作用を示す温泉として草津温泉<sup>8,9)</sup>、秋田県の玉川温泉<sup>10,11)</sup>、岩手県の新安比温泉<sup>11)</sup> 北海道の酸性泉<sup>12)</sup>が報告されている。抗菌作用を示す温泉のほとんどは強酸性硫黄泉であるが、蔵王温泉も酸性で硫黄を含んでおり、草津温泉と同じ成分も含まれており、本研究でも強い殺菌作用があることが確かめられた。

殺菌作用を示す温泉水中の物質について、酸性の状態ではマンガンイオンおよびヨウ素イオンが作用すること<sup>13)</sup>、硫黄は表皮の層で酸素遊離基と作用してペントキチオン酸が生成され抗菌作用を示すことが報告されている<sup>14)</sup>。pH 6.6-7.6 の中性に分類される温泉でもホウ酸濃度が高い温泉水で殺菌、生育抑制効果が認められるとの報告<sup>11)</sup>や pH 2.0 の硫酸は同じ pH 2.0 の温泉水よりも殺菌作用は弱く、さらに水酸化ナトリウムで pH を 3.0 に調整すると温泉水は殺菌作用が増強されるのに対して、硫酸では殺菌作用は認められないとの報告<sup>9,15)</sup>、強酸水の MRSA に対する殺菌効果は確実ではないとの報告<sup>16)</sup> から、ただ単に酸性だけでは、殺菌作用は十分でないと考えられる。今回検討した蔵王温泉水の源泉にはマンガンイオン、ヨウ素イオン、メタホウ酸が含まれていることから、これらの物質が殺菌作用をしていると推測される。MRSA に対して蔵王温泉は 45°C でないと強い殺菌作用を示さない結果が得られたが、その原因として温泉水に含まれる物質によるのか、グラム陰性菌とグ

ラム陽性菌の細胞壁の構造の違いなど, 細菌の側の要因かは不明であり, 今後, 検討していく予定である。

皮膚病の治療に関する温泉の効果については, 黄色ブドウ球菌の定着により悪化されるアトピー性皮膚炎に酸性泉が有効であることが野口により詳細に解説されており<sup>17)</sup> 今回の我々の研究結果から蔵王温泉水も緑膿菌, MRSA, 黄色ブドウ球菌による皮膚感染症の改善に期待される。蔵王温泉水の源泉は, 強い酸性で硫黄の臭いがすることから, 45°C の源泉に5分間入浴していることは, 誰もが簡単にできることではないと考えられる。しかし, 蔵王温泉水の源泉は少量なら無料で入手できるうえに, 50%温泉水でも強い殺菌作用を示すことから, 温泉水を希釈して, 暖めてからガーゼなどに浸して使用することなどで除菌に用いることができると考えられる。

## 文 献

- 1) 伊藤心水, 伊藤柏軒, 岡崎鷹峰: “縁起”. 高湯温泉誌, 伊藤源助 編, 山形, 永昌活版所, pp.1-5, 1899.
- 2) 久間木國男, 佐藤和美, 阿部恵子ほか: 蔵王温泉の温泉要素の変動(第4報). 山形衛生研究所報, 30: 5-20, 1997.
- 3) 伊藤心水, 伊藤柏軒, 岡崎鷹峰: “高湯温泉ノ効能”. 高湯温泉誌, 伊藤源助編, 山形, 永昌活版所, p. 6, 1899.
- 4) 鈴木有彦, 安積輝夫, 鳥居修平: 多剤耐性緑膿菌感染症を伴い外科的治療にて治癒に至った仙骨部褥瘡の1例. 臨皮, 59 (1): 20-23, 2005.
- 5) 三井田博, 富樫きょう子, 田中栄一郎ほか: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌が分離された伝染性膿痂疹の臨床的検討. 臨皮, 55 (13): 1005-1007, 2001.
- 6) 池田政身: 治りにくい小児の“とびひ” - 原因はMRSAだった - . 感染看護, 19 (10): 18-20, 2003.
- 7) 鏡森定信: 泉質別にみた温泉の効果. 日温気物医誌, 69 (4): 223-233, 2006
- 8) 熊木敏郎, 植田理彦, 荻原敏且: 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) に対する二, 三の温泉水の影響. 日温気物医誌, 51 (3): 147-152, 1988.
- 9) 久保田一雄, 倉林 均, 田村耕成ほか: 成人型アトピー性皮膚炎に対する草津温泉療法 - 100 症例の治療経験 - . 日温気物医誌, 62 (2): 71-79, 1999.
- 10) 野口順一: アトピー性皮膚炎の温泉・水治療法, 東京, 光雲社, 1995.
- 11) 野口順一: 東北地方にある特異な泉質の温泉とそれらの皮膚科的適用. 日温気物医誌, 59(2): 121-125, 1996
- 12) 内野英治, 砂川紘之, 佐藤洋子ほか: 黄色ブドウ球菌の消長に及ぼす温泉水の影響. 日本温泉科学, 49: 135, 1999
- 13) Inoue, T., Inoue, S. and Kubota, K.: Bactericidal activity of manganese and iodide ions against *Staphylococcus aureus*: A possible treatment for acute atopic dermatitis. Acta Derm Venereol, 79: 360-362, 1999.
- 14) Matz, H., Orion, E., Wolf, R.: Balneotherapy in dermatology. Dermatol Ther, 16: 132-140, 2003.
- 15) 井上敬文, 井上紳太郎, 久保田一雄: 草津温泉水の殺菌効果. 日温気物医誌, 61 (1): 24, 1997.
- 16) 梶原恵子, 大掛美加, 松本真弓ほか: 強酸水使用前後の細菌検査結果について. 栃木母性衛生 26: 17-19, 1999.
- 17) 野口順一: 皮膚病の温泉・水治療法, 東京, 光雲社, 1996.

— 2008. 2. 15 受稿, 2008. 3. 12 受理 —

## 要 旨

緑膿菌と MRSA に対する蔵王温泉水による殺菌効果について検討した結果, 緑膿菌を 45℃ の 0.9%温泉水に 5 分間作用させると生残菌が検出されたが, 9-90%温泉水では生残菌は全く検出されなかった。25℃ の温泉水を緑膿菌に 5 分間作用させて検討した結果, 0.9%および 9%温泉水では, 生残菌が検出されたが, 45%および 90%温泉水では生残菌は全く検出されなかった。

MRSA を 45℃ の 0.9-90%温泉水に 5 分間作用させてた結果, 0.9%および 9%温泉水では生残菌が検出されたが, 45%および 90%温泉水では生残菌は全く検出されなかった。25℃ の温泉水を用いて検討した結果, 90%の温泉水に 30 分間作用させても生残菌は減少するものの, 完全な殺菌効果は認められなかった。

以上のことから, 蔵王温泉水には, 緑膿菌, MRSA に対して強い殺菌作用が認められ, その効果は温泉水の濃度, 温度により異なることが判明した。

**キーワード:** 蔵王温泉, 緑膿菌, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌, 殺菌, 温泉水