

次亜塩素酸 Na が最も即効的に殺菌効果を示した。モノクロラミンは次亜塩素酸 Na に比較してレジオネラ属菌、アメーバ類に対しては同等の効果を示したが、一般細菌、従属栄養細菌に対しては僅かに劣る結果となったがほぼ遜色ない効果であった。クロラミン B は、両者に比較するとレジオネラ属菌やアメーバ類に対して効果を発揮するのに時間がかかったり、一般細菌、従属栄養細菌に対しては 24 時間接触でも不検出のレベルまでの効果が得られなかった。クロラミン B はモノクロラミンに比較して殺菌効果が弱い、増殖していない状態のレジオネラ属菌やアメーバ類に対しては長時間の接触で不検出にできた。モノクロラミンは次亜塩素酸 Na とほぼ同等のさっき効果が得られると考えられた。

2-1. モデル循環式浴槽試験の結果

(1) 試験水質

試験を行った浴槽水の水質を示す。

項目	値
pH	8.0
電気伝導率 (mS/m)	96
全硬度	226
Ca 硬度	140
Mg 硬度	86
塩化物イオン	160
硫酸イオン	120
酸消費量 (pH4.8)	100
シリカ	11
アンモニウムイオン	<0.1

(単位: mg/L)

(2) 浮遊性微生物の挙動 (表 7、9)

① レジオネラ属菌

モノクロラミン処理時は、初期菌数 8.5×10^2 CFU/100mL であった。モノクロラミンを添加 10 分後で $2.0 \times$

10^2 CFU/100mL、30 分の接触で不検出 (10 CFU/100mL 未満) となり、以降不検出を維持した。

クロラミン B 処理時は、初期菌数 6.2×10^3 CFU/100mL であった。クロラミン B を添加後、菌数は徐々に減少したが 3 時間接触後は 3.0×10^3 CFU/100mL であった。24 時間の接触で 6.5×10^2 CFU/100mL となったが不検出にはならなかった。

② 一般細菌数

モノクロラミン処理時は、初期菌数 9.7×10 CFU/mL であった。モノクロラミンを添加 10 分後で 1.2×10 CFU/mL、1 時間及び 3 時間では 2 CFU/mL となり、24 時間後には不検出となった。

クロラミン B 処理時は、初期菌数 4.0×10^3 CFU/mL であった。クロラミン B を添加後、菌数はやや減少し 3 時間接触後は 1.6×10^3 CFU/mL であった。24 時間には 7.1×10^3 CFU/mL に増加していた。

③ 従属栄養細菌数

モノクロラミン処理時は、初期菌数 1.9×10^4 CFU/mL であった。10 分から 3 時間の間では、 1×10^2 CFU/mL 程度となり菌数は 2 桁以上減少した。24 時間の接触で 3.1×10 CFU/mL となった。クロラミン B 処理時は、初期菌数 1.4×10^5 CFU/mL であった。クロラミン B を添加後、菌数は減少していき 3 時間接触後は 1.6×10^4 CFU/mL になった。24 時間には 1.3×10^5 CFU/mL となり 3 時間後に比較して 10 倍に増加した。

④ ATP

モノクロラミン処理時は、初期 ATP は 39 pmol/L であった。接触時間とともに緩やかに減少して行き 3 時間で 33 pmol/L となった。24 時間では 2 pmol/L に減少した。

クロラミン B 処理時は、初期 ATP は

105pmol/Lであった。接触時間とともに減少して行き3時間で19pmol/Lとなった。24時間では33pmol/Lと3時間時に比較してやや増加した。

(3) スポンジ担体の微生物挙動 (表8、10)

スポンジ担体3個を10mLの滅菌水に抽出した液中の微生物数の挙動。

①モノクロラミン処理時

モノクロラミン投入前ではレジオネラ属菌数 6.0×10^4 CFU/mL、一般細菌数 5.8×10^2 CFU/mL、従属栄養細菌数 5.2×10^5 CFU/mL、ATP2500pmol/Lであった。24時間の接触後では微生物数はいずれも大幅に減少しておりレジオネラ属菌数は不検出(10CFU/mL未満)、一般細菌数6CFU/mL、従属栄養細菌数 1.3×10^2 CFU/mL、ATP11pmol/Lとなった。

②クロラミンB処理時

クロラミンB投入前ではレジオネラ属菌数 6.9×10^2 CFU/mL、一般細菌数 3.9×10^3 CFU/mL、従属栄養細菌数 3.4×10^5 CFU/mL、ATP4850pmol/Lであった。24時間の接触後ではレジオネラ属菌数は不検出(10CFU/mL未満)となったが、一般細菌数 1.5×10^3 CFU/mL、従属栄養細菌数 4.2×10^5 CFU/mL、ATP1190pmol/Lとなり、レジオネラ属菌は減少したが、一般細菌及びATPの減少はわずかであり、従属栄養細菌は初期とほぼ同じ菌数となった。

(4) 残留塩素濃度の変化

①モノクロラミン処理時

モノクロラミンを全残留塩素濃度で3mg/Lを添加後、10分で2mg/Lに低下、補給後30分目も減少が見られたが、以降3時間目までは3mg/Lを維持した。3時間から24時間では

3mg/Lが1.6mg/Lに低下した。

②クロラミンB処理時

クロラミンBを全残留塩素濃度で3mg/Lを添加後、10分では低下なし、30分目は2.8mg/Lとなり3mg/Lに補給後1時間目で減少なし3時間目で2.7mg/Lとなった。3時間から24時間では3mg/Lが2.3mg/Lに低下した。

2-2. モデル循環式浴槽試験の考察

モデル循環式浴槽は、浴槽に加えてろ過器、配管等が設けられており継続的に保有水が循環しているためろ過器内部や配管内面にバイオフィームが付着していると考えられる。このため、バッチ試験法に比較して細菌類の供給が多いことが考えられ殺菌効果が得られにくいことが想定された。

モノクロラミンは、レジオネラ属菌を30分後の採水で不検出にしており良好な殺菌効果が得られた。一般細菌、従属栄養細菌に対しても殺菌効果を示し、従属栄養細菌は初期菌数の100分の一に抑制した。バイオフィームを想定したスポンジ担体に対する殺菌効果もレジオネラ属菌、一般細菌、従属栄養細菌に対して良好であった。

クロラミンBは、レジオネラ属菌に対して24時間後の採水でも不検出にならず 6.5×10^2 CFU/100mL 検出された。一般細菌数、従属栄養細菌数はいずれも3時間目までは減少傾向であるが、24時間目の採水ではほぼもとの菌数レベルに戻った。バッチ式試験に比較して殺菌効果が弱くなっており、バイオフィームが存在する複雑な水系では細菌類の供給、菌相の交替などの要因で十分な効果が得られなかったものと考えられた。

これに対してモノクロラミンは、殺菌効果が強く、即効的に作用しており実機浴槽系に近い複雑かつ汚染が激しい水系においても良好な殺菌効果を得ることができた。

D. 結論

・モノクロラミンは、全残留塩素濃度 3mg/L を維持することで、浴槽水のレジオネラ属菌対策として従来の次亜塩素酸 Na に代替して使用できる可能性があることが確認された。

・クロラミンBは、全残留塩素濃度の低下の程度は小さく安定に濃度管理できるが、実際の浴槽水の衛生管理に使用するには殺菌効果が弱く不適當とは考えられた。

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

表 1. バッチ試験のレジオネラ属菌数

接触時間	無処理	レジオネラ属菌数(CFU/100mL)		
		モノクロラミン 3mg/L(as Cl ₂)	NaClO 3mg/L(as Cl ₂)	クロラミンB 3mg/L(as Cl ₂)
接触前	5100	5100	5100	5100
30分	3800	<10	<10	2100
1時間	5400	<10	<10	5200
3時間	1900	<10	<10	3200
24時間	400	<10	<10	0

表 2. バッチ試験の一般細菌数

接触時間	無処理	一般細菌数(CFU/mL)		
		モノクロラミン 3mg/L(as Cl ₂)	NaClO 3mg/L(as Cl ₂)	クロラミンB 3mg/L(as Cl ₂)
接触前	2300	2300	2300	2300
30分	2300	6	9	16
1時間	2500	7	<1	15
3時間	4000	7	<1	16
24時間	53000	<1	<1	15

表 3. バッチ試験の従属栄養細菌数

接触時間	無処理	従属栄養細菌数(CFU/mL)		
		モノクロラミン 3mg/L(as Cl ₂)	NaClO 3mg/L(as Cl ₂)	クロラミンB 3mg/L(as Cl ₂)
接触前	7100	7100	7100	7100
30分	7700	33	6	200
1時間	10000	33	6	150
3時間	12000	20	6	120
24時間	870000	<1	<1	140

表 4. バッチ試験のアメーバ数

接触時間	無処理	アメーバ数(PFU/100mL)		
		モノクロラミン 3mg/L(as Cl ₂)	NaClO 3mg/L(as Cl ₂)	クロラミンB 3mg/L(as Cl ₂)
接触前	1200	1200	1200	1200
30分	600	<2	<2	36
1時間	800	<2	<2	8
3時間	500	<2	<2	6
24時間	200	<2	<2	<2

表 5. バッチ試験の ATP

接触時間	ATP(p mol/L)			
	無処理	モノクロラミン 3mg/L(as Cl ₂)	NaClO 3mg/L(as Cl ₂)	クロラミンB 3mg/L(as Cl ₂)
接触前	97	97	97	97
30分	100	2	1	43
1時間	120	10	6	33
3時間	130	1	0	23
24時間	560	17	11	19

表 6. バッチ試験の残留塩素濃度の挙動

接触時間	残留塩素(mg/L asCl ₂)							
	無処理		モノクロラミン		NaClO		クロラミンB	
	全塩素	遊離塩素	全塩素	遊離塩素	全塩素	遊離塩素	全塩素	遊離塩素
接触前	0	0	2	0.5	0	2~3	3	0.5
30分			2→3	0.5	0	1.4~2→3	3	0.5
1時間	0	0	3	0.5→0.7	0	2~3→3	3	0.5
3時間			2~3→3	0.4	0	2~3→3	3	0.4
24時間	0	0	0.7	0	0	0.2	3	0

表 7. モデル循環式浴槽試験(モノクロラミン)の浴槽水

接触時間	レジオネラ属 菌数 (CFU/100mL)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)	全塩素 (mg/L asCl ₂)	遊離塩素 (mg/L asCl ₂)
接触前	850	97	19000	39	0	
10分	200	12	97	75	2→3	0.4→0.7
30分	<10	10	61	39	2~3→3	0.7→0.7
1時間	<10	2	110	41	3	0.5
3時間	<10	2	78	33	3	0.3
24時間	<10	<1	31	2	1.6	<0.1

表 8. モデル循環式浴槽試験(モノクロラミン)
のスポンジ担体のデータ

接触時間	レジオネラ 属 (CFU/mL)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)
接触前	60	580	520000	2500
10分	-	-	-	330
30分	-	-	-	160
1時間	-	-	-	130
3時間	-	-	-	260
24時間	<10	6	130	11

表 9. モデル循環式浴槽試験(クロラミンB)の浴槽水

接触時間	レジオネラ属 菌数 (CFU/100mL)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)	全塩素 (mg/L asCl ₂)	遊離塩素 (mg/L asCl ₂)
接触前	6200	4000	140000	105	0	
10分	3900	1400	37000	72	3	0
30分	2200	2100	23000	39	2.8→3	0→0
1時間	1400	1100	20000	29	3	0
3時間	3000	1600	16000	19	2.7→3	0→0
24時間	650	7100	130000	33	2	0→0

表 8. モデル循環式浴槽試験(クロラミンB)
のスポンジ担体のデータ

接触時間	レジオネラ 属 (CFU/mL)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)
接触前	690	3900	340000	4850
10分	-	-	-	5090
30分	-	-	-	3940
1時間	-	-	-	2890
3時間	-	-	-	2140
24時間	<10	1500	420000	1190



図 1. モデル循環式浴槽に浸漬したスポンジ担体

平成 20 年度研究報告書

実験用循環式浴槽における
フローサイトメトリーを用いたレジオネラ汚染の迅速評価

田栗利紹 長崎県環境保健研究センター

研究協力者 杉山寛治 静岡県環境衛生科学研究所
神田 隆 静岡県環境衛生科学研究所
高橋奈緒美 静岡県環境衛生科学研究所
黒木俊郎 神奈川県衛生研究所
小田康雅 シスメックス株式会社

1. 研究目的

入浴施設における衛生管理の重要項目の一つとしてバイオフィーム対策があり、バイオフィームの主要構成要素である細菌とレジオネラ汚染の関係を示唆する報告がなされている^{1,2)}。細菌数を計測できる技術としては直接鏡検法や培養法が知られているが、その実施にはこれまで多大な時間と労力を要していた。

フローサイトメトリーは、微細な粒子を流体中に分散させ、一定速度で流れる粒子それぞれにレーザー光を照射して、得られた散乱光と蛍光を電気信号として解析し、個々の粒子を光学的に分析する手法である。平成 19 年度の長崎県特別研究事業の中で、この特性を利用した新たな評価方法が開発された³⁾。即ち、入浴設備から採取された試料について、フローサイトメトリーにより、粒子の散乱光強度と蛍光強度とを測定し、それらの測定値により特定範囲に含まれる粒子(図 1)を汚染微生物として分類計数する。計数された粒子数に基づいて、入浴設備の汚染度を判定する方法(以下新評価方法)である。

今回、この新評価方法を用いて、営業施設の約 1/5 規模の実験用浴槽にてモデル実験を実施した。循環系統中の浴槽水において、非消毒環境と消毒環境を作り出し、各環境における各種微生物の消長を、新評価方法を用いて解析するとともに、定量PCR法やATP法を行って互いの成績を比較した。

なお、本研究は、平成 20 年度長崎県特別研究事業との共同研究として実施された。

2. 研究方法

実験方法は、Ohata *et al.*の方法⁴⁾に準拠して実施し、一連の作業を2回繰り返した。最初に、実験用循環式浴槽にて、高濃度塩素による消毒(次亜塩素酸ナトリウム終濃度 50mg/L×3 時間)、高圧洗浄、および 3 度の換水を実施した。実験開始から 6 日間(実験 2:4 日間)、0.2~0.4mg/L の低濃度塩素条件でボランティア 16 人を(実験 2:10 人)入浴させて有機物を蓄積させた。塩素注入を停止すると同時に行った紫外線照射と入浴により、遊離残留塩素を完全に消失させて、6 日

間汚染微生物の消長を観察した。さらに、この後、再び消毒を開始して、3日間(実験2:2日間)、0.2~0.4mg/Lの低濃度塩素条件で運転させ、汚染微生物の推移を観察した。

浴槽水は、有機物蓄積開始日を0日として、15日間(実験2:12日間)、全体として21回(実験2:24回)の定期的なサンプリングを行って、培養検査とスクリーニング検査に供試した(図1、図2)。培養検査としては、従属栄養細菌数検査、アメーバ検査、およびレジオネラ属菌検査を実施した。スクリーニング検査としては、フローサイトメリー、ATP検査、およびレジオネラ属菌の定量PCRを実施し、併せて遊離残留塩素濃度(実験2:全残留塩素濃度を追加測定)を測定した(表1)。

表1に、具体的な検査項目と方法を示した。

3. 研究結果

実験結果を図2と図3に示した。従属栄養細菌は塩素消失後から1日以内で増殖し、それから1日遅れてアメーバとレジオネラが増殖した。それぞれの増殖ピークは従属栄養細菌、アメーバ、レジオネラの順で出現し、2回の実験で同様な消長を示した。

フローサイトメリーで計数された粒子数は、従属栄養細菌の消長とほとんど重なる推移を示し、2回の実験で再現性の高い結果であった。しかし、塩素停止期間の粒子数は細菌数と比べて2log少ない傾向を示した。

ATP量は、細菌の増殖と共に増加し、ピークを描いた直後に1~1.5log減少した。塩素の再消毒の時に実験1では消毒後すぐに減少したが、実験2では消毒後に一旦増加した後減少し始め、細菌数と比べて減少時間が遅れる傾向を示し

た。

レジオネラ属菌遺伝子の定量値は、実験1では、レジオネラ属菌検査の数値と倍半分の誤差で同様な曲線を示した。実験2では、レジオネラが不検出の時に検出限界以下にならず、1~2logで推移した。2回の実験で、消毒直後に1log高い値を示す傾向を認めた。

遊離塩素濃度について、実験1では消毒後の変動は認められなかったが、実験2では消毒後に一旦増加したもののすぐに減少して0.2~0.4mg/Lを維持できなかった。実験2で測定した全塩素濃度は再消毒直後に約0.8mg/Lまで増加し、遊離塩素濃度の増加と共に減少して0.2~0.4mg/Lで推移した。

4. 考察

Ohata *et al.* は実験浴槽におけるレジオネラ属菌、アメーバ、及び従属栄養細菌の自然汚染とこれらの消長について報告している。本研究においても、これらの微生物は、Ohata *et al.*の実験結果と同様な推移を示した。さらに、本研究では、フローサイトメリーにより、従属栄養細菌と重なる推移を示す粒子数をリアルタイムで計数することができた。従って、フローサイトメリーによる新評価方法は、細菌汚染を迅速に探知でき、レジオネラ汚染の迅速判定ができると考えられた。粒子数と従属栄養細菌数との差は、y軸近辺に分布する不活化粒子群とのオーバーラップを避けるために、解析対象粒子群の領域を限定したことが主な原因と考えられた(図1)。

ATP法においても、従属栄養細菌の増殖と並行する増加曲線が得られたが、直後にピークより1~1.5log減少し、低い数値で推移した。細菌の増殖ステージが対数期からプラトー期に移行したことによ

り活性の低下が起こったと考えられた。

レジオネラ属菌遺伝子の定量値は、実験1ではレジオネラ属菌を倍半分の誤差で測定できたが、実験2では消毒環境で偽陽性が認められた。塩素が低濃度である環境ではレジオネラ属菌の遺伝子が壊れていない可能性が示唆された。

モデル実験に於いて、今回用いた3つのスクリーニング法は、何れもレジオネラ汚染の迅速評価への適用の可能性が示唆されたが、それぞれの基準値の設定と普遍性証明が実用化への鍵となると考えられる。

実験2では、殺菌直後の結合塩素化が顕著であった。このことから、水道水を原水とする浴槽において、結合塩素化により有効塩素の値が変動する可能性が示唆された。また、ろ材の高濃度塩素による消毒、高圧洗浄、および換水などの徹底した衛生管理がなされれば、0.2～0.4mg/Lの低濃度塩素条件によっても十分な殺菌効果が認められることが確かめられた。

5. 結論

実験循環式浴槽水において、低濃度塩素条件における各種微生物の消長を、フローサイトメトリーを使った新評価法によりリアルタイムで監視できることが確かめられ、同方法のレジオネラ汚染に対する迅速評価の可能性が示された。

6. 参考文献

1) 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)「温泉の泉質

等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究」平成18年度総括・分担研究報告書 主任研究者:倉 文明(2007)

2) 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)「掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究」平成18年度総括・分担研究報告書 主任研究者:井上博雄(2007)

3) 田栗利紹ら、入浴設備の汚染度の判定方法、浴槽水における殺微生物剤の殺微生物効果の判定方法及び浴槽水の水質管理方法、特願2007-223277

4) Katsuhiko Ohata *et al.*, Growth of *Legionella* in Non-sterilized, Naturally Contaminated Bath Water in a Facility Which Mechanically Circulates and Purifies the Water, In *Legionella*; state of the art 30years after its recognition, (Edited by Nicholas P. Cianciotto *et al.*), ASM press, Washington, D.C. (2006)

5) 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成20年度総括・分担研究報告書 主任研究者:倉 文明(2009)

7. 健康危険情報 なし

8. 研究発表 なし

9. 知的所有権の取得状況 なし

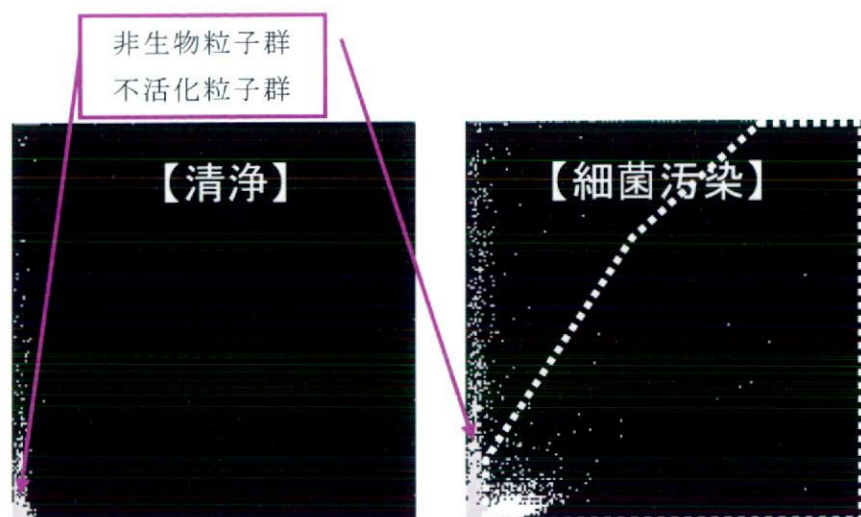


図1 新評価方法による細菌汚染判定
点線で囲った領域の粒子を汚染細菌と判定する

表1 検査項目と方法

	検査名	検査フロー	引用文献等
培養法	従属栄養細菌数検査	原試料水を適切に希釈した0.1mL→R2A培地42°C×7日→判定、3連検査 平均値を解析	掛け流し式温泉汚染調査検査マニュアル ²⁾
	レジオネラ属菌検査	原試料水500mLを孔径0.4μmPPフィルター濃縮→GVPC培地37°C×7-10日→判定、3連検査平均値を解析	掛け流し式温泉汚染調査検査マニュアル ²⁾
	アメーバ検査	原試料水50mLを3000rpm×5分遠心濃縮処理→アメーバ培地30°C×7日→判定、3連検査平均値を解析	掛け流し式温泉汚染調査検査マニュアル ²⁾
スクリーニング法	フローサイトメトリー	原試料水0.2mLを専用サンプルチューブ(シスメックス)に注入後、全自動細菌測定装置(シスメックス)で処理→即時判定、3連検査平均値を解析	全自動細菌測定装置使用説明書
	ATP検査	原試料水5mLと0.4μmセルロースアセテート膜フィルターろ液5mLを、それぞれATPキット(キッコーマン)で処理して差を算出→即時判定、3連検査平均値を解析	黒木法 ⁵⁾
	レジオネラ属菌遺伝子定量	レジオネラ属菌検査の濃縮試料2mLを15000×5分遠心濃縮し改良酵素溶菌法で処理→リアルタイムPCRによるレジオネラ検出キット(タカラバイオ)で定量	改良酵素溶菌法 ⁵⁾
	遊離残留塩素濃度	原水10mLに専用遊離塩素用DPD試薬(ハック)を挿入しデジタル比色計(ハック)で測定	上水試験方法2003
	全残留塩素濃度	原水10mLに専用全塩素用DPD試薬(ハック)を挿入しデジタル比色計(ハック)で測定	上水試験方法2003

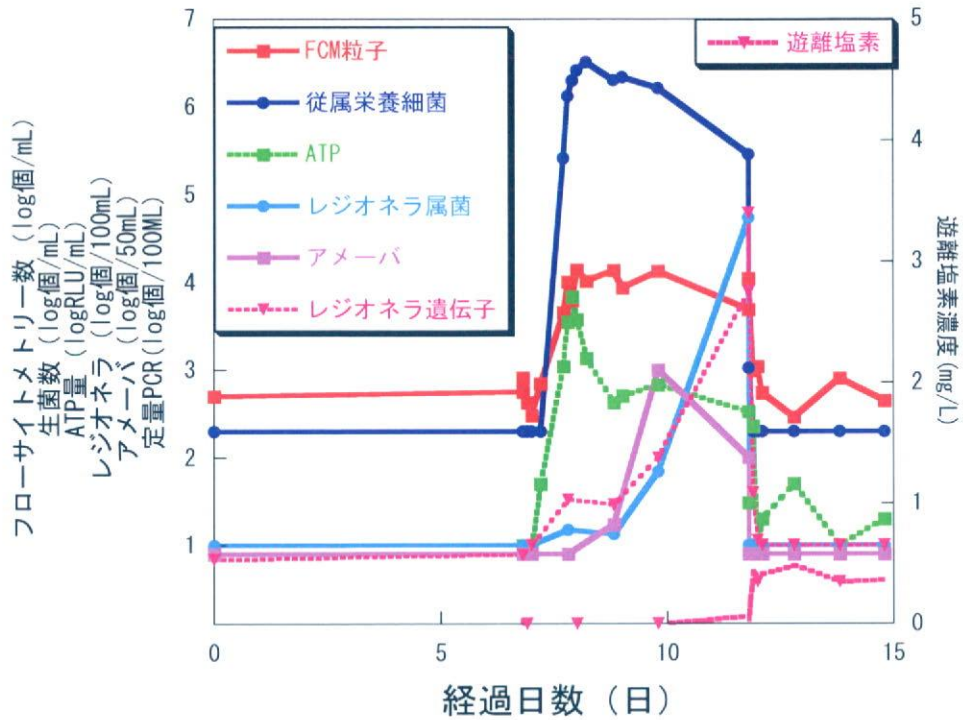


図2 各種検査結果の推移 (実験1)

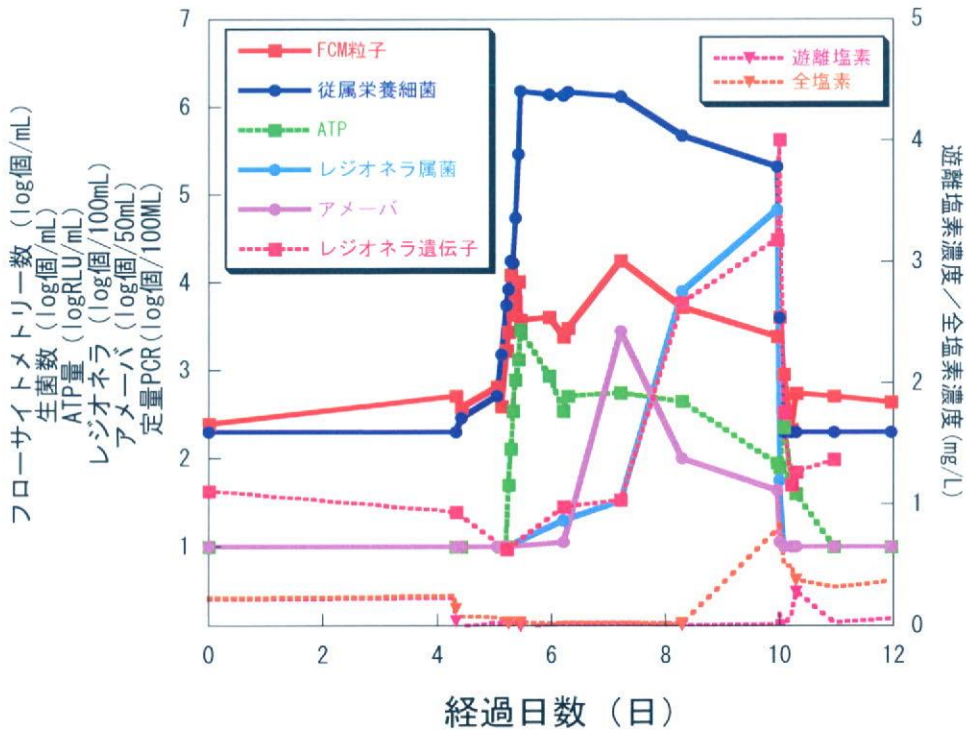


図3 各種検査結果の推移 (実験2)

厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理総合研究事業)
分担研究報告書

公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究

消毒副生成物ハロアセトニトリル類の暴露評価に関する研究

研究分担者: 神野 透人	国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部
研究協力者: 香川(田中) 聡子	国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部
研究協力者: 高橋 淳子	(財)食品薬品安全センター秦野研究所
研究協力者: 竹熊 美貴子	埼玉県衛生研究所
研究協力者: 大河原 晋	武蔵野大学薬学部
研究協力者: 古川 容子	国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部
研究協力者: 奥秋 菜央	東京医薬専門学校

研究要旨: 空气中及び水中の消毒副生成物(トリハロメタン類、ジハロアセトニトリル類)について、それぞれ加熱脱離-GC/MS及びダイナミックヘッドスペース-GC/MSによる定量法を確立し、一般家庭、公衆浴場での入浴やプールでの遊泳に伴う暴露量の評価を行った。その結果、クロロホルムでは公衆浴場での経気道暴露、ついで室内遊泳プールでの経気道暴露の寄与が高く、ジクロロアセトニトリルでは水道水の飲用による経口暴露が50%以上を占めることが明らかになった。

A. 研究目的

ハロアセトニトリル類(HANs)は、トリハロメタン類(THMs; Chloroform, TCM; Bromodichloromethane, BDCM; Dibromochloromethane, DBCM; Bromoform, TBM)やハロ酢酸類(HAAs)とともに塩素消毒を行った水中の主要な消毒副生成物(DBPs)の一つであり(Richardson et al., 2007)、原水中の含窒素有機化合物と塩素との反応によって生じることが知られている。

WHO Guidelines for Drinking Water Quality 3rd ed. (2004)では、Dibromoacetonitrile (DBAN)に70 µg/Lのガイドライン値、Dichloroacetonitrile (DCAN)に20 µg/Lの暫定ガイドライン値が設けられている。後者の暫定ガイドライン値は、90日間経口投与試験(Hayes et al., 1986)において雌雄のラットで観察された相対肝臓重量の増加に関する

LOAEL 8 mg/kg/dayに不確実係数3,000を適用して得られたTDI 2.7 µg/kg/dayの20%を水道水に割り当てて求められたものである。

一方、我が国では水質管理目標設定項目としてDCANに40 µg/L(暫定)の目標値が定められている。この値は、Hayes et al. (1986)の実験で得られた8 mg/kg/dayをNOAELと判断し、不確実係数1,000を適用して導かれたものであるが、2007年の食品安全委員会の評価ではWHO Guidelines for Drinking Water Quality 3rd ed. (2004)と同様にこの値をLOAELと見なして不確実係数3,000が採用された。その結果、DCANの暫定目標値が10 µg/Lに引き下げられることとなり、DCAN並びに関連するジハロアセトニトリル類(DHANs; DCAN; Bromochloroacetonitrile, BCAN; DBAN)の暴露、特に水道水の飲用による経口暴露以外の媒体・経路からの暴露状

況に強い関心が寄せられている。

そこで本研究では、まず水中及び空気中の DHANs の測定方法を確立し、塩素による消毒が実施されている公衆浴場・室内遊泳プールを対象に施設内空気及び水中の DHAN 濃度を調査した。ついで、得られた測定データと暴露シナリオに関する公開データベース (<http://unit.aist.go.jp/riss/crm/exposurefactors/>) を基に暴露評価を実施し、水道水の飲用による経口暴露量や一般家庭浴室での経気道・経皮暴露量との比較を行った。

B. 実験方法

B-1 サンプルング

一般家庭浴室 (12 家庭; 東京、神奈川、埼玉)、公衆浴場 (8 施設; 神奈川、埼玉) 及び室内遊泳プール (10 施設; 東京、神奈川、埼玉) で 2008 年 10~11 月にサンプルングを行った。

水試料は、40 mg/mL NH₄Cl 100 µL と適量の 1 M HCl を加えた 40 mL ガラス製バイアルに気泡が残らないように採水して密栓し、冷蔵状態で研究室に移送した。1 M HCl の添加量は、試料水の pH を 4.5~5.0 に調整するのに必要な量を予め滴定して求めた。

空気試料は、床上約 1.2 m の位置に設置した携帯型ポンプ (柴田化学製 MP-Σ30) で施設内の空気を 75 mL/min の流速で 10 分間吸引し、直列に接続した 2 本の Tenax TA 管 (Supelco, 1/4" × 3.5") に THMs 及び DHANs を吸着させた。

B-2 ダイナミックヘッドスペース-GC/MS 法による水中の THMs 及び DHANs の定量

20 mL ガラス製バイアルに試料水 10 mL を採り、NaCl 3 g を加えてアルミシールと耐熱セプタムで封緘した。Tekmar HT3 ヘッドスペース サンプラー と Shimadzu

GC/MS-QP2010 による定量は以下の測定条件で行った。

[Tekmar HT3] 試料温度, 40°C; バルブ及びライン温度, 175°C; スウィープ流速及び時間, 50 mL He/min, 30 min; トラップ, GL-Trap; トラップ加熱温度及び時間, 225°C, 2 min; スプリット比, 20

[GC/MS-QP2010] カラム, AQUATIC (0.32 mm×60 m, 1.4 µm); キャリアガス及び線速度, He, 40 cm/sec; 昇温プログラム, 40°C - (5°C/min) - 80°C - (10°C/min) - 200°C; 定量イオン, TCM m/z 83 (確認イオン 47, 85), BDCM m/z 83 (47, 85), DBCM m/z 129 (127, 131), TBM m/z 173 (171, 175), DCAN m/z 74 (82, 84), BCAN m/z 74 (76, 155), DBAN m/z 120 (118, 199)。

B-3 加熱脱離-GC/MS 法による空気中の THMs 及び DHANs の定量

加熱脱離-GC/MS による定量は Shimadzu TDTS-2010 及び Shimadzu QP-2010 を用い、以下の測定条件で行った。

[TDTS-2010] 加熱脱離, 280°C, 50 mL He/min, 10 min; コールドトラップ冷却温度, -10°C; コールドトラップ加熱, 280°C, 10min; バルブ及びライン温度, 250°C; スプリット比, 25

[GC/MS] カラム, Rtx-1 (0.32 mm×60 m, 1µm); キャリアガス及び線速度, He, 39.1 cm/sec; 昇温プログラム, 40°C - (3°C/min) - 100°C - (20°C/min) - 250°C; 定量イオンはダイナミックヘッドスペース-GC/MS 法の場合と同じ。

B-4 残留塩素濃度の測定

残留塩素濃度の測定には Aquab AQ-101 (柴田化学) を使用し、装置の取扱説明書にしたがって DPD 法により遊離残留塩素濃度を測定した。KI 存在化で測定した総残留塩素濃度と遊離残留塩素濃度の差から結合残留塩素

濃度を算出した。

B-5 皮膚透過係数

皮膚透過係数の文献値が存在しない DHANs については Dermwin ver. 1.43 (U.S. Environmental Protection Agency) により算出した推定値を用いた。

C. 結果と考察

C-1 水道水、一般家庭及び公衆浴場浴槽水、浴室空気、並びに室内遊泳プール水及び施設内空気中の DBPs 濃度

一般家庭水道水、浴槽水、公衆浴場浴槽水、室内遊泳プール水、一般家庭浴室空気、公衆浴場浴室空気及び室内遊泳プール空気の測定結果を図 1~7 に示した。一般家庭水道水中の THMs 濃度の中央値は TCM, 5.59 µg/L; BDCM, 3.20 µg/L; DBCM, 1.25 µg/L; TBM, 0.71 µg/L、DHANs 濃度の中央値は DCAN, 0.84 µg/L; BCAN, 0.82 µg/L; DBAN, 1.35 µg/L であった。一方、一般家庭浴槽水中濃度の中央値は、TCM, 6.60 µg/L; BDCM, 3.66 µg/L; DBCM, 1.14 µg/L; TBM, 0.25 µg/L; DCAN, 0.98 µg/L; BCAN, 0.92 µg/L; DBAN, 1.29 µg/L であり、TCM、BDCM、DCAN 及び BCAN は加熱によって僅かながら (10-20%程度) 増加するのに対し、TBM では顕著な減少傾向が認められた。公衆浴場浴槽水中の THMs 濃度の中央値は TCM, 11.8 µg/L; BDCM, 4.25 µg/L; DBCM, 3.68 µg/L; TBM, 1.61 µg/L、DHANs 濃度の中央値は DCAN, 2.48 µg/L; BCAN, 2.98 µg/L; DBAN, 2.84 µg/L で、一般家庭浴槽水中の DBPs 濃度と比較すると BDCM 以外はいずれも公衆浴場の方が 2 - 6 倍高濃度であった。また、室内遊泳プール水中 DBPs 濃度の中央値は TCM, 29.2 µg/L; BDCM, 1.81 µg/L; DBCM, 0.86 µg/L; TBM, 0.62 µg/L; DCAN, 8.06 µg/L; BCAN, 1.80 µg/L; DBAN,

2.03 µg/L であり、DCAN 濃度が一般家庭浴槽水の 8.3 倍と極めて高いことが特徴的であった。

空気中の DBPs 濃度 (中央値) についてみると、一般家庭浴室の THMs 濃度は TCM, 12.8 µg/m³; BDCM, 10.6 µg/m³; DBCM, 3.31 µg/m³; TBM, 0.28 µg/m³、DHANs 濃度は DCAN, 0.79 µg/m³; BCAN, 0.43 µg/m³; DBAN, ND で、公衆浴場浴室では TCM, 54.4 µg/m³; BDCM, 8.71 µg/m³; DBCM, 2.28 µg/m³; TBM, 0.43 µg/m³; DCAN, 1.26 µg/m³; BCAN, 0.71 µg/m³; DBAN, ND、室内遊泳プールでは TCM, 135.5 µg/m³; BDCM, 6.31 µg/m³; DBCM, 1.71 µg/m³; TBM, 0.49 µg/m³; DCAN, 7.60 µg/m³; BCAN, 0.69 µg/m³; DBAN, ND であり、室内遊泳プール空気中の TCM 及び DCAN 濃度は一般家庭浴室空気中濃度の約 10 倍と極めて高いことが明らかになった。

C-2 2 DBPs の多経路暴露評価

成人 (体重 50 kg) の呼吸量を 20 m³/day、体表面積を 1.6 m² と仮定し、入浴時には体表面積の 90%、遊泳時には 100% が水に浸かるものとして経気道暴露量及び経皮暴露量を算出した。入浴時間は、暴露係数ハンドブックを基に、一般家庭または公衆浴場浴室で 25 分間を過ごし、その間に浴槽水に 9 分間浸かると仮定した。また、遊泳時間については同様に年間 53.7 時間と仮定した (行為者率 7.5%)。皮膚透過係数として、THMs に関しては Xu et al. (2002) の報告した値 (TCM, 0.16 cm/h; BDCM, 0.18 cm/h; DBCM, 0.20 cm/h; TBM, 0.21 cm/h) を、DHANs に関しては DermWin version 1.43 で算出した値 (DCAN, 0.652×10⁻³ cm/h; BCAN, 0.405×10⁻³ cm/h; DBAN, 0.251×10⁻³ cm/h) を採用した。

表 1 及び表 2 は、それぞれ検出濃度の中央値、最大値を基に算出した 1 日あたりの暴露

量をまとめたものである。C-1 で述べたように室内遊泳プールの THMs 濃度、DHANs 濃度は著しく高いものの、1 日あたりの遊泳時間が 8.8 min と短いために、暴露量としては公衆浴場とほぼ同程度の寄与があるという結果になった。そこで、水道水を毎日 2 L 飲用するとともに一般家庭浴室もしくは公衆浴場で 25 分間入浴し、それらに加えて一部の人 (7.5%) では室内プールでの遊泳に伴って DBPs に暴露するというシナリオの下で、TCM (図 8) 及び DCAN (図 9) について検出濃度の中央値で算出した暴露量の積算を行った。その結果、TCM では公衆浴場での経気道暴露、ついで室内遊泳プールでの経気道暴露の寄与が高く、DCAN では水道水の飲用による経口暴露が 50%以上を占めることが明らかになった。

D. 結論

空气中及び水中の消毒副生成物 (トリハロメタン類、ジハロアセトニトリル類) について、それぞれ加熱脱離-GC/MS 及びダイナミックヘッドスペース-GC/MS による定量法を確立し、一般家庭、公衆浴場での入浴やプールでの遊泳に伴う暴露量の評価を行った。その結果、比較的揮発性の高い TCM では公衆浴場や室内遊泳プールでの経気道暴露が主要な暴露経路であるのに対し、TCM よりも揮発性の劣る DCAN では水道水の飲用による経口暴露の寄与が大きいことが明らかになった。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

奥秋菜央, 神野透人, 香川 (田中) 聡子, 古川容子, 大河原 晋, 高橋淳子, 安藤正典,

西村哲治: 公衆浴場におけるジハロアセトニトリル類の暴露評価. 平成 20 年度室内環境学会総会 (2008. 12. 東京)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

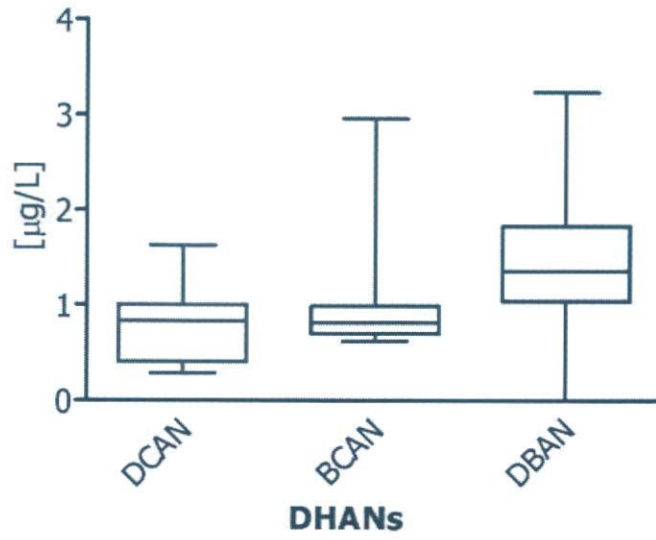
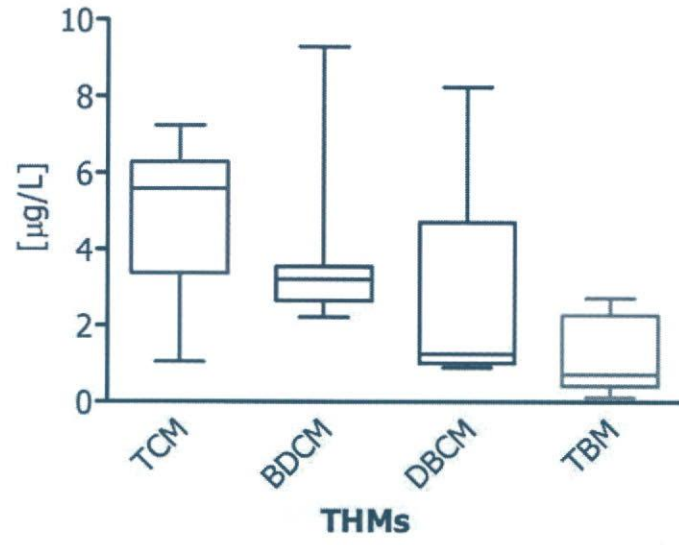


図1 一般家庭水道水中の THMs (upper) 及び DHANs (lower) の濃度分布

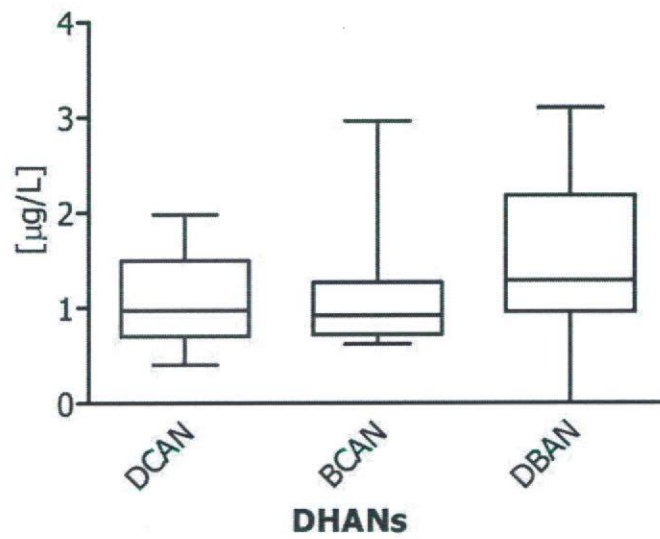
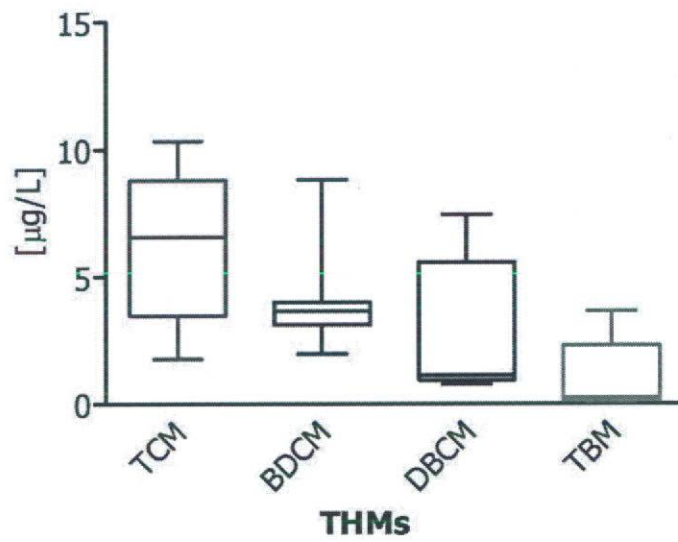


図2 一般家庭浴槽水中の THMs (upper) 及び DHANs (lower) の濃度分布

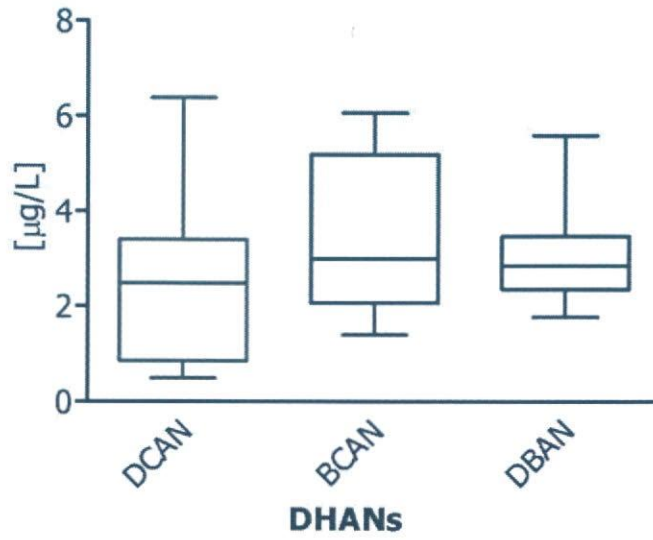
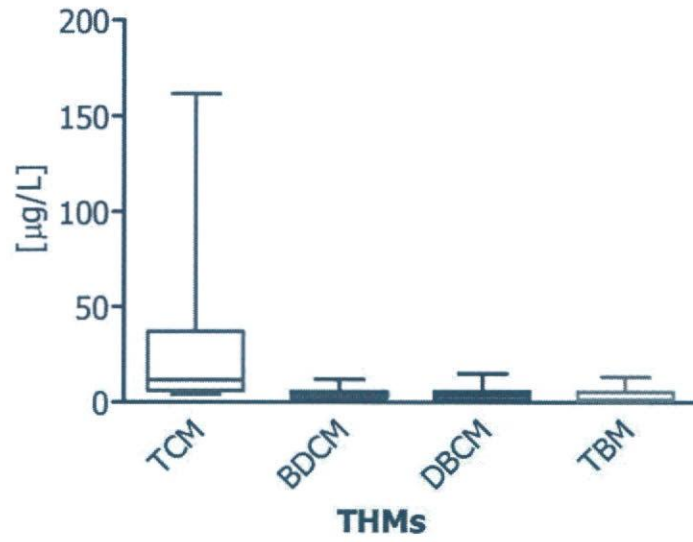


図3 公衆浴場浴槽水中の THMs (upper) 及び DHANs (lower) の濃度分布

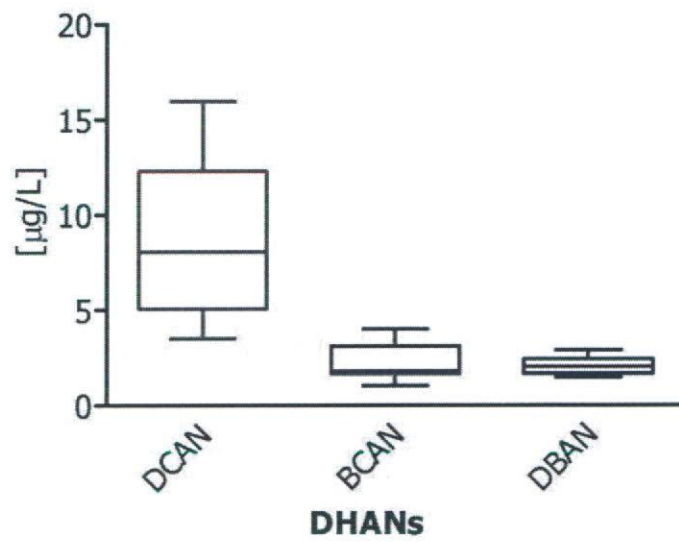
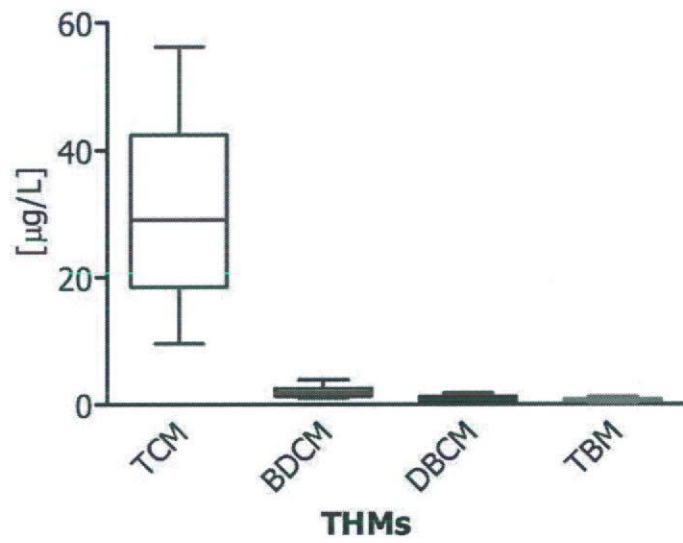


図4 室内遊泳プール水中の THMs (upper) 及び DHANs (lower) の濃度分布

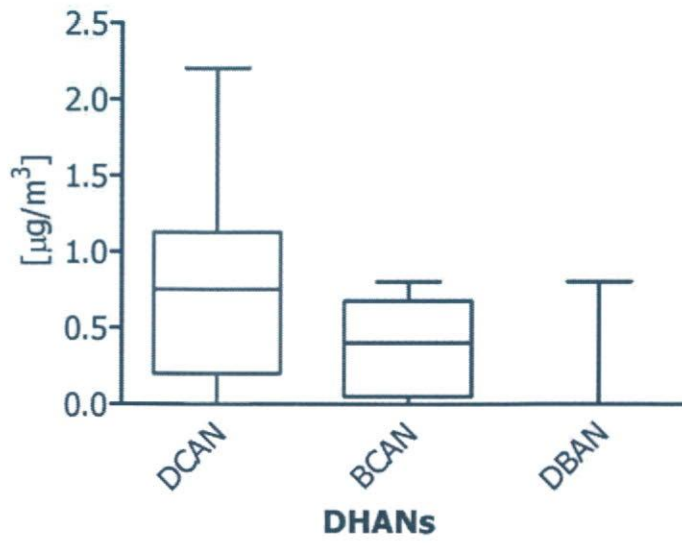
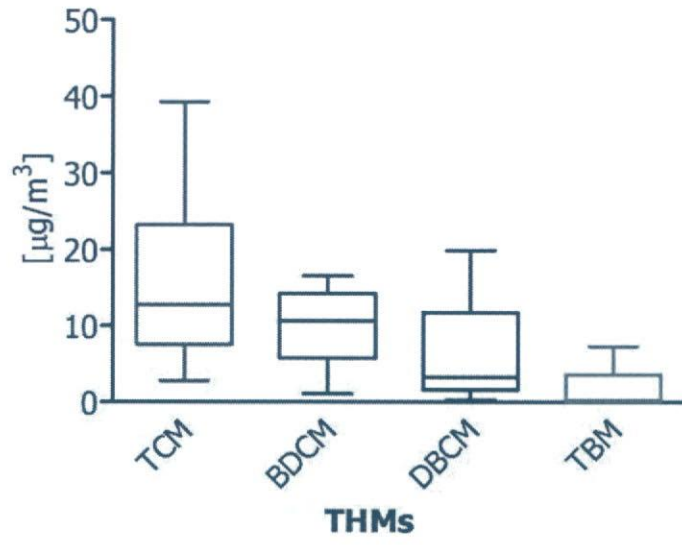


図5 一般家庭浴室空気中の THMs (upper) 及び DHANs (lower) の濃度分布