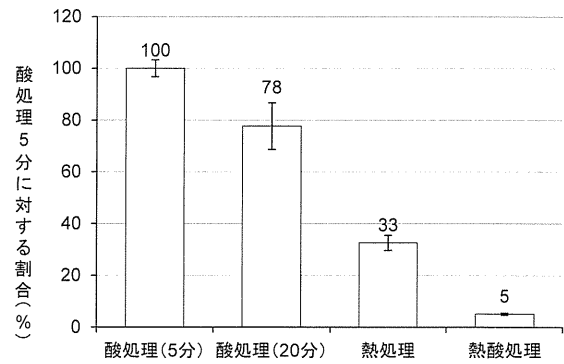


(1) 前処理直後の菌数低下

アメーバ培養菌液・酸処理 5 分後の菌数 (130 CFU/100 μ l) を 100%とし、各処理直後の菌数を平板培養法で比較



(2) 18 時間液体培養後のコピー数

アメーバ培養菌液・酸処理 5 分→18 時間液体培養後の rRNA 量 (10⁶ コピー/PCR tube) を 100%とし、各処理後のコピー数を RT-qPCR 法で比較

図 4 液体培養でのレジオネラ増殖に与える前処理の影響

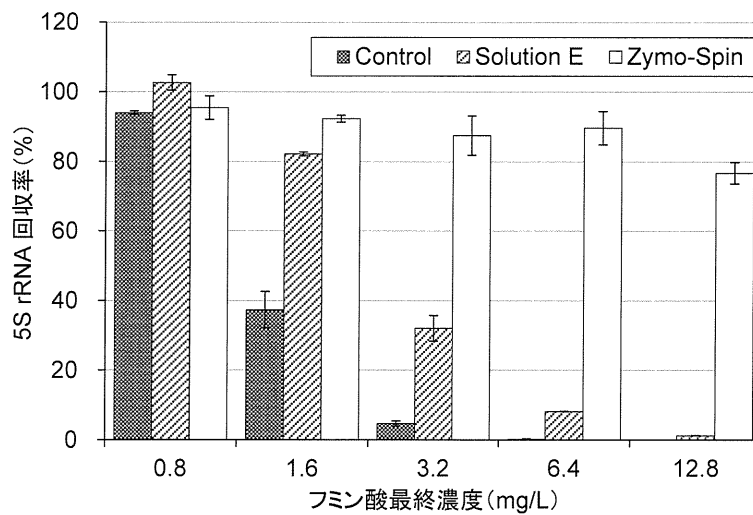
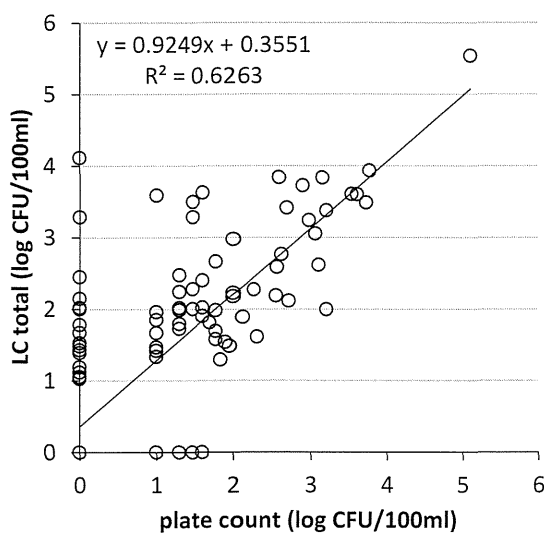
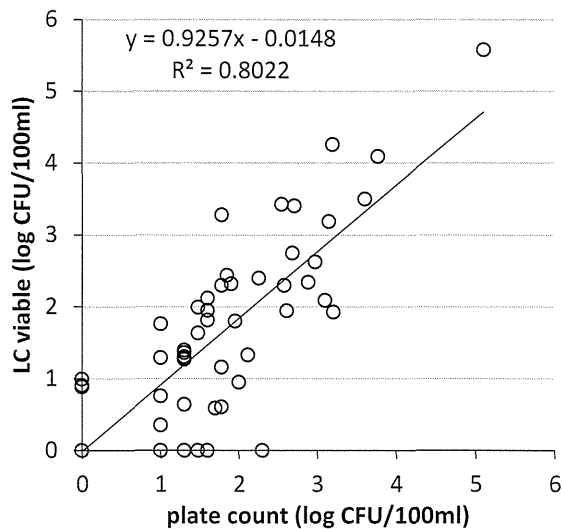


図 5 RT-qPCR 阻害回避試薬の効果



(1) LC 法 Total Legionella (n=154)



(2) LC 法 Viable Legionella (n=136)

判定保留の 18 件を除く

図 6 平板培養法と LC RT-qPCR 法との比較

表 3 平板培養法と LC RT-qPCR 法との比較

(1) Total Legionella (総菌) (CFU/100ml)

	Plate count		計
	≥ 10	< 10	
LC法 Total Legionella	54	17	71
	6	77	83
計	60	94	154

感度 90.0% 特異度 81.9%

(2) Viable Legionella (生菌) (CFU/100ml)

	Plate count		計
	≥ 10	< 10	
LC法 Viable Legionella	40	3	43
	8	85	93
計	48	88	136

感度 83.3% 特異度 96.6%

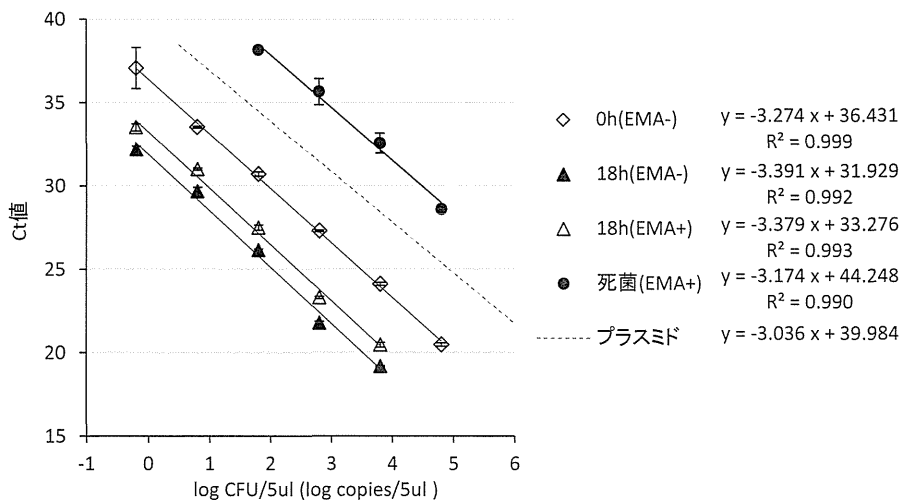
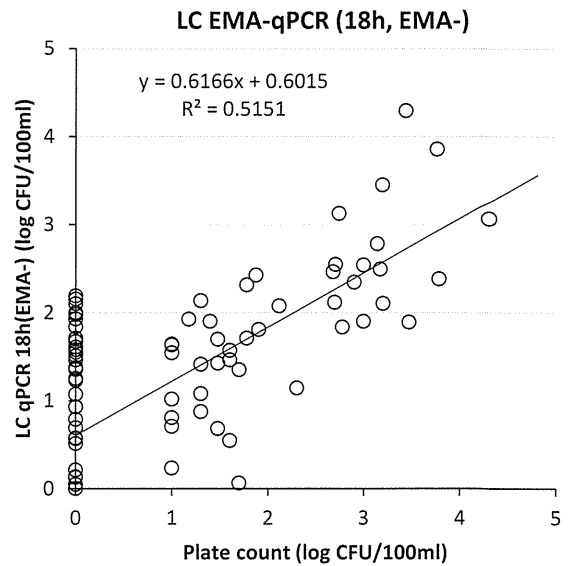
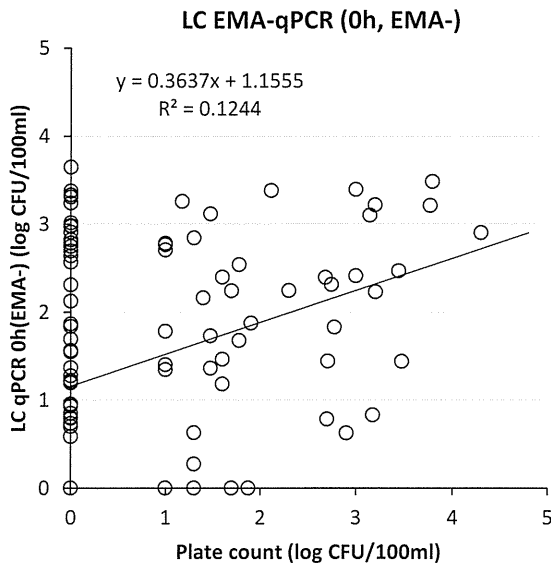
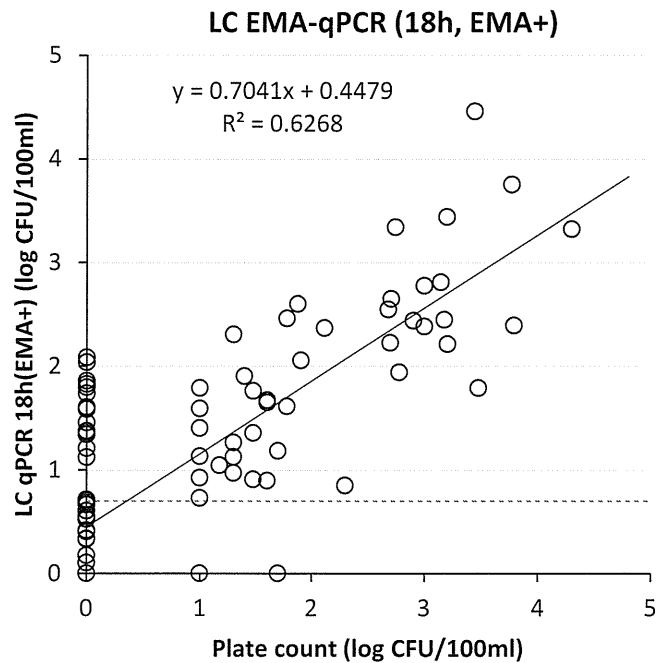


図 7 アメーバ培養レジオネラを用いた LC EMA-qPCR の検量線



(1) LC EMA-qPCR における 0h LC (-)

(2) LC EMA-qPCR における 18h LC (-)



(3) LC EMA-qPCR における 18h LC (+)

破線は LC EMA-qPCR 法における 0.7 log CFU/100ml (5 CFU/100ml) の値を示す。

図 8 平板培養法と LC EMA-qPCR 法との比較(n=113)

表 4 平板培養法と LC EMA-qPCR 法との比較 (n=113)

(1) LC EMA-qPCR における 0h LC (EMA-)

		CFU/100ml		計
		Plate count		
		≥ 10	< 10	
EMA-qPCR	≥ 1	40	39	79
0h LC (∅)	< 1	4	30	34
計		44	69	113

感度 90.9% 特異度 43.5%

(2) LC EMA-qPCR における 18h LC (EMA-)

		CFU/100ml		計
		Plate count		
		≥ 10	< 10	
EMA-qPCR	≥ 1	44	34	78
18h LC (∅)	< 1	0	35	35
計		44	69	113

感度 100% 特異度 50.7%

(3) LC EMA-qPCR における 18h LC (EMA+)

		CFU/100ml		計
		Plate count		
		≥ 10	< 10	
EMA-qPCR	≥ 1	42	30	72
18h LC (f)	< 1	2	39	41
計		44	69	113

感度 95.5% 特異度 56.5%

(4) LC EMA-qPCR における 18h LC (EMA+)

カットオフ値を 5 CFU/100ml に変更

		CFU/100ml		計
		Plate count		
		≥ 10	< 10	
EMA-qPCR	≥ 5	42	17	59
18h LC (f)	< 5	2	52	54
計		44	69	113

感度 95.5% 特異度 75.4%

表 5 検体採取から検査まで

項目	地研実態調査での 一致/多い回答(%)	新版レジ防止指針 (ISO 法ベース)	WG 提案方法
採水方法	容器入水、柄杓等使用	—	柄杓等使用が望ましい ¹⁾
採水量	約 1000mL (約 61)	500mL?	1000mL ²⁾
容器への採取量	—	満杯にせず上部に空間を残す	満杯にせず上部に空間を残す
採水容器の材質	ポリプロピレン(約 85)	ガラス製またはポリエチレン製など	滅菌済み容器 ³⁾
チオ硫酸ナトリウム添加	行っている(92)	行う	行う
搬送温度	冷蔵(68)	6~18°C	6~18°C ⁴⁾
検査開始まで	決めている・ ある程度決めている (約 45)	採取後 2~5 日以内 が望ましい。濃縮検 体の保存は 14 日を超 えてはならない。	採取後 2~5 日以内 が望ましいとされてい るが、可能な限り速や かに行う。濃縮検体 の保存は 14 日を超え てはならない。
搬入後保存温度	冷蔵(10°C未満)(約 91)	6±2°Cが望ましい	6±2°Cが望ましい
非濃縮検体での検査	21/75 施設(28%)	行う	行う ⁵⁾
安全キャビネット	利用 49%、未利用 51%	必要	必要

- 1) 容器入水の場合、容器表面にレジオネラ属菌の付着が考えられ、場合によっては検査室内での相互汚染が懸念されるため。状況により、搬入後、容器周辺を消毒してから検査を行う。
- 2) 予備の検水確保のため。ろ過濃縮を推奨するため、基本ろ過量の倍量である 1000mL とした。もし遠心濃縮を行う場合は、基本遠心量の倍量を確保すること。
- 3) ポリプロピレンやポリエチレン製またはガラス製など。
- 4) 宅配便等の冷蔵システム利用の場合はそれに従う。検査室への速やかな搬入が可能な場合は常温も可。
- 5) 採取された検体の菌数を予測できないので、非濃縮検体と濃縮検体を並行して検査する
((財)ビル管理教育センター: <付録>1 環境水のレジオネラ属菌検査方法. 新版レジオネラ症防止指針, 91, 1999)
森本 洋ほか: レジオネラ選択分離生培地の比較検討, 北海道衛研所報, 58, 51-54, 2008 (厚労科研費「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」データより)
森本 洋ほか: 浴槽水中のレジオネラ属菌検査における非濃縮検体の重要性. 北海道衛研所報, 61, 21-23, 2011 (厚労科研費「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」データより)
ただし、清掃消毒直後の検体等、レジオネラ属菌数が少ないと推定される場合においては、濃縮検体のみでの検査対応も可とする。

表 6 アメーバ増菌培養菌を用いたメンブランフィルターの材質-孔径による回収率

No.	メンブランフィルター ¹⁾	孔径 (μm)	n	回収率(%)		0.2 μm ポリカーボネートと比較 P値 ²⁾
				平均	SD	
1	ポリカーボネート	0.20	7	86.5	33.04	
2	ポリカーボネート	0.40	6	51.3	17.35	0.04*
3	セルロースアセテート	0.20	6	67.5	36.02	0.35
4	セルロースアセテート	0.45	9	51.5	17.94	0.03*
5	セルロース混合エステル	0.20	4	40.1	21.36	0.02*
6	セルロース混合エステル	0.45	6	48.7	22.13	0.03*

1) No.1-5: ADVANTEC、No.6:MILIPORE

2) t検定

表 7 アメーバ増菌レジオネラのフォルダー別孔径 0.4 あるいは 0.45 μm メンブランフィルターにおける通過検討結果

No.	フィルター ¹⁾		Aフォルダー使用		Bフォルダー使用		Cフォルダー使用		
	材質	1段目	2段目	回収菌数	回収率	回収菌数	回収率	回収菌数	回収率
		孔径 (μm)	孔径 (μm)	CFU/100ml (%)	(%)	CFU/100ml (%)	(%)	CFU/100ml (%)	(%)
			440	(100)	590	(100)	340	(100)	
1	ポリカーボネート	0.4	0.2	22	(5.0)	23	(3.8)	ND	(-)
2	セルロースアセテート	0.45	0.2	0	(0)	5.7	(1)	0	(0)
3	セルロース混合エステル	0.45	0.2	ND ²⁾	(-)	0	(-)	ND	(-)

(検水量: 500ml × 2、GVPC α 培地使用)

1) ADVANTEC、径47mm 2段目ポリカーボネート使用

2) ND:Not done

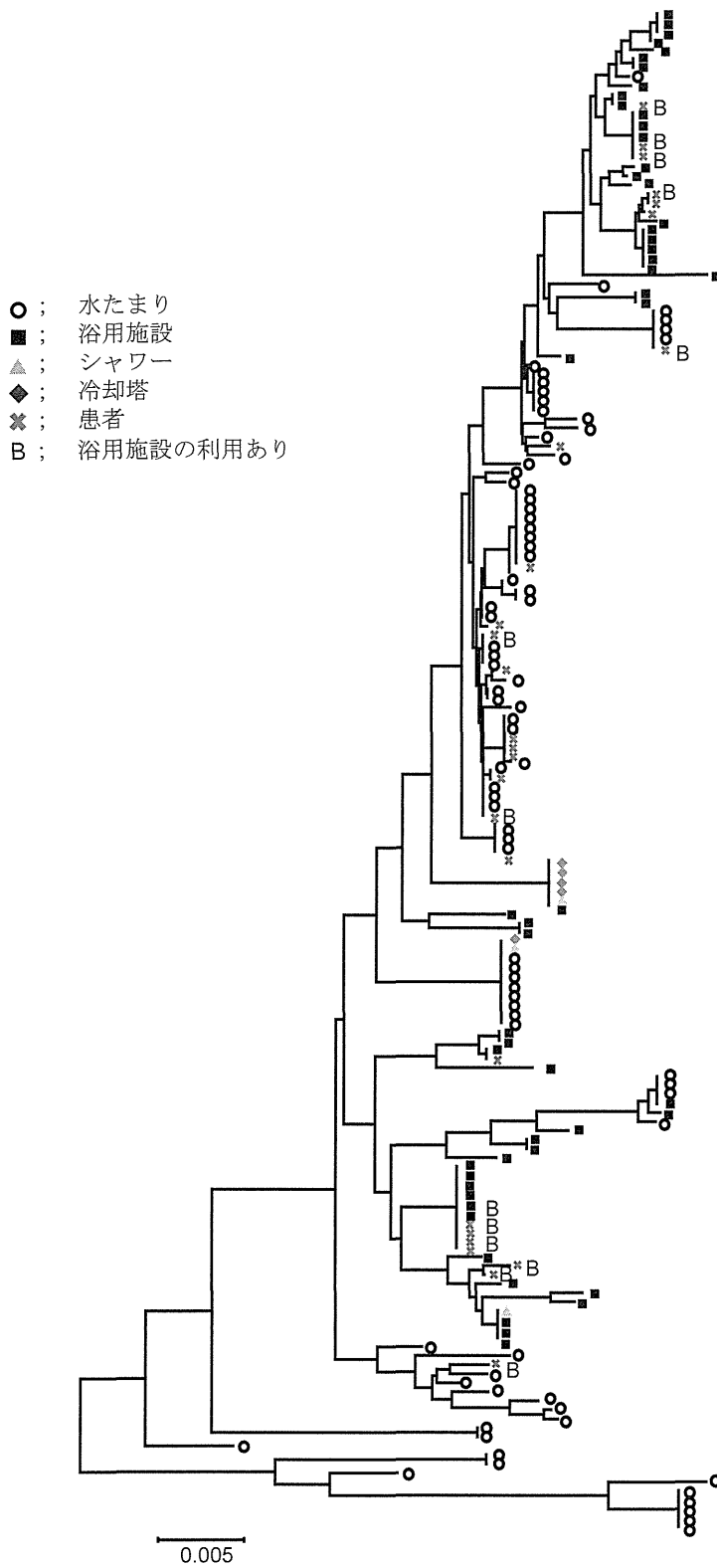


図9 *L. pneumophila* SG1 の SBT 塩基配列の分子系統樹

表 8 *L. pneumophila* 国内分離株 109 株の DDH 法による亜種同定結果

血清群	亜種			菌株数
	<i>pneumophila</i>	<i>fraseri</i>	<i>pascullei</i>	
1	10	0	0	10
2	7	0	0	7
3	9	1	0	9
4	5	2	0	7
5	16	0	0	16
6	8	0	0	8
7	7	0	0	7
8	8	0	0	8
9	7	0	0	7
10	6	0	0	6
11	2	2	0	4
12	7	0	0	7
13	6	0	0	6
14	2	0	0	2
15	4	0	0	4
計	104	5	0	109

表 9 国内分離株(109 株)における *pilE* 遺伝子のタイプ

	<i>pilE</i> type															計
	1	3	4	5	6	8	10	12	13	14	17	20	21	22	27	
subsp. <i>pneumophila</i>	4	6	11	6	10	2	31	16	11	0	1	1	3	2	0	104
subsp. <i>fraseri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	5

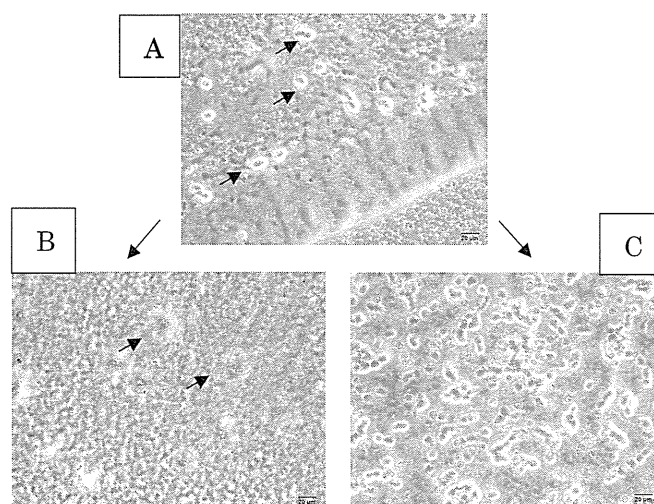


図 10 試験培地での *Acanthamoeba* の培養

- A: 培地に接種直後の観察像。アメーバ栄養体が観察される (→)
- B: 培養 3 日後の接種部における観察像(判定結果は-)。菌の感染による宿主アメーバでの細胞内増殖の結果、アメーバが破裂崩壊し死滅している(→)。
- C: 培養 3 日後の接種部における観察像(班定結果は+)。菌が存在していてもアメーバの死滅は見られず、増殖が認められる。

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究
研究代表者：倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部

平成 24 年度 分担研究報告書

モノクロラミンによる循環式浴槽の消毒効果について
—営業施設における検証試験—

研究分担者	○佐原啓二	静岡県環境衛生科学研究所
	縣 邦雄	アクアス株式会社 つくば総合研究所
	神野透人	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
	八木田健司	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	杉山寛治	株式会社マルマ 研究開発部
	小坂浩司	国立保健医療科学院 水道工学部
	泉山信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	片山富士男	静岡市保健所
	富田敦子	静岡市環境保健研究所
	江口大介	ケイ・アイ化成株式会社
	市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社
	道越勇樹	静岡県環境衛生科学研究所
	八木美弥	静岡県環境衛生科学研究所

(研究要旨)

遊離塩素消毒が困難とされるアルカリ泉質やアンモニア態窒素が多く含まれる温泉水の循環式浴槽をもつ営業中の 3 施設において各 6 週間、モノクロラミンの生成装置と全塩素濃度測定器による自動制御装置を導入し、その消毒効果を検証した。

その結果、モノクロラミン濃度は 2 施設において目標値 3 ± 1 mg/L の範囲内を保持することができたが、1 施設においては目標値からの逸脱があった。試験中は 3 施設とも悪臭の原因となるトリクロラミンは検出されず、浴槽水からレジオネラ属菌は一切検出されなかった。浴槽水中のレジオネラ属菌の遺伝子数は試験期間を通して低値であるが検出された。また、レジオネラ属菌が増殖する宿主となる自由生活性アメーバは検出されず、アメーバが増殖する前兆として重要な従属栄養細菌数は $10^1 \sim 10^4$ CFU/mL オーダーに推移した。モノクロラミン濃度を適正に保持できた 2 施設では、人体に有害なトリハロメタン類など消毒副生成物は、試験前（または対照浴槽）22.16 ~ 194.56 μ g/L 検出されていたが、試験中は 1/100 程度の低値に安定した。

以上の結果から、モノクロラミンが浴槽水に対して高い消毒効果のあること、消毒副生成物の発生が極めて少ないこと等が実証され、本法が安全で快適な新たな消毒法として期待される結果が得られた。問題点として、循環式浴槽におけるモノクロラミン濃度の自動制御において、硬度の高い泉質の場合は全塩素濃度測定器の電極にスケールの付着が生じることが分かった。

A. 研究目的

遊離塩素消毒の各種問題点を補う新たな消毒方法として、モノクロラミンに着目し、平成 23 年度にはアルカリ泉質の浴槽水の実験用循環式モデル浴槽を使用して、モノクロラミン消毒の自動化実験を行った。その結果、モノクロラミンが浴槽水の殺菌、ろ過材等の生物膜形成防止に高い効果のあること、カルキ臭が発生しないこと等が実証され、モノクロラミン消毒は、安全で快適な新たな消毒法として期待される結果が得られた。

そこで、平成 24 年度は遊離塩素消毒が困難とされるアルカリ泉質やアンモニア態窒素が多く含まれる温泉水の循環式浴槽を使用している 3 営業施設において、モノクロラミンの生成装置と全塩素濃度測定器による自動制御装置を導入し、モノクロラミンによる消毒法の有用性について実証試験を行った。

B. 研究方法

1 対象施設

(1) A施設

静岡県静岡市内の公衆浴場で、実験浴槽は循環式浴槽の露天風呂(総容量約 20 トン、ろ過あり)、成分分析表による泉質はナトリウム炭酸水素塩温泉(低張性/アルカリ性/低温泉)で pH9.0、研究班が測定した源泉の硬度は 2 と低く、アンモニア態窒素は 1.9 mg/L であった(表 1)。

(2) B施設

静岡県島田市内の公衆浴場で、実験浴槽は循環式浴槽の露天風呂(総容量 6.5 トン、ろ過あり)、成分分析表による泉質はナトリウム塩化物温泉(高張性/弱アルカリ性/高温泉)で pH 7.8、研究班が測定した源泉の硬度は 298 と高く、アンモニア態窒素は 4.3 mg/L であった(表 1)。

(3) C施設

静岡県浜松市内のホテルの入浴施設で、実験浴槽は循環式浴槽の露天風呂(総容量 28 トン、ろ過あり)、成分分析表による泉質はナトリウム-カルシウム塩化物温泉(低張性/弱アルカリ性/低温泉)で pH 8.2、研究班が測定した源泉の硬度は 475 と高く、アンモニア態窒素は 0.4 mg/L であつ

た(表 1)。

2 モノクロラミンの注入等

(1) モノクロラミン生成装置

今回は全施設において、モノクロラミンの注入方式として、全塩素濃度測定器による自動制御装置を用いてモノクロラミン濃度を 3 mg/L 程度に保持する方法を採用し、既報^{1,2)}で使用した装置を移設して使用した。すなわち、ポンプをフィードバック制御で作動させ、水道水に次亜塩素酸ナトリウムと塩化アンモニウムのモル比を 1 : 2.5 になるように混合して生成したモノクロラミンを浴槽水に添加した。設定下限濃度を下回るとポンプの運転開始、上限濃度の超過で停止させた。

(2) 試験実施期間

A施設は平成 24 年 10 月 23 日から 12 月 2 日(41 日間、6 週間)、B施設は平成 24 年 9 月 13 日から 10 月 21 日(39 日間、6 週間)、C施設は平成 24 年 11 月 30 日から平成 25 年 1 月 10 日(41 日間、6 週間)の期間に試験を実施した。

(3) 排水

各施設において週 1 回行うろ過器と循環系の洗浄消毒後の高濃度残留塩素を含む浴槽水は、チオ硫酸ナトリウムの添加により中和して排水した。

3 検体採取及び検査項目

(1) 検体採取

実験浴槽水については、次亜塩素酸ナトリウム管理時(試験前または対照浴槽)に 1 回、試験中は週 1 回のろ過器と循環系の洗浄消毒の前日(入浴による有機物負荷が最大と推定される日)に 6 回、計 7 回採水し、各種検査に供した。C施設については、4 週目及び 5 週目は年末年始休暇中のため一部の精密検査用検体は採取しなかった。

(2) 検査項目

1) 微生物検査

レジオネラ属菌の定量は、浴槽水 500mL をメンブランフィルター法により 100 倍に濃縮し、GVPC 寒天培地を用いて分離培養し、100mL あたりの CFU (Colony Forming Unit) を算出した。また、レジオネラ属菌の存在(死菌を含む)を調べるため、リアルタイム PCR 法 (Cycleave PCR *Legionella* (5SrRNA) Detection Kit Ver.2

(TAKARA))により、レジオネラ属菌特異的遺伝子の定量を行い、得られたコピー数をCFU/100mLに換算した。

さらに、レジオネラ属菌の増殖の場となる自由生活性アメーバ（大腸菌塗布無栄養寒天培地）、およびアメーバ増殖の前兆となる従属栄養細菌（R2A寒天培地）についても常法により定量した。

2) 塩素濃度の定量

モノクロラミンの定量およびモノクロラミン生成に伴って生成される恐れのあるジクロラミン、トリクロラミンの分別定量は、米国 Standard Methods（第21版，2005）のDPDを用いた硫酸第一鉄アンモニウム（FAS）による滴定法（DPD/FAS滴定法）に準じて行った。特に、悪臭の原因となるトリクロラミンの濃度測定については、高感度に定量できるHS-GC/MS法（定量下限値は15 μ g/L）を併用した。これらの塩素濃度の測定については、国立保健医療科学院で実施した。

3) 塩素消毒による消毒副生成物の定量

塩素消毒を行った浴槽水から入浴者が経気道及び経皮的に取り込まれる化学物質暴露を評価するため、塩素消毒を行った水中で検出される消毒副生成物（トリハロメタン類4物質及びハロアセトニトリル類3物質）の定量を行った。これらの測定は、国立医薬品食品衛生研究所で実施した。

4) 一般水質検査

浴槽水の水質検査項目の測定は、アクアスつくば総合研究所または株式会社マルマで実施した。

5) 採水現場における塩素濃度の測定

採水現場における浴槽水のモノクロラミン濃度、全残留塩素濃度、遊離残留塩素濃度の測定は、簡易測定器であるポケット残留塩素計（HACH社）を用いた。測定試料は、測定器の測定可能範囲内にするため浴槽水を5倍に希釈調製した。

4 入浴者へのアンケート調査

B施設については、試験中の対象者にアンケート用紙を配布し、退館時に回収箱を設置して回収し、2,343人から回答を得た。試験中は試験実施の掲示により、入浴者へ周知した（図1，図2）。

C. 結果

1 A施設における各種検査値（表2）

（1）微生物に対する消毒殺菌効果

レジオネラ属菌の培養では、試験中一切検出されなかった。自由生活性アメーバは検出されず、従属栄養細菌数は試験期間を通して $10^1\sim 10^3$ CFU/mLオーダーの低値に推移した。レジオネラ属菌の遺伝子は、浴槽水中コピー数は30CFU/100mL以下の低値に安定していたが、試験期間を通してレジオネラ属菌の遺伝子は検出された。

（2）塩素濃度の推移

モノクロラミン濃度は、試験中2.4~3.9mg/Lの範囲内を維持し、目標の 3 ± 1 mg/Lに保持することができた。試験中トリクロラミンは全く検出されず、ジクロラミンは1週目に微量が検出されたに過ぎなかった。

（3）消毒副生成物の発生

消毒副生成物発生量（トリハロメタン類4物質およびハロアセトニトリル類3物質の合計）は、試験前（次亜塩素酸ナトリウムのみを添加して管理）が22.16 μ g/Lに対し、試験中は0.19~0.26 μ g/Lと極めて低く安定していた（図4-1）。

2 B施設における各種測定値（表3）

（1）微生物に対する消毒殺菌効果

レジオネラ属菌の培養では、試験中は一切検出されなかった。自由生活性アメーバも検出されず、従属栄養細菌数は試験期間を通して減少傾向を示した。レジオネラ属菌の遺伝子は、試験中浴槽水から検出されたが、遺伝子量は時間経過と共に減少傾向を示した。

（2）塩素濃度の推移

モノクロラミン濃度は、試験中0.91~28.0mg/Lの範囲を推移し、目標の濃度範囲 3 ± 1 mg/Lを逸脱した。モノクロラミン濃度が5mg/Lを超えた時は、ジクロラミンも0.2~1.1mg/Lの範囲で検出されたが、トリクロラミンは検出されなかった。

（3）消毒副生成物の発生

モノクロラミン濃度28mg/Lが検出された4週目には、消毒副生成物が比較対照と同程度まで高濃度に検出されるに至った（図4-2）。この時の入浴者のアンケート調査において、第4週に消毒

の臭い、肌や目への刺激など通常との違いを訴える記載が比較的多くみられた(図3)。

モノクロラミン濃度 5 mg/L 程度以下では消毒副生成物濃度(トリハロメタン類4物質およびハロアセトニトリル3物質の合計)は、0.59~0.89 $\mu\text{g/L}$ と低く安定していた。

3 C施設における各種測定値(表4)

(1) 微生物に対する消毒殺菌効果

レジオネラ属菌の培養では、試験中は一切検出されなかった。自由生活性アメーバも検出されず、従属栄養細菌数は試験期間を通して $10^2\sim 10^4$ CFU/mL オーダーに推移した。レジオネラ属菌の遺伝子は、試験中浴槽水から 100 CFU/100mL 程度検出され、減少傾向は認められなかった。

(2) 塩素濃度の推移

モノクロラミン濃度は、試験中 2.2~3.4 mg/L の範囲内を維持し、目標の 3 ± 1 mg/L に保持することができた。ジクロラミンは6週目に微量が検出されたに過ぎず、トリクロラミンは全く検出されなかった。

(3) 消毒副生成物の発生

浴槽水中の消毒副生成物発生量(トリハロメタン類4物質およびハロアセトニトリル類3物質の合計)は、試験前(次亜塩素酸ナトリウムのみを添加して管理)が 194.56 $\mu\text{g/L}$ に対し、試験中は 0.52~3.08 $\mu\text{g/L}$ と低く安定していた(図4-3)。

D. 考察

1 微生物に対する消毒殺菌効果

レジオネラ属菌の培養では、全3施設において試験中レジオネラ属菌は一切検出されず、遊離塩素消毒が困難とされるアルカリ泉質、アンモニア態窒素が多く含まれる浴槽水へのモノクロラミンの注入が本菌の消毒殺菌に有効であった。また、レジオネラ属菌の増殖の場となる自由生活性アメーバは一切検出されず、アメーバ増殖の前兆となる従属栄養細菌数は試験期間を通して $10^1\sim 10^4$ オーダーに低値推移したことから、浴槽水へのモノクロラミン注入による消毒殺菌効果の有効性が確認された。

一方、レジオネラ属菌の遺伝子検査では、試験

期間を通して検出されたことから、本菌は循環ろ過装置の内部や配管系の内部に付着した生物膜またはそこに付着するアメーバ内部に寄生して僅かながら生存していると考えられる。

2 モノクロラミン濃度の推移

A施設では、モノクロラミン濃度を 3 ± 1 mg/L に保持することを目標として自動制御装置を稼働させたところ、目標範囲内を維持することができた。

しかし、B施設では、モノクロラミン濃度が目標範囲を逸脱した。本試験浴槽の循環系に設置した全塩素濃度測定器が5分毎にモニタリングしたチャートは、試験中 3.0~3.5 mg/L の範囲内を維持しており、モノクロラミンの注入制御は設定通り機能していた。しかし実際は、モノクロラミンの目標濃度を逸脱し、全塩素濃度測定器が計測した値とポケット水質計で測定した値のモノクロラミン濃度との間に誤差が生じた。原因として、カルシウムイオンと炭酸イオン及び炭酸水素イオンを多く含む硬度の高い泉質では、全塩素濃度測定器のセンサーにスケール(炭酸カルシウム等の結晶)が付着し、感度が低下したものと考えられた。浴槽水の濃度を正確に反映させるためには、全塩素濃度測定器のセンサーの洗浄や校正を定期的に行う必要性のあることが分かった。

C施設では、泉質はB施設同様に硬度が高かったため、この教訓を生かして全塩素濃度測定器のセンサーの調整を毎日実施した。すなわち、ポケット水質計を用いて測定した浴槽水のモノクロラミン濃度と全塩素濃度測定器の測定値を調整した。その結果、試験中は目的のモノクロラミン濃度制御は可能であったが、現場にとっては大きな負担となった。モノクロラミン消毒を安全に普及させるには、研修等の訓練が必要と考えられた。

3 臭気と消毒副生成物の問題

結合塩素の1種であるトリクロラミンは、カルキ臭の主要な原因物質であり生成を防ぐ必要があるが、試験中には全3施設において全く検出されなかった。これは、塩化アンモニウムを過剰に注入したことによる効果と考えられる。

同じく生成させないことが望まれるジクロラ

ミンについては、モノクロラミン濃度が適正に保持されたA施設及びC施設では各1回極微量が検出されたに過ぎなかったが、モノクロラミン濃度が5mg/Lを超えたB施設ではモノクロラミン濃度に応じてジクロラミンも僅かに検出された。このことから、モノクロラミン濃度を適正に保持することで、ジクロラミンの生成を抑えられると思われる。

浴槽水中のモノクロラミン濃度と消毒副生成物発生量との関係を解析すると、モノクロラミン濃度を適正に保持できた2施設(A及びC)では、トリハロメタン類4物質およびハロアセトニトリル類3物質の合計が試験前22.16~194.56 μ g/Lに対し、試験中は0.19~3.08 μ g/Lと極めて低く安定していた。これらの結果から、モノクロラミン消毒を適正に実施することで、消毒副生成物の生成は桁違いに低減できると推察された。

一方、モノクロラミン濃度は第4週に最大で28.0 mg/Lが検出されたB施設では、消毒副生成物として、トリハロメタン類4物質およびハロアセトニトリル類3物質が比較的多く検出された。これに対応するように、入浴者のアンケート調査において、第4週にかけて消毒の臭い、肌や目への刺激など通常との違いを訴える記載が散見された。従って、必要以上の高濃度の消毒は避けるべきと考える。

4 ろ過器および配管の消毒方法

浴槽水のモノクロラミン管理を行うと、浴槽水中に相当量の遊離アンモニアが含まれるため、ろ過器及び配管の消毒法として条例規則(静岡県)で規定する10~50 mg/Lの遊離残留塩素濃度を確保するためには次亜塩素酸ナトリウムを大量投入する必要があるが、その過程ではトリクロラミン等の発生の危険性もある。従って、循環浴槽の配管消毒は、温泉水を排水してから水道水または井水を張り、これに次亜塩素酸ナトリウムを投入して10~50 mg/Lの遊離残留塩素濃度を確保して行う方法が推奨される。

一方、モノクロラミンによりろ過器と循環系の洗浄消毒効果が確認されれば、作業量、作業時間、費用の点で改善される。本法の実用化に向け有効

性をさらに検証する必要がある。

5 アンモニア態窒素の影響

残留遊離塩素濃度を測定する一般的なDPD(ジエチル-p-フェニレンジアミン)法は、調製DPD試薬により遊離塩素と結合塩素をそれぞれ分別定量できるとされるが、結合塩素のみ含まれる場合でも遊離残留塩素があるかのように測定される欠点が指摘されている³⁾。

今回試験した3施設とも源泉にはアンモニア態窒素が含まれており、特にA及びB施設では1.9~4.3 mg/L含まれているため、通常消毒に用いる次亜塩素酸ナトリウムを投入しても結合塩素が生成され遊離残留塩素は発生しない。しかし、現場においてDPD法により本温泉水の残留遊離塩素濃度を測定すると、見掛け上0.2 mg/L程度が検出され、規定量が確保され衛生上問題ないと誤解されていた。事実、試料水を精査すると、本温泉水には遊離塩素は含まれず、結合塩素(モノクロラミン)が検出された。

また、アンモニア態窒素が0.4 mg/L含まれていたC施設では試験前は次亜塩素酸ナトリウムを多量投入し不連続点塩素処理管理を行っており、消毒副生成物7種類の合計が194.56 μ g/Lと多量に発生した。このようなアンモニア態窒素が含まれている泉質はモノクロラミン処理が適していると考えられる。

温泉施設管理者は、温泉中のアンモニア態窒素濃度を踏まえて衛生管理を行う必要があるが、温泉分析成分の検査項目の中にアンモニア態窒素は含まれないので、通常アンモニア態窒素濃度を把握しておらず、このような反応が起きていることについての認識はない。この問題点を温泉施設管理者に対して周知すると共に、温泉分析に、アンモニア態窒素の検査項目追加を提案したい。

6 モノクロラミン測定の精度と現場での検査方法

今回、採水現場における残留塩素の測定には、簡易測定器であるポケット残留塩素計を用いたが、モノクロラミンの測定値は精密検査値とほぼ一致しており、簡易機器の精度に問題はなかった。

一方、全塩素濃度測定器は、電極へのスケール

の付着により測定値の大きな誤差が生じた。これはポーラログラフ式測定装置の限界であり、洗浄以外に対策はなく、定期的な校正が欠かせない。従って、本簡易機器による測定値に基づきポーラログラフ式測定装置の校正を定期的に行うことが前提となる。モノクロラミン生成装置の正確な制御には、校正をいつ誰が行うのか、現場での研修訓練により対応できるのかが問題となる。

E. 結論

遊離塩素消毒が困難とされるアルカリ泉質やアンモニア態窒素が多く含まれる温泉水の循環式浴槽をもつ3営業施設において、自動モノクロラミン消毒の実証試験を行った。

その結果、浴槽水へのモノクロラミン 3 mg/L 程度の注入がレジオネラ属菌の消毒殺菌に有効であり、かつ消毒副生成物の発生は極めて低く抑えられ、その有用性が確認された。モノクロラミンの濃度制御においては、硬度の高い泉質では管理に注意点のあることが分かった。

F. 参考文献

- 1) 倉文明, 縣邦雄, 田栗利紹, 杉山寛治, 神澤啓: モノクロラミン消毒による入浴施設の衛生管理 実際の入浴施設における注入・測定の自動化, 平成 23 年度厚生労働科学研究 (健

康安全・危機管理対策総合研究事業) 分担研究報告書

- 2) 倉文明, 杉山寛治, 神田隆, 市村祐二, 江口 大介, 泉山信司, 八木田健司, 小坂浩司, 遠藤卓郎: 公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究, モデル浴槽水におけるモノクロラミン生成・注入・測定の自動化の検証, 平成 23 年度厚生労働科学研究 (健康安全・危機管理対策総合研究事業) 分担研究報告書
- 3) 吉川循江: 市販 DPD 試薬を使用して遊離残留塩素を測定する場合の注意, 横浜市衛生研究所検査情報月報(3) 4-6 (2008)

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

- 1) 杉山寛治, 神田隆, 佐原啓二, 市村祐二, 江口 大介, 泉山信司, 八木田健司, 小坂浩司, 遠藤卓郎, 倉文明: モノクロラミン生成・注入・測定を自動化した循環式浴槽モデルにおける消毒効果の検証, 日本防菌防黴学会第 39 回年次大会, 東京 (2012)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

表 1 モノクロラミン検証試験実施施設

		A施設	B施設	C施設
施設	所在地	静岡市	島田市	浜松市
	分類	公衆浴場	公衆浴場	ホテル
	浴槽	循環式、露天風呂	循環式、露天風呂	循環式、露天風呂
	総容量	20 m ³ (男 and 女)	6.5 m ³ (男 or 女)	28 m ³ (男 and 女)
	利用者数	平均 319 人/日	平均 587 人/日	平均 480 人/日
泉質(温泉分析書による)	泉質名	ナトリウム炭酸水素塩温泉 (低張性/アルカリ性/低温泉)	ナトリウム塩化物温泉 (高張性/弱アルカリ性/高温泉)	ナトリウム-カルシウム 塩化物 温泉 (低張性/弱アルカリ性/低温泉)
	pH	9.0	7.8	8.2
	ナトリウムイオン	312 mg/kg	4,089 mg/kg	341 mg/kg
	カリウムイオン	4.6 mg/kg	75.8 mg/kg	15.0 mg/kg
	マグネシウムイオン	<0.1 mg/kg	12.8 mg/kg	23.0 mg/kg
	カルシウムイオン	1.2 mg/kg	159.6 mg/kg	101.0 mg/kg
	マンガンイオン	<0.05 mg/kg	0.2 mg/kg	0.3 mg/kg
	鉄(Ⅱ)イオン	<0.05 mg/kg	0.5 mg/kg	<0.05 mg/kg
	炭酸水素イオン	703 mg/kg	352 mg/kg	78 mg/kg
	炭酸イオン	57.7 mg/kg	—	—
	水酸化物イオン	0.2 mg/kg	<0.011 mg/kg	0.027 mg/kg
	塩化物イオン	3 mg/kg	6505 mg/kg	702 mg/kg
	臭化物イオン	0.5 mg/kg	2.5 mg/kg	0.8 mg/kg
	ヨウ化物イオン	0.4 mg/kg	2.0 mg/kg	<0.05 mg/kg
	硫化水素イオン	0.4 mg/kg	—	—
硫酸イオン	1.8 mg/kg	<0.2 mg/kg	62.6 mg/kg	
測定値	全硬度	2	298	475
	アンモニア態窒素	1.9 mg/L	4.3 mg/L	0.4 mg/L

表2 A施設におけるモノクロラミン消毒による検証試験の各種検査結果

検査項目		試験前	1週目	2週目	3週目	4週目	5週目	6週目
微生物検査	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	レジオネラ属菌遺伝子数 (CFU/100mL)	1.7	5.5	15.0	19.3	29.2	21.1	5.0
	アメーバ数(個/50mL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	従属栄養細菌数(CFU/mL)	2.3×10	3.0×10^2	3.3×10^2	1.2×10^3	2.3×10^3	2.9×10^2	2.8×10^3
塩素濃度	モノクロラミン (mg/L)	1.2	3.2	3.5	2.4	3.6	3.9	3.9
	ジクロラミン (mg/L)	0.2	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	トリクロラミン (mg/L)	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015
	遊離塩素 (mg/L)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
消毒副生成物	トリクロロメタン(μ g/L)	20	0.21	0.25	0.19	0.26	0.23	0.23
	ブロモジクロロメタン(μ g/L)	1.8	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	ジブロモクロロメタン(μ g/L)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	トリブロモメタン(μ g/L)	0.36	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	ジクロロアセトニトリル(μ g/L)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	ブロモクロロアセトニトリル(μ g/L)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	ジブロモアセトニトリル(μ g/L)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	上記7物質の計(μ g/L)	22.16	0.21	0.25	0.19	0.26	0.23	0.23
現場簡易検査	モノクロラミン (mg/L)	1.2	4.1	4.3	2.9	4.4	4.0	3.9
	全塩素 (mg/L)	0.6	1.6	4.0	1.0	3.5	1.5	4.5
	遊離塩素 (mg/L)	0.1	0.1	1.0	0.5	1.5	0.5	0
	遊離アンモニア (mg/L)	0.1	2.2	-	2.8	2.6	2.8	2.8

表3 B施設におけるモノクロラミン消毒による検証試験の各種検査結果

検査項目		対照浴槽	1週目	2週目	3週目	4週目	5週目	6週目
微生物検査	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	レジオネラ属菌遺伝子数 (CFU/100mL)	3.2	13	4.1	1.5	0.9	0.4	0.8
	アメーバ数(個/50mL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	従属栄養細菌数 (CFU/mL)	6	1.6×10^4	1.9×10^2	6	2	2.5×10	2
塩素濃度	モノクロラミン (mg/L)	7.0	0.91	2.8	9.0	28.0	6.2	5.5
	ジクロラミン (mg/L)	0.56	<0.1	<0.1	0.4	1.1	0.2	0.2
	トリクロラミン (mg/L)	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015
	遊離塩素 (mg/L)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
消毒副生成物	トリクロロメタン(μ g/L)	0.28	0.6	0.15	0.17	0.4	0.18	0.16
	ブロモジクロロメタン(μ g/L)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.63	<0.1	<0.1
	ジブロモクロロメタン(μ g/L)	0.89	0.12	0.19	0.26	1.4	0.2	0.16
	トリブロモメタン(μ g/L)	4.8	0.17	0.45	0.94	3.9	0.44	0.27
	ジクロロアセトニトリル(μ g/L)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.37	<0.1	<0.1
	ブロモクロロアセトニトリル(μ g/L)	0.67	<0.1	<0.1	0.32	1.3	0.35	<0.1
	ジブロモアセトニトリル(μ g/L)	2.9	<0.1	<0.1	<0.1	5	<0.1	<0.1
	上記7種の計(μ g/L)	9.54	0.89	0.79	1.69	13.0	1.17	0.59
現場簡易検査	モノクロラミン (mg/L)	8.5	1.2	3.1	9.5	28	5.7	6.0
	全塩素 (mg/L)	3.9	1.0	1.5	4.4	12	3.3	2.9
	遊離塩素 (mg/L)	0.3	0.3	0.2	0.3	0.1	0.3	0.3
	遊離アンモニア (mg/L)	1.6	2.8	2.8	2.8	>2.8	2.8	2.8

表4 C施設におけるモノクロラミン消毒による検証試験の各種検査結果

		試験前	1週目	2週目	3週目	4週目	5週目	6週目
微生物検査	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	レジオネラ属菌遺伝子数 (CFU/100mL)	34.9	74.1	128.3	40.5	55.3	183.1	85.9
	アメーバ数 (個/50mL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	従属栄養細菌数 (CFU/mL)	<1	1.1×10^2	5.2×10^2	1.0×10^3	1.7×10^3	1.6×10^4	7.2×10^2
塩素濃度	モノクロラミン (mg/L)	0.1	2.6	3	3.4			2.2
	ジクロラミン (mg/L)	0.1	<0.1	<0.1	<0.1			0.1
	トリクロラミン (mg/L)	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015			<0.015
	遊離塩素 (mg/L)	1.2	<0.1	<0.1	<0.1			<0.1
消毒副生成物	トリクロロメタン (μ g/L)	0.56	<0.1	<0.1	0.24			<0.1
	ブロモジクロロメタン (μ g/L)	20	<0.1	<0.1	0.24			<0.1
	ジブロモクロロメタン (μ g/L)	22	0.21	0.18	0.50			0.16
	トリブロモメタン (μ g/L)	110	0.49	0.42	2.1			0.36
	ジクロロアセトニトリル (μ g/L)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1			<0.1
	ブロモクロロアセトニトリル (μ g/L)	5.0	<0.1	<0.1	<0.1			<0.1
	ジブromoアセトニトリル (μ g/L)	37	<0.1	<0.1	<0.1			<0.1
	上記7種の計 (μ g/L)	194.56	0.70	0.60	3.08			0.52
県条例浴槽水 基準等の検査	pH	7.9	8.1	8.0	7.9	8.1	7.9	8.1
	濁度	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	過マンガン酸カリウム消費量	4.4	8.7	6.2	5.8	5.5	14.7	5.1
	大腸菌群	0	0	0	0	0	0	0
現場簡易検査	モノクロラミン (mg/L)	0.35	3.6	3.2	3.5	4.0	3.3	3.7
	全塩素 (mg/L)	1.5	3.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	遊離塩素 (mg/L)	1	0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	遊離アンモニア (mg/L)	ND	0.32	0.55	0.4	0.25	0.35	0.3



図1 モノクロラミン検証試験実施の掲示とアンケートの回収法

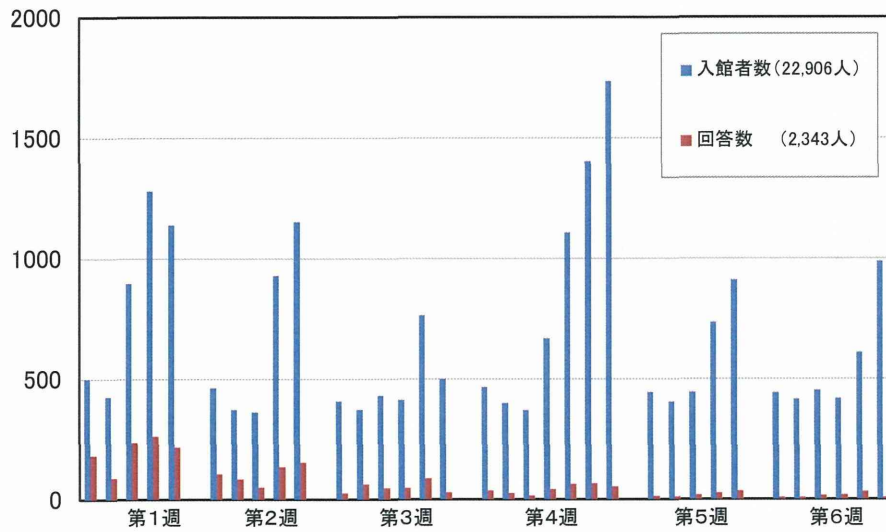


図2 B施設の入館者数とアンケート回答者数

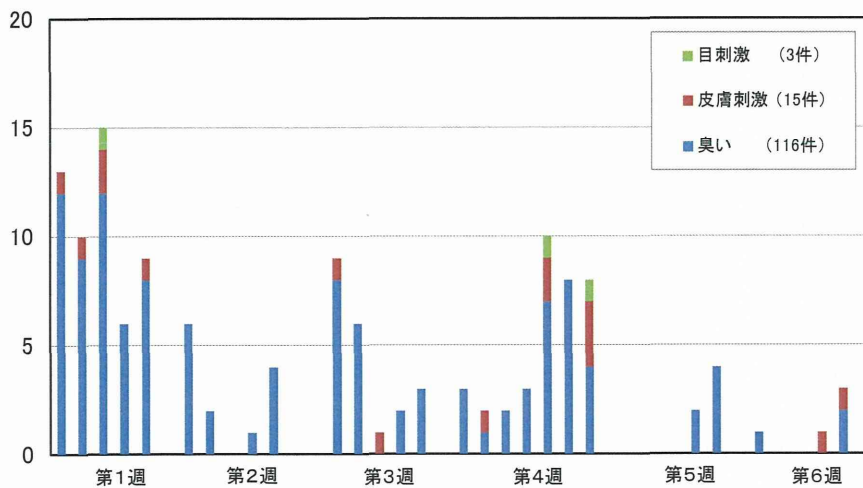


図3 回答中「試験前との違いを感じた」内容の内訳