

含まず)である。

循環式浴槽系へのモノクロラミン注入システムのフローを図3に示す。

3. 個別の施設における運転結果

3-1. 静岡県(平成22年度実施)の温泉施設

本施設は源泉の揚水ポンプを連続運転し、 $10.8\text{m}^3/\text{時}$ の流量で源泉貯槽に溜め、源泉貯槽から複数の大浴槽及び個室浴槽に温泉水を供給している。浴槽は全て循環系が無く、掛け流し式である。源泉の水量に対して、一定量のモノクロラミン液を添加することで、浴槽水中のモノクロラミン濃度を所定の値に維持することとした。モノクロラミン生成装置で生成したモノクロラミン液は、濃度が約 800mg/L 、 $\text{pH}7.8$ 、生成量は $31\text{g}/\text{時間}$ であった。

このモノクロラミン液を源泉貯槽のマンホールから、連続的に添加した。結果、浴槽の蛇口で採水した温泉水のモノクロラミン濃度は 3mg/L をやや上回り、目標の 3.0mg/L を確保できた。

モノクロラミン添加前の源泉貯槽水のレジオネラ属菌数は $250\text{CFU}/100\text{mL}$ であった。添加後2時間では全塩素濃度 2.5mg/L 、レジオネラ属菌は不検出。添加後6時間に末端浴場の温泉浴槽水を検査した結果、全塩素濃度 3mg/L 、レジオネラ属菌は不検出であった。その後1ヵ月、2ヵ月の温泉浴槽水でレジオネラ属菌は培養法不検出であった。2ヵ月後の温泉浴槽水のLAMP法は陽性であった。これはモノクロラミンが残留する浴槽水にはレジオネラの生菌は存在しないが、モノクロラミンで殺菌された死菌が存在するためと考えられた。表4に全塩素濃度及びレジオネラ属菌の測定結果を示す。

本温泉水は、 $\text{pH}8.8\sim 9$ の弱アルカリ

性、塩素の消費が無い水質であった。

このため、源泉貯槽に添加したモノクロラミンがほぼ計算どおり末端の浴槽水で検出されたものである。

3-2. 長崎県(平成23年度実施)の温泉施設

本温泉入浴施設では、ろ過器を有する保有水量約 20m^3 の循環式大浴槽系でモノクロラミン処理を行った。モノクロラミン生成装置と全塩素濃度測定計器を設置し、自動制御を行った。大浴槽には源泉水2割、水道水8割の湯が供給されている。源泉水はモノクロラミンを消費する性質があり、実験室における試験では 100mg/L 添加した時、3時間後に 40mg/L 減少、48時間後では 72mg/L 減少した。(図4)大浴槽水と同様に源泉水2割、水道水8割で混合した場合、モノクロラミン 3.2mg/L 添加後3時間で 0.4mg/L に低下した。源泉水、大浴槽水、水道水の水質分析結果を表5に示す。源泉水はアンモニウムイオン 4.6mg/L 、TOC 1.5mg/L 、ORP 344mV であり還元力は強くないがモノクロラミンを消費することが確認された。

このような水質条件のため、浴槽水中のモノクロラミン(全塩素)濃度を安定に維持するために、全塩素濃度測定計器による自動制御は有効であった。3ヶ月の試験期間中、およそ1週間に一回、測定計器の校正を行いつつ、浴槽水のモノクロラミン濃度を $2\sim 4\text{mg/L}$ 程度に維持管理することが出来た。

試験期間中8回の採水の結果、浴槽水のレジオネラ属菌数は全て不検出($10\text{CFU}/100\text{mL}$ 未満)であった。

この時入浴者から、大浴槽水に関する塩素臭気の苦情は無く、モノクロラミン処理は入浴時の快適性向上にも有用であると考えられた。

3-3. 静岡県（平成24年度実施）の温泉施設（島田市，静岡市の施設）

（1）島田市の施設

保有水量 6.5m³の循環式浴槽に表2の仕様のモノクロミン生成装置及び全塩素濃度測定計器を設置して，6週間にわたりモノクロミン処理を行った。装置の設置状況を写真1，2に示す。本施設では温泉の水質が炭酸カルシウムのスケール生成傾向であり，全塩素濃度測定計器の電極にスケールが付着し，電極の感度が低下したため自動制御により浴槽水中の全塩素濃度が高くなる状況が発生した。表6に試験期間中の全塩素濃度の測定結果を示す。水質にもよるが，全塩素濃度測定計器の校正及び電極洗浄を適切な頻度で行う必要性が確認された。

試験期間中の浴槽水の採水検査では，レジオネラ属菌は検出されなかった。

モノクロミン処理期間中，1週間に一度行う高濃度塩素洗浄の方法を検討した。モノクロミン処理では浴槽水のアンモニウムイオン濃度が高くなるので，通常の塩素剤添加量では遊離残留塩素濃度が維持できなくなる。当施設では浴槽水を水道水に入れ替えた後，塩素剤を添加して遊離塩素濃度を維持して高濃度塩素洗浄を行った。

（2）静岡市の施設

保有水量 20m³の循環式浴槽に表2の仕様のモノクロミン生成装置及び全塩素濃度測定計器を設置して，6週間にわたりモノクロミン処理を行った。

本施設では6週間の試験期間中，全塩素濃度測定計器の校正をしなくても全塩素濃度測定値のずれは発生せず，浴槽水的全塩素濃度を安定して管理できた。（表7）これは，本施設の温泉水は軟水であり炭酸カルシウムのスケー

ル生成傾向が小さいことから電極の感度劣化が無かったためと考えられる。両施設の温泉浴槽水質を表8に示す

本施設における1週間に一度の高濃度塩素洗浄は以下の通りとした。

浴槽の保有水量が男女共通のため20m³と大きく，水道水に入れ替えるのは手間と時間の制約から困難であった。

このため1週間に一度のろ過器及び循環系の消毒は，浴槽水に約20mg/Lの塩素剤を添加することで浴槽水的全塩素濃度を10mg/L以上として実施した。

この定期的消毒及び，浴槽水中のモノクロミン濃度を常時3mg/L程度維持を行った試験期間中，浴槽水のレジオネラ属菌は不検出であった。

4. 運転コストの検討

モノクロミン処理と遊離塩素処理の運転コストの比較検討を行った。

塩化アンモニウム（食品添加物）の金額を¥500/kgとすると，20%塩化アンモニウムは¥100/kgとなる。12%次亜塩素酸ナトリウムの金額を¥100/kgとする。モノクロミンを生成するときの両液の混合量はほぼ同量なので，有効塩素あたりで比較した場合，モノクロミン液は次亜塩素酸ナトリウム単独に比べて，約2倍のコストとなる。

実際の浴槽水処理では，温泉泉質，設備のシステムにより異なるが，遊離塩素の維持濃度を1.0mg/Lとした場合，モノクロミンの維持濃度は3.0mg/L以上なので，モノクロミン処理では最大3倍の使用量となる。実際には浴槽水で塩素が消費された残りが維持濃度となるので，両者の差は小さくなる。

上記条件で計算すると，モノクロミン処理の運転コストは，遊離塩素処理の2倍から6倍の範囲内となることがわかる。

D. 結論

1. 実際の4箇所の温泉入浴施設において、モノクロラミン生成装置及び、全塩素濃度測定計器を設置して、浴槽水中のモノクロラミン濃度を所定の濃度範囲に維持管理した。
2. 上記モノクロラミン処理により、浴槽水中のレジオネラ属菌を不検出（10CFU/100mL未満）に出来た。
3. 3～5mg/L程度のモノクロラミンが残留する浴槽水に入浴した場合、不快な塩素臭気を感じることはなく、モノクロラミン処理は入浴時の快適性向上にも有用であると考えられた。
4. モノクロラミン生成装置の費用は810,285円(税込み, 工事費含まず)である。全塩素濃度測定計器のコストは、イワキ CL-310W-IA インライン型（濃度範囲 0～5mg/L）の場合 535,500円(税込み, 工事費含まず)である。
5. モノクロラミン処理時の運転コストは、水質や設備システムにより異なるが、遊離塩素処理に比較して2倍から6倍となる。

6. 実際の運用を通じて、モノクロラミン処理における課題が明らかとなったので、対応をする必要がある。

- ①塩素を消費する温泉水に適用する場合は、事前に予備試験を行い適用可能性を評価する。
- ②全塩素濃度測定計器の校正と電極洗浄などのメンテナンスを定期的に行う必要がある。
- ③1週間に一度行う、ろ過器と配管系の消毒方法に検討を要する。本件は、施設ごとの方法を設定する必要がある。

E. 参考文献

なし

F. 研究発表

第40回建築物環境衛生管理全国大会
(2012年2月24日) (財)ビル管理教育センター主催にて発表

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

表1. モノクロラミン生成装置の設計基準

	通流量(最大)	通流量(最大)
水道水	1200mL/分	72L/時間
12%次亜塩素酸ナトリウム液 (%は W/W, 比重 1.15, Cl ₂ 分子量=71)	12.0mL/分	0.721L/時間
20%塩化アンモニウム液 (%は W/V, NH ₄ Cl 分子量=53.5)	13.5mL/分	0.81L/時間
モノクロラミン (asCl ₂) 生成量	1.66g/分	100g/時間
本条件でのモノクロラミン液の塩素：アンモニウムのモル比は、 1：2.2 モノクロラミン濃度は、約 1380mg/L		
参考：モノクロラミン生成の反応式 $\text{NaClO} + \text{NH}_4\text{Cl} \rightarrow \text{NH}_2\text{Cl} + \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$		

表 2. モノクロアミン生成装置の機器類の仕様・価格

品名	機器仕様・品名	価格(税込み)
水道水タンク	50L ポリエチレン製, ボールタップ付き	36,435
水道水ポンプ	タクミナ製 CS2-1000-VTCE-HW-100V1-Y-S-S 型 最大 1200mL/分×0.3MPa (60Hz 時)	164,850
次亜塩素酸ナトリウム液タンク	タクミナ製 PTU-100 型 100L ポリエチレンタンク	65,205
次亜塩素酸ナトリウム液ポンプ	グランドフォス製 DDC6-10A-PV/T/C-F- 310202JGA 型 最大 100mL/分×0.6MPa	116,445
塩化アンモニウム液タンク	タクミナ製 PTU-100 型 100L ポリエチレンタンク	65,205
塩化アンモニウム液ポンプ	グランドフォス製 DDC6-10A-PV/T/C-F- 310202JGA 型 最大 100mL/分×0.6MPa	116,445
スタティックミクサ	20A 塩化ビニル製	77,700
制御盤	100V, 水道水ポンプ遅延タイマー (0~30 秒) 及び水道水タンクのレベル制御付き	157,500
配管類	薬液混合部主配管は 20A 塩化ビニルパイプ その他は, 塩ビブレードホースにて接続	10,500
合計金額		¥ 810,285

注記:表中の価格(税込み)は, 定価, 工事費用は含まない.

表 3. 全塩素濃度測定計器の仕様・価格

品名	機器仕様・品名	価格(税込み)
全塩素濃度測定計器	イワキ CL-310W-IA インライン型残留塩素計 濃度範囲 0~5mg/L	535,500
合計金額		¥ 535,500

注記:表中の価格(税込み)は, 定価, 工事費用は含まない.

表 4. 静岡県(平成 22 年度)の温泉施設の全塩素濃度、レジオネラの検査結果

採水月日	11月11日	11月11日	11月11日	12月10日	1月13日
時刻	11:00	13:00	17:00	15:00	14:00
試料名	源泉貯槽	源泉貯槽	A浴槽	B浴槽	B浴槽
レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	250	<10	<10	<10	<10
LAMP法	試験せず	試験せず	試験せず	試験せず	陽性
全残留塩素濃度 (mg/L)	0(投入前)	2.5程度	3.0程度	3.5	3.4

表 5. 長崎県(平成 23 年度)の温泉施設の水質分析結果

	源泉水	大浴槽	水道水
pH(25°C)	8.2	8.4	7.5
電気伝導率(mS/m)	1500	340	13
全硬度 (CaCO ₃)	72	41	34
カルシウム硬度 (CaCO ₃)	36	20	16
マグネシウム硬度 (CaCO ₃)	36	21	18
塩化物イオン (Cl ⁻)	4400	960	5
酸消費量 (pH4.8)(CaCO ₃)	2500	420	33
シリカ (SiO ₂)	42	64	68
硫酸イオン(SO ₄)	<5	<5	6
TOC	1.5	1.3	<1.0
COD(O)	3.4	0.6	0.7
アンモニウムイオン (NH ₄)	4.6	3.8	<0.1
全ヨウ素	3.8	2.8	—
ORP(mV)	344	460	600

単位:pH、電気伝導率(mS/m)、ORP(mV)を除きmg/L

表 6. 島田市施設の浴槽水中のモノクロラミン濃度の推移 (単位: mg/L)

開始時	2日目	5日目	11日目	18日目	26日目	32日目	39日目
9月13日	9月14日	9月17日	9月23日	9月30日	10月8日	10月14日	10月21日
2.5	2.2	1.2	3.1	9.5	28	5.7	6.0

試験開始 18 日目にやや高い、26 日目に、非常に高い濃度になっている。

表 7. 静岡市施設の浴槽水中のモノクロラミン濃度の推移 (単位: mg/L)

開始時	1週目	2週目	3週目	4週目	5週目	6週目
10月23日	10月28日	11月4日	11月11日	11月18日	11月25日	12月2日
1.7	4.1	4.3	2.9	4.4	4.0	3.9

試験期間中ほぼ安定した濃度となっている。

表 8. 静岡県(平成 24 年度)の両温泉施設の水質分析結果

(単位: mg/L)

項目	島田市温泉水	静岡市温泉水
pH(25°C)	7.4	8.9
電気伝導率(mS/m)	1900	140
全硬度 (CaCO ₃)	298	2
Ca硬度 (CaCO ₃)	250	2
Mg硬度 (CaCO ₃)	48	<1
M-アルカリ度 (CaCO ₃)	160	710
塩化物イオン	6600	5
硫酸イオン	<5	<5
シリカ	26	20
アンモニウムイオン	5.5	2.4
TOC	1.2	<0.1
KMnO ₄ 消費量*	5.4	<1

*島田市温泉水は硝酸銀を添加して測定

図 1. モノクロラミン生成装置のフロー図

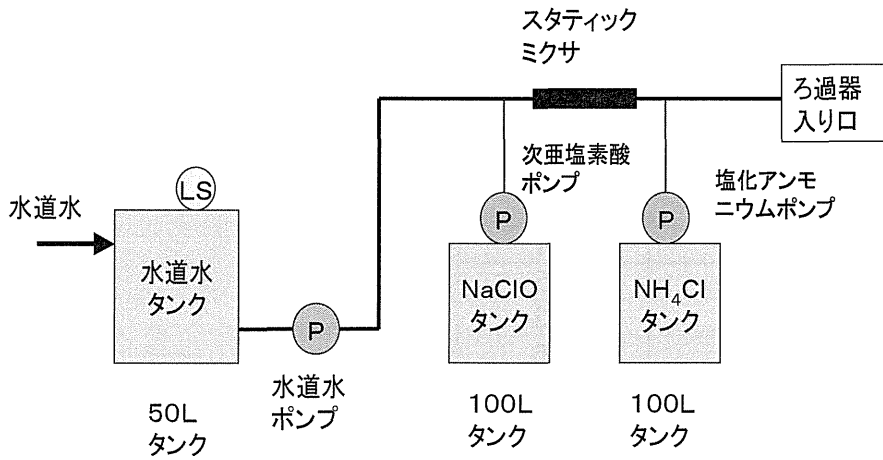
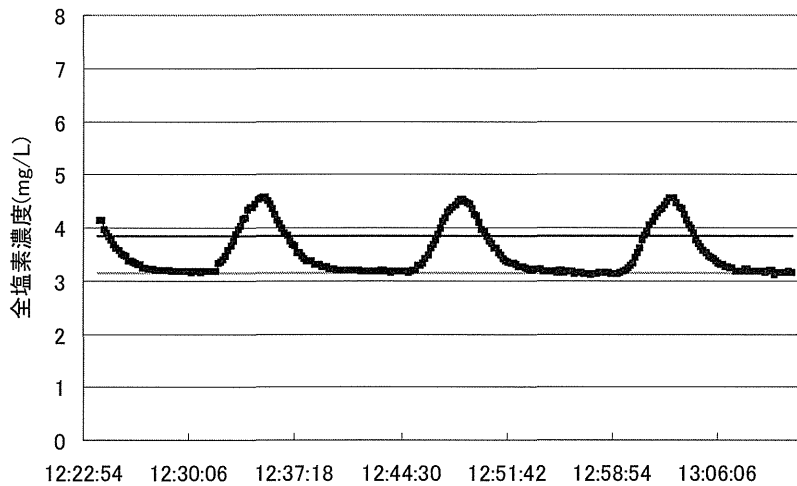
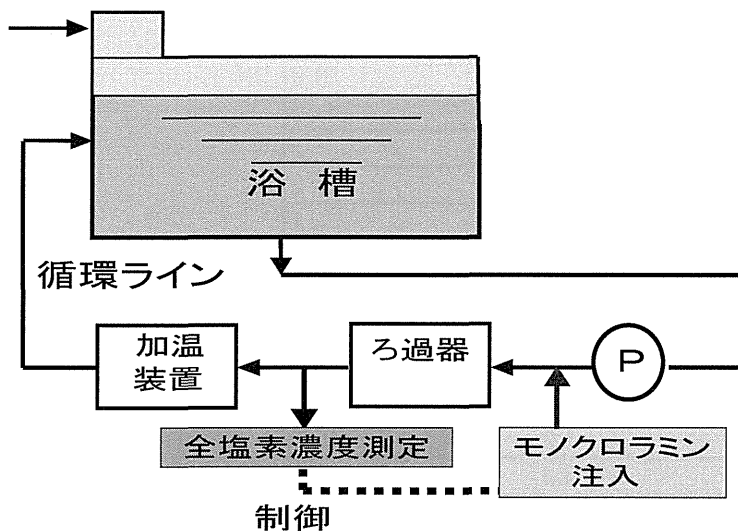


図 2. ろ過器出口水の全塩素濃度の測定結果例



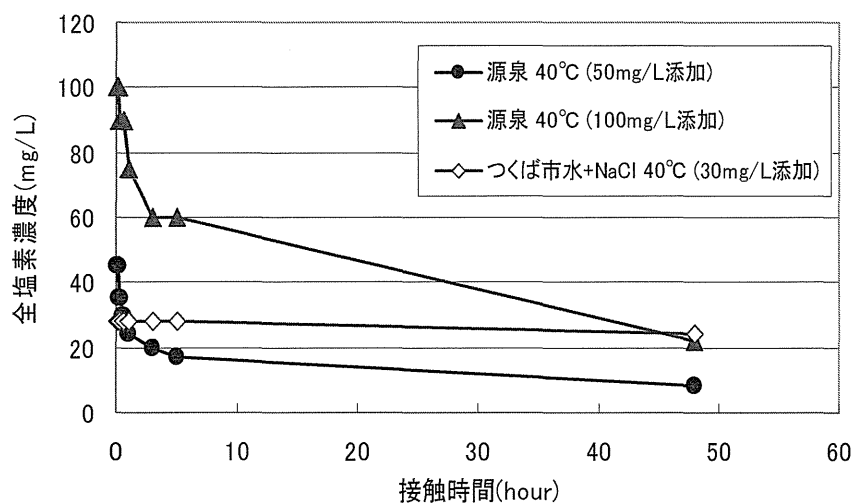
太い線が、全塩素濃度。
 ピーク間隔は 14 分間。
 全塩素濃度が低下して行き 3.15mg/L (下の線) で制御 ON(薬注開始), 濃度が上昇して行き 3.85mg/L (上の線) で制御 OFF(薬注停止)。

図 3. 循環式浴槽系のモノクロラミン注入・制御フロー図



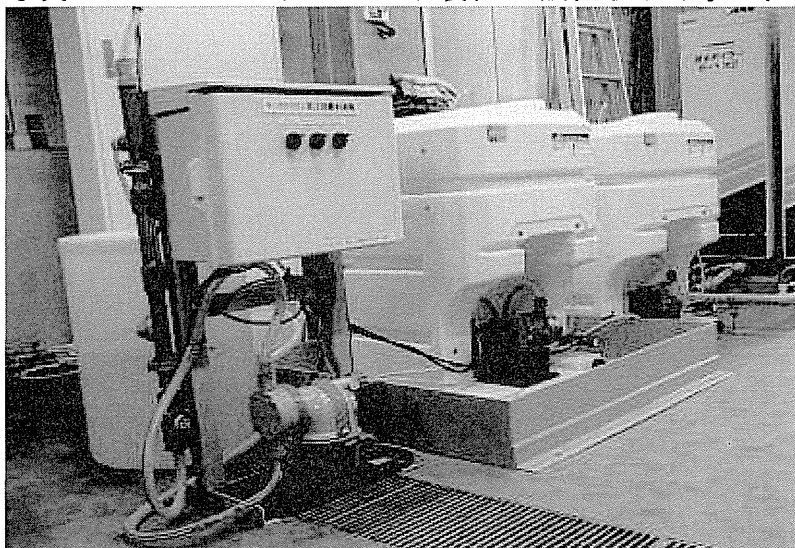
ろ過器の出口配管から浴槽水をサンプリングし、全塩素濃度を測定。ろ過器入り口配管にモノクロラミン液を注入。

図 4. 長崎県(平成 23 年度)の温泉水のモノクロラミン消費量



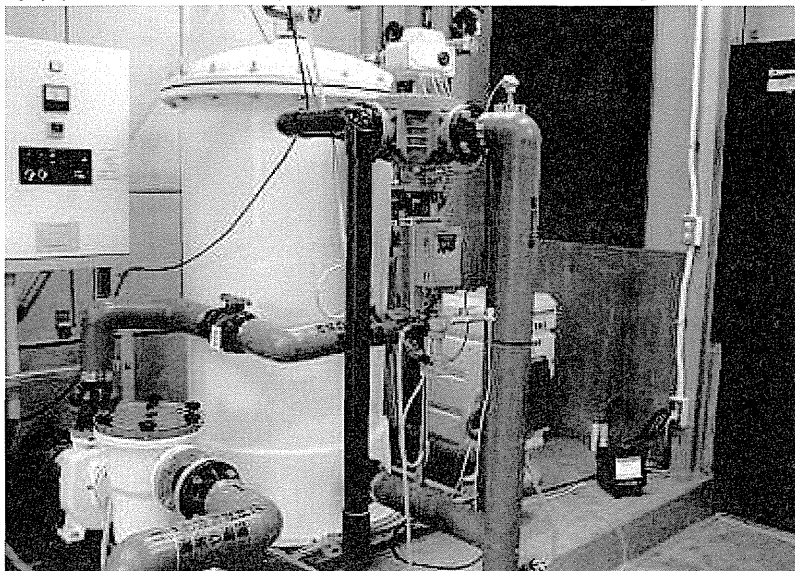
源泉水にモノクロラミンを添加すると時間とともに濃度が低下する。
つくば市水に添加した場合は濃度は殆ど低下しない。

写真 1. モノクロラミン生成装置の設置状況(島田市の施設)



左から、制御盤と水道水ポンプ(奥に水道水タンク)、塩化アンモニウム液のタンクとポンプ、次亜塩素酸ナトリウム液のタンクとポンプ、である。混合配管は制御盤の左側面に縦に取り付けられている。水道水、薬液類の配管は塩ビブレードホースを使用している。

写真 2. 全塩素濃度測定計器の設置状況(島田市の施設)



ろ過器に設置した、全塩素濃度測定計器の様子。サンプル水はろ過器の出口配管からホースで電極セルに1L/分の流量で導いている。モノクロラミン液の注入箇所はろ過器の入り口配管である。

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

分担 総合研究報告書

－ 消毒副生成物の暴露評価 －

研究分担者: ○神野 透人	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
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
研究協力者: 香川(田中) 聡子	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
古川 容子	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
岡元 陽子	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
真弓 加織	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
竹熊 美貴子	埼玉県衛生研究所
高橋 淳子	桐生大学短期大学部 生活科学科
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

研究要旨: レジオネラ属菌に対する塩素代替消毒剤としてモノクロラミンの適用可能性を考える際には、消毒副生成物暴露の観点からも健康リスクに対する影響を精査する必要があると考えられる。そこで、本研究ではモノクロラミン処理浴槽水中の消毒副生成物との比較に資するためのデータを得る目的で、まず現行の塩素消毒を行っている入浴施設において消毒副生成物濃度に関する調査を実施した。10箇所の浴場施設について調査を行った結果、いずれの施設の浴室空気中からもクロロホルム ($15\sim 111\ \mu\text{g}/\text{m}^3$) をはじめとするトリハロメタン類やジクロロアセトニトリル ($0.37\sim 7.7\ \mu\text{g}/\text{m}^3$)、ブロモクロロアセトニトリル ($0.95\sim 5.8\ \mu\text{g}/\text{m}^3$) が検出された。浴槽水中からはこれらの消毒副生成物に加えて、ジクロロ酢酸 ($5.3\sim 43\ \mu\text{g}/\text{l}$) やトリクロロ酢酸 ($2.0\sim 50\ \mu\text{g}/\text{l}$) が比較的高濃度で検出され、さらに、抱水クロラールが高い濃度 ($4\sim 110\ \mu\text{g}/\text{l}$) で存在していることが本研究によって初めて明らかになった。次に、モノクロラミン処理を試験的に導入した実施施設の浴槽水中の消毒副生成物、特に含窒素化合物であるジハロアセトニトリル類並びにヨウ素化消毒副生成物について、通常の塩素処理時との量的・質的な差異を比較検討した。その結果、総トリハロメタン濃度 (塩素化/臭素化トリハロメタン4化合物とヨウ素化トリハロメタン6化合物の和) がモノクロラミン処理の導入によって顕著に低下し ($1/10\sim 1/50$)、消毒副生成物の経気道及び経皮暴露による健康リスクを効果的に低減できることが明らかになった。ただし、ヨウ化物イオンが含まれている温泉水では、今までに検出事例のない Bromodiiodomethane や Iodoform 等のヨウ素化トリハロメタン類が塩素処理及びモノクロラミン処理浴槽水の何れにも存在することが明らかになった。ヨウ素化トリハロメタン類の健康影響については必ずしも十分な情報が得られないことから、今後は毒性データの取得や詳細な暴露評価が必要になると考えられる。

A. 研究目的

本研究では、公衆浴場等における塩素代替消毒剤、特にモノクロラミンの適用可能性を消毒副生成物暴露の観点から評価する目的で、まず従前の塩素消毒を行っている浴場施設において浴槽水及び浴室空気中の含窒素化合物(ハロアセトニトリル類・*N*-ニトロソジメチルアミン・クロロピクリン)を含む一群の消毒副生成物に関する調査を実施した。次いで、試験的にモノクロラミン消毒を導入した浴場施設において浴槽水中の消毒副生成物濃度を測定し、消毒剤の違いによる消毒副生成物の質的・量的な差異について検討を行った。また、これらの調査の過程で、特定の条件下ではヨウ素化消毒副生成物が生じている可能性のあることが明らかになったため、新たに分析法を確立して浴槽水の汚染実態について調査を実施した。さらに、新規の消毒副生成物について主要な暴露経路を推定するための手法を確立する目的で、揮散性(例えばヘンリー定数)や脂溶性(例えばオクタノール-水分配係数(Log P))などの物理化学的なパラメーターの計算化学的な手法による推定方法についても検討を行った。

B. 実験方法

B-1. 塩素消毒を行った公衆浴場等の浴槽水及び浴室空気中消毒副生成物の定量

水道法の公定法に従い、浴槽水中のハロ酢酸類はメチル誘導体化しガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/M)で、アルデヒド類はPFBOA誘導体化しGC/MSで、TOCは全有機炭素計TOC-V CPHで定量した。

空気中のVOCは加熱脱着-GC/MSで、アルデヒド類はDNPH誘導体化してHPLCで定量した。

B-2. モノクロラミン消毒を行った公衆浴場等の浴槽水中消毒副生成物の定量

浴槽水中の塩素化/臭素化トリハロメタン類、ジハロアセトニトリル類及びアルデヒド類濃度は、AquaPT6000 パージ・トラップ濃縮導入装置及びGC/MS(GCMS-QP2010)を用いて定

量した。

ヨウ素化トリハロメタン類、特に Iodoform については前述のパージ・トラップ-GC/MS 法では十分な感度が得られなかったため、別途オフラインパージ・トラップ 加熱脱離-GC/MS による測定法を確立し、定量を行った。まず、小型インピンジャーに浴槽水をはかり採り、NaCl を加えた後に He ガスを約 50 mL/min の流速で流して曝気し、揮散したヨウ素化トリハロメタン類をガラス製 Tenax TA 吸着管で捕集した。Tenax TA 吸着管に捕集したヨウ素化トリハロメタン類は加熱脱離-GC/MS を用いて定量した。

B-3. 計算化学による消毒副生成物の物理化学的パラメーターの推定

ハロケトン類 20 物質、ハロアミド類 9 物質、ハロアセトニトリル類 9 物質、ハロアルデヒド類 11 物質、ハロニトロメタン類 9 物質及びハロキノン類 4 物質の計 62 種類の消毒副生成物を対象に検討を行った。これらの消毒副生成物の 3 次元分子構造を作成し、配座探索プログラム CONFLEX ver. 6 により 10 kcal/mol 以内のエネルギー範囲の配座空間を探索した。得られた最安定配座について密度汎関数(DFT)法による量子化学計算を行い、COSMO-RS 法により物性値を算出した。

C. 結果と考察

塩素による消毒を行っている 10 箇所の浴場施設について調査を行った結果、いずれの施設の浴室空気中からもクロロホルム ($15\sim 111\ \mu\text{g}/\text{m}^3$) をはじめとするトリハロメタン類やジクロロアセトニトリル ($0.37\sim 7.7\ \mu\text{g}/\text{m}^3$)、ブromokloroアセトニトリル ($0.95\sim 5.8\ \mu\text{g}/\text{m}^3$) が検出された。浴槽水中からはこれらの消毒副生成物に加えて、ジクロロ酢酸 ($5.3\sim 43\ \mu\text{g}/\text{l}$) やトリクロロ酢酸 ($2.0\sim 50\ \mu\text{g}/\text{l}$) が比較的高

濃度で検出された。一方、*N*-ニトロソジメチルアミンとクロロピクリンについてはいずれの浴槽水でも不検出であったが、抱水クロールが高い濃度 (4~110 µg/l) で存在していることが本研究によって初めて明らかになった (表 1)。

次に、試験的にモノクロラミン処理を導入した浴場施設の浴槽水中消毒副生成物濃度を指標として塩素代替消毒剤モノクロラミンの適用可能性を検討した。その結果、図 1 に示したように塩素処理時に主要な消毒副生成物としてクロロホルム (20 µg/l) が検出された浴場施設ではモノクロラミン処理への変更によって生成量が 1/100 (0.21 µg/l) まで大幅に低減した。また、ブromoホルム (110 µg/l) とジブromoアセトニトリル (37 µg/l) が主な塩素消毒副生成物である他の浴場施設においても、モノクロラミン処理時には消毒副生成物の生成が 1/5 以下 (それぞれ 0.42-23 µg/l、定量下限値未満) に抑えられることが明らかになった。これらの結果は、消毒副生成物暴露の観点から、モノクロラミンが有望な塩素代替消毒剤であることを示している。一方、もともと塩素処理時のトリハロメタン類濃度が低い別の浴場施設を精査した結果、興味深いことに、塩素処理とモノクロラミン処理のいずれの場合にもヨードホルム (CHI₃) やクロロジヨードメタン (CHCl₂)、ブromoジヨードメタン (CHBr₂) などのヨウ素化トリハロメタン類が比較的高濃度で存在していることが明らかになった。

さらに、公衆浴場等における消毒副生成物の主要な暴露経路の予測方法を確立する目的で、計算化学的手法による物理化学的なパラメーターの推定についても検討を行った。その結果、皮膚透過性の指標となる LogP については非経験的な量子化学計算による結果と定量的構造活性相関による結果とは比較的良

い相関関係を示したのに対し、経気道暴露の指標となるヘンリー定数については明瞭な相関は認められなかった。現時点では、本研究で検討を行った大部分の DBPs についてヘンリー定数の文献値 (実測値) が得られないために両手法による予測値の妥当性を議論することは出来ないが、少なくとも経皮暴露については非経験的な手法により比較的精度良く予測できる可能性が示唆された (図 2)。

D. 結論

本研究によって、塩素による消毒を実施している浴場施設ではトリハロメタン類やハロアセトニトリル類の多経路暴露 (経気道・経皮) が懸念されることが明らかになった。また、塩素代替消毒剤の候補であるモノクロラミンは、消毒副生成物の観点からもトリハロメタン類及びハロアセトニトリル類の生成量を顕著に低減する有望な消毒剤であることが示された。ただし、ヨウ化物イオンが存在する温泉水ではいずれの消毒剤によってもヨウ素化トリハロメタン類を生じることが初めて見出され、ヨードホルムについてはモノクロラミン処理浴槽水中の濃度が若干高い傾向が認められたことから、今後、ヨウ素化消毒副生成物の経皮あるいは経気道暴露の可能性を検証するとともに、それらの有害性に関する情報を収集・取得する必要があると考えられる。

E. 研究発表

E-1 論文発表

なし

E-2 学会発表

神野透人, 高橋淳子, 竹熊美貴子, 香川 (田中) 聡子, 古川容子, 泉山信司, 遠藤卓郎: モデル浴槽のモノクロラミン消毒副生成物に関する暴露評価. 日本防菌防黴学会第 37 回年次大会 (2010.9)

竹熊美貴子, 吉田栄充, 澁木優子, 香川 (田中) 聡子, 神野透人, 西村哲治: 遊泳用プールにおける水中及び室内空気中の消毒副生成物調査. 日本薬学会第 131 年会 (2011.3)

竹熊美貴子, 野本かほる, 柴田 穰, 高橋淳子, 古川容子, 香川 (田中) 聡子, 神野透人, 西村哲治: 公衆浴場における消毒副生成物の実態調査: 含窒素消毒副生成物とアルデヒ

ト類. 第 48 回全国衛生化学技術協議会年会 (2011.11)

神野透人, 香川 (田中) 聡子, 西村哲治: コンピューターケミストリーを利用した家庭用品中の化学物質の物性値予測法に関する研究. 平成 23 年度 室内環境学会学術大会 (2011.12)

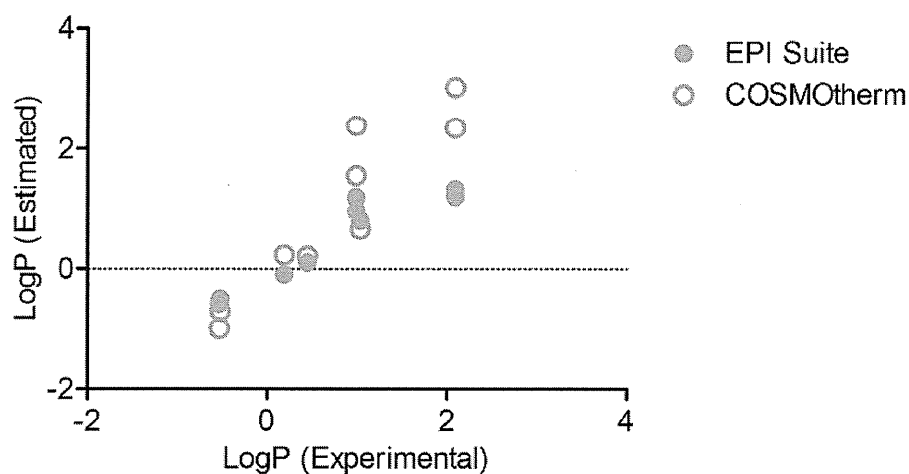
竹熊美貴子, 吉田栄充, 野本かほる, 柴田譲, 香川 (田中) 聡子, 神野透人, 西村哲治: 公衆浴場および遊泳用プールにおける消毒副

生成物の実態調査. 日本薬学会第 132 年会 (2012.3)

F. 知的所有権の取得状況

なし

Correlation of LogP with the Experimental Values



[EPI Suite]
 $r = 0.938$, Slope = 0.74
[COSMOtherm]
 $r = 0.932$, Slope = 1.38

図 2 実験的に得られた消毒副生成物の LogP 値と推定値の相関

表1 塩素消毒を行った公衆浴場等浴槽水中の消毒副生成物

項目	定量下限値	単位	公衆浴場1	公衆浴場2	公衆浴場3	公衆浴場4	公衆浴場5	公衆浴場6	公衆浴場7	公衆浴場8	
総トリハロメタン	クロロホルム	0.001	mg/L	0.009	<0.001	0.022	0.004	0.018	0.008	0.005	0.004
	ジブロモクロロメタン	0.001	mg/L	0.007	<0.001	0.002	0.001	0.011	0.003	<0.001	<0.001
	ブロモジクロロメタン	0.001	mg/L	0.010	<0.001	0.004	0.002	0.013	0.004	<0.001	<0.001
	ブロモホルム	0.001	mg/L	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.005	0.001	<0.001	<0.001
	合計	0.001	mg/L	0.027	<0.001	0.028	0.007	0.047	0.016	0.005	0.004
NDMA	0.01	μg/L	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	
ハロアセトニトリル類	クロロアセトニトリル	0.001	mg/L	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	ジクロロアセトニトリル	0.001	mg/L	0.003	<0.001	0.009	0.004	0.009	0.006	0.001	0.002
	トリクロロアセトニトリル	0.001	mg/L	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	ブロモクロロアセトニトリル	0.001	mg/L	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.001
	ジブロモアセトニトリル	0.001	mg/L	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	クロロピクリン	0.001	mg/L	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	抱水クロラール	0.001	mg/L	0.019	0.004	0.11	0.065	0.043	0.045	0.041	0.047
	ブロモアセトニトリル	0.001	mg/L	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	トリブロモアセトニトリル	0.001	mg/L	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	ブロモジクロロアセトニトリル	0.001	mg/L	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	ジブロモクロロアセトニトリル	0.001	mg/L	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

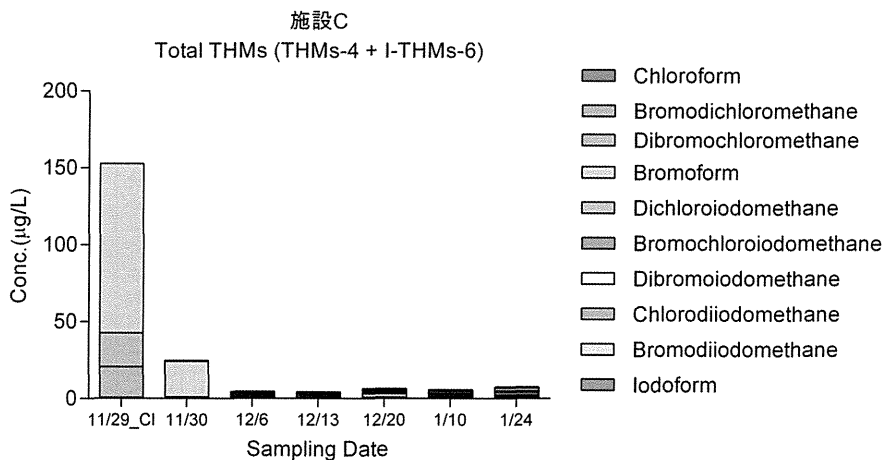
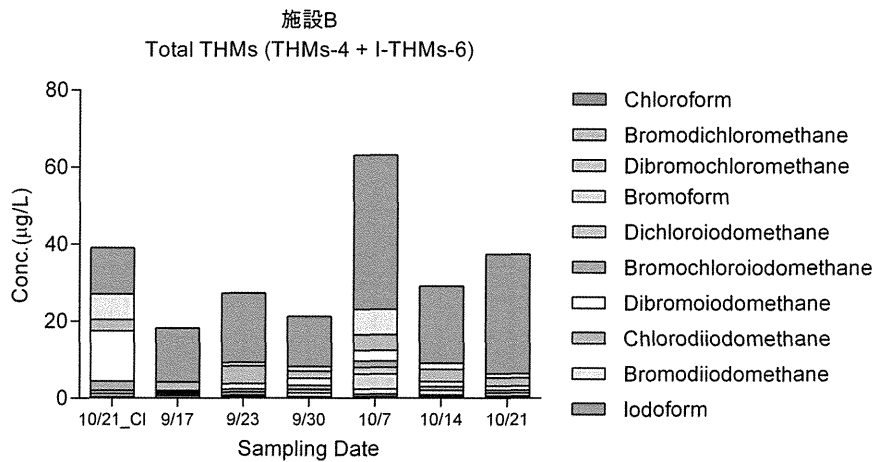
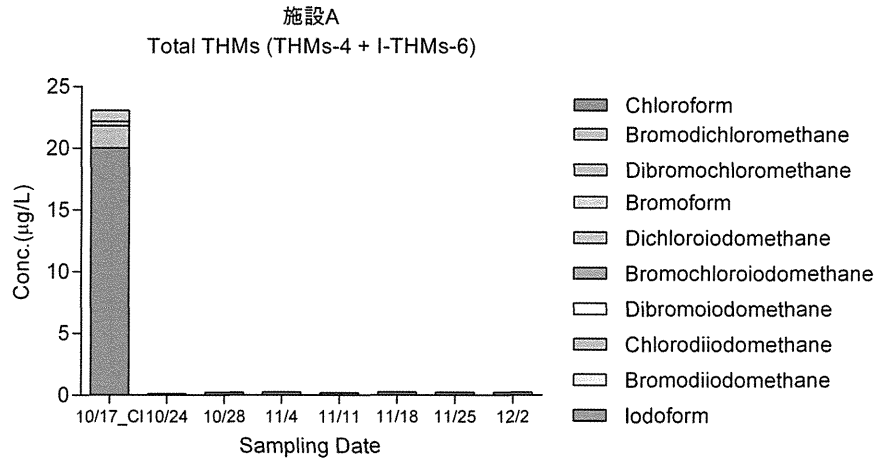


図1 試験的にモノクロアミン処理を導入した公衆浴場等浴槽水中の THM 濃度
Sampling DateにClを付したものは塩素処理時のTHM濃度を示している。また、施設Bの9/30~10/21,
特に10/7の採水試料はモノクロアミンが過剰であった。

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 主任研究官

分担研究報告書

液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の開発 (平成 22～24 年度)

研究分担者	○ 烏谷 竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
	荒井 桂子	横浜市衛生研究所
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	田栗 利紹	長崎県保健環境研究センター
	八木田 健司	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	矢崎 知子	宮城県保健環境センター
	金谷 潤一	富山県衛生研究所
	吉崎 美和	タカラバイオ (株) ドラゴンジェノミクスセンター

研究要旨

入浴施設の浴槽水等を対象としたレジオネラ属菌の生菌迅速検査法として、液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (以下、LC RT-qPCR 法) を開発した。DNA よりも鋳型量が豊富な 5S rRNA を標的とし、カラム精製不要で定量性に優れた 1 step RT-qPCR を作成した。濃縮浴槽水に液体培地を加えて 18 時間培養し、rRNA の増加量を RT-qPCR で測定することで、生菌量と死菌量を同時に評価する LC RT-qPCR 法を確立した。コピー数既知のコントロール RNA を用い、アメーバで培養したレジオネラ属菌の 5S rRNA コピー数が、1 CFU 当たり 8,000 コピーから 18 時間培養後に 400,000 コピーに増加することを明らかにし、検水中の rRNA コピー数を CFU に換算する係数とした。夾雑菌による液体培養でのレジオネラ増殖抑制を回避するため、検水濃縮液の ATP 量に応じて前処理を追加・変更する手順を定めた。また、温泉成分等による RT-qPCR 反応阻害を回避するため、RNA 抽出液及び RT-qPCR 反応液に阻害回避試薬を加えること等の改良により、偽陰性反応の低減に成功した。改良 LC RT-qPCR 法を実試料で評価した結果、培養前の定量値から算出する Total Legionella (死菌 + 生菌) は、平板培養法と比較して感度 90.0%、特異度 81.9%であったが、液体培養後の定量値から算出する Viable Legionella は、感度 83.3%、特異度 96.6%と、生菌に対する特異性が極めて高い方法であることを明らかにした。平板培養法と LC RT-qPCR 法の定量値は高い相関を示し ($R^2=0.80$)、施設の汚染状況を迅速に評価できると考えられた。本法は、検体搬入から最短 21 時間程度で生菌の有無と汚染レベルが判明することに加え、死菌量から潜在的な汚染リスクが評価可能であり、施設の衛生管理及び指導に十分活用可能と考えられた。

A 研究目的

現在、浴槽水等の環境水からのレジオネラ属菌

の検出は、濃縮した検水を培地平板上に塗布し、
発育した集落数を計測する平板培養法により行

われている。現行法の問題点としては、判定までに7~10日を要し、汚染状況の把握に時間がかかることが挙げられる。このため、遺伝子検査を用いた迅速検査法、すなわち16S rRNAあるいは5S rRNA遺伝子等のレジオネラ属菌に特異的な配列を標的としたLAMP法及びリアルタイムPCR法が開発され、行政対応の判断材料として活用が始まっている。しかし、通常の遺伝子検査法は、生菌のみならず死菌に由来する遺伝子も増幅対象とするため、遺伝子検査が陽性であっても通常の平板培養法で陰性となる場合があり、結果の解釈と活用方法には注意を要する。大量の死菌の存在は、浴槽や配管内にバイオフィーム等レジオネラの供給源があることを意味するため、施設管理の指標としての意義は認められるが、平板培養法の結果を迅速に予測できる生菌迅速検査法への期待は高い。現在、EMA等の前処理試薬を用いて生菌由来のDNAのみを増幅するEMA-qPCR法等が開発され¹⁻³⁾、市販キットも発売されているが、普及には至っていない。

我々は、レジオネラ生菌のrRNAが短時間の液体培養で増加することに着目し、生菌特異的な迅速検査法の開発を行ってきた⁴⁻⁶⁾。3年間の検討の結果、浴槽水等の濃縮検体を酸処理後、MWY液体培地に加えて1夜培養し、培養後のrRNA増加量をRT-qPCRで定量することにより、浴槽水等の生菌数の測定が可能な液体培養(Liquid Culture)定量RT-PCR法(LC RT-qPCR)を開発したのでその概要を報告する。

B 研究方法及び検査材料

1 レジオネラ属菌平板培養検査

レジオネラ症防止指針第3版に準じて実施した。即ち、検水1リットルを採取し、そのうちの600mlをポリカーボネートフィルター(孔径0.2 μ m、直径47mm、ADVANTEC)でろ過し、滅菌蒸留水6mlで懸濁して100倍濃縮液とした。100倍濃縮液500 μ lに酸処理液(0.2M HCl-KCl buffer、pH2.2、武藤化学)500 μ lを加えて室温で5~20

分間反応後、GVPC寒天培地(日本ビオメリュー)及びWYO α 寒天培地(栄研化学)に100 μ lずつ塗布し、36 $^{\circ}$ Cで7日間培養した。

2 液体培養(Liquid Culture)定量RT-PCR(LC RT-qPCR)

(1) MWY液体培地

Yeast Extract (Bacto) 1.0g、活性炭(Norit SA2、日本ノリット) 0.2gを90mlの蒸留水に加えて121 $^{\circ}$ C、15分間高圧蒸気滅菌後、レジオネラBCYE発育サプリメント(SR110、Oxoid)及びMWY選択サプリメント(SR118、Oxoid)を無菌的に添加し、1mlずつ分注して-30 $^{\circ}$ Cで保存した。

(2) 試料の濃縮

100倍濃縮液1mlを15,000rpmで5分間遠心後、上清900 μ lを除去して1000倍濃縮液100 μ lを作成した。

(3) 液体培養

1000倍濃縮液100 μ lに酸処理液(0.2M HCl-KCl buffer、pH2.2、武藤化学)100 μ lを加えて室温で5分間反応後、MWY液体培地900 μ lを加えて中和した。ボルテックス後、100 μ lをマイクロチューブに分取し、-30 $^{\circ}$ Cで保存した(Ct(0h)測定用)。残りの濃縮試料加MWY液体培地1000 μ lを36 $^{\circ}$ Cで18時間静置培養後、100 μ lをマイクロチューブに分取した(Ct(18h)測定用、即時処理しない場合は-30 $^{\circ}$ C保存)。なお、微生物汚染の激しい検体については、酸処理時間を20分に延長したもの及び100倍濃縮液を同時に培養した。

(4) 酵素溶菌希釈法によるRNAの抽出

分取した培養液100 μ lに8% Chelex TE緩衝液250 μ l、5M NaCl 8 μ l、10% Triton X-100 20 μ l、100mM Dithiothreitol 20 μ l及び20mg/ml Proteinase K 2 μ lを加え、55 $^{\circ}$ Cで30分間溶解反応を行った(終濃度5% Chelex、0.1M NaCl、0.5% Triton X-100、5mM Dithiothreitol、0.1mg/ml Proteinase K)。95 $^{\circ}$ Cで10分間加熱処理後、15,000rpmで5分間遠心し、上清50 μ lをTE緩衝液200 μ lで希釈後混和し、RNA抽出液とした。

(5) RT-qPCR

Diederer ら⁸⁾の 5S rRNA を標的とした qPCR を改良し、1 step RT-qPCR の反応系を作成した。すなわち、プライマーは 5S1 (ACTATAGCGATTTGGAACCA)、5S2 (GCGATGACCTACTTTTCGCAT)、プローブは Leg5S (FAM-CCGCGCCAATGATAGTGTGAGGC-TAMRA)、反応試薬は One Step Prime Script RT-PCR Kit (TAKARA、RR064) を使用し、RNA 抽出液 2 μ l を加えて全量を 20 μ l とし RT-qPCR 反応を行った。プライマー、プローブの最終濃度はそれぞれ 400nM、250nM とし、反応液中にタカラバイオから提供を受けた阻害回避試薬 Solution E を 1/10 量添加した。測定機器は、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Life Technologies) を使用し、反応条件は 45 $^{\circ}$ C 5 分、95 $^{\circ}$ C 10 秒の後、95 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒を 45 サイクル行った。

3 5S rRNA コントロールの合成とコピー数の算出

(1) 5S rRNA コントロールの合成

Legionella pneumophila 長崎 80-045 株の 5S rRNA 領域を PCR で増幅し、T7 RNA Polymerase を用いた in vitro transcription 反応により、一本鎖 RNA を合成した。まず、T7 プロモーター配列を付加したセンスプライマー-LEG5S-FT7 (TAATACGACTCACTATAGGGTCTGCGACTATAGCGATTTGGAACCA) とアンチセンスプライマー-LEG5S-R (ACCCTGGCGATGACCTACTTTTCGCAT) を用い、TAKARA EX Taq HS (TAKARA) により 5S rRNA 全領域を含む二本鎖 DNA を合成した。PCR 反応には GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を使用し、94 $^{\circ}$ C 1 分の後、94 $^{\circ}$ C 10 秒、60 $^{\circ}$ C 10 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒を 30 サイクル行った。増幅産物を QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) により精製し、in vitro Transcription T7 kit (TAKARA) をマニュアルに従い使用し、一本鎖 RNA を合成した。Transcript RNA を MEGAclear kit (Ambion) で精製後、Quant-iT RNA Assay Kit

(Molecular Probes)によりコピー数を決定した。

Transcript RNA は TE バッファーで希釈して 5 \times 10⁶ コピー/ μ l に調整し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

(2) RT-qPCR を用いた検量線の作成

5 \times 10⁶ コピー/ μ l の 5S rRNA 原液 5 μ l に 45 μ l の EasyDilution (TAKARA) を加えてボルテックスし、5.0 \times 10⁵ コピー/ μ l とした。以下、同様に 5.0 コピー/ μ l まで 10 倍希釈を行い、6 点の希釈系列を作成した。RT-qPCR 反応は 2 連で行い、コピー数算出の検量線を作成した。

4 レジオネラ菌体当たりの 5S rRNA コピー数の決定

(1) アメーバ培養レジオネラの調整

Acanthamoeba castellanii Neff strain (ATCC 30010) を PYGC 培地で 30 $^{\circ}$ C 4 日間培養後、フラスコに付着したアメーバを 1/50 PBS で洗浄し、PYGC 培地を 1/50 PBS に置き換えた。そこに BCYE α 寒天培地で 30 $^{\circ}$ C 4 日間培養した *Legionella pneumophila* 長崎 80-045 株を少量接種し、30 $^{\circ}$ C で 4~5 日間培養した。得られたレジオネラ菌液を孔径 5 μ m のメンブレンフィルターでろ過し、アメーバの残骸等を除去した。そのろ液 (約 10⁸ CFU/ml) を検量線作成用のレジオネラ菌液とし、1/50 PBS で 10 倍希釈系列を作成した。希釈液 100 μ l を BCYE α 寒天培地 (ビオメリュー) 2 枚に塗布し、その平均値から各系列 100 μ l 中の菌数を算出した。

(2) 5S rRNA コピー数の決定

アメーバ培養レジオネラで作成した 10 倍希釈系列の 100 μ l を用い、平板培養で算出した菌数を横軸に、LC RT-qPCR 法で算出した培養前の 5S rRNA コピー数及び 18 時間培養後のコピー数を縦軸にプロットし、切片からレジオネラ 1 CFU 当たりのコピー数及び 18 時間培養後のコピー数を算出した。

5 微生物汚染による液体培養抑制及びフミン酸等による RT-qPCR 反応阻害の改善に関する検討

(1) 液体培養でのレジオネラ増殖に与える前処理の影響

アメーバ培養レジオネラを 1/50 PBS で希釈した菌液 500μl に次の①～④の操作を加えた後、100μl を BCYE α 平板培地 (日本ビオメリュー) 2 枚に塗布し、36℃ 5 日間培養後のコロニー数をカウントした。同様に、各処理後の 100μl に MWY 液体培地を 900μl 加えて 18 時間培養後の 5S rRNA コピー数を RT-qPCR で測定した (いずれも n=2)。

- ①酸処理 5 分：菌液 500μl に酸処理液 500μl を加えて室温で 5 分間静置
- ②酸処理 20 分：菌液 500μl に酸処理液 500μl を加えて室温で 5 分間静置
- ③熱処理：菌液 500μl を 50℃で 20 分間加熱
- ④熱酸処理：菌液 500μl を 50℃で 20 分間加熱後、酸処理液 500μl を加えて室温で 5 分間静置

(2) 微生物汚染検体における LC RT-qPCR 反応阻害回避効果の検討

RT-qPCR 反応阻害が確認された微生物汚染検体 (ろ過器逆流水、pH8.3、ATP 16,450RLU/10ml、従属栄養細菌数 8.1×10^6 CFU/ml、レジオネラ属菌数 3,100 CFU/100ml) を試料として用いた。RNA 抽出時の Chelex 及び RT-qPCR 反応時の Solution E を添加しない LC RT-qPCR をコントロールとし、Chelex あるいは Solution E を使用した場合の 5S rRNA コピー数を算出した。また、阻害除去カラム OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (ZYMO RESEARCH) をマニュアル通り用いて RNA 抽出液を処理した。

(3) フミン酸による RT-qPCR 反応阻害対策

不溶性フミン酸 (和光純薬) をアルカリ溶解後に pH 7.4 に調整し、終濃度 3.2 mg/L~0.05 mg/L の範囲になるように 2 段階希釈を行った。それぞれの系列に、 10^3 コピー及び 10^5 コピーの合成 5S rRNA を添加し、RT-qPCR キット (TAKARA、RR064) でコピー数を測定した。RT-qPCR による回収率の低下が認められた濃度をフミン酸の MIC (最少阻害濃度) とした。阻害回避試薬の検証には、RT-qPCR チューブ当たり合成 5S rRNA 10^5 コピー、フミン酸 12.8 mg/L~0.8 mg/L となるように 2 段階希釈系列を作成し、Solution E 及び Zymo-Spin カラムを使用した場合の MIC を算出した。

4 検査材料及び検査方法

平成 22 年度は 68 件 (浴槽水 39 件、原水 22 件、逆流水 7 件)、平成 23 年度は 199 件 (浴槽水 176 件、原水 17 件、ろ過器逆流水 6 件)、平成 24 年度は 147 件 (浴槽水 129 件、原水 18 件、ろ過器逆流水 7 件) の試料を採取し、平板培養法及び LC RT-qPCR 法によりレジオネラ属菌数を算出した。平板培養法はレジオネラ症防止指針第 3 版に従った。LC RT-qPCR 法による「Total Legionella*1」は、Ct (0h) から算出した検水 100ml 中の 5S rRNA コピー数を 1 CFU 当たりのコピー数 (8,000) で除すことによって生菌数+死菌数の総菌数 (CFU/100ml) に換算し、10 CFU/100ml 以上を陽性とした。生菌定量値「Viable Legionella*2」は、Ct (18h) から算出した検水 100ml 中の 5S rRNA コピー数を 18 時間培養後の 1 CFU 当たりコピー数 (400,000) で除し、同様に Ct (0h) から算出

$$*1 \text{ Total Legionella (CFU/100ml)} = \frac{\text{検水 中の コピー数}}{\text{, (当たりの コピー数)}}$$

$$*2 \text{ Viable Legionella (CFU/100ml)} = 18 \text{ 時間培養後の生菌換算数} - \text{培養前の生菌換算数 (バックグラウンド値)}$$

$$= \frac{\text{時間培養後の検水 中の コピー数}}{\text{, (時間培養後の 当たりの コピー数)}} - \frac{\text{検水 中の コピー数}}{\text{,}}$$

$$*3 \text{ 生菌下限値 (CFU/100ml)} = \frac{\text{検水 中の コピー数}}{\text{,}}$$

した菌数の差を生菌数 (CFU/100ml) とした。LC RT-qPCR 法による生菌の有無は、Ct (18h) が Ct (0h) に比較して 1 以上低下し、かつ生菌定量値「Viable Legionella」が 2 CFU/100ml 以上の場合に陽性と判定した。「生菌下限値*3」は、Ct (0h) から算出した検水 100ml 中の 5S rRNA コピー数を 18 時間培養後の 1 CFU 当たりのコピー数 (400,000) で除すことで、生菌の検出下限値を示した。なお、Ct (18h) と Ct (0h) の差が 1 未満であり、かつ生菌下限値が 2 CFU/100ml 以上の検体については偽陰性の可能性が否定できないため、判定保留とした。

一般細菌数は標準寒天培地で 36°C 2 日間培養後、従属栄養細菌数は R2A 寒天培地で 42°C 7 日間培養後の菌数を求めた。ATP 量の測定は、携帯用簡易測定器ルミテスター PD-10 及びルシパックワイド (キッコーマン) を使用し、検水 100 倍濃縮液 100 μ l から検水 10ml 当たりの RLU 値を求めた。

C 結果

1 RT-qPCR の検量線と定量下限値

RT-qPCR の検量線を作成し、定量下限値を求めた (図 1)。2 社の定量用キット (TAKARA、invitrogen) 及び 2 社のリアルタイム PCR 装置 (TAKARA DICE、Life technologies StepOnePlus) のいずれを用いても、増幅効率 100~108%、 $R^2=0.9990\sim 0.9997$ の良好な検量線が作成できることを確認した。また、本反応における定量下限値は、10 コピー/tube と考えられた。

2 レジオネラ菌体当たりの 5S rRNA コピー数の決定

アメーバ培養レジオネラ菌の 10 倍希釈系列を用い、平板培養で算出した菌数を横軸に、LC RT-qPCR 法で算出した培養前の 5S rRNA コピー数及び 18 時間培養後のコピー数を縦軸にプロットした検量線を作成した (図 2)。各検量線の回帰式は次のとおりであった。

○レジオネラ培養前の検量線

$$1 \text{ 回目} : y = 1.0331x + 3.9328 \quad R^2 = 0.9998$$

$$2 \text{ 回目} : y = 1.0478x + 3.9195 \quad R^2 = 0.9998$$

○18 時間培養後の検量線

$$1 \text{ 回目} : y = 0.9779x + 5.7005 \quad R^2 = 0.9992$$

$$2 \text{ 回目} : y = 0.9918x + 5.5911 \quad R^2 = 0.9992$$

これらの検量線の切片から、レジオネラ菌体 (1 CFU) 当たりの 5S rRNA コピー数及び 18 時間培養後のコピー数を次のとおり算出した。

○レジオネラ菌体 (1 CFU) 当たりのコピー数

$$10^{(3.9328+3.9195)/2} = 8,437 \approx \underline{8,000} \text{ コピー}$$

○18 時間培養後のコピー数

$$10^{(5.7005+5.5911)/2} = 442,385 \approx \underline{400,000} \text{ コピー}$$

以上のことから、レジオネラの 5S rRNA は、菌体 (1 CFU) 当たり約 8,000 コピーであり、液体培地で 18 時間培養後には約 400,000 コピーに、約 50 倍増加するものと考えられた。

3 LC RT-qPCR の阻害要因と改善

(1) 液体培養でのレジオネラ増殖に与える前処理の影響

アメーバ培養菌に対する前処理の影響を確認するため、①酸処理 5 分、②酸処理 20 分、③熱処理 (50°C 5 分)、④熱酸処理 (50°C 5 分後、酸処理 5 分) の前処理を行い、平板培養により出現するコロニー数を比較した。その結果、①酸処理 5 分が 130 CFU/100 μ l と最も高値を示したのに対し、②酸処理 20 分では 77%、③熱処理及び④熱酸処理は 65%前後に低下したが、有意な低下ではなかった (図 3(1)、t 検定により棄却)。一方、液体培養 18 時間培養後の 5S rRNA コピー数は、①酸処理 5 分が 10^6 copies/PCR tube と最も高値を示し、②酸処理 20 分では 78%に低下したのに対し (有意差なし)、③熱処理は 33%、④熱酸処理では 5%と有意に低下した (図 3(2)、t 検定 $P < 0.05$)。

(2) 液体培養でのレジオネラ増殖抑制の改善

微生物汚染の激しい検体は、液体培養の段階でレジオネラの増殖が競合的に抑制されることが明らかとなっている。そこで、増殖抑制が認めら

れたろ過器逆洗水を使用し、酸処理 5 分、酸処理 20 分、熱処理 (50°C 5 分)、熱酸処理 (50°C 5 分後、酸処理 5 分) の前処理を行い、LC RT-qPCR による定量値を比較した (図 4)。平板培養法では、酸処理 5 分及び熱処理でレジオネラのコロニーは確認できなかったが、酸処理 20 分及び熱酸処理では雑菌の影響を受けることなくレジオネラの検出が可能であった (図 4 (a))。一方、LC RT-qPCR 法では、培養前の総菌定量値はいずれの前処理においてもほぼ同じ結果が得られたが、液体培養後に生菌定量値が得られたのは酸処理 20 分と熱酸処理のみであり、熱酸処理は酸処理 20 分と比較して 1/10 程度に低下した (図 4 (b))。

(2) RT-qPCR 反応阻害の回避

RT-qPCR 反応阻害の要因として、高度の微生物汚染とフミン酸等反応阻害物質の混入が挙げられる。高度の微生物汚染により RT-qPCR 反応阻害が認められたろ過器逆洗水を使用し、阻害回避試薬等の効果を検証した。RT-qPCR 反応液への Solution E の添加及び RNA 抽出液の Zymo-Spin カラム処理ではいずれの方法でも培養前後ともに改善効果は認められなかったが、RNA 抽出液に終濃度 5% の Chelex を添加した場合には培養前検体で 10 倍、培養後検体で 40~50 倍程度の感度増加が認められた (図 5)。

また、フミン質が含まれた温泉水では、qPCR 反応が阻害されることが知られている。そこで、RT-qPCR キット (TAKARA, RR064) におけるフミン酸の MIC 値を算出し、各阻害回避試薬の効果を検証した。RT-qPCR 反応液中のフミン酸最終濃度 1.6 mg/L で 5S rRNA の回収率が 1/3~1/4 に低下したことから、当該キットにおけるフミン酸の MIC は 1.6 mg/L と考えられた (図 6)。一方、RT-qPCR 反応液中に Solution E を添加した場合の MIC は 3.2 mg/L に上昇し、当該試薬の阻害回避効果が確認できた。RNA 抽出液を Zymo-Spin カラムに通した場合は、終濃度 12.8 mg/L でも反応阻害は認められず、高い阻害回避効果が確認できた (図 7)。

以上の検討から、塩素消毒を行っていない掛け流し式温泉や、配管・ろ過器洗浄水など高度の微生物汚染が想定される検体では、酸処理時間を 5 分から 20 分に延長し、1000 倍濃縮液に加えて 100 倍濃縮液も評価することとした。また、RNA 抽出時には終濃度 5% となるように Chelex 樹脂を添加し、Solution E を含んだ RT-qPCR 反応液を使用することとした。

3 浴槽水等における検査結果

(1) ATP 量と微生物汚染指標菌数との相関

平成 23 年度に採取した検水 106 件について、ATP 及び従属栄養細菌数等の微生物汚染指標菌の相関を検討した (図 8)。ATP 量と従属栄養細菌数との間には高い相関が認められ ($R^2=0.73$)、回帰式から ATP 値 5,000 RLU/10ml は概ね従属栄養細菌数 10^5 CFU/ml に相当すると考えられた。一般細菌数においても ATP 量と弱い相関が認められたが ($R^2=0.51$)、従属栄養細菌数よりも劣るものであった。ATP 量は、検水の微生物汚染の指標となることが確認された。平成 24 年度の LC RT-qPCR の解析結果から、ATP 値 5,000 RLU/10ml 以上の検水は、1000 倍濃縮液と 100 倍濃縮液の両方で酸処理 20 分の後に液体培養以降の操作を行うこととし、最も高い Viable Legionella の定量値が得られたデータを採用することとした。

(2) レジオネラ属菌検査における平板培養法と

LC RT-qPCR 法との比較

平成 24 年度に採取した検水 154 件について、平板培養法と LC RT-qPCR 法の定量値を比較した (図 9、表 1)。平板培養法では 40.1% (59/147) がレジオネラ陽性 (10 CFU/100ml 以上) であったのに対し、LC RT-qPCR 法 Total Legionella (生菌+死菌) は 46.9% (69/147) が陽性 (10 CFU/100ml 以上) であり、LC RT-qPCR 法 Total Legionella の平板培養法に対する感度は 90.0%、特異度は 81.9%であった (表 1 (1))。一方、LC RT-qPCR 法 Viable Legionella (生菌) では、大量のレジオネラ死菌由来の 5S rRNA が検出された 16 件につ

いては、生菌由来の rRNA の増加が検出できない可能性があるため判定保留とし、残りの 131 件について平板培養法の結果と比較した。平板培養法では 36.6% (48/131) がレジオネラ陽性 (10 CFU/100ml 以上) であったのに対し、LC RT-qPCR 法 Viable Legionella (生菌) は 32.8% (43/131) が陽性 (10 CFU/100ml 以上) であり、LC RT-qPCR 法 Viable Legionella の平板培養法に対する感度は 83.3%、特異度は 96.6%であった (表 1 (2))。平板培養法と LC RT-qPCR 法の定量値を比較すると、Total Legionella (近似曲線の傾き 0.92、 $R^2=0.63$)、Viable Legionella (0.93、 $R^2=0.80$) のいずれも平板培養法と良好な相関を示し、平板培養法の結果を精度良く予測可能なことを明らかにした (図 9)。

なお、判定保留とした 18 件中 12 件 (66.7%) が平板培養法陽性であり、LC RT-qPCR 法 Total Legionella 定量値は 100~13,000 CFU/100ml、平板培養法定量値は 10~5,300 CFU/100ml と多様であった。

D 考 察

我々は、今回の 3 年間の研究期間で、液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (LC RT-qPCR) に様々な改良を加え、簡便かつ再現性に優れたレジオネラ生菌迅速検査法を開発した。

本法は、鋳型量が豊富な 5S rRNA そのものを標的とする高感度な RT-qPCR をベースに開発を進めた結果、カラム精製の不要な簡便な操作で検体の調整を可能とした点に特徴がある。また、濃縮検体を液体培地で一夜 (18 時間) 培養し、rRNA の増加量から生菌の有無と生菌数を定量するため、本法で陽性と判定された検体のほとんどが平板培養法でも陽性であり、平板培養法の結果を予測する極めて特異性の高い検査法であることを明らかにした (特異度 96.6%)。

開発当初は、微生物汚染の激しい検体 (塩素消毒を行っていない掛け流し式温泉や配管・ろ過器洗浄水等) で、液体培地中のレジオネラ属菌の増殖が競合的に抑制される場合や、増加した夾雑菌

による RT-qPCR 反応阻害が原因とみられる偽陰性に苦慮した。しかし、その対策として、検水の ATP 量を指標に前処理を変更する手順を定め、RNA 抽出液や RT-qPCR 反応液に阻害回避試薬を追加することで偽陰性反応の低減に成功し、温泉を利用した浴槽水に適用可能な迅速検査法を確立した。

LC RT-qPCR 法は、液体培養によるレジオネラ 5S rRNA の増加量から生菌数を算出するため、rRNA の増加を上回る大量の死菌が存在する検体では、生菌としての検出が不可能な場合がある。しかし、LC RT-qPCR 法が生菌のみならず、同時に死菌量も定量できる点を活用し、検査結果として Total Legionella、Viable Legionella のほか、「判定保留」の基準を設けて生菌検出下限値を明示し、生菌の存在が否定できないという注意喚起に利用することを提案した。判定保留すなわち大量の死菌検出は、ろ過器や循環配管等へのバイオフィルムの蓄積を示唆しており、これを潜在的なハイリスクとして捉え、洗浄等の対策を講じる指標に活用することで、生菌汚染や事故発生を未然に防ぐ管理技術の向上に貢献できるものと考えられる。

本法は、検体搬入から最短 21 時間程度で生菌の有無と汚染レベルが判明することに加え、死菌量から潜在的な汚染リスクが評価可能であり、施設の衛生管理及び指導に十分活用可能と考えられた。

E 結 論

入浴施設の浴槽水等を対象としたレジオネラ属菌の生菌数を迅速に評価可能な液体培養 (Liquid Culture) 定量 RT-PCR 法 (LC RT-qPCR) を開発した。本法の評価を実試料で行ったところ、培養前の定量値から算出する Total Legionella (死菌+生菌) は、平板培養法と比較して感度 90.0%、特異度 81.9%であったが、液体培養後の定量値から算出する Viable Legionella は、感度 83.3%、特異度 96.6%と、生菌に対する特異性が極めて高い方法であることを明らかにした。本法は、検体搬