

平成 25 年度 分担研究報告書

冷却水系の消毒維持管理と菌の多様性

研究分担者	縣 邦雄	アクアス株式会社	つくば総合研究所
研究協力者	井上浩章	アクアス株式会社	つくば総合研究所
	神澤 啓	アクアス株式会社	つくば総合研究所

（研究要旨）

冷却水におけるレジオネラ属菌の検出実態を解析し，2001 年から 2012 年にかけて，30%程度から 25%弱に漸減しているが，冷却水処理をしてもレジオネラ属菌が検出されること，殺菌剤の種類別検出率から塩素系殺菌剤はレジオネラ属菌を抑制できていないことが明らかになった．塩素剤処理の冷却水から検出されるレジオネラ属菌を調査した結果，無処理とは菌相が変化しており *Legionella pneumophila* SG1 や SG6 の割合が多くなっており，これらの菌種・血清群は塩素剤に対する抵抗性が高い可能性が示された．

また，冷却水中のレジオネラ属菌の菌種を，培養法と EMA-qPCR 法で調査した結果，冷却水には既存種に分類されないレジオネラ属の生菌が多く存在することが示された．このことは，培養法と EMA-qPCR 法の検査結果の一致程度を評価するうえで勘案すべきであることを示した．

塩素剤処理した冷却水に存在するレジオネラ属菌は，塩素剤に対する抵抗性が培地上で発育した菌よりも高くなっていることを実験室試験で確認した．このレジオネラ属菌の塩素抵抗性の要因を調査した結果，アメーバ内で増殖したレジオネラ属菌の塩素耐性が高いことが考えられた．

モデル冷却塔を用いて実際の冷却水と同様の運転条件を再現し，殺菌剤の種類別レジオネラ属菌抑制効果を 20 週間にわたり評価した結果，結合塩素剤の常時 3mg/L 維持はレジオネラ属菌が増殖し，菌数は無処理よりも高くなり有効性は認められなかった．遊離塩素を常時 0.2mg/L 以上維持した場合とイソチアゾリン製剤処理は，20 週間にわたりレジオネラ属菌を抑制した．

今後，冷却水における有効なレジオネラ属菌の殺菌処理方法及び条件を確立することにより，冷却水に起因するレジオネラ症の発症数を抑制できることが期待される．

A．研究目的

国立感染症研究所感染症疫学センターのレジオネラ症の週別報告数<sup>1)</sup>によれば，夏から秋の期間に報告数が増える傾向がある．夏は，冷房需要が増えるので冷却塔の稼働台数が冬期に比べて増加する．加えて冷却水のレジオネラ属菌の検出率も高くなる．<sup>2)</sup> こうしたことから，夏期にレジオネラ症の報告数が増加する要因として冷却水の影響が考えられる．わが国では冷却塔由来のレジオネラ症の報告は稀であるが，海外では集団

感染事例も多く「外国におけるレジオネラ症集団感染事例(2002年～2007年)」のリスト<sup>3)</sup>によれば，26 件のうち 14 件が，冷却水を感染源としている．また 2012 年にカナダ・ケベック市と英国のエンジンバラで冷却塔を感染源とする集団発生が報告<sup>4)</sup>されている．諸外国の事例に学び，冷却水のレジオネラ対策を一層重視する必要がある．

こうした背景を受けて本研究では，冷却水のレジオネラ属菌の存在実態を明らかにすること，及びレジオネラ属菌を抑制するために使用されて

いる各種殺菌剤，とりわけ塩素系殺菌剤の効果を  
実態調査及び実験室で評価し，より有効なレジオ  
ネラ属菌抑制方法を検討し，確立することを目的  
とする．また，冷却水におけるレジオネラ属菌の  
菌種を調査することにより，殺菌剤の作用による  
菌相の変化，冷却水におけるレジオネラ属菌の遺  
伝子検査法の実用性検討のための知見を得るこ  
とも目的とした．

## B．研究方法

### 1．冷却水のレジオネラ属菌検出データの解析

#### (1) 冷却水におけるレジオネラ属菌検出率の推 移及び殺菌剤の種類別検出率

2001年1月から2012年12月にかけて日本全国  
の建築物（ビル）や工場，医療施設，商業施設等  
の冷却水を採水し，アクアス株式会社総合研究所  
で検査した結果を解析した．採水には25%チオ硫  
酸ナトリウム水溶液を1 mL添加して高圧蒸気滅  
菌した500 mL容のポリプロピレン製容器を用い  
た．採水時，冷却水で使用している殺菌剤の種類  
が明確な場合は，採水者が検査依頼ラベルに殺菌  
剤の種類を記載した．採水した試料水は冷蔵状態  
（4～6℃）で保存し，速やかに検査した．

レジオネラ属菌の検査方法はISO 11731に準じ  
た方法で行った．試料水400 mLを冷却遠心（6400  
×g，30 min）にて100倍に濃縮し，等量の0.2 M  
KCl-HCl 緩衝液（pH 2.2）を加えて10 min室温に  
放置後，200 μLをGVPC培地（MERCK）に接種した．  
37℃のインキュベーター内で培養し，6日後に培  
地を観察してレジオネラ属菌と判断される集落  
数を計数した．これらの集落を血液寒天培地（5%  
量の馬脱繊維血を添加した普通寒天培地）とBCYE $\alpha$   
培地に接種して，37℃のインキュベーター内で培  
養した．2日後にそれぞれの培地を観察し，血液  
寒天培地に発育せずBCYE $\alpha$ 培地に発育した集落を  
レジオネラ属菌とした．この試験の検出下限は10  
CFU/100mLである．

ただし，上記手法でレジオネラ属菌の検査をし  
た場合，GVPC培地全体にレジオネラ属菌以外の細  
菌類や真菌類が発育し，レジオネラ属菌の検出が  
できない場合がある．その場合にレジオネラ属菌

を検出するため，保存しておいた濃縮菌液を使用  
し，0.2 M酸性リン酸緩衝液（pH 2.2）による酸  
処理，および抗生物質の添加量と添加する抗真菌  
剤の種類を増やしたCAT $\alpha$ 培地<sup>5)</sup>を使用して再検  
査した結果も集計に加えた．

#### (2) 塩素処理レジオネラ属菌の種別調査

2013年8月から11月に，実際に運転されてい  
る冷却水を採取し，レジオネラ属菌の検出試験を  
ISO 11731に準じた方法で行った．

冷却水は，無処理，遊離塩素処理，結合塩素処理  
の3種の処理方法のものを採取した．

培養法により検出されたレジオネラ属菌につい  
て，培地上のコロニーを採取してレジオネラ属の  
菌種・血清群別を判定した．判定試験は市販の試  
薬，Duopath Legionella（MERCK），レジオネラ免  
疫血清「生研」（デンカ生研），Legionella Latex  
Test（Oxoid）を組み合わせて使用し，試験操作  
は各試薬に定められた方法に従って実施した．

#### 2．培養法とEMA-qPCR法によるレジオネラ属菌 の菌種調査

実際に運転されている冷却水3検体を採取して，  
培養法によるレジオネラ属菌検出を行い，菌種を  
同定した．同じ試料水について，レジオネラ属菌  
特異的16S rRNA 遺伝子を標的とするプライマー  
及び*Legionella pneumophila* 特異的 *mip* 遺伝子  
を標的とするプライマーを用いたEMA-qPCR法  
（タカラバイオ Thermal Cycler Dice Real Time  
System）で測定を行ない，各遺伝子量を求め，  
レジオネラ属菌の生菌に占める*Legionella*  
*pneumophila* の存在比率を求めた．

また，EMA処理後の試料について，16S rRNA 遺  
伝子のクローンライブラリーを作成し解析した．

#### 3．塩素処理冷却水のレジオネラ属菌に対する塩 素剤の殺菌試験結果

塩素剤処理を行っておりレジオネラ属菌が検  
出された実機冷却水を試験水として，実験室で各  
種条件でレジオネラ属菌に対する遊離塩素の殺  
菌効果を試験した．条件は，以下の4通りとした．

実機のまま

レジオネラ属菌が検出されている実際の冷却水に次亜塩素酸 Na を 5mg/L となるように添加して、時間経過と共にレジオネラ属菌数を培養法で測定し、生菌数の推移を調査した。レジオネラ属菌数が初期に対して 3 桁減少する時間(分)を求めた。また、次亜塩素酸 Na を添加 30 分後の試験水の遊離残留塩素濃度を測定した。

#### 5 μm ろ過条件

実際の冷却水を 5 μm のフィルターでろ過し、冷却水中のアメーバ等の原生動物類やバイオフィルムを除去した後、と同様に遊離塩素の殺菌効果を調査した。

#### 上澄み置換条件

実際の冷却水を冷却遠心 (6400 × g, 30 min) し、沈殿物を pH7.0 リン酸緩衝液に懸濁して、冷却水の水質 (pH, 各種イオン類) の影響を取り除いた後、と同様に塩素の殺菌効果を求めた。

#### 培養菌株条件

実際の冷却水から培養法により分離したレジオネラ属菌の菌株を pH7.0 リン酸緩衝液に懸濁して、と同様に塩素の殺菌効果を求めた。

### 4. モデル冷却水系を用いた各種殺菌剤によるレジオネラ属菌抑制効果の評価

アクアス(株)つくば総合研究所(茨城県つくば市)の研究棟一階屋外南側テラスに、冷却塔を模擬した循環式モデル冷却塔を設置して、各種殺菌剤を使用してレジオネラ属菌の抑制効果を評価した。モデル冷却塔は保有水量 60L, 循環水量約 200L/時間, 電気ヒーターを使用して水温 30 に維持し、つくば市水を 1 日あたり 7L 補給するシステムである。処理条件は以下の 4 系統とした。

#### 無処理

#### 殺菌剤を添加しない条件

#### 遊離塩素

次亜塩素酸 Na を残留塩素濃度測定計器により制御しつつ添加して、循環水中の遊離残留塩素濃度を 0.5(又は 0.2)mg/L に維持する条件

#### 結合塩素

結合塩素剤(塩素化スルファミン酸)を連続的に添加して循環水中の全残留塩素濃度を 3mg/L に

維持する条件

#### イソチアゾリン製剤品

イソチアゾリンを主成分とする抗レジオネラ用冷却水処理剤を連続的に添加して循環水中の薬剤濃度を 200mg/L 維持する条件

モデル冷却塔は水系全体を清掃した後、2013 年 9 月 20 日から上記条件で循環運転を開始し、1 週間に一度、理化学的水質分析、レジオネラ属菌数、アメーバ数、ATP 濃度、一般細菌数、従属栄養細菌数を測定した。アメーバ数は、大腸菌塗布寒天培地に試料水を接種し 25 で 2 週間培養しプラーク数を計数した。ATP 濃度は東亜 DKK 社 ATP TESTER AF-70 を使用して測定した。一般細菌数は、日水製薬社の標準寒天培地を使用し 37 で 24 ± 2 時間培養後の菌数を測定した。従属栄養細菌数は、日水製薬社の R2A 寒天培地を使用し 20 で 7 日間培養後の菌数を測定した。

### C. 結果と考察

#### 1. 冷却水のレジオネラ属菌検出データの解析

(1) 冷却水におけるレジオネラ属菌検出率の推移及び殺菌剤の種類別検出率

2001 年 1 月から 2012 年 12 月までの冷却水の検査検体数は合計 77842 検体。2001 年が年間 3121 検体、その後増加していき 2012 年は年間 8503 検体である。これらの冷却水のレジオネラ属菌検出結果データを集計した。

冷却水の検査では、ISO 11731 に準じた方法で行った結果、GVPC 培地全体にレジオネラ属菌以外の細菌類や真菌類が発育しレジオネラ属菌の検出ができないものが 6.5% 存在したが、これらを CAT<sub>α</sub> 培地で再検査した結果、検出不能率を 0.2% に低減できており、この結果も集計に加えている。

各年毎の冷却水のレジオネラ属菌の検出率を 10 CFU/100mL 以上、及び 100 CFU/100mL 以上に分類した結果を図 1. に示す。

10 CFU/100mL 以上検出される割合は、2001 年及び続く数年は 30% 程度であり、その後漸減し 2008 年以降はおおむね 25% 以下となっている。また、100 CFU/100mL 以上検出されるものは、10 CFU/100mL 以上検出される割合よりも約 10% 低

く推移している。集計した冷却水のうち、冷却水処理剤を添加しているものは約 90%であるが、薬剤による冷却水処理を行なってもレジオネラ属菌が検出される実態が明らかとなった。

冷却水の殺菌剤の種類別にレジオネラ属菌数分布を集計した結果を図 2. に示す。殺菌剤の種類は、5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリル-3-オンに代表されるイソチアゾリン系、4 級アンモニウム塩化合物等のカチオン系、1-5-ペンタンジアル(グルタルアルデヒド)、及び塩素系(遊離残留塩素タイプ及び結合塩素タイプ)に分類した。レジオネラ属菌検出率は殺菌剤無処理が 53.1%、イソチアゾリン系が 19.2%、カチオン系が 21.9%、グルタルアルデヒドが 9.7%、塩素系が 55.0%であった。無処理の冷却水と比較すると、有機系殺菌剤処理ではレジオネラ属菌の検出率は明らかに減少しており、冷却水の有機系殺菌剤処理はレジオネラ属菌汚染防止のための一定の効果が認められる。但し、有機系殺菌剤で処理していてもレジオネラ属菌が検出されている。その要因としては殺菌剤の注入量不足や殺菌剤の消費、分解等によって、冷却水系内の殺菌剤濃度が有効濃度以上に保たれていないことが考えられる<sup>6)</sup>。

一方、塩素系では無処理と同等以上(55.0%)のレジオネラ属菌が検出されている。また、無処理と比較して 10000 CFU/100mL 以上の高菌数のレジオネラ属菌が検出される検体の割合が 2.9%から 13%に上昇している。今回の解析結果では、塩素系殺菌剤は冷却水系のレジオネラ属菌抑制効果が認められなかった。

## (2) 塩素処理レジオネラ属菌の種別調査

冷却水から検出したレジオネラ属菌の菌種・血清群別を処理法別に集計した結果を、図 3. に示す。

無処理は殺菌剤を無添加の冷却水であり、29 検体から 252 株を採取して菌種・血清群別を検査した。遊離塩素処理は 6 試料 57 株、結合塩素処理は 24 試料 184 株の菌種・血清群別を検査した。

無処理では *Legionella pneumophila* SG1 の割合が 46%であるが、結合塩素処理では 73%となっており菌相が変化している。遊離塩素処理では *Legionella pneumophila* SG1 の割合は無処理と同

じ 46%であるが、SG6 が 28%存在し、無処理・遊離塩素処理に比較して高くなっている。

この結果より、*Legionella pneumophila* SG1 及び SG6 が塩素剤(結合型、遊離型)に対して抵抗性が高いことが考えられた。

## 2. 培養法と EMA-q PCR 法によるレジオネラ属菌の菌種調査

無処理冷却水(ctwA)、イソチアゾリン処理冷却水(ctwB、ctwC)の培養法によるレジオネラ属菌検出結果(菌数と菌種の同定)、および EMA-q PCR 法による *Legionella* DNA、*Legionella pneumophila* DNA の検出結果を表 1. に示す。培養法では、 $2.9 \times 10^2$  CFU/100mL ~  $7.6 \times 10^4$  CFU/100mL のレジオネラ属菌が検出され、その殆ど(97~100%)が *Legionella pneumophila* であった。これに対して、EMA-q PCR 法による DNA 定量値から求めた *Legionella pneumophila* の存在比率は、3~13%であった。

各冷却水についてクローンライブラリー解析(解析したクローン数は 51~62)を行なった結果では、*Legionella pneumophila* クローン数の割合は 2~11%であり、*Legionella pneumophila* 以外のクローン数は 10 種類以上あり、系統樹上(図 4.)ではそのほとんどが既存種のクラスターに属さなかった。

この結果から、冷却水中には培養法で検出されず、既存種に分類されないレジオネラ属菌の生菌が多く存在することが示唆された。

## 3. 塩素処理冷却水のレジオネラ属菌に対する塩素剤の殺菌試験結果

実際に塩素系殺菌剤で処理をしており、レジオネラ属菌が検出された冷却水 6 試料を用いて各種条件で次亜塩素酸 Na を添加して殺菌試験した結果を表 2. に示す。表中の数字は、初期遊離塩素濃度 5 (mg/L) と、菌数が 3 桁減少するのに要した時間(分)を乗じたものである。

従来<sup>7)</sup>の報告では、遊離塩素によるレジオネラ属菌の殺菌効果は、(濃度 × 3 桁減少時間)が 0.3 となっている。表 3. には、実冷却水のレジオネラ属

菌数，アメーバ数，他の水質を示す．

以下，表 2. のデータを解説する．

#### 実機のまま

表中カッコ内の数字は，30 分後の遊離残留塩素濃度である．試料により残留塩素濃度は異なるが，FS，FM，KH のように高濃度残留していても殺菌に要する時間が従来報告よりもはるかに高いことがわかる．すなわち，塩素処理した実冷却水中のレジオネラ属菌は遊離残留塩素に対して高い抵抗性を示すことがわかった．

#### 5 μmろ過条件

ろ過処理により原生動物類やバイオフィルムを取り除いた場合も，数値は実機のままである．前記で示された塩素抵抗性が，原生動物類やバイオフィルムの存在に由来しないと判断された．

#### 上澄み置換条件

冷却水の水質を pH7.0 のリン酸緩衝液に置き換えたものである．数値は実機のままに比較して小さくなっている傾向が認められる．これは，実冷却水の pH が FS を除き 8.0 以上の弱アルカリ性であり，本条件では pH7.0 となったことで遊離残留塩素の殺菌効果が高まったためと判断する．この場合も，文献の値ほど小さくならず，レジオネラ属菌の塩素抵抗性に関して pH 以外の塩類濃度などの寄与は大きくないと考えられる．

#### 培養菌株条件

一旦，培地上に発育したレジオネラ属菌株に対して遊離残留塩素の殺菌効果は高く，接触後直ちに殺菌され，濃度×3 桁殺菌時間は 0.5 未満となった．この値は，従来の文献データと同様である．

以上の結果から，実際の塩素処理冷却水に存在するレジオネラ属菌は，その細菌自体が遊離残留塩素に対する抵抗性を有しており，その抵抗性は同じ菌株であっても培地上で培養されることで無くなることが明らかになった．

環境中でのレジオネラ属菌の増殖にはアメーバ類が大きく関わっているが，Schook らは *Acanthamoeba polyphaga* に感染して増殖した *Legionella pneumophila* は BCYE $\alpha$  寒天培地で増殖した *L. pneumophila* と比べて塩素剤に対する抵抗性が 64 倍上昇したと報告している<sup>8)</sup>．また，

Chang らは *Hartmannella vermiformis* に感染して増殖した *L. pneumophila* は *A. castellanii* に感染して増殖した *L. pneumophila* よりも塩素剤に対して抵抗性が上昇したと報告している<sup>9)</sup>．

すなわち，環境水中のレジオネラ属菌はアメーバを介して増殖していることにより，塩素剤が効きにくくなっている可能性が考えられた．

#### 4．モデル冷却水系を用いた各種殺菌剤によるレジオネラ属菌抑制効果の評価

試験に使用したモデル冷却塔は 4 系統であり，外観写真を図 5. と図 6. に示す．

2013 年 9 月 20 日から 4 通りの処理条件で運転しており 2014 年 2 月 6 日まで，年始を除き 1 週間ごとに循環水を採水して，レジオネラ属菌数，アメーバ数，ATP 濃度，一般細菌数，従属栄養細菌数を検査・測定した．処理条件は，研究方法の項に記載した ~ であるが，遊離塩素処理は試験開始後 11 週目の 12 月 4 日まで 0.5mg/L 維持，12 月 5 日以降は 0.2mg/L 維持とした．

微生物等の検査結果を時系列的にグラフ化したものを，図 7. から図 11. に示す．

レジオネラ属菌は，無処理では運転開始後 1 週間目の採水で 10 CFU/100mL 検出され，2 週間目では  $2.6 \times 10^3$  CFU/100mL に増加，その後も定着し続けた．結合塩素処理では全残留塩素濃度 3mg/L を維持したところ 2 週間目までは不検出，3 週間目に  $3.8 \times 10^4$  CFU/100mL と非常に高いレジオネラ属菌が検出された．その後も，継続して検出されている．遊離塩素処理は残留濃度を常時 0.5mg/L (11 週目以降 0.2mg/L) 維持しており，14 週目の 12 月 26 日に 10 CFU/100mL 検出されたが，それ以外は不検出を維持している．イソチアゾリン処理は，試験開始以降 20 週目の 2 月 6 日まで継続して不検出を維持している．

アメーバについても，レジオネラと同様の傾向である．無処理と結合塩素処理ではレジオネラ属菌の検出に先立ってアメーバが検出されており，アメーバがレジオネラ属菌の増殖を支持していることが示されている．遊離塩素処理とイソチアゾリン処理は，いずれもアメーバ数を不検出あるいは

は検出しても低い値に抑制している。  
ATP と従属栄養細菌数は類似の挙動を示しており、無処理と結合塩素処理では期間中、常時高い値を示している。遊離塩素処理では0.5mg/L維持時は低い値で推移したが、維持濃度を0.2mg/Lに低下させてからはやや高い値を示すようになった。イソチアゾリン処理は11週目の12月5日付近から高い値を示すようになった。この時、わずかながらピンク色のバイオフィルムの付着が認められるようになり、イソチアゾリンの有効成分の残留濃度が低下した。

一般細菌数は、遊離塩素処理で維持濃度を0.5から0.2mg/Lに低下させたと同時に菌数の増加が認められた。無処理とイソチアゾリン処理は、一般細菌数が高めに推移し、結合塩素処理の一般細菌数は相対的に低い値であった。

この結果より、処理方法にもよるが冷却水のレジオネラ属菌の検出挙動は、一般細菌数や従属栄養細菌数とは相関がないことがわかった。レジオネラ属菌の検出は、アメーバとは関連しており、アメーバを増殖させないことが冷却水のレジオネラ属菌抑制に有効であることが示された。処理の種類別では、結合塩素処理はレジオネラ属菌を抑制できず、むしろ無処理よりも高い菌数となった。遊離塩素処理は、常時遊離塩素濃度を維持することによりアメーバ、レジオネラ属菌を抑制した。イソチアゾリン処理は、安定的にアメーバ、レジオネラ属菌を抑制した。

実際の冷却水では、遊離塩素処理でレジオネラ属菌が高い菌数検出されるので、本モデル試験との相違、例えば一時的に残留塩素濃度を維持できない状況の存在など、を検討していく必要がある。

#### D. 結論

2012年の時点で、薬剤により水処理を行っているものも含めて、約22%の冷却塔水からレジオネラ属菌が10 CFU/100mL以上検出されている。

冷却水処理に使用する殺菌剤は、種類によりレジオネラ属菌抑制効果が異なり、検査結果の集計から塩素系殺菌剤はレジオネラ属菌の抑制に有効でないデータとなっている。

塩素剤処理の冷却水から検出されるレジオネラ属菌は、無処理に比べて菌相が変化しており *Legionella pneumophila* SG1 や SG6 の割合が多くなっている。これらの血清群は、塩素剤に対する抵抗性が高い可能性がある。

冷却水中のレジオネラ属菌の菌種を培養法とEMA-qPCR法で調査した結果、冷却水には既存種に分類されないレジオネラ属菌の生菌が多く存在することが示唆された。このことは、培養法とEMA-qPCR法の検査結果の一致程度を評価するうえで勘案すべきである。

塩素処理した冷却水に存在するレジオネラ属菌は、塩素剤に対する抵抗性が培地上で発育した菌よりも高くなっている。塩素抵抗性の要因を調査した結果、アメーバ内で増殖したレジオネラ属菌の塩素耐性が高いことが考えられた。

モデル冷却塔を用いて、実際の冷却水と同様の運転条件を再現した。殺菌剤の種類別レジオネラ属菌抑制効果を評価した結果、結合塩素剤の常時3mg/L維持は無処理と同様にレジオネラ属菌が増殖し、菌数は無処理よりも高くなった。遊離塩素を常時0.2mg/L以上維持した場合とイソチアゾリン製剤処理は、試験開始後20週間にわたりレジオネラ属菌を抑制した。

- 以上 -

#### E. 参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：感染症発生動向調査 (IDWR) 第9週通巻第15巻第9号 p10 (2013)
- 2) 井上浩章, 高間朋子, 石間智生, 縣邦雄：各種水利用設備のレジオネラ属菌検出実態, 防菌防黴誌. Vol. 41, NO. 12, pp659-661 (2013)
- 3) 財団法人ビル管理教育センター：レジオネラ症防止指針(第3版), p4 (2009)
- 4) 倉文明, 前川純子：レジオネラ症 - 最近の多様な感染源 IASR Vol. 34 pp169-170 (2013)

- 5) Inoue, H., Noda, A., Takama, T., Ishima, T., and Agata, K. :Enhanced antifungal effect of the selective medium for the detection of *Legionella* species by a combination of cycloheximide, amphotericin B and thiabendazole. *Biocontrol Sci.*, **11**, pp69-74(2006)
- 6)財団法人ビル管理教育センター：第3版レジオネラ症防止指針, p87(2009)
- 7) 縣邦雄, 石間智生, 三山義輝, 青木哲也, 田中俊光, 藤垣妙子, 遠藤卓郎:レジオネラ属菌に対する有機系殺菌剤の殺菌性能 ビルと環境 N092 pp84-88(2001)
- 8)Schook, P., Rajan, J., and Ogawa, Y. Replication of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba polyphaga* results in an increased tolerance to bleach. 日本防菌防黴学会第39回年次大会要旨集, p124 (2012)
- 9)Chang, C. -W., Kao, C. -H., and Liu, Y. -F. Heterogeneity in chlorine susceptibility for *Legionella pneumophila* released from *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *J. Appl.*

*Microbiol.*, **106**, pp97-105 (2009)

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- 1) 井上浩章, 高間朋子, 石間智生, 縣邦雄: 各種水利用設備のレジオネラ属菌検出実態, 防菌防黴誌. Vol.41, NO.12, pp659-661(2013)

##### 学会発表

- 1) 井上浩章, 藤村玲子, 縣邦雄, 太田寛行: エチジウムモノアジド処理 PCR 法による環境水中のレジオネラ属菌の検出, 第29回日本微生物生態学会, 鹿児島(2013)
- 2) 井上浩章, 小野寺順子, 石間智生, 縣邦雄: 冷却水のレジオネラ属菌に対するNaClOの殺菌効果調査, 日本防菌防黴学会第40回年次大会, 大阪(2013)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

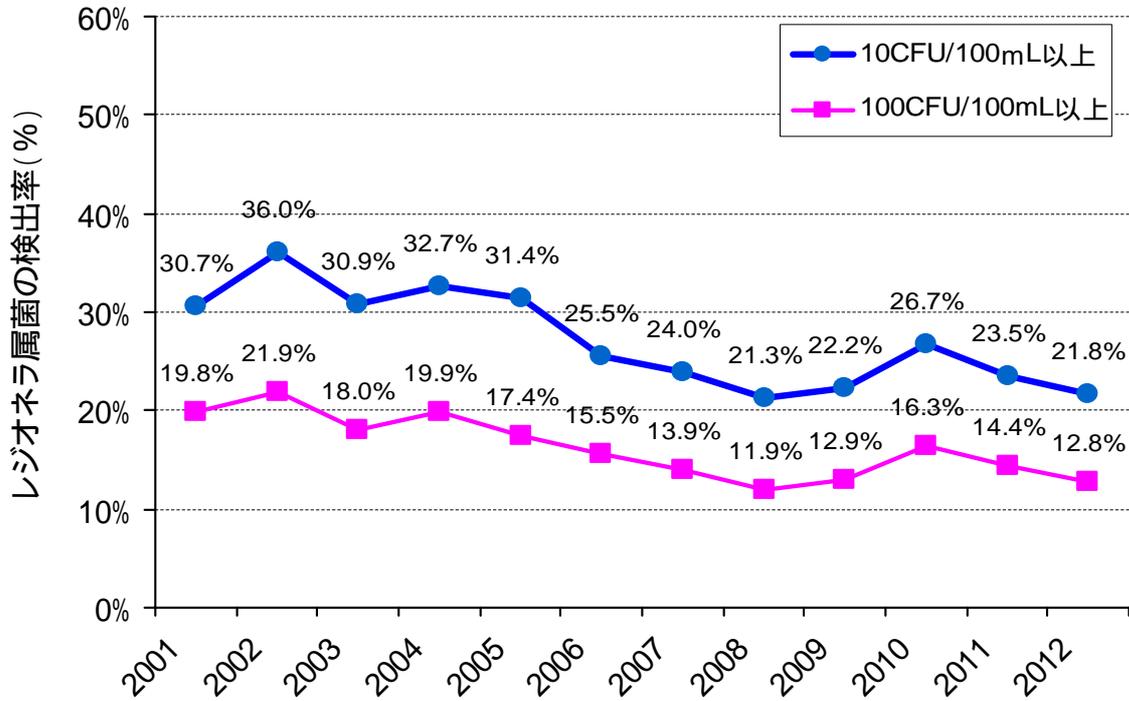


図1. 冷却水のレジオネラ属菌検出率の年別推移

表1. 培養法及びEMA-qPCR法による冷却水からのレジオネラ属菌検出結果

Sample	Plate culture		EMA-qPCR		
	<i>Legionella</i> counts (CFU/100ml)	Identification of <i>Legionella</i> species (%)	<i>Legionella</i> DNA (pg/liter) (A)	<i>L. pneumophila</i> DNA (pg/liter) (B)	% <i>L. pneumophila</i> (B/A×100)
ctw A	$1.2 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i> (100)	60	7.5	13
ctw B	$2.9 \times 10^2$	<i>L. pneumophila</i> (97), <i>Legionella</i> sp. L-29 (3)	4600	140	3
ctw C	$7.6 \times 10^4$	<i>L. pneumophila</i> (100)	9000	700	8

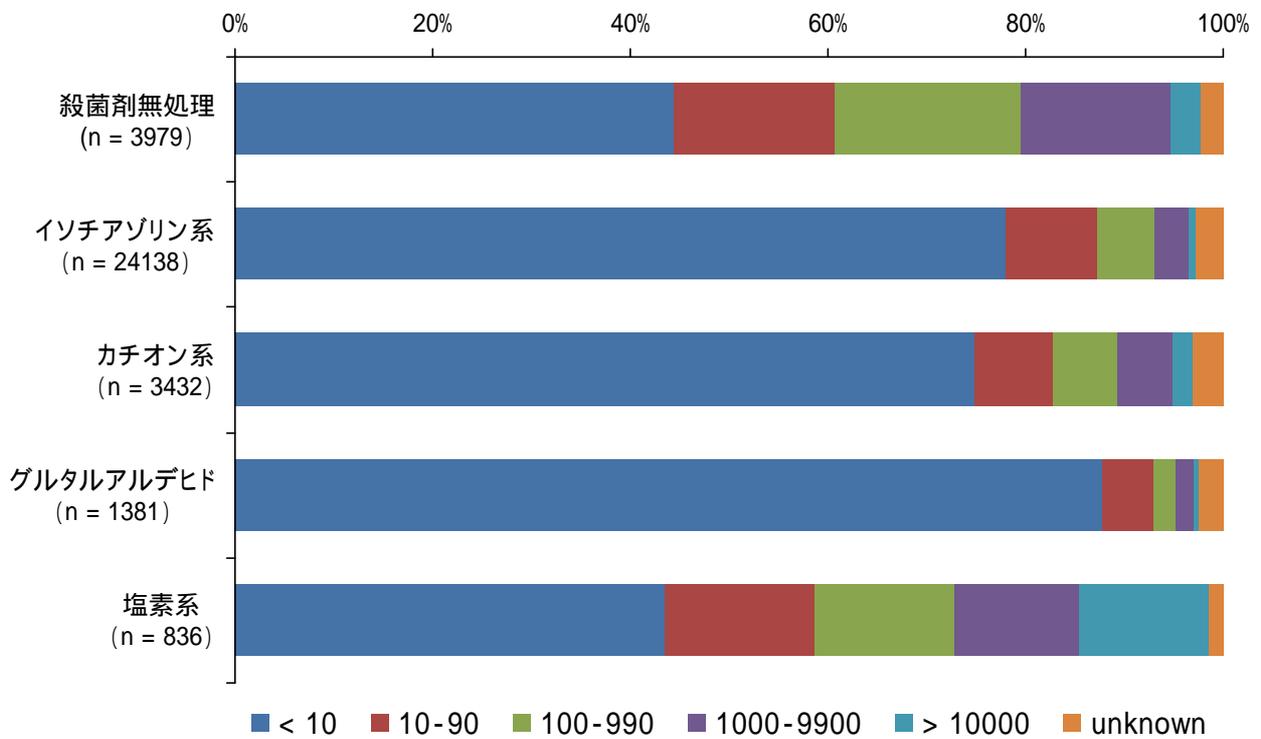


図2. 殺菌剤の種類別レジオネラ属菌の菌数分布  
(凡例は、レジオネラ属菌数の範囲を示す 単位：CFU/100mL)

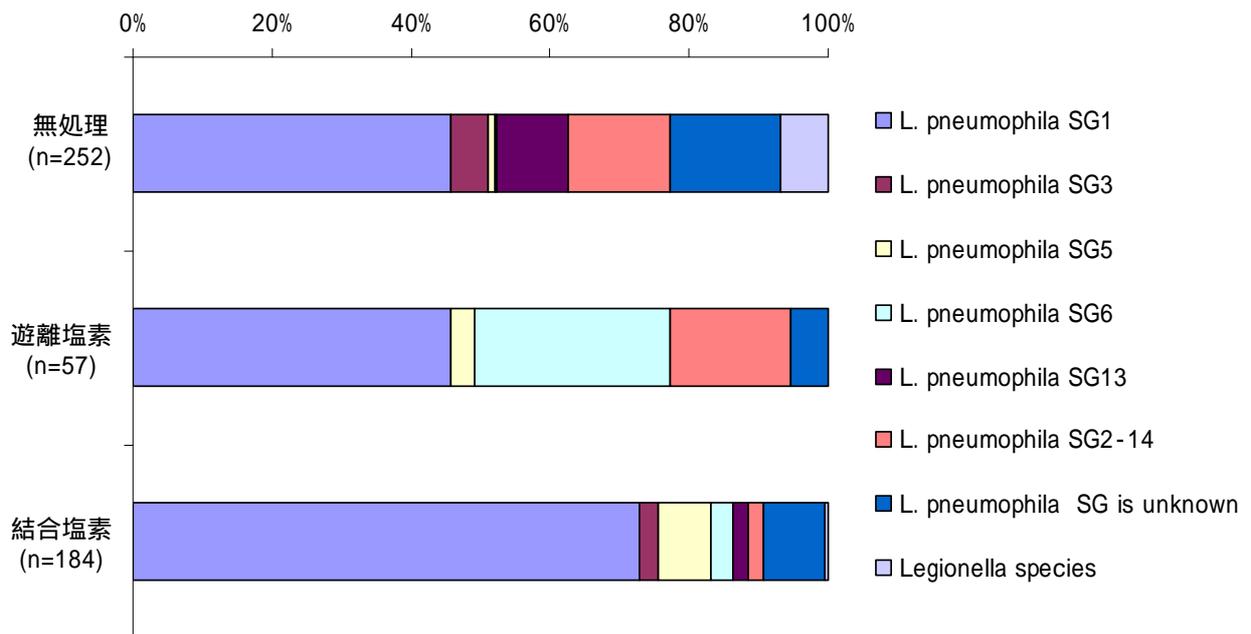


図3. 塩素系処理冷却水のレジオネラ属菌の種類



表2. 実冷却水のレジオネラ属菌を各種条件で次亜塩素酸 Na を添加して殺菌試験した結果

実冷却水		初期遊離塩素5(mg/L) × 3桁減少時間(分)			
試料	pH	実機のまま	5 μmろ過	上澄み置換	培養菌株
SA	8.8	90(2.5)	-	50	<0.5
DK	8.2	22(1.5)	21	8	<0.5
FS	7.0	50(3.5)	-	20	<0.5
FM	8.0	>300(3.5)	>300	100-150	<0.5
DU	8.3	>300(0.8)	-	-	-
KH	8.3	75(5)	-	-	-
		( ) は30分後の残留塩素濃度			

表3. 実冷却水のレジオネラ属菌数，アメーバ数，他の水質

試料	レジオネラ	アメーバ	TOC	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	濁度
	(CFU/100ml)	(PFU/100ml)	(mg/L)	(mg/L)	
SA	7400	23000	15	0.4	4
DK	200000	< 2	4.3	0.2	0.7
FS	2500	200	7.8	< 0.1	8
FM	5800	2500	5	< 0.1	0.6
DU	24000	9000	23	0.1	6.6
KH	1900	1900	4.6	< 0.1	1



図5. モデル冷却塔の設置状況

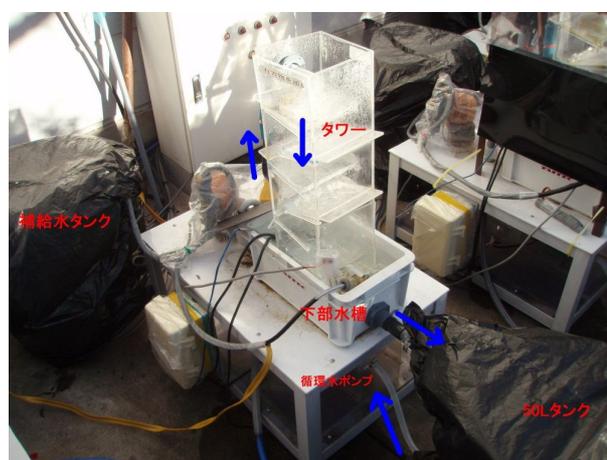


図6. モデル冷却塔の構成

(タンク類、タワー部を黒く覆っているのは、藻類の繁殖を防止するためである)

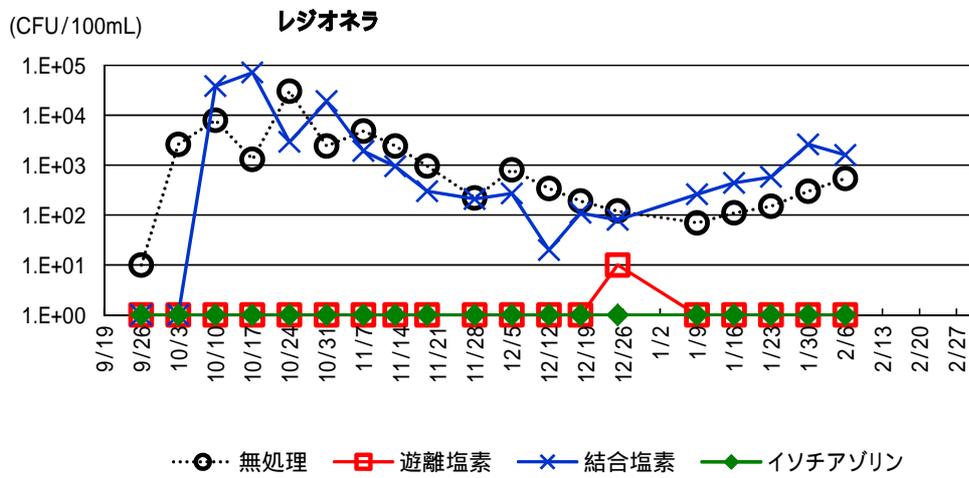


図 7. モデル冷却水の各種処理条件でのレジオネラ属菌の推移

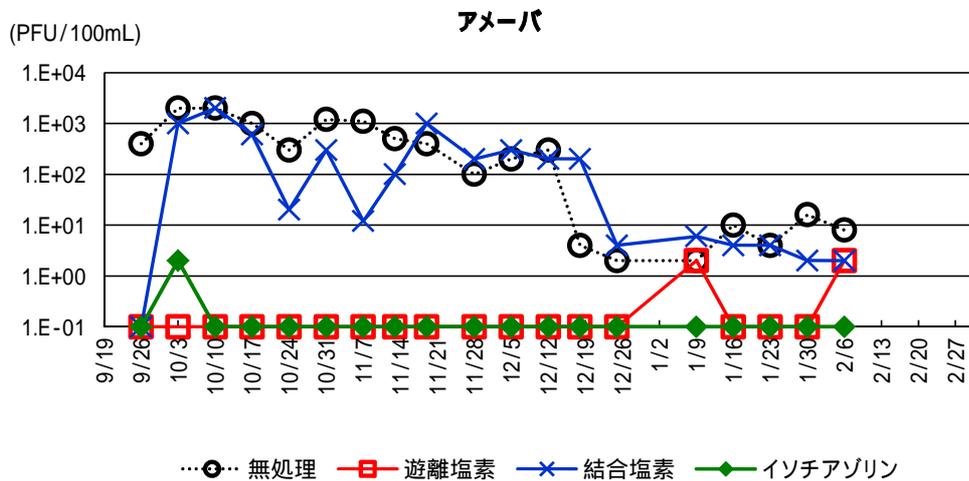


図 8. モデル冷却水の各種処理条件でのアメーバ数の推移

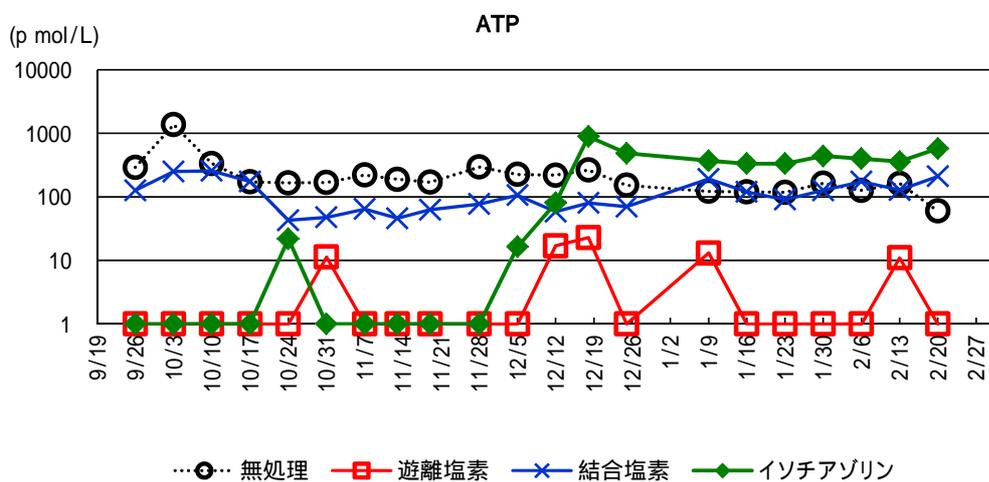


図 9. モデル冷却水の各種処理条件でのATP値の推移

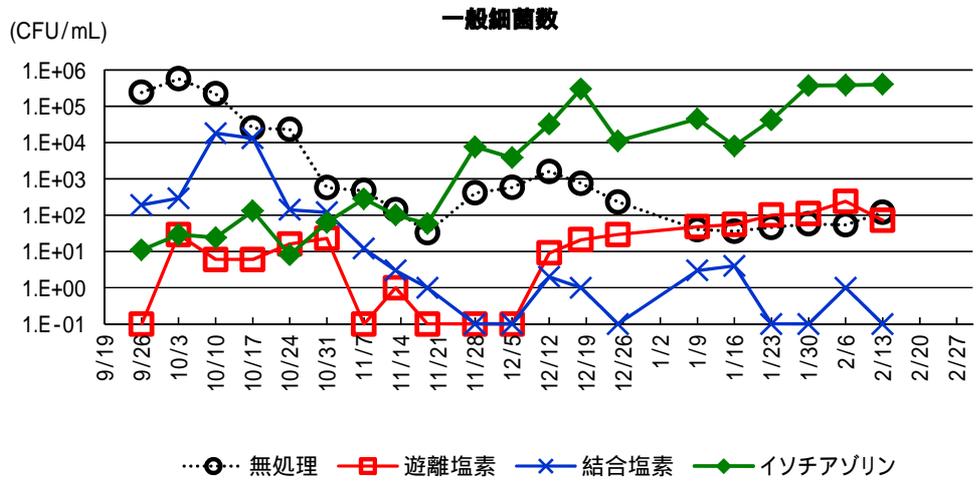


図 10. モデル冷却水の各種処理条件での一般細菌数の推移

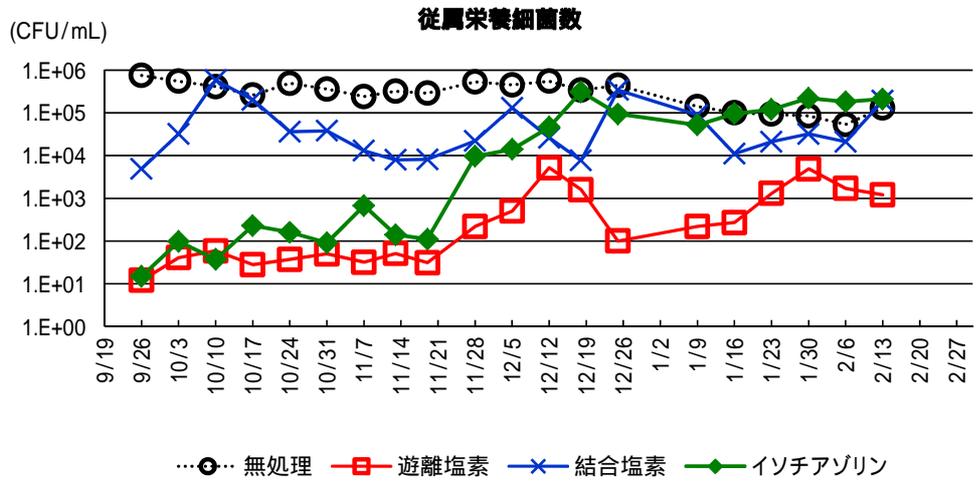


図 11. モデル冷却水の各種処理条件での従属栄養細菌数の推移