

モノクロラミンを概ね 3mg/L の濃度維持を目標にタイマーによる自動機械注入を行った。

静岡市内の施設 0 は 1 日の平均利用者が 319 人の循環式露天風呂で、泉質はナトリウム - 炭酸水素塩、pH9.0 であった。試験は 3 か月実施しその間 6 回採水し、検査に供した。

浜松市内の施設 H は前述 2- (1) 及び 3- (1) と同様の施設である。試験は 5 ヶ月間実施した。

## (2) アンモニウム源の検討

上記の循環式入浴施設において、モノクロラミンを生成するための薬剤の塩素剤とアンモニウムのモル比を 1:2.5 から 1:1.5 に低減するとともに、アンモニウム源を従来の塩化アンモニウムより低価で入手しやすい硫酸アンモニウムに切り替えて消毒効果の維持について検証した。

## C. 結果

### 1 鉄イオンを含む泉質におけるモノクロラミン消毒効果の検証

#### (1) 鉄泉の源泉水におけるモノクロラミンの濃度安定性

全鉄イオン  $Fe^{2+}+Fe^{3+}$ :10mg、pH6.9、アンモニア態窒素 1mg/L を含む源泉水について、次亜塩素酸ナトリウムとモノクロラミン添加後の、塩素濃度の経時変化を図 2 及び図 3 に示した。

次亜塩素酸ナトリウム 5 mg/L 添加では遊離塩素は直ちに結合塩素に変化した。10mg/L 添加では不連続点 (ブレイクポイント) 塩素処理に相当する全残留塩素濃度の大幅な減少がみられた (図 2)。モノクロラミンでは 5 mg/L 及び 10mg/L 添加ともに全塩素濃度は安定して維持された (図 3)。

#### (2) 循環式入浴施設 (営業施設) における検証試験

前述の濃度安定性試験で、モノクロラミン添加時の濃度減少がほとんどない源泉水を使用する循環式浴槽におけるモノクロラミン消毒検証試験の結果を表 1 に示した。モノクロラミン消毒中の浴槽水からレジオネラやアメーバの検出はなく、塩素臭の原因であるトリクロラミンも検出されず、消毒副生成物の生成も少なかった。一方、

遊離塩素管理時にはレジオネラ属菌が 20 CFU/100mL、一般細菌数が 9,500 CFU/mL 検出された。

### 2 気泡発生装置使用浴槽におけるモノクロラミン消毒効果の検証

実証試験を行った 3 施設の試験結果を表 2 に示した。

施設 T ではモノクロラミン消毒中の浴槽水からレジオネラやアメーバの検出はなく、塩素臭の原因であるトリクロラミンも検出されず、消毒副生成物の生成も遊離塩素管理時より少なかった。

施設 R においても、浴槽水からレジオネラやアメーバの検出はなかった。消毒副生成物も総じて遊離塩素管理より少なかった。

施設 H では、モノクロラミン消毒中の浴槽水からレジオネラやアメーバの検出はなく、一般細菌数も低い値で推移した。遊離塩素管理時に 0.028 mg/L 検出された塩素臭の原因であるトリクロラミンも検出されず、消毒副生成物の生成も極めて少なかった。

また気泡発生装置を有する浴槽と同じ循環系等で装置を有さない浴槽のモノクロラミン添加量及び維持濃度に有意な差は認められなかった。

なお、試験期間中いずれの施設からも塩素臭の発生報告はなかった。

### 3 モノクロラミン消毒の長期運用試験

#### (1) タイマー注入方式装置の導入

表 3 に H 施設と 0 施設の長期運用試験の結果を示した。モノクロラミンの系内濃度は、両施設とも一時的な濃度の増減はあったが、目標とした 3mg/L を概ね維持していた。微生物検査では、両施設ともレジオネラ属菌及びアメーバは期間中検出されなかった。施設 0 では従属栄養細菌の増減が激しく減少傾向は認められなかった。施設 H の一般細菌は、極めて少ない数にとどまった。

H 施設の 5 ヶ月の試験期間中 1 か月間の系内濃度維持状況と宿泊者数の関係を図 4 に示した。1 日のモノクロラミン添加量は 7~12mg/L で、宿泊者数の増減による系内濃度への影響は認められ

ず、濃度の増減は補給湯量の増減によることがわかった。

## (2) アンモニウム源の検討

アンモニウム源を昨年まで使用していた塩化アンモニウムから硫酸アンモニウムに変え、そのモル比（塩素：アンモニア）を1:2.5から1:1.5に低減させても、モノクロラミン等の濃度、消毒効果に差はみられなかった。

## D. 考察

### 1 鉄イオンを含む泉質におけるモノクロラミン消毒効果の検証

#### (1) 鉄泉の源泉水におけるモノクロラミンの濃度安定性試験

浴槽水におけるモノクロラミンの濃度安定性を事前に知ることは、本消毒方法導入の可否を判断する上で有用な情報となる。本研究においては、まず、実験室レベルで実証試験を行う源泉水にモノクロラミンや遊離塩素を加え経時的濃度変化を確認して、モノクロラミン消毒適用の可否を調査後、実証試験を行うという試験スキームを構築した。本スキームでモノクロラミンの濃度安定性が確認され、実証試験に向けた有用なデータを得ることができた。今後、このスキームの活用が期待される。

鉄イオンを含むT施設の源泉水を用いて本試験を実施した結果、遊離塩素10mg/Lの添加で全塩素濃度が検出されなくなったことから、本泉質では遊離塩素10mg/Lの注入でブレイクポイントに達したものと思われる。一方、モノクロラミンは、5mg/Lの添加で良好な安定性を示したことから、消毒効果が十分期待できると考えられた。

なお、この予測は後述する実証試験の成績からも支持された。

#### (2) 循環式入浴施設（営業施設）における検証試験

実証試験の結果、微生物検査の状況を見ると、遊離塩素管理時には、*L. pneumophila* SG5が検出されたが、モノクロラミン管理時にはレジオネラ属菌は検出されなかった。しかしながら、レジオネラ属菌由来の遺伝子は検出されたことから、モ

ノクロラミンが浴槽水中に存在していたレジオネラ属菌を殺菌したことが、強く示唆された。また、一般細菌数もモノクロラミン管理時には激減したことから、その消毒効果が裏付けられた。

一方、理化学検査結果では、塩素臭の原因であるトリクロラミンも検出されず、消毒副生成物の生成も少なかった。

これらのことから、鉄イオンを含む泉質においては、モノクロラミン消毒で管理することでレジオネラ属菌のコントロールが可能であった。

### 2 気泡発生装置使用浴槽におけるモノクロラミン消毒効果の検証

実証試験の結果、微生物検査の状況を見ると、3施設ともモノクロラミン管理時ではレジオネラ属菌やアメーバは検出されず、その消毒効果が裏付けられた。

理化学検査結果では、塩素臭の原因であるトリクロラミンも検出されず、消毒副生成物の生成も少なかった。

加えて、施設Hで気泡発生装置設置の有無にかかわらず、モノクロラミンの失活は殆どなく、モノクロラミンの濃度維持が可能であることが示された。

これらのことから、気泡発生装置使用浴槽におけるモノクロラミン管理は安全にレジオネラ属菌のコントロールすることが可能であった。

### 3 モノクロラミン消毒の長期運用試験

#### (1) タイマー注入方式装置の導入

実証試験の結果、モノクロラミン濃度はタイマー注入方式においても安定して維持されることが確認された。また、モノクロラミンの系内濃度補給湯量の増減に影響を受けるが、利用者数には影響されないことが示唆された。本装置には湯量補給の増減に対応できる追加添加機能や添加休止機能付きのものが必要である。

#### (2) アンモニウム源の検討

本研究において、モノクロラミン生成のためのアンモニウム源を塩化アンモニウムから硫酸アンモニウムに、塩素剤：アンモニウムのモル比を

1:2.5 から 1:1.5 に変更して、濃度安定性と消毒効果について検証したところ、モノクロラミン濃度は目標とする 3mg/L を維持することが確認された。また、レジオネラ属菌及びアメーバも検出されず、従来の消毒効果の保持が可能であることが示唆された。また、消毒副生成物の発生もほとんど認められず良好であったことから、アンモニウム源を変更することは可能であり、若干ではあるが、経済性の向上を果たした。

#### E. 結論

遊離塩素管理では十分なレジオネラ属菌殺菌効果が期待できない鉄イオンを含む泉質において、モノクロラミン管理の実証試験を実施し、その有用性を確認した。

また、実験室レベルで予めモノクロラミンや遊離塩素の経時的濃度変化を確認したうえで実証試験を行うという試験スキームを構築した。

気泡発生装置を使用している浴槽においても、モノクロラミン管理は安全にレジオネラ属菌をコントロールすることが可能であることを確認した。

長期間にわたるモノクロラミン管理においては、簡便なタイマー注入方式装置が対応可能であることが示唆された。加えて、アンモニウム源としての硫酸アンモニウムの有用性を確認し、モノクロラミン消毒法導入の実用化に向けた結果が得られた。

#### F. 参考文献

- 1) 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・測定の実証, 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 (研究代表者、倉 文明)
- 2) 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 縣 邦雄, 遠藤卓郎: モノクロラミン消毒による浴槽レジオ

ネラ属菌の衛生対策, 保健医療科学 59 (2) 109-115 (2010)

- 3) 縣邦雄, 田栗利紹, 杉山寛治, 神澤啓: 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・測定の実証, 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 (研究代表者、倉 文明)
- 4) 佐原啓二, 縣邦雄, 神野透人, 八木田健司, 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 片山富士男, 富田敦子, 江口大介, 市村祐二, 道越勇樹, 八木美弥: 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, モノクロラミン消毒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, 平成 24 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 (研究代表者、倉 文明)
- 5) 縣邦雄, 青木信和, 市村祐二, 江口大介, 杉山寛治, 泉山信司, 小坂浩司, 片山富士男, 和田裕久, 富田敦子: レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究, アンモニウムイオン、ヨウ化物イオン等が塩素剤の安定性に与える影響, 平成 25 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 (研究代表者、倉 文明)
- 6) 佐原啓二, 杉山寛治, 神澤啓: 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, モノクロラミン消毒による入浴施設の衛生管理 静岡県内の温泉入浴施設における注入・測定方法の実証, 平成 24 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 (研究代表者、倉 文明)

#### G. 研究発表

##### 論文発表

なし

#### 学会発表

- 1) 杉山寛治、縣邦雄、江口大介、市村祐二、神野透人、小坂浩司、泉山信司、八木田健司、片山富士男、和田裕久、富田敦子、長岡宏美、田中慶郎、遠藤卓郎、倉文明：種々の温泉水におけるノクロラミン消毒効果と高濃度洗浄の検証，日本防菌防黴学会第 41 回年次大会，東京（2014）
- 2) 青木信和、江口大介、市村祐二、杉山寛治、泉山信二、倉文明：温泉水に含まれる成分がモノクロラミンに与える影響の確認，日本防菌防黴学会第 41 回年次大会，東京（2014）

#### 研修会

- 1) 杉山寛治：レジオネラ症防止対策講演会，富

山県主催，2014 年 9 月 9 日，富山市

- 2) 杉山寛治：レジオネラ対策講習会，東京都多摩府中保健所主催，2015 年 2 月 18, 23 日，東京都府中市

#### 刊行物

杉山寛治：モノクロラミン消毒による浴槽水の衛生対策，ビルと環境，No.148，34-41（2015）

- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）  
なし



施設H

- ・泉質：ナトリウム - カルシウム塩化物泉、pH 8.2  
アンモニア態窒素 0.4mg/L 含む
- ・浴槽容量：15 m<sup>3</sup>
- ・利用者数：平均 554 人/日



施設R

- ・井戸水の沸かし湯使用
- ・浴槽容量：8 m<sup>3</sup>
- ・ボタン操作による高濃度モノクロアミン洗浄実施
- ・利用者数：平均 100 人/日



施設T

- ・泉質：鉄泉  
(全鉄イオン Fe<sup>2+</sup> + Fe<sup>3+</sup> :10mg/L)  
pH 6.9  
アンモニア態窒素 1 mg/L 含む
- ・浴槽容量：5 m<sup>3</sup>
- ・利用者数：20 人/日

図 1 実証試験を実施した気泡発生装置設置浴槽の概要

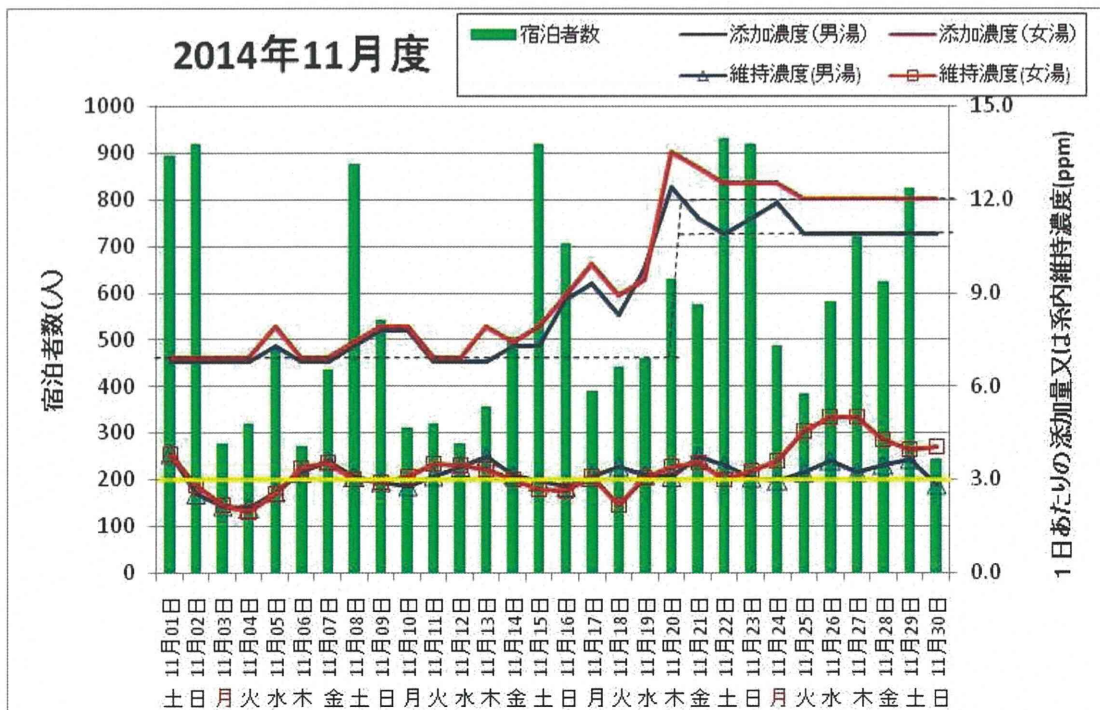


図 4 タイマー注入方式によるモノクロアミンの系内濃度維持と宿泊者数 (施設 H)

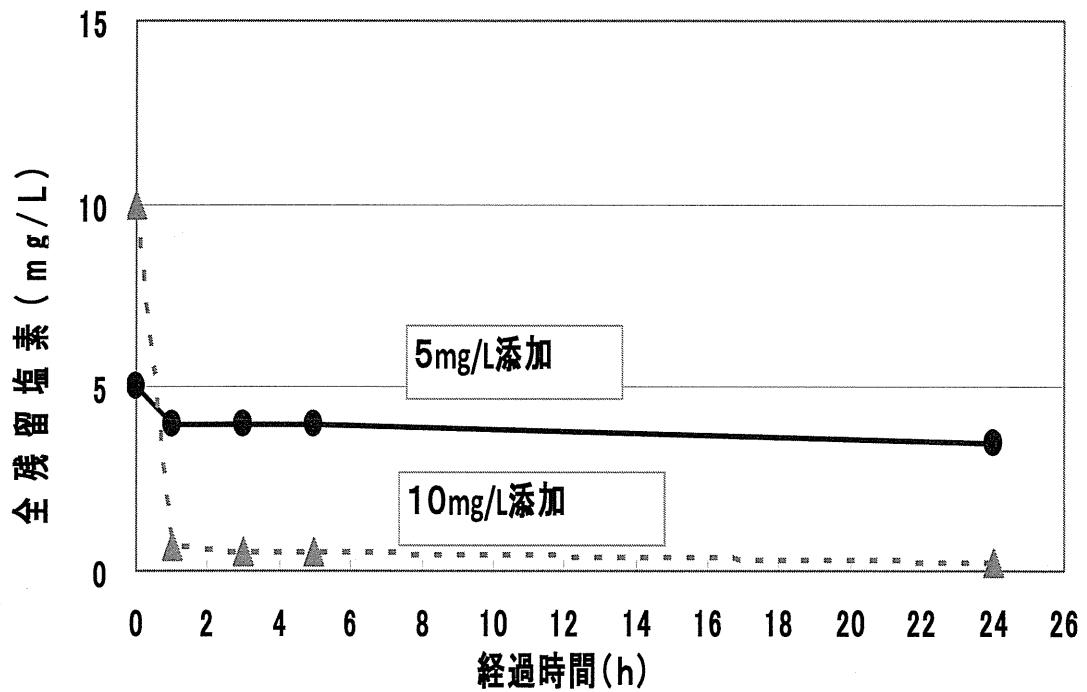


図2 鉄イオン含有温泉に次亜塩素酸Na添加時の全塩素濃度の変化  
(施設 T 源泉)

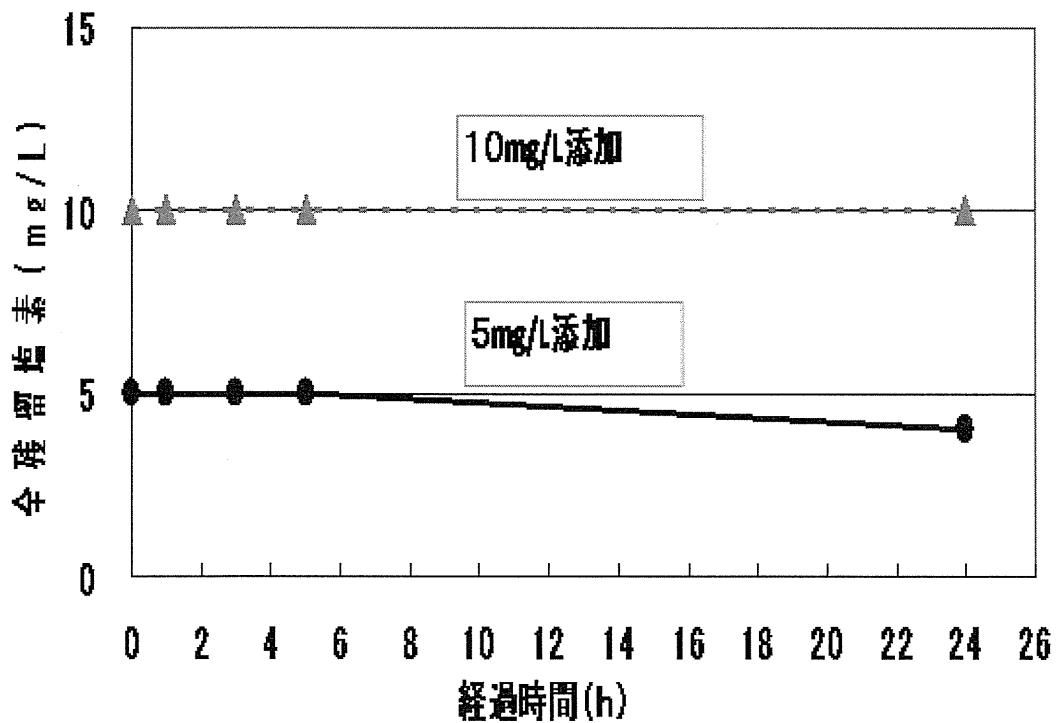


図3 鉄イオン含有温泉にモノクロラミン添加時の全塩素濃度の変化  
(施設 T 源泉)

表1 鉄イオンを含む泉質の循環式浴槽水の消毒時の各種検査結果（施設T）

検査項目	遊離塩素管理時 (11/3 17:45採水)	モノクロラミン管理時 (11/4 15:30採水)	
微生物検査	レジオネラ属菌 (CFU/100mL)	20 ( <i>L. pneumophila</i> SG5)	0
	レジオネラ属菌遺伝子	陽性	陽性
	一般細菌数 (CFU/mL)	9,500	8
	アメーバ数 (個/50mL)	<1	<1
塩素濃度	モノクロラミン (mg/L)	<0.1	2
	ジクロラミン	<0.1	0.2
	トリクロラミン	<0.015	<0.015
	遊離塩素	<0.1	<0.1
消毒副生成物	Dichloroacetonitrile	0.21	-
	Bromochloroacetonitrile	-	-
	Dibromoacetonitrile	-	-
	Chloroform	1.1	0.14
	Bromodichloromethane	0.49	-
	Dibromochloromethane	0.20	-
	Bromoform	-	-
	Chloroacetic acid	0.75	1.1
	Dichloroacetic acid	5.7	6.8
	Trichloroacetic acid	-	-
	Bromoacetic acid	-	-
	Dibromoacetic acid	-	-
	Bromochloroacetic acid	-	-
Bromodichloroacetic acid	-	-	
Dibromochloroacetic acid	-	-	

—: 定量下限値未満

表2 気泡発生装置使用浴槽水におけるモノクロラミン消毒の検査結果

検査項目	施設T		施設R			施設H										
	遊離塩素管理時	モノクロラミン管理時	遊離塩素管理時	モノクロラミン管理時		遊離塩素管理時	モノクロラミン管理時									
				5日目	12日目		12日目	27日目	41日目	55日目	76日目	97日目	104日目	118日目		
レジオネラ属菌 (CFU/100mL)	20 ( <i>L. pneumophila</i> SG5)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
レジオネラ属菌遺伝子	陽性	陽性	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
一般細菌数 (CFU/mL)	9500	8	.	.	.	<1	6	3	<1	2	2	1	2	5		
アメーバ数 (個/50mL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	NT	NT	NT		
モノクロラミン (mg/L)	<0.1	2	<0.1	.	.	<0.1	1.8	.	.	.	.	.	.	.		
ジクロラミン	<0.1	0.2	0.2	.	.	0.2	<0.1	.	.	.	.	.	.	.		
トリクロラミン	<0.015	<0.015	0.018	.	.	0.028	<0.015	.	.	.	.	.	.	.		
遊離塩素	<0.1	<0.1	0.2	.	.	2	<0.1	.	.	.	.	.	.	.		
Dichloroacetonitrile	0.21	-	0.81	0.27	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.		
Bromochloroacetonitrile	-	-	-	-	.	1.5	-	.	.	.	.	.	.	.		
Dibromoacetonitrile	-	-	-	-	.	21	0.18	.	.	.	.	.	.	.		
Chloroform	1.1	0.14	5	0.94	.	0.15	-	.	.	.	.	.	.	.		
Bromodichloromethane	0.49	-	0.52	-	.	2.6	-	.	.	.	.	.	.	.		
Dibromochloromethane	0.20	-	0.16	-	.	19	-	.	.	.	.	.	.	.		
Bromoform	-	-	-	-	.	140	0.58	.	.	.	.	.	.	.		
消毒副生成物 Chloroacetic acid	0.75	1.1	7.9	12	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.		
Dichloroacetic acid	5.7	6.8	28	39	.	9.6	4.8	.	.	.	.	.	.	.		
Trichloroacetic acid	-	-	-	-	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.		
Bromoacetic acid	-	-	-	-	.	8.7	-	.	.	.	.	.	.	.		
Dibromoacetic acid	-	-	-	-	.	28	0.63	.	.	.	.	.	.	.		
Bromochloroacetic acid	-	-	-	-	.	15	-	.	.	.	.	.	.	.		
Bromodichloroacetic acid	-	-	-	-	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.		
Dibromochloroacetic acid	-	-	-	-	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.		

—: 定量下限値未満    .: 検査せず

表3 長期運用試験検査結果

検査項目	施設O						施設H										
	モノクロラミン管理時						遊離塩素管理時	モノクロラミン管理時									
	3日目	17日目	31日目	45日目	58日目	73日目		12日目	27日目	41日目	55日目	76日目	97日目	104日目	118日目		
レジオネラ属菌 (CFU/100mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10		
一般細菌数 (CFU/mL)	.	.	.	.	.	.	<1	6	3	<1	2	2	1	2	5		
アメーバ数 (個/50mL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	.	.	.		
モノクロラミン (mg/L)	4.5	3.2	3.7	4.2	4.9	5.9	<0.1	1.7	3.8	.	.	.	3.7	3.5	.		
全塩素	.	2.8	4	3	3	5	>2	1.7	3.9	4.2	3.6	3.9	3.8	3.5	3.3		
遊離アンモニア	.	2.2	2.8	2.1	0.9	2.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
遊離塩素	.	.	.	.	.	.	2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		

..: 検査せず



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）  
レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究

平成 26 年度 分担研究報告書

－ 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 生活衛生化学部第一室
研究協力者: 香川(田中) 聡子	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部第一室
田原 麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部第一室
川原 陽子	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部第一室
真弓 加織	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部第一室
高橋 淳子	桐生大学短期大学部 生活科学科
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: 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
研究分担者: 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

**研究要旨:** 昨年度の分担研究で、ヨウ素（ヨウ化物）イオンを含有する温泉では塩素消毒およびモノクロミン消毒のいずれの場合も、消毒副生成物としてヨウ素化トリハロメタン類やヨウ素化ハロ酢酸類が生じることを見出した。そこで、従前の塩素消毒時の消毒副生成物の実態を把握する目的で、源泉中のヨウ素イオン濃度が比較的高い新潟県、秋田県および静岡県内の計 11 施設を対象に、浴槽水中のヨウ素化消毒副生成物濃度および関連する水質指標の調査を実施した。その結果、2 施設でヨードホルム ( $\text{CHI}_3$ ) およびジヨードメタン ( $\text{CH}_2\text{I}_2$ ) が比較的高濃度で検出され、濃度範囲はそれぞれ 34.6 - 74.8  $\mu\text{g/L}$ 、16.8 - 31.0  $\mu\text{g/L}$  であった。同時に、浴槽水中の残留塩素濃度、全有機炭素濃度およびヨウ素イオン・ヨウ素酸イオン濃度を測定し、ヨウ素化消毒副生成物濃度との間に明確な関連性は認められなかった。ヨウ素化消毒副生成物の有害作用に関しては限られた情報しかないものの、化学的な反応性等から、塩素化あるいは臭素化消毒副生成物と比較して強い毒性を示す可能性が示唆されている。したがって、温泉施設におけるヨウ素化消毒副生成物曝露は、代替消毒剤としてのクロラミン処理導入の場合に考慮する必要があるのみならず、現行の処理においても曝露評価ならびに低減化策を検討すべき重要な問題であると考えられる。

#### A. 研究目的

多くの温泉施設では湯水の節約や温泉資源の保護を目的として、循環式浴槽が採用されており、このような浴場施設では主に次亜塩素酸ナトリウムや次亜塩素酸カルシウムなど塩素消毒剤によるレジオネラ属菌対策が講じられている。しかし、アルカリ泉など源泉の水質によっては、殺菌力が非解離型 ( $\text{HClO}$ ) の 1/100 程度に過ぎない次亜塩素酸イオン ( $\text{ClO}^-$ ) の比率が増加し、消毒効果が大幅に低

下することが知られている。したがって、泉質にかかわらずレジオネラ属菌に対する十分な消毒効果を担保するためには、このような塩素消毒剤の欠点を補う代替消毒剤を選定することが喫緊の課題となっている。このような背景から、厚生労働科学研究 健康安全・危機管理対策総合研究事業（研究代表者：国立感染症研究所 倉 文明）では、皮膚刺激性などの健康影響に関して安全性が高く、かつ浴槽水中での残留性を兼ね備えているモノクロラ

ミンに着目し、代替消毒剤の有力な候補として実証試験が進められている。

著者らは、モノクロラミン消毒の導入によって総トリハロメタン濃度などが顕著に低下し、消毒副生成物の経気道及び経皮曝露による健康リスクを効果的に低減できることを明らかにしてきた。また、昨年度の分担研究では、ヨウ素（ヨウ化物）イオンを含有する温泉では、塩素消毒およびモノクロラミン消毒のいずれによってもヨウ素化トリハロメタン類やヨウ素化ハロ酢酸類が生成することを見出し、浴室空気からの経気道曝露も含めたヨウ素化消毒副生成物の詳細な曝露評価が必要であることを明らかにした。今年度の研究では、昨年度に開発した小型クローズド・ループ・ストリップング (CLS) 装置にフッ素樹脂製ポンプの採用などの改良を加えて小型化・可搬化を図った。さらに、この CLS 装置を用いて、源泉中のヨウ素イオン濃度が比較的高い新潟県、秋田県および静岡県計 11 施設について、浴槽水中のヨウ素化消毒副生成物濃度および関連する水質指標の調査を実施した。

## B. 実験方法

### B-1 試料

秋田県内 2 カ所、新潟県内 5 カ所および静岡県 4 カ所、計 11 カ所の温泉施設で浴槽水を採取した。浴槽水は 40 mL ガラスバイアルに採水し、少量のアスコルビン酸ナトリウムを添加した後に冷蔵して研究室に輸送した。pH および残留塩素濃度は採取後直ちに測定を行った。

### B-2 分析条件

#### B-2-1 ジおよびトリハロメタン類 (DTHMs) の定量

DHMs 6 化合物 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Br}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{BrCl}$ ,  $\text{CH}_2\text{I}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{ClI}$ ,  $\text{CH}_2\text{BrI}$ ) および THMs 10 化合物 ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHBrCl}_2$ ,  $\text{CHBr}_2\text{Cl}$ ,  $\text{CHBr}_3$ ,  $\text{CHCl}_2\text{I}$ ,  $\text{CHBrClI}$ ,  $\text{CHBr}_2\text{I}$ ,  $\text{CHClI}_2$ ,  $\text{CHBrI}_2$ ,  $\text{CHI}_3$ ) の計 16 化合物を測定対象とした。あらかじめ NaCl

3 g を入れた 22 mL マイクロコネクター型インピンジャー (Sigma-Aldrich) 試料水 10 mL を採り、図 1 に示した改良型 CLS 装置を組み立てた。約 30 mL/min の流速で 30 分間空気を循環し、試料水から揮散した DTHMs を不活性処理ステンレス製 Tenax TA 吸着管 (CAMSCO, GL Sciences) に吸着させた。

Tenax TA に吸着した DTHMs は加熱脱離-ガスクロマトグラフ/質量分析計 (TD-GC/MS) で定量した。TD 装置は Shimadzu TDTS-2010 を用い、以下の条件で DTHMs を脱着させた。  
加熱脱離: 280°C, 50 mL He/min, 10 min  
コールドトラップ冷却温度: -15°C  
コールドトラップ加熱: 280°C, 10min  
バルブおよびライン温度: 250°C  
スプリット比: 10

コールドトラップから脱着した DTHMs を GC カラムに導入し、下記の測定条件で Shimadzu GC/MS QP-2010 で定量を行った。各 DTHM の SIM 測定イオンを表 1 に示した。

カラム: Restek Rtx-1 (0.32 mm × 60 m, 1 μm)  
キャリアガスおよび線速度: He, 30 cm/sec  
昇温プログラム: 40°C - (3°C/min) - 100°C -  
(20°C/min) - 250°C  
トランスファーライン温度: 250°C  
イオン源温度: 200°C  
イオン化法: EI, 70 eV

#### B-2-2 ハロ酢酸類 (HAAs) の定量

Mono-HAAs 3 化合物 ( $\text{CH}_2\text{ClCOOH}$  (MCAA),  $\text{CH}_2\text{BrCOOH}$  (MBAA),  $\text{CH}_2\text{ICOOH}$  (MIAA)), Di-HAA 6 化合物 ( $\text{CHCl}_2\text{COOH}$  (DCAA),  $\text{CHBr}_2\text{COOH}$  (DBAA),  $\text{CHI}_2\text{COOH}$  (DIAA),  $\text{CHBrClCOOH}$  (BCAA),  $\text{CHClI}_2\text{COOH}$  (CIAA),  $\text{CHBrI}_2\text{COOH}$  (BIAA)) および Tri-HAAs 3 化合物 ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (TCAA),  $\text{CBrCl}_2\text{COOH}$  (BDCAA),  $\text{CBr}_2\text{ClCOOH}$  (DBCAA)) の計 12 化

化合物を測定対象とした。

Microsep Advance Centrifugal Device (Pall) を用いて試料水を 3000 rpm で 20 分間遠心し、夾雑する垢などの懸濁物質を限外ろ過により除去した後に分析に供した。LC/MS/MS 分析には Shimadzu LCMS-8040 を用い、以下の条件で測定を行った。各 HAA の MRM 測定イオンを表 2 に示した。

移動相: 0.1%ギ酸水溶液:0.1%ギ酸添加  
メタノール=70:30-0:100 (30-40 min)

流量: 0.2 mL/min

カラム: Waters Atlantis T3  
(4.6 mm×150 mm, 3 μm)

カラム温度: 30°C

試料注入量: 50 μL

イオン化法: ESI Negative Ion Mode

インターフェイス電圧: -3.5 kV、

ドラインガス流量: 15 mL/min

DL 温度: 250°C

ヒートブロック温度: 200°C

測定イオン: Scan mode, 50-500; MRM mode

### B-2-3 ヨウ素酸イオンおよびヨウ素化物イオンの定量

ヨウ素イオンはイオンクロマトグラフ法、ヨウ素酸イオンは高速液体クロマト-ポストカラム吸光度法で定量した。定量下限値はそれぞれ 0.2 mg/L、0.1 mg/L であった。

### C. 結果と考察

表 3 は各施設の浴槽水中 DTHMs 濃度をまとめたものである。総 DTHMs 濃度 (定量を行ったすべての DTHMs の和) でみると、HS-11 (102 μg/L)、HS-3 (72.1 μg/L)、HS-10 (52.5 μg/L) および HS-8 (22.8 μg/L) の 4 施設が比較的高い値を示した。ただし、これら 4 施設の主要な DTHM 種は異なっており、HS-11 と HS-3 では  $\text{CHI}_3$  が最も高濃度で検出され (それぞれ 74.8

μg/L、34.6 μg/L)、次いで 2 置換体である  $\text{CH}_2\text{I}_2$  濃度が高い値を示した (それぞれ 16.8 μg/L、31 μg/L)。両施設の  $\text{CH}_2\text{I}_2/\text{CHI}_3$  比はそれぞれ 0.22 と 0.90 で、約 4 倍の差異が認められた。 $\text{CH}_2\text{I}_2$  の方が  $\text{CHI}_3$  よりも沸点が低く、浴槽水中から揮散しやすいと考えられることから、 $\text{CH}_2\text{I}_2/\text{CHI}_3$  比の違いはこれらの生成後の時間経過を反映している可能性が考えられる。一方、HS-10 では主要な DTHMs は  $\text{CHCl}_3$  (34.8 μg/L) および  $\text{CHBrCl}_2$  (11.8 μg/L)、HS-8 では  $\text{CHBr}_3$  (18.5 μg/L) であった。後者については、Br イオンを含む地下水の加水が一因であると推察される。

総 I-DTHMs 濃度 ( $\text{CH}_2\text{ClI}$ 、 $\text{CH}_2\text{BrI}$ 、 $\text{CH}_2\text{I}_2$ 、 $\text{CHCl}_2\text{I}$ 、 $\text{CHBr}_2\text{I}$ 、 $\text{CHBr}_2\text{I}$ 、 $\text{CHClI}_2$ 、 $\text{CHBrI}_2$  および  $\text{CHI}_3$  の計 9 化合物の和) でみると、上述した HS-3 と HS-11 の他に、HS-8 (3.28 μg/L)、HS-7 (2.39 μg/L)、HS-2 (1.48 μg/L) および HS-5 (1.03 μg/L) でも 1 μg/L を越える濃度でヨウ素化体が存在し、HS-2、HS-5 および HS-7 では総 DTHMs に占めるヨウ素化体の比率が高いことが特徴的であった (65~84%)。

HAA の測定結果を表 4 にまとめた。今回の調査で I-HAAs が検出されたのは HS-11 と HS-3 のみであり、これらは上述したように I-DTHMs 濃度が高い施設であった。特に、HS-11 では総 I-DTHMs 濃度 (101 μg/L) に匹敵する濃度の I-HAAs (94.9 μg/L) の生成が認められた。

各施設の浴槽水の水質指標として、表 5 に残留塩素濃度と TOC 濃度、表 6 にヨウ素イオンおよびヨウ素酸イオン濃度をまとめて示した。これらの水質指標と浴槽水中のヨウ素化消毒副生成物量との間には必ずしも明確な関連は認められなかった。ただし、視点を変えると、HS-4、HS-5 および HS-6 のようにヨウ素イオン濃度が比較的高く (45 mg/L~56 mg/L)、かつ TOC 濃度も高い (15 mg/L~23 mg/L) にもかかわらず、総 DTHMs は低い濃度 (0.62 μg/L~2.44 μg/L) で維持・管理されている施設もあることから、これらの結果は、消毒条件の最適化等によって有害性が疑われる消毒副生成物への曝露を低減できる可能性を示していると言えよう。

### D. まとめ

著者らは、代替消毒剤としてのクロラミン

処理の問題点として、含ヨウ素温泉では有害性未知のヨウ素化消毒副生成物が生じることが明らかになってきたが、本研究の結果から通常の塩素処理を行っている含ヨウ素温泉浴槽水においても高濃度のヨウ素化消毒副生成物を生じている事例があることを見出した。ヨウ素化消毒副生成物の有害作用に関しては限られた情報しかないものの、化学的な反応性等から、塩素化あるいは臭素化消毒副生成物と比較して強い毒性を示す可能性が示唆されている。したがって、温泉施設におけるヨウ素化消毒副生成物曝露は、代替消毒剤としてのクロラミン処理導入の場合に考慮する必要があるのみならず、現行の処理においても曝露評価や低減化策を検討すべき重要な問題であると考えられる。

## F. 知的所有権の取得状況

なし

## E. 研究発表

### E-1 論文発表

なし

### E-2 学会発表

神野 透人、香川(田中) 聡子、田原 麻衣子、川原 陽子、真弓 加織、五十嵐 良明、縣 邦雄、杉山 寛治、小坂 浩司、八木田 健司、泉山 信司、倉 文明：循環式温泉浴槽水および浴室空気中のヨウ素化消毒副生成物. 第 51 回全国衛生化学技術協議会 年会 (2014.11, 大分)

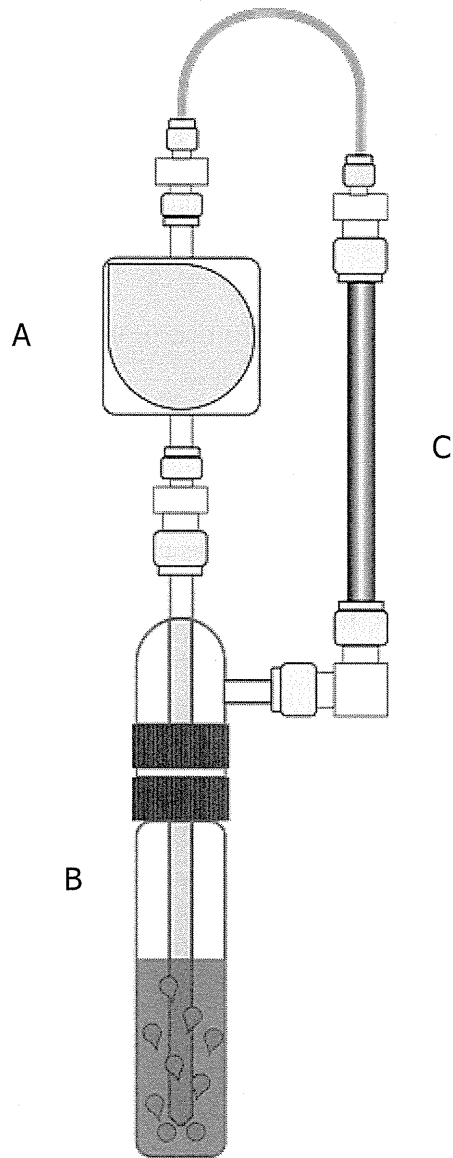


図1 改良型クローズド・ループ・ストリッピング装置

- A, 圧電ユニモルフ振動子ポンプ UPS-112G; B, 22 mL マイクロコネクター型インピンジャー;  
C, 不活性処理ステンレス製 Tenax TA 吸着管

表 1 加熱脱離-GC/MS によるジハロメタン類およびトリハロメタン類分析の SIM 測定イオン

Compounds		Precursor ion ( $m/z$ )	Product ion ( $m/z$ )
Chloroacetic acid	MCAA	139.05	92.90
Dichloroacetic acid	DCAA	173.05	126.95
Trichloroacetic acid	TCAA	207.05	116.85
Bromoacetic acid	MBAA	185.00	138.95
Dibromoacetic acid	DBAA	262.90	216.85
Bromochloroacetic acid	BCAA	173.00	128.95
Bromodichloroacetic acid	BDCAA	206.95	162.90
Dibromochloroacetic acid	DBCAA	296.80	206.80
Iodoacetic acid	MIAA	185.00	126.90
Diiodoacetic acid	DIAA	356.80	310.80
Chloriodoacetic acid	CIAA	218.95	126.90
Bromiodoacetic acid	BIAA	262.90	128.85

表 2 LC/MS/MS によるハロ酢酸類分析の MRM 測定イオン

Group #	Start Time (min)	End Time (min)	DHMs, THMs and ISs	Rt (min)	Monitor Ions			
					Quant.		Qualitative	
1	4.00	9.00	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5.79	84	49	86	
			CH <sub>2</sub> BrCl	7.81	130	49	128	
			CHCl <sub>3</sub>	7.94	83	47	85	
2	9.00	12.50	Fluorobenzene	9.91	96	70		
			CH <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	10.50	174	95	172	
			CHBrCl <sub>2</sub>	10.77	129	85	127	
			CH <sub>2</sub> ClI	11.23	176	127	178	
3	12.50	16.00	CHBr <sub>2</sub> Cl	13.90	129	127	131	
			CH <sub>2</sub> BrI	14.25	220	127	222	
			CHCl <sub>2</sub> I	14.83	83	85	175	210
4	16.00	20.00	CHBr <sub>3</sub>	17.05	173	171	175	252
			CHBrClI	17.95	129	127	131	256
			CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	17.97	268	127	141	
			1-Bromo-4-fluorobenzene	18.54	95	174	176	
5	20.00	23.00	CHBr <sub>2</sub> I	20.95	173	171	175	300
			CHClI <sub>2</sub>	21.75	175	127	177	302
6	23.00	30.00	CHBrI <sub>2</sub>	24.58	219	127	221	346
			1,4-Dibromobenzene	26.65	236	75	234	
			CHI <sub>3</sub>	27.95	267	127	394	

表 3 浴槽水中の DTHMs 濃度 (µg/L)

温泉施設	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> BrCl	CHCl <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	CHBrCl <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> ClI	CHBr <sub>2</sub> Cl	CH <sub>2</sub> BrI	CHCl <sub>2</sub> I	CHBr <sub>3</sub>	CHBrClI	CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	CHBr <sub>2</sub> I	CHClI <sub>2</sub>	CHBrI <sub>2</sub>	CHI <sub>3</sub>
HS-1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
HS-2	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.13	0.21	0.16	0.15	0.28	< 0.1	0.56	< 0.1	0.27	< 0.1	0.21
HS-3	< 0.1	< 0.1	0.54	< 0.1	0.44	0.55	0.51	< 0.1	0.37	0.44	< 0.1	31.0	0.27	2.80	0.59	34.6
HS-4	< 0.1	< 0.1	0.75	< 0.1	0.42	< 0.1	0.28	< 0.1	0.31	0.20	< 0.1	0.35	< 0.1	0.13	< 0.1	< 0.1
HS-5	< 0.1	< 0.1	0.17	< 0.1	0.18	0.13	0.20	< 0.1	0.31	< 0.1	< 0.1	0.59	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
HS-6	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.17	< 0.1	< 0.1	0.22	< 0.1	0.23	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
HS-7	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.15	0.21	< 0.1	0.34	0.23	< 0.1	0.64	< 0.1	0.36	< 0.1	0.90
HS-8	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.12	0.97	< 0.1	0.17	18.5	0.44	0.32	1.00	0.32	0.52	0.39
HS-9	< 0.1	< 0.1	7.90	< 0.1	0.68	< 0.1	0.35	< 0.1	< 0.1	0.28	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
HS-10	0.10	< 0.1	34.8	< 0.1	11.8	< 0.1	4.90	< 0.1	< 0.1	0.93	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
HS-11	0.15	< 0.1	0.13	< 0.1	0.17	0.53	0.26	0.41	0.77	0.35	< 0.1	16.8	0.64	5.00	1.80	74.8

表 4 浴槽水中の HAAs 濃度 (µg/L)

温泉施設	MCAA	DCAA	MBAA	DBAA	BCAA	MIAA	DIAA	CIAA	BIAA
HS-1	ND	3.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HS-2	ND	1.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HS-3	ND	1.7	ND	ND	ND	ND	6.5	ND	ND
HS-4	ND	0.36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HS-5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HS-6	ND	1.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HS-7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HS-8	ND	2.3	0.28	5.8	0.27	ND	ND	ND	ND
HS-9	ND	5.4	ND	ND	0.32	ND	ND	ND	ND
HS-10	0.94	16.0	0.62	2.4	9.4	ND	ND	ND	ND
HS-11	ND	8.8	ND	4	4.7	12.5	68.1	11.8	2.5

表 5 浴槽水中の残留塩素および TOC 濃度

温泉施設	残留塩素 (mg/L)		TOC (mg/L)
	遊離塩素	結合塩素	
HS-1	0.02	0.13	2.4
HS-2	1.20	0.20	7.3
HS-3	0.92	0.02	4.5
HS-4	0.32	0.12	16.0
HS-5	0.81	0.24	15.0
HS-6	0.08	0.25	23.0
HS-7	0.14	0.13	8.6
HS-8	3.00	0.76	1.9
HS-9	1.90	0.10	0.9
HS-10	9.30	1.00	1.3
HS-11	6.10	4.80	11.0

表 6 浴槽水中のヨウ素イオンおよびヨウ素酸イオン濃度

温泉施設	I <sup>-</sup>		IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)
	温泉分析書 (mg/kg)	浴槽水実測値 (mg/L)	
HS-1	< 0.2	< 0.2	< 0.1
HS-2	28.8	22.0	0.9
HS-3	16.6	5.3	6.6
HS-4	72.1	56.0	< 0.1
HS-5	86.7	55.0	< 0.1
HS-6	5.2	45.0	< 0.1
HS-7	32.4	26.0	< 0.1
HS-8	1.5	< 0.2	1.5
HS-9	1.6	< 0.2	< 0.1
HS-10	2.4	< 0.2	< 0.1
HS-11	12.6	0.4	1.1



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）  
レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における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 26 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)

冷却水は浴槽水と同様にレジオネラ属菌の増殖環境であり、諸外国では多くの集団発生が報告されている。我が国においても、特に都会のビルでは夏期に多くの冷却塔が稼働しており、レジオネラ症感染のリスクは高い。冷却水における、レジオネラ属菌の汚染実態の把握と有効なレジオネラ属菌の消毒、維持管理方法を確立することを目的として調査研究を行った。

最近における、冷却水の殺菌剤種類別のレジオネラ属菌検出率を調査し、無処理では 52.5%から検出すること、有機系殺菌剤の有効性の程度の確認、塩素系殺菌剤では高い菌数の割合が無処理よりも増加することを明らかにした。

モデル冷却塔により、各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果を評価した。無処理と、結合塩素(全塩素 3mg/L)処理は  $10^2 \sim 10^4$ CFU/100mL のレジオネラ属菌が継続的に検出された。結合塩素剤ではレジオネラ属菌は抑制できなかつた。CMI+カチオン処理は、常時不検出を維持し、効果の持続性が確認された。遊離塩素(0.2mg/L)処理は運転停止による残留塩素の消失、pH 条件によるアメーバ増殖等の要因によりレジオネラ属菌が検出されることから、維持管理上の注意点を確認した。

冷却水のクローンライブラリー解析の結果、培養法で検出されず既存種に属さないレジオネラ属菌クローンが多く存在し、多様なレジオネラ菌種が確認された。一方、浴槽水の多様性は低く、塩素剤による殺菌処理が影響している可能性が示唆された。クローンライブラリー解析の結果は、環境水中のレジオネラ属菌検査における、培養法「陰性」、遺伝子「陽性」の不一致の要因として、培養されない未記載のレジオネラ属菌の存在を示した。よってこの不一致は、EMA-q PCR 法によっても解消されないことが確認された。

A. 研究目的

レジオネラ症の発生件数を月別に集計すると、梅雨時の 7 月にピークが存在<sup>1)</sup>し、続く 8 月、9 月、10 月も多い傾向にある。夏期は、ビル等の冷房需要が増えるので冷却塔の稼働台数も多く、冷却水中のレジオネラ属菌の検出率も高い。<sup>2)</sup>

夏期にレジオネラ症の発生数が増える理由として、冷却水からの感染の増加が推定される。

わが国で報告されるレジオネラ症の感染源は

入浴施設が多く、冷却塔による事例は稀である。一方、海外のレジオネラ症集団発生事例<sup>3)</sup>は、冷却塔を感染源とするものが主である。最近では、2012 年にカナダ・ケベックと英国・エジンバラで冷却塔を感染源とする集団発生の報告<sup>4)</sup>がある。諸外国に学び、冷却水を原因とするレジオネラ症の発生を抑制するため、冷却水のレジオネラ属菌の実態把握と消毒対策を講じる必要がある。

本研究では、①実冷却水におけるレジオネラ属菌の存在実態を殺菌剤の種類別に調査すること、及び②各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果をモデル冷却塔で評価することにより、冷却水系の消毒維持管理方法を確立する。③冷却水のレジオネラ属菌をクローンライブラリー解析することにより、冷却水系のレジオネラ属菌の多様性を調査し、冷却水のレジオネラ属菌汚染の実態をより正確に把握することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 冷却水の殺菌剤別レジオネラ属菌検出実態

2013年4月から2014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)つくば総合研究所でレジオネラ属菌数を測定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1mL添加して高圧蒸気滅菌した500mL容のポリプロピレン製容器を用いた。冷却水系で使用している殺菌剤の種類は、採水者が確認して明確なものについて検査依頼ラベルに記載した。採水した試料水は冷蔵(4~6°C)で保存し、速やかに検査した。

レジオネラ属菌の検査は以下の方法で行った。試料水400mLを冷却遠心(6400 × g, 30 min)にて100倍に濃縮し、等量の0.2M酸性リン酸緩衝液(pH 2.2)を加えて10 min室温に放置後、200 μLをGVPC培地(日研生医研)に接種した。37°Cのインキュベータで培養し、6日後に培地上の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とBCYE $\alpha$ 培地に接種して、37°Cのインキュベータで培養した。2日後に其々の培地を観察し、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。

但し、上記手法でレジオネラ属菌の検査をした時、GVPC培地全体にレジオネラ属菌以外の細菌や真菌が発育し、レジオネラ属菌の検出ができない場合がある。その場合は、保存しておいた100倍濃縮菌液を使用し、前処理として加温処理(50°C × 30min)に続き酸処理(前述)を行い、レジオネラ属菌用選択培地としてCAT $\alpha$ 培地<sup>5)</sup>を使用して

再検査して得た結果も集計に加えた。

### 2. モデル冷却塔を用いた各種殺菌剤の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)の実験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、アメーバ等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180L/hr、電気ヒーターを使用して常時水温30°Cに維持し、循環水の蒸発は殆ど無く、つくば市水を7L/day補給するシステムである。

以下の4系統の処理条件で試験を行った。

#### ①無処理

殺菌剤を添加しない条件

#### ②遊離塩素

次亜塩素酸ナトリウム溶液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0.2 mg/Lに維持する条件

#### ③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3 mg/Lに維持する条件

#### ④CMI+カチオン製剤品

CMI(5-クロロ-2-メチル-4-イソシアゾリノン-3-オン)とカチオンポリマー(WSCP)を含有する処理剤を循環水中に200mg/L維持する条件

モデル冷却塔は2013年9月20日から循環運転を開始し、今年度(2014年4月以降)も継続して運転しており2015年2月12日までの結果を得た。この運転期間中、pH設定値の変更、休日の運転停止などの条件調整を行っている。

1週間に一度、理化学的項目(pH、電気伝導率、カルシウム、マグネシウム、酸消費量(pH4.8)、塩化物イオン、硫酸イオン、シリカ)の水質分析、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。

アメーバ数の測定は、試料水50mLを遠心濃縮し、濃縮菌液の全量を大腸菌塗布寒天培地に接種、25°Cで2週間培養した後、プラーク数を計数した。ATP濃度は東亜DKK社製ATP TESTER AF-70を使用して測定した。一般細菌数は、標準寒天培地(日

水製薬)を使用し 37°Cで 24±2 時間培養後の集落数を測定した。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地(日水製薬)を使用し 20°Cで 7 日間培養後の集落数を測定した。

### 3. クローンライブラリー解析による冷却水のレジオネラ属菌の多様性調査

実際に運転している冷却水 8 検体を採取して、培養法によるレジオネラ属菌の検出を行い、検出菌株について菌種を同定した。同じ試料水を用いて、レジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーを作製して解析した<sup>6)</sup>。

各検体の濃縮試料をエチジウムモノアジド処理 (Viable Legionella Selection Kit for PCR Ver. 2.0 および LED CrossLinker 12, タカラバイオ) した後 DNA を抽出・精製 (NucleoSpin gDNA Clean-up kit, タカラバイオ) し、レジオネラ属に特異的なプライマーペア (LEG 225F および LEG 858R)<sup>7)</sup>で PCR 増幅 (TaKaRa Ex Taq Hot Start Version, タカラバイオ) し、その PCR 増幅産物を用いて定法に従いクローニングした。得られたクローンの塩基配列は解析ソフト (Mothur platform) で解析し、塩基配列が 99%以上一致するものを同一の OTU として分類して、多様性指数を算出した。

## C. 結果と考察

### 1. 冷却水の殺菌剤別レジオネラ属菌検出実態

2013 年 4 月から 2014 年 12 月にレジオネラ属菌を検査した実際の冷却水のうち、使用している殺菌剤の種類が明確なものは 6664 検体であった。殺菌剤の種類は、5-クロロ-2-メチル-4-イソシアゾリル-3-オンに代表される CMI 系、CMI とカチオンポリマー (WSCP) の複合系、4 級アンモニウム塩等のカチオン系、1-5-ペンタンジアル(グルタルアルデヒド)、及び塩素系 (遊離塩素、及び結合塩素剤) に分類した。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 1. に示す。レジオネラ属菌検出率は殺菌剤無処理が 52.5 %, CMI 系が 12.1 %, CMI+カチオン系が 11.3 %, カチオン系が 17.9%, グルタルアルデヒドが 3.4 %, 塩素系が 35.9 %であった。無処理の場合と比較すると、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、有機系殺菌剤による冷却水処理はレジオネラ属菌抑制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>8)</sup>。

一方、塩素系は無処理よりも検出率は低いものの明瞭な抑制効果ではない。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割合が 4.6 %から 8.7 %に上昇しており、塩素系殺菌剤は冷却水系のレジオネラ属菌抑制効果が不十分であると判断される。

### 2. モデル冷却塔を用いた各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果の評価

モデル冷却塔の外観写真を図 2. と図 3. に示す。

2013 年 9 月 20 日から 4 通りの処理条件で循環運転しており、2015 年 2 月 12 日までほぼ 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、従属栄養細菌数及び理化学的水質項目を検査・測定した。

2014 年 2 月からのレジオネラ属菌、アメーバ、一般細菌数等の検査結果を時系列的にグラフ化したものを、図 4. から図 8. に示す。

運転条件の経緯は、2 月 26 日から 3 月 10 日まで循環運転停止、3 月 10 日から 3 月 31 日まで殺菌剤の添加なしで循環運転、3 月 31 日から殺菌剤を添加して日中のみ循環運転し、夜間と休日は運転停止、以後この条件を継続。5 月 3 日～7 日は運転停止、8 月 13 日～18 日は運転停止、8 月 21 日から 4 条件とも循環水に炭酸水ナトリウムを 200mg/L 添加して pH を 8.7 程度に上昇させた。それ以前の pH は平均 8.1 であった。12 月 9 日から CMI+カチオンを使用冷却水系の試験を中止したが、他の 3 式は運転継続した。その後 12 月 29 日～1 月 5 日まで運転を停止し、その後運転開始。前述運転状況は、図 4. から図 8. 中に図示した。

遊離塩素処理では、循環運転中は遊離残留塩素濃度 0.2mg/L。結合塩素処理では、循環運転中は全残留塩素濃度 3mg/L、CMI+カチオン剤の処理剤

濃度は循環水中 200mg/L である。

レジオネラ属菌は、無処理及び結合塩素処理では  $10^2 \sim 10^4$ CFU/100mL の比較的高菌数で継続的に検出された。CMI+カチオン処理は、循環運転の停止の有無にかかわらず、試験期間中連続して不検出(10CFU/100mL 未満)を維持した。

遊離塩素処理は、2月26日の運転停止後、検出され始め殺菌剤無しの運転で  $10^4$ CFU/100mL 近くまで増加した。その後日中の遊離残留塩素濃度 0.2mg/L 維持により  $10^1 \sim 10^2$ CFU/100mL 程度に低下した。その後6月4日から不検出となったが、8月13日～18日の運転停止により  $10^4$ CFU/100mL に増加した。8月21日から循環水の pH を一般的な冷却水の pH である 8.7 に調整したところ、日中の循環水中の遊離残留塩素濃度 0.2mg/L 維持によっても  $10^1 \sim 10^2$ CFU/100mL 程度のレジオネラ属菌が継続的に検出された。

アメーバについても、レジオネラ属菌と同様の傾向である。無処理と結合塩素処理では、ほぼ常時アメーバが検出されている。CMI+カチオン処理では、アメーバは、ほぼ不検出(2PFU/100mL 未満)を維持した。遊離塩素処理は、運転停止時に増加する傾向がみられ、特に8月の運転停止時と pH 調整後は常時  $10^2 \sim 10^3$ PFU/100mL 程度のアメーバが検出されるようになった。この結果、pH 8.7 程度の条件では遊離残留塩素濃度 0.2mg/L ではアメーバを抑制できないことを示している。

ATP と従属栄養細菌数は類似の挙動を示しており、いずれの処理条件でもある程度の値を示している。4条件で大きな相違はないが、相対的には CMI+カチオンが高く、遊離塩素処理が低く、無処理と結合塩素処理が中間的である。一般細菌数は ATP や従属栄養細菌数に比べて4つの処理条件による差が大きくなっているが同様の傾向を示す。

今回の試験結果より、無処理冷却水では、一旦レジオネラ属菌が定着すると継続して検出されることが確認された。処理方式別では、結合塩素処理は循環水中の結合塩素濃度を 3mg/L 維持してもレジオネラ属菌を抑制できず、無処理よりも高い菌数となることもあった。結合塩素処理では、常時アメーバが多く検出されており、レジオネラ

の増殖環境が形成されていることが考えられた。CMI+カチオン処理は、運転停止などの影響を受けず、安定してレジオネラ、アメーバを不検出に維持した。これは、殺菌効果を有するとともに効果の持続性(分解しにくい)が寄与していると考えられた。遊離塩素処理は、平成25年度の報告では常時遊離塩素を維持した結果、アメーバ、レジオネラ属菌を抑制した。今回の試験では、運転停止期間や夜間の循環停止で残留塩素濃度が無くなることに加えて、pH 8.7 の条件ではアメーバ、レジオネラ属菌を抑制できなくなった。実際に運転している冷却水では pH 8.7 は通常の条件であり、また夜間や休日の運転停止も一般的である。こうした運転条件では、停止中に残留塩素濃度が消失することによるアメーバやレジオネラ属菌の増殖に注意が必要であることが確認された。

### 3. クローンライブラリー解析による冷却水のレジオネラ属菌の多様性調査

今回、クローンライブラリー解析した8検体の冷却水に加えて、昨年度報告の3検体の冷却水(A, B, C)及び3検体の浴槽水(D, E, F)の処理状況、採水日、培養法によるレジオネラ属菌の検出菌数と菌種を表1.に示す。これら11検体の冷却水と、3検体の浴槽水のクローンライブラリーを構成するクローンの相対量のデータを図9.に示す。

全ての冷却水において赤で示した既存種に属さない未知のレジオネラ属菌クローンの塩基配列が大部分を占めた。冷却水から培養法で検出されたレジオネラ属菌は、表1.に示す通りほとんどが *Legionella pneumophila* であったが、冷却水 B, G, H, J, K (CMI 連続注入)及び冷却水 L (遊離塩素処理)から *L. pneumophila* のクローンは回収されなかった。一方、浴槽水は *L. pneumophila* のクローンの比率が冷却水と比較して高く、既存種に属さない未知のレジオネラ属菌クローンの塩基配列の割合が低い傾向にあった。

表2.にクローンライブラリーの多様性指数を示す。冷却水 I, O (結合塩素処理)は OTU 数, Chao1 の値が高く、多様性が高いことを示している。冷却水 L (遊離塩素処理)の多様性は低かった。浴槽水 D, E の多様性は低く、既存種に属さない未培