

マンガンイオンは鉄イオンと同様に温泉などに含まれる成分でもあるので、マンガンイオンを含む泉質の温泉の消毒にもモノクロラミンが適している判断された。

今回のマンガンイオンを含め、アルカリ泉^{7,8,9)}や、アンモニア態窒素^{7,8,9)}、臭化物イオン⁹⁾、鉄イオン²⁾などを含む温泉で、モノクロラミンの消毒効果を実証してきたが、いずれの泉質の場合も、まず、実験室内で事前に源泉水を使ったモノクロラミンの適合性試験を行った。源泉水におけるモノクロラミン濃度の安定性を調べ、本消毒方法の導入の可否を判断した。温泉の泉質は泉源ごとに異なる可能性が高いので、営業施設へのモノクロラミン消毒導入の際には、源泉水を使ったモノクロラミンの事前適合性試験が活用できると思われる。

公衆浴場法等の条例で週1回以上の実施が求められている循環式浴槽のろ過器・配管洗浄方法として、遊離塩素管理時に使用されている高濃度遊離塩素は、モノクロラミン管理時には不連続点処理や事前換水が必要となり、薬剤コストや所要時間の面から現場向きではない。そこで、モノクロラミンによる配管洗浄等の方法（適正濃度及び時間）を検討した。実験室内の回流装置試験→プラント（循環式モデル浴槽）試験→現場施設での実証試験という手順で試験の効率化を図るとともに、安全性の確保を考慮しながら試験データを作成し、モノクロラミン濃度（10 mg/L 以上）と処理時間（1 時間以上）という配管洗浄の条件を決定した。

モノクロラミン濃度約 10 mg/L で 2 時間の配管洗浄後に、一部施設のモノクロラミン管理時の浴槽水から従属栄養細菌が検出された。これらの菌株の一部は、部分塩基配列解析の結果から、*Mycobacterium phlei* と同定された。この菌株のモノクロラミンなどによる殺菌条件を検討したところ、モノクロラミン約 15 mg/L 濃度、30 分間感作で殺菌されることがわかった。その他の従属栄養細菌の分離株はより低濃度の 5 mg/L のモノクロラミン、30 分間の感作で殺菌された。今回の配管洗浄条件であるモノクロラミン濃度 10 mg/L、

1 時間の配管洗浄で十分な殺菌・洗浄効果が得られない場合は処理時間を延長するなどの対応が必要と思われる。また、ろ過器の消毒をモノクロラミン直接注入により実施する場合には 5 mg/L 以上、貯湯槽消毒では 50~100 mg/L を内壁に直接噴霧する方法が適当であると示唆された（表 7）。

なお、モノクロラミン消毒後は、水質汚濁防止法による規制を鑑み、チオ硫酸ナトリウム等で中和した後排水することが望ましい。

以上、循環式浴槽へモノクロラミン消毒法を導入するにあたり必要な衛生管理手法は確立されたものと思われる。今後、全国の入浴施設にモノクロラミン消毒法が普及し、浴槽水の確実なレジオネラ防除がなされることで、レジオネラ症患者の発生低減が期待できる。

E. 結論

循環式浴槽水のモノクロラミン消毒は、遊離塩素消毒が難しいアルカリ泉や、アンモニア態窒素、臭化物イオン、鉄イオンなどを含む広範囲な泉質の温泉で、効果的に使用できることがわかった。また、マンガンイオンを含む浴槽水についてもモノクロラミン消毒が有効であることが実証された。

浴槽水のモノクロラミン管理時に必要な配管洗浄の方法も確立されたことから、今後、全国の地方自治体の公衆浴場法施行条例等へのモノクロラミン消毒法の採用が期待される。

F. 参考文献

- 1) 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）
- 2) 長岡宏美，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，和田裕久，榎原広里，市村祐二，青木信和：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，各種泉質及び形態の温泉施設におけるモノクロラミンによるレジオネラ属菌消毒

効果の検証, 平成 26 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) 総括・分担研究報告書。(研究代表者 倉文明)

- 3) Asami M., Oya M., Kosaka K.: A national survey of NDMA in raw and drinking water in Japan. Sci. Total Environ. 407 (11) 3540-3545 (2009)
- 4) 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)
- 5) 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・測定の実験的検証, 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 (研究代表者、倉文明)
- 6) 水質試験方法等調査専門委員会: 上水試験方法 解説編 1993 p.262 日本水道協会
- 7) 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・測定の実験的検証, 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 (研究代表者、倉 文明)
- 8) 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)
- 9) 縣邦雄, 神野透人, 八木田健司, 杉山寛治,

小坂浩司, 泉山信司, 長岡宏美, 片山富士男, 和田裕久, 富田敦子, 市村祐二, 江口大介: 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, 種々の温泉水におけるモノクロラミン消毒効果と高濃度洗浄の実験的検証, 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)

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

- 1) 長岡宏美, 市村祐二, 青木信和, 江口大介, 神野透人, 小坂浩司, 泉山信司, 八木田健司, 縣邦雄, 片山富士男, 榎原広里, 和田裕久, 杉山寛治, 倉文明: 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, 日本防菌防黴学会第 42 回年次大会, 大阪 (2015)
- 2) 杉山寛治, 長岡宏美, 片山富士男, 和田裕久, 榎原広里, 市村祐二, 青木信和, 江口大介, 神野透人, 小坂浩司, 泉山信司, 八木田健司, 縣邦雄, 田中慶郎, 倉文明: 循環式浴槽水のモノクロラミン消毒による長期間にわたるレジオネラ属菌の制御, 日本防菌防黴学会第 42 回年次大会, 大阪 (2015)
- 3) 牧田幸久, 鈴木秀紀, 森主博貴, 松橋平太, 柴田真也, 長岡宏美, 川森文彦, 小澤匡宏, 山内薫明, 森 健, 市村祐二, 青木信和: モノクロラミンの浴槽水消毒条件の検討, 静岡県公衆衛生研究会, 静岡 (2016)

研修会

- 1) 長岡宏美: 文京区環境衛生監視員「公衆浴場等のレジオネラ症防止対策」研修会, 文京区保健所主催, 2015 年 5 月 28 日, 東京都文京区
- 2) 壁谷美加: 平成 27 年度生活衛生営業関係業務検討会, 岡山県保健福祉部生活衛生課主催, 2015 年 7 月 10 日, 岡山県岡山市
- 3) 杉山寛治, 市村祐二: 平成 27 年度浴槽の衛生

管理に係る講習会，神戸市保健所・衛生監視事務所主催，2015年7月13日，兵庫県神戸市

2016年2月5日，東京都千代田区

4) 長岡宏美：平成27年度生活衛生関係技術担当者研修会，厚生労働省健康局生活衛生課主催，

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
特許5782574「モノクロラミン調製装置」
特許権者ケイ・アイ化成株式会社

表1 マンガンイオンを含む地下水を使用した循環式浴槽におけるモノクロラミン消毒検証試験結果

浴槽水 検査項目		実験浴槽(モノクロラミン管理)						対照浴槽	
		開始時	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	<10
	一般細菌数 (CFU/mL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	5	8.3 × 10
	従属栄養細菌数 (CFU/mL)	<1	<1	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ³	5.8 × 10
	抗酸菌 (定性)	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
	アメーバ数 (CFU/50mL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
塩素濃度	モノクロラミン (mg/L)	-	-	6.0	-	3.7	-	-	<0.1
	ジクロラミン (mg/L)	-	-	0.2	-	0.2	-	-	0.2
	トリクロラミン (μg/L)	-	-	<15	-	<15	-	-	<15
	遊離塩素 (mg/L)	-	-	<0.1	-	<0.1	-	-	0.45
消毒副生成物	トリハロメタン類 4物質 (μg/L)	-	-	<0.001	-	<0.001	-	-	0.006
	NDMA (ng/L)	-	-	6.3	-	6.6	-	-	5.6
現場簡易検査	モノクロラミン (mg/L)	3.7	6.4	5.5	4.1	4.1	3.55	2.5	-
	全塩素 (mg/L)	3.64	5.85	5.41	3.72	3.63	3.52	2.7	-
	遊離塩素 (mg/L)	0.1	0.2	0	0	0	0	0	0.8
	遊離アンモニア (mg/L)	>	0.55	1.15	2.75	1.65	2.05	2.4	2.3

表2 モデル浴槽における配管洗浄前後のレジオネラ属菌数

モノクロラミン濃度		浴槽水 (CFU/100mL)	配管 A	配管 B	ヘアキャッチャー網	ろ過材
5 mg/L	洗浄前	1.4 × 10	-	+	+	-
	1時間後	0	-	-	-	NT*
	2時間後	0	-	-	-	-
10 mg/L	洗浄前	4.7 × 10 ⁶	+	+	+	+
	1時間後	0	-	-	-	NT*
	2時間後	0	-	-	-	-

* NT:検査せず

表 3 モデル浴槽における配管洗浄前後の一般細菌数

モノクロラミン濃度		浴槽水 (CFU/mL)	配管 A	配管 B	ヘアキャッチャー網	ろ過材
5 mg/L	洗浄前	3.2×10^5	1.4×10^4	5.1×10^3	1.0×10^2	1.6×10
	1 時間後	1.0×10^2	1.0×10^2	0	1	NT*
	2 時間後	0	5.0×10	0	0.5	-
10 mg/L	洗浄前	2.0×10^3	1.8×10^3	6.3×10^3	2.0×10^3	1.4×10^4
	1 時間後	0	-	4.0×10	0	NT*
	2 時間後	0	0	5	5	1.5×10

* NT:検査せず

表 4 高濃度モノクロラミン(約 9mg/L)による配管洗浄前後の検査成績

績

露天風呂の逆洗水

配管洗浄前 (モノクロラミン濃度 2.93mg/L)	一般細菌数 (CFU/mL)	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	アメーバ数 (PFU/50mL)
露天浴槽水	0	<10	<1
逆洗 1 分	11	<10	<1
逆洗 2 分	29	<10	<1
逆洗 3 分	1	<10	<1
逆洗 4 分	4	<10	<1
逆洗 5 分	1	<10	<1
2h 配管洗浄後 (モノクロラミン濃度 9.18→ 8.22mg/L)	一般細菌数 (CFU/mL)	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	アメーバ数 (PFU/50mL)
露天浴槽水	0	<10	<1
逆洗 1 分	0	<10	<1
逆洗 2 分	0	<10	<1
逆洗 3 分	0	<10	<1
逆洗 4 分	0	<10	<1
逆洗 5 分	0	<10	<1

ヘアキャッチャーの拭き取り

2h 配管洗浄後(モノクロラミン濃度 9.18→ 8.22mg/L)	一般細菌数 (CFU/ 綿棒)	レジオネラ属菌数 (CFU/ 綿棒)
配管洗浄前	0	<10
配管洗浄後	0	<10

表 5 高濃度モノクロラミン（約 7mg/L）による配管洗浄後の検査成績

対照：遊離塩素（10 mg/L）配管洗浄

1. HC 内拭き取り試験結果

（拭き取り綿棒あたりの CFU）

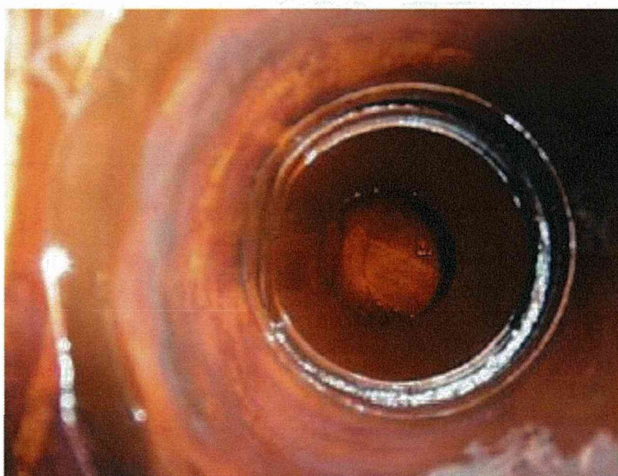
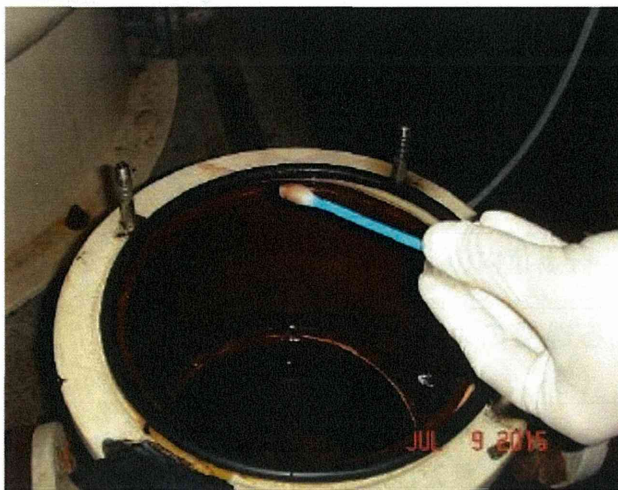
	一般細菌数	従属栄養細菌数※
モノクロラミン消毒区	45	35
遊離塩素消毒区	1.1×10^3	1.2×10^3

※ R2A 培地にて試験を実施しましたが、確認されたコロニーは培養初期にみられ、一般細菌と同様のものであり、所謂実証試験現場で認められている従属栄養細菌とは異なると考えられます。

2. HC の外観写真

モノクロラミン処理区（男女内湯）

遊離塩素処理区（男女露天（檜））



- ・ HC（ヘアークッチャー）の配管部は、上写真の通り、遊離塩素処理区と比べて非常に綺麗な状態となっており、微性物汚染も殆ど認められない状況でした。

表 6 従属栄養細菌に対する各種薬剤の殺菌効力試験

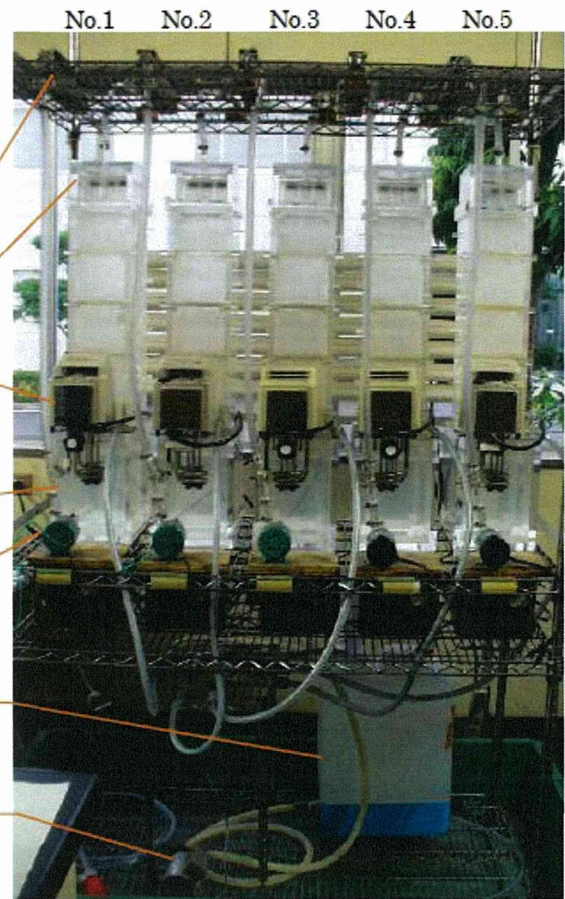
薬 剤 名	濃度	30 分後		120 分後		薬 剤 名	濃 度	30 分後	120 分 後
		菌数 (CFU/100mL)	最終濃度 (mg/L)	菌数 (CFU/100mL)	最終濃度 (mg/L)			菌数 (CFU/100mL)	菌数 (mg/L)
モ	5 mg/L	3.4×10^5	4.9	3.3×10^5	4.5	過 酸 化 水 素	0.5%	1.0×10^3	
ノ	10 mg/L	2.6×10^4	9.7	1.0×10^4	9		1.0%	1.1×10^2	
ク	15 mg/L		14.2		13.6		1.5%		<10
ロ	20 mg/L		18.8		18.1		2.0%		
ラ	25 mg/L	<10	23.1	<10	21.1		2.5%	<10	
ミン	30 mg/L		28.1		25.5		3.0%		
遊 離 塩 素	5 mg/L	3.2×10^5	3.7	1.5×10^5	2.7	対 照			
	10 mg/L	2.2×10^5	7	5.6×10^4	7				
	15 mg/L	7.0×10^4	14		12.5			3.9×10^5	3.3×10^5
	20 mg/L	5.0×10^4	16.4	<10	15.2				
	25 mg/L	4.2×10^4	21.1		19.9				
	30 mg/L	6.1×10^3	25.7		25.8				

表 7 モノクロラミン消毒における適正濃度

貯湯槽内の消毒方法	50~100mg/L を内壁に噴霧
ろ過器の消毒方法 (ろ過器に直接注入して消毒する場合)	5mg/L 以上を注入
ろ過器の消毒方法 (浴槽水に投入し循環させて消毒する場合)	浴槽水に投入し 10mg/L 以上として 1 時間以上循環後、中和処理して排 出
配管等の設備の消毒方法 (浴槽水に投入し循環させて消毒する場合)	
浴槽水の消毒方法 (通常の浴槽の場合)	3mg/L 以上

【回流装置の概要】

回流装置の外観写真を左に示します。全5系統で、1基あたりの保有水量は8.7L。温調器により温度設定が可能で、循環ポンプにより、系内水を循環運転できる仕様となっています。

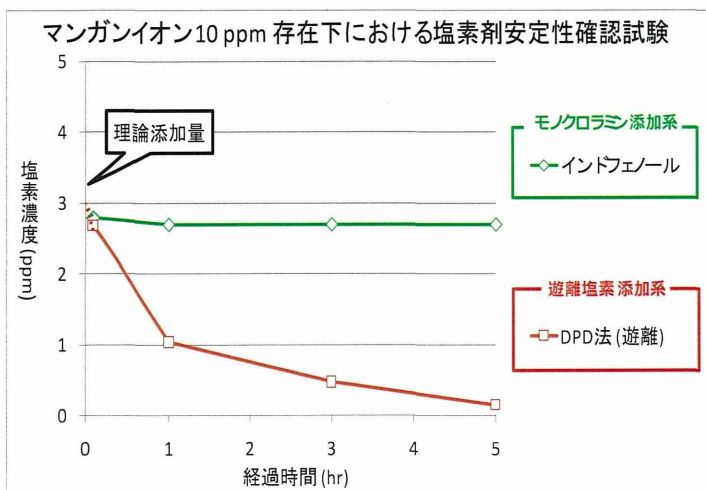


- 上部配管
- 上部水層
- 温調器
- 下部水層
- 循環ポンプ
- オーバーフロー
ストックタンク
- 補給水送水ポンプ

※ 今回の試験では、汚染状況を各系統で均一としたいため、オーバーフロー水を一旦タンクに貯め再度、各系等に一定量送水する試験系としています。

※ モノクロラミンによる高濃度洗浄試験時は、オーバーフロー水の給水を停止し、各系統独立した循環運転下にて、試験を実施しています。

図1 洗浄効果判定試験で使用了5系統の回流装置



塩素剤添加時の外観確認 (40°C 3 時間後)

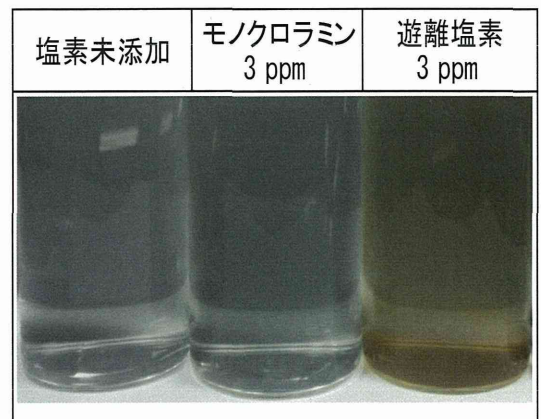
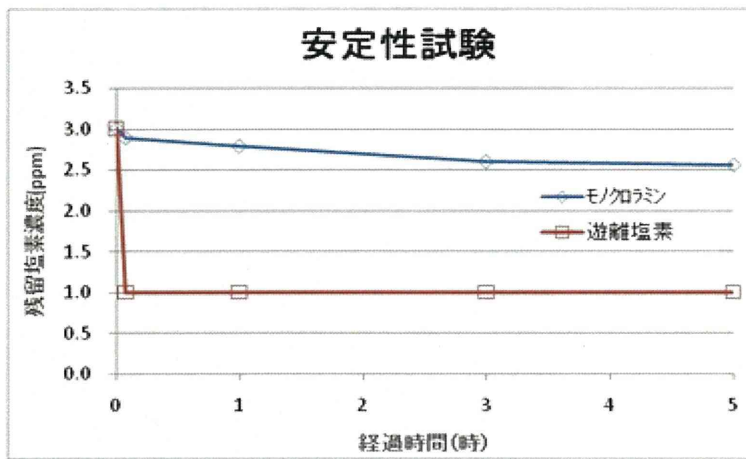


図2 マンガンイオン存在下におけるモノクロラミン安定性試験



《3 時間経過時の外観写真》
未処理 モノクロアミン 遊離塩素



図 3 マンガンイオンを含む地下水を用いたモノクロアミン消毒の事前適合性試験

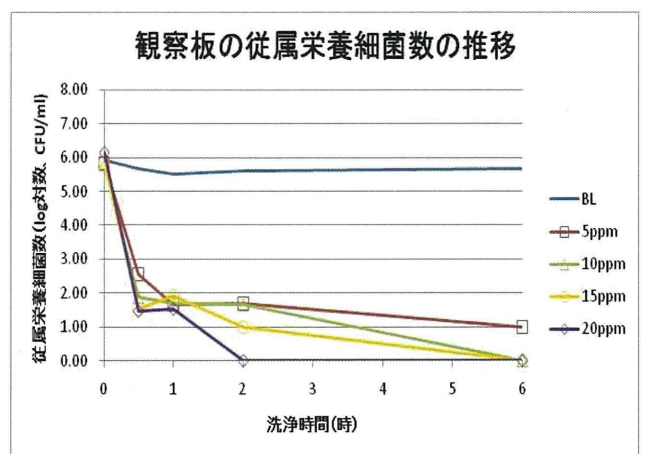
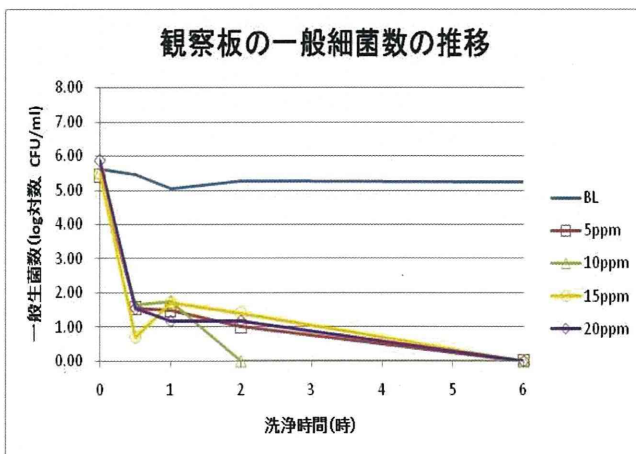


図 4 回流装置 観察板の一般細菌数の洗浄濃度別 経時的推移

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）
研究報告書

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

浴槽水の塩素消毒における電流滴定法の有用性

研究代表者：国立感染症研究所 倉 文明
研究協力者：横浜市衛生研究所 荒井桂子 田中礼子 山之内孝 加藤元規

（研究要旨）

公衆浴場の浴槽水は塩素等で消毒が行われており、日常の残留塩素濃度管理はレジオネラ症防止の観点から非常に重要である。浴場施設の管理者は毎日浴槽水の残留塩素濃度を測定して、適正な塩素濃度に調節している。残留塩素の測定には、DPD 試薬による比色法が用いられることが多い。この方法は簡便で感度が高い上、現場で行うことができることから、行政の立ち入り調査時にもこの方法を用いている。しかし、この方法は発色の桃色の色調変化が見にくく、着色を呈している温泉等では DPD 試薬の比色による測定が難しい。また、測定対象水がアンモニア態窒素を高濃度で含有する場合、塩素剤と反応して高濃度の結合残留塩素を生じ、短時間に DPD 試薬と反応して桃色を呈するため、遊離残留塩素と結合残留塩素の区別がつきづらいなど、問題が多い。

そこで、着色している温泉試料を対象に、電流滴定法の有効性を、通常現場で使用している DPD 試薬と比較した。

その結果、通常使用している DPD 試薬では判断できなかった着色試料の残留塩素を、電流滴定法では遊離残留塩素と結合残留塩素に区別して求めることが可能であった。また、アンモニア態窒素が高い濃度で含まれる試料においては、DPD 試薬では遊離残留塩素として測定されていた残留塩素を、結合残留塩素として検出することが出来た。

A. 研究目的

公衆浴場の浴槽水は塩素等で消毒されており、毎日残留塩素濃度の測定が行われ、適切な塩素濃度範囲が保たれるように管理されている¹⁾。現場での毎日の測定には DPD 試薬を用いた比色法²⁾が多く用いられており、行政による立ち入り検査や指導時もこの方法を用いている。DPD 試薬による比色法は水道水を原水とした白湯には有効であるが、着色した温泉等では比色が難しい。この場合は「測定不可能」として遊離残留塩素を測定しないことがあり、公衆衛生上の維持管理に問題が生じる。そのうえ、立ち入りを行う行政も遊離

残留塩素の確認が出来ず、改善指導に支障が生じていた。

また、アンモニア態窒素を高濃度で含有する地下水を原水とする浴槽水に塩素剤を投入すると、アンモニア態窒素と反応して結合残留塩素（モノクロラミン、ジクロラミン）が高い濃度で生じる。この状況下で DPD 法を用いて測定を行うと、試薬と結合残留塩素が瞬時に反応して濃い桃色を呈するため、遊離残留塩素の見分けがつかなくなる。この事象はアンモニア態窒素が水質基準に含まれていないことから、あまり認知されていない。そのため、高濃度の結合残留塩素による発色を遊

遊離残留塩素と誤認している場合がある。そのため、本来不足している塩素剤の量を低減するなど逆の操作を誘発している。アンモニア態窒素を高濃度に含有する地下水を、塩素消毒して浴槽水として使用することに無理があるが、現実に使用している営業施設があり、塩素濃度の管理のために測定方法の対応が必要となっている状況がある。

そこで、着色の障害を受けず、遊離残留塩素と結合残留塩素を区分して測定が出来るといわれる電流滴定法³⁾を用いて、対象試料が着色している場合と、アンモニア態窒素が高い濃度で含まれる場合の有効性を、通常現場で使用している DPD 試薬と比較したので報告する。

B. 材料および研究方法

1. 対象試料

(1) 公衆浴場施設 A

温泉浴槽水 4 試料 (A~D)、温泉原水 1 試料。泉質はナトリウム-炭酸水素塩泉。浴槽水および源泉は黒褐色透明。

(2) 公衆浴場施設 B

温泉浴槽水 2 試料 (E、F)、温泉原水 1 試料。泉質はナトリウム-塩化物炭酸水素塩泉。浴槽水および源泉は黒褐色透明。施設 B は原水槽に塩素を注入しており、原水槽前からは採水できなかった。また、浴槽 F には炭酸ガスを注入していた。

2. 検査項目

(1) 研究室

遊離残留塩素、結合残留塩素、レジオネラ属菌、一般細菌、従属栄養細菌、色度、濁度、pH、アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素。

(2) 現場検査

遊離残留塩素、結合残留塩素、水温、pH。

3. 検査方法

(1) 残留塩素

a) 電流滴定法

研究室では電流滴定法を用いた。残留塩素電流滴定器 AT-II 型 (磯村)。試薬は 0.00564N フェニル・アルセン・オキシド溶液 (磯村)、酢酸緩衝溶液 pH4 (磯村)、リン酸緩衝溶液 pH7 (磯村)、ヨウ化カリウム (特級、関東化学) を用いた。結合残留塩素値は総残留塩素値から遊離残留塩素値を引いて算出した。

b) DPD 試薬による比色法

現場検査では DPD 法を用いた。施設 A ではポサイドン水質比色検定器ダイヤル型 DP2 (水道機工)、DPD 試薬 (水道機工) を、施設 B ではポサイドン水質比色検定器ダイヤル型 DP2 (水道機工) および DPD 試薬 (SIBATA) を用いた。

(2) レジオネラ属菌

試料 500ml を 5ml にろ過濃縮し、0.5ml をマイクロチューブに分取し、残りを保存した。分取した濃縮試料を 50℃30 分間加熱処理し、冷却後ボルテックスで攪拌し、GVPC 培地 (極東製薬) 3 枚に 100、100、10 μ l を塗抹し、37℃、7 日間培養した。出現したコロニーのうち斜光法でカットガラス様の模様を有するコロニーを計数した。レジオネラ属菌の同定には LAMP 法 (Loopamp レジオネラ検出試薬キット E、リアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA、栄研化学) を用いた。

(3) 一般細菌、従属栄養細菌

一般細菌は標準寒天培地 (ニッスイ) で 36℃、24 時間培養後、出現したコロニーを計数した。従属栄養細菌は R2A 培地 (ニッスイ) で 20℃、7 日間培養後、出現したコロニーを計数した。

(4) 色度、pH、濁度

色度は Lambda650 (PerkinElmer)、透過炎測定法。pH は HM-35V (東亜 DKK)、ガラス電極法。濁度は V-650 (日本分光) 積分球式光電光度法。

(5) アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素

イオンクロマトグラフ法により測定を行う

た。装置は ICS1100（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いた。アンモニア態窒素の測定に際しては、カラムは CG16 および CS16（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を、標準品はアンモニア性窒素標準原液 100（関東化学）を用いた。亜硝酸態窒素および硝酸態窒素の測定に際しては、カラムは AG23 および AS23（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を、標準品はの亜硝酸性窒素標準原液 100 および硝酸性窒素標準原液 100（関東化学）を用いた。

C. 結果と考察

1. 施設 A

(1) 結果

測定結果を表 1 に示した。

遊離残留塩素は現場測定で行った DPD 法で浴槽水 A~D は 0.4mg/l を示し、同時に行った施設管理者の測定でも 0.4mg/l を示した。しかし、電流滴定法では 0.07mg/l と非常に低い値を示した。また、電流滴定法による結合残留塩素は 0.10~0.13 mg/l と低い値であった。

レジオネラ属菌は原水、浴槽水 A~D のすべてで不検出（10cfu/100ml 未満）であった。一般細菌は原水が 93cfu/ml であったのに対し、浴槽水 A は 1.3×10^3 、C は 1.0×10^3 、B、D は 1.3×10^5 cfu/ml と菌数が増加していた。従属栄養細菌は原水が 4.3×10^2 cfu/ml であったのに対し、浴槽水 A は 1.1×10^4 、C は 1.2×10^4 、B は 2.0×10^6 、D は 2.4×10^6 cfu/ml と菌数が増加していた。

アンモニア態窒素は原水が 7.0mg/l であったが、浴槽水 A は 2.6、C は 2.7、浴槽水 B、D は 2.5 mg/l 未満と減少していた。亜硝酸態窒素は原水が 0.1mg/l 未満であったが、浴槽水 A、C は 2.2、浴槽水 B は 6.5、D は 6.7 mg/l と増加していた。硝酸態窒素は原水、浴槽水 A~D のすべてで 1.3 mg/l 未満であった。

pH はいずれも 8.4~8.7 を示し、次亜塩素酸ナトリウム製剤の消毒効果の少ないアルカ

リ側であった。色度は原水が 1,800 度、浴槽水は A~D のいずれも 1,900 度であった。ろ過を行ったカップ（上径 8cm、下径 5cm、水深 7cm）に浴槽水を満たすと、上部からろ紙が全く視認できなくなる状況であった（図 1）。

(2) 考察

浴槽水の遊離残留塩素が、現場測定で DPD 法と研究室での電流滴定法で大きく異なっていた。浴槽水中の遊離残留塩素値が DPD 法の測定値 0.4mg/l であった場合、一般細菌や従属栄養細菌に対し、十分な消毒効果を有するが、施設 A の浴槽水 A~D から検出された一般細菌および従属栄養細菌の菌数は非常に高く、遊離残留塩素の真値が 0.4 mg/l に満たないと考えられた。

現場測定で DPD 法と研究室での電流滴定法で値が異なったのは、いくつかの理由が考えられた。1点目は、現場から研究室までの搬入経過時に塩素が消費された可能性である。しかし、採水は浴槽水を理化学用 1,000ml 容器に満水にした空気層のない状態で、採水から搬入までの時間は 2 時間程度であった。この間に、若干の減少が生じたとしても 2 割未満まで遊離残留塩素が減少する可能性は低いと考えられた。2点目は、DPD 法の比色に対する温泉の着色の影響である。施設 A の浴槽水はいずれも色度 1,900 度の濃い茶褐色であり、この濃い茶褐色をバックグラウンドとした DPD 試薬の微妙な桃色の変化を比色するのは難しい。浴槽水の着色による影響は大きいと思われた。3点目は、結合残留塩素の存在である。DPD 試薬は遊離残留塩素のみが存在しているのであれば直ちに発色し、さらに発色することはないが、結合残留塩素が存在している場合には、反応時間と共に濃く発色し、結合残留塩素濃度が高いほど発色し始める時間も速くなる。施設 A の場合は浴槽水中に結合残留塩素が存在したため、正確に変色を確認しようとするうちに、遊離残留塩素のみ発色している測定時間を逸してしまったのではないかと思われ

た。

アンモニア態窒素を有する水を塩素で殺菌すると、アンモニア態窒素が酸化されて亜硝酸態窒素になり、さらに酸化されて硝酸態窒素になる。施設Aの浴槽水A～Dは原水に含まれていた7.0mg/lのアンモニア態窒素が亜硝酸態窒素へ酸化されて減少しているが、浴槽水A、Cではまだ検出されていた。また、浴槽水A～Dは結合残留塩素が検出されていることから、塩素消毒が不連続点に達していないと思われた。

アンモニア態窒素や一般細菌および従属栄養細菌の値から、DPD法よりも電流滴定法の値が真値に近いと考えられ、電流滴定法が有用であると思われた。

2. 施設 B

(1) 結果

遊離残留塩素は現場測定で行った DPD 法で原水は 1.5、浴槽水 E は 1.0、浴槽水 F は 0.5mg/l を示した。一方、電流滴定法では原水は 0.61、浴槽水 E は 0.55、浴槽水 F は 0.65mg/l を示した。また、電流滴定法による結合残留塩素は、原水は 2.9、浴槽水 E は 1.8、浴槽水 F は 0.26mg/l であった。

レジオネラ属菌は原水、浴槽水 E、F のすべてで不検出 (10cfu/100ml 未満) であった。一般細菌は原水が 1cfu/ml であったのに対し、浴槽水 E は 1.0×10^3 、F は 39 cfu/ml と菌数が増加していた。従属栄養細菌は原水が 3cfu/ml であったのに対し、浴槽水 E は 1.1×10^3 、F は 1.2×10^2 cfu/ml と菌数が増加していた。

アンモニア態窒素は原水が 6.4mg/l であったが、浴槽水 E は 3.8、浴槽水 F は 5.2mg/l と減少していた。亜硝酸態窒素は原水と浴槽水 F が 0.1mg/l 未満であったが、浴槽水 E は 0.2mg/l と増加していた。硝酸態窒素は原水、浴槽水 E、F すべてで 1.3mg/l 未満であった。

pH は原水で 8.3、浴槽水 E で 8.7、浴槽水 F は 6.4 であった。浴槽水 F が弱酸性を示した

のは、炭酸ガスの注入によるものと思われた。色度は原水が 760 度、浴槽水 E は 710、浴槽水 F は 700 度であった。ろ過を行ったカップに浴槽水を満たすと、上部からろ紙が視認できなくなる状況であった。濁度は原水では 0.1 度未満であったが、浴槽水 E は 0.49 度、浴槽水 F は 0.35 度であった。

(2) 考察

原水および浴槽水 E の遊離残留塩素が、現場測定で DPD 法と研究室での電流滴定法で異なっていたが、浴槽水 F の値は比較的近い値を示した。施設 B は施設 A の場合と異なり、電流滴定法でも遊離残留塩素が 0.55mg/l 以上検出されているため、原水と浴槽水 F の一般細菌および従属栄養細菌の菌数が少なかったため、DPD 法と電流滴定法のどちらが真値に近いかは判断ができなかった。

浴槽水 E と F で遊離残留塩素値が電流滴定法で 0.55 と 0.65 とほぼ同等、DPD 法で 1.0 と 0.5mg/l と浴槽水 E の方が高い値であったのに対し、一般細菌が 1,000 と 39cfu/ml と差が生じていた。これは浴槽水 F に炭酸ガスを注入していたため、pH が遊離残留塩素の殺菌効果が高い弱酸性に傾いたため、一般細菌数に差が生じたと思われた。

塩素処理済みの原水でもアンモニア態窒素が 6.4mg/l 検出されており、電流滴定法で遊離残留塩素と結合残留塩素が検出されていたことから、不連続点に達していないと思われた。

D. まとめ

着色した水の残留塩素を比色法の DPD 法で正確に測定するのは、その色が濃いほど難しい。電流滴定法は着色の度合いに係らず、測定が可能であり、非常に簡便である。また、アンモニア態窒素を含有する浴槽水の結合残留塩素の妨害も受けづらいことから、着色した水やアンモニア態窒素を含有する浴槽水の遊離残留塩素を測定するには、電流滴定法は

有用と思われた。

参考文献

- 1 公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について, 健発第 0214004 号、厚生労働省健康局長, 平成 15 年 2 月 14 日.
- 2 上水試験方法 2011 年版Ⅱ理化学編 (無機物部会), 日本水道協会, 2011 ; p.216-218.

3 上水試験方法 2011 年版Ⅱ理化学編 (無機物部会), 日本水道協会, 2011 ; p.222-224.

F. 論文発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 施設 A の検査結果

検査項目	検査結果				
	温泉原水	浴槽水A	浴槽水B	浴槽水C	浴槽水D
電流滴定法 遊離残留塩素 (mg/L)	0.03未満	0.07	0.07	0.07	0.07
電流滴定法 結合残留塩素 (mg/L)	0.03未満	0.10	0.10	0.13	0.13
現場測定 (DPD法) 遊離残留塩素 (mg/L)	0.1未満	0.4	0.4	0.4	0.4
一般細菌 (cfu ¹⁾ /mL)	93	1300	130000	1000	130000
従属栄養細菌 (cfu ¹⁾ /mL)	430	11000	2000000	12000	2400000
レジオネラ属菌 (cfu ¹⁾ /100mL)	不検出 (10未満)	不検出 (10未満)	不検出 (10未満)	不検出 (10未満)	不検出 (10未満)
アンモニア態窒素 (mg/L)	7.0	2.6	2.5未満	2.7	2.5未満
亜硝酸態窒素 (mg/L)	0.1未満	2.2	6.5	2.2	6.7
硝酸態窒素 (mg/L)	1.3未満	1.3未満	1.3未満	1.3未満	1.3未満
pH 値	8.4	8.7	8.4	8.7	8.4
色度 (度)	1800	1900	1900	1900	1900
濁度 (度)	測定不能	測定不能	測定不能	測定不能	測定不能

1) : colony forming unit コロニー形成単位の略

表 2 施設 B の検査結果

検査項目	検査結果		
	塩素添加済み 温泉原水	浴槽水E	浴槽水F
電流滴定法 遊離残留塩素 (mg/L)	0.61	0.55	0.65
電流滴定法 結合残留塩素 (mg/L)	2.9	1.8	0.26
現場測定 遊離残留塩素 (mg/L)	1.5	1.0	0.5
一般細菌 (cfu ¹⁾ /mL)	1	1000	39
従属栄養細菌 (cfu ¹⁾ /mL)	3	1100	120
レジオネラ属菌 (cfu ¹⁾ /100mL)	不検出 (10未満)	不検出 (10未満)	不検出 (10未満)
アンモニア態窒素 (mg/L)	6.4	3.8	5.2
亜硝酸態窒素 (mg/L)	0.1未満	0.2	0.1未満
硝酸態窒素 (mg/L)	1.3未満	1.3未満	1.3未満
pH 値	8.3	8.7	6.4
色度 (度)	760	710	700
濁度 (度)	0.1未満	0.5	0.4

1) : colony forming unit コロニー形成単位の略

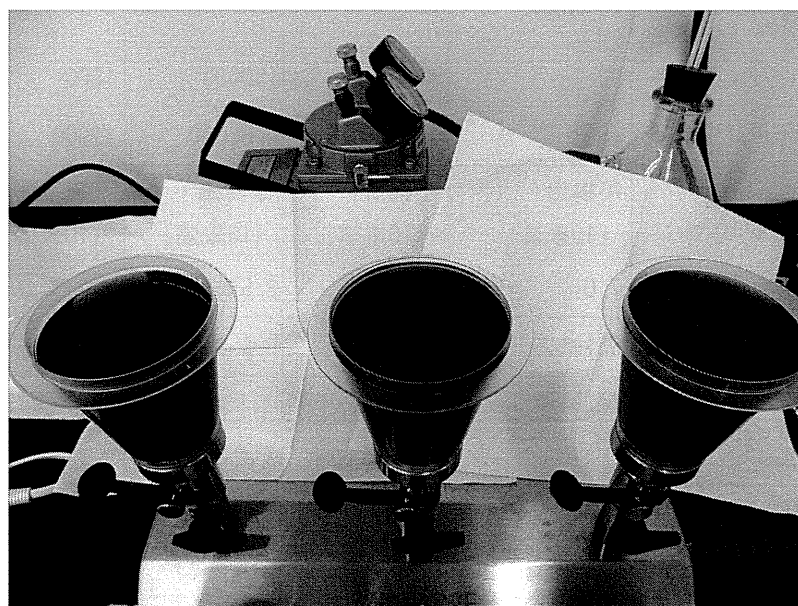


図 1 施設 A の浴槽水のろ過風景

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 27 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¹⁾されている。我が国でも建築物における空調用冷却塔が夏季に多く稼働しており、レジオネラ症感染のリスクがある。冷却水起因のレジオネラ症防止に資するために、冷却水におけるレジオネラ汚染の実態把握、市中の空気中のレジオネラ存在調査の検討及び、冷却水のレジオネラ属菌を抑制するための消毒、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。

前年度の調査で冷却水中のレジオネラ属菌クローンライブラリー解析の結果、菌種の多様性と、難培養性のレジオネラ属菌の存在を示唆した。今年度は、難培養性レジオネラ属菌をアメーバ共培養と定量 PCR の組み合わせで検出した。培養法でレジオネラ属菌が不検出、PCR 法でレジオネラ属菌の DNA が検出された冷却水 13 試料を調査し、5 試料でレジオネラ属菌の DNA の増加を認めた。

クローン解析の結果、*Legionella drozanskii* 等の難培養性レジオネラ属菌が検出された。このことより、実冷却水では従来の培養法で検出されないレジオネラ属菌が存在しており、その存在は PCR 検査により認識することが出来ることがわかる。

サイクロン式エアサンプラー(コリオリス μ) による空気中のレジオネラ属菌の定量的測定法を確立した。実際の冷却塔の内部や近傍では空気中にレジオネラ属菌が存在し、検出量は冷却水中のレジオネラ属菌数と相関が認められた。また、市街地の空気を採取して調査した結果、レジオネラ属菌の遺伝子が検出され、ビルが多い繁華街や土埃汚染が多い地域で、検出される遺伝子量が多い傾向であった。

モデル冷却塔により、前年度に引き続き各種殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果を調査した。結合臭素(全塩素 3mg/L)処理では $10^3 \sim 10^4$ CFU/100mL のレジオネラ属菌が検出され、レジオネラ属菌の抑制効果は無かった。遊離塩素処理は、運転停止による残留塩素の消失、pH が 8.7 でアメーバが増殖した結果、レジオネラ属菌が検出された。遊離臭素処理においてもレジオネラが検出されており、遊離塩素と遊離臭素処理では、pH 条件、運転休止の影響など維持管理上の注意点が明確になった。

A. 研究目的

レジオネラ症の週別発生件数は、6 月初旬から 9 月にかけての夏季に多い傾向にある。この理由として、空調用冷却水からの感染が推定

される。わが国の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例¹⁾は、冷却塔を感染源とするものが主である。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レジオネラ属菌抑制対策を講じる必要がある。

本研究では、冷却水起因のレジオネラ症防止に資するために、①冷却水におけるレジオネラ汚染の実態把握、②市中の空気中のレジオネラ存在調査の検討及び、③冷却水のレジオネラ属菌を抑制するための消毒、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。

B. 研究方法

1. 冷却水の難培養性レジオネラの検出

実際の冷却水において、培養法でレジオネラ属菌の生菌不検出であり、遺伝子検査法で陽性となった冷却水 13 試料 (表 1.) についてアメーバ共培養によるレジオネラ属菌の増殖性を調査した。

アメーバ共培養は 25 cm² の培養フラスコに *Acanthamoeba* sp. AC3722-12 (環境分離株) を PYGC 培地で培養 (30°C, 4 日間) し、培養フラスコの底一面にアメーバを増殖させ、培養上清を 10 mL の Page' s saline に置換した後、冷却水の 100 倍濃縮液を 0. 1 mL 添加して 30°C で 15 日間培養した²⁾。

アメーバ共培養 6 日目と 15 日目にサンプリングして培養法 (試料液 0. 1mL, GVPC 培地, 37°C, 8 日間) および定量 PCR 法 (試料液 50 μL, Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit, タカラバイオ) でレジオネラ属菌を検出した。また、PCR 増幅産物をクローニングして 16S rRNA 遺伝子の一部の塩基配列 (616 bp) を決定³⁾することで、PCR で検出したレジオネラ属菌を同定した。

2. 市中の空気中のレジオネラ属菌存在調査

エアサンプラーはコリオリス μ (Bertin 社, フランス) を用いた (図 1.)。コリオリス μ は専用の捕集容器に入れた 15 mL の捕集液 (滅菌脱イオン水) 中に空気中の粒子を捕集する。空気の吸引量は 300 L/min であり、10 分間ないし 20 分間吸引して、捕集液中のレジオネラ属菌を培養法と定量 PCR 法で検査した。

培養法による検査は、捕集液を酸による前処理後 0. 1mL ずつ 5 枚の選択培地に接種して培養し

レジオネラ属菌を検出した

定量 PCR 法は、捕集液 2 mL をマイクロチューブに移し、15000 rpm で 10 分間遠心して上清を除き、アルカリ熱抽出法⁴⁾により DNA を抽出した。抽出した DNA は NucleoSpin gDNA Clean-up Kit (タカラバイオ) で精製した。定量 PCR は Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ)、および Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラバイオ) を用い、使用方法は各取扱説明書に従った。

空気の捕集は、実際に運転している冷却塔 4 基について、冷却塔の内部 (点検口から 0. 5m) 及び冷却塔の側面約 1m 付近でのサンプリングとした。

また市街地のレジオネラの存在調査のために、市街地の一定範囲内を乗用車で移動しながら、右後部座席の窓から空気を採集した。採集日は 2015 年 9 月 21 日で、東京地方の天気は晴れ、最高気温は 27. 5°C、最低気温は 19. 5°C、湿度は 45%、東の風 3 m/s だった。採集箇所は、国道 294 号 (茨城県常総市)、東京都の渋谷駅周辺、新宿駅周辺、銀座周辺、国道 254 号 (春日町交差点から東池袋 2 丁目交差点)、池袋駅周辺、首都高速道路 (東池袋から扇大橋)、および茨城県つくば駅周辺とした。陰性対照は弊社研究所の実験室内で採集した。

3. 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 (つくば総合研究所 (茨城県つくば市) に循環式モデル冷却塔を設置して、各種殺菌剤を添加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、電気ヒーターにより常時水温を 30°C に維持し、つくば市水を 7L/day 補給した。以下の 3 種類の殺菌剤で試験を行った。

①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、循環水中の遊離塩素濃度を 0. 4 から 1. 0mg/L に維持。

②遊離臭素：次亜臭素酸を残留塩素濃度測定計器により制御しつつ添加して、循環水中の遊離臭素濃度を 0. 4 mg/L (asCl₂) に維持。

③結合臭素：結合臭素剤 (臭素化スルファミン酸) を連続的に添加して、循環水中の全残留濃度を

3 mg/L (asCl₂)に維持。

モデル冷却塔は 2015 年 3 月から継続して循環運転しており 2016 年 2 月 18 日までの結果を得た。この運転期間中、無処理期間の設定、残留塩素の変更、休日運転停止などの条件調整を行っている。

原則として 1 週間に一度、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測定した。

レジオネラ属菌の検査は以下の方法で行った。

試料水 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 酸性リン酸緩衝液 (pH 2.2) を加えて 10 min 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、8 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。

アメーバ数の測定は、試料水 50 mL 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。

C. 結果と考察

1. 冷却水の難培養性レジオネラの検出

アメーバ共培養した 13 試料について、培養法では 13 試料全てが不検出となりレジオネラ属菌の増殖は検出できなかった。定量 PCR 法では 5 試料においてレジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子のコピー数の増加が認められた。(図 2.)

この結果から、難培養性レジオネラ属菌のアメーバ内増殖が示唆された。各 PCR 増幅産物をクロニングした結果を図 3. に示す。CTW-A から得られた全てのクローンは *Legionella drozanskii*, CTW-I から得られた全てのクローンは *Legionella lytica*, CTW-L および CTW-M から得られた一部のクローンは *Legionella massiliensis* の 16S rRNA 遺伝子部分配列とほぼ一致した (図 3. の黄色部分)。一方、CTW-J から得られた全てのクローンと

CTW-L および CTW-M から得られたほとんどのクローンは *L. drozanskii* と同じクラスターに分類されたため、これらのクローンは *L. drozanskii* の近縁種と推測する (図 3. の水色部分)。

L. drozanskii や *L. lytica* は通常の培養法では検出できないレジオネラ属菌として知られる。今回の調査の結果、冷却水中に生息する多様な培養法では検出できないレジオネラ属菌の生菌の存在を確認した。

PCR 法では、これら難培養性のレジオネラ属菌も検出されるため、冷却水系のレジオネラ感染源としてのリスク評価には PCR 法による検出を活用することも重要である。

2. 市中の空気中のレジオネラ属菌存在調査

(1) 冷却塔の周辺での調査結果

調査した 4 基の冷却塔循環水のレジオネラ属菌数を表 2. に示す。CT-A, B, C からはレジオネラ属菌の生菌、遺伝子ともに検出したが、CT-D からはレジオネラ属菌の生菌は検出しなかった。

捕集液からの定量 PCR によるレジオネラ属菌は吸引した空気 1 m³ 中のレジオネラ属菌遺伝子のコピー数に換算して示す。各冷却塔の内部と外部から採集した空気中のレジオネラ属菌の遺伝子検出結果を図 4. に示す。各冷却塔ともに冷却塔内部の方が外部よりもレジオネラ属菌の遺伝子量が多かった。冷却水中のレジオネラ属菌の遺伝子量と比較すると、上部のファンが稼働中の CT-A と CT-C では、水中の遺伝子量が多い CT-C の方が空気中の遺伝子量が多かった。上部ファンが停止中の CT-B は、冷却水中のレジオネラ属菌の遺伝子量が最も高かったが、空気中のレジオネラ属菌の遺伝子量は比較的 low だった。冷却水から生菌が検出されず遺伝子量も少なかった CT-D の空気からは、極少量の遺伝子が検出された。

また、各捕集液から培養法によりレジオネラ属菌を検出した結果、CT-A 内部から 25 CFU/m³, CT-C 内部から 5 CFU/m³ 検出しており、冷却水中のレジオネラ属菌数が多い CT-A の方が空気中のレジオネラ属菌数が多かった。一方、CT-B 内部から生菌は検出しなかった。これは、CT-B は上部のファンが停止しておりエアロゾルの発生が少

なく、レジオネラ属菌の飛散が少なかったものと推察する。これらの結果は、稼働中の冷却塔では冷却水のレジオネラ属菌汚染量と飛散するレジオネラ属菌の量に相関があることを示唆する。

(2) 市街地での調査結果

各採集エリアおよび移動時に採集した空気中のレジオネラ属菌遺伝子検出結果を図 5. に示す。渋谷駅周辺、新宿駅周辺、銀座周辺、および池袋駅周辺で採集した空気中からは 10 から 100 copies/m³ のレジオネラ属菌の遺伝子を検出した。国道 294 号(常総市)では都内の繁華街と同レベルのレジオネラ属菌の遺伝子を検出した。これは、空気採集の 11 日前に発生した常総市を流れる鬼怒川の氾濫による水害により、辺りが土埃にまみれていた影響と推察する。また、首都高速道路でも僅かながらレジオネラ属菌の遺伝子を検出した。一方、国道 254 号、つくば駅周辺ではレジオネラ属菌の遺伝子は検出しなかった。

各採集場所の捕集液から培養法によりレジオネラ属菌の生菌の検出を試みたが、何れの捕集液からもレジオネラ属菌の生菌は検出しなかった。この結果より、ビルの密度の高い繁華街や土埃の多い地区では空気中にレジオネラ属菌の遺伝子が存在することが確認された。

3. 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

3 種類の殺菌剤を評価するための循環試験を 2015 年 3 月から、2016 年 2 月 18 日まで行い、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。

2015 年 3 月からのレジオネラ属菌、アメーバ、ATP、一般細菌数、従属栄養細菌数の検査結果を時系列的にグラフ化したものを図 6. から図 10. に示す。各図中の薄青の帯は、長期休暇の運転停止である。

遊離塩素処理を赤い四角マーカと線で示す。3 月 5 日から 5 月 11 日までは、0.4mg/L 維持、以降は 1.0mg/L 維持した。遊離臭素処理は、青い X マーカと線で示す。8 月 24 日に処理を開始しており、0.4mg/L(asCl₂) の濃度を維持した。8 月 24

日以前は無処理状態であった。結合臭素(臭素化スルファミン酸)は、黒丸マーカと線で示す。これも 8 月 24 日に処理を開始しており、全残留濃度として 3mg/L(asCl₂) を維持した。8 月 24 日以前は白丸マーカで示しており無処理である。結合臭素処理では、2016 年 1 月 18 日からその水系に、CMI 製剤の殺菌剤を 20mg/L、週 2 回添加している。

レジオネラ属菌は、結合臭素処理では全残留濃度 3mg/L(asCl₂) の条件では 10³~10⁴CFU/100mL の高菌数が連続的に検出された。1 月 18 日に CMI 製剤を添加したところ直ちに不検出となった。

遊離塩素処理は、0.4mg/L で 10²CFU/100mL が連続的に検出され、その後 1.0mg/L と濃度を高めた結果やや菌数レベルが低くなったが、継続的に数 10CFU/100mL が検出されている。

遊離臭素処理は、0.4mg/L(asCl₂) でそれまでの無処理状態 10³CFU/100mL レベルを数 10CFU/100mL に低下させている。但し散発的に数 10CFU/100mL が検出されている。

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。無処理期間と結合臭素処理では、ほぼ常時アメーバが検出されている。遊離塩素処理は、5 月 11 日に残留濃度を 0.4 から 1.0mg/L に高めた結果アメーバ数が減少したが、8 月以降再度定着を始め 10²PFU/100mL 程度となった。遊離臭素処理では 0.4mg/L(asCl₂) でアメーバ類を抑制している。結合臭素処理で 10²PFU/100mL 存在したアメーバ類は 1 月 18 日からの CMI 製剤の添加により不検出とすることが出来た。

ATP は無処理期間や結合臭素処理では数 100pmol/L を維持するが遊離塩素、遊離臭素処理 1pmol/L 以下にまで低下した。

一般細菌数は、殺菌剤の添加により低く推移する傾向が認められる。従属栄養細菌数は結合臭素、遊離塩素では無処理と同程度の菌数であるが、遊離臭素では低い菌数で推移している。

今回の試験結果より、結合臭素処理は循環水中の結合濃度を 3mg/L(asCl₂) 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。結合臭素処理では、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。

遊離塩素処理では、pH8.7、残留濃度 0.4mg/L で常時アメーバ、レジオネラ属菌を抑制できず、1.0mg/L でもアメーバは抑制できずレジオネラが継続的に低菌数検出した。遊離臭素処理は遊離塩素処理に比較してアメーバ、レジオネラとも抑制的であるが、常時不検出にはならなかった。

CMI 製剤は、週 2 回 20mg/L の添加により水系に定着したレジオネラ、アメーバ類を不検出した。

D. 結論

(1) 培養法でレジオネラが不検出、遺伝子が検出された冷却水について、アメーバ共培養でレジオネラの増殖を調査した。13 検体中 5 検体で培養不能レジオネラ属菌の生菌の存在が確認された。実冷却水における、培養不能レジオネラ属菌生菌の存在が示され、冷却水系のレジオネラ感染源としてのリスク評価に PCR 法によるレジオネラ属菌遺伝子検出の重要性が示された。

(2) 市中の空気中のレジオネラ属菌の存在。エアサンプラーにより、空気中のレジオネラ属菌の存在を調査した結果、冷却塔の内部や側面の空气中に冷却水中の菌数に相応するレジオネラ属菌が存在した。空気中の菌数は冷却塔のファンが稼働している場合に高くなる傾向である。市街地や土埃の多い地域の空気からレジオネラ属菌の遺伝子を検出した。市街地ではビルの屋上の空調用冷却塔からのレジオネラ汚染が考えられ、今後のレジオネラ症抑制対策のための汚染実態調査の重要性が示された。

(3) 酸化性殺菌剤のレジオネラ属菌抑制効果。結合臭素(塩素化スルファミン酸)処理では結合残留濃度を 3mg/L(asCl_2) 維持しても $10^3 \sim 10^4$ CFU/100mL のレジオネラ属菌が継続的に検出され、レジオネラ属菌の抑制効果は無かった。

遊離塩素(1.0mg/L)処理は、無処理に比較してレジオネラを低菌数に抑制するが、アメーバを抑制できず、レジオネラ属菌が 10CFU/100mL レベルで継続的に検出された。

遊離臭素処理では 0.4mg/L(asCl_2)維持により塩素処理よりもアメーバ、レジオネラを抑制したが

継続的に不検出とはならなかった。

酸化性殺菌剤の使用にあたっては、遊離残留濃度を適正に維持するとともに、レジオネラ属菌が抑制できなくなった場合は CMI 製剤などを併用することが望ましい。

—以上—

E. 参考文献

- 1) 倉文明：レジオネラ症の国内外の動向，ビルと環境. No.149, pp36-44 (2015)
- 2) Inoue, H., Agata, K., and Ohta, H., Detection of uncultured *Legionella* spp. in cooling tower water samples by amoebic coculturing and quantitative PCR. 30th JSME annual meeting & 7th international symposium on Microbial Ecology in Tsuchiura, PN-221. (2015)
- 3) Inoue, H., Fujimura, R., Agata, K., and Ohta, H., Molecular characterization of viable *Legionella* spp. in cooling tower water samples by combined use of ethidium monoazide and PCR. *Microbes and Environments*, **30**, 108-112. (2015)
- 4) Baige, J., Lokies, J., Schaberg, T., Finckh, U., Fischer, M., Mauch, H., Lode, H., Kohler, B., and Rolfs, A. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 90-95. (1995)

F. 研究発表

(1) 学会発表

- 1) 井上浩章, 太田寛行, 縣 邦雄, : 培養法と遺伝子検出法によるレジオネラ属菌検査結果の相違に関する検討. 日本防菌防黴学会第 42 回年次大会, 東京 (2015)
- 2) Inoue, H., Agata, K., and Ohta, H., Detection of uncultured *Legionella* spp. in cooling tower water samples by amoebic coculturing and quantitative PCR. 30th JSME annual meeting & 7th international symposium

on Microbial Ecology in Tsuchiura, PN-221. (2015)

(2) 論文発表

- 1) Inoue, H., Takama, T., Yoshizaki, M., and Agata, K. :Detection of Legionella species in environmental water by the quantitative PCR method in combination with ethidium monoazide treatment . Biocontrol Science, 20. pp71-74(2015)
- 2) Inoue, H., Fujimura, R., Agata, K., and Ohta, H. :Molecular characterization

of viable Legionella spp. in cooling tower water samples by combined use of ethidium monoazide and PCR. Microbes and Environments, 30. pp108-112(2015)

- 3) 井上浩章, 伊藤雅代, 縣邦雄, :サイクロン式エアサンプラーと定量PCRによる空気中のレジオネラ属菌の検出. 日本防菌防黴学会誌, (投稿中)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) なし

表 1. 冷却水の難培養性レジオネラの検出試験に用いた冷却水

	レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)	レジオネラ属菌 DNA 量 (copies/100 mL)	アメーバ数 ^a (PFU/100 mL)	細菌数 ^b (CFU/mL)	pH
CTW-A	<10	2.2×10^3	1.8×10^3 (AC, VK, HT)	2.6×10^6	7.8
CTW-B	<10	1.1×10^5	<2	1.0×10	8.1
CTW-C	<10	9.9×10^5	<2	3.9×10^5	8.1
CTW-D	<10	1.0×10^3	<2	1.2×10^3	8.4
CTW-E	<10	1.6×10^4	2 (AC)	<10	7.9
CTW-F	<10	4.5×10^2	<2	<10	8.8
CTW-G	<10	6.5×10^4	<2	1.6×10^4	8.6
CTW-H	<10	1.3×10^3	<2	1.1×10^5	7.6
CTW-I	<10	4.8×10^4	8.0×10^3 (VN, VK)	1.1×10^6	8.3
CTW-J	<10	1.3×10^3	<2	3.7×10^6	8.5
CTW-K	<10	1.2×10^4	12 (AC)	2.6×10^6	8.0
CTW-L	<10	3.0×10^6	<2	1.8×10^6	8.2
CTW-M	<10	1.5×10^5	6 (HT)	1.3×10^7	8.0

^a 数値の下の括弧はアメーバの種類を示す (AC: *Acanthamoeba* sp., VK: *Vahlkampfiidae*, HT: *Hartmannella* sp., VN: *Vannella* sp.)

^b R2A 培地で 25°C, 7 日間培養したときの細菌数