

平成 29 年度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）
「小規模水供給システムの安定性及び安全性確保に関する統合的研究」
平成 29 年度分担研究報告書

大腸菌および耐塩素性従属栄養細菌に対する顆粒型消毒剤の消毒効果の検証

研究代表者 国立保健医療科学院 浅見 真理
研究分担者 国立保健医療科学院 島崎 大
研究協力者 国立保健医療科学院 前田 暢子
研究協力者 国立保健医療科学院 阿部 功介

研究要旨：

次亜塩素酸ナトリウム溶液の代替として、顆粒状の塩素化シアヌル酸系消毒剤2種（SDIC およびTCCA）の適用を想定し、水供給システムへの適用可能性について、大腸菌（*E. coli* K12）および耐塩素性従属栄養細菌（*S. paucimobilis*）の不活化能力ならびに残留特性等の面から評価した。消毒剤の残留濃度は、消毒対象となる細菌の種別により異なり、SDICおよびTCCAいずれも次亜と同程度以下の残塩保持濃度となる可能性が示された。各消毒剤のCT値および生残率に基づく不活化能力は次亜と同程度であるものの、対象とする細菌種やCT値に応じて前後することが明らかとなった。実際の水供給システムへの適用に際しては、このような各消毒剤の不活化能力ならびに残留特性の相違について留意する必要がある。

A．研究目的

高齢化及び人口減少等により、全国数千の地域において水道管路等で構成される水道及び飲料水供給施設等（以下、水供給システム）を維持することが困難となりつつある。水供給システムにおいて必須である消毒については、本邦で主流となっている次亜塩素酸ナトリウム溶液に対して、地元住民による運搬や補充が重労働となること、周囲への腐食を生じる場合があること、不適切な保管や長期間の使用による有効塩素濃度の低下ならびに塩素酸濃度の上昇が懸念されることなどの課題が指摘されている。

ここでは、次亜塩素酸ナトリウム溶液の代替として、顆粒状の塩素化シアヌル酸系消毒剤の適用を想定し、水供給システムへの適用可能性について、微生物の不活化能力ならびに残留特性等の面から評価することを目的とした。

B．研究方法

(1)消毒剤原液の調整

実験に使用する塩素化シアヌル酸系消毒剤として、ジイソシアヌル酸ナトリウム（SDIC）およびトリイソシアヌル酸（TCCA）を、また、比較対象として次亜塩素酸ナトリウム溶液（次亜）を用いた。SDIC および TCCA はいずれも研究用試薬（和光純薬株式会社製）を 300mg-Cl₂/L となるよう Milli-Q 水に溶解して各消毒剤の原液を調整し、有効塩素濃度を DPD-FAS 滴定法により確認した。長期の冷蔵保管において有効塩素濃度の低下が観察されたため、消毒実験の際には、調整直後から 1 週間以内の消毒剤減益を使用した。次亜として有効塩素濃度 12%の次亜塩素酸ナトリウム溶液（和光純薬株式会社製）を 300mg-Cl₂/L となるよう Milli-Q 水に溶解し、有効塩素濃度を DPD-FAS 滴定法により確認した。

(2)細菌原液の調整および培養方法

消毒実験に用いる大腸菌として *E. coli* K12、塩素耐性のある従属栄養細菌として *Sphingomonas paucimobilis* を選定した（いずれも東京大学大学院工学系研究科 片山 浩之 准

教授より分与)。大腸菌原液は、超低温冷蔵庫に保存された *E. coli* K12 冷凍菌株を LB 液体培地 50mL × 2 本に懸濁し、インキュベータ内にて 37、72 時間以上振盪培養、卓上遠心機にて菌体から培地を遠心分離して高圧蒸気滅菌済み PBS(-) 溶液に再懸濁する操作を 2 回繰り返した後、PBS(-) 2mL × 2 本に再懸濁して調整した。従属栄養細菌原液は、同様に冷凍保存された *S. paucimobilis* 冷凍菌株をニュートリエント液体培地 50mL × 2 本に懸濁し、湿潤条件のインキュベータ内にて 30、72 時間以上振盪培養した後、卓上遠心機にて菌体から培地を遠心分離して PBS(-) 溶液に再懸濁する操作を 2 回繰り返す、PBS(-) 2mL × 2 本に再懸濁して調整した。

各細菌の計数は混釈培養法により行った。*E. coli* K12 の培養には TSA 寒天培地を、*S. paucimobilis* の培養にはニュートリエント寒天培地を用い、前者は 37、18~22 時間、後者は湿潤条件下で 30、42~46 時間、それぞれインキュベータ内で培養した。

(3) 消毒実験

500mL 三角フラスコにそれぞれ 10 倍 PBS(-) 50mL、Milli-Q 水 450mL、マグネットスターラーを入れてアルミホイルをかぶせ、高圧蒸気滅菌 (121、20 分間) した。予備実験により決定した所定量の高圧蒸気滅菌済み 0.1N HCl を添加し、細菌原液および消毒剤原液を添加した後の pH が 7.0 付近となるようにした。攪拌しながら細菌原液 1.0mL (初期濃度 10⁶CFU/mL オーダー)、消毒剤原液 0.833mL (初期濃度 0.5mg-Cl₂/L) を添加し、所定時間ごとに 10mL を採水、0.1% チオ硫酸ナトリウム溶液 100μL 入りの試験管に採取して、細菌の計数に供した。また、所定時間ごとに 10mL を採水、ハンディ型残留塩素計 (HACH 社 Pocket Chlorimeter II) および専用試薬を用いて直ちに遊離残留塩素濃度を測定した。実験終了後に三角フラスコ内溶液の pH を測定し、pH が 7.0 付近であることを確認した。各条件の実験は 3 回繰り返して行った。

C. 研究結果

(1) 各塩素消毒剤の残留塩素濃度の経時変化

次亜、SDIC、TCCA の各消毒剤を *E. coli* K12 または *S. paucimobilis* と接触させた際の残留塩素濃度の経時変化を図 1 に示す。*E. coli* K12 を用いた場合、残留塩素濃度は接触直後より次亜 > SDIC > TCCA となり、接触 6 分後の濃度はそれぞれ 0.24 ± 0.02、0.17 ± 0.004、0.12 ± 0.004mg-Cl₂/L であった。一方、*S. paucimobilis* を用いた場合、接触直後および 12 分後の残留塩素濃度は次亜 > TCCA > SDIC となったものの、60 分後の残留塩素濃度は 0.064 ± 0.013 (次亜) ~ 0.073 ± 0.009mg-Cl₂/L (SDIC) の範囲となり、ウェルシュの t 検定による統計学的な有意差は認められなかった (p < 0.05)。

(2) 各細菌の生残率の経時変化

次亜、SDIC、TCCA の各消毒剤との接触による *E. coli* K12 または *S. paucimobilis* の生残率の経時変化を図 2 に示す。*E. coli* K12 の生残率は、接触直後から次亜 < TCCA < SDIC の順のまま推移し、接触 6 分後の生残率はそれぞれ 3.4 ± 2.0 × 10⁻⁷、4.8 ± 5.5 × 10⁻⁷、9.7 ± 5.6 × 10⁻⁷ であった。一方、*S. paucimobilis* の生残率は、接触直後は次亜 < TCCA < SDIC であったものの、1 分後以降は SDIC < 次亜 < TCCA の順となり、60 分後の生残率はそれぞれ 1.6 ± 0.5 × 10⁻⁶、3.5 ± 4.4 × 10⁻⁶、1.3 ± 0.6 × 10⁻⁵ となった。

D. 考察

(1) 各塩素消毒剤の残留塩素濃度の経時変化

E. coli K12 を用いた場合に各消毒剤の残留塩素濃度に有意差が見られた要因として、大腸菌の初期濃度による影響の可能性が考えられた (次亜: 1.4 ± 0.5 × 10⁶CFU/mL、SDIC: 2.7 ± 0.2 × 10⁶CFU/mL、TCCA: 3.6 ± 0.4 × 10⁶CFU/mL)。しかしながら、*S. paucimobilis* にも同様に初期菌体濃度の差があったものの (次亜: 9.1 ± 0.4 × 10⁵CFU/mL、SDIC: 8.8 ± 0.7 × 10⁵CFU/mL、TCCA: 2.3 ± 0.2 × 10⁶CFU/mL) 残留塩素濃度への影響は特段見られなかった。このため、消毒剤の残

留濃度は、消毒の対象となる細菌の種別により異なることが示された。塩素化イソシアヌル酸系消毒剤である SDIC および TCCA は、いずれも次亜と同程度以下の残塩保持濃度となる可能性があり、日常的な残留塩素濃度の管理において留意すべきと考えられた。

(2)各細菌の生残率の経時変化

各消毒剤とも、接触直後に *E. coli* K12 の大部分を不活化したものの、その生残率は次亜 < TCCA < SDIC の順となり、接触 6 分後も同じ順であった。前項に記したように大腸菌の初期濃度は次亜 < SDIC < TCCA であることを考慮すれば、TCCA の不活化速度は SDIC よりも速いと推定された。*S. paucimobilis* の不活化においては、接触直後の生残率は *E. coli* K12 と同じ順であったものの、1 分後以降は SDIC < 次亜 < TCCA となり、SDIC の不活化速度は次亜および TCCA よりも速いと推定された。このことから、各消毒剤の不活化能力は、細菌の種別により異なることが示された。

(3)CT 値に基づく各消毒剤の不活化能力の比較

前項について定量的に考察するため、各消毒実験の残留塩素濃度が測定間で直線的に減衰すると仮定し、接触時間から CT 値を算出、生残率と比較した(表 1)。すなわち、同程度の CT 値で生残率が小さい消毒剤ほど、より不活化能力が高いとした。この結果、*E. coli* K12 については、接触直後となる CT 値 0.058 ~ 0.068 mg-Cl₂/L・sec の範囲での不活化能力は次亜 > TCCA > SDIC、接触後 30 秒 ~ 1 分となる CT 値 0.42 ~ 0.55 mg-Cl₂/L・sec の範囲では TCCA > 次亜 > SDIC、接触後 3 ~ 6 分となる CT 値 1.05 ~ 1.80 mg-Cl₂/L・sec の範囲では TCCA > 次亜 > SDIC の順となった。また、*S. paucimobilis* については、接触直後となる CT 値 0.058 ~ 0.068 mg-Cl₂/L・sec の範囲での不活化能力は次亜 > TCCA > SDIC、接触後 30 ~ 60 分となる CT 値 6.19 ~ 8.36 mg-Cl₂/L・sec の範囲では SDIC > 次亜 > TCCA の順となった。

以上のことから、各塩素化イソシアヌル酸系消毒剤の不活化能力は次亜と同程度であるものの、対象とする細菌種や CT 値に応じて前後することが明らかとなった。

E . 結論

次亜塩素酸ナトリウム溶液の代替として、顆粒状の塩素化シアヌル酸系消毒剤 2 種 (SDIC および TCCA) の適用を想定し、水供給システムへの適用可能性について大腸菌 (*E. coli* K12) および耐塩素性従属栄養細菌 (*S. paucimobilis*) の不活化能力ならびに残留特性等の面から評価したところ、各消毒剤ともに次亜と同程度以下の残塩保持濃度となる可能性があること、不活化能力は次亜と同程度であるものの、対象とする細菌種や CT 値に応じて前後することが明らかとなった。実際の水供給システムへの適用に際しては、このような各消毒剤の不活化能力ならびに残留特性の相違について留意する必要がある。

F . 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

G . 知的所有権の取得状況

なし

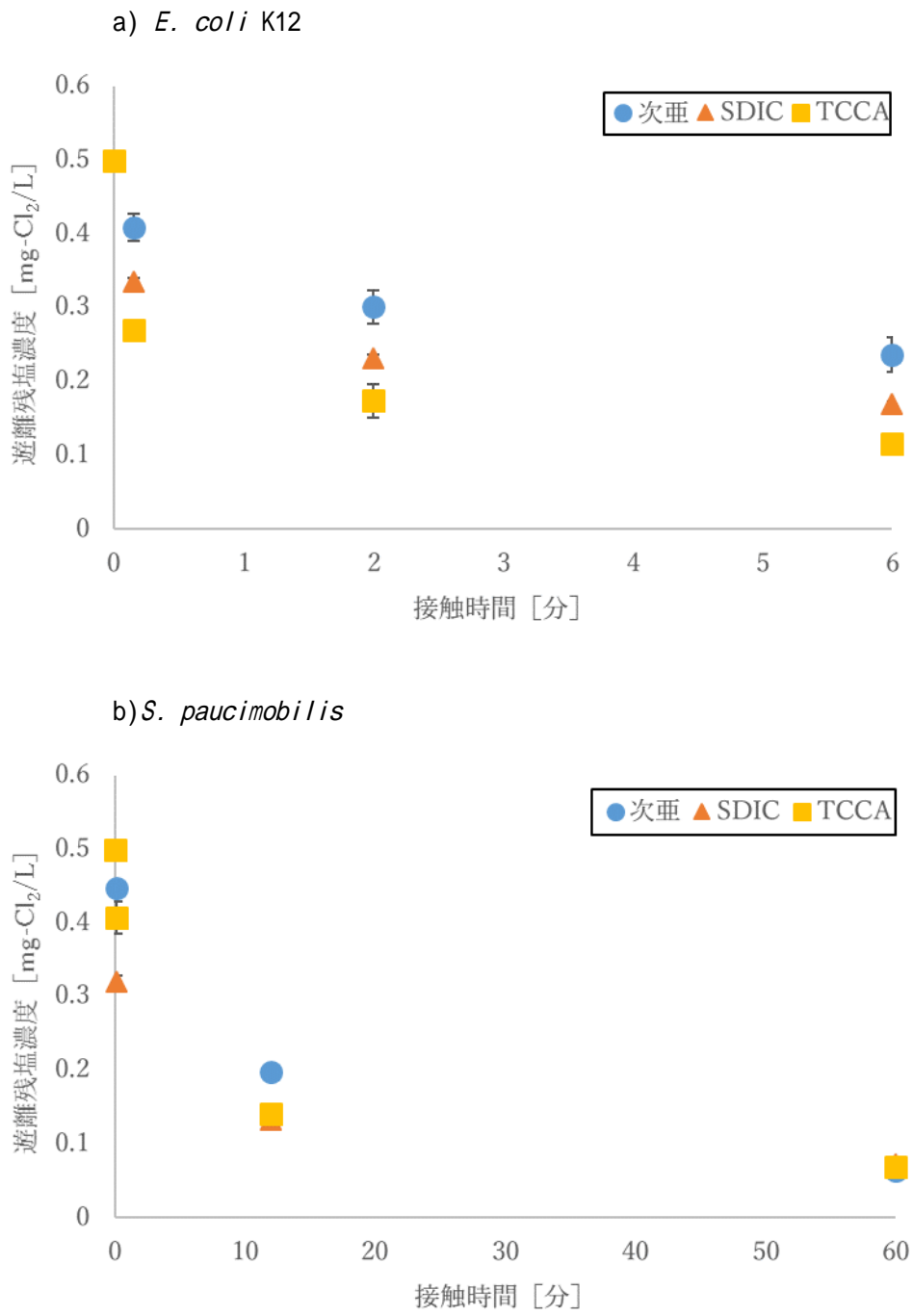


図1 各塩素消毒剤の残留塩素濃度の経時変化

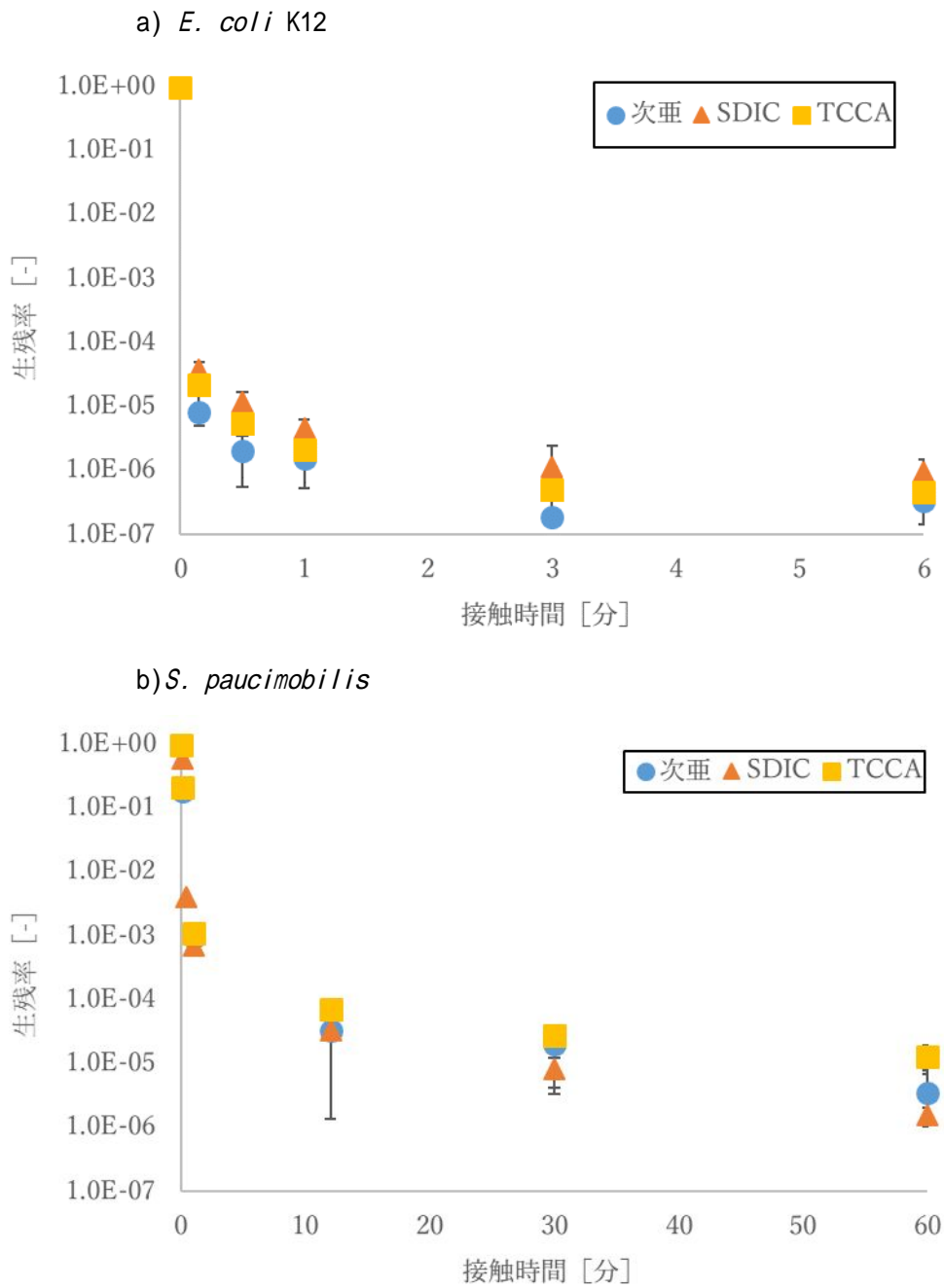


図2 各細菌の生残率の経時変化

表 1 各細菌における CT 値および生残率の比較

a) *E. coli* K12

接触時間	次亜		SDIC		TCCA	
	CT	生残率	CT	生残率	CT	生残率
0.15	0.068	8.25E-06	0.063	3.81E-05	0.058	2.27E-05
0.5	0.546	2.09E-06	0.454	1.19E-05	0.372	5.68E-06
1	0.630	1.6E-06	0.521	4.65E-06	0.424	2.2E-06
2	0.725		0.588		0.469	
3	1.597	1.9E-07	1.254	1.17E-06	0.963	5.24E-07
6	1.801	3.45E-07	1.391	9.71E-07	1.050	4.77E-07

b) *S. paucimobilis*

接触時間	次亜		SDIC		TCCA	
	CT	生残率	CT	生残率	CT	生残率
0.15	0.07	1.9E-01	0.06	6.2E-01	0.07	2.2E-01
0.42			0.42	4.1E-03		
1	0.70	9.6E-04	0.51	7.2E-04	0.64	1.1E-03
12	3.90	3.39E-05	2.75	3.35E-05	3.32	7.35E-05
30	7.66	2.08E-05	5.53	8.39E-06	6.19	2.74E-05
60	10.22	3.54E-06	7.68	1.57E-06	8.35	1.33E-05