

厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)
分担研究報告書

公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究

レジオネラ宿主アメーバに対するモノクロラミンの不活化効果の検討

分担研究者 泉山 信司 国立感染症研究所寄生動物部

研究協力者 小村 麻子 国立感染症研究所寄生動物部

研究要旨: 当該研究事業は浴槽水の消毒方法を検討し、入浴者にとって安全で許容し得る浴槽の維持管理方法の構築を目的とする。レジオネラ属菌汚染防止等の目的で温泉を含む浴用水の施設の消毒は必須となっているが、その一方で消毒剤の使用方法は泉質や設備構造により一様ではない。厚生労働省の通知等では第一選択として塩素剤による消毒を勧奨している。しかし、塩素剤は高 pH やある種の金属イオンを多く含む泉質の湯などでは著しく効果を減ずることが指摘されている。また、アンモニア性窒素を含む泉質ではいわゆる不連続点塩素処理 (break point chlorination) が求められるが、不連続点塩素処理は高度な専門的知識と厳密に管理された条件が要求される。そこで、遊離残留塩素による消毒に換えてあらたな消毒方法の開発が求められている。当該研究ではクロラミン消毒に着目し、レジオネラ属菌の宿主となるアメーバに対する効果を評価した。Naegleria 属アメーバに対して pH 7.5 付近では、Ct 値 ≈ 675 (モノクロラミン 3mg/L で 4 時間未満の処理に相当) で $2\sim 3\text{-log}_{10}$ のアメーバの不活化には達成された。また、pH 9.2 で 35°C の時、Naegleria 属アメーバに対しては Ct 値 $\approx 4,000$ (モノクロラミン 3mg/L で 22 時間強の処理に相当) 程度で 4-log_{10} 以上の不活化効果を示した。一方、Acanthamoeba に対しては Ct 値 $\approx 3,570$ (モノクロラミン 3mg/L で 20 時間程度の処理に相当) で 4-log_{10} 以上の不活化が期待された。

A. 研究目的

温泉等を含む浴用施設ではレジオネラ属菌による汚染防止の目的で消毒は必須となっているが、消毒剤等の使用方法は泉質や浴槽設備などにより一様ではない。厚生労働省の通知等で勧奨されている塩素剤は高 pH や、ある種の金属イオン、有機質等を多く含む泉質では著しく効果を減ずること、塩素臭が生じること、濃度維持が困難であることが指摘されている。当該研

究では遊離残留塩素消毒以外の消毒剤や管理方法の模索が続けられている。

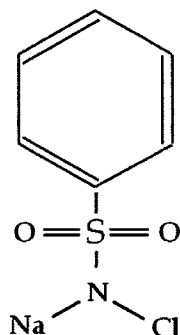
バイオフィルム対策として水道分野で使用が検討されつつあるクロラミン消毒に着目した。クロラミンは高 pH に使用可能で、金属イオン、アンモニウムイオン等による影響を受けにくく、濃度が維持され持続性がよい利点がある。本剤は、塩素剤の一種であることから現行の塩素剤と類似の消毒方法として導入に問題がなく、現場での濃度

測定も可能である。当該研究ではレジオネラ属菌の宿主となるアメーバに対する効果

を評価を行ったので報告する。

研究方法

クロラミン-B : 消毒剤としてクロラミン(関東化学)を使用した。



Chloramine B
Benzenesulfonechloramide Sodium
Salt; MW=213.62 (as Anhydride)
C₆H₅ClN₂NaO₂S · xH₂O

精製水 (MiliQ 水) 1,000mL にクロラミン-B 約 3g 溶解し、保存液とした。本試薬は試薬の概ね 25 重量%が全塩素濃度として検出されることから 3.7 水塩相当と考えられた。実験に際し、既知濃度 (~10mg/L) となるように緩衝アメーバ生理食塩水 (後述) に希釈した。濃度調製は DPD 法 (後述) で全塩素濃度を実測し概ね 4mg/L、6mg/L あるいは 10mg/L となるよう調製した。

塩素濃度測定

水中の遊離残留塩素濃度は DPD 法的全遊離残留塩素測定法により求めた (ポケット塩素計、全塩素用測定試薬; HACH 社)。

アメーバ

Naegleria lovaniensis Aq/9/1/45D 株: 1990 年に Dr. De Jonckheere J より譲渡され、以来、国立感染症研究所において SCGYEM 栄養培地で無菌的な継代培養 (一部凍結保存) により維持されてきた。

Acanthamoeba castellanii castellanii 株: 1990 年に Dr. De Jonckheere J より譲渡さ

れ、以来、国立感染症研究所において PYGC 培地で無菌的な継代培養 (一部凍結保存) により維持されてきた。

いずれも温水環境中に生息する代表的なアメーバで、*Acanthamoeba* と *Naegleria* では各種環境要因に対する耐性が異なる。

培養初期から中期にかけて活発に分裂しているアメーバ栄養体をアメーバ緩衝液 (Page's Amoeba Saline: 添付資料) で 3 回遠心洗浄してから実験に供した。その際、シストの環境耐性は良く知られていることから、シストの混入を避けた。

緩衝アメーバ生理食塩水

pH7.5 リン酸緩衝アメーバ生理食塩水液には Page's Amoeba Saline の化学組成を基本とし、その 10 倍濃度の緩衝液を使用液とした。また、pH 9.2 のホウ酸緩衝アメーバ生理食塩水 (保存液) の塩濃度はリン酸緩衝アメーバ生理食塩水と同じとし、pH 調製は Clark & Lubs のホウ酸緩衝液を用いた。それぞれのアメーバ生理食塩水の組成は以下の通りである。

×10 Page's Amoeba Saline (pH 7.5)

NaCl	1.2g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.04g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04g
KCl	0.75g
0.1 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7.5)	100mL

使用に際して 10 倍希釈する。

pH 9.2 ホウ酸緩衝食塩水

NaCl	1.2g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.04g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04g
0.1 M Clark & Lubs buffer soln. (pH 9.2) *	100mL

使用に際して 10 倍希釈する。

* 0.76g KCl + 0.62g H₃BO₃/100mL を 65.4mL に 0.4g/100mL NaOH (0.1M) 溶液を 34.6mL 加えて 100mL とする

消毒効果判定試験

24 ウェルプレート (Sumilon) にウェルあたり 10⁴、10³、10² 細胞/500μL となるようにアメーバを入れ、で 30 分 (*Naegleria*)、あるいは 3 時間 (*Acanthamoeba*) 程度静置して培養プレート底面にアメーバの定着を待った。緩衝アメーバ生理食塩水で希釈した既知濃度のクロラミン-B 溶液を各アメーバウェルに 500μL 添加し、40℃、あるいは 35℃ に静置して位相差顕微鏡下で細胞の状態を定期的に観察した (図 1)。細胞の変性 (死滅) が確認された時点で 100μL の 0.1M チオ硫酸ナトリウム添加して塩素を中和した。次いで、上清を吸引除去し、培地を加えて 35℃ または 30℃ で数日間培養してアメーバが生残していないことを確認した。

全塩素濃度測定用として別途にアメーバウェルを用意し、消毒開始時と終了時の前塩素量の測定値から Ct 値 = (全塩素濃度 mg/L as CL) × (接触時間 (分)) を算出した。

B. 研究結果

クロラミン-B は有機モノクロラミンの一種で、科学的に安定で残留性に富んでいる。塩素系の薬品であるが、その消毒効果は遊離塩素とは異なり代謝系に働き、細菌類では代謝系の阻害作用により不活化が起こるものと考えられている。

中性域におけるクロラミン-B のアメーバに対する消毒効果 (pH 7.5)

Naegleria に対する効果: *Naegleria lovaniensis* を pH 7.5 の PAGE's Amoeba saline (10 倍濃度) 中でクロラミン-B と 42°C、3 時間の処理を行った (表 1-A~C)。試験期間中の全塩素濃度の減少は小さく、塩素消費は殆ど無視できることが確認された。すなわち、試験開始時に 3.9mg/L であった全塩素量は実験終了時において 3.6mg/L であった。3 回の繰り返し実験の結果、 10^3 の細胞に対して全塩素 4mg/L の接触を行ったウェル (6 ウェル全て) において一部のアメーバの生残が認められ、培地への置換後に生育を確認した。一方、 10^2 の細胞では 6 ウェル全てにおいてアメーバの死滅が確認された。これより、 $2 \sim 3\text{-log}_{10}$ のアメーバの不活化には Ct 値 ≈ 675 で達成された。

Acanthamoeba に対する効果:

Acanthamoeba castellanii を pH 7.5 の PAGE's Amoeba saline (10 倍濃度) 中で 3.8~9.2mg/L の濃度範囲のクロラミン-B と 35°C、2.5 時間の処理を行なった。その結果、この処理時間内では全ての験条件で一部の *Acanthamoeba* が生残した。したがって、Ct 値 $\leq 1,500$ では 2-log_{10} の不活化に達しないものと判断された (表 3-A~C)。ついで、接触時間を 17~20 時間にまで延長したところ、全ての塩素濃度条件でアメーバの死滅が確認された。ここから、Ct 値 $\leq 3,570$ で 4-log_{10} 以上の不活化が期待される。

アルカリ域でのクロラミン-B のアメーバに対する消毒効果 (pH 9.2)

N. lovaniensis を pH 9.2 のホウ酸緩衝アメーバ生理食塩水中で 4.0、5.8、および 9.4mg/L のクロラミン-B に 42°C、3.5 時間のしよりを行なった。その結果、最も強い消毒条件となる 10^2 細胞に対する全塩素

10mg/L の条件でも 6 ウェルすべてにおいてアメーバの一部が生残し、その後の培養でアメーバの回復が認められた (表 2-A~D)。すなわち、Ct 値 $\leq 2,000$ では 2-log の不活化は期待できなかった。なお、42°C の実験条件ではクロラミン-B を含まない陰性対照群においても 3.5 時間以上の処理によりアメーバの変性が確認されたことから、温度条件を 40°C と 35°C の 2 条件に下げて 17 時間の接触を行った。その結果、最も緩やかな条件となる 10^4 細胞に塩素量 4mg/L の処理においても全てのウェルでアメーバの変性 (死滅) が確認された。これより、Ct 値 $\leq 4,000$ で 4-log_{10} 以上の不活化が期待された。なお、pH 9.2 のアルカリ域では塩素の有無にかかわらず *Acanthamoeba* の活性は著しく阻害され、消毒試験の実施に至らなかった。

C. 考察

水環境中のアメーバは基本的にバイオフィーム内、あるいは何らかの構造物の表面に付着しており、当該実験においてもこの条件に倣って実験系を構築した。レジオネラの宿主アメーバとして知られる代表的な *Acanthamoeba* および *Naegleria* を用いてアメーバに対する消毒効果を検討した。いずれのアメーバもクロラミン-B に対する耐性は強く、数時間から 20 時間の接触時間において消毒効果が認められた。したがって、遊離残留塩素を用いた実験結果とは異なり (Chang, 1978)、即効性の消毒効果は期待できないと結論された。しかしながら、数時間から半日でアメーバの栄養体の不活化が可能であること、また、当該研究事業の別途報告 (一般細菌等へのクロラミン B の消毒効果の評価) において一般細菌等への消毒効果が示されていることから、浴槽等における宿主アメーバを含めたバイオフィーム対策には十分効果が望めるもの

と判断される。なお、当該研究においてはアメーバシストに対する消毒効果は検討対象には含めなかった。アメーバシストは各種の環境耐性を有しており、化学物質への耐性も強いものと判断されるが、モノクロラミン濃度が維持されている環境では残留シストからアメーバの増殖に至ることはないと考えられる。

D. 結論

遊離残留塩素に比べ、モノクロラミン(クロラミン-B)の消毒効果は遅効性であるが、反面、残留性が高い特性がある。したがって、濃度の維持管理が容易で、浴槽等における宿主アメーバを含めたバイオフィーム対策、ひいてはレジオネラ対策に効果が望めるものと判断された。すなわち、クロラミン消毒の欠点は十分な接触時間により相殺させることが出来るものとする。また、今回、中性域からアルカリ域においてレジオ

ネラ属菌の宿主アメーバに対する消毒効果を確認した。今後、濃度維持方法を含め、効果的な使用方法の検討により遊離残留塩素を代替する消毒方法となるものと期待される。

参考文献

Chang SL. Resistance of pathogenic Naegleria to some common physical and chemical agents. Appl Environ Microbiol. 1978 Feb;35(2):368-75.

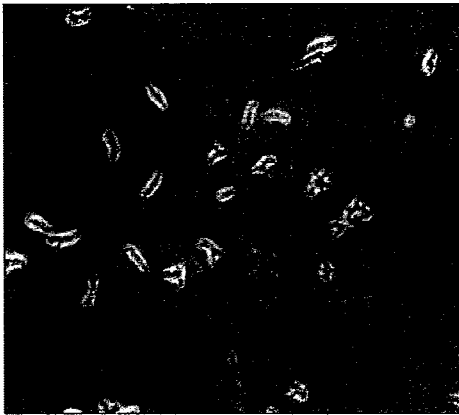
E. 研究発表

なし

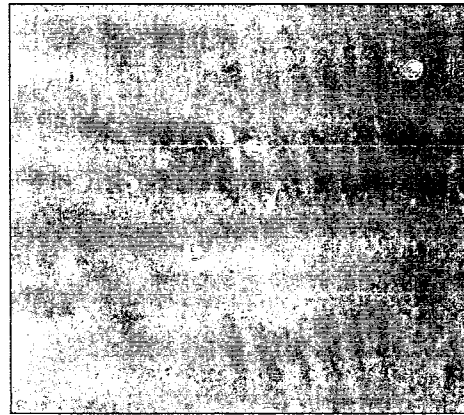
F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

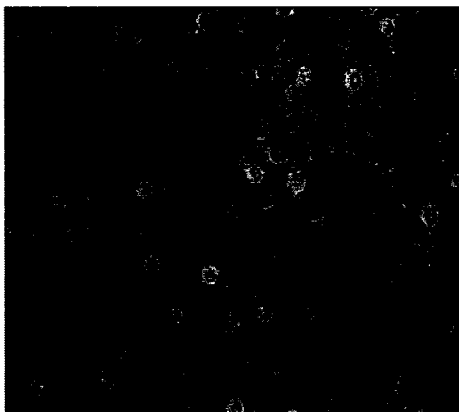
a) 消毒開始 50 分後



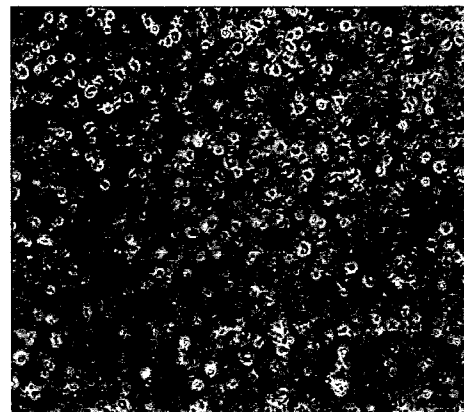
b) 120 分後



c) 180 分後



d) 培地交換 5 日後



e) 生残した場合の培地交換 5 日後

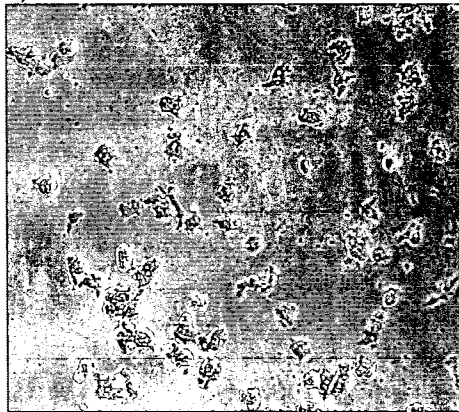


図 1 消毒効果の位相差顕微鏡による観察

1. Naegleria 属アメーバ、pH7.5、40℃、10mg/L 処理、50 分後。まだ変化がみられない
2. 同 120 分後、仮足の伸長が消え、細胞が丸くなった
3. 同 180 分後、ほとんどの細胞が死滅し、位相差のハレーションが消失
4. 培地に交換して 5 日後、アメーバの増殖は認められない
5. 10^3 cells で 4mg/L、180 分間の消毒後に培地に交換した場合、アメーバの成育が認められた

表1-A. 1回目

Naegleria lovaniensis Aq/9/1/45D

× 10 amoeba saline pH7.5 42°C

クロラミンB濃度 mg/L as CL

開始時	10 ⁴ cells	4.0	5.7	9.6	0
終了時(145分後)	10 ⁴ cells	3.8	5.5	8.8	0
	10 ³ cells	4.0	5.7	9.2	0
	10 ² cells	3.9	5.5	9.2	0

顕微鏡観察による細胞の生死判定

細胞数		クロラミンB濃度 mg/L as CL			
		4.0	5.7	9.6	0
50分後	10 ⁴ cells	+	+	+-	+
	10 ³ cells	ND	ND	ND	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
90分後	10 ⁴ cells	+	+-	-	+
	10 ³ cells	ND	ND	ND	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
120分後	10 ⁴ cells	+	+-	-	+
	10 ³ cells	+-	-	-	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
145分後	10 ⁴ cells	+	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	+
SCGYEM 置換 3日 30°C	10 ⁴ cells	+	+-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	+
SCGYEM 置換 7日 30°C	10 ⁴ cells	+(6/6)	+(4/6)	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	+

表1-B. 2回目

Naegleria lovaniensis Aq/9/1/45D

× 10 amoeba saline pH7.5 42°C

クロロミンB濃度 mg/L as CL

開始時	10 ⁴ cells	4.1	5.4	8.7	0
終了時(150分後)	10 ⁴ cells	3.7	5.1	8.3	0
	10 ³ cells	3.6	5.2	8.3	0
	10 ² cells	3.9	5.3	8.5	0

顕微鏡観察による細胞の生死判定

細胞数		クロロミンB濃度 mg/L as CL			
		4.1	5.4	8.7	0
50分後	10 ⁴ cells	+	+	+-	+
	10 ³ cells	ND	ND	ND	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
90分後	10 ⁴ cells	+	+-	-	+
	10 ³ cells	ND	ND	ND	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
120分後	10 ⁴ cells	+	+-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
150分後	10 ⁴ cells	+	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
SCGYEM 置換 5日 30°C	10 ⁴ cells	+(6/6)	+(6/5)	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	+

表1-C. 3回目

Naegleria lovaniensis Aq/9/1/45D

×10 amoeba saline pH7.5 42°C

クロロミンB濃度 mg/L as CL

開始時	10 ⁴ cells	3.9	5.6	8.9	0
終了時(180分後)	10 ⁴ cells	3.6	5.4	8.5	
	10 ³ cells	3.6	5.5	8.5	
	10 ² cells	3.6	5.6	8.4	

顕微鏡観察による細胞の生死判定

	細胞数	クロロミンB濃度 mg/L as CL			
		3.9	5.6	8.9	0
50分後	10 ⁴ cells	+	+	+	+
	10 ³ cells	+	+	+-	+
	10 ² cells	+	+	+-	+
90分後	10 ⁴ cells	+	+	+-	+
	10 ³ cells	ND	ND	ND	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
120分後	10 ⁴ cells	+	+	-	+
	10 ³ cells	+	+-	-	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
150分後	10 ⁴ cells	+	+	-	+
	10 ³ cells	+-	+-	-	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
180分後	10 ⁴ cells	+	+-	-	+
	10 ³ cells	+-	-	-	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
SCGYEM 置換 2日 30°C	10 ⁴ cells	+(6/6)	+	-	+
	10 ³ cells	+	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	+
SCGYEM 置換 5日 30°C	10 ⁴ cells	+(6/6)	+(6/6)	-	+
	10 ³ cells	+(6/6)	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	+

表2-A. 1回目

Naegleria lovaniensis Aq/9/1/45D

Clark and Lubs solutions, pH9.2 42°C

クロラミンB濃度 mg/L as CL

開始時	10 ⁴ cells	3.7	5.8	9.4	0
終了時(210分後)	10 ⁴ cells	3.7	5.5	9	0
	10 ³ cells	3.7	5.7	8.8	0
	10 ² cells	3.8	5.5	9.2	0

顕微鏡観察による細胞の生死判定

		クロラミンB濃度 mg/L as CL			
		3.7	5.8	9.4	0
60分後	細胞数				
	10 ⁴ cells	+	+	+	+
	10 ³ cells	ND	ND	ND	+
120分後	10 ² cells	ND	ND	ND	+
	10 ⁴ cells	+	+	+	+
	10 ³ cells	ND	ND	ND	+
150分後	10 ² cells	ND	ND	ND	+
	10 ⁴ cells	+	+	+	+
	10 ³ cells	ND	ND	ND	+
180分後	10 ² cells	ND	ND	ND	+
	10 ⁴ cells	+	+	+	+
	10 ³ cells	ND	ND	ND	+
210分後	10 ² cells	ND	ND	ND	+
	10 ⁴ cells	+	+	-	+
	10 ³ cells	+	-	-	+
SCGYEM 置換 2日 30°C	10 ² cells	ND	ND	ND	+
	10 ³ cells	ND	ND	ND	+
	10 ⁴ cells	+(6/6)	+(6/6)	-	+
SCGYEM 置換 5日 30°C	10 ² cells	+(1/6)	+(1/6)	-	+
	10 ³ cells	+(6/6)	+(6/6)	+(1/4)	+
	10 ⁴ cells	+(6/6)	+	+	+

表2-B. 2回目

Naegleria lovaniensis Aq/9/1/45D

Clark and Lubs solutions, pH9.2 42-40°C

クロラミンB濃度 mg/L as CL

開始時	10 ⁴ cells	(4)	(6)	(10)	0
終了時(20時間後)	10 ⁴ cells	3.3	ND	ND	0
	10 ³ cells	ND	ND	ND	0
	10 ² cells	ND	ND	ND	0

消毒終了時、10⁴ cellsプレートのクロラミンBが最も低濃度のウェルについてのみ全塩素濃度測定を行った

顕微鏡観察による細胞の生死判定

	細胞数	クロラミンB濃度 mg/L as CL			
		(4)	(6)	(10)	0
1時間後	10 ⁴ cells	+	+	+	+
	10 ³ cells	+	+	+	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
2時間後	10 ⁴ cells	+	+	+	+
	10 ³ cells	+	+	+	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
3時間後	10 ⁴ cells	+	+	+	+
	10 ³ cells	+	+	+	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
4時間後	10 ⁴ cells	+	+	+-	+
	10 ³ cells	+	+	+-	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
8.6時間後	10 ⁴ cells	+-	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
20時間後	10 ⁴ cells	-	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
SCGYEM 置換 4日 30°C	10 ⁴ cells	-	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	+

表2-C. 3回目

Naegleria lovaniensis Aq/9/1/45D
Clark and Lubs solutions, pH9.2 40°C

クロラミンB濃度 mg/L as CL

開始時	10 ⁴ cells	4.0	5.8	9.4	0
終了時(17時間後)	10 ⁴ cells	3.2	4.7	8.6	0
	10 ³ cells	3.6	5.4	9.2	0
	10 ² cells	3.7	5.6	9.1	0

顕微鏡観察による細胞の生死判定

		クロラミンB濃度 mg/L as CL			
		4.0	5.8	9.4	0
17時間後	細胞数				
	10 ⁴ cells	-	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	ND
SCGYEM 置換 5日 30°C	10 ⁴ cells	-	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	+

表2-D. 4回目

Naegleria lovaniensis Aq/9/1/45D
Clark and Lubs solutions, pH9.2 35°C

クロラミンB濃度 mg/L as CL

開始時	10 ⁴ cells	4.1	5.7	9.4	0
終了時(16時間後)	10 ⁴ cells	3.3	4.9	9.0	0
	10 ³ cells	3.8	5.4	9.2	0
	10 ² cells	3.7	5.4	9.4	0

顕微鏡観察による細胞の生死判定

		クロラミンB濃度 mg/L as CL			
		4.1	5.7	9.4	0
16時間後	細胞数				
	10 ⁴ cells	-	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	ND
SCGYEM 置換 6日 30°C	10 ⁴ cells	-	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	+

表3-A. 1回目

*Acanthamoeba castellanii castellanii*株 ×10 amoeba saline pH7.5 35°C

クロラミンB濃度 mg/L as CL

開始時	10 ⁴ cells	3.8	5.6	9.2	0
終了時(150分後)	10 ⁴ cells	3.7	5.5	9.0	0
	10 ³ cells	3.7	5.4	0.1	0
	10 ² cells	3.7	5.7	9.1	0

顕微鏡観察による細胞の生死判定

		クロラミンB濃度 mg/L as CL			
		3.8	5.6	9.2	0
50分後	10 ⁴ cells	+	+	+	+
	10 ³ cells	ND	ND	ND	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
120分後	10 ⁴ cells	+	+	+-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
150分後	10 ⁴ cells	+	+	+-	+
	10 ³ cells	+	-	-	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
PYGC 置換 1日 30°C	10 ⁴ cells	+	+	+	+
	10 ³ cells	+	+-	+-	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	ND
PYGC 置換 6日 30°C	10 ⁴ cells	+(6/6)	+(6/6)	+(4/4)	+
	10 ³ cells	+(6/6)	+(6/6)	+(4/4)	+
	10 ² cells	+(6/6)	+(6/6)	+(4/4)	+

表3-B. 2回目

*Acanthamoeba castellanii castellanii*株 ×10 amoeba saline pH7.5 35°C

クロラミンB濃度 mg/L as CL

開始時	10 ⁴ cells	4.0	5.7	9.2	0
終了時(20時間後)	10 ⁴ cells	3.5	5.4	8.9	0
	10 ³ cells	3.6	5.6	8.9	0
	10 ² cells	3.6	5.4	9.0	0

顕微鏡観察による細胞の生死判定

		クロラミンB濃度 mg/L as CL			
		4	5.7	9.2	0
2.5時間後	10 ⁴ cells	+	+	+	+
	10 ³ cells	+	+	+	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
20時間後	10 ⁴ cells	-	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	ND
PYGC 置換 2日 30°C	10 ⁴ cells	-	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	ND
	10 ² cells	-	-	-	ND
PYGC 置換 5日 30°C	10 ⁴ cells	-	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	+

表3-C. 3回目

*Acanthamoeba castellani castellani*株 × 10 amoeba saline pH7.5 35°C

クロラミンB濃度 mg/L as CL

開始時	10 ⁴ cells	4.0	(6)	(10)	0
終了時(17時間後)	10 ⁴ cells	3.0	ND	ND	0
	10 ³ cells	ND	ND	ND	0
	10 ² cells	ND	ND	ND	0

顕微鏡観察による細胞の生死判定

		クロラミンB濃度 mg/L as CL			
		4.0	(6)	(10)	0
17時間後	10 ⁴ cells	-	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	ND	ND	ND	+
PYGC 置換 3日 30°C	10 ⁴ cells	-	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	ND
PYGC 置換 7日 30°C	10 ⁴ cells	-	-	-	+
	10 ³ cells	-	-	-	+
	10 ² cells	-	-	-	+

厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)
分担研究報告書

公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究

クロラミン B のレジオネラに対する殺菌作用

主任研究者 : 遠藤卓郎 国立感染症研究所寄生動物部
分担研究者 : 倉 文明 国立感染症研究所細菌第一部
泉山信司 国立感染症研究所寄生動物部

(研究要旨) 結合塩素として作用する有機塩素系消毒薬であるクロラミン B について、レジオネラに対する殺菌作用を検索した。pH 7.7 および pH 8.9 の緩衝液に *Legionella pneumophila* 血清群 1 (Nagasaki 80-045 株) を浮遊させ、40°C で静置し、一定時間後に採取して、その中の生菌数を BCYE α 培地でコロニー数として求めた。6 時間あるいは 24 時間の実験期間中、全残留塩素の変化は 20% 未満であった。pH 7.7 では、1.1 mg/L の残留塩素濃度で、6 時間以内に生菌は不検出 (4.46-log_{10} の不活化) となった。3.45 mg/L では 3 時間以内に不検出、5.45 mg/L では、30 分以内に不検出となった。一方、pH 8.9 では pH 7.7 に比べ殺菌効果が緩やかになったが、3.2 mg/L や 5.1 mg/L の場合に 2 時間以内には、不検出となった。pH 8.9 では、高濃度 3~5 mg/L の場合に殺菌効果が 2 相性になり、その変換点が 30 分後近辺に見られた。特に 1.1 mg/L のクロラミン B の場合には観察した 6 時間後であっても 1.9-log_{10} 程度の菌数の減少しなかった。これらのことから、*L. pneumophila* の消毒には 3~5 mg/L が実用的であった。

A. 研究目的

これまで公衆浴場等の消毒剤として塩素剤が第 1 選択的に用いられており、適切な塩素による消毒効果は十分に評価されてきた。しかしながら、塩素剤は高 pH やある種の金属イオン、アンモニウムイオン、有機質、還元性物質を多く含む泉質の湯などでは著しく効果を減ずること、特有の臭気が好まれないこと、また、濃度管理が難しいことが指摘されている。一方、欧米の水道においてレジオネラを含むバイオフィルム対策にモノクロラミンが用いられている。モノクロラミンは遅効性であるが、バイオフィ

ルムへの浸透性が高く、高温でも比較的安定であること¹⁾、簡易に測定できること、残留性が高いこと、微臭気で皮膚刺激性が低いこと、また、トリハロメタン等の消毒副生成物ができにくいことなどの利点がある。ここではモノクロラミンより取り扱いの簡単な有機塩素剤クロラミン B を用いてレジオネラに対する消毒効果を検討した。

B. 研究方法

菌株: *Legionella pneumophila* 血清群 1 (NIIB 0058 Nagasaki 80-045 株) を使用した²⁾。菌は、-80°C に凍結保存したスキム

ミルクより粉末培地 (Difco Legionella Agar Base) から自作した BCYE α 寒天培地に接種した。30°C、4 日間の湿潤状態で培養後に、菌のコロニーをかきとって、4mL ポリスチレンチューブ (Falcon) に生理食塩水の浮遊液とした。この後、1.5mL エッペンドルフチューブで 2 回高速遠心して洗浄し、菌以外の可溶性有機物の持ち込みを減らした。菌濃度は DENSIMAT (BioMerieux 社) で測定し、約 2×10^9 / mL の浮遊液を作成した。

試薬: pH 7.5 (Page Amoeba Solution)、pH 8.9 のホウ酸緩衝液の 10 倍液を作成し、実験前に滅菌純水で希釈して用いた。これらの緩衝液の pH はクロラミン B (Sodium benzenesulfonchloramide, $C_2H_6SO_2NNaCl \cdot 2H_2O$, MW 246.65, CAS [127-52-6(anhydr)]、関東化学) を添加する前に HORIBA B-212 で測定した。クロラミン B の保存液は、990 mg/L as Cl となるよう調製し、室温で遮光保存した。この状態で安定であった。ウォーターバスで 50 mL のポリプロピレン製コニカルチューブ (Falcon) 中に各々の緩衝液 20~30 mL を予め 40°C にしておいた菌液を作成した。全残留塩素濃度は、ポケット残留塩素計 46700-00 (セントラル科学株式会社) と専用の粉末試薬 (パーマ・ケム) を使用して、取り扱い説明書にしたがい、DPD 法により測定した。なお、今回の実験で用いたクロラミン B は試薬の 25~30% が有効塩素量である。

殺菌実験: 菌を 10^6 / mL になるように添加したクロラミン B 緩衝液をウォーターバスに静置し、一定時間後に無菌的に 0.1mL 採取し、0.9 mL の 1% ハイポの入ったエッペンドルフチューブに入れボルテックスで攪拌し塩素を中和した (文献 3 より改変)。ハイポで中和した菌液を適当に希釈して BCYE プレート 2 枚にまいた。35°C、4 日間

以上培養してコロニー数を計数し、2 枚のプレートの平均数から、浮遊液中の生菌数を求めた。コロニーが小さい場合はさらに培養を続けてから計数した。

倫理面への配慮: 実験動物やヒト由来の検体は含まれていず、倫理面の配慮はなされている。

C. 研究結果

全残留塩素濃度の推移: 実験の開始前と終了直後に測定したところ、24 時間あるいは 6 時間後の変動は、20% 未満であった (図 1、3)。

菌のコロニー数の推移: pH 7.7 では、1.1 mg/L の残留塩素濃度で、6 時間以内に不検出 (4.46-log_{10} 不活化) となった。3.45 mg/L では 3 時間以内に不検出、5.45 mg/L では、30 分以内に不検出となった。3 mg/L 近辺の濃度では、実験により殺菌効果に違いが見られた (図 2、図 4)。

pH の影響: pH 7.7 より pH 8.9 の実験条件において殺菌効果が遙減したが、高濃度 3~5 mg/L 処理の場合には、2 時間以内に生菌が不検出になった。pH 8.9 では、高濃度 3~5 mg/L の場合に殺菌効果が 2 相性になり、その変換点が 30 分後近辺に見られた。また、pH 8.9、1.1 mg/L のクロラミン B の場合には観察した 6 時間後にも 1.86-log_{10} 程度の菌数の減少に留まった。

。

D. 考察

クロラミン B と同様の有機塩素化合物であるクロラミン T (*N*-chloro-*p*-toluene sulfonamide) については、冷却塔の消毒に使用され、最近レジオネラに対する作用も報告されている³⁾。クロラミン T はヒトに安全で、毒性が少なく、高温でも溶液中で安

定で、金属腐食性がほとんどなく、菌の消毒剤耐性のリスクがなく、生物により分解されるので環境への負荷が少ないという。一方、これまでクロラミン B に関するレジオネラに対する作用の報告はない。今回クロラミン B について検索して、浮遊性の *L. pneumophila* に対しては、クロラミン T と同程度の効果がみられた。ただ菌株により効果は多少異なるかもしれない。

Elsmore によると、望ましい水処理消毒剤は、 5×10^6 - 5×10^7 /mL の菌と接触後 1 時間以内に 4log 減少させることとしている⁴⁾。その意味では、3-5mg/L のクロラミン B が妥当と思われる。

低分子量のモノクロラミンは、*L. pneumophila* に 1 mg/L (モノクロラミンとしての濃度) で 15 分で 99% 不活化され、平均 $C \times t_{99}$ は 15 mg.min/L であるという¹⁾。今回は、図 2、図 4 より各々の濃度と 99% 不活化時間(分)の両対数散布図の回帰直線により 257、219 になるので暫定的ながら pH 7.7 の $C \times t_{99}$ は約 240 mgmin/L (塩素濃度として)となった。

E. 結論

結合塩素として作用する有機塩素系消毒薬であるクロラミン B について、レジオネラに対する殺菌作用を検索した。緩衝液に *Legionella pneumophila* 血清群 1 を浮遊させ、浴槽水の温度 40℃ で静置し、一定時間後に採取して、その中の生菌数をコロニー数として求めた。pH 7.7 では、1.1 mg/L の残留塩素濃度で、6 時間以内に生菌は不検出となった。3.45 mg/L では 3 時間以内に不検出、5.45 mg/L では、30 分以内に不検出となった。一方、pH 8.9 では pH 7.7 に比べ殺菌効果が緩やかになった。*L. pneumophila* の消毒には 3-5 mg/L が実用的であった。

引用文献

1) Cunliffe DA. Inactivation of *Legionella pneumophila* by monochloramine. J Appl Bacteriol. 1990 May;68(5):453-9.

2) Saito, A., T. Shimoda, M. Nagasawa, H. Tanaka, N. Ito, Y. Shigeno, K. Yamaguchi, M. Hirota, M. Nakatomi, and K. Hara. 1981. The first case of Legionnaires' disease in Japan. Kansenshogaku Zasshi 55:124-128.

3) Ozlem Sanli-Yurudu N, Kimiran-Erdem A, Cotuk A. Studies on the efficacy of Chloramine T trihydrate (N-chloro-p-toluene sulfonamide) against planktonic and sessile populations of different *Legionella pneumophila* strains. Int J Hyg Environ Health. 2007 Mar;210(2):147-53.

4) Elsmore R. Microbiocides and the control of *Legionella*. In: Barbaree, JM. *Legionella* Current Status and Emerging Perspectives. ASM 1325 Massachusetts Ave, N. W. Washington, DC, pp. 250-253, 1-55581-055-1.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) Kura F, Amemura-Maekawa J, Suzuki-Hashimoto A, Chang B, Izumiyama S, Ichinose M, Endo T, Watanabe H: Surveillance of *Legionella* isolates from bathtub water in Japan: An increase of the

rate of *Legionella pneumophila* serogroup 1. 22nd Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Stockholm. June 2007.

- 2) Suzuki-Hashimoto A, Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Izumiyama S, Ichinose M, Watanabe H, Endo T: The surveillance of *Legionella* from cooling towers between 2001 and 2006 in Japan. 22nd Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Stockholm. June 2007.
- 3) 倉 文明、前川純子、鈴木敦子、常彬、泉山信司、市瀬正之、遠藤卓郎、渡辺治雄: 浴槽水からのレジオネラ属菌の検出状況 - *Legionella pneumophila* 血清群 1 の増加 -。感染症学会、2007 年 4 月、京都。
- 4) 鈴木敦子、前川純子、倉 文明、常彬、泉山信司、市瀬正之、渡辺治雄、遠藤卓郎: 冷却塔水からのレジオネラ属菌の検出状況 - 2001 年度から 2006 年度まで -。感染症学会、2007 年 4 月、京都。

5) 倉 文明: レジオネラ属菌の管理基準、感染事例と菌濃度との関連、および分子疫学、招請講演、行政研修フォーラム、公衆衛生学会、2007 年 10 月、松山。

6) 郡山洋一郎、中村由美子、青木眞里子、柴早苗、高橋朝子、鈴木龍雄、工藤寛子、前川純子、倉文明: 足立区における温泉水からのレジオネラ属菌検出事例について、第 20 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌部会、2 月。

3. 総説

1) 倉 文明: *Legionella pneumophila*、最新細菌・カビ・酵母図鑑(高鳥浩介、五十君静信監修)、71-74、技術情報協会、東京、2008 年 12 月 27 日。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。

その他 なし。

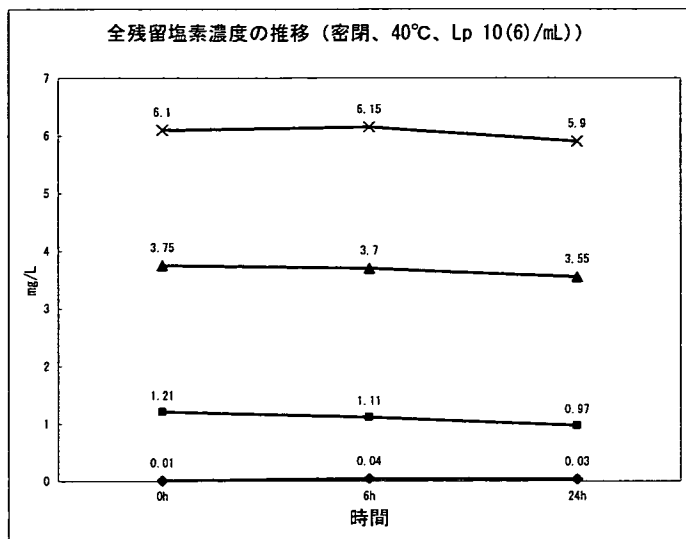
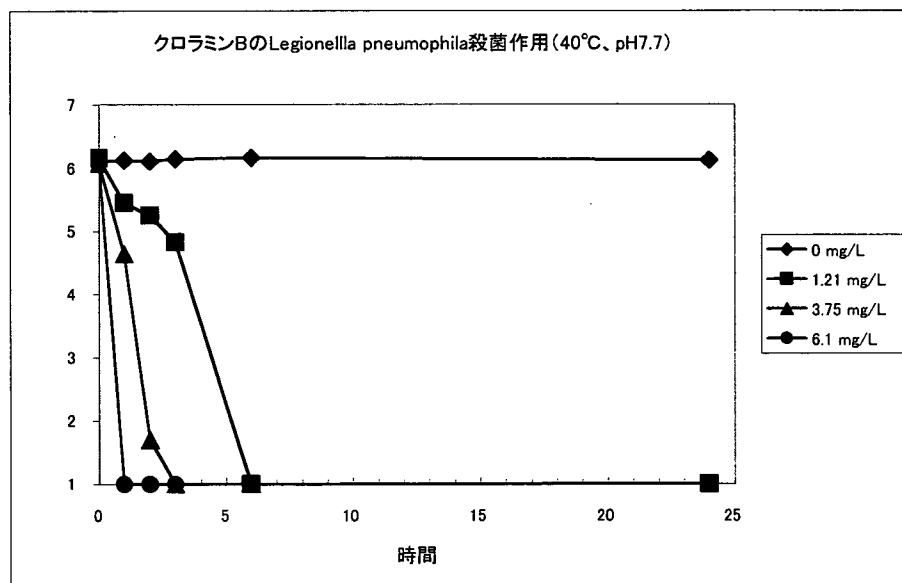


図1 実験 1, pH 7.7



クロラミン B 濃度 (塩素濃度として、mg/L)				
時間	0	1.21	3.75	6.1
0	6.11	6.16	6.08	6.09
1	6.13	5.45	4.64	<1.7
2	6.11	5.26	1.70	<1.7
3	6.15	4.83	<1.7	<1.7
6	6.17	<1.7	<1.7	<1.7
24	6.13	<1.7	<1.7	<1.7

図2 実験 1

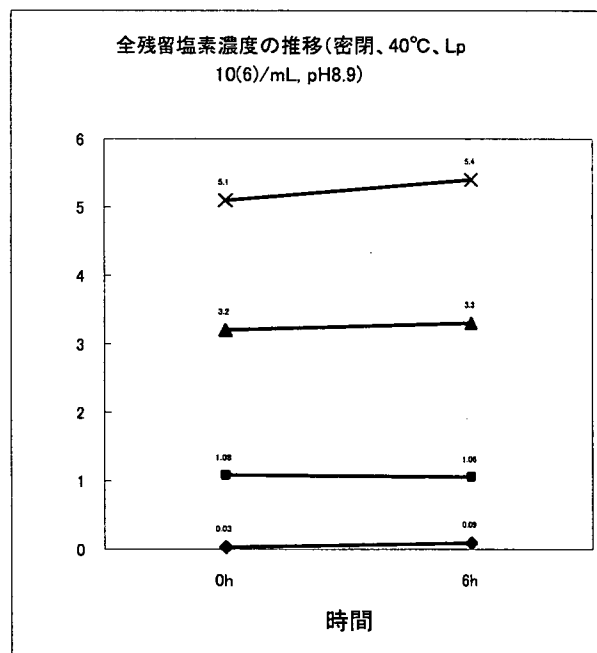
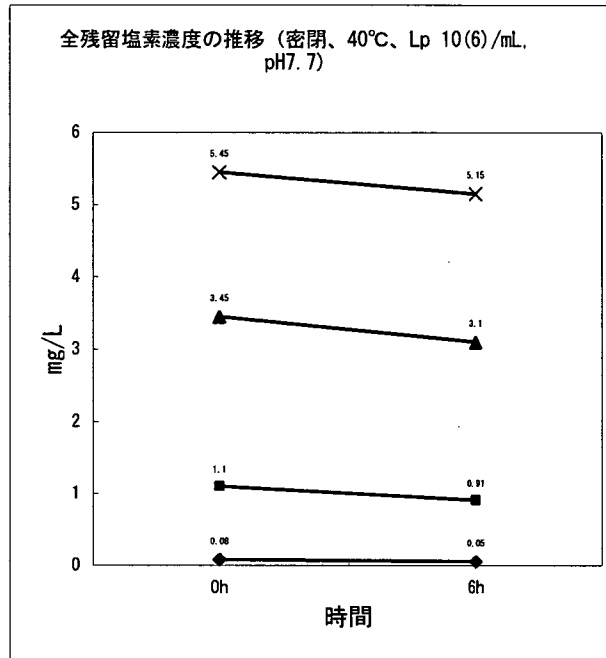


図3 実験2