

200840030A

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

公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 遠藤 卓郎

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I.	総括研究報告書	
	公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究 1
	遠藤 卓郎	
II.	分担研究報告書	
1.	モノクロラミンのレジオネラに対する殺菌作用 15
	倉 文明・泉山 信司	
2.	モノクロラミンによる <i>Naegleria</i> アメーバの不活化 25
	泉山 信司・八木田健司	
3.	モノクロラミンの皮膚一次刺激性に関する研究 30
	神野 透人・泉山 信司・香川(田中) 聡子・高橋 淳子・ 畔上 二郎	
4.	循環ろ過式モデル浴槽におけるクロラミン B による消毒効果 48
	杉山 寛治・泉山 信司・八木田健司	
5.	結合塩素剤による浴槽水の消毒効果の評価 53
	縣 邦雄・泉山 信司・神澤 啓	
6.	実験用循環式浴槽におけるフローサイトメトリーを用いた 63
	レジオネラ汚染の迅速評価	
	田栗利紹・杉山寛治・神田 隆・高橋奈緒美・黒木俊郎・ 小田康雅	
7.	消毒副生成物ハロアセトニトリル類の暴露評価に関する研究 68
	神野 透人・香川(田中) 聡子・高橋 淳子・竹熊 美貴子・ 大河原 晋・古川 容子・奥秋 菜央	
8.	レジオネラ属菌に対する殺菌・消毒剤の効果判定方の検討 82
	秋山 茂・坂上 吉一	
9.	消毒剤の種類と浴槽への適用について 89
	坂上 吉一・秋山 茂	
10.	温泉施設浴槽の真菌汚染 97
	高鳥浩介	

I. 総括研究報告書

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）
平成 20 年度総括研究報告書

公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究

研究代表者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所
研究分担者	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
	縣 邦雄	アクアス(株) つくば総合研究所
	神野 透人	国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部
	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所
	秋山 茂	北里大学 医療衛生学部
	坂上 吉一	近畿大学 農学部

研究要旨： 当該研究では浴槽の維持管理方法の構築を目的として、入浴者にとって安全で許容し得る浴槽水の消毒方法の検討を行っている。現在はレジオネラ属菌汚染防止にむけて温泉を含む浴用水の塩素消毒が奨励されているが、遊離残量塩素消毒は高 pH の浴槽水、有機物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。ところで、塩素剤は遊離残量塩素のみならず結合塩素にも消毒効果が知られており、後者は高 pH で有効性が期待できること、即効性は劣るものの安定性や浸透性に優れていることなどが知られている。当該研究では積極的に結合塩素であるモノクロラミン消毒に着目して研究を進めている。昨年度のレジオネラ属菌および宿主アメーバに対するクロラミン B（有機モノクロラミン）の消毒効果の検討に続き、本年度は無機のモノクロラミンによる消毒効果を評価した。pH 7.5 および pH 8.8 の 2 条件で *Legionella pneumophila* 血清群 1（Nagasaki 80-045 株）にモノクロラミンを作用させ、継時的に生菌数の推移を求めた。その結果、pH 7.5 では、全残留塩素濃度として 1.0 mg/L で 10 分以内に生菌は非検出（4.3-log 以上の不活化）となった。3.0mg/L では 5 分以内、5.6 mg/L では、2 分以内で非検出となった。また、pH 8.8 の条件では pH 7.5 に比べて殺菌効果が緩やかになり、不活化に要する時間が 2 倍程度延長され、1.1 mg/L の全残留塩素濃度で 20 分以内、3.1mg/L では 9 分以内、6.1mg/L では 5 分以内で非検出となった。中性域および高 pH 域における 2-log の不活化に要する Ct 値はそれぞれ 4.2、15.5mg・min/L と計算された。また、4-log 程度の不活化に要する Ct 値は中性域で 10 未満、高 pH 領域で 25～30mg・min/L 程度であった。さらに、*L. pneumophila* 浴槽水由来の異なった血清群の 9 株を用いた実験において、いずれも 1.1 mg、30 分処理で非検出となることが確認された。加えて、無機モノクロラミンはレジオネラ属菌の宿主アメーバ *Naegleria* に対してきわめて効果的で、4-log₁₀ 程度のアメーバ不活化効果は pH7.5 から 9.0 での条件で Ct 値 5～8mg・min/L と計算された。

公衆浴場等における塩素代替消毒剤としてのモノクロラミンの適用可能性を判断す

る上で皮膚への影響を明らかにする必要があることから、ウサギにおける皮膚一次刺激性について検討を行った。その結果、56 mg/L の濃度においても刺激性はほとんど観察されず、「無刺激物」に分類されることが明らかになった。また、国外ではあるがモノクロラミンは飲料水の消毒薬としても使用されており、これらのことを総合的に判断して、モノクロラミンは次亜塩素酸ナトリウムの代替消毒剤として使用が期待される。

無機モノクロラミンは製剤としての保存ができず、用時調製が必要で使用上の制限要素となり得る。そこで、前年度に引き続き用時調製が不要なクロラミン B (有機モノクロラミン) の間欠投入による浴槽管理についてモデル浴槽を用いて実証実験を試みた。浴槽水の全塩素濃度を 3mg/L に保持しつつ入浴を実施し、浴槽水での細菌数、ろ過器、配管等でのバイオフィーム形成の状況を調査したところ、6 日間を超えると浴槽水およびろ過機内において従属栄養細菌数が上昇し、やがてレジオネラが検出される結果を得た。クロラミン B は次亜塩素酸 Na に比較して殺菌効果が弱く、持続的な殺菌効果は不十分と判断された。一方、無機モノクロラミンを用いたバッチ試験及びモデル循環式浴槽／入浴試験での殺菌効果を評価したところ、両試験条件とも従来から使用されている次亜塩素酸ナトリウムとほぼ同等のレジオネラ属菌殺菌効果が確認された。

今日では浴場水の衛生管理の徹底が指示されているが、レジオネラ属菌の微生物生態の特殊性から効果的な洗浄・消毒方法が確立されていない。新たな消毒剤等の開発に向け、その有効性評価方法を確立する必要がある。レジオネラ属菌に対する消毒効果判定において、解決すべき課題はレジオネラの培養（生死判定）に液体培地を用いることができないことで、寒天平板培地への消毒剤の持込みが問題となる。各種評価方法のうち、2000 年に EC の標準化委員会の定めた「ヨーロッパ標準殺菌効力試験法」がレジオネラ消毒薬評価に適用できるのではないかとの感触を得た。この方法は作用させた微生物数の減少量から有効か無効かを評価するもので、細菌類では初期菌数から 5 Log 以上の減少があれば有効と判断する。

有効な洗浄・消毒剤の選定およびその有効濃度を決定するための基礎的検討を実施している。モデル浴槽 (5L) での実験では、ヒノキチオール 25.0 μ g/mL、6 時間の接触で *L. pneumophila* 増殖を完全に抑制することが示された。過酢酸は 5.0 μ g/mL で、*L. pneumophila* 血清型 1 の増殖を速やかに抑制し、2.0 μ g/mL でも大きな抑制効果が示された。しかしながら、モデル浴槽の容量を大きく (80L) するとヒノキチオール、過酢酸ともに効果が減じる傾向が見られ、実機レベルでの検討が待たれる。

一方、入浴施設における衛生管理の重要項目の一つとしてバイオフィーム対策があり、一般細菌数あるいは従属栄養細菌数とレジオネラ汚染の関係を示唆する報告がある。そこで、低濃度塩素条件における浮遊細菌数の消長をフローサイトメトリーでモニターすることでレジオネラ汚染に係る迅速評価の可否について検討した。

浴槽水消毒の必要性は改めて触れるまでもないが、当該研究では次亜塩素酸ナトリウム消毒の負の効果についても言及してきた。空気中及び水中の消毒副生成物 (トリハロメタン類、ジハロアセトニトリル類) について、それぞれ加熱脱離-GC/MS 及びダイナミックヘッドスペース-GC/MS による定量法を確立し、一般家庭、公衆浴場で

の入浴やプールでの遊泳に伴う暴露量の評価を行った。その結果、クロロホルムでは公衆浴場での経気道暴露、ついで室内遊泳プールでの経気道暴露の寄与が高く、ジクロロアセトニトリルでは水道水の飲用による経口暴露が50%以上を占めることが明らかになった。

また、バイオフィーム形成に係る微生物として真菌類の調査が新たに行われた。全国35温泉において、浴槽の排水溝、浴槽床面、浴槽壁面などで変色している部分から綿棒で85サンプルを採集したところ、*Candida*、*Trichosporon*、*Fusarium*、*Cladosporium*、*Acremonium* 等々の多様な真菌類が54件で認められた。

1. 研究目的

レジオネラ属菌類は20°Cから45°C付近の温度環境で増殖する細胞寄生性細菌で、体内ではマクロファージなど貪食細胞内で増殖する。浴槽水などの温水環境ではアメーバなどの原虫類を宿主として増殖する。入浴施設はレジオネラに汚染されやすい施設で、『浴槽水の有機物 → 細菌繁殖 → 細菌捕食性微生物(アメーバ等)の繁殖 → レジオネラ汚染』という汚染の構図が成立している。このように原因が明らかな場合、その対策は容易のはずであるが、現行の入浴施設での対策は困難を極める。今後、実態調査を含めながら、入浴施設の設備や構造、管理方法、あるいは風呂の利用方法そのものの変更が不可欠と考える。当該研究では次亜塩素酸ナトリウムの欠点を補うべく結合型塩素(モノクロラミン)の消毒効果および浴槽水への利用を検討している。

2. 研究方法

2.1. 無機クロラミンを中心にレジオネラ属菌、宿主アメーバ、一般細菌/従属栄養細菌、真菌類、ならびにバイオフィーム着生阻止に係る消毒効果を実験室レベル、およびモデル浴槽を用いて検討し、レジオネラおよび宿主アメーバの不活化効果に係る Ct 値 (mg・min/L) を算定した。併せて、有機モノクロラミン(クロラミンB)および次亜塩素酸ナトリウムとの消毒効果の比較を行った。あわせて、塩素剤以外の洗浄・消毒剤についての

検討を行った。

2.2. 皮膚一次刺激性試験は OECD Guideline for the Testing of Chemicals: No. 404, Acute Dermal Irritation/Corrosion (2002) を参考に立案し、(財)食品薬品安全センター秦野研究所において委託試験として実施した。試験にあたっては「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日、法律第105号、平成17年6月22日一部改正)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月28日、環境省告示第88号)及び「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日、科発第0601001号)を遵守し、「財団法人食品薬品安全センター秦野研究所動物実験に関する指針」(平成2年10月1日、平成18年10月2日改正)に基づいて実施した。

2.2.1. 一般状態に異常のないことを確認した雄の日本白色種ウサギ (Kbs:JW) 3匹の体幹背部被毛を試験開始の前日に剪毛し、剪毛した背部皮膚を上下、左右に計4区画に分け(図1)、それぞれ約6 cm²の適用部位を確保した。尾部側の左右2区画の皮膚角質層に井桁状の擦過傷皮膚を作成した。適用部位に約2.5×2.5 cm 四方の滅菌済みリント布をあて、試験液または対象液をそれぞれ0.5 mLずつ染み込ませ4時間にわたり接触させた(30分間隔での張り替え)。その後、適用部位を清拭し、1時間、24時間、48時間及び72時間の時点で評価基準(表1)に従い、紅斑お

よび痂皮形成ならびに浮腫の程度を評点判定し、一次刺激性指数を得た。得られた一次刺激性指数を基に、皮膚刺激反応の分類表にしたがって検体の刺激性の程度を分類した。

2.3. 殺菌・消毒剤の効果判定方法の検討にむけて石炭酸係数測定法、改良 Kelsey-Sykes 法、ヨーロッパ標準殺菌効力試験法の3方法に準拠して処理し、薬剤作用後の供試菌の生死判定を液体培地と寒天平板培地で行い、成績の比較を行なった。各試験方とも、試験薬剤は塩化ベンザルコニウム、供試菌は、*Escherichia coli* (NIHJ JC-2) と *Staphylococcus aureus* (ATCC 65389) の2種類とした。

2.4. 東京、神奈川および埼玉県下の一般家庭の浴室12件、神奈川、埼玉県下の公衆浴場8施設、および東京、神奈川、埼玉県下の室内遊泳プール10施設を対象にサンプリングを行ない、水および施設内空気中の消毒副生成物の濃度を測定した。得られた測定デ

ータと暴露シナリオに関する公開データベース (<http://unit.aist.go.jp/riss/crm/exposurefactors/>) を基に暴露評価を実施し、水道水の飲用による経口暴露量や一般家庭浴室での経気道・経皮暴露量との比較を行った。

2.5. 浴槽水中のレジオネラ菌数は一般細菌や従属栄養細菌数と相関があることが知られている。そこで、フローサイトメーターによる全菌数(粒子数)測定を応用した浴槽水の管理法について検討した。

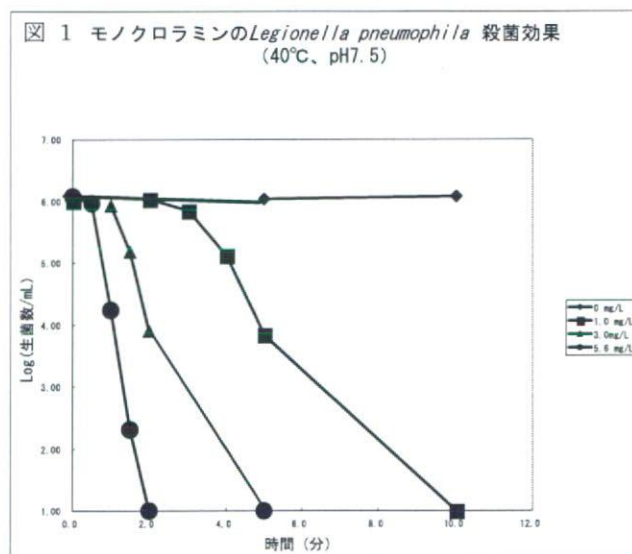
2.6. バイオフィーム形成に係る微生物として真菌類の調査が新たに行われた。全国35温泉において、浴槽の排水溝、浴槽床面、浴槽壁面などで変色している部分から綿棒85サンプルを採集し、真菌類の分離に努めた。

3. 研究結果

3.1. 無機クロラミンによる不活化効果

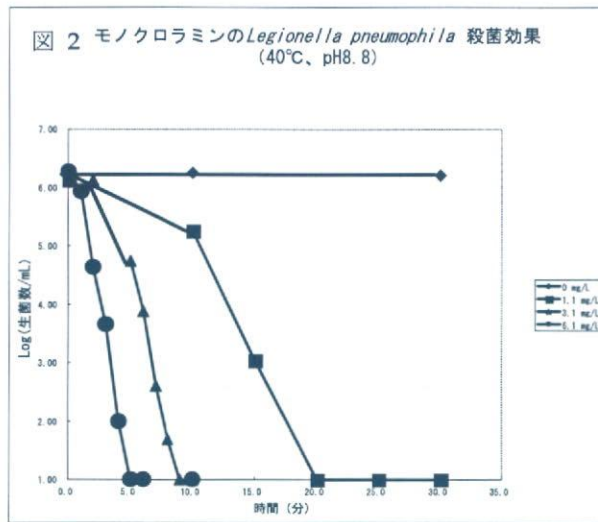
3.1.1. レジオネラ属菌に対する不活化効果
pH 7.5 および pH8.8 における不活化効果は、全残留塩素濃度1mg/Lで、10分以内に4.3-log程度の不活化が達成された。3mg/L では5分

以内、6mg/L では2分以内に同程度の不活化が得られた。(図1)。殺菌効果は2相性で、緩やかな殺菌とその後の急速な殺菌が見られた。急速な殺菌に至るまでの時間はモノクロラミンの濃度に依存して減少した(図1)。



一方、pH 8.8 の条件で同程度の不活化効果を得るためには接触時間を2倍程度延長する必要があったが(図2)、いずれの濃度でも培養可能な生菌は20分以内と短時間のうちに非検出となった。また、種々の血清群の *L. pneumophila* 10株を試験したところ、いずれの菌株も30分後には非検出(4.2-logの不活化)となり、モノクロラミンに対する感受性は血

清群の違いに関わらず同程度と判定された。中性域および高pH域における2-logの不活化に要するCt値はそれぞれ4.2、15.5mg・min/Lと計算された。また、4-log程度の不活化に要するCt値は中性域で10未満、高pH領域で25~30mg・min/L程度であった。



3.1.2. 宿主アメーバ (*Naegleria lovaniensis*) に対する不活化効果

pH9.0の条件下で 10^4 個の *N. lovaniensis* にモノクロラミンを作用させ、継時的に消毒効果を評価した。全塩素濃度1.3 mg/Lの条件で4分40秒までは一部は生残するが、5分では死滅の結果が得られた。4-log程度のネグレリア不活化に要するCt値は6.5mg・min/Lと計算された。さらに、全塩素濃度1.3 mg/Lの条件で

10^4 、 10^3 、 10^2 細胞に対して消毒効果を評価したところ、 10^4 細胞では6分、 10^3 細胞では4分、 10^2 細胞では1分15秒で不活化が達成された(図3)。同様に中性域でのモノクロラミンのアメーバに対する消毒効果は 10^4 細胞が3分で生残、4分で不活化された。これより、4-logの不活化に要するCt値は4.5mg・min/Lと計算された。

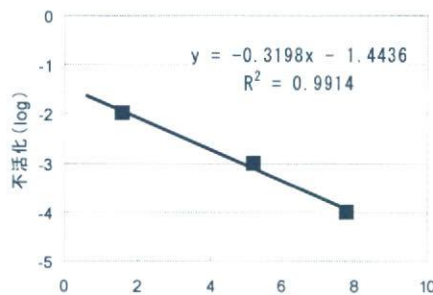


図3. モノクロラミンによる *Naegleria* の不活化曲線

3.1.3. モノクロラミンの皮膚一次刺激性に関する研究

モノクロラミン溶液をリント布に染み込ませ、30分のインキュベーション後に残存するモノクロラミンを定量し、残存率が86%程度を維持することを確認した。モノク

ロラミン (56 mg/L, pH 7.2) を塗布したウサギ (図4) では、いずれも擦過傷皮膚で適用検体除去1時間後に非常に軽度の紅斑が観察されたものの、評価基準 (表1、2) に照らして得られた平均値として得られる一次刺激性指数は0.2となり (表3)、最終的に「無刺激物」と判定された。

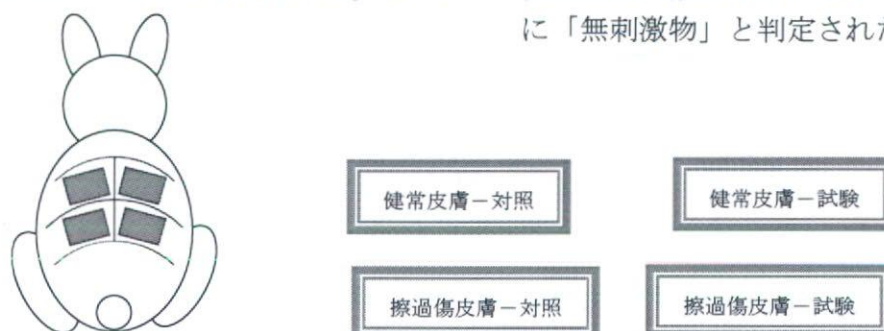


図4. ウサギ背部の試験液 (A) および対照液 (B) 適用部位

表1 皮膚刺激性反応の評価基準

観察項目	刺激性反応	評点
1) 紅斑および痂皮の形成		
	紅斑なし	0
	非常に軽度な紅斑 (やっと認められる程度)	1
	明らかな紅斑	2
	中等度ないし強い紅斑	3
	重度な紅斑 (ビート赤色) から軽い痂皮形成 (深部にわたる障害)まで	4
2) 浮腫		
	浮腫なし	0
	非常に軽度な浮腫 (やっと認められる程度)	1
	明らかな浮腫 (腫脹の輪郭がはっきりしている)	2
	中等度の浮腫 (約1mmの高さに腫脹している)	3
	重度な浮腫 (1mm以上盛り上がり、適用局所を超えて広がる)	4

表2 判定基準 [皮膚刺激反応の分類表]

一次刺激性指数	判定
0 ~ 0.4	無刺激物
0.5 ~ 1.9	軽度刺激物
2.0 ~ 4.9	中等度刺激物
5.0 ~ 8	強度刺激物

適用検体	動物番号	適用皮膚	紅斑・痂皮形成評点			浮腫評点			個別別刺激性指数
			適用検体除去後の観察時間			適用検体除去後の観察時間			
			1時間	24時間	48時間	1時間	24時間	48時間	
試験液	1	健常皮膚	0	0	0	0	0	0	0.2
		擦過傷皮膚	1	0	0	0	0	0	
	2	健常皮膚	0	0	0	0	0	0	0.2
		擦過傷皮膚	1	0	0	0	0	0	
	3	健常皮膚	0	0	0	0	0	0	0.2
		擦過傷皮膚	1	0	0	0	0	0	
一次刺激性指数						0.2			
判定						無刺激物			
対照液	1	健常皮膚	0	0	0	0	0	0	0
		擦過傷皮膚	0	0	0	0	0	0	
	2	健常皮膚	0	0	0	0	0	0	0
		擦過傷皮膚	0	0	0	0	0	0	
	3	健常皮膚	0	0	0	0	0	0	0.2
		擦過傷皮膚	1	0	0	0	0	0	
一次刺激性指数						0.1			
判定						無刺激物			
個別別刺激性指数：			適用検体除去後1時間、24時間及び48時間における適用部位の紅斑・痂皮形成、及び浮腫評点の合計を6(観察部位数2か所×観察回数3回)で除して算出						
一次刺激性指数：			個別別刺激性指数の合計を動物数で除して算出						

3.1.4. モノクロラミンによる浴槽水の消毒効果の評価

レジオネラ属菌が定着している浴槽水 (5 × 10³CFU/100mL) をビーカー (5L) に移し、無機モノクロラミン、クロラミンB、および次亜塩素酸ナトリウムを個別に添加し(全残留塩素濃度として3mg/L)、継時的に微生物の推移を観察した(表4)。モノクロラミン、あるいは次亜塩素酸ナトリウムの添加群では30分間の接触により3-log程度、あるいはそれ以上の不活化が達成され、24時間までその状況が維持された。クロラミンB群では3時間までの接触では菌数の変化は殆どなく、24時間の接触により3-log程度の不活化が達成された。従属栄養細菌はモノクロラミンあるいは次亜塩素酸ナトリウムの添加24時間後に3-log程度あるいはそれ以上

の不活化が達成された。一方、クロラミンBの添加では24時間の接触で1-log程度の不活化に留まった。アメーバに対してはモノクロラミン、次亜塩素酸ナトリウムは30分間の接触により3-log程度あるいはそれ以上の不活化が得られ、24時間まで効果を維持した。また、クロラミンBは30分間の接触で2-log程度の不活化、24時間の接触により3-log程度あるいはそれ以上の不活化が得られた。また、レジオネラが定着しているモデル循環式浴槽(浴槽水500L)への添加実験でもモノクロラミンの添加後30分間で3-log程度あるいはそれ以上の不活化が得られ、24時間まで効果を維持した。クロラミンB添加によっては24時間後に1-log程度の不活化に留まった(表5)。

表 4. バッチ試験におけるレジオネラに対する不活化効果

接触時間	無処理	レジオネラ属菌数(CFU/100mL)		
		モノクロラミン 3mg/L(as Cl ₂)	NaClO 3mg/L(as Cl ₂)	クロラミンB 3mg/L(as Cl ₂)
接触前	5100	5100	5100	5100
30分	3800	<10	<10	2100
1時間	5400	<10	<10	5200
3時間	1900	<10	<10	3200
24時間	400	<10	<10	0

表 5. モデル循環式浴槽における無機モノクロラミンの不活化効果

接触時間	レジオネラ属 菌数 (CFU/100mL)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)	ATP (p mol/L)	全塩素 (mg/L asCl ₂)	遊離塩素 (mg/L asCl ₂)
接触前	850	97	19000	39	0	
10分	200	12	97	75	2→3	0.4→0.7
30分	<10	10	61	39	2~3→3	0.7→0.7
1時間	<10	2	110	41	3	0.5
3時間	<10	2	78	33	3	0.3
24時間	<10	<1	31	2	1.6	<0.1

3.1.5. 循環ろ過式モデル浴槽におけるクロラミン B 添加による管理

循環水量 4 m³/h のモデル浴槽の浴槽水 2 m³(pH8.1、水温 40℃)に対しクロラミン B を投入し、浴槽水の全残留塩素濃度を 3 mg/L に調整した。その後、13 日間にわたって、間欠的なクロラミン B 保存液の投入を繰り返し、全残留塩素濃度 3 mg/L を維持した。浴槽へは 7 日間に延べ 10 名が入浴して浴槽水への有機物の蓄積を行った。浴槽水の検査項目はレジオネラ属菌数、従属栄養細菌数などの菌数測定と、過マンガン酸カリウム消費量、TOC(全有機炭素)などとした。また、クロラミン管理 1 日後の入浴

前と、クロラミン管理 13 日後の集毛器(HC)網、塩化ビニール配管の綿棒拭き取り材料、およびセラミックろ過材について、レジオネラ属菌数、従属栄養細菌数を検査した。浴槽水の従属栄養細菌数はクロラミン B 投入 3 日後までは 10¹ CFU/ml 程度で推移したが、6 日以降は 10⁴ CFU/ml に増殖した。同じく、レジオネラ属菌数も 3 日後までは検出されなかったが、6 日以降 13 日後までに 10¹~10² CFU/100ml の増殖がみられた(図 5)。また、過マンガン酸カリウム消費量と TOC はクロラミン B の添加と入浴に伴い上昇し、定期的な浴槽水の交換は必要になると考えられた。

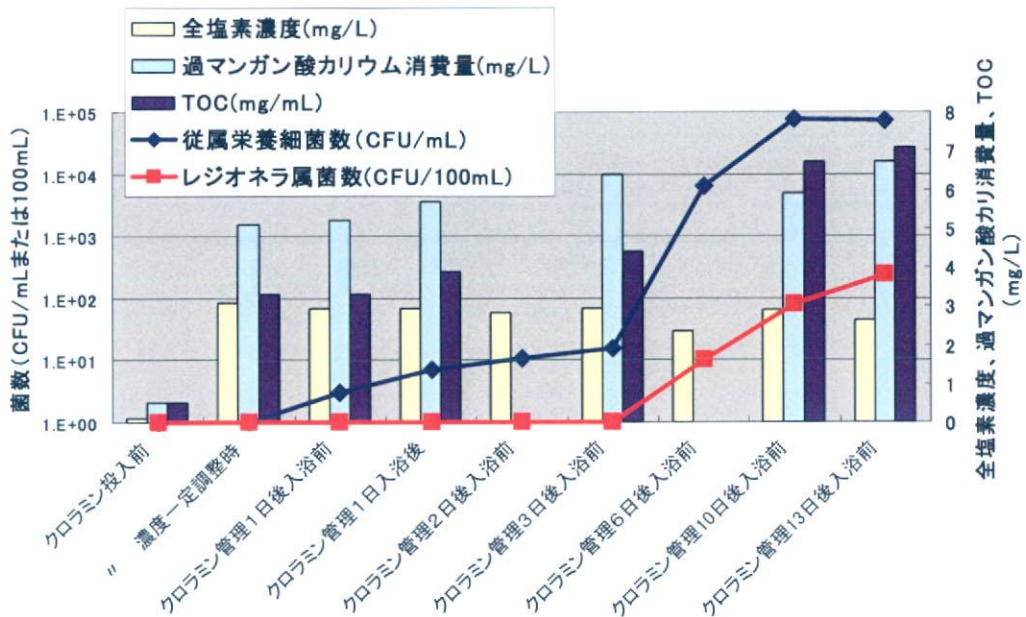


図5. モデル浴槽水へのクロラミンB投入（全塩素濃度3 mg/L維持）時の菌数と水質の変化

3.2. 殺菌・消毒剤の効果判定

3.2.1. 殺菌・消毒剤の効果判定方法

新たな消毒剤等の開発に向け、その有効性を評価する方法を確立する必要がある。レジオネラ属菌の培養は専ら寒天平板培地が用いられ、液体培地が使われない。消毒剤の効果判定に際しては微量ではあるが消毒剤作用液が培地中に持ち込まれる。液体培地であれば持ち込まれる作用液量に対して培地の液量が十分に多いため、作用液は無視できるまでに希釈（500倍程度）される。ところが、寒天培地に滴下された作用液は寒天培地内に

浸透拡散しても直径2cm程度の円の範囲で、薬剤の希釈は25～50倍程度で、殺菌作用を示さないまでも発育阻止作用が残る可能性が否定できないのではないかと考えられる。この点を考慮しつつ、既存の各種評価方法を検討したところ、「ヨーロッパ標準殺菌効力試験法」がレジオネラ消毒薬評価に適用できるのではないかと感触を得た（図6、表6）。この方法は作用させた微生物数の減少量から有効か無効かを評価するもので、細菌類では初期菌数から5 Log以上の減少があれば有効と判断する。

図6. ヨーロッパ標準試験法(EN法)

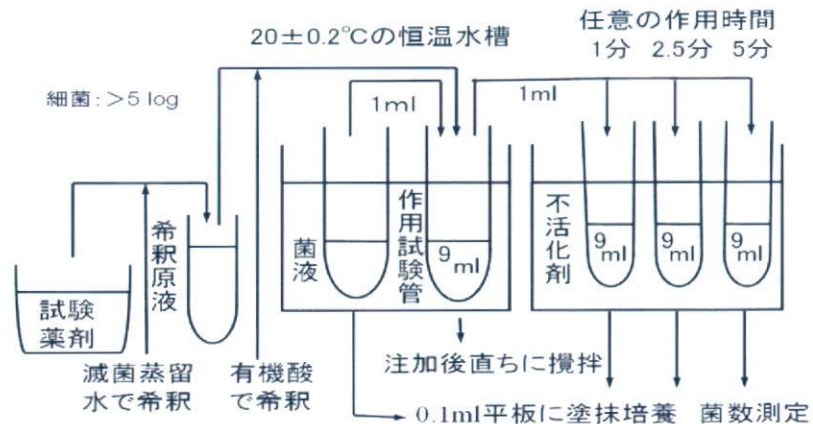


表 6. ヨーロッパ標準殺菌抗力試験法による供試菌の対数減少量

供試菌	<i>Escherichia coli</i> (NIHJ JC-2)			<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 65389)		
	濃度 (%)	0.01	0.005	0.0025	0.003	0.0025
30秒	>5	3.25	2.52	>5	4.80	3.50
60	>5	4.15	3.35	>5	5.0	4.52
90	>5	>5	3.75	>5	>5	5.0
120	>5	>5	4.21	>5	>5	>5

3.2.2. 塩素系薬剤以外の消毒剤の検討

ヒノキチオールは 12.5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で

L. pneumophila 血清型 1 型および血清型 6 型に対して増殖抑制効果が認められた(図 7)。

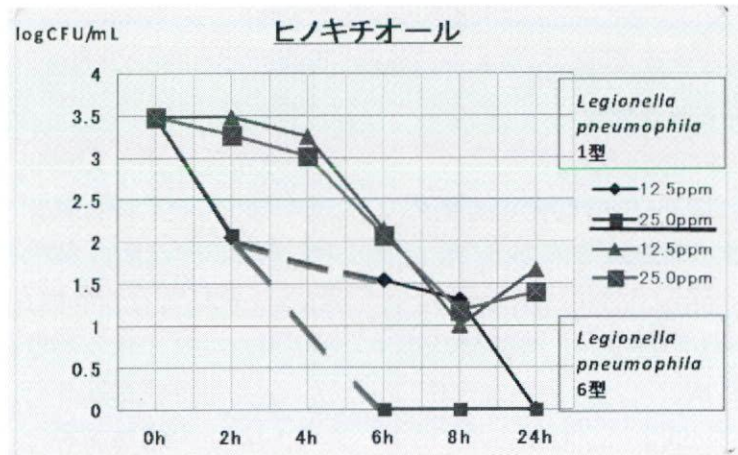


図 7. ヒノキチオールによる *L. pneumophila* の抑制効果の推移

3.3. フローサイトメーターを用いたレジオネラ汚染迅速評価

フローサイトメトリーで計数された粒子数は、塩素停止期間の粒子数は細菌数と比べて 2log 少ない傾向を示したものの、再現性よく浴用水中の従属栄養細菌の消長と重なる推移を示した。浴槽水の粒子数 3,000 個/mL を閾値としその前後でレジオネラの陽性率が大きく変化することが示されたことから、フローサイトメトリーを使ったリアルタイム監視の可能性が示唆された。

3.4. 消毒副生成物の曝露評価に関する研究

空气中及び水中の消毒副生成物 (トリハロメタン類、ジハロアセトニトリル類) について、それぞれ加熱脱離-GC/MS 及びダイナミックヘッドスペース-GC/MS による定量法を確立し、一般家庭、公衆浴場での入浴やプールでの遊泳に伴う曝露量の評価を行った。その結果、比較的揮発性の高いトリハロメタンは公衆浴場や室内遊泳プールでの経気道曝露が主要な曝露経路であることが明らかになった (図 8)。

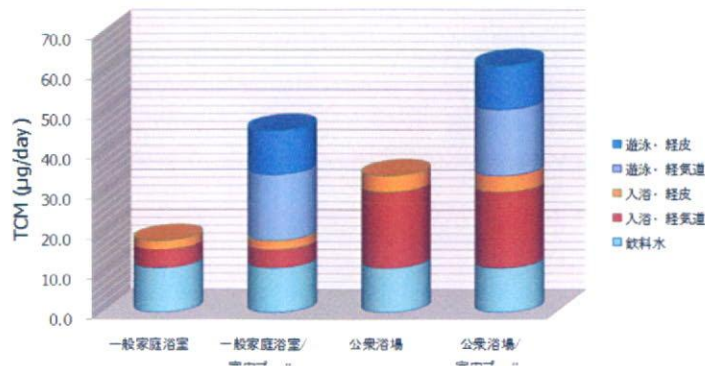


図8. 水道水の飲用、入浴及び遊泳に伴う TCM の暴露量

3.4.1. 真菌類汚染

バイオフィーム形成微生物による公衆浴場の微生物汚染はひいてはレジオネラ汚染につながるのみならず、真菌症の原因にもなる恐れが危惧される。そこで、レジオネラ生息環境に分布する真菌の消毒方法まで拡大して研究を進めることを目的としてバイオフィーム形成真菌と黒色真菌の汚染実態の調査を行った。調査地域は北海道から九州まで35温泉85か所について調査した。調査は、浴槽の排水溝、浴槽床面、浴槽壁面などで変色している部分から綿棒85件、また循環温泉水23件は採水瓶等を用いてサンプリングし、今回は、綿棒の結果のみについて報告する。85件中、真菌陽性は54件であった。検出真菌は *Exophiala*, *Phoma*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Scolecobasidium*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Trichosporon* など比較的暗色系真菌が多く検出され、今後レジオネラ生息環境での真菌の実態とあわせて健康被害との関連性を追求していく必要がある。

4. 考察

次亜塩素酸ナトリウムによる浴槽水が抱える問題への対応として結合型塩素モノク

ロラミンによる消毒管理の可能性について検討している。モノクロラミンは科学的に安定でバイオフィームへの浸透性に優れていること、広範囲の pH 領域で消毒効果が期待できること、微臭性で消毒副生成物の発生の恐れがないなど利点が指摘されており、欧米ではすでに水道水の消毒剤として導入されている。一方、遅効性なことからある程度の接触時間が必要となることや用時調製が必要なために2剤を混合する反応槽(装置)が必要なことなどが指摘される。

本年度の研究成果として、レジオネラや宿主アメーバ (*Naegleria*) に対して無機モノクロラミンは高い消毒効果を示すこと、特に次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果が著しく損なわれる高 pH 領域において十分な消毒効果を示すことが確認された。レジオネラ属菌を標的として 4-log 程度の不活化に要する Ct 値は中性域で 10mg・min/L 未満、高 pH 領域で 25~30mg・min/L 程度であったことから、仮に 3mg/L 程度(全遊離残量塩素として)で使用することを想定すれば高 pH 領域においても接触時間は 10 分以内と使用に支障なく効果が得られるものと判断される。これまでの検討では、モノクロラミンに対するレジオネラの感受性は種や血清型によっ

て違いが見られず、いずれも高い感受性を示した。また、ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験の結果は浴槽水への使用が予定される20倍程度の濃度においても「無刺激物」と判定されており、次亜塩素酸ナトリウムの代替消毒剤としての使用に向けた条件が揃いつつある。一方、モデル循環式浴槽での有機モノクロラミン（クロラミンB）による消毒実験の結果では想定した不活化効果が得られず、消毒剤として不適当と判断された。なお、無機モノクロラミンの消費は避けられず、次亜塩素酸ナトリウム同様に連続的・間歇的に注入する必要があった。

遊離残量塩素による消毒では有害副生成物の発生が防げず、その管理は慎重でなければならない。一般家庭、公衆浴場での入浴やプールでの遊泳に伴う暴露量の評価を行った結果、新たに比較的揮発性の高いトリハロメタンは公衆浴場や室内遊泳プールでの経気道暴露が主要な暴露経路であることが明らかになった。本来、健康的な生活を得るための入浴が有害物質の曝露経路として無視できない状況にあるという現状は速やかに改善されるべきものと考えられる。この見地からもモノクロラミン消毒の導入に期待される。

昨年度の報告書で触れたように、浴槽水に添加使用することのできる消毒剤はほぼハロゲン系の薬剤に限定される。一方、定期的な洗浄・消毒を効率的かつ効果的に行なうための薬剤の選択肢は広い。本年度は過酢酸等の効果を検証したが、基準となる薬効評価方法の確立が急がれる。今後は無機モノクロラ

ミンの消毒効果、消費量（濃度維持方法）、消毒副生成物の確認、その他についてモデル循環式浴槽など実機レベルでの検証を行い、実効性の証明、ならびにその使用方法を確立していく予定である。また、無機モノクロラミンの簡易発生装置の開発も併せて行う必要があるものと考えられる。

5. 結論

レジオネラや宿主アメーバ (*Naegleria*) に対して無機モノクロラミンは高い消毒効果を示し、高pH領域においても十分な消毒効果を示すことを確認した。仮に3mg/L程度の濃度（全遊離残量塩素として）で使用することを想定すれば高pH領域においても10分以内の接触時間で4-log程度の不活化効果が得られるものと考えられる。モノクロラミンに対するレジオネラの感受性は種や血清型によって差が無いと判断された。皮膚一次刺激性試験の結果は50mg/L（使用が予定される20倍程度）程度の濃度においても「無刺激物」と判定されており、次亜塩素酸ナトリウムの代替消毒剤として有望である。一方、同じくモノクロラミンであっても有機モノクロラミン（クロラミンB）の単独投入では短期的な使用に限られると判断された。

6. 健康情報

なし

7. 研究発表

7.1. 論文発表

1. 村上光一, 長野英俊, 野田多美枝, 濱崎光宏, 堀川和美, 石黒靖尚, 乙藤武志, 迎田恵之, 泉山信司, 八木田健司, 遠藤卓郎、浴場施設でのレジオネラ属菌と宿主アメーバの関連, およびレジオネラ属菌を塩素消毒により制御する場合の問題点、防菌防黴, Vol.36, No.11, pp.749-756 (2008)
2. 烏谷 竜哉, 黒木 俊郎, 大谷 勝実, 山口 誠一, 佐々木 美江, 齊藤 志保子, 藤田 雅弘, 杉山 寛治, 中嶋 洋, 村上 光一, 田栗 利紹, 藏元 強, 倉 文明, 八木田 健司, 泉山 信司, 前川 純子, 山崎 利雄, 縣 邦雄, 井上 博雄 掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌汚染とリスク因子、感染症学雑誌 83: 36~44, (2009)

7.2. 学会発表

1. 倉文明、泉山信司、縣 邦雄、遠藤卓郎:クロラミンBによるレジオネラ属菌の消毒.防菌防黴学会第35回年次大会、2008年9月、浜松市
2. 遠藤卓郎、泉山信司、倉 文明:クロラミンBによるレジオネラ属菌とNaegleria属アメーバの消毒.環境技術学会第8回研究発表大会、2008年9月、大阪.
3. 泉山信司、倉 文明、縣 邦雄、八木田健司、遠藤卓郎、クロラミンBによるNaegleriaアメーバの消毒、第68回日本寄生虫学会東日本支部大会、2008年10月、浜松市
4. 倉 文明、泉山信司、伊藤雅代、遠藤卓郎、クロラミンBによるレジオネラ属菌の消毒、日本防菌防黴学会第35回年次大会、平成20年9月、浜松市
5. 神田隆、高橋奈緒美、杉山寛治、泉山信司、倉文明、遠藤卓郎、浴槽水を用

いた核酸検出法と培養法の比較検討、日本防菌防黴学会第35回年次大会、平成20年9月、浜松市

6. 遠藤卓郎、泉山信司、倉 文明、クロラミンBによるレジオネラ属菌とNaegleria属アメーバの消毒、第8回環境技術学会研究発表大会、2008年9月、大阪市
7. 泉山信司、倉 文明、縣 邦雄、八木田健司、遠藤卓郎、クロラミンBによるNaegleriaアメーバの消毒、第68回日本寄生虫学会東日本支部大会、2008年10月、浜松市
8. 奥秋菜央, 神野透人, 香川(田中)聡子, 古川容子, 大河原 晋, 高橋淳子, 安藤正典, 西村哲治: 公衆浴場におけるジハロアセトニトリル類の暴露評価. 平成20年度室内環境学会総会 (2008. 12. 東京).
9. Amemura-Maekawa J, Suzuki-Hashimoto A, Chang B, Izumiyama S, Ichinose M, Endo T, Watanabe H: Sequence based typing and monoclonal antibody typing of Legionella pneumophila serogroup 1 clinical and environmental isolates in Japan. 23rd Annual Meeting of the European Working Group for Legionella infections. Madrid. May 2008.
10. Kura F, Suzuki-Hashimoto A, Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Izumiyama S, Ichinose M, Watanabe H, Endo T: Surveillance of Legionella in hot springs with physicochemical and microbiological water quality parameters. 23rd Annual Meeting of the European Working Group for Legionella infections. Madrid. May 2008.

知的財産の取得状況
なし

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理総合研究事業)
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

モノクロラミンのレジオネラに対する殺菌作用

研究代表者 : 遠藤卓郎 (国立感染症研究所)
研究分担者 : 倉 文明 (国立感染症研究所細菌第一部)
研究分担者 : 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消毒薬であるモノクロラミンについて、レジオネラに対する殺菌作用を検索した。pH 7.5 および pH 8.8 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。10 分あるいは 30 分間の実験期間中、全残留塩素の減少は 9.3% 未満であった。pH 7.5 では、1.0 mg/L の残留塩素濃度で、10 分以内に生菌は非検出(対数で < -4.31) となった。3.0 mg/L では 5 分以内で非検出、5.6 mg/L では、2 分以内で非検出となった。一方、pH 8.8 では pH 7.5 に比べ殺菌効果が緩やかになり、非検出となるまでの時間は約 2 倍に延びた。1.1 mg/L の残留塩素濃度で 20 分以内に生菌は非検出、3.1 mg/L では 9 分以内で非検出、6.1 mg/L では 5 分以内で非検出となった。殺菌効果は 2 相性で、緩やかな殺菌とその後の急速な殺菌が見られた。急速な殺菌に至るまでの時間はモノクロラミンの濃度に依存した。さらに種々の血清群の *L. pneumophila* 浴槽水由来 9 株も 1.1 mg、30 分処理で非検出となった。これらのことから、*L. pneumophila* の消毒には 1 mg/L で十分に有効であった。

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) 2)}、簡易に測定できること、残留性が高いこと^{2) 3)}、微臭気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²⁾などの利点がある。昨年度は取り扱いの簡単なクロラミン B を検討したが、有機化合物のために過マンガン酸カリ消費量が増加するという見かけ上の欠点がある。そこで今

年度はモノクロラミン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：基礎的な検討には *Legionella pneumophila* 血清群 1 (NIIB 0058 Nagasaki 80-045 株) を使用した⁴⁾。その他、表 1 のように日本の浴槽水由来 9 株も使用した。菌は、 -80°C の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 で 4 日間湿潤状態で培養後に、菌のコロニーをかきとって、4 mL 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、1.5 mL 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 $2 \times 10^9/\text{mL}$ 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 1 倍液とした。0.5M 塩化アンモニウム 242.5 μL と次亜塩素酸ナトリウム (有効塩素 5% 以上) (関東化学) 原液 65 μL とを緩衝液 50 mL に混合しモノクロラミンを作製した。pH8.9 および pH7.5 の緩衝液では全残留塩素濃度は、各々 72 mg/L および 50 mg/L となった。 4°C で遮光保存すると、pH8.8 では 5 日後、18 日後に全残留塩素が 0%、11% 減少し、pH7.5 では各々 15%、43% 減少していた。この保存液より実験時に 1 倍の緩衝液で希釈してモノクロラミン濃度を調整した。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 10 mL ~ 20 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。

殺菌実験：菌を $10^6/\text{mL}$ になるように添加したモノクロラミン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 0.1 mL 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 1 より改変)。ウォーターバスとボルテックスは安全キャビネット内に設置した。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 で 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 9 日まで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：実験の開始後 (約 3 分後) と終了後 (実験により約 13 分後から約 33 分後) に測定したところ、全残留塩素の減少は 9.3% 未満であった。

菌のコロニー数の推移：pH 7.5 では、1 mg/L の残留塩素濃度で、10 分以内に培養可能な生菌は非検出 (対数で < -4.31) となった。3 mg/L では 5 分以内で非検出、6 mg/L では、2 分以内で非検出となった (図 1、図 2)。殺菌効果は 2 相性で、緩やかな殺菌とその後の急速な殺菌が見られた。急速な殺菌に至るまでの時間はモノクロラミンの濃度に依存して減少した (図 2)。

pH の影響：pH 7.5 より pH 8.8 の方が、殺菌効果がゆるやかになり非検出となるまでの時間は約 2 倍に延びた。いずれの濃度でも培養可能な生菌は 20 分以内に非検出となった (図 3、図 4)。

不活化は菌株によらない：表 1 に示された