

種々の血清群の *L. pneumophila* 10 株を試験したところ、血清群によらず、いずれの菌株も 30 分後には非検出 (対数で < -4.17) となった。

$C \times t_{99}$: 図 1、図 2 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の切片 ($\log C=0$) より 5.0、3.3 が得られ、pH 7.5 の $C \times t_{99}$ は 4.2 mgmin/L (塩素濃度として) となった (図 5)。同様にして、pH 8.8 については、図 3、図 4 より 16.6、14.3 が得られ、 $C \times t_{99}$ は 15.5 mgmin/L (塩素濃度として) となった (図 6)。

D. 考察

Momba らは、表層水を飲料水とするためのモデル実験で、遊離塩素やモノクロラミンの単独使用よりも、遊離塩素消毒後のモノクロラミンの使用がバイオフィルムの生成を抑えたという³⁾。また、Flannery らによれば、塩素消毒からモノクロラミンに給水系の消毒剤を変更したところ、給水系の全塩素 (遊離塩素と結合塩素を含む) が増加し (とくに平均 45°C の給湯水で安定、一方トリハロメタンは半減)、レジオネラの検出が 60% から 4% に減少したという²⁾。さらに、Kool らは、水道水の消毒剤としてモノクロラミンを使用していた病院は、遊離塩素を使用していた病院よりもレジオネラ肺炎の集団発生が少なく、水道水関連のその集団発生の 90% はモノクロラミンの使用で防げただろうとしている⁵⁾。このようにモノクロラミンは、浴槽水の温度で遊離塩素よりも安定で残留しやすく、バイオフィルムの生成を抑えるため、レジオネラ症の発生を抑制すると考えられる。

Cunliffe は、モノクロラミンが *L. pneumophila* を 1 mg/L (モノクロラミンとしての濃度) で pH 8.4~8.6 の滅菌水道水中

で 15 分で 99% 不活化し、平均 $C \times t_{99}$ は 15 mg.min/L であるとした¹⁾。これを塩素濃度に換算すると 69% の 10.3 mg.min/L となる。今回は、pH 7.5 で 4.2 mg.min/L、pH 8.8 で 15.5 mg.min/L という近い値が得られた。

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⁶⁾。その意味では、1 mg/L のモノクロラミンで十分であると思われる。実際、この濃度で今回試験した 10 株の *L. pneumophila* (浴槽水由来 9 株、患者由来 1 株) は菌の血清群によらず 30 分以内で菌のコロニーが非検出となった。

一方、1 mg/L のモノクロラミンによって培養可能な菌は減少するが、培養不能の生菌が残ると最近報告された⁷⁾。ただし、2 mg/L 以上の濃度のモノクロラミンだとアメーバの添加によっても培養可能菌が回復していない。実際に浴槽水に応用するにあたっては、この点を勘案して濃度が決められるべきである。

E. 結論

結合塩素として作用す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。*Legionella pneumophila* 血清群 1 の浮遊液を 40°C 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 7.5 では、1.0 mg/L の残留塩素濃度で、10 分以内には非検出となった。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。*L. pneumophila* の消毒には 1 mg/L が有効であった。

引用文献

- 1) Cunliffe DA. Inactivation of *Legionella pneumophila* by monochloramine. J Appl Bacteriol. 1990, 68:453-9.
- 2) Flannery B, Gelling LB, Vugia DJ, Weintraub JM, Salerno JJ, Conroy MJ, Stevens VA, Rose CE, Moore MR, Fields BS, Besser RE. Reducing *Legionella* colonization in water systems with monochloramine. Emerg Infect Dis. 2006, 12:588-96.
- 3) Momba MN, Binda MA. Combining chlorination and chloramination processes for the inhibition of biofilm formation in drinking surface water system models. J Appl Microbiol. 2002, 92:641-8.
- 4) Saito A, Shimoda T, Nagasawa M, Tanaka H, Ito N, Shigeno Y, Yamaguchi K, Hirota M, Nakatomi M, Hara K. The first case of Legionnaires' disease in Japan. Kansenshogaku Zasshi 1981, 55:124-128.
- 5) Kool JL, Carpenter JC, Fields BS. Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease. Lancet. 1999, 353:272-7.
- 6) 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.
- 7) Alleron L, Merlet N, Lacombe C, Frère J. Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. Curr Microbiol. 2008, 57:497-502.

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

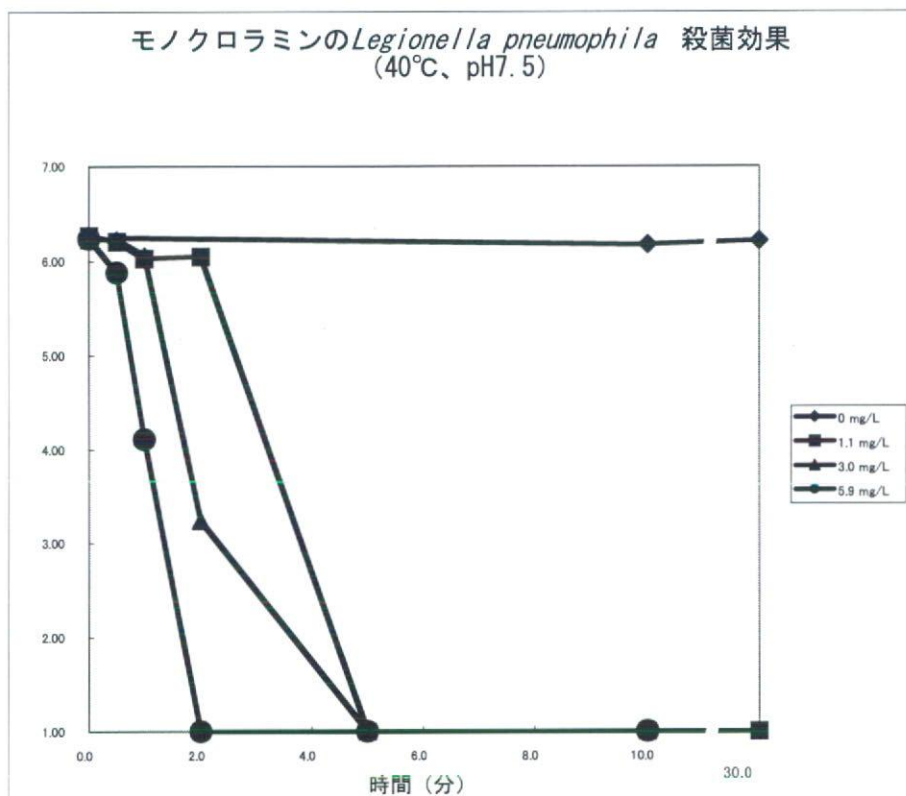
- 1) Amemura-Maekawa J, Suzuki-Hashimoto A, Chang B, Izumiyama S, Ichinose M, Endo T, Watanabe H: Sequence based typing and monoclonal antibody typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in Japan. 23rd Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Madrid. May 2008.
- 2) 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.
- 3) 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。
- 4) 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。
- 5) 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。

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。

表 1 使用した菌株

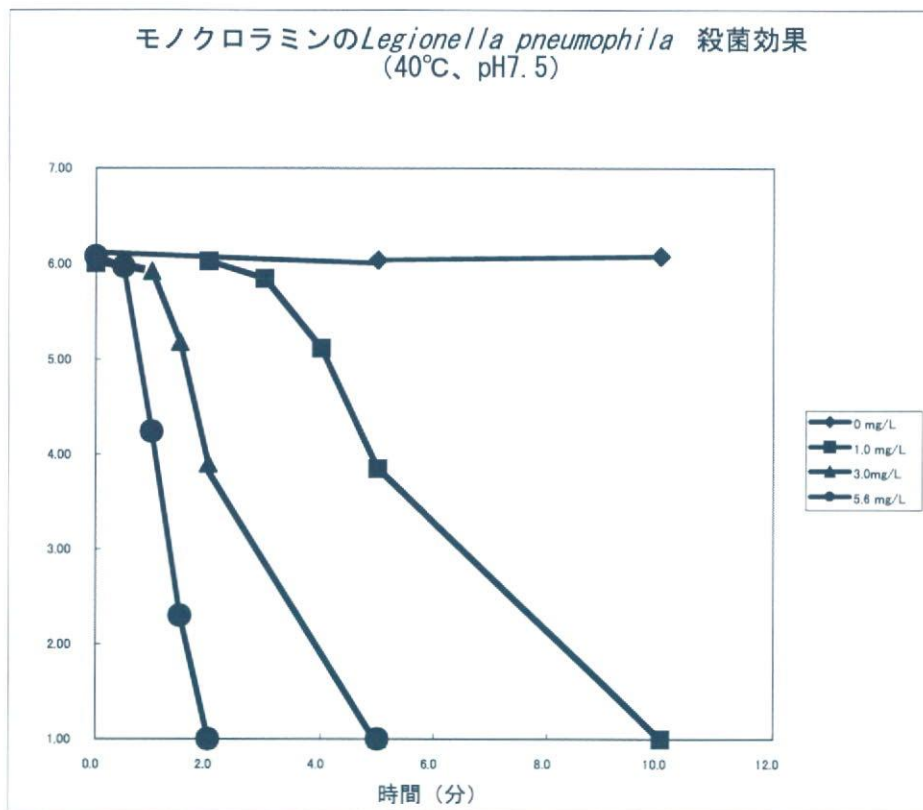
No.	菌種	血清群	菌株	分離地域	備考
1	<i>L. pneumophila</i>	1	NIIB 0058	長崎	臨症分離株
2	<i>L. pneumophila</i>	1	NIIB 0281	茨城	浴槽水分離株、集団感染起因菌
3	<i>L. pneumophila</i>	1	NIIB 0302	静岡	浴槽水分離株、集団感染起因菌
4	<i>L. pneumophila</i>	1	NIIB 0378	宮崎	浴槽水分離株、集団感染起因菌
5	<i>L. pneumophila</i>	3	NIIB 0188	長野	浴槽水分離株
6	<i>L. pneumophila</i>	4	NIIB 0372	新潟	浴槽水分離株
7	<i>L. pneumophila</i>	5	NIIB 0288	茨城	浴槽水分離株
8	<i>L. pneumophila</i>	5	NIIB 0392	客船	浴槽水分離株
9	<i>L. pneumophila</i>	6	NIIB 0187	長野	浴槽水分離株
10	<i>L. pneumophila</i>	6	NIIB 0371	新潟	浴槽水分離株



	モノクロラミン濃度 (塩素濃度として、mg/L)			
時間 (分)	0 mg/L	1.1 mg/L	3.0 mg/L	5.9 mg/L
0	6.27	6.27	6.23	6.24
0.5	N.T.	6.21	6.23	5.88
1	N.T.	6.03	6.06	4.11
2	N.T.	6.05	3.24	<1.7
5	N.T.	<1.7	<1.7	<1.7
10	6.18	<1.7	<1.7	<1.7
30	6.22	<1.7	<1.7	N.T.

図1 実験1、 pH 7.5、 Log (cfu/mL)

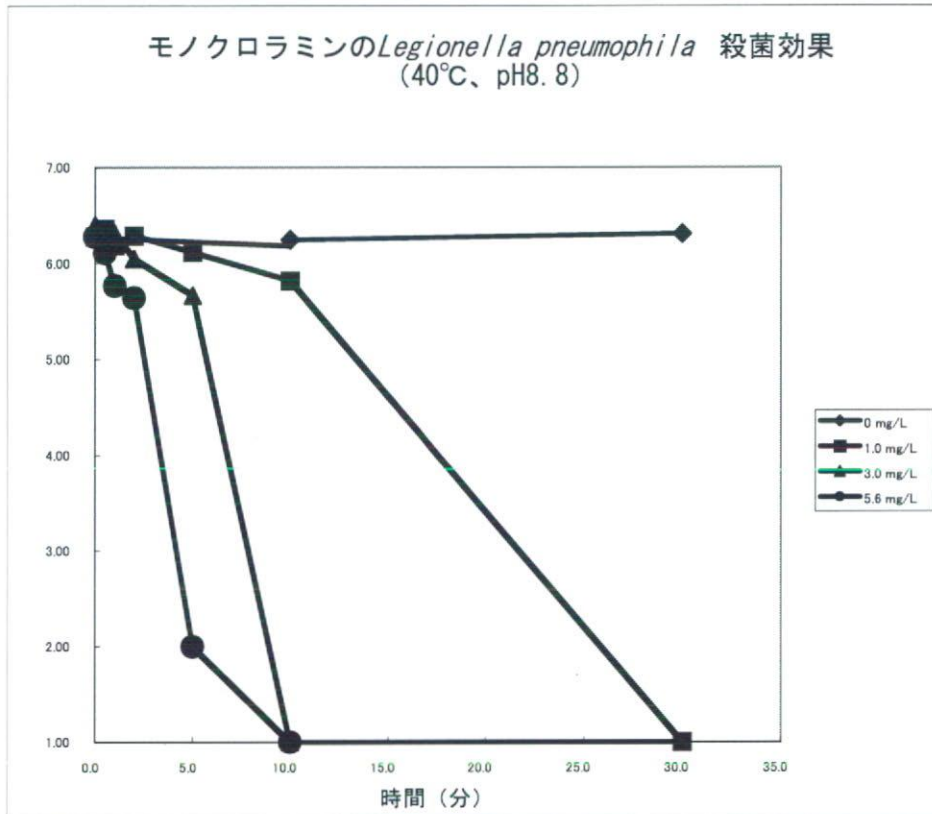
N.T.: not tested



	モノクロラミン濃度 (塩素濃度として、mg/L)			
時間 (分)	0 mg/L	1.0 mg/L	3.0mg/L	5.6 mg/L
0	6.01	6.01	6.06	6.08
0.5	N.T.	N.T.	N.T.	5.97
1	N.T.	N.T.	5.92	4.24
1.5	N.T.	N.T.	5.18	2.3
2	N.T.	6.03	3.9	<1.7
3	N.T.	5.85	N.T.	N.T.
4	N.T.	5.12	N.T.	N.T.
5	6.04	3.85	<1.7	<1.7
10	6.08	<1.7	N.T.	N.T.

図 2 実験 2, pH 7.5、Log (cfu/mL)

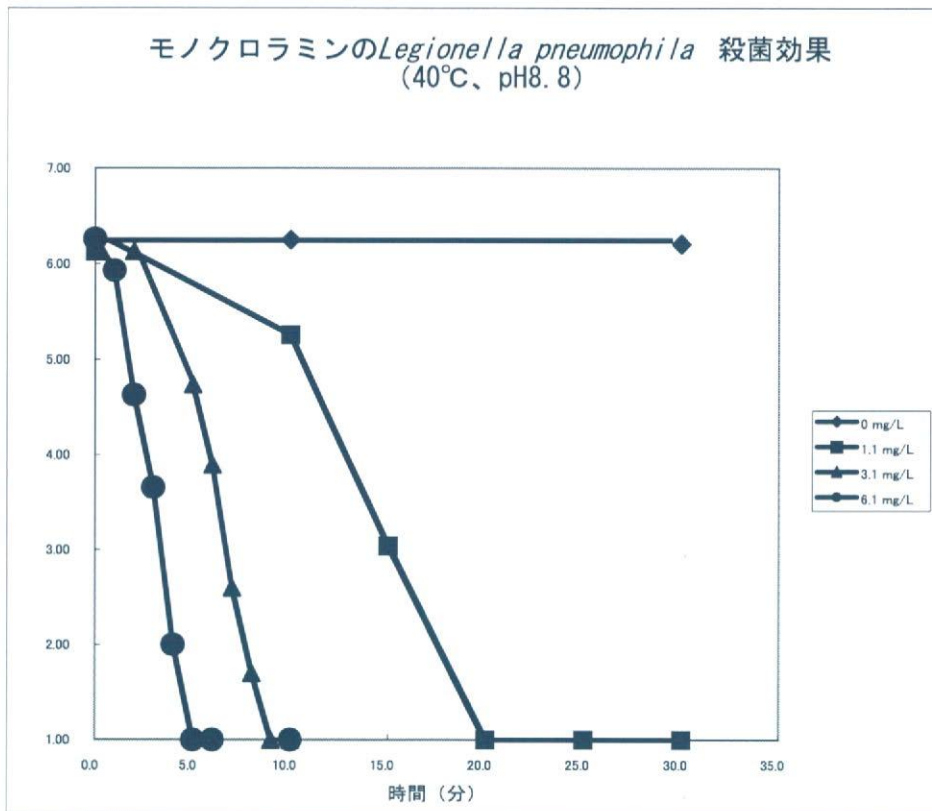
N.T.: not tested



時間 (分)	モノクロラミン濃度 (塩素濃度として、mg/L)			
	0 mg/L	1.0 mg/L	3.0 mg/L	5.6 mg/L
0	6.28	6.28	6.40	6.28
0.5	N.T.	6.36	6.33	6.11
1	N.T.	6.19	6.32	5.77
2	N.T.	6.29	6.05	5.64
5	N.T.	6.12	5.67	2
10	6.25	5.82	<1.7	<1.7
30	6.31	<1.7	<1.7	N.T.

図3 実験1, pH 8.8、Log (cfu/mL)

N.T.: not tested



時間 (分)	モノクロミン濃度 (塩素濃度として、mg/L)			
	0 mg/L	1.1 mg/L	3.1 mg/L	6.1 mg/L
0	6.24	6.13	6.22	6.26
1	N.T.	N.T.	N.T.	5.93
2	N.T.	N.T.	6.13	4.63
3	N.T.	N.T.	N.T.	3.65
4	N.T.	N.T.	N.T.	2.00
5	N.T.	N.T.	4.74	<1.7
6	N.T.	N.T.	3.89	<1.7
7	N.T.	N.T.	2.6	N.T.
8	N.T.	N.T.	1.7	N.T.
9	N.T.	N.T.	<1.7	N.T.
10	6.25	5.26	<1.7	<1.7
15	N.T.	3.04	N.T.	N.T.
20	N.T.	<1.7	N.T.	N.T.
25	N.T.	<1.7	N.T.	N.T.
30	6.21	<1.7	N.T.	N.T.

図 4 実験 2, pH 8.8、Log (cfu/mL)

N.T.: not tested

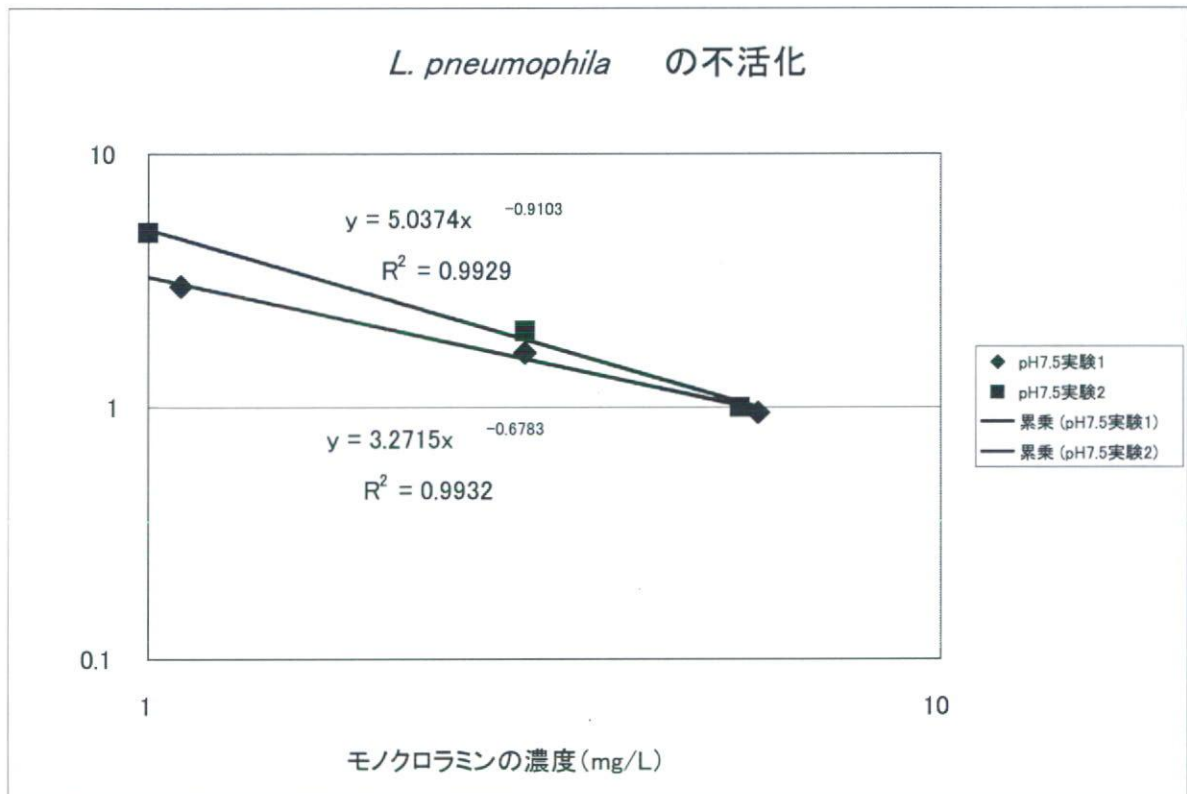


図 5

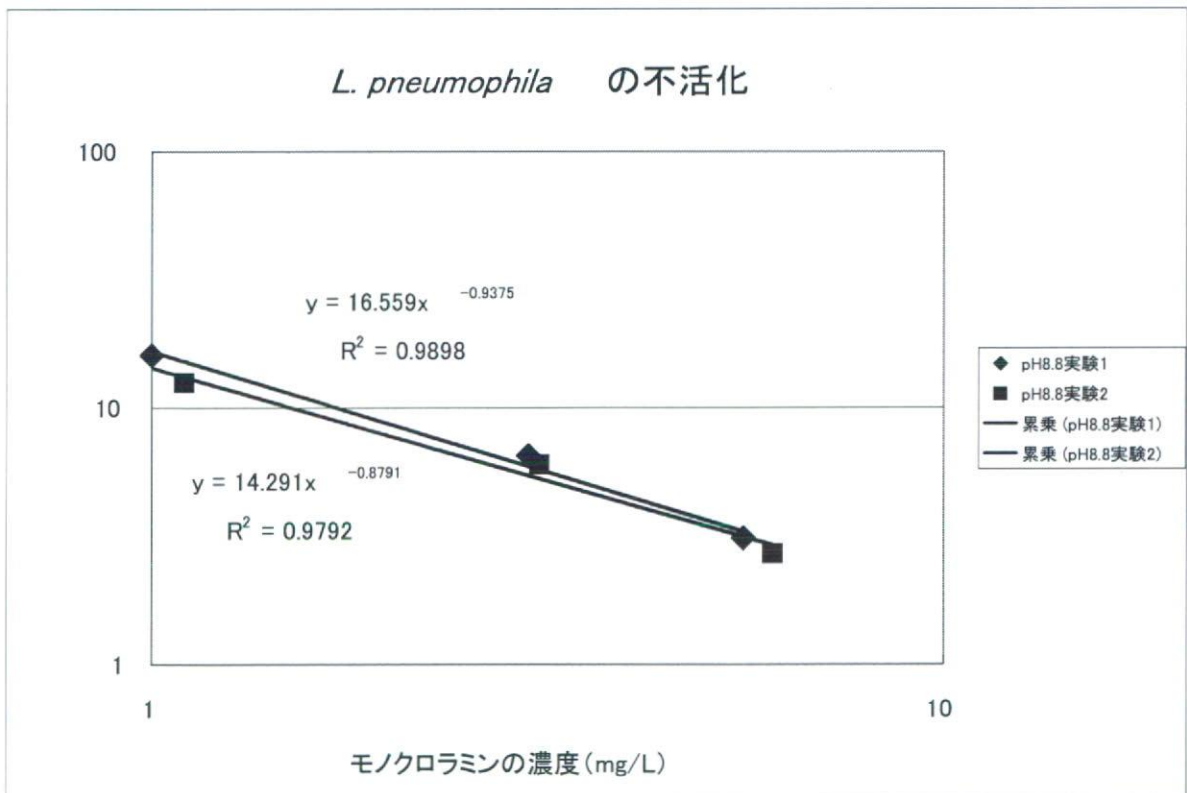


図 6

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)
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

モノクロラミンによる *Naegleria* アメーバの不活化

研究分担者： 泉山 信司 国立感染症研究所寄生動物部

研究協力者： 八木田健司 国立感染症研究所寄生動物部

研究要旨： 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。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塩素消毒は必須となっているが、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。アンモニア性窒素を含む泉質では結合塩素となって遊離残留塩素が維持できないことが問題とされたが、結合塩素にも消毒効果はあり、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。昨年度は有機の結合型塩素であるクロラミン B を用いた消毒を行い、数千の Ct 値にしてアメーバを不活化することを明らかにした。当該年度は無機のクロラミンであるモノクロラミンによる消毒について、レジオネラ属菌の宿主の1つ、*Naegleria* 属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 pH7.5 から 9.0 では、Ct 値≒5~8(モノクロラミン 1mg/L で 5~8 分の処理に相当)で 4-log₁₀ のアメーバの不活化が達成された。モノクロラミンはアメーバの栄養体を容易に不活化し、浴槽水での応用が期待された。

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塩素消毒は必須となっているが、泉質や浴槽設備などにより効果は一様ではなく、全ての温泉の安全を担保するには至っていない。次亜塩素酸ナトリウム等の塩素剤は高 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し、消毒副生成物や塩素臭が生じること、濃度維持が容易ではないことが指摘されている。さらに、遊離残量塩素による消毒は本来的に不連続点塩素処理(不連続点を超えて塩素を注入する処理方法)の維持が求められる。しかしながら、配管系を含む浴槽水系には多量の有機物が存在することや入浴者自体が塩素消費をすることから、不連続点塩素処理を実行することは不可能

で、連続的に塩素を注入し続けなければならない。

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を続けており、バイオフィーム対策として海外の水道で使用されているモノクロラミン消毒に着目して検討を行っている。モノクロラミンは高 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。昨年度は有機のクロラミンであるクロラミン B を用いた消毒を検討した結果、*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 2~3-log₁₀ のアメーバの不活化を、pH 9.2 で 35℃の時では Ct 値≒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

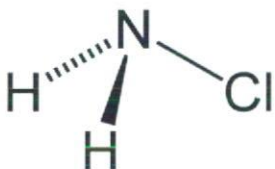
4-log₁₀ 以上の不活化を示した。遊離残留塩素に比べ、モノクロラミン(クロラミン-B)の消毒効果は遅効性であったが、残留性が高く濃度の維持管理が容易で、浴槽等における宿主アメーバを含めたバイオフィーム対策に効果が望めるものと判断された。すなわち、高い Ct 値の欠点は十分な接触時間により相殺させることが出来るものと考えた。当該年度は無機のクロラミン

としてモノクロラミンによる消毒を検討した。モノクロラミンは、有機のモノクロラミンに比べて安定性が低く、アンモニアと遊離塩素の混合による用事調製が必要となることに難がある。実用化については後日の検討課題とすることとして、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したので報告する。

B. 研究方法

モノクロラミン

次亜塩素酸ナトリウムとアンモニア溶液を混合することで、生成した。



Monochloramine MW=51.48 NH ₂ Cl
--

図1 モノクロラミン

ホウ酸緩衝生理食塩水 50ml 中で 0.5M 塩化アンモニウム 243μl と次亜塩素酸ナトリウム (0.85M、関東化学) 65μl を混合し、保存液とした。この時のモル比は文献を参考に 2.2:1 とした (Rose ら 2007)。DPD 法(後述)で概ね 40~70mg/L の全塩素濃度が検出された。消毒実験に際して、同じ緩衝液に希釈して全塩素濃度を実測し、1~12mg/L となるよう調製した。

塩素濃度測定

水中の全残留塩素濃度ならびに遊離残留塩素濃度は DPD 法により求めた(ポケット塩素計、全塩素用ならびに遊離塩素用測定試薬; 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。

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下記アメーバ緩衝生理食塩水で 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。緩衝液
の使用時の pH は 7.5、9.0 であった。

×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 ホウ酸緩衝生理食塩水

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、30 分程度静置してウェル底面にアメー
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モノクロラミン溶液を各
アメーバウェルに 500μL 添加し、室温の位相差
顕微鏡下で細胞の状態を定期的に観察した。
細胞の変性 (死滅) が確認された時点、あるい
は一定時間ごとに 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
静かに吸引除去し、培地を加えて 35°C 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。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を確認したが、異なる値が
得られた場合には平均値を全塩素濃度として
用いた。

C. 研究結果

モノクロラミンは、昨年検討したクロラミン-B よ
り不安定、遊離残留塩素より安定で、その不活

化効果は中間的となることが予想された。まず、*Naegleria lovaniensis* に対して pH9.0 で室温の緩衝液中において、2.3、5.4、12mg/L の全塩素濃度で15分間の接触を行った結果、 10^4 から 10^2 の細胞が不活化され、次いで 1.3、2.7、

アルカリ域でのモノクロラミンのアメーバに対する消毒効果

N. lovaniensis を pH9.0 のホウ酸緩衝アメーバ生理食塩水中で、10分前後まで20秒の間隔で経時的にモノクロラミン消毒の効果を追跡した。 10^4 細胞に対して全塩素濃度 1.3 mg/L の条件で、4分40秒までは生残、5分では死滅の結果が得られた。すなわち、で 4-log の不活化に要

5.4mg/L の濃度で5分間の接触でも 10^4 細胞が不活化された。その範囲で不活化が達成できるものとして、まずアルカリ域での詳細な Ct 値から検討を進めた。

する Ct 値は 6.5 と計算された。

さらに詳細な確認試験として、 10^4 、 10^3 、 10^2 細胞に対して経時的に消毒効果を追跡した。 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秒で不活化を達成した。この時の全塩素濃度は 1.3mg/L で、それぞれの Ct 値は 7.8、5.2、1.6 であった。この結果を片対数グラフにプロットし、不活化直線を得た(図2)。

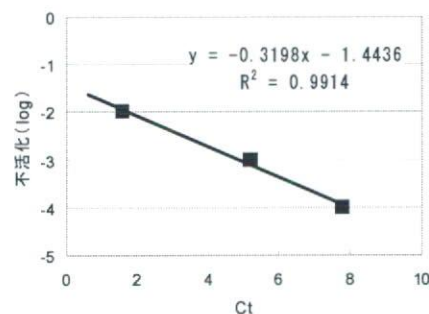


図2 *Naegleria* アメーバのモノクロラミンによる不活化直線

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

pH 7.5 の PAGE's Amoeba saline (10倍濃度) 中で 1.13mg/L のモノクロラミンによるアメーバ消毒処理を行った結果では、 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 4.52 と計算された。

以上の結果をまとめると、pH7.5 から 9.0 において、Ct 値 5~8 で 4-log₁₀ のアメーバの不活化が達成された。

D. 考察

レジオネラの宿主アメーバとして知られる *Naegleria* 属アメーバに対する消毒効果を検討

した。実験系は昨年のクロラミン B と同様である。すなわち、水環境中のアメーバは基本的にバイオフィルム内、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た実験系を使用した。昨年度のクロラミン-B では消毒に数時間から 20 時間の接触時間が必要となり、即効性の消毒効果は期待できないと結論された。本年度のモノクロラミンでは、pH によらず、わずか数分でアメーバが不活化され、即効性が期待できる結果が得られた。しかしながら、モノクロラミンの安定性は必ずしも高くなく、作成した保存液中のモノクロラミンは徐々に減少していた(Data not shown)。実際の使用にあたっては浴場施設で用時調整する必要がある。

E. 結論

遊離残留塩素に比べ、モノクロラミンの消毒効果は遅効性であるが、有機クロラミンに比べれば十分に高い即効性があった。モノクロラミンの生成に関する課題をクリアすれば、浴槽等における宿主アメーバを含めたバイオフィルム対策、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。

参考文献

Monochloramine inactivation of bacterial select agents. Rose LJ, Rice EW, Hodges L, Peterson A, Arduino MJ. Appl Environ Microbiol. 2007 May;73(10):3437-9.

F. 研究発表

紙上発表

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)

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

口頭発表

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

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

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

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

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

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

モノクロラミンの皮膚一次刺激性に関する研究

研究代表者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所寄生動物部
研究分担者	神野 透人	国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部
研究分担者	泉山 信司	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	香川(田中) 聡子	国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部
研究協力者	高橋 淳子	(財) 食品薬品安全センター秦野研究所
研究協力者	畔上 二郎	(財) 食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨: 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必須となる皮膚への影響を明らかにする目的で、モノクロラミンの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。したがって、代替消毒剤としてモノクロラミンを用いた場合でも、入浴者の皮膚刺激が問題なることは無いものと考えられる。

A. 研究目的

Legionella 族菌による汚染を防止する目的で、公衆浴場等における消毒剤として塩素が汎用されている。しかし、泉質によっては塩素では十分な消毒効果が得られない場合があり、かつトリハロメタン類をはじめとする消毒副生成物による健康影響も看過できない問題となっている。このような背景から、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」では塩素代替消毒剤となり得る化合物について広範にわたる探索を行い、最も有力な候補としてモノクロラミンを選定し、消毒効果をはじめとする公衆浴場への適用可能性について研究を進めているところである。しかしながら、公衆浴場で使用する消毒剤として安全性の観点から最も重要な「モノクロラミンの皮膚刺激性」に関する十分な情報が得られないことが、最終的なリスクベネフィットを判定する上での障害となっている。そこで、この判定に必要な刺激性に関する情報を収集することを目的として皮膚一次刺激性試験を実施し

た。

B. 実験方法

B-1 モノクロラミンの安定性試験

塩化アンモニウム (NH_4Cl) は和光純薬工業製の特級試薬、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (NaClO , min. 5.0%) は関東化学製の鹿 1 級試薬を使用した。

Milli Q 水で調製した 0.5 M NH_4Cl 400 μL と NaClO 100 μL を Milli Q 水で希釈して 500 mL とし、モノクロラミン溶液を調製した。この溶液を milli Q 水で 50 倍希釈して全残留塩素及び遊離塩素濃度を DPD 法により測定し、両者の差として結合残留塩素濃度を算出した。皮膚一次刺激性試験で使用するリント布 (約 2.5 cm×2.5 cm) 2 枚をガラスピーカーに入れてモノクロラミン溶液 1 mL を滴下し、蒸散を防ぐためにパラフィルムで被覆した後に 25°C で 30 分間インキュベートした。インキュベーション終了後のリント布からモノクロラミン溶液を回収して残留塩素濃度を測定し、モノクロラミンの残存率を算出した。

B-2 モノクロラミンの皮膚一次刺激性試験

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。尚、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。以下に試験の概要を示した。

- 1) 1週間以上の予備飼育を行って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た。
- 2) 剪毛した背部皮膚を上下、左右に計4区画とし(図1)、それぞれ約6 cm² (約2.5×2.5 cm) の適用部位を確保した。このうち、尾部側の左右2区画の皮膚角質層には滅菌した18 Gの注射針で井桁状に擦り傷を付け、擦過傷皮膚とした。
- 3) 約2.5×2.5 cm四方の滅菌済みリント布を各適用部位にあて、試験液または対象液をそれぞれ0.5 mLずつ染み込ませた。この操作を30分間隔で繰り返し、4時間にわたって計8回の適用を行った。
- 4) 適用時間経過後に日局注射用水で湿らせた脱脂綿で適用部位を清拭し、その後1時間、24時間、48時間及び72時間の時点で表1に示す評価基準に従って、紅斑および痂皮形成ならびに浮腫の程度を観察し、評点を付した。
- 5) 動物ごとに、適用検体除去後1時間、24時間及び48時間における紅斑および痂皮形成と浮腫の評点を合計して6(観察部位数2か所×観察回数3回)で除し、個体別

刺激性指数とした。それぞれの個体別刺激性指数の和を動物数で除して平均値を求め(小数第2位を四捨五入)、これをそれぞれの一次刺激性指数(P.I.I.)とした。

- 6) 得られたP.I.I.を基に、表2に示した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。

C. 結果

C-1 モノクロラミンの安定性

B. 実験方法の“B-1 モノクロラミンの安定性試験”に記したように Milli Q 水で調製したモノクロラミン溶液のpHは、3回の調製を行った平均値として7.45であり、緩衝能を付与せずに水溶液として皮膚一次刺激性試験に用いることとした。また、この時の結合塩素(モノクロラミン)濃度は52 mg/Lで、全残留塩素の少なくとも95%以上が結合塩素として存在していた。

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た結果、残存率は3回の実験の平均値として85.9%であった。

C-2 モノクロラミンの皮膚一次刺激性

表3に皮膚一次刺激性試験の結果を示した。モノクロラミン(56 mg/L, pH 7.2)を適用したウサギでは、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(図2)、3匹の平均値として得られるP.I.I.は0.2であり、最終的に「無刺激物」と判定された。

D. 考察

モノクロラミンの生体影響については、飲料水の消毒剤あるいは塩素消毒副生成物としての観点から WHO Guidelines for Drinking Water Quality, 3rd Edition (http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/index.html)で既に評価が行われている。雄ラットに2年間にわたって飲水投与したNTPの研究での最高投与量であるNOAEL 9.4 mg/kg/day(最高投与群のラットの平均体重は相当する対照群

よりも低かったが、これはおそらく飲料水の異味によるものである) を基に 94 µg/kg 体重の TDI が設定されている。体重 60 kg の成人が 1 日あたり 2L の飲料水を摂取するものとして、ガイドライン値は 3 mg/L とされている。しかしながら、公衆浴場等で代替消毒剤として使用した場合の生体影響指標として最も重要な皮膚への影響については、公的な機関によるレビューを含め、文献情報はほとんど無く、*Environment Health Criteria* の下記の記述が検索された唯一のものであった。"クロラミンを 1-1000 mg/L の濃度範囲のクロラミンを含む水に 1 日に 10 分間、4 日間にわたって Sencar マウスを浸し、皮膚刺激に対するモノクロラミンの影響を試験した。次亜塩素酸 (pH 6.5) や 次亜塩素酸塩 (pH 8.5) とは異なり、クロラミンでは皮膚の過形成を生じることにはなかった。(WHO; *Environment Health Criteria* 216: Disinfectants and Disinfectant By-Products (2000). Available from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc216.htm> as of July 6, 2005.)"

そこで、本研究班では最も汎用されている OECD Guideline for the Testing of Chemicals: No. 404, Acute Dermal Irritation/Corrosion 法に準拠した方法で独自に皮膚一次刺激性試験を実施した。その結果、試験濃度が WHO ガイドライン値の 15 倍以上高濃度であるにもかかわらず、適用時間終了 1 時間後に軽度の紅斑が観察されたのみで、モノクロラミンが「無刺激物」であることが明らかになった。したがって、消毒を目的として通常使用される濃度域においては、浴槽水中のモノクロラミンによって皮膚刺激が引き起こされる可能性は低いと考えられる。

E. 結論

モノクロラミンのウサギにおける皮膚一次刺激性について検討を行った結果、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。したがって、公衆浴場における代替消毒剤としてモノクロラミンを用いた場合でも、入浴者の皮膚刺激が問題なることは無いものと考

えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

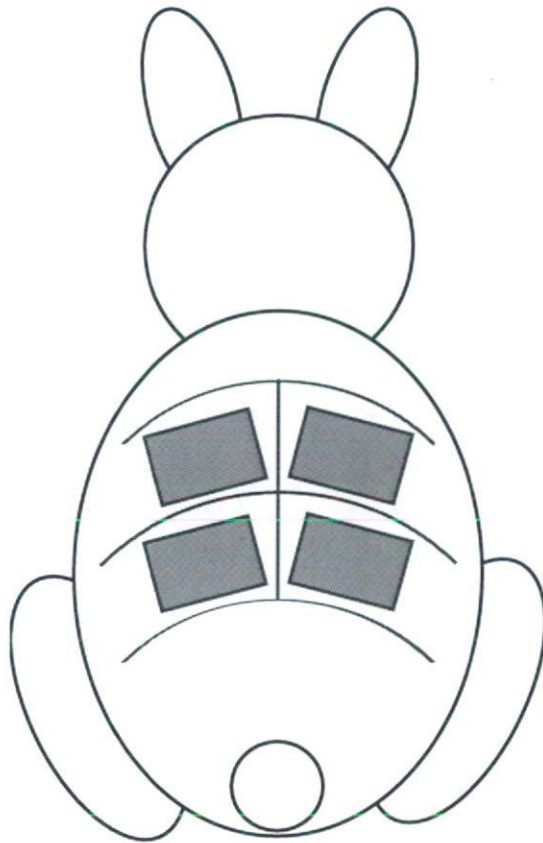


図1 ウサギ背部の試験液及び対照液適用部位

健全皮膚－対照液

健全皮膚－試験液

擦過傷皮膚－対照液

擦過傷皮膚－試験液

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 (やっとな認められる程度)	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 (やっとな認められる程度)	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 1 mm の高さに腫脹している)	3
	重度な浮腫 (1 mm 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	適用検体除去後の観察時間	個別刺激性指数		
			1時間	24時間				1時間	24時間
試験液	1	健全皮膚	0	0	0	0	0	0.2	
		擦過傷皮膚	1	0	0	0	0	0	0.2
		健全皮膚	0	0	0	0	0	0	0.2
	2	擦過傷皮膚	1	0	0	0	0	0	0.2
		健全皮膚	0	0	0	0	0	0	0.2
		擦過傷皮膚	1	0	0	0	0	0	0.2
	一次刺激性指数					0.2			
		判定				無刺激性			
	対照液	1	健全皮膚	0	0	0	0	0	0
擦過傷皮膚			0	0	0	0	0	0	0
健全皮膚			0	0	0	0	0	0	0
2		擦過傷皮膚	0	0	0	0	0	0	0
		健全皮膚	0	0	0	0	0	0	0
		擦過傷皮膚	1	0	0	0	0	0	0.2
一次刺激性指数						0.1			
		判定				無刺激性			
個別刺激性指数：		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：		個別刺激性指数の合計を動物数で除して算出							

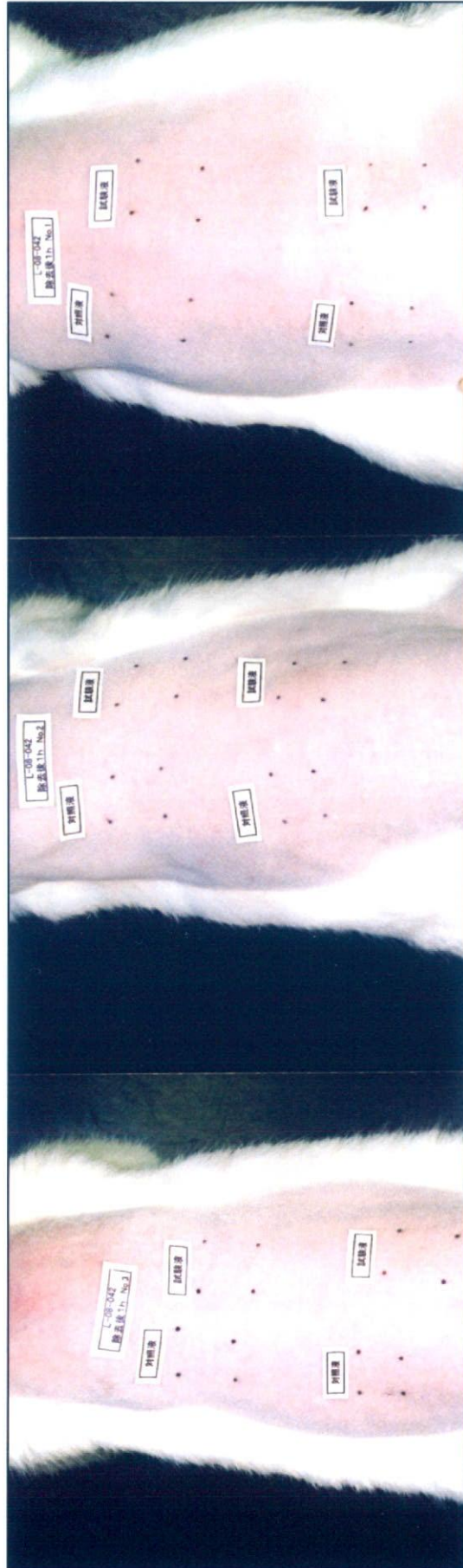


図2 適用検体除去1時間後のウサギ背部
試験液を適用した擦過傷皮膚部位で非常に軽度の紅斑が観察された