

## 要約

モノクロラミンの皮膚一次刺激性試験を、日本白色種雄ウサギ(Kbs:JW)を用いて実施した。試験液として、用時に調製したモノクロラミン溶液(結合残留塩素 56 mg/L)を用いた。また、対照液にはモノクロラミン溶液の調製に用いた日局注射用水をそのまま用いた。試験群は1群3匹からなる1群構成とし、1個体にモノクロラミン溶液と対照液を2箇所ずつ適用し、それぞれの皮膚反応を比較した。すなわち、適用前日に剪毛した背部皮膚を前後左右に計4区画設け、それぞれ約6 cm<sup>2</sup>(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(擦過傷皮膚)をつけた。右側の健常皮膚および擦過傷皮膚にはモノクロラミン溶液を、また左側の健常皮膚および擦過傷皮膚には対照液を、それぞれ0.5 mLずつ、1回30分間、計8回、合計4時間適用した。最終適用検体除去後1、24、48 および72 時間に皮膚反応を観察した。次いで、最終適用検体除去後1時間、24時間および48時間の刺激性評点をもとに一次刺激性指数を求め、皮膚刺激性反応の分類表に従って刺激性の程度を分類した。

その結果、最終適用検体除去後1時間の観察で、モノクロラミン溶液の擦過傷皮膚適用部位全箇所と対照液の擦過傷皮膚適用部位3箇所中1箇所に、非常に軽度な紅斑の刺激性反応がみられたが、これらの反応は24時間後の観察では消失し、その後は観察期間を通して刺激性反応は認められなかった。また、健常皮膚には刺激性反応は全くなかった。これらの所見を皮膚刺激反応の分類表に従って判定した結果、モノクロラミン溶液の一次刺激性指数は0.2で「無刺激物」に分類された。よって、モノクロラミン溶液は、擦過傷皮膚に対して軽微な刺激性を有する可能性はあるが、その反応は組織を損傷させるものではなく、また、健常皮膚に対しては、刺激性はないと考えられる。

## 試験目的

モノクロラミンの安全性評価の資料とするため、ウサギにおける皮膚一次刺激性試験を行った。

## 試験ガイドライン

本試験は、「OECD Guideline for the Testing of Chemicals: No. 404, Acute Dermal Irritation/Corrosion」(April 24, 2002)(以下、OECD No. 404と記す)を参考に立案し、実施した。

## 動物愛護

全ての実験操作は、「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)および「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(動物実験承認番号: 1080381A)。なお、承認された動物実験計画からの変更はなかった。

## 材料と方法

### 1. 被験物質

被験物質であるモノクロラミンは、次亜塩素酸ナトリウムおよび塩化アンモニウムの混合物で無色透明の液体である。

### 2. 適用検体

試験液としたモノクロラミン溶液は、国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部より提供された次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素 5.0%以上)(関東化学 試薬一級 ロット番号 010X2103)および塩化アンモニウム(和光純薬工業 試薬特級 ロット番号 ALG6466)を用いて用時に調製した。すなわち、日局注射用水(製造番号 A85VH1、光製薬)1 L に 0.5 M 塩化アンモニウム溶液 4 mL および次亜塩素酸ナトリウム溶液 1 mL を加えて混合し、試験液とした。なお、この溶液の結合残留塩素濃度は、56 mg/L、遊離残留塩素濃度は 0.1 mg/L 未満、pH 7.2 であった。また、試験に使用した次亜塩素酸ナトリウム溶液中の塩素酸および臭素酸濃度は、6.94 mg/L および 0.001 mg/L 未満であった。調製後の試験液は、遮光・密封約 40 mL ガラス容器(満水)で冷蔵保管し、各々の適用の都度、新たな容器中の試験液を用いた。

対照液は、試験液の調製に用いた日局注射用水をそのまま用いた。

### 3. 動物と飼育方法

試験動物には、日本白色種雄ウサギ[Kbs:JW、クリーン動物(Healthy)、北山ラベス 伊那生産場]を用いた。動物は、2008 年 11 月 7 日または 2008 年 11 月 21 日に 16~18 週齢で購入し、入荷日を含む 7 日間の検疫期間に加えて、試験に使用するまで予備飼育期間として飼育環境に馴化させた。試験には、他の試験に未使用で、予備飼育期間中の一般状態に異常がなく、適用前日に背部を電気バリカンで剪毛し、ヘアサイクルが休止期の動物 3 匹(適用日体重 2.967~3.325 kg、適用時週齢 20~24 週齢)を選んで用いた。

動物は、許容温度 20.0~26.0℃、許容湿度 40.0~75.0%、換気設定約 15 回/時間、照明 12 時間(7 時~19 時点灯)に制御された飼育室内で金属製金網床ケージ(350W×500D×350H mm)に 1 匹ずつ収容した。動物には約 130 g/日の固型飼料(RC4、オリエンタル酵母工業)を給餌し、水道水(秦野市水道局給水)は自由摂取とした。

動物の識別は、入荷時に左耳介内側に発注番号、外側に馴化番号を、また、試験動物選別時に右耳介外側に動物番号を、それぞれ油性フェルトペンで記入することにより行った。さらに、入荷時に発注番

号、馴化番号、性および入荷日を記載した動物カードを、また、試験動物選別後に、入荷時とは色の異なる動物カードに、試験番号、性、動物番号および実験開始日を記入し、ケージに掛けた。

試験動物 3 匹は、観察終了後(2008 年 12 月 26 日)にバルビタール系麻酔薬を使用した注射麻酔法により安楽死処分した。

#### 4. 試験群

試験群は 1 群 3 匹からなる 1 群構成とし、1 個体に試験液と対照液を 2 箇所ずつ適用し、それぞれの皮膚反応を比較した。

#### 5. 適用方法

##### 1) 適用経路

適用経路は、背部皮膚の健常皮膚および擦過傷皮膚とした。

##### 2) 適用部位

適用前日に剪毛した背部皮膚を、上下、左右に、計 4 区画設け、それぞれ約 6 cm<sup>2</sup>(約 2.5×2.5 cm)の適用部位を確保した。このうち、適用直前に、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(擦過傷皮膚)をつけた。右側の健常皮膚および擦過傷皮膚には試験液を、また左側の健常皮膚および擦過傷皮膚には対照液を適用した(図 1 参照)。

##### 3) 適用量、適用回数および適用時間

適用は、OECD No. 404 に準じて、適用 1 箇所あたり約 2.5×2.5 cm 四方、0.5 mL/回とした。また、試験液の安定性を考慮し、1 回 30 分間、計 8 回、合計 4 時間の適用とした。

##### 4) 適用方法

適用時間内は、適用検体の剥離を防止するため、動物を発熱性物質試験用固定器に收容した。試験液または対照液を、0.5 mL ずつしみ込ませた約 2.5×2.5 cm 四方の滅菌済みリント布を、それぞれの適用部位にあて、その上をパラフィルムとテープで覆って止めた。これを 30 分間隔で計 8 回、合計 4 時間の適用を行った。なお、適用期間中は、絶食、絶水とした。

##### 5) 適用時間経過後の処置

4 時間の適用後に適用部位を日局注射用水で湿らせた脱脂綿で清拭した。

#### 6. 観察方法

##### 1) 一般状態の観察

観察期間中、毎日 1 回、一般状態の観察を行った。

##### 2) 体重測定

適用日および観察終了日に体重を測定した。

##### 3) 適用部位の肉眼的観察

最終適用検体除去後 1 時間、24 時間、48 時間および 72 時間に、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に評点を付けた。

#### 4) 適用部位の写真撮影

肉眼的観察の補助資料とするため、全例について、最終適用検体除去後1時間の観察終了後に適用部位の写真撮影を行った。

### 7. 判定方法

#### 1) 一次刺激性指数(P.I.I.)の算出

- ① 動物ごとに、適用検体除去後1時間、24時間および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(小数第2位を四捨五入)、個体別刺激性指数とした。
- ② 各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とする(最高点=8)とした。

#### 2) 判定

求めた一次刺激性指数より、表2に示す皮膚刺激反応の分類表に従って、各適用検体の刺激性の程度を分類した。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

当該試験期間中に、「予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと」はなかった。

### 試験成績

#### 1. 一般状態および体重推移

観察期間中、いずれの例においても一般状態に異常は認められなかった(表3)。また、適用後の体重には著しい変動はなかった(表4)。

#### 2. 肉眼的観察結果

##### 1) 試験液(表5、写真1～写真3)

最終適用検体除去後1時間の観察では、3例全例の擦過傷皮膚に、非常に軽度な紅斑(評点1)がみられたが、健常皮膚には刺激性反応は認められなかった。また、24時間後の観察では、擦過傷皮膚にみられた紅斑は消失し、これ以降の観察では、いずれの適用部位にも刺激性反応は認められなかった。これらの結果から、試験液の一次刺激性指数は0.2と算出された。

## 2) 対照液(表 5、写真 1～写真 3)

最終適用検体除去後 1 時間の観察では、3 例中 1 例(動物番号 3)の擦過傷皮膚に、評点 1 の紅斑がみられたが、他の 2 例の擦過傷皮膚および全健常皮膚には刺激性反応は認められなかった。また、24 時間後の観察では、擦過傷皮膚にみられた紅斑は消失し、これ以降の観察では、いずれの適用部位にも刺激性反応は認められなかった。これらの結果から、対照液の一次刺激性指数は 0.1 と算出された。

## 考察および判定

モノクロラミンの皮膚一次刺激性試験を実施した結果、最終適用検体除去後 1 時間の観察で、モノクロラミン溶液の擦過傷皮膚適用部位全箇所、非常に軽度な紅斑の刺激性反応がみられたが、これらの反応は 24 時間後の観察では消失し、その後は観察期間を通して刺激性反応は認められなかった。また、健常皮膚には刺激性反応は全くなかった。モノクロラミン溶液の擦過傷皮膚の適用部位にみられた紅斑は、対照液の擦過傷皮膚適用部位(3 箇所中 1 箇所)にも同様な反応がみられる程度の軽微なものであった。また、これらの所見を皮膚刺激反応の分類表に従って判定した結果、モノクロラミン溶液の一次刺激性指数は 0.2 で「無刺激物」に分類された。よって、モノクロラミン溶液は、擦過傷皮膚に対して軽微な刺激性を有する可能性はあるが、その反応は組織を損傷させるものではなく、また、健常皮膚に対しては、刺激性はないと考えられる。

- |                  |           |
|------------------|-----------|
| ① 右背部頭部側皮膚:健全皮膚  | 適用検体: 試験液 |
| ② 右背部尾部側皮膚:擦過傷皮膚 | 適用検体: 試験液 |
| ③ 左背部頭部側皮膚:健全皮膚  | 適用検体: 対照液 |
| ④ 左背部尾部側皮膚:擦過傷皮膚 | 適用検体: 対照液 |

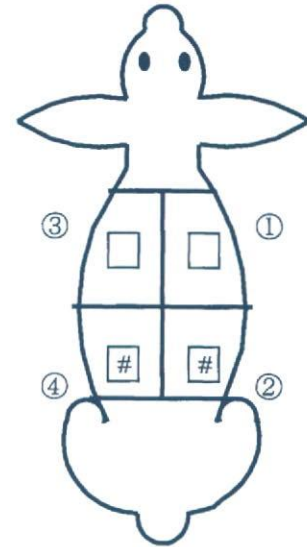


図 1

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 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  |

表 3

一般状態

| 動物番号 | 適用日 | 適用後 1 日 | 適用後 2 日 | 適用後 3 日 |
|------|-----|---------|---------|---------|
| 1    | —   | —       | —       | —       |
| 2    | —   | —       | —       | —       |
| 3    | —   | —       | —       | —       |

—:変化なし

表 4

体重推移

| 動物番号 | 体重 (kg) |       |
|------|---------|-------|
|      | 適用日     | 観察終了日 |
| 1    | 3.325   | 3.288 |
| 2    | 2.967   | 2.953 |
| 3    | 3.044   | 3.051 |

表 5

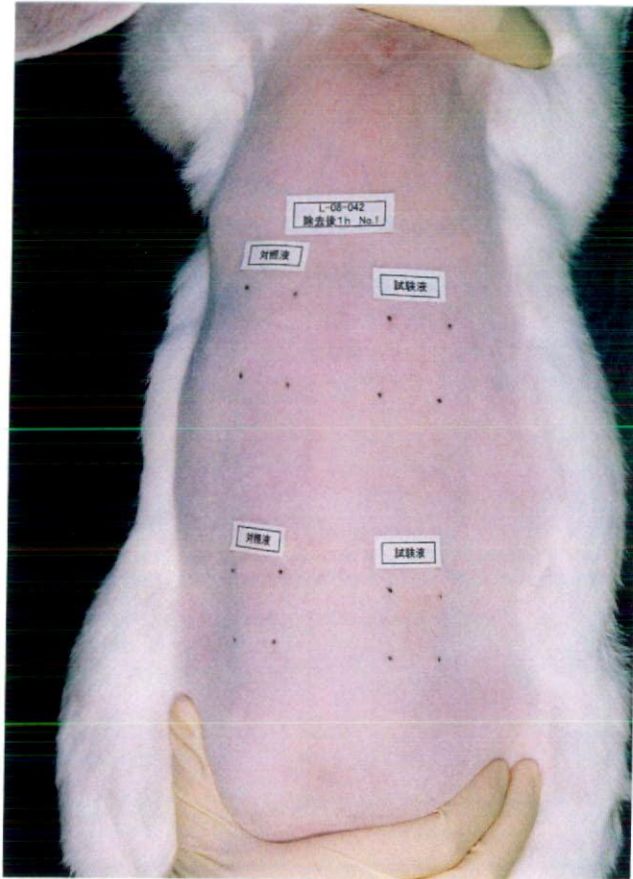
モノクローマリン溶液のウサギにおける皮膚一次刺激性試験成績

| 適用検体    | 動物番号 | 適用皮膚              | 紅斑・痂皮形成評点             |      | 浮腫評点 |                       | 個別刺激性指数 |
|---------|------|-------------------|-----------------------|------|------|-----------------------|---------|
|         |      |                   | 最終適用検体除去後の観察時間<br>1時間 | 24時間 | 48時間 | 最終適用検体除去後の観察時間<br>1時間 |         |
| 試験液     | 1    | (健全皮膚)<br>(擦過傷皮膚) | 0                     | 0    | 0    | 0                     | 0.2     |
|         | 2    | (健全皮膚)<br>(擦過傷皮膚) | 1                     | 0    | 0    | 0                     | 0.2     |
|         | 3    | (健全皮膚)<br>(擦過傷皮膚) | 0                     | 0    | 0    | 0                     | 0.2     |
| 一次刺激性指数 |      |                   | 0.2                   |      |      |                       |         |
| 判 定     |      |                   |                       |      |      |                       |         |
| 無刺激物    |      |                   |                       |      |      |                       |         |
| 対照液     | 1    | (健全皮膚)<br>(擦過傷皮膚) | 0                     | 0    | 0    | 0                     | 0       |
|         | 2    | (健全皮膚)<br>(擦過傷皮膚) | 0                     | 0    | 0    | 0                     | 0       |
|         | 3    | (健全皮膚)<br>(擦過傷皮膚) | 1                     | 0    | 0    | 0                     | 0.2     |
| 一次刺激性指数 |      |                   | 0.1                   |      |      |                       |         |
| 判 定     |      |                   |                       |      |      |                       |         |
| 無刺激物    |      |                   |                       |      |      |                       |         |

個別刺激性指数＝適用検体除去後1時間、24時間および48時間における適用部位の紅斑・痂皮形成および浮腫の評点の合計を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



(頭側)

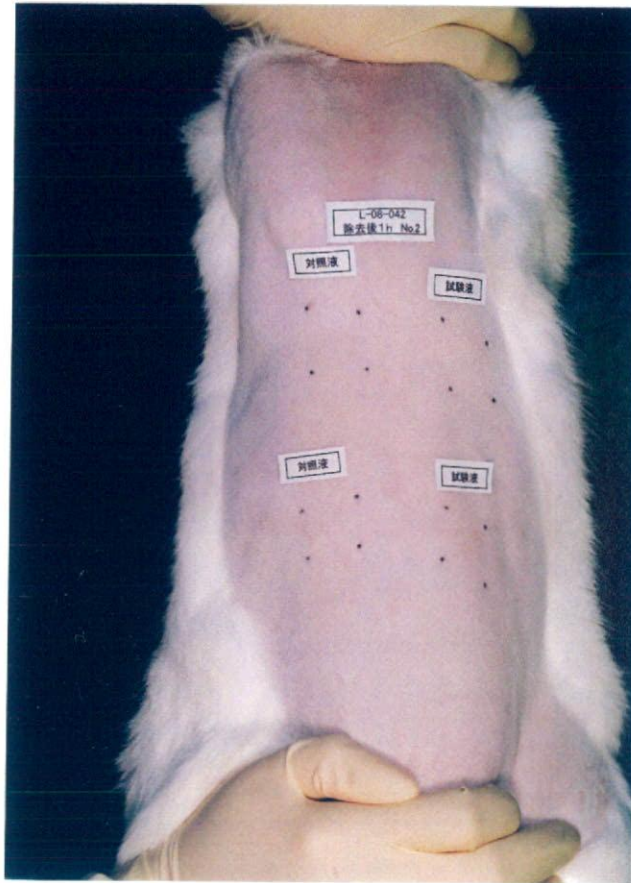


(尾側)

写真 1

モノクロラミンのウサギにおける皮膚一次刺激性試験  
動物番号 1  
適用検体除去後 1 時間の皮膚

(頭側)

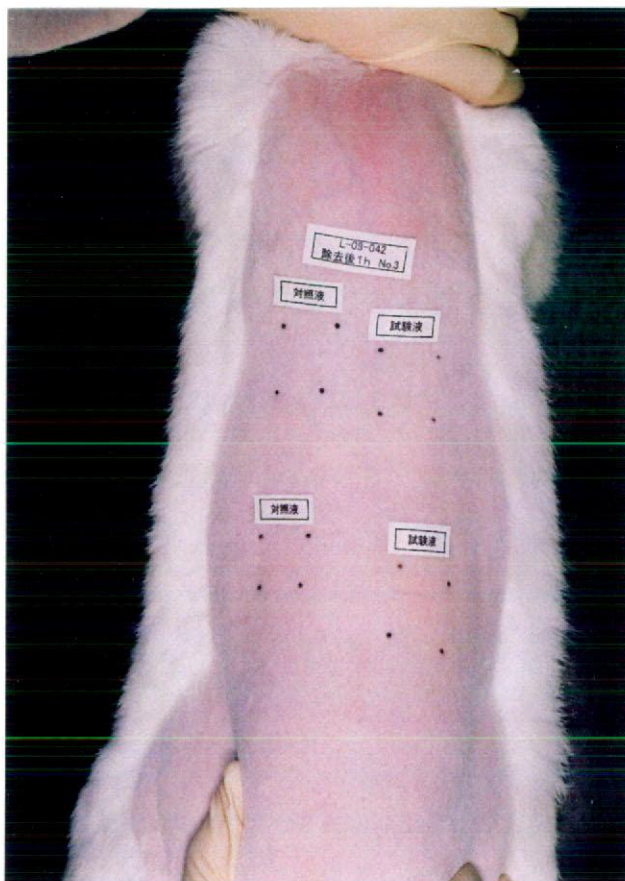


(尾側)

写真 2

モノクロラミンのウサギにおける皮膚一次刺激性試験  
動物番号 2  
適用検体除去後 1 時間の皮膚

(頭側)



(尾側)

写真 3

モノクロラミンのウサギにおける皮膚一次刺激性試験

動物番号 3

適用検体除去後 1 時間の皮膚

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

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

分担研究者 杉山 寛治 静岡県環境衛生科学研究所  
泉山 信司 国立感染症研究所  
八木田健司 国立感染症研究所

研究要旨

モデル浴槽を使用してクロラミン B 消毒効果の実証試験を行った。浴槽水へのクロラミン B の間欠的投入による全塩素濃度 3 mg/L の保持と、入浴を実施し、浴槽水とろ過器内水の浮遊菌数と、濾過材、ヘアーキャッチャー、配管の拭き取りによるバイオフィーム形成状況を調べた。

ヒトの入浴による全塩素濃度の大きな減少はなく、1日に塩素換算 0.3 mg/L 相当のクロラミン B の投入で全塩素濃度が安定的に保持できた。6日間のクロラミン B 投入による全塩素濃度 3 mg/L の保持で、浴槽水の浮遊菌数（従属栄養細菌数、レジオネラ）の増加を抑制することができた。クロラミン B（全塩素濃度 3 mg/L）による消毒効果は6日間以内では期待できるが、それ以上に継続すると、浴槽水、ろ過機内水の従属栄養細菌数が上昇を始め、レジオネラも検出されるようになった。また、入浴に伴う TOC など有機物量の上昇は避けられず、定期的な浴槽水の交換は必須と思われた。

A. 研究目的

浴槽水におけるレジオネラ属菌の汚染が問題となっているが、高 pH、アンモニア等を含む温泉では遊離残留塩素による消毒が困難であることから、代替消毒法が求められている。当該研究では水道等のバイオフィーム対策として使用されることがあるクロラミン消毒に着目し、今年度は試薬の取り扱いが比較的容易で、室温において安定なクロラミン B による消毒効果を、循環ろ過式モデル浴槽において検討した。浴槽水のクロラミン B 濃度は、平成 19 年度に実施した「クロラミン B によるレジオネラ属菌の消毒の事前評価」において、高 pH (pH8.9) で消毒効果が確認できた全残留塩素濃度 3 mg/L を維持した。

B. 方法

1. 循環ろ過式モデル浴槽におけるクロラミン B 消毒実験

クロラミン B（関東化学）は全残留塩素濃度が塩素換算として約 12,000 mg/L の保存液を作

成し、室温で遮光保存した。試薬はこの条件下で 1 ヶ月以上安定に保存できることを確認した。全残留塩素濃度はポケット残留塩素計（HACH 社）を用い DPD 法により測定した。

循環水量 4 m<sup>3</sup>/h のモデル浴槽の浴槽水 2 m<sup>3</sup> (pH8.1、水温 40℃) に、クロラミン B の約 12,000 mg/L 保存液 220 mL を投入し、浴槽水の全残留塩素濃度を 3.08 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、10 名が入浴し、浴槽水への有機物の蓄積を行った。

## 2. サンプリング

クロラミン投入前、クロラミン濃度一定調整後、クロラミン管理 1 日後の入浴前後と、クロラミン管理 2、3、6、10、13 日後の入浴前に、浴槽水、ろ過器内水を採取した。浴槽水については、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）などの水質検査を実施した。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 日間後の集毛器（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。

## C. 結果および考察

### 1. 入浴者数、クロラミン B 投入量、全残留塩素濃度、遊離残留塩素濃度の変化

クロラミン B 管理時の入浴者数と、浴槽水へのクロラミン B 投入量、浴槽水的全残留塩素濃度、遊離残留塩素濃度の変化を図 1 に示した。ヒトの入浴による全塩素濃度の大きな減少はなく、浴槽水へのクロラミン B 投入量は、1 日平均 25 mL 程度（塩素換算 0.3 mg/L 相当）で、実験期間を通して全残留塩素濃度の変動はほぼ目標とした 3 mg/L の 20% 未満に収まっていた。このことから、クロラミン B の間欠的な投入によって、ヒトの入浴にかかわらず、安定的に全残留塩素濃度が保持できることがわかった。また、浴槽水の遊離残留塩素濃度はすべて 0.1 mg/L 以下であり、クロラミン B 投入による増加はなかった。

### 2. 浴槽水のレジオネラ属菌数、従属栄

養細菌数、過マンガン酸カリウム消費量、TOC などの推移

モデル浴槽へのクロラミン B 投入による全残留塩素濃度 3 mg/L 維持管理時の浴槽水におけ

る従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数、全残留塩素濃度、過マンガン酸カリウム消費量、TOC の推移を図 2 に示した。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 1ml あたり  $10^1$  CFU 程度で推移したが、6 日以降は  $10^4$  CFU に増殖がみられた。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、100ml あたり  $10^1$  から  $10^2$  CFU の増殖がみられた。以上より、クロラミン B 投入による全塩素濃度 3 mg/L の保持による消毒効果は、6 日間以内では期待できるが、それ以上に継続すると、浴槽水、ろ過機内水の従属栄養細菌数が上昇し始め、レジオネラも検出されることがわかった。

過マンガン酸カリウム消費量と TOC は、入浴に伴って上昇し、溶存有機物量の上昇は避けられず、定期的な浴槽水の交換は必須と思われた。

### 3. ろ過器内水のレジオネラ属菌数、従属栄養細菌数の推移

図 3 に、クロラミン B 投入による全残留塩素濃度 3 mg/L 維持管理時の、ろ過器内水の従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数を示した。ろ過器内水の従属栄養細菌数は 3 日以降から徐々に増加し、10 日以降は 1ml あたり  $10^5$  CFU 以上になった。レジオネラ属菌は 10 日までは検出されなかったが、13 日後には 100ml あたり  $10^2$  CFU に増加した。

### 4. クロラミン B 投入時の浴槽系内のバイオフィームの変化

図 4 に、クロラミン B 投入による全残留塩素濃度 3 mg/L 維持管理時の、浴槽系内のバイオフィーム（従属栄養細菌数、レジオネラ属菌

数)の変化を示した。クロラミンB 投入時の浴槽系内のバイオフィルムの増加は、全残留塩素濃度 3 mg/L 維持、13日後の配管やヘアークャッチャーの拭き取りの従属栄養細菌数の増加で確認された。13日後のろ過材からはレジオネラ属菌も 800 CFU/gに検出された。クロラミンB (全残留塩素濃度3 mg/L) による13日間と長期間にわたるバイオフィルム形成抑制効果は期待できなかった。

#### D. 結論

基礎実験で、レジオネラ属菌の消毒効果が確認されたクロラミン B による 3 mg/L の全残留塩素濃度を使用し、循環ろ過式モデル浴槽における浮遊菌数とバイオフィルム形成の抑制が可能か検討した。

クロラミンB の間欠的な投入によって、ヒトの入浴にかかわらず、安定的に全残留塩素濃度が保持できることがわかった。クロラミンB (全残留塩素濃度3 mg/L) による消毒効果は6日間以内では期待できるが、それ以上に継続すると、浴槽水、ろ過器内水の従属栄養細菌数が上昇し始め、レジオネラも検出されるようになった。また、入浴に伴うTOCなど有機物量の上昇は避けられず、定期的な浴槽水の交換は必須と思われた。

#### E. 研究発表

なし

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

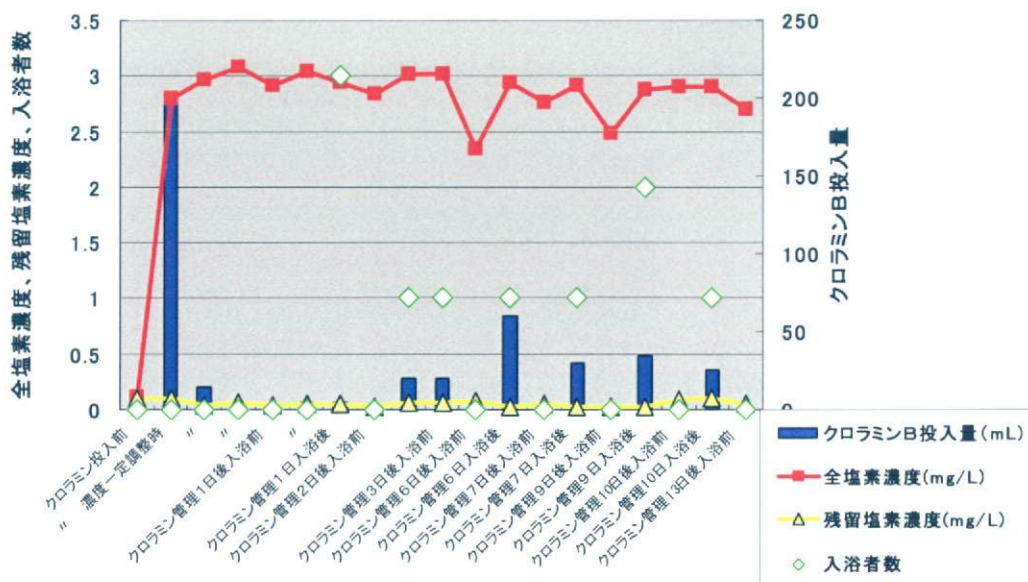


図1.クロラミンB投入量、全塩素濃度、残留塩素濃度、入浴者数の変化

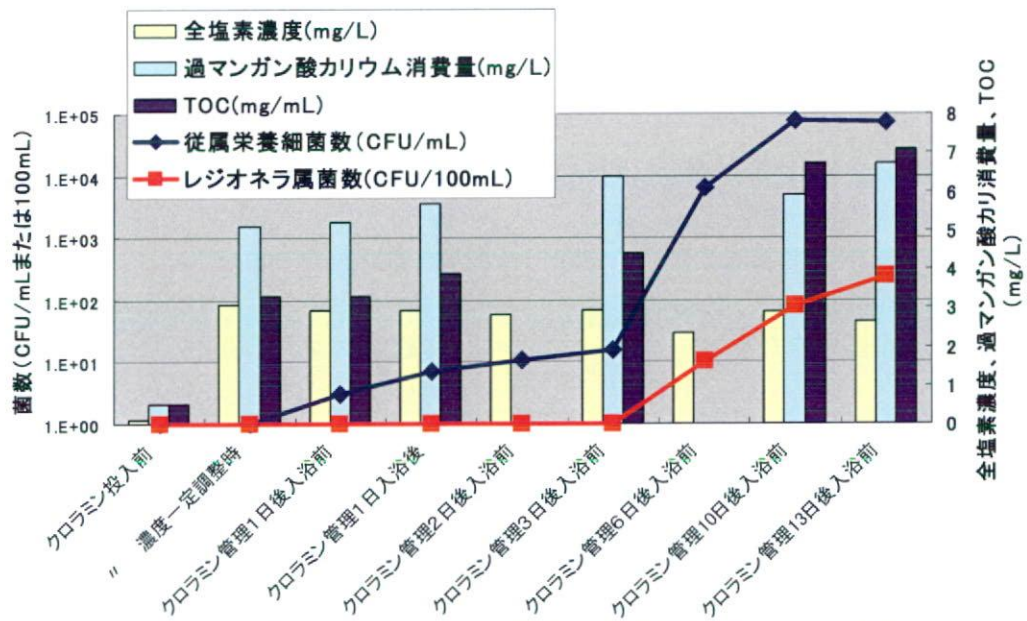


図2. モデル浴槽水へのクロラミンB投入（全塩素濃度3 mg/L維持）時の菌数と水質の変化

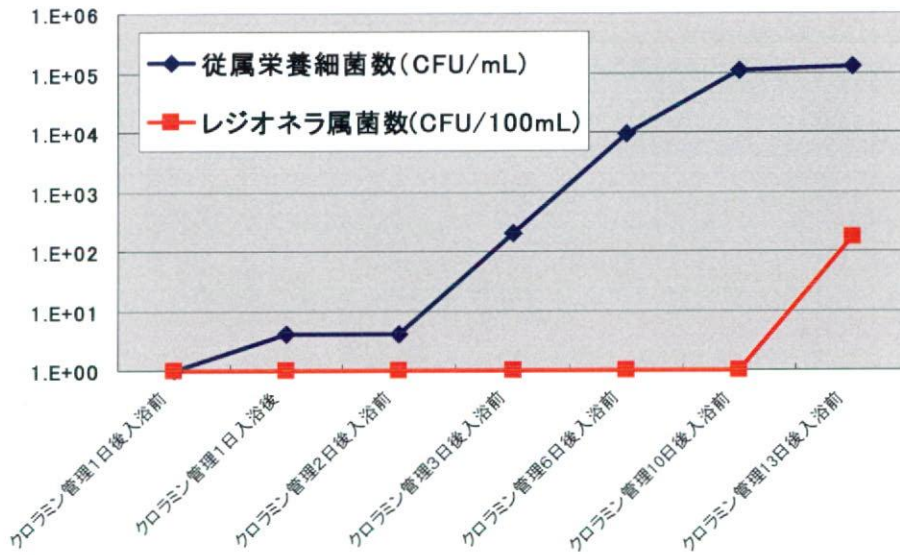


図3. クロラミンB管理時のろ過器内水の菌数の変化

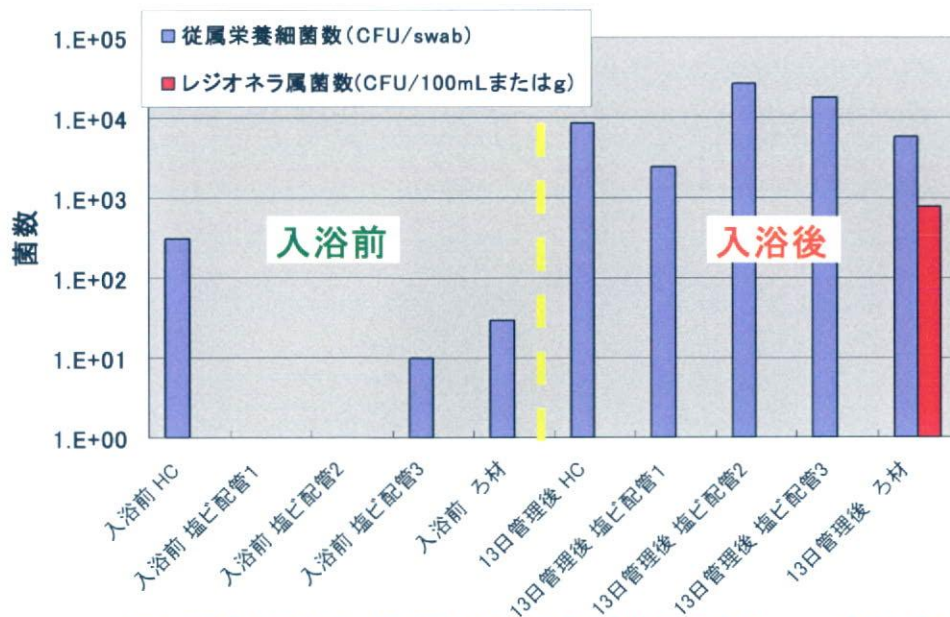


図4. モデル浴槽水へのクロラミンB投入(全塩素濃度 3 mg/L維持)時の拭き取りでみたバイオフィルムの変化



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

結合塩素剤による浴槽水の消毒効果の評価

|       |       |                |
|-------|-------|----------------|
| 主任研究者 | 遠藤 卓郎 | 国立大学法人 東京海洋大学  |
| 分担研究者 | 縣 邦雄  | アクアスつくば総合研究所   |
| 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 | 神澤 啓  | アクアスつくば総合研究所   |

研究要旨：公衆浴場における浴槽水のレジオネラ属菌対策は、遊離性残留塩素濃度を維持する管理が一般的であるが、0.2～1.0mg/L程度を常時維持することは、遊離性残留塩素の反応性が高いことから手間が掛かる。また、高濃度に維持した場合はヒトに対する塩素臭刺激や皮膚刺激性、金属類に対する腐食性が問題となる。そこで遊離性塩素剤の欠点を解決できるレジオネラ属菌の消毒方法として、結合型塩素剤であるモノクロラミンやクロラミンB(有機モノクロラミン)の採用を検討した。本試験研究では、レジオネラ属菌の定着したモデル浴槽水を使用して、モノクロラミン、クロラミンBによるレジオネラ属菌等に対する殺菌効果をバッチ試験及びモデル循環式浴槽試験で評価した。その結果、モノクロラミンは、両試験条件とも従来から使用されている次亜塩素酸Naとほぼ同等のレジオネラ属菌殺菌効果が確認された。クロラミンBは次亜塩素酸Naやモノクロラミンに比較して殺菌効果が弱く、特に実際の浴槽条件に近いモデル循環式浴槽試験での効果は不十分であった。今後、モノクロラミンを実際の浴槽水の衛生管理に使用できる可能性が確認された。

A. 研究目的

公衆浴場における浴槽水の微生物制御、とりわけレジオネラ属菌対策を目的とした消毒は通常、塩素剤(次亜塩素酸ナトリウム溶液、塩素化イソシアヌル酸塩など)を添加して、遊離性残留塩素濃度を0.2～1.0mg/L程度に常時維持することにより行われている。この処理により浮遊性のレジオネラ属菌を殺菌するとともに、浴槽壁面やろ過器ろ材へのバイオフィーム付着を抑制し、浴

槽水中のレジオネラ属菌を不検出に維持管理する。

しかし、遊離性残留塩素は反応性が高いため、ヒトの入浴による有機物の混入やジェット浴での曝気、時間経過の要因で濃度が変化しやすい。このため、遊離性残留塩素濃度を安定して維持管理することは手間がかかり困難を伴う。また、遊離性残留塩素濃度が高い場合はヒトに対する皮膚刺激性や臭気、金属材質に対する腐食性が問題となる。

これに対し、結合型の塩素剤は反応性が緩やかなことから、遊離残留塩素の各種欠点が緩和される可能性がある。昨年度の研究では結合型塩素剤であるクロラミンBによる、消毒効果を評価した。今年度は、結合型塩素剤としてクロラミンBに加えてモノクロラミの消毒効果を評価する。試験は、実際の浴槽水に近い水質や微生物汚れの条件でレジオネラ属菌、一般細菌、従属栄養細菌に対する消毒効果を評価し、これらの結合型塩素剤について実際の浴槽水への適用の可能性を評価することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 概要

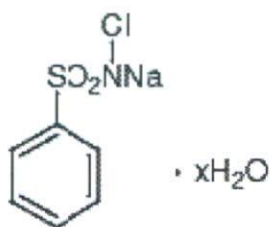
実際の浴槽水に近い水質、微生物汚染状態の試験水を用いて、結合塩素型消毒剤であるモノクロラミン及びクロラミンB、比較として次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて、レジオネラ属菌をはじめとする細菌類に対する殺菌効果を調査した。試験は①バッチ試験法によるレジオネラ属菌等が定着した浴槽水の殺菌試験 ②モデル循環式浴槽を用いて浴槽水中のレジオネラ属菌等に対する殺菌試験の2種類を行った。

### 2. 塩素系消毒剤

試験に使用した各種塩素剤を示す。

#### ① クロラミンB :

化学式  $C_6H_5ClNNaO_2S \cdot xH_2O$ 、  
無水の場合の分子量は 213.62.



クロラミンBの構造式

市販試薬(東京化成)を使用。試薬の25重量%が全塩素濃度として検出される。

(3.7水塩相当) 水中の残留濃度はDPD法の全残留塩素測定法により求めた。

#### ②モノクロラミン溶液

次亜塩素酸ナトリウム溶液と、塩化アンモニウムを1:1の当量反応させて調製した。調製濃度は、試験条件により1000mg/L、または1%とした。

#### ③塩素剤:12%次亜塩素酸ナトリウム溶液(食品添加物規格品)を用いた。

## 3. 試験方法

### 3-1. バッチ試験

- ① モデル循環式浴槽(保有水量500L、砂ろ過装置を有する)の浴槽水を4個のビーカーに各5L入れ、恒温水槽中で40℃に維持、攪拌した。なお、この浴槽水には、継続的にレジオネラ属菌が定着している。
- ② 4個の各ビーカーに対して、無処理、モノクロラミン、クロラミンB、比較として次亜塩素酸ナトリウムによる処理を行った。
- ③ 無処理時の試料水を採取後、ビーカーの浴槽水中に各塩素剤を残留濃度が3mg/Lになるように添加した。次亜塩素酸Naは遊離残留塩素濃度、他は全残留塩素濃度により測定、設定した。
- ④ 各種塩素剤添加後30分、1時間、3時間、24時間に採水し、レジオネラ属菌数、一般細菌数、従属栄養細菌数、アメーバ数、ATPを測定した。レジオネラ属菌数及びアメーバ数は新版レジオネラ防止指針に記載の方法により測定した。一般細菌数・従属栄養細菌数は上水試験方法により測定した。ATP濃度は東亜DKK

社製AF-100型により測定した。

- ⑤ 採水した試料水にはチオ硫酸ナトリウムを添加し、残留塩素を中和した後、直ちに各種の検査を行なった。また、採水時に各試験液の残留塩素濃度を測定し、維持濃度である3mg/Lに対して不足している場合は各塩素剤を補給し濃度を3mg/Lに調整した。

### 3-2. モデル循環式浴槽の試験

- ① レジオネラ属菌の定着が確認されているモデル浴槽（保有水量500L、砂ろ過を備えた循環式）の水温を35℃に維持し、1週間循環した。
- ② 無処理時の浴槽水を採水後、モノクロラミン（又はクロラミンB）を全残留塩素濃度として3mg/Lになるように添加して、添加後10分、30分、1時間、3時間、24時間に循環浴槽水を採水し、浮遊性のレジオネラ属菌数、一般細菌数、従属栄養細菌数、アメーバ数、ATPを測定した。
- ③ 各細菌数の測定に加えて、浴槽水中に浸漬しておいたスポンジ担体（10mm角）3個を採取し、10mLの滅菌水に抽出し、抽出液のATPを測定した。これはバイオフィルムの消毒効果について評価するために実施した。スポンジ担体の浸漬の状態を図1に示す。
- ④ 採水した試料水には、チオ硫酸ナトリウムを添加し残留塩素を中和した後、各種の検査を行なった。また、浴槽水の採取時には、全残留塩素濃度及び遊離塩素濃度を測定し、残留塩素濃度が3mg/Lに対して不足している場合には不足分を添加した。
- ⑤ クロラミンBによる試験は、モノクロラミンによる試験終了後、循環浴槽水中の残留塩素濃度が消失しレジ

オネラ属菌が再度定着したことを確認後実施した。

## C. 結果と考察

### 1-1. バッチ試験の結果

#### (1) 試験水質

試験を行った浴槽水の水質を示す。

| 項目          | 値    |
|-------------|------|
| pH          | 8.2  |
| 電気伝導率(mS/m) | 100  |
| 全硬度         | 223  |
| Ca硬度        | 140  |
| Mg硬度        | 83   |
| 塩化物イオン      | 160  |
| 硫酸イオン       | 110  |
| 酸消費量(pH4.8) | 120  |
| シリカ         | 11   |
| アンモニウムイオン   | <0.1 |

(単位: mg/L)

#### (2) 微生物類の挙動(表1~表5)

##### ①レジオネラ属菌

初期菌数は $5.1 \times 10^3$ CFU/100mLであった。無処理の場合は、時間経過とともに少しずつ減少していき、3時間で $1.9 \times 10^3$ CFU/100mL、24時間後には $4.0 \times 10^2$ CFU/100mLになった。モノクロラミン、次亜塩素酸Naは、30分間の接触により不検出(10CFU/100mL未満)となり、24時間まで不検出を維持した。クロラミンBは3時間の接触では殆ど菌数の変化はなく $3 \sim 5 \times 10^3$ CFU/100mL程度であったが、24時間の接触により不検出となった。

##### ②一般細菌数

初期菌数は $2.3 \times 10^3$ CFU/mLであった。無処理の場合は、時間経過とともに徐々に増加していき、3時間で $4.0 \times 10^3$ CFU/mL、24時間後には $5.3 \times 10^4$ CFU/mLになった。モノクロラミンは30分で6CFU/mLに減少し、3時間までほぼ同じ菌数であったが、24時

間後には不検出となった。これに対して次亜塩素酸 Na は 1 時間で不検出にしておりモノクロラミンよりも即効的であった。クロラミン B は 30 分で  $1.6 \times 10^6$  CFU/mL に減少したが 24 時間の接触でも同じ菌数であり、不検出にはならなかった。

### ③ 従属栄養細菌数

初期菌数は  $7.1 \times 10^3$  CFU/mL であった。無処理の場合は、時間経過とともに増加していき、3 時間で  $1.2 \times 10^4$  CFU/mL、24 時間後には  $8.7 \times 10^5$  CFU/mL になった。モノクロラミンは 30 分で  $3.3 \times 10^6$  CFU/mL に減少し、3 時間まではほぼ同じ菌数であったが、24 時間後には不検出となった。これに対して次亜塩素酸 Na は 30 分から 3 時間で 6 CFU/mL、24 時間後で不検出であった。クロラミン B は 30 分で  $2.0 \times 10^2$  CFU/mL に減少したが 24 時間の接触で  $1.4 \times 10^2$  CFU/mL 菌数であり、不検出にはならなかった。

### ④ アメーバ数

初期のアメーバ数は  $1.2 \times 10^3$  PFU/100mL であった。無処理の場合は時間経過とともに少しずつ減少していき、3 時間で  $5.0 \times 10^2$  PFU/100mL、24 時間後には  $2.0 \times 10^2$  PFU/100mL になった。モノクロラミン、次亜塩素酸 Na は、30 分間の接触により不検出 (2 PFU/100mL 未満) となり、24 時間まで不検出を維持した。クロラミン B は 30 分間の接触で  $3.6 \times 10^6$  PFU/100mL となり 3 時間で 6 PFU/100mL、24 時間の接触により不検出となった。

### ⑤ ATP

初期 ATP は 97 pmol/L であった。無処理の場合は、時間経過とともに徐々に増加していき、3 時間で 130 pmol/L、24 時間後には 560 pmol/L になった。モノクロラミンは 30 分で 2 pmol/L に

減少し、3 時間まではほぼ程度であったが、24 時間後には 17 pmol/L に増加した。次亜塩素酸 Na は 3 時間で 0 pmol/L であったが 24 時間では 11 pmol/L に増加した。クロラミン B は 30 分で 43 pmol/L となりその後徐々に減少していき、24 時間では 19 pmol/L になった。

### (3) 残留塩素濃度の変化(表 6)

試験水中の残留塩素濃度は、モノクロラミンと次亜塩素酸 Na は試験期間中採水の都度 2 mg/L 程度に減少していたが、クロラミン B の場合は 24 時間目まで減少せず全残留塩素濃度 3 mg/L を維持した。3 時間から 24 時間の間では、モノクロラミンは全残留塩素濃度が 3 mg/L から 0.7 mg/L に、次亜塩素酸 Na は遊離残留塩素濃度が 3 mg/L から 0.2 mg/L に減少した。モノクロラミン、クロラミン B は 30 分から 3 時間の間での測定で、遊離残留塩素濃度が 0.5 mg/L 程度検出されたが、24 時間目では遊離残留塩素濃度は 0 mg/L であった。

### 1-2. バッチ試験の考察

バッチ方式による 24 時間の試験は、実際の浴槽水と同様の水質及び微生物汚染の水を使用しているが、バイオフィームが存在しない条件での試験である。この場合、無処理条件ではレジオネラ属菌及びアメーバ類は徐々に減少するのに対して、一般細菌及び従属栄養細菌は菌数が増加していく。これは、レジオネラ属菌とアメーバは浮遊状態では増殖しておらず新たな供給がされていないことを示し、一般細菌や従属栄養細菌は浮遊性の状態で増殖することを示している。

各塩素系薬剤の効果を比較すると、