

200942011B

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 19 年度～平成 21 年度 総合研究報告書

研究代表者 遠藤 卓郎

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I.	総合研究報告書	
	公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究 遠藤 卓郎	1
II.	資料編	
1.	クロラミンのレジオネラに対する殺菌作用 倉 文明・泉山 信司・前川 純子	11
2.	レジオネラ宿主アメーバに対するクロラミン消毒効果の検討 泉山 信司・小村 麻子・八木田 健司	23
3.	モノクロラミン消毒に係るモノクロラミン溶液の作成方法と 測定方法についての検討 泉山 信司・杉山 寛治・小坂 浩司	29
4.	循環ろ過式浴槽モデルにおけるクロラミン消毒の効果 杉山 寛治・泉山 信司・八木田 健司・神田 隆・田栗 利紹・小坂 浩司	39
5.	結合型塩素(モノクロラミン)による浴槽水の消毒効果 縣 邦雄・泉山 信司・神澤 啓	49
6.	フローサイトメトリーを用いたレジオネラ症予防のための 浴槽水モニタリング技術 田栗 利紹・倉 文明・泉山 信司・杉山 寛治・小田 康雅	73
7.	消毒剤の種類と浴槽への適用について 坂上 吉一・秋山 茂	77
8.	温泉施設浴槽の真菌汚染およびモノクロラミンによる制御 高鳥 浩介・村松 芳多子・太田 利子・久米田 裕子・高橋 淳子	95
9.	入浴施設の衛生管理での HACCP システム導入の提言と モニタリング法の検討 黒木 俊郎	99
10.	OECD 水泳プール及び浴用水の消毒剤の有効性評価に係る 手引書(概訳)ならびに原文	103
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	121
IV.	研究成果の刊行物・別刷	123

I. 総合研究報告書

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 客員研究員

研究要旨：各種浴槽施設におけるレジオネラ汚染防止が謳われてすでに久しいが、今日においても問題の解決にはほど遠い状況にある。対策の基本は循環装置を含む浴槽系全体でのバイオフィーム対策で、換水と洗浄・消毒ならびに浴槽水の遊離残留塩素の適正な維持である。しかしながら、水質によっては遊離残留塩素による消毒が適さないことも指摘されている。当該研究においては、遊離残留塩素の欠点を補うべく、結合塩素（モノクロラミン）消毒の有効性を検証した。モノクロラミンは化学的に安定で（残留性に優れ）、遊離残留塩素にくらべ即効性の面で劣るが、その反面バイオフィームへの浸透性に優れることや高 pH 領域やアンモニアの存在下でも消毒効果が期待される。また、トリハロメタン等の消毒副生成物が産生されにくいこと、臭気がほとんど無いなどの優れた特徴を有している。

モノクロラミンはレジオネラ属菌に対して十分な不活化効果を示し、2～3mg/L のモノクロラミンとの 15 分以内の接触で概ね 5-log 程度の不活化が確認された。宿主アメーバ (*Naegleria*) に対しても効果的で、pH7.5 から 9.0 の pH 領域で 4-log₁₀ 程度の不活化の達成に要する Ct 値は 5～8mg・min/L と計算された。また、循環浴槽の配管系や人工的に形成させたスポンジ内のバイオフィームに対しても十分な消毒作用が確認された。循環ろ過式浴槽モデルにおいて入浴を伴った検証実験では 3 mg/L 程度のモノクロラミンを約 2 週間維持したところ、その間浴槽水、ろ過器内水のみならず、ろ過材、ヘアーキャッチャー、配管においてレジオネラ属菌およびアメーバは不検出の状態が保たれた。また、従属栄養細菌数もほぼ不検出に保たれており高い消毒効果が確認され、併せて消毒に伴う塩素臭がない利点も確認された。

モノクロラミン溶液はアルカリ環境下で既知濃度の次亜塩素酸ナトリウムの希釈溶液を用意し、これに適量のアンモニアを添加して作成した。この混合方法ではジクロラミンおよびトリクロラミンの生成が最小限に抑えられる。浴槽施設でのモノクロラミン濃度は DPD 吸光度法による全塩素濃度測定で定量される。高濃度のモノクロラミン液は不安定（自己分解が進み、モノクロラミン濃度の低下とともに pH が著しく低下し、塩素ガスの発生）で、保存には不向きであることから、現場で用時調製する必要がある。モノクロラミン消毒では遊離残留塩素消毒で問題となるトリハロメタン類やハロ酢酸類等の副生成物は発生しないが、それに変わり含窒素消毒副生成物（ジハロアセトニトリル類等）の生成が見られた。これらの濃度は水道関連の各種基準/目標値と比較しても低い値であるが、管理上から浴槽水の頻

繁な換水は必須である。

現在、市販されている消毒剤はアルコール系、アルコール配合剤、アルデヒド系、ハロゲン化合物（塩素系、ヨウ素系）、界面活性剤系（陽イオン、両性）、ビッグアナイド系、フェノール類および過酸化物質等に分類される。このうち、浴槽水の消毒に使用可能な薬剤は使用実績も考慮すれば次亜塩素酸ナトリウムなどハロゲン化合物のうちのごく限られた薬剤に絞られる。国際的には OECD が水泳プールを含む浴槽水の消毒剤認可に際して慎重な対応を検討している。基本的には遊離残留塩素消毒を参照消毒剤と位置付け、新規消毒剤は遊離残留塩素と同等かそれ以上の消毒効果を持つものであるべきと規定されている。現在検討中のガイドライン（Draft OECD Guidance Document for Demonstrating Efficacy of Pool and Spa Disinfectants）では浴槽水中での残留性が担保されること、浴槽水として適切な pH 範囲あるいは浴槽水中に含まれるイオンの種類や量に影響されないこと、消毒剤の濃度測定方法（現場使用の検査のキット）が確立されていること、安全使用濃度が定められていることなど、詳細な条件が検討されている。併せて消毒効果判定に向けた詳細な実験条件も示されている。このような国際的な動向を踏まえ、わが国においても新規消毒剤開発に向けた指針が示されるべきと考える。

入浴施設には浴槽の周辺等に暗色系真菌の発生がしばしば見られる。これらを含め、浴槽水や配管系内の消毒は HACCP システムにおける重要管理点での処理に該当し、危害を確実に除去するための高い実効性が要求される。また、新たな管理ツールとして ATP 量の測定やフローサイトメトリーを用いた迅速な全菌数を指標とした汚染評価方法（監視システム）が提案された。

研究分担者

倉 文明	国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官
泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官
縣 邦雄	アクアス(株) つくば総合研究所 所長
神野 透人	国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 室長
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 専任講師
坂上 吉一	近畿大学 農学部 教授

A. 研究目的

当該研究では遊離残留塩素消毒の欠点を補うべく結合型塩素（クロラミン）による消毒に着目した。モノクロラミンは化学的に安定で（残留性に優れ）、遊離残留塩素にくらべ効果は低いものの消毒作用を持つ。遊離残留塩素から結合型塩素による消毒に転換することで配管などを含めた浴槽システム全体でのバイオフィルム対策、ひいてはレジオネラ症感染リスクの低減が期待される。また、化学的に安定性が高いことから、濃度管理が容易で管理の簡素化が期待される。クロラミンには無機-と有機-クロラミンが知られるが、消毒効果は無機型が優れていることが示された。当該研究ではレジオネラ属菌や宿主

アメーバを対象としたモノクロラミンの不活化効果、実機レベルでの消毒効果を検証した。併せて、本剤の皮膚刺激性、副生成物等の安全面からの検討を行った。

B. 研究方法

浴用水のレジオネラ汚染防止に向けて結晶型塩素（モノクロラミン）による消毒効果を検討し、遊離残留塩素による消毒の適用が難しい浴用水水質等でのレジオネラ症の感染リスク低減に寄与する。具体的には下記の諸項目について検討する。

1. レジオネラ属菌、宿主アメーバの不活化に要する濃度と接触時間
2. 実機（モデル浴槽）レベルでの消毒効果の検証
3. バイオフィームに対する消毒効果
4. 入浴に伴う有機物の蓄積とクロラミンの挙動（モノ-、ジ-、トリ-クロラミンの継時変化等）の検討
5. モノクロラミンの皮膚刺激性の検討
6. モノクロラミン消毒による消毒副生成物の解析
7. その他

併せて、消毒剤の有効性の評価に必要となる諸条件を検討・整理を行なう。

当該研究ではヒトを対象とした調査研究は計画されていない。また、ヒト由来の検査材料を用いる実験等は計画されていない。動物を用いた病原性試験を行なう場合は国立感染症研究所／国立医薬品食品衛生研究所の動物実験実施規程に従って事前に申請し、その定めを遵守して実験する。

C. 研究結果

クロラミンの消毒効果

結合塩素として消毒効果を示すモノクロラミンを用いてレジオネラ属菌に対する殺

菌作用を検討した。

1. *Legionella pneumophila* の各血清群の菌類、ならびにわが国で分離されるレジオネラ属菌種、海外の浴槽から分離された菌種等を対象としてモノクロラミンの殺菌効果を検討したところ、3mg/L 程度の濃度で5分接触(Ct 値:15mg・min/L)により概ね 5-log₁₀ 程度かそれ以上の不活化が得られることが示された。
2. 宿主アメーバ (*Naegleria lovaniensis*) に対しては pH7～pH9 の領域で 4-log₁₀ 程度の不活化に要する Ct 値は 4.5～6.5mg・min /L と計算された。

循環ろ過式浴槽モデル（浴槽水2トン）において、入浴を伴った実験によりモノクロラミンの消毒効果を検証した。現場で用時調整（後述）したモノクロラミンを浴槽水へ間欠的に適当量投入して、約2週間にわたり濃度を3mg/L程度に調整・維持した。その結果、

1. モノクロラミンの濃度はヒトの入浴によって大幅な減少はなく、不足するモノクロラミンを補うことで浴槽水中の濃度を安定的に維持することができた。
2. 実験期間にわたり、浴槽水およびろ過器内水のレジオネラ属菌および宿主アメーバは不検出であった。
3. 同様に、従属栄養細菌数もほぼ不検出で、細菌学的に良好な水環境が維持された。
4. ろ過材、ヘアーキャッチャー、配管におけるバイオフィーム形成もほとんど認められなかった。
5. モノクロラミン消毒ではいわゆる塩素臭の発生が無く、遊離残留塩素消毒に特有の臭気問題が生じないことを確認した。
6. すでに汚染状態にあるモデル循環式浴槽（レジオネラ 2,300 CFU/100mL）に

モノクロラミン(2.0mg/L程度)を投入・維持した場合、クロラミン投入1時間後で10 CFU/100mLに減少し、その後は不検出を維持した。アメーバ(400 PFU/100mL)は1時間後に不検出に転じ、以降は不検出が維持された。

7. 一般細菌数および従属栄養細菌数もクロラミン投入後から徐々に減少し、1日後にはほぼ不検出にまで低下し、その後この状態が維持された。
8. 同様の消毒効果が浴槽配管系及びスポンジ担体中に形成されたバイオフィームに対しても得られ、バイオフィームの除去効果が確認された。

モノクロラミンの生成と保存性

モノクロラミン溶液はアルカリ環境下で次亜塩素酸ナトリウム溶液と塩化アンモニウム水溶液を適宜混合することで生成させる。その際、ジクロラミンおよびトリクロラミンの生成を抑えることが重要で、既知濃度の次亜塩素酸ナトリウムの希釈溶液を用意し、これにアンモニアを添加することで生成した。浴槽水中におけるモノクロラミンの挙動については実験期間中ならびに終了時点において浴槽水からジクロラミンがわずかに検出された程度にとどまり、トリクロラミンは検出されなかったという結果であった。また、モデル浴槽中に有機クロラミンは生成されていないことを確認した。なお、モノクロラミン消毒では現場でのモノクロラミンの用時調製が必要なことで、特に、高濃度のモノクロラミン液は不安定で保存には不向きであることに注意しなくてはならない。高濃度溶液は自己分解が進み、比較的短時間のうちにモノクロラミン濃度の低下とともに溶液のpHが著しく低下し、塩素ガスの発生が確認された。

モノクロラミン消毒に伴う消毒副生成物

モノクロラミン処理を行った浴槽水中の消毒副生成物としてはジクロロ酢酸(0.018 mg/L)、ジブromoアセトニトリル(5.8 µg/L)、ブromoホルム(2.9 µg/L)が比較的高濃度で検出された。公衆浴場でのモノクロラミン消毒の適用可能性、あるいは使用濃度、さらには浴用水の連続使用可能日数などの詳細な検討に際しては、各種泉質やpH範囲など多様な試料を用いてジハロアセトニトリル類等の含窒素消毒副生成物の検討が求められるよう。

フローサイトメトリーを用いた浴槽水の微生物汚染モニタリング技術

系統の異なる浴槽水149試料について、レジオネラ菌の定性結果ごとにフローサイトメトリーによる全細菌数の度数分布を求めたところ、3,000個/ml未満であった93試料のほとんどからレジオネラ属菌は検出されず(陰性一致率97.8%)、3,000個/mlを超えるとレジオネラの陽性例が39例となった(陽性一致率69.6%)。これより、フローサイトメーターを用いた全菌数測定の間値を3,000個/mlとして浴槽水の微生物学的清浄度を評価することが可能と考えた。

新規消毒剤の検証方法

厚生労働省は浴場水の衛生管理の徹底を指示しているが、レジオネラ属菌の微生物生態の特殊性から効果的な消毒方法が確立されていないのが現状である。それを確立するためには、消毒剤の効果判定を適確に行うことが重要であることから、これまで行われてきた消毒剤の殺菌効力評価法に関する文献的調査を実施したうえで、数多く考案されている殺菌力評価法をレジオネラ属菌に適用す

るための試験法について検討してきた。その結果、作用させた菌量の減少量で評価する評価法が適用可能であることが示唆された。

近年の国際的な動向を見ると、OECDにより浴槽水の新規消毒剤の評価に向けてのガイドライン（Draft OECD Guidance Document for Demonstrating Efficacy of Pool and Spa Disinfectants）が準備されている。ここでも遊離残留塩素消毒が参照消毒剤と位置付けられ、新規消毒剤はこれと同等かそれ以上の消毒効果を持つものであるべきとされている。ガイドラインによると、新規に浴槽水の消毒剤として評価を得るには以下の条件を満たすことが求められている。

1. 浴槽水中で残留性が保証され、自動注入装置の存在が望まれる
2. 浴槽水として快適な pH 範囲、あるいは浴槽水中に含まれるイオンの種類やその他の成分量に影響されず消毒効果が保証されること
3. 消毒剤の濃度測定方法（野外検査用のキット）の存在が望まれること
4. 濃度不足が生じたり病原微生物の発生が認められた際には追加注入が可能なこと
5. 安全使用濃度が定められていること（安全使用濃度の半量で消毒効果が保証され、その2倍濃度で入浴者の健康に影響しないこと）
6. 消毒薬が複数の成分から成る場合にはそれぞれの薬効（比率）が示されること

OECD ガイドラインには併せて消毒効果判定に向けた詳細な実験条件も提示されている。

入浴施設には浴槽の周辺等に暗色系真菌の発生がしばしば見られる。これらを含め、浴槽水や配管系内の消毒は HACCP システム

における重要管理点での処理に該当し、危害を確実に除去するための高い実効性が要求される。また、新たな管理ツールとして ATP 量の測定やフローサイトメトリーを用いた迅速な全菌数を指標とした汚染評価方法（監視システム）が提案された。

D. 考察

温泉を含む浴用施設ではレジオネラ属菌等の汚染防止のため浴槽水の遊離残留塩素消毒が勧奨されてきたが、泉質や管理状況などによりその消毒効果が期待できない場合が知られている。特に高 pH やある種の金属イオン、アンモニウムイオン、有機質等を多く含む泉質では著しく効果を減じること、濃度管理が困難なことが指摘される。あわせて臭気（塩素臭）が敬遠される傾向にある。当該研究事業では結合型塩素（モノクロラミン）に着目し、その消毒効果を検討し、遊離残留塩素に比べれば遅効性ではあるが、レジオネラを含む細菌叢ならびに宿主アメーバに対する高い不活化効果が確認された。モデル浴槽を用いた検証実験で、極めて良好な消毒効果が実証された。文献調査ならびに動物実験によるモノクロラミンの皮膚刺激性試験を行い、浴槽水への使用濃度での安全性が確認された。これらの結果からモノクロラミンによる浴槽水のレジオネラ属菌等に対する消毒管理は有望であり、実施設では適切な濃度維持と殺菌洗浄との組み合わせにより良好な消毒効果が期待される。また、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確立している。なお、実際の浴槽水への適用にあたっては、モノクロラミンの連続製造装置及び浴槽水の全残留塩素濃度管理の自動化を適用することが望ましい。

一方、浴槽水に添加使用が可能な消毒剤がハロゲン化合物にほぼ限られる現実を踏まえれば、レジオネラ対策は浴槽水の消毒から浴槽システムの洗浄・消毒、ならびに換水を要点とした原点に立ち返った管理手法にシフトすべきものと考ええる。

E. 結論

結合型の塩素であるモノクロラミン (2~3mg/L) による浴槽水のレジオネラ汚染対策に効果的であるとの結論を得た。遊離残留塩素に比べ化学的に安定であることから、浴槽水中での濃度管理が容易である。バイオフィームに対する消毒効果もすぐれており、配管系や人工的に作成したスポンジ内のバイオフィームに対しても効果が認められた。浴槽水中の濃度は簡易測定法である DPD 比色法 (全塩素量) が使用可能であった。一方、モノクロラミンは現場で用時調製しなければならないという問題があるが、ポーラログラフ式の全残留塩素濃度測定計器による連続測定も可能で、モノクロラミンの自動注入機の開発 (自動制御) に向けた障壁は無いものと判断される。

当該主任研究者は浴槽水のレジオネラ汚染が問題となった当初より、対策に向けた研究に従事してきた。この間、一貫して主張してきたことは「浴槽水の管理は日々の換水と浴槽洗浄を基本とすべき」もので、「塩素消毒は浴用水の連用に伴って発生する感染症 (レジオネラ症) に対する応急措置に過ぎない」ということである。然るに現場では浴槽水の長期間連用を既成事実として浴用施設の大型化がはかられてきたが、入浴施設の大型化は化石燃料の使用と温泉の掘削技術の進展に伴って興ったことで、歴史は浅く、わが国の温泉文化とは何ら関係のない事象である。入浴施設の大型化は現代社会にどの程度貢献しているのか、それは消毒

剤を常用してまでも必要なことなのか、社会全体として考えるべきではなかろうか。当該研究はやむなく現状対応として代替消毒剤のモノクロラミン消毒の有効性を検討した。本結果は浴用水を介するレジオネラ症予防に貢献するものと確信するが、根本的な衛生対策からは程遠い。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 遠藤卓郎、泉山信司、八木田健司. 生活用水のアメーバ汚染. 化学療法の領域. <特集：住環境と感染・アレルギー> 23(4), 65-68, 2007.
2. 高橋淳子, 久保田佳子, 小島幸一, 栗原綱義, 渡辺実, 青木信道, 大沢高温, 菅原英治, 田幡憲一, 佐久間豊夫, 松本秀章, 矢根五三美, 佐藤 望, 田中(相原)真紀, 香川(田中)聡子, 神野透人, 高鳥浩介: 各種浴場施設内における消毒副生成物の曝露評価. ビルと環境 117: 27-32, 2007.
3. 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, 迎田惠之, 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)
4. 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

5. 杉山寛治、小坂浩司、泉山信司*、縣 邦雄、遠藤卓郎. モノクロミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策. 保健医療科学 59 : 印刷中, 2010.
2. 学会発表
 1. 高橋淳子, 久保田佳子, 大原直樹, 小島幸一, 香川(田中)聡子, 神野透人, 高鳥浩介 : 公衆浴場および家庭内浴室における消毒副生成物の曝露評価. 第 28 回日本食品微生物学会, 2007. 9.
 2. 遠藤卓郎 : 温泉施設におけるレジオネラ感染予防のための適切な衛生管理手法、第 66 回日本公衆衛生学会、2007.10.
 3. 蔵文明 : レジオネラ属の管理基準、感染事例と菌濃度との関連、および分子疫学、第 66 回日本公衆衛生学会、2007.10.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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. 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
 11. 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
 12. 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

- 菌防衛学会第 35 回年次大会、平成 20 年 9 月、浜松市
13. 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
 14. 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).
 15. 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.
 16. 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.
 17. Taguri T, Oda Y, Sugiyama K, Izumiyama S, Kura F: Using flow cytometry to monitor the risk of legionellosis in bath water. LEGIONELLA 2009. Paris. October 2009.
 18. Kura F, Amemura-Maekawa J, Chang B, Suzuki-Hashimoto A, Ichinose M, Endo T, Watanabe H: Two groups of *Legionella anisa* isolates of environmental origin in Japan. LEGIONELLA 2009. Paris. October 2009.
 19. 泉山信司、八木田健司、倉 文明、遠藤卓郎: モノクロラミンによる *Naegleria* アメーバの消毒. 第 9 回環境技術学会研究発表大会、2009 年 9 月、大阪市.
 20. 高橋淳子、香川(田中) 聡子、久保田佳子、大島赴夫、小島幸一、泉山信司、遠藤卓郎、高橋浩介、神野透人: 公衆浴場における消毒副生成物の暴露評価と真菌汚染の実態調査について. 第 9 回環境技術学会研究発表会、2009.9 (大阪)
 21. 杉山寛治、神田隆、高橋奈緒美、泉山信司、倉文明、遠藤卓郎: 循環ろ過式浴槽モデルにおけるクロラミン B の消毒効果. 日本防菌防衛学会第 36 回年次大会 (大阪)、2009. 9.15
 22. 高橋淳子、香川(田中) 聡子、久保田佳子、大島赴夫、小島幸一、泉山信司、神野透人、遠藤卓郎: 公衆浴場における消毒副生成物の暴露評価. フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー (2009.11)
 23. 竹熊美貴子、吉田栄充、浦辺研一、澁木優子、香川(田中) 聡子、神野透人、西村哲治: 公衆浴場における浴槽水中及び浴室内空気中の消毒副生成物調査. 日本薬学会第 130 年会 (2010.3)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 資料編

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)
総合研究報告書

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 客員研究員)
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)
研究協力者 前川純子 (国立感染症研究所細菌第一部)

(研究要旨) 結合塩素として作用する消毒薬である 2 種のクロラミンについて、7.5～7.7 と 8.8～8.9 の 2 種の pH 下で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 (Nagasaki 80-045 株) を浮遊させ、40℃ 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。(クロラミン B) 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 時間以内に生菌は非検出(対数で < 4.46) となった。3.45 mg/L では 3 時間以内で非検出、5.45 mg/L では、30 分以内で非検出となった。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、非検出となった。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 時間後にも log1.86 しか菌数が減少しなかった。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。(モノクロラミン) 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。さらに培養不能の生菌が生じない(アメーバを添加しても回復しない) 濃度とされる 3 mg/L で pH 7.7 および pH 8.8 の緩衝液にレジオネラ属菌 17 種 21 株をそれぞれ浮遊させ、40℃ 15 分間処理して採取したところ、BCYE α 培地上のコロニーは非検出となった(菌種により対数で 2.40～5.46 の減少)。15 分間の実験期間中、全残留塩素の減少は 10.3%以下であ

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らすこと、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ー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、バイオフィー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)}、微臭気味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²⁾などの利点がある。取り扱いの簡単なクロラミンBと欧米で実際に給湯水に使用されているクロラミンを検討した。モノクロラミンBは有機化合物であるために過マンガン酸カリ消費量が増加するという欠点がある。

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、日本の浴槽水由来 *L. pneumophila* 血清群 1,3,4,5,6 合計 9 株(表 1)及び日本の浴槽水から分離されるレジオネラ属菌、代表的なレジオネラ属菌(表 2)も使用した。菌は、-80℃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℃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 マイクロチューブで 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 の浮遊液を作製した。なお、一部の菌種は 30℃ 5%CO₂ (*Legionella nautarum*)、37℃ 5%CO₂ (*Legionella anisa*、*Legionella gratiana*、*Legionella geestiana*、*Legionella feeleii* 血清群 2) で培養した。

試薬：pH 7.5 (Page Amoeba Solution)、pH 8.9 のホウ酸緩衝液の 10 倍液を作製し、実験前に滅菌純水で希釈して 1 倍液とした。緩衝液の pH は HORIBA B-212 で測定した。クロラミン B (Sodium benzenesulfonchloramide, C₂H₆SO₂NNaCl·2H₂O, MW 246.65, CAS [127-52-6(anhydr)]、関東化学) の保存液は、990 mg/L as Cl として作製し、室温で遮光保存した。この状態で安定であった。一方、モノクロラミンは、0.5M 塩化アンモニウム 242.5 μ L 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 μ L とを緩衝液 50 mL に混合して作製した。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℃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℃にしておいた菌液を作製した。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：菌を約 10^6 /mL になるように添加した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0.1mL採取し、0.9 mLの1%ハイポの入った1.5mLマイクロチューブに入れボルテックスミキサー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ミキサー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

クロラミンBについて

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。

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時間以内に非検出(対数で < -4.46)となった。3.45 mg/Lでは3時間以内に非検出、5.45 mg/Lでは、30分以内に非検出となった(図1)。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。

pHの影響：pH 7.7よりpH 8.9の方が、殺菌効果が速減したが、高濃度3~5 mg/L処理の場合には、2時間以内に生菌が非検出になった(図1)。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(図2)。特に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 $\log 1.86$ しか菌数が減少しなかった。

モノクロラミンについて

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(図3)。3 mg/Lでは5分以内に非検出、6 mg/Lでは、2分以内に非検出となった(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。

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(図4)。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。

不活化は菌株によらない：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1 mg/Lの濃度で30分後には非検出(対数で4.17の減少)となった。レジオネラ属菌17種21株についても検討した3 mg/L(実測値は2.9~3.2 mg/L)で15分後に非検出となった(菌種により対数で2.40~5.46の減少)。

$C \times t_{99}$ ：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、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

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⁵⁾。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。

Momba らによると、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⁶⁾。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 pH8.4–8.6 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、pH7.5 で 4.2 mg.min/L、pH8.8 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⁷⁾。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⁸⁾。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。今年度の我々の 15 分間処理実験や杉山らのモデル浴槽の試験では 3 mg/L の濃度なので確実な不活化が期待される。

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°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。

クロラミン B は pH 7.7 では、1.1 mg/L の残留塩素濃度で、6 時間以内に生菌は非検出となった。3.45 mg/L では 3 時間以内で非検出、5.45 mg/L では、30 分以内で非検出となった。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。

一方モノクロラミンは 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。さらに培養不能の生菌が生じない（アメーバを添加しても回復しない）濃度とされる 3 mg/L で pH 7.7 および pH 8.8 の緩衝液にレジオネラ属菌 17 種 21 株は 40°C 15 分間処理で非検出となった

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) 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.

- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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

- 1) Kuroki T, Ishihara T, Ito K, Kura F: Bathwater-associated cases of legionellosis in Japan with special reference to *Legionella* concentrations in water. Jpn. J. Infect. Dis. 62(3):201- 5, 2009.

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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 泉山信司、八木田健司、倉 文明、遠藤卓郎: モノクロラミンによる *Naegleria* アメーバの消毒. 第 9 回環境技術学会研究発表大会、2009 年 9 月、大阪市.
 - 12) Taguri T, Oda Y, Sugiyama K, Izumiyama S, Kura F: Using flow cytometry to monitor the risk of legionellosis in bath water. LEGIONELLA 2009. Paris. October 2009.
- 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。

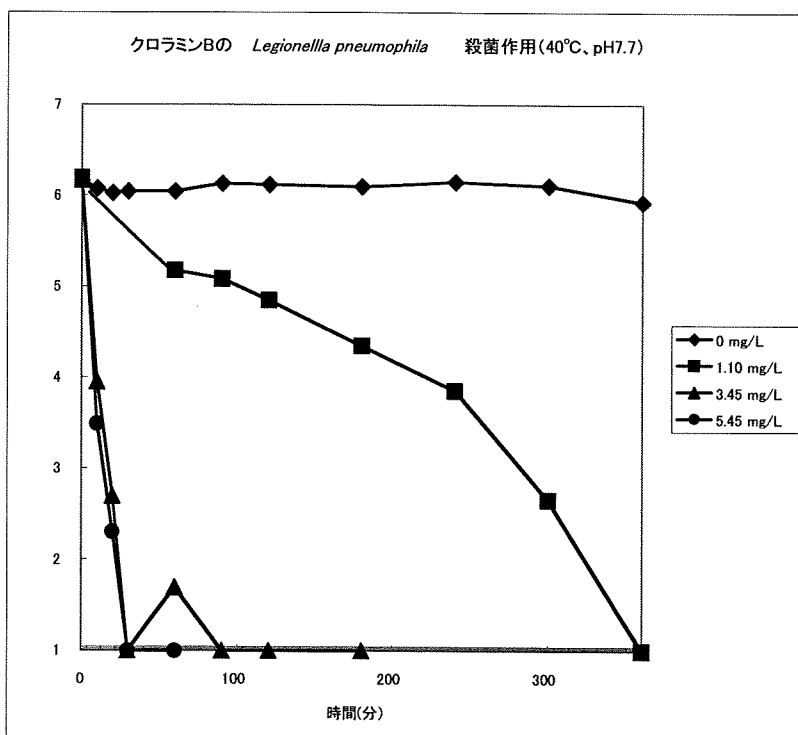


図 1 pH 7.7

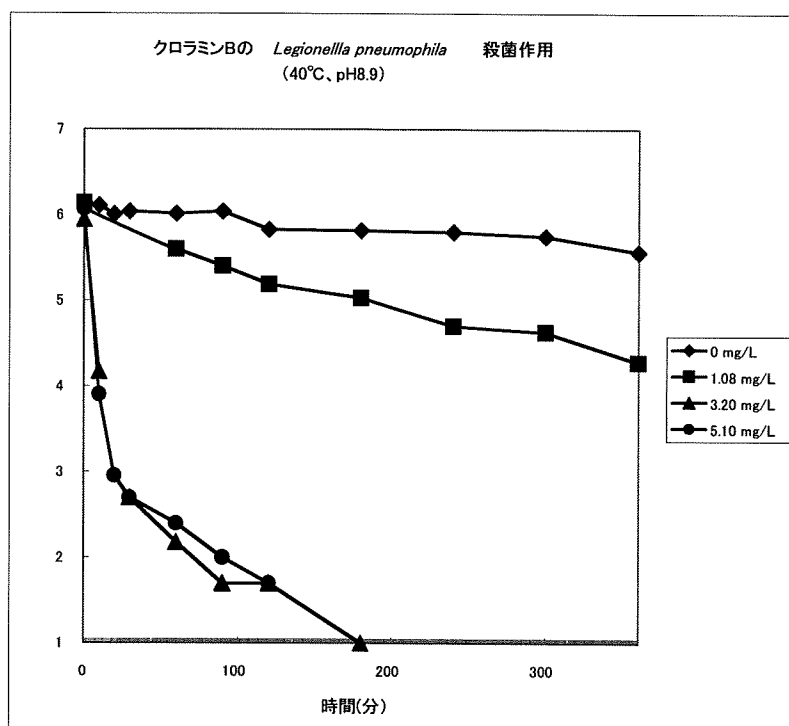


図 2 pH 8.9