

- 13) Junko Amemura-Maekawa, Kiyomi Kikukawa J. H. Helbig, Katsunori Furuhashi, Masayuki Ichinose, Atsuko Suzuki-Hashimoto, Bin Chang, Miyo Murai, and Fumiaki Kura: Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from bath water, cooling tower water, and soil in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 2011.
- 14) Fumiaki Kura, Junko Amemura-Maekawa, Akiko Kaneko, Toshiro Kuroki, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Hiroshi Nakajima, Kimiko Kawano, Yuki Tada, and J. H. Helbig: Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 from patients in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 2011.
- 15) 原田義高、吉嶺裕之、諸角美由紀、生方公子、前川純子、倉 文明、渡辺喜和雄、森本浩之輔、有吉紅也: MultiplexPCR が有用であった *Legionella pneumophila* serogroup 10 によるレジオネラ肺炎. 第 85 回日本感染症学会総会. 東京、2011 年 4 月.
- 16) 山崎利雄: 臨床、動物、公衆浴場の浴用水等から検出された *Mycobacterium avium* における VNTR 法による検討、第 86 回日本結核病学会総会、東京、2011 年 6 月.
- 17) 山崎利雄、杉山寛治、前川純子、泉山信司、遠藤卓郎、倉 文明: 臨床および循環式浴槽水等から検出された *Mycobacterium avium* の縦列反復数可変領域 (VNTR) を用いた解析、第 81 回実験結核研究会、東京、2011 年 6 月.
- 18) 金谷潤一、磯部順子、嶋智子、木全恵子、綿引正則、佐多徹太郎: 富山県内で分離された *L. pneumophila* 血清群 (SG) 1 の遺伝子解析. 日本防菌防黴学会第 38 回年次大会、大阪、2011 年 8 月.
- 19) 田栗利紹、杉山寛治、小坂浩司、泉山信司、倉 文明: 温泉利用循環ろ過式浴槽水におけるモノクロラミン消毒の有効性. 日本防菌防黴学会第 38 回年会、大阪、2011 年 8 月.
- 20) 杉山寛治、神田隆、縣邦雄、久保田明、泉山信司、小坂浩司、遠藤卓郎、倉文明: アルカリ泉掛け流し式浴槽に対するモノクロラミンの消毒の導入、日本防菌防黴学会第 38 回年次大会、大阪、2011 年 8 月.
- 21) 竹熊美貴子、野本かほる、柴田 穰、高橋淳子、古川容子、香川 (田中) 聡子、神野透人、西村哲治: 公衆浴場における消毒副生成物の実態調査: 含窒素消毒副生成物とアルデヒド類. 第 48 回全国衛生化学技術協議会年会 (2011.11)
- 22) 神野透人、香川 (田中) 聡子、西村哲治: コンピューターケミストリーを利用した家庭用品中の化学物質の物性値予測法に関する研究. 平成 23 年度 室内環境学会学術大会 (2011.12)
- 23) 神田隆、高橋奈緒美、八木美弥、西尾智裕、杉山寛治、縣邦雄、久保田明、泉山信司、小坂浩司、遠藤卓郎、倉文明: アルカリ泉掛け流し式浴槽に対するモノクロラミンの消毒の導入、第 24 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究会、茨城、2012 年 2 月
- 24) 竹熊美貴子、吉田栄充、野本かほる、柴田穰、香川 (田中) 聡子、神野透人、西村哲治: 公衆浴場および遊泳用プールにおける消毒副生成物の実態調査. 日本薬学会第 132 年会 (2012.3)
- 25) 森本 洋: 分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性、第 85 回日本細菌学会総会技術講習会「話題微生物の分離・同定法と最新事情」、平成 24 年 3 月 27 日長崎新聞文化ホール
- 26) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Hiroyuki Tawara, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Shinobu Tanaka, Hiroshi Nakajima Shuji Yoshino, Shinjiro Abe, Takako Misaki, Tomoe Shimada, Taku Wakui, Yuki Tada, Makoto Ohmishi. Grouping of clinical isolates of *Legionella pneumophila* SG1 in Japan, using SBT analysis and environmental habitats. ESGLI 2012 (1st Meeting of the ESCMID Study Group for *Legionella* Infections), Dresden, Germany, Sep. 2012.
- 27) 山崎利雄、前川純子、磯部順子、縣 邦雄、杉山寛治、緒方喜久代、倉 文明温泉等の浴槽水の抗酸菌検出調査と分離された *Mycobacterium*

*avium* の VNTR 法による解析、第 82 回実験結核研究会総会、2012 年 5 月、広島

- 28) 荒井桂子、堀切佳代、田中礼子、吉川循江、坂井清、前沢仁、刈込高子：前培養を組み合わせた RT-PCR 法 (LC RT-PCR 法) を用いたレジオネラ迅速検査法の検討、日本防菌防黴学会第 39 回年次大会、東京、2012 年 9 月
- 29) 杉山寛治、神田隆、佐原啓二、市村祐二、江口大介、泉山信司、八木田健司、小坂浩司、遠藤卓郎、倉文明：モノクロラミン生成・注入・測定を自動化した循環式浴槽モデルにおける消毒効果の検証、日本防菌防黴学会第 39 回年次大会、東京、2012 年 9 月
- 30) 中臣昌広、山下康之、杉本麻里子、石山康史、岡部咲子：公衆浴場等シャワー水のレジオネラ属菌対策とその成果、日本防菌防黴学会第 39 回年次大会、東京、2012 年 9 月
- 31) 倉 文明：生息環境に対応したレジオネラ・ニューモフィラのグループ化と感染リスク、シ

ンポジウム環境改変と微生物生態系、招請講演、第 28 回日本微生物生態学会大会 (JSME 2012)、豊橋市、2012 年 9 月

- 32) 縣邦雄：モノクロラミンによる浴槽水のレジオネラ対策、第 40 回建築物環境衛生管理全国大会、東京、2013 年 1 月

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

前川 純子、渡邊 治雄、倉 文明、常 彬、森林 敦子、杉江 元、早川 洋一：新規イソクマリン系蛍光物質。特許第 4590625 号。登録日 2010 年 9 月 24 日。（レジオネラ菌体に由来する蛍光物質）

倉 文明、前川純子、渡辺治雄、小林静史、高橋朋子：マクロファージのレジオネラ・ニューモフィラ感受性を支配する遺伝子を導入したマウス、特許第 4696233 号、登録日 2011 年 3 月 11 日

図1. 浴槽システムのモノクロラミン注入・制御フロー図

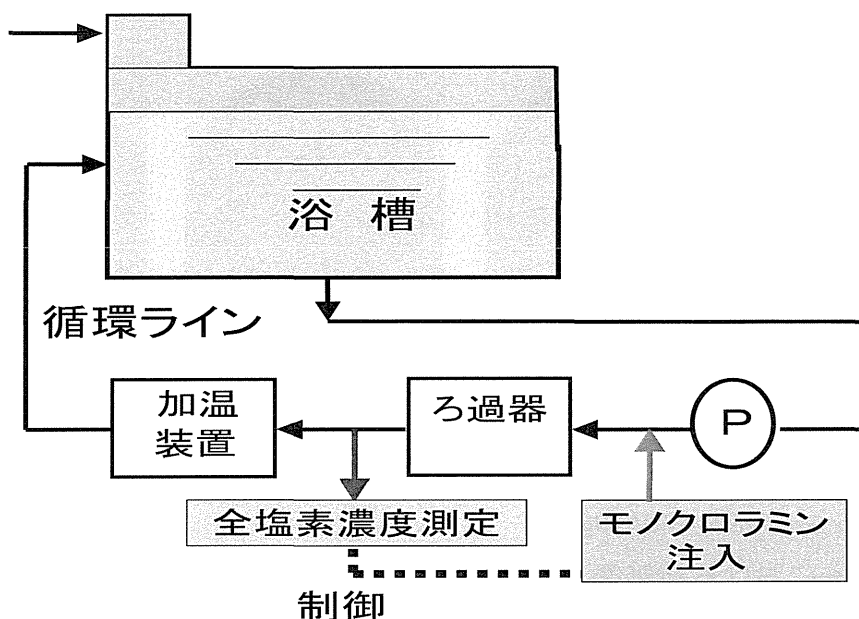


図2. モノクロラミン発生装置のフロー図

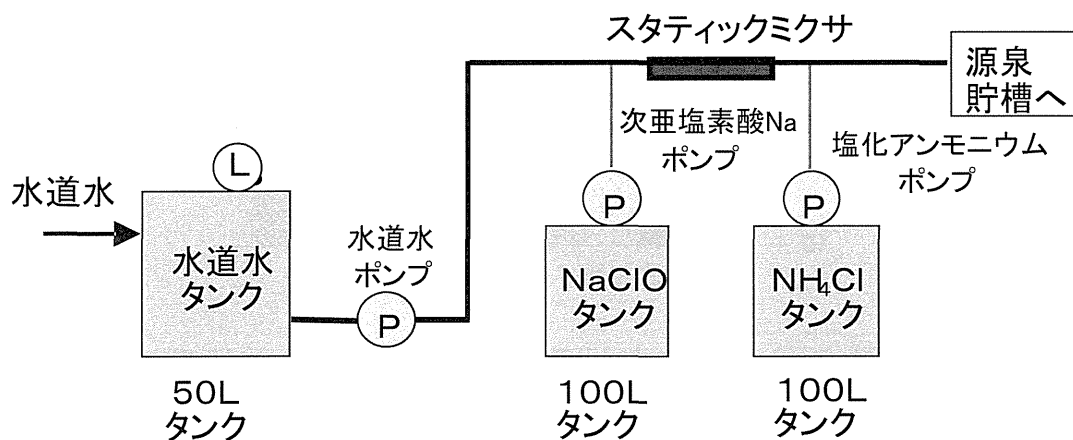
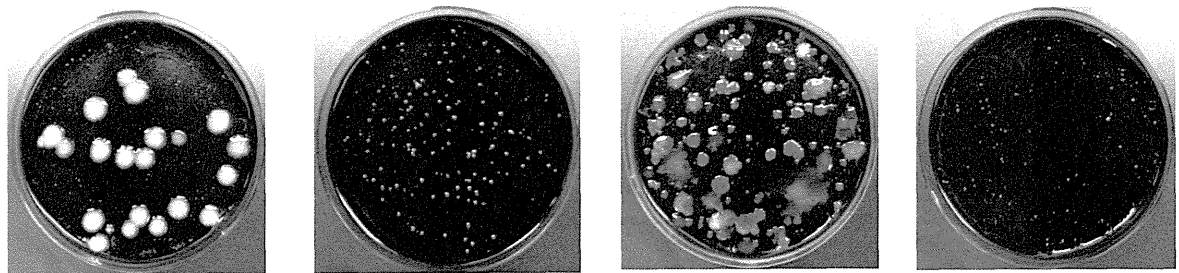


表1 営業中の公衆浴場におけるモノクロラミン生成装置による検証試験結果

検査項目		実験前	開始時	1週目	2週目	3週目	4週目	5週目	6週目
		10月17日	10月23日	10月28日	11月4日	11月11日	11月18日	11月25日	12月2日
微生物検査	レジオネラ属菌数 (cfu/100mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	レジオネラ属菌遺伝子数 (cfu/100mL)	1.7	13.9	5.5	15.0	19.3	29.2	21.1	5.0
	従属栄養細菌数 (cfu/mL)	$2.3 \times 10^1$	$1.5 \times 10^2$	$3.0 \times 10^2$	$3.3 \times 10^2$	$1.2 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$	$2.9 \times 10^2$	$2.8 \times 10^3$
	アメーバ数 (cfu/50mL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
塩素濃度	モノクロラミン (mg/L)	1.2	1.3	3.2	3.5	2.4	3.6	3.9	3.9
	ジクロラミン (mg/L)	0.2	<0.015	0.2	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015
	トリクロラミン (mg/L)	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015
	遊離塩素 (mg/L)	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015
消毒副生成物	CHCl <sub>3</sub> (トリクロロメタン) (ppb)	20	0.12	0.21	0.25	0.19	0.26	0.23	0.23
	CHBrCl <sub>2</sub> (プロモジクロロメタン) (ppb)	1.8	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	CHBr <sub>2</sub> Cl (ジブロモクロロメタン) (ppb)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	CHBr <sub>3</sub> (トリブロモメタン) (ppb)	0.36	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C <sub>2</sub> HCl <sub>2</sub> N (ジクロロアセトニトリル) (ppb)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C <sub>2</sub> HClBrN (プロモクロロアセトニトリル) (ppb)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	C <sub>2</sub> HBr <sub>2</sub> N (ジブロモアセトニトリル) (ppb)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	上記7物質の計	22.16	0.12	0.21	0.25	0.19	0.26	0.23	0.23

(a) 平板培養法における前処理の効果



酸処理 (5分)	酸処理 (20分)	熱処理	熱酸処理
雑菌多	雑菌なし	雑菌多	雑菌なし
レジオネラ不検出	レジオネラ発育良好 3,100 CFU/100ml	レジオネラ不検出	レジオネラ発育遅い

(b) LC RT-qPCR 法における前処理の効果

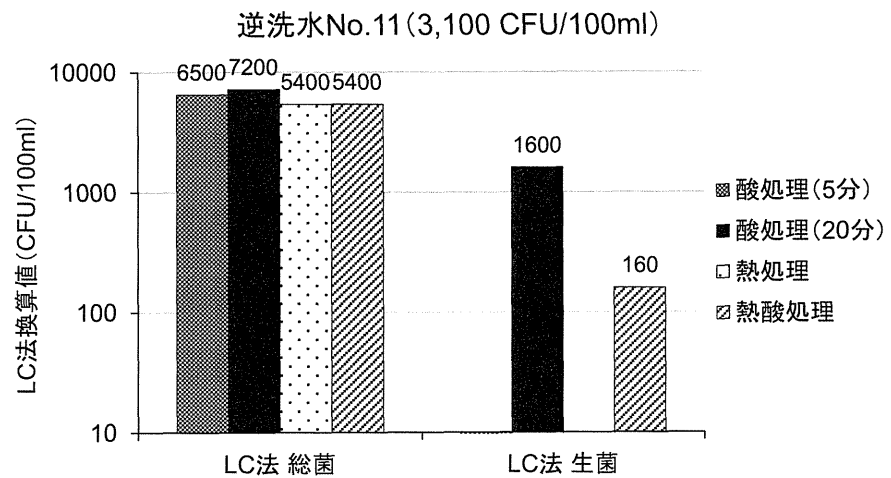


図3 微生物汚染検体における LC RT-qPCR 法前処理の効果

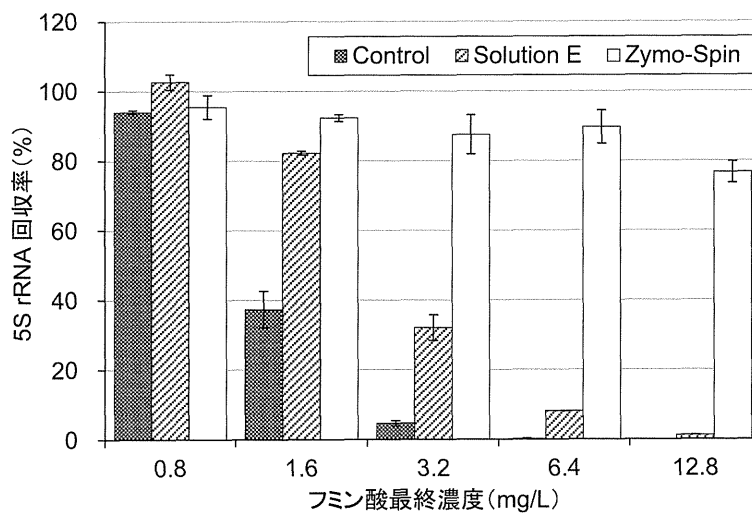
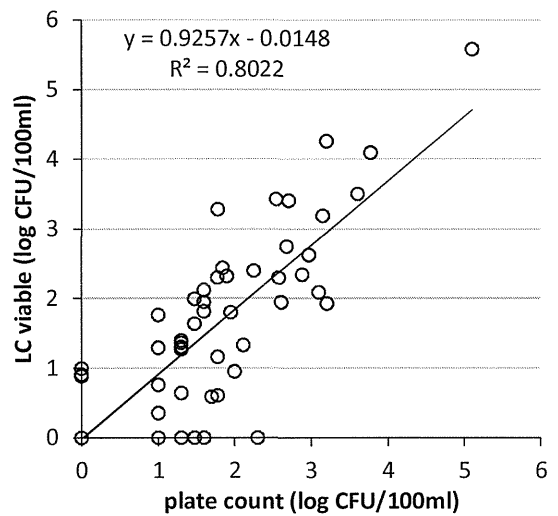
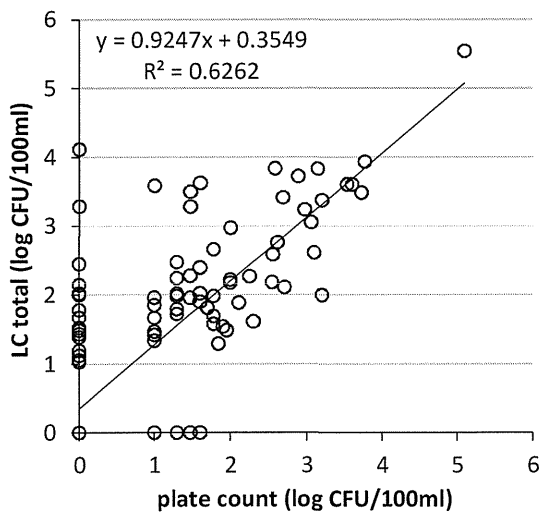


図4 RT-qPCR 阻害回避試薬の効果



(1) LC 法 Total Legionella (n=147) (2) LC 法 Viable Legionella (n=131)  
判定保留の 16 件を除く

図 5 平板培養法と LC RT-qPCR 法との比較

表 2 平板培養法と LC RT-qPCR 法との比較

(1) Total Legionella (総菌)

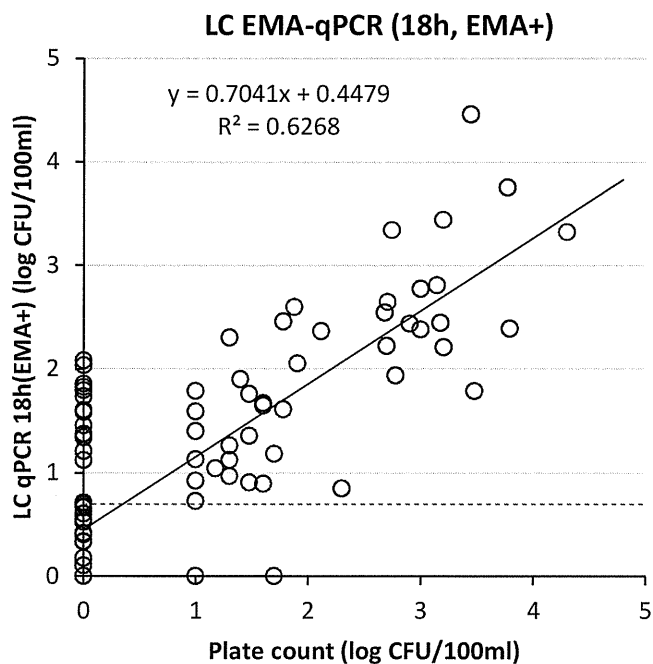
	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 10	< 10		
LC法 Total Legionella	53	16	69	
	6	72	78	
計	59	88	147	

感度 89.8% 特異度 81.8%

(2) Viable Legionella (生菌)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	≥ 10	< 10		
LC法 Viable Legionella	40	3	43	
	8	80	88	
計	48	83	131	

感度 83.3% 特異度 96.4%



(3) LC EMA-qPCR における 18h LC (+) 破線は LC EMA-qPCR 法における 0.7 log CFU/100ml (5 CFU/100ml) の値を示す。

図 6 平板培養法と LC EMA-qPCR 法との比較 (n=113)

表 3 平板培養法と LC EMA-qPCR 法との比較 (n=113)

(1) LC EMA-qPCR における 0h LC (EMA-)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	$\geq 10$	$< 10$		
EMA-qPCR	$\geq 1$	40	39	79
0h LC (-)	$< 1$	4	30	34
計		44	69	113

感度 90.9% 特異度 43.5%

(2) LC EMA-qPCR における 18h LC (EMA-)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	$\geq 10$	$< 10$		
EMA-qPCR	$\geq 1$	44	34	78
18h LC (-)	$< 1$	0	35	35
計		44	69	113

感度 100% 特異度 50.7%

(3) LC EMA-qPCR における 18h LC (EMA+)

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	$\geq 10$	$< 10$		
EMA-qPCR	$\geq 1$	42	30	72
18h LC (+)	$< 1$	2	39	41
計		44	69	113

感度 95.5% 特異度 56.5%

(4) LC EMA-qPCR における 18h LC (EMA+)

カットオフ値を 5 CFU/100ml に変更

	(CFU/100ml)			計
	Plate count		計	
	$\geq 10$	$< 10$		
EMA-qPCR	$\geq 5$	42	17	59
18h LC (+)	$< 5$	2	52	54
計		44	69	113

感度 95.5% 特異度 75.4%

表 4 検体採取から検査まで

項目	地研実態調査での一致/多い回答(%)	新版レジ防止指針(ISO 法ベース)	WG 提案方法
採水方法	容器入水、柄杓等使用	—	柄杓等使用が望ましい <sup>1)</sup>
採水量	約 1000mL (約 61)	500mL?	1000mL <sup>2)</sup>
容器への採取量	—	満杯にせず上部に空間を残す	満杯にせず上部に空間を残す
採水容器の材質	ポリプロピレン(約 85)	ガラス製またはポリエチレン製など	滅菌済み容器 <sup>3)</sup>
チオ硫酸ナトリウム添加	行っている(92)	行う	行う
搬送温度	冷蔵(68)	6~18℃	6~18℃ <sup>4)</sup>
検査開始まで	決めている・ある程度決めている(約 45)	採取後 2~5 日以内が望ましい。濃縮検体の保存は 14 日を超えてはならない。	採取後 2~5 日以内が望ましいとされているが、可能な限り速やかに行う。濃縮検体の保存は 14 日を超えてはならない。
搬入後保存温度	冷蔵(10℃未満)(約 91)	6±2℃が望ましい	6±2℃が望ましい
非濃縮検体での検査	21/75 施設(28%)	行う	行う <sup>5)</sup>
安全キャビネット	利用 49%、未利用 51%	必要	必要

1) 容器入水の場合、容器表面にレジオネラ属菌の付着が考えられ、場合によっては検査室内での相互汚染が懸念されるため。状況により、搬入後、容器周辺を消毒してから検査を行う。

2) 予備の検水確保のため。ろ過濃縮を推奨するため、基本ろ過量の倍量である 1000mL とした。もし遠心濃縮を行う場合は、基本遠心量の倍量を確保すること。

3) ポリプロピレンやポリエチレン製またはガラス製など。

4) 宅配便等の冷蔵システム利用の場合はそれに従う。検査室への速やかな搬入が可能な場合は常温も可。

5) 採取された検体の菌数を予測できないので、非濃縮検体と濃縮検体を並行して検査する  
((財)ビル管理教育センター:<付録>1環境水のレジオネラ属菌検査方法.新版レジオネラ症防止指針,91,1999)

森本 洋ほか:レジオネラ選択分離生培地の比較検討,北海道衛研所報,58,51-54,2008(厚労科研費「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」データより)

森本 洋ほか:浴槽水中のレジオネラ属菌検査における非濃縮検体の重要性.北海道衛研所報,61,21-23,2011(厚労科研費「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」データより)

ただし、清掃消毒直後の検体等、レジオネラ属菌数が少ないと推定される場合においては、濃縮検体のみでの検査対応も可とする。

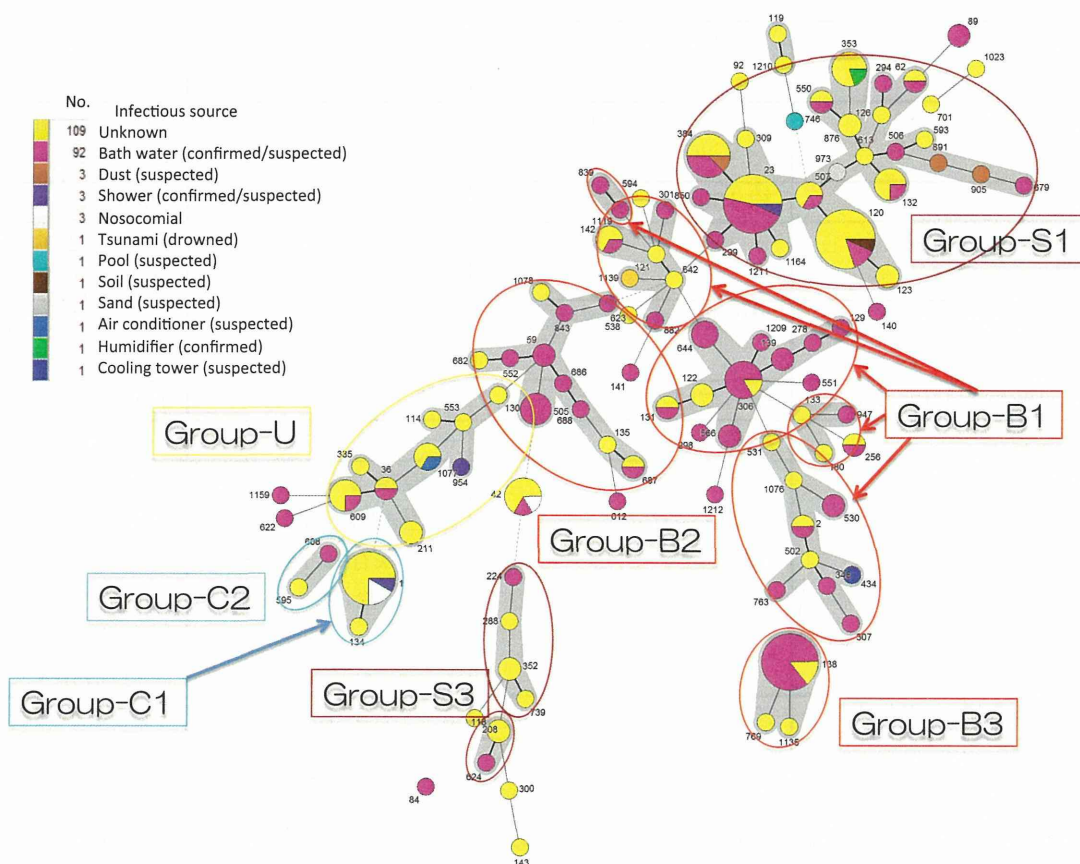


図7. Minimum spanning tree で示した 1980 年から 2012 年に分離された *L. pneumophila* 血清群 1 の臨床分離株 217 株の ST による類縁関係。円の脇の数字は ST ナンバーを示し、円の大きさはそれぞれの ST の株数に比例している。推定・確定された感染源により異なる色で株を示した（感染源不明は黄色、浴槽水はマゼンダなど）。ST をつなぐ枝は遺伝子座数の違いに比例して長くなっており、総枝長が最短になるように tree は描かれている。隣り合う ST の遺伝子座の違いが 2 つ以下の場合、周囲が灰色に塗られて、complex を形成していることを示している。それぞれの complex が、環境分離株の解析に基づき提唱（Amemura-Maekawa *et al.*, 2012. *Appl. Environ. Microbiol.* 12:4263-70）されたどのグループに属するかも示した。Group-B1, B2, B3 は浴槽水分離株が主に属するグループ、Group-C1, C2 は冷却塔水分離株が主に属するグループ、Group-S1, S2, S3 は土壌分離株が主に属するグループだが、国内の臨床分離株では Group-S2 に属する菌株はなかった。環境分離株の解析では見出されなかった Group-U が形成された。



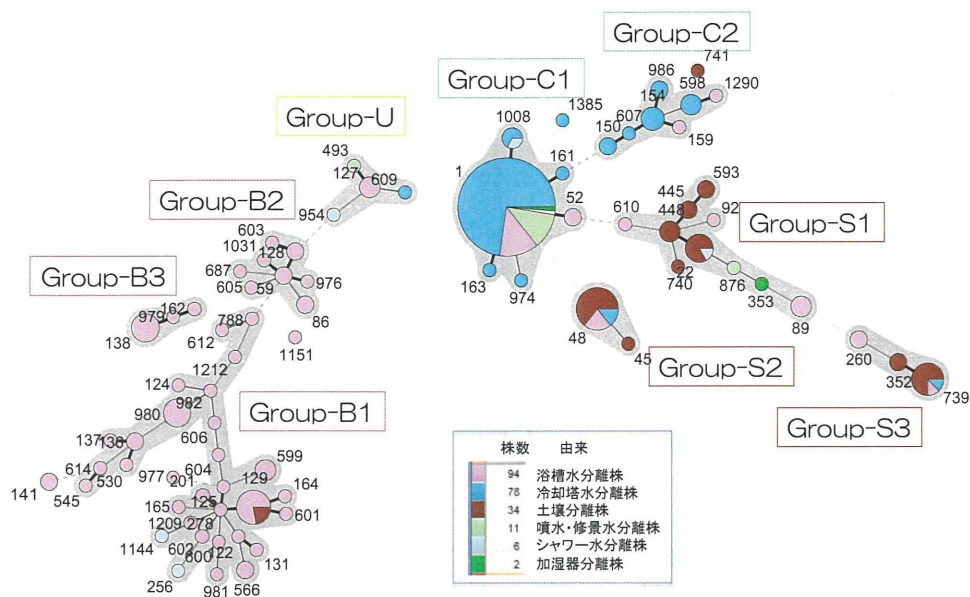


図 8. Minimum spanning tree で示した *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株 225 株の ST による類縁関係。以前解析した冷却塔水分離株 50 株、浴槽水分離株 50 株、土壌分離株 34 株の計 134 株 (Amemura-Maekawa *et al.*, 2012. Appl. Environ. Microbiol. 12:4263-70) に加えて、本研究で解析した 91 株 (冷却塔関連株 28 株、浴槽関連株 44 株、噴水・修景水 11 株、シャワー水 6 株、加湿器 2 株、感染源からの分離株 10 株を含む) について解析を行った。

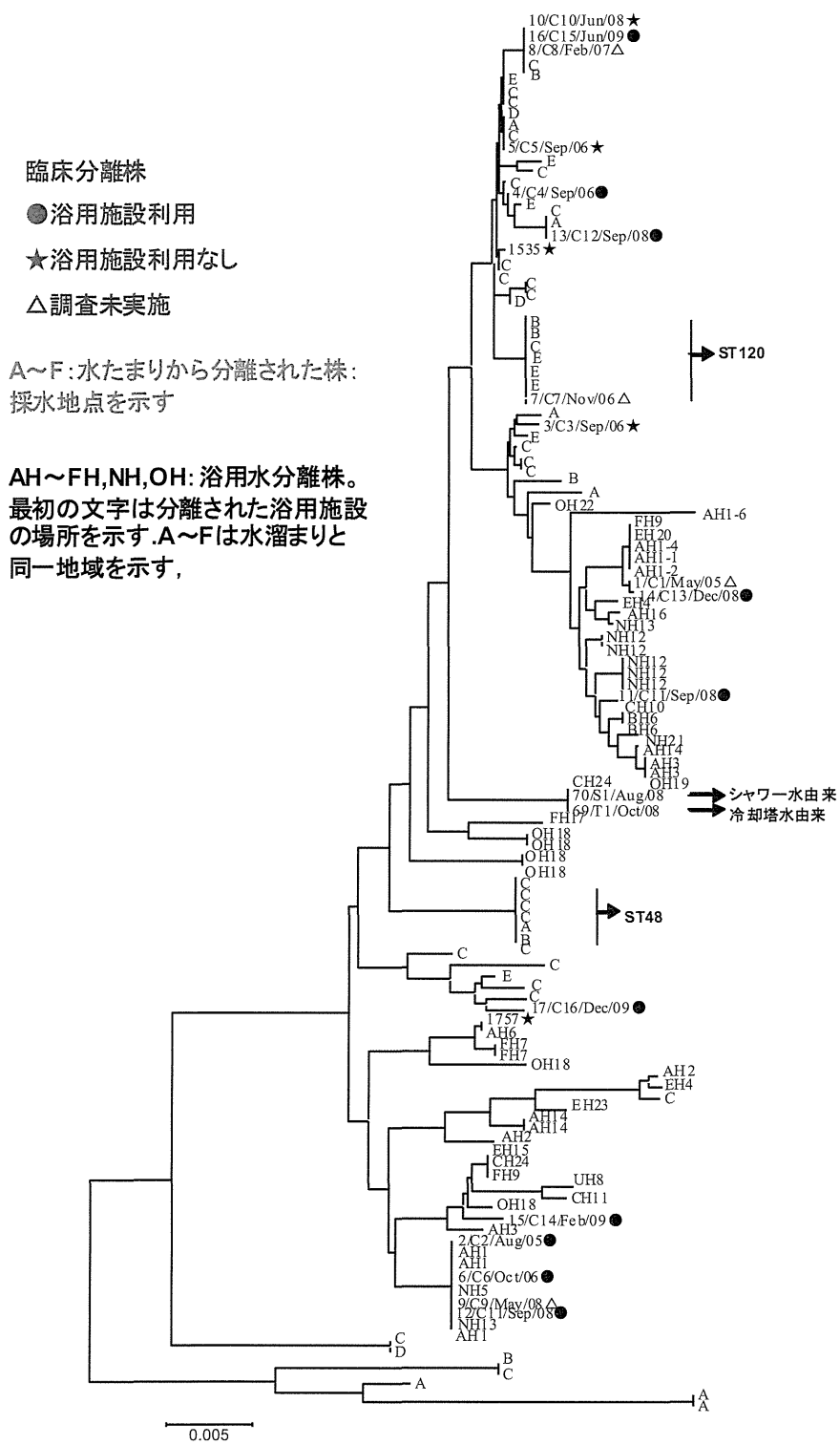


図 9 *L.pneumophila* SG1のSBT塩基配列の系統樹解析

表5 *L.pneumophila* 国内分離株 109 株の DDH 法による亜種同定結果

血清群	亜種			菌株数
	<i>pneumophila</i>	<i>fraseri</i>	<i>pascullei</i>	
1	10	0	0	10
2	7	0	0	7
3	9	1	0	9
4	5	2	0	7
5	16	0	0	16
6	8	0	0	8
7	7	0	0	7
8	8	0	0	8
9	7	0	0	7
10	6	0	0	6
11	2	2	0	4
12	7	0	0	7
13	6	0	0	6
14	2	0	0	2
15	4	0	0	4
計	104	5	0	109

表6 国内分離株(109 株)における *pilE* 遺伝子のタイプ

	<i>pilE</i> type															計
	1	3	4	5	6	8	10	12	13	14	17	20	21	22	27	
subsp. <i>pneumophila</i>	4	6	11	6	10	2	31	16	11	0	1	1	3	2	0	104
subsp. <i>fraseri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	5

## II. 資料編

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）  
公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究

平成22年度～24年度分担総合研究報告書

掛け流し式浴槽及び循環式浴槽におけるモノクロラミンによる消毒検証試験

研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	○杉山寛治	静岡県環境衛生科学研究所
	○佐原啓二	静岡県環境衛生科学研究所
	縣 邦雄	アクアス株式会社 つくば総合研究所
	神野透人	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
	八木田健司	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	杉山寛治	株式会社マルマ 研究開発部
	小坂浩司	国立保健医療科学院 水道工学部
	泉山信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	片山富士男	静岡市保健所
	富田敦子	静岡市環境保健研究所
	江口大介	ケイ・アイ化成株式会社
	市村祐二	ケイ・アイ化成株式会社
	道越勇樹	静岡県環境衛生科学研究所
	八木美弥	静岡県環境衛生科学研究所
	神田 隆	静岡県環境衛生科学研究所

研究要旨：遊離塩素消毒が困難とされるアルカリ泉質やアンモニア態窒素が多く含まれる泉質に対して、モノクロラミンによる消毒検証試験を行った。掛け流し式浴槽については、アルカリ泉質の1施設において1年間、循環式浴槽については、アルカリ性の井水を用いた実験用モデル浴槽で14日間、アルカリ泉質かつアンモニア態窒素が多く含まれる温泉水の営業中の3施設において各6週間、モノクロラミン生成装置を導入し、モノクロラミン濃度を3 mg/L程度に保持してその消毒効果を検証した。掛け流し式浴槽においては、モノクロラミン濃度をほぼ設定どおりに保持できた。試験中の浴槽水は、細菌学的に良好な成績であり、モノクロラミン消毒後の源泉タンク内水や各浴槽水における水質検査ではカルキ臭の原因となるトリクロラミンは全く検出されなかった。循環式モデル浴槽においては、モノクロラミンの生成装置と全塩素濃度測定器による自動制御装置の導入により、モノクロラミン濃度はほぼ設定された濃度範囲内で制御できた。その間の浴槽水、ろ過器内水のレジオネラ属菌、従属栄養細菌、自由生活性アメーバは不検出であった。また、カルキ臭の原因となるジクロラミン、トリクロラミンは検出されなかった。営業中の循環式浴槽では、モノクロラミンが浴槽水に対して高い消毒効果のあること、消毒副生成物の発生が極めて少ないこと等が実証され、本法が安全で快適な新たな消毒法として期待される結果が得られた。課題として、循環式浴槽におけるモノクロラミン濃度の自動制御においては、硬度の高い泉質の場合は管理に注意点のあることが分かった。

## A. 研究目的

浴槽水の消毒に使用される次亜塩素酸ナトリウムは、その殺菌効果は高いが、カルキ臭や一部の泉質による殺菌効果の低下、有害な副生成物の生成の可能性などの問題を抱えており、次亜塩素酸ナトリウムに替わる安全で効果的な消毒方法の開発が求められている。

一方、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モノクロラミンは、次亜塩素酸ナトリウムより化学的安定性があり、濃度管理が容易で、有機物の存在下でも有害なトリハロメタン等の副生成物を生成せず、塩素のように不快な悪臭を生じさせない利点を持つといわれている。

平成 21 年度の厚生労働科学研究「公衆浴場におけるレジオネラの消毒方法に関する研究」において、次亜塩素酸ナトリウム消毒の難しい高 pH 領域においても、モノクロラミンがレジオネラや宿主アメーバなどに対し高い殺菌効果を持ち、その安全性（ウサギの皮膚刺激性試験において無刺激性と判定）が高いことが確認されている。

該研究では、さらに、循環ろ過式浴槽モデルにモノクロラミン消毒を導入し、入浴を伴った実験で、浴槽水の殺菌と、ろ過材、配管、集毛器などのバイオフィーム形成防止に効果があることを検証している。また、モノクロラミン消毒によってカルキ臭が生じない利点も確認され、モノクロラミン消毒は循環式浴槽水の次亜塩素酸ナトリウムに替わる新しい消毒方法として期待できる結果が示されている。

今回は、まず、モノクロラミン濃度の保持が容易な掛け流し式浴槽において、モノクロラミン消毒方法を導入して、その消毒効果を調べた。次に、アルカリ性の井水の沸かし湯を使った循環ろ過式のモデル浴槽系内にモノクロラミンの生成装置と全塩素濃度測定器による自動制御装置を導入して、濃度維持と消毒効果を調べた。さらに、アルカリ泉質かつアンモニウム態窒素が多く含まれる温泉水の循環式浴槽をもつ営業中の 3 施設において、その消毒効果について実証試験を行った。

## B. 研究方法

### 1 掛け流し式浴槽

#### (1) 対象施設

静岡県内の施設で、源泉は揚水量 10.8 m<sup>3</sup>/h で連続的に源泉タンク (50 t) に流入し、そこから配管を経由して掛け流し式浴槽に給湯される。

#### (2) モノクロラミン生成装置

モノクロラミン濃度の保持が比較的容易な掛け流し式浴槽においては、源泉タンク内の温泉水に次亜塩素酸ナトリウムと塩化アンモニウムを水道水に一定比率混合することにより自動生成したモノクロラミンを 3 mg/L 前後を目標に自動注入し、1 年間保持した。

### 2 循環式浴槽 (モデル浴槽)

#### (1) 対象施設

循環ろ過式浴槽モデル (静岡県環境衛生科学研究所に設置) は、砂ろ過装置を含む循環配管と浴槽や加温装置からなり、pH8.4 の井水を満たしてからモノクロラミン消毒を開始した。循環流速を 4 m<sup>3</sup>/h とし、湯温 40°C に維持した浴槽水に研究所職員が入浴することで有機物汚染を負荷した。

#### (2) モノクロラミン生成装置等

モノクロラミンの生成、注入、測定の自動化装置を導入して、濃度制御はモノクロラミン濃度に相当する全塩素濃度測定器の測定値により 3 mg/L 前後を目標に 14 日間保持した。

### 3 営業中の循環浴槽

#### (1) 対象施設

##### 1) A 施設

静岡県静岡市内の公衆浴場で、実験浴槽は循環式浴槽の露天風呂 (総容量約 20 トン、ろ過あり)、成分分析表による泉質はナトリウム炭酸水素塩温泉 (低張性/アルカリ性/低温泉) で pH9.0、研究班が測定した源泉の硬度は 2 と低く、アンモニウム態窒素は 1.9 mg/L であった。

##### 2) B 施設

静岡県島田市内の公衆浴場で、実験浴槽は循環式浴槽の露天風呂 (総容量 6.5 トン、ろ過あり)、

成分分析表による泉質はナトリウム塩化物温泉（高張性/弱アルカリ性/高温泉）で pH 7.8、研究班が測定した源泉の硬度は 298 と高く、アンモニア態窒素は 4.3 mg/L であった。

### 3) C施設

静岡県浜松市内のホテルの入浴施設で、実験浴槽は循環式浴槽の露天風呂（総容量 28 トン、ろ過あり）、成分分析表による泉質はナトリウム-カルシウム塩化物温泉（低張性/弱アルカリ性/低温泉）で pH 8.2、研究班が測定した源泉の硬度は 475 と高く、アンモニア態窒素は 0.4 mg/L であった。

#### (2) モノクロラミン生成装置等

モノクロラミンの生成、注入、測定の自動化装置を導入して、濃度制御はモノクロラミン濃度に相当する全塩素濃度測定器の測定値により  $3 \pm 1$  mg/L を目標に保持した。各施設で 6 週間行った。

## 4 検査項目

### (1) 微生物検査

レジオネラ属菌の定量は、浴槽水 500mL をメンブランフィルター法により 100 倍に濃縮し、GVPC 寒天培地を用いて分離培養し、100mL あたりの CFU (Colony Forming Unit) を算出した。また、レジオネラ属菌の存在（死菌を含む）を調べるため、リアルタイム PCR 法により、レジオネラ属菌特異的遺伝子の定量を行い、得られたコピー数を CFU/100mL に換算した。

さらに、自由生活性アメーバ（大腸菌塗布無栄養寒天培地）、および従属栄養細菌（R2A 寒天培地）についても常法により定量した。

### (2) 塩素濃度の定量

モノクロラミンの定量およびモノクロラミン生成に伴って生成される恐れのあるジクロラミン、トリクロラミンの分別定量は、DPD/FAS 滴定法に準じて行った。特に、悪臭の原因となるトリクロラミンの濃度測定については、高感度に定量できる HS-GC/MS 法を併用した。これらの塩素濃度の測定については、国立保健医療科学院で実施した。

### (3) 塩素消毒による消毒副生成物の定量

塩素消毒を行った浴槽水から入浴者が経気道及び経皮的に取り込まれる化学物質暴露を評価するため、塩素消毒を行った水中で検出される消毒副生成物（トリハロメタン類 4 物質及びハロアセトニトリル類 3 物質）の定量を行った。これらの測定は、国立医薬品食品衛生研究所で実施した。

### (4) 一般水質検査

浴槽水の水質検査項目の測定は、アクアスつくば総合研究所または株式会社マルマで実施した。

### (5) 採水現場における塩素濃度の測定

採水現場における浴槽水のモノクロラミン濃度、全残留塩素濃度、遊離残留塩素濃度の測定は、簡易測定器であるポケット残留塩素計（HACH 社）を用いた。測定試料は、測定器の測定可能範囲内にするため浴槽水を 5 倍に希釈調製した。

## C. 研究結果および考察

### 1 掛け流し式

モノクロラミン消毒前の源泉水から  $1.4 \times 10^3$  CFU/100mL のレジオネラ属菌が検出されたにもかかわらず、モノクロラミンを注入した源泉タンク内の温泉水や給湯された浴槽水からは、レジオネラ属菌、自由生活性アメーバ、一般細菌ともに不検出で、従属栄養細菌数も消毒後の源泉タンク内の温泉水におけるごくわずかの検出に止まり、十分な消毒効果が確認された。

モノクロラミン消毒により、アルカリ泉質の温泉であっても、長期間にわたって安定した、細菌学的に良好な掛け流し式浴槽水が維持できることが示された。

### 2 循環ろ過式浴槽モデル

循環浴槽水におけるモノクロラミン（全塩素）濃度は、12 日間、延べ 11 名の入浴による有機物負荷にかかわらず、ほぼ設定された濃度範囲内で制御できた。塩素濃度の低下は緩やかで、モノクロラミンは遊離塩素に比べ安定と考えられた。濃度の復帰は 10 分程度と素早く行われていた。ま

た、塩素臭の原因となるジクロロアミン、トリクロロアミンは検出されなかった。その間の浴槽水、ろ過器内水のレジオネラ属菌、従属栄養細菌、自由生活性アメーバはいずれも不検出と、モノクロロアミン消毒により、レジオネラ属菌等の制御が可能との成績であった。

これらの結果から、循環ろ過式浴槽水のモノクロロアミン消毒の自動化は、アルカリ泉質の浴槽水の新しい消毒法として期待できると考えられた。

### 3 営業中の循環式浴槽

#### (1) 微生物に対する消毒殺菌効果

レジオネラ属菌の培養では、全3施設において試験中レジオネラ属菌は一切検出されず、遊離塩素消毒が困難とされるアルカリ泉質で、かつアンモニア態窒素が多く含まれる浴槽水へのモノクロロアミンの注入が本菌の消毒殺菌に有効であった。また、レジオネラ属菌の増殖の場となる自由生活性アメーバは一切検出されず、アメーバ増殖の前兆となる従属栄養細菌数は試験期間を通して $10^1 \sim 10^4$  CFU/mL オーダーの低値に推移したことから、浴槽水へのモノクロロアミン注入による消毒殺菌効果の有効性が確認された。

一方、レジオネラ属菌の遺伝子検査では、試験期間を通して検出されたことから、本菌は循環ろ過装置の内部や配管系の内部に付着した生物膜またはそこに付着するアメーバ内部に寄生して僅かながら生存していると考えられる。

#### (2) モノクロロアミン濃度の推移

A施設では、モノクロロアミン濃度を $3 \pm 1$  mg/Lに保持することを目標として自動制御装置を稼働させたところ、目標範囲内を維持することができた。本施設では、試験中に全塩素濃度測定器の調整は行うことなく、モノクロロアミン濃度の維持が可能であった。

しかし、B施設では、モノクロロアミン濃度が目標範囲を逸脱した。今回、モノクロロアミンの目標濃度を逸脱した原因は、全塩素濃度測定器が計測した値と浴槽水のモノクロロアミン濃度との間に誤差が生じたことにある。硬度の高い泉質では、

全塩素濃度測定器のセンサーにスケールが付着し、感度が低下したものと考えられた。浴槽水の濃度を正確に反映させるためには、全塩素濃度測定器のセンサーの洗浄や校正を定期的に行う必要性のあることが分かった。

C施設では、泉質はB施設同様に硬度が高かったため、この教訓を生かして全塩素濃度測定器のセンサーの調整を毎日実施した。その結果、試験中は目的のモノクロロアミン濃度制御は可能であったが、現場にとっては大きな負担となることが明らかとなった。モノクロロアミン消毒法を安全に普及させるためには、研修等の訓練が必要と考えられた。

#### (3) 臭気と消毒副生成物の問題

結合塩素の1種であるトリクロロアミンは、カルキ臭の主要な原因物質であり生成を防ぐ必要があるが、試験中には全3施設において全く検出されなかった。これは、塩化アンモニウムを過剰に注入したことによる効果と考えられる。

同じく生成させないことが望まれるジクロロアミンについては、モノクロロアミン濃度が適正に保持されたA施設及びC施設では各1回極微量が検出されたに過ぎなかったが、モノクロロアミン濃度が5 mg/Lを超えたB施設ではモノクロロアミン濃度に応じてジクロロアミンも僅かに検出された。このことから、モノクロロアミン濃度を適正に保持することで、ジクロロアミンの生成を抑えられると思われる。

浴槽水中のモノクロロアミン濃度と消毒副生成物発生量との関係を解析すると、モノクロロアミン濃度を適正に保持できた2施設(A及びC)では、トリハロメタン類4物質およびハロアセトニトリル類3物質の合計が試験前 $22.16 \sim 194.56 \mu\text{g/L}$ に対し、試験中は $0.19 \sim 3.08 \mu\text{g/L}$ と極めて低く安定していた。これらの結果から、モノクロロアミン消毒を適正に実施することで、消毒副生成物の生成は桁違いに低減できると推察された。

一方、モノクロロアミン濃度は第4週に最大で28.0 mg/Lが検出されたB施設では、モノクロロアミンによる消毒副生成物として、トリハロメタン



類4物質およびハロアセトニトリル類3物質が比較的多く検出された。これに対応するように、入浴者のアンケート調査において、第4週にかけて消毒の臭い、肌や目への刺激など通常との違いを訴える記載が散見された。従って、必要以上の高濃度の消毒は避けるべきと考える。

#### E. 結論

遊離塩素消毒が困難とされるアルカリ泉質やアンモニア態窒素が多く含まれる泉質等に対して、掛け流し式浴槽、循環式浴槽（実験用モデル浴槽および営業中の3施設）において、モノクロラミンによる消毒検証試験を行った。

その結果、モノクロラミン濃度 3 mg/L 程度の注入がレジオネラ属菌の消毒殺菌に有効であり、かつ、消毒副生成物の発生は極めて低く抑えられること等が実証され、本法が安全で快適な新たな消毒法として期待される結果が得られた。循環式浴槽におけるモノクロラミン濃度の自動制御においては、硬度の高い泉質では管理に注意点のあることが分かった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 杉山寛治、神田隆、縣邦雄、久保田明、泉山信司、小坂浩司、遠藤卓郎、倉文明：アルカリ泉掛け流し式浴槽に対するモノクロラミンの消毒の導入、日本防菌防黴学会第38回年次大会、大阪、2011年8月
- 2) 神田隆、高橋奈緒美、八木美弥、西尾智裕、杉山寛治、縣邦雄、久保田明、泉山信司、小坂浩司、遠藤卓郎、倉文明：アルカリ泉掛け流し式浴槽に対するモノクロラミンの消毒の導入、第24回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究会、茨城、2012年2月
- 3) 杉山寛治、神田隆、佐原啓二、市村祐二、江口大介、泉山信司、八木田健司、小坂浩司、遠藤卓郎、倉文明：モノクロラミン生成・注入・測定を自動化した循環式浴槽モデルにおける消毒効果の検証、日本防菌防黴学会第39回年次大会、東京、2012年9月

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

表 1 営業中の循環式浴槽におけるモノクロアミン検証試験結果

		A施設	B施設	C施設
施設	所在地	静岡市	島田市	浜松市
	分類	公衆浴場	公衆浴場	ホテル
	浴槽	循環式、露天風呂	循環式、露天風呂	循環式、露天風呂
	総容量	20 m <sup>3</sup> (男 and 女)	6.5 m <sup>3</sup> (男 or 女)	28 m <sup>3</sup> (男 and 女)
	利用者数	平均 319 人/日	平均 587 人/日	平均 480 人/日
泉質	泉質名	ナトリウム炭酸水素塩温泉	ナトリウム塩化物温泉	ナトリウム-カルシウム 塩化物温泉
		(低張性/アルカリ性/低温泉)	(高張性/弱アルカリ性/高温泉)	(低張性/弱アルカリ性/低温泉)
	pH	9.0	7.8	8.2
測定値	全硬度	2	298	475
	アンモニア態窒素	1.9 mg/L	4.3 mg/L	0.4 mg/L
モノクロアミン管理	実験期間	6 週間	6 週間	6 週間
	モノクロアミン濃度保持	2.4~3.9 mg/L	0.9~28.0 mg/L	2.2~3.4 mg/L
	モノクロアミン自動制御	良好 (センサー調整なし)	洗浄必須 (センサー調整必要)	良好 (センサー調整必要)
	レジオネラ属菌	<10cfu/100mL	<10cfu/100mL	<10cfu/100mL
微生物検査	アメーバ	不検出	不検出	不検出
	レジオネラ属菌遺伝子の検出	30cfu/mL 以下	13cfu/mL 以下	183cfu/mL 以下
	従属栄養細菌	低値安定 10 <sup>3</sup> cfu/mL 程度	減少傾向 3週目以降<10 <sup>2</sup> cfu/mL	安定 10 <sup>3</sup> cfu/mL 程度
	ジクロアミン、トリクロアミンの生成	・ジクロアミン 0.2 mg/L (1/6 回検出) ・トリクロアミン検出なし	・ジクロアミン 0.2~1.1 mg/L (4/6 回検出) ・トリクロアミン検出なし	・ジクロアミン 0.1 mg/L (1/4 回検出) ・トリクロアミン検出なし
化学検査	消毒副生成物 (トリハロメタン類 4 物質、ハロアセトニトリル類 3 物質)の生成	0.19~0.25 μg/L  (実験前 22.16 μg/L)	0.59~13.0 μg/L  (対照浴槽 9.54 μg/L)	0.60~3.08 μg/L  (実験前 194.56 μg/L)

厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）  
分担研究報告書

公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究

モノクロラミン消毒による入浴施設の衛生管理  
実際の入浴施設における注入・測定自動化

研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所細菌第一部
研究分担者	○縣 邦雄	アクアス株式会社つくば総合研究所
研究分担者	佐原 啓二	静岡県環境衛生科学研究所
研究分担者	田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター
研究協力者	杉山 寛治	株式会社マルマ 研究開発部
研究協力者	神澤 啓	アクアス株式会社つくば総合研究所

研究要旨：3年間の調査研究期間中に、4箇所（静岡県3箇所，長崎県1箇所）の温泉入浴施設において、浴槽水のレジオネラ属菌抑制対策としてモノクロラミン添加による処理対策を導入し調査研究を行った。その結果、以下の結論を得た。

1. モノクロラミンを3mg/L程度以上，常時浴槽水に維持することで，浴槽水中のレジオネラ属菌を不検出（10CFU/100mL未満）に維持することが出来た。
2. モノクロラミンを添加した浴槽水は，遊離塩素消毒に比較して臭気が無い（又は少ない）という利点を得られた。
3. モノクロラミン生成装置を設置することで，人手によりモノクロラミンを調製して添加する代わりに，浴槽水にモノクロラミンを連続的に添加出来た。
4. 浴槽水中のモノクロラミン濃度を測定計器の全塩素モードにより常時測定し，モノクロラミン生成装置を制御することで，浴槽水中のモノクロラミン濃度を自動的に設定値に維持管理することが出来た。
5. しかしながら以下の課題があり，モノクロラミン処理の採用に際しては注意が必要である。

（1）モノクロラミンを消費する温泉水では，添加量が多くなり実用的でない場合があるので，事前に予備試験を行い適用可能性を確認する必要がある。

（2）モノクロラミン処理を行なうと浴槽水中のアンモニウムイオンが増加するので，1週間に一度行なう高濃度塩素洗浄の際，遊離塩素濃度を維持するには，ブレイクポイント処理が必要となる。実際の施設では，高濃度洗浄時のブレイクポイント処理のための次亜塩素酸ナトリウム添加量の設定が難しい。従って，施設に応じた洗浄方法の検討が必要である。

（3）モノクロラミン濃度を測定する全塩素濃度測定計器の電極は，温泉の水質によってはスケールが付着して感度が低下することにより測定値がずれる。定期的に校正や洗浄を行うなどの適切な維持管理が必要である。

## A. 研究目的

本調査研究の目的は、以下の通りである。

(1) 実際の各種泉質の温泉入浴施設で、浴槽水のモノクロラミン濃度を 3mg/L 程度以上に調整することにより、浴槽水中のレジオネラ属菌を不検出に出来ることを確認する。

(2) モノクロラミンは、塩化アンモニウムと次亜塩素酸ナトリウムを反応させて調製するが、調製後の保存が出来ない。従って、実際の温泉施設でモノクロラミン処理を行なうためには、生成装置を設置する必要がある。実際の入浴施設に適用可能なモノクロラミン生成装置を設計、設置、運用して実用性を確認すること、及び浴槽水中のモノクロラミン濃度を自動制御するための測定計器とその運用方法を確立する。

## B. 研究方法

### 1. 概要

静岡県 3 箇所、長崎県 1 箇所の温泉入浴施設にモノクロラミン生成装置を設置して実際にモノクロラミン処理を行い、浴槽水中のモノクロラミン濃度を所定濃度に維持できること、及びレジオネラ属菌の不検出を確認した。

### 2. 試験方法

#### 2-1. モノクロラミン生成装置

モノクロラミンの生成量として 1 時間に最大 100g の生成装置を設計して、機器類を組み立て、現地に設置した。

#### 2-2. 全塩素濃度測定計器による浴槽水のモノクロラミン濃度測定と制御

全塩素濃度測定計器を現地に設置し、ろ過器出口配管から浴槽水を電極セルに毎分 1L 通水して全塩素濃度を測定した。制御値を 3~4mg/L に設定してモノクロラミン発生装置の運転を制御した。

## C. 結果と考察

### 1. モノクロラミン生成装置の設計と設置、運用

モノクロラミン生成装置の設計基準

を表 1 に、最終型の機器の品名・仕様と価格を表 2 に示す。

モノクロラミン生成装置のフローを図 1 に示す。水道水を、ボールタップ付きの 50L タンクに貯め、水道水用のポンプを用いて混合用配管に通水する。そこに 12% 次亜塩素酸ナトリウム液を添加する。次亜塩素酸ナトリウム液は、配管中のスタティックミクサにより混合希釈される。混合希釈された次亜塩素酸ナトリウム液に対して、20% 塩化アンモニウム液を添加してモノクロラミンを生成させる。生成するモノクロラミン液の pH は約 8、濃度は 800~1400mg/L 程度である。モノクロラミンの生成濃度と量は、各ポンプの吐出量を変更することで調整出来る。

モノクロラミン液の注入点は、循環式の場合は、ろ過器の入口配管である。

本発生装置のイニシャルコストは、810,285 円(工事費含まず)である。

### 2. 全塩素濃度測定計器によるモノクロラミン濃度の測定と制御

塩素濃度測定計器 (CL-310W-IA 型) の表示部(標準 2mg/L までの表示)を 10mg/L に改造したものをを用いた。

サンプル水は浴槽水をろ過器出口配管から 1L/分に取り出し電極セルに導入、通水後は排水した。設定値を 3.5mg/L とした時の全塩素濃度の測定結果例を図 2 に示す。設定値の 90% (3.15mg/L) で発生装置 ON となり、設定値の 110% (3.85mg/L) で OFF となるが、ろ過器タンクに添加されたモノクロラミンがろ過器出口配管に遅れて出てくるため最大 5.5mg/L 程度となる。この時浴槽水の全塩素濃度は 3.1mg/L 程度である。

全塩素濃度測定計器のコストは、イワキ CL-310W-IA インライン型(濃度範囲 0~5mg/L) の場合 535,500 円(工事費