

平成 30 年度厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究
研究代表者 前川 純子（国立感染症研究所 細菌第一部）

分担研究報告書

モノクロラミン消毒の薬湯への応用、並びに雑菌への対応

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	藤井 明	(株)ヘルスケミカル
研究協力者	松田 宗大	(株)ヘルスケミカル
研究協力者	松田 尚子	(株)ヘルスビューティー
研究協力者	枝川亜希子	(地独)大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	吉田 光範	国立感染症研究所 ハンセン病研究センター
研究協力者	星野 仁彦	国立感染症研究所 ハンセン病研究センター

研究要旨

公衆浴場等の入浴施設では、生薬や無機塩などの薬湯が使用されているが、レジオネラ属菌の増殖を招くことがある。ところが次亜塩素酸ナトリウムのいわゆる遊離塩素は激しく消費され、薬湯の種類によっては色が退色し、濃度管理は困難である。モノクロラミン消毒を用いることで、これら問題の解消と、レジオネラ抑制の両立が実現できた。一方、薬湯使用の有無にかかわらず、モノクロラミン消毒の長期継続により従属栄養細菌数の増加が確認されたため、その推移と菌種、並びに制御方法を検討した。モノクロラミン消毒下では、レジオネラが培養不検出であっても、LAMP 法が高率に陽性となったことから、消毒が LAMP 法の結果に及ぼす影響も確認した。

A. 研究目的

レジオネラ症の報告数は年々増加しており、2018 年の速報値では 2,000 件を超えている。レジオネラ症の主な感染源は公衆浴場等の浴槽水とされ、次亜塩素酸ナトリウム(塩素)による浴槽水の消毒が指導されているが、鉄、マンガン、アンモニア態窒素が存在している場合や、薬湯では消毒効果が減弱することから、その対策が必要となっている。

薬湯は、有機物や無機物の薬剤を浴槽水に溶解、懸濁して使用するが、遊離塩素消毒と両立せず、レジオネラが問題となることがある。言い換えると、薬湯に次亜塩素酸ナトリウムのいわゆ

る遊離塩素消毒を加えると、塩素は激しく消費され、薬湯は退色し、両者の濃度管理は著しく困難になり、レジオネラの増殖を来すことがある。そこで本研究では、薬湯に対して結合塩素の一種であるモノクロラミン消毒の適用を試みた。モノクロラミンは、温泉等の鉄、マンガン、アンモニア態窒素の存在下においても消毒効果が得られ、浴槽水中の安定性が高く消費量が少ないことから、従来の遊離塩素消毒に代わる方法として期待されている¹⁻²⁾。

一方、薬湯使用の有無に関係なく、モノクロラミン消毒の長期継続により従属栄養細菌数が増加することがあった³⁻⁴⁾。本研究におい

ても従属栄養細菌数の増加を見たことから、その推移と菌種、並びに制御方法を検討した。雑菌に病原性はなくても、バイオフィルムの発生はレジオネラ属菌等の病原性細菌の増殖を招く恐れがあることから、菌数は少ないほうが好ましい。これに関連して、レジオネラ属菌を標的とした LAMP 法が陽性になることがあり、バイオフィルム中での増殖が懸念された。レジオネラ属菌を的確に検出できているのか、LAMP 法に及ぼす消毒の影響について併せて検討することとした。

B. 研究方法

B1 モノクロラミン消毒の薬湯への応用

神奈川県内に所在の一営業施設の協力を得て、実際の浴槽水を用いて検討を行った。すなわち、薬湯の実施、モノクロラミン消毒と各種塩素濃度の測定、レジオネラ属菌と従属栄養細菌数の検査を行った。

施設の循環式浴槽は複数系統あるが、試験を行ったのは、露天ひのき風呂系統のみとし、他は従来の遊離塩素消毒で管理した。井戸水を張った露天ひのき風呂において、生薬又は無機塩の薬湯を使用した(図 1)。消毒には、モノクロラミン(いわゆる結合塩素消毒)又は次亜塩素酸ナトリウム(いわゆる遊離塩素消毒)を用いた。モノクロラミン生成装置を設置し、タイマー式の制御で管理した。具体的には、モノクロラミンは次亜塩素酸ナトリウムとアンモニウム塩溶液を用いて用時調製し、ろ過器手前に注入し、総残留塩素濃度 3mg/L 以上で管理した。次亜塩素酸ナトリウムは遊離残留塩素濃度 0.4mg/L 以上で管理した。薬湯の遊離塩素消毒では、退色が進むのに合わせて薬湯を追加投入した。浴槽水の湯色は目視又は吸光光度法により評価し、湯の香りは官能評価した。

採水直後に pH(ガラス電極式 pH メーター、堀場)、遊離残留塩素と全残留塩素(DPD 法によるポケット残留塩素計、HACH 社)の測定を行った。施設では、浴槽水的全残留塩素を、毎日 2~3 時間おきに測定した。

B2 雑菌への対応

試験期間中は任意のタイミングで採水し、各種微生物試験を行った。水試料はチオ硫酸ナトリウムを添加した滅菌容器に採水、冷蔵にて搬送、保存した。レジオネラ培養検査は、レジオネラ症防止指針に記載のろ過濃縮法⁵⁾に準じて行った。すなわち 100 倍ろ過濃縮液を熱処理または酸処理し、GVPC 寒天培地で 36、7 日間培養した³⁾。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地を用いた混釈培養の 25 ないし 37、2 から 3 週間 で求めた。コロニー形状から優占であった 3 コロニーを釣菌し、常法に従い 16S rDNA 塩基配列を確認した。一般細菌数は標準寒天培地を用いて 37、48 時間培養した。

高濃度のモノクロラミン、あるいは次亜塩素酸ナトリウムを用いて、営業終了後に定期的に消毒を行った。洗浄後は、チオ硫酸ナトリウムにより中和し、排水した。浴槽水はセラミックろ材ろ過の循環式で管理されていたが、週 2 回完全換水し、ろ過器の逆流洗浄は毎日行われていた。

B3 LAMP 法への消毒の影響

LAMP 法への消毒の影響は、循環式浴槽において新しい湯を張り、無消毒下で循環約 2 時間後の浴槽水を試験水として用いた。この試験水に総塩素 3.5mg/L 前後となるよう調製したモノクロラミン溶液又は遊離塩素 0.5mg/L 前後となるよう調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加した。各消毒剤添加後は約 25 に置き、1、3、5 及び 24 時間後に塩素濃度測定後、塩素を中和した試験水につき、レジオネラ属菌培養検査及び LAMP 法を行った。LAMP 法反応は添付文書の条件で実施した(レジオネラ検出試薬キット E、栄研化学)。

Legionella pneumophila (ATCC33152) より抽出した DNA 溶液を、直接に消毒する試験も実施した。DNA の抽出は QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)を用いた。総塩素 4.4mg/L 前後となるよう調製したモノクロラミン溶液又は遊離塩素 0.7mg/L 前後となるよう調製した次亜塩素酸

ナトリウム溶液を、DNA に添加した。各消毒剤添加後は約 25 に置き、15 及び 30 分、1、3、5 及び 24 時間後に採水し、塩素濃度も測定した。塩素を中和した試験水を鋳型として、LAMP 法を行った。

C. 研究結果および考察

C1 モノクロラミン消毒の薬湯への応用

薬湯管理における塩素注入量と塩素濃度の推移、及び薬湯の状況を図 2 及び図 3 に示した。生薬及び無機塩薬湯使用時のいずれにおいても、モノクロラミンは総残留塩素濃度として 3mg/L 以上の維持が可能であり、レジオネラ属菌は検出されなかった。薬湯の退色や香りの変化は認められず、薬湯の追加投入の必要がなかった(表 1)。

一方、次亜塩素酸ナトリウムでは、生薬による塩素の消費が激しく、薬湯の色を保持しながら、遊離残留塩素濃度を 0.4mg/L 以上に安定的に維持することは困難であった。無機塩薬湯使用時も同様で、遊離残留塩素濃度が上昇するに従って薬湯は顕著に退色した(図 4)。適正な塩素濃度と薬湯の維持の両立が極めて困難であった。

C2 雑菌への対応

モノクロラミン消毒を継続しておよそ 3 週目以降に従属栄養細菌数が増加し、 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL の濃度で推移した(図 5、1 月 3 日 ~ 2 月 20 日頃)。R2A 寒天培地より釣菌した優占 3 コロニーのうち、2 株は *Mycobacterium phlei* (1 株の塩基配列が 100% 一致 (466/466bp)、もう 1 株は 99.8% 一致 (465/466))、1 株は *Microbacterium aurum* (99.4% = 466/469) に近縁な *Microbacterium* sp. (100% = 469/469) と同定された。*M. phlei* は、モノクロラミン消毒の浴槽で以前にも報告されており、病原性はないとされているが、バイオフィルムの蓄積は好ましくないと考えられた。

高濃度塩素消毒を行ったが、従属栄養細菌数は一過性に減少しただけであった(図 6)。モノ

クロラミン(総塩素 3~6mg/L)消毒下 10^5 の菌数は、次亜塩素酸ナトリウム(遊離塩素 0.2~0.9mg/L)に切替後は 10^2 に、その後再びモノクロラミンに切替後は 10^4 まで増加した(図 5)。また、モノクロラミン及び次亜塩素酸ナトリウム消毒下いずれの期間においても、*M. phlei* が検出された。週 1 回、60mg/L、1 時間の高濃度塩素消毒実施により、 $10^2 \sim 10^3$ レベルの菌数低下は見られたが、3 日後にはほぼ元の菌数に戻った。60mg/L、7 時間の消毒でも同様の結果であった。持続的な低減のためには、モノクロラミン消毒の場合は、週に 2 回以上が従属栄養細菌数の低減に必要と考えられた。バイオフィルムを徹底して除去することが好ましいと考えられた。

C3 LAMP 法への消毒の影響

レジオネラ検査では、試料水から培養法で 60CFU/100mL を検出し、LAMP 法も陽性であった。ここにモノクロラミン約 3.5mg/L 及び次亜塩素酸ナトリウム約 0.5mg/L を添加して 1 時間後は培養法不検出であった。LAMP 法は、モノクロラミン添加の 24 時間後でも陽性であった。次亜塩素酸ナトリウム添加では、3 時間後以降に不検出であった(表 2)。

DNA にモノクロラミンあるいは次亜塩素酸ナトリウムを直接に添加すると、モノクロラミン約 4.4mg/L では 24 時間後でも LAMP 法陽性であった(表 3)。次亜塩素酸ナトリウム約 0.7mg/L 添加では 15 分後から LAMP 法で不検出となった。すなわち、モノクロラミンは次亜塩素酸ナトリウムと比較して、DNA を分解(あるいは変性)しない結果であった。仮に、浴槽水がモノクロラミン消毒によりレジオネラが培養不検出となっても、LAMP 法陽性が長時間続く場合があると考えられた。一方、次亜塩素酸ナトリウムでは速やかに LAMP 法で不検出となり、消毒が DNA 検出に及ぼす影響は大きく異なっていた。

以上の結果に従えば、モノクロラミン消毒では LAMP 法陽性でも培養法不検出の可能性が高く、遊離塩素消毒の LAMP 法陽性は消毒の不足が示唆されそうである。レジオネラの DNA 検

査の解釈には、使用消毒剤の把握が必要であり、いずれの陽性にしても、浴槽やろ過器に汚染とバイオフィルムの存在が示唆されることから、消毒・洗浄作業が不可欠と考えられた。

D. 結論

生薬及び無機塩薬湯の塩素管理には、次亜塩素酸ナトリウムに比べてモノクロラミン消毒が有用であった。すなわち無機塩及び生薬のどちらの薬湯においても、モノクロラミンの濃度維持が可能であり、レジオネラ属菌は検出されなかった。モノクロラミン消毒では薬湯の色や香りに対する影響が少なく、薬湯の使用量が少なく済んだ。モノクロラミン消毒を継続して、*M. phlei* が検出された。高濃度塩素消毒は従属栄養細菌数を一過性に減少させたが、週に2回以上の消毒や、洗浄によるバイオフィルムの徹底除去が必要と考えられた。モノクロラミンは次亜塩素酸ナトリウムと比較して、DNAを分解又は変性しない結果であった。

E. 参考文献

1. 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 懸邦雄, 遠藤卓郎: モノクロラ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, (2010), 109~115
2. 杉山寛治, 長岡宏美, 佐原啓二, 神田隆, 久保田明, 懸邦雄, 小坂浩司, 前川純子, 遠藤卓郎, 倉文明, 八木田健司, 泉山信司: モノクロラミン消毒による掛け流し式温泉のレジオネラ対策, 防菌防黴, 45, (2017), 295~300
3. 長岡宏美, 泉山信司, 八木田健司, 「社会福祉施設の入浴設備におけるモノクロラミン消毒実証試験と浴槽水から分離される従属栄養細菌について」, 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「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究(研究代表者、前川純子)」より、平成28年度分担研究報告書

4. 田中忍, 中西典子, 野本竜平, 有川健太郎, 濱夏樹, 岩本朋忠, 温泉水におけるモノクロラミン消毒効果の検証, 神戸市環境保健研究所報, 第46巻, 39~42頁, 2018
5. レジオネラ症防止指針作成委員会: レジオネラ症防止指針(第3版), pp.28~36, 2009, (財)ビル管理教育センター

F. 研究発表

誌上発表

なし

口頭発表

1. 藤井明, 渡邊貴明, 松田宗大, 松田尚子, 小倉徹, 植園健一, 枝川亜希子, 泉山信司, 薬湯使用時におけるモノクロラミン消毒の有用性評価, 第46回建築物環境衛生管理全国大会, 2019年1月, 東京都
2. 渡邊貴明, 松田宗大, 小倉徹, 植園健一, 松田尚子, 枝川亜希子, 泉山信司, 藤井明, 循環式浴槽においてモノクロラミン消毒下で増殖する従属栄養細菌の同定ならびにその制御法について, 日本防菌防黴学会, 2018年11月, 東京都
3. 小倉徹, 植園健一, 渡邊貴明, 松田宗大, 原口浩幸, 森中りえか, 枝川亜希子, 藤井明, モノクロラミン及び次亜塩素酸ナトリウム消毒下におけるレジオネラ属菌のLAMP法結果に及ぼす影響, 日本防菌防黴学会, 2018年11月, 東京都

知的所有権の取得状況

特許申請, 実用新案登録, その他

なし

a) 浴槽写真



c) 生薬



d) 無機塩



b) 浴槽配管系統図

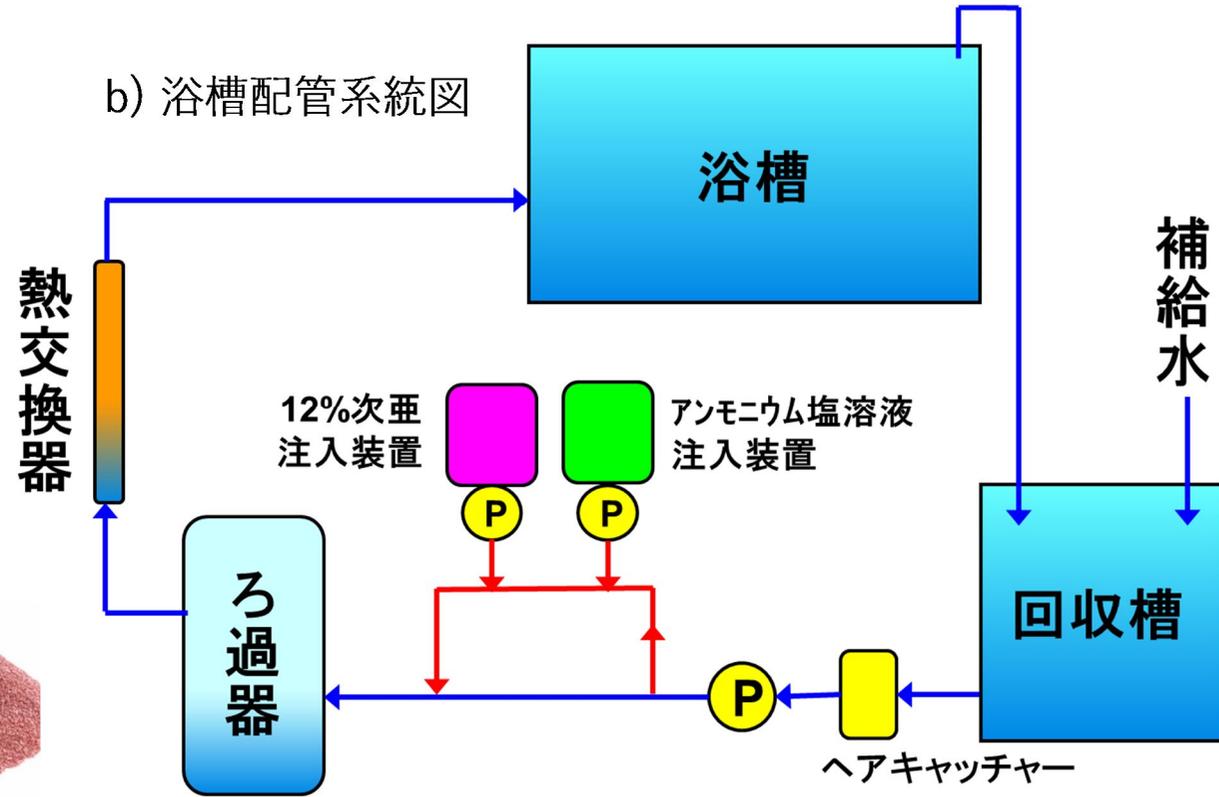


図1 試験施設概要

施設は神奈川県内のいわゆるスーパー銭湯で、入館者数は1日あたり平日で800人、土日祝日は1,700人ほど。

a)浴槽写真、露天のひのき風呂。

b)浴槽配管系統図、総水量は7m³、ろ過器にセラミックろ材を使用。ろ過器の手前にモノクロラミン消毒装置（並びに遊離塩素消毒装置）を設置。現在は推奨されない回収槽を利用しており、レジオネラ属菌により汚染されやすい難がある。

c, d)薬湯に添加する薬剤の写真、生薬あるいは無機塩の薬湯を使用している。

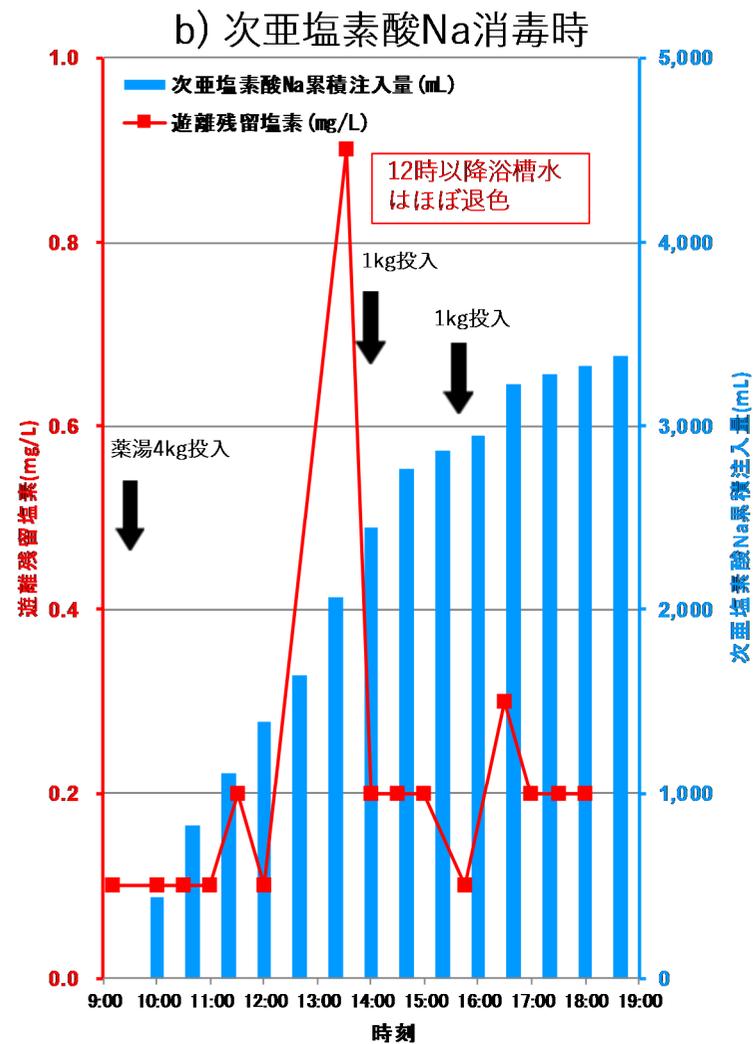
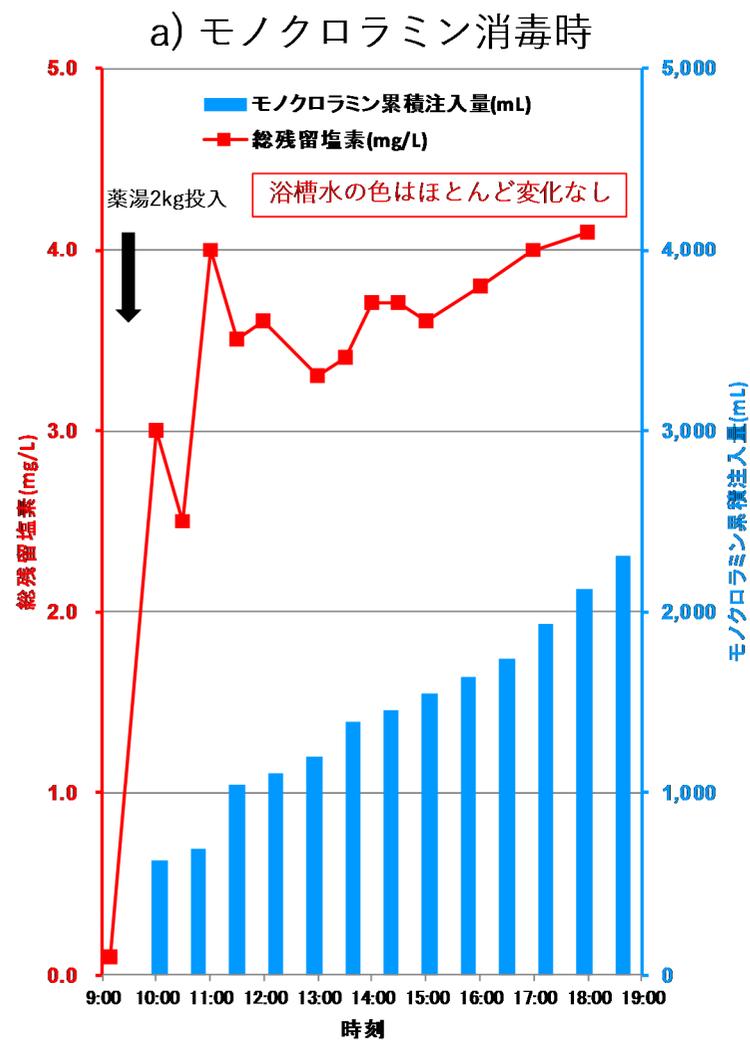


図2 生薬使用の薬湯に対する塩素消毒の推移

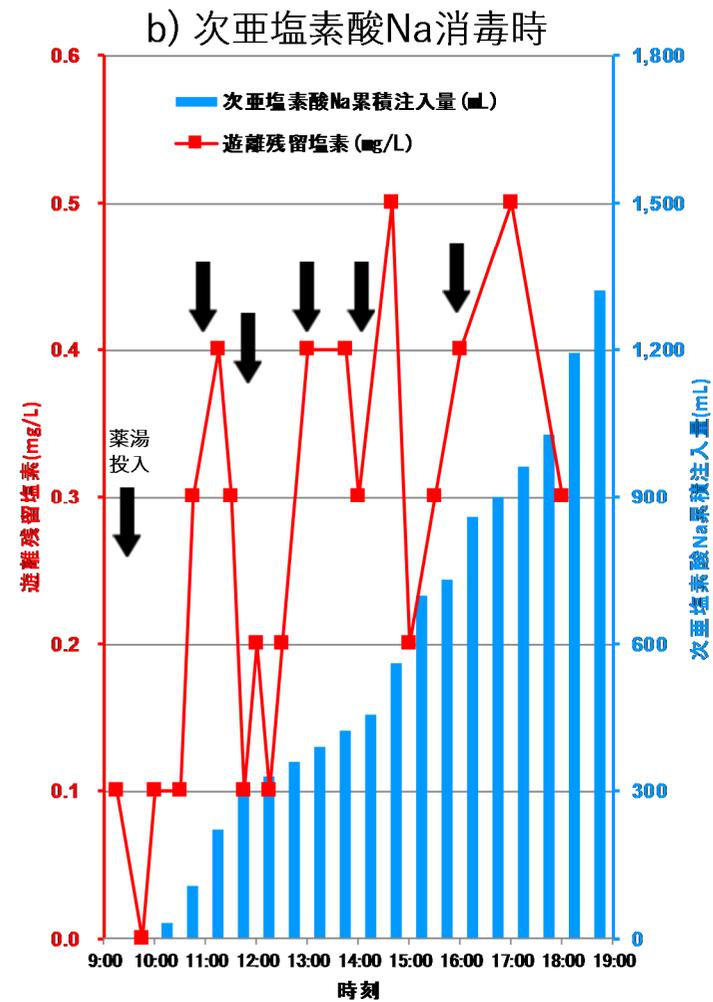
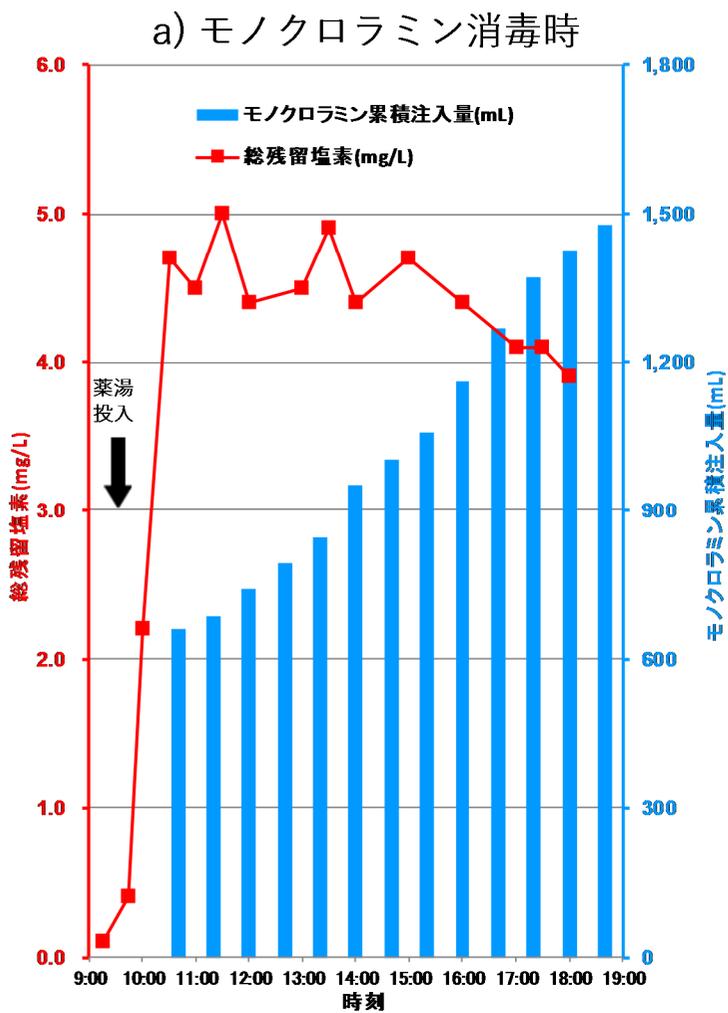
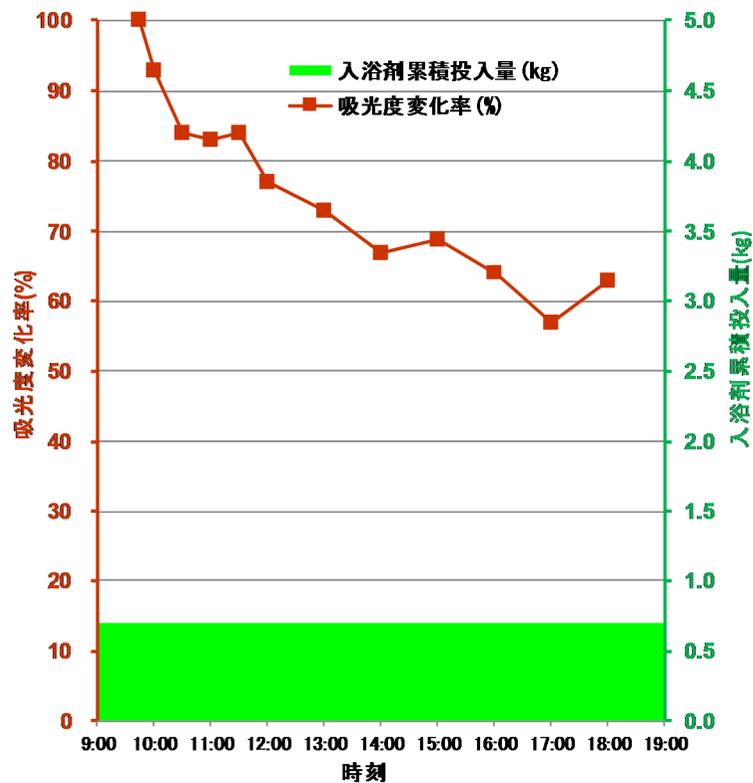


図3 無機塩の薬湯に対する塩素消毒の推移

a) モノクロラミン消毒時



b) 次亜塩素酸Na消毒時

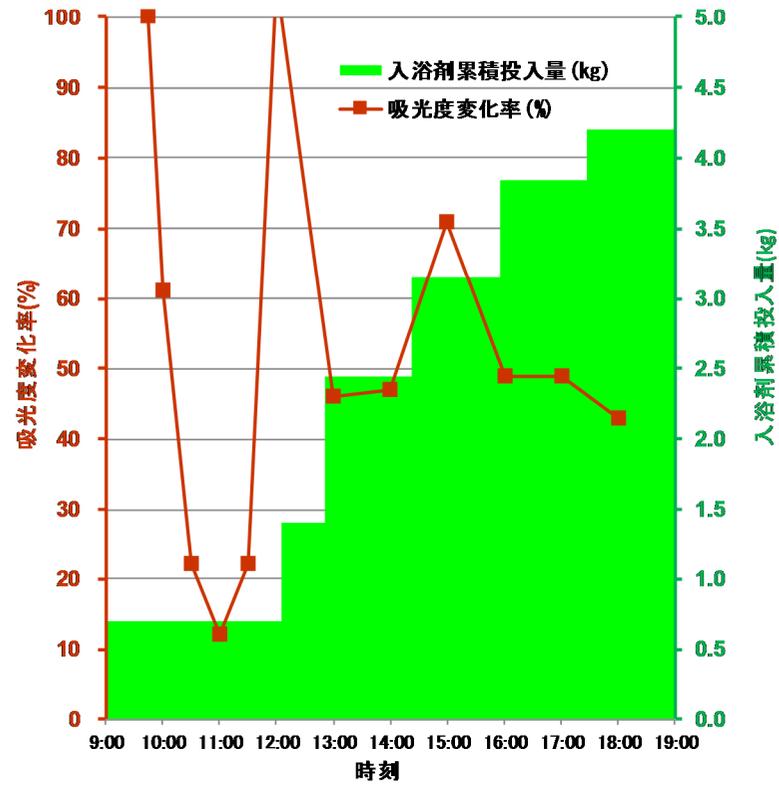


図4 無機塩の薬湯の色調の変化

表1 薬湯に対するモノクロラミン消毒と次亜塩素酸ナトリウム消毒の比較

項 目	生薬薬湯		無機塩薬湯	
	モノクロラミン	次亜塩素酸Na	モノクロラミン	次亜塩素酸Na
残留塩素の保持性	◎	×(消費が激しい)	◎	×(消費が多い)
レジオネラ属菌不検出	◎	○(適正濃度維持が条件)	◎	○(適正濃度維持が条件)
浸出色の維持	◎	×(退色)	◎	×(退色・色調変化)
入浴剤使用量	◎(少ない)	×(多い)	◎(少ない)	×(多い)
においの保持性	◎	×(塩素臭に変化)	◎	○

◎：極めて良好、○：良好、△：やや不良、×：不良

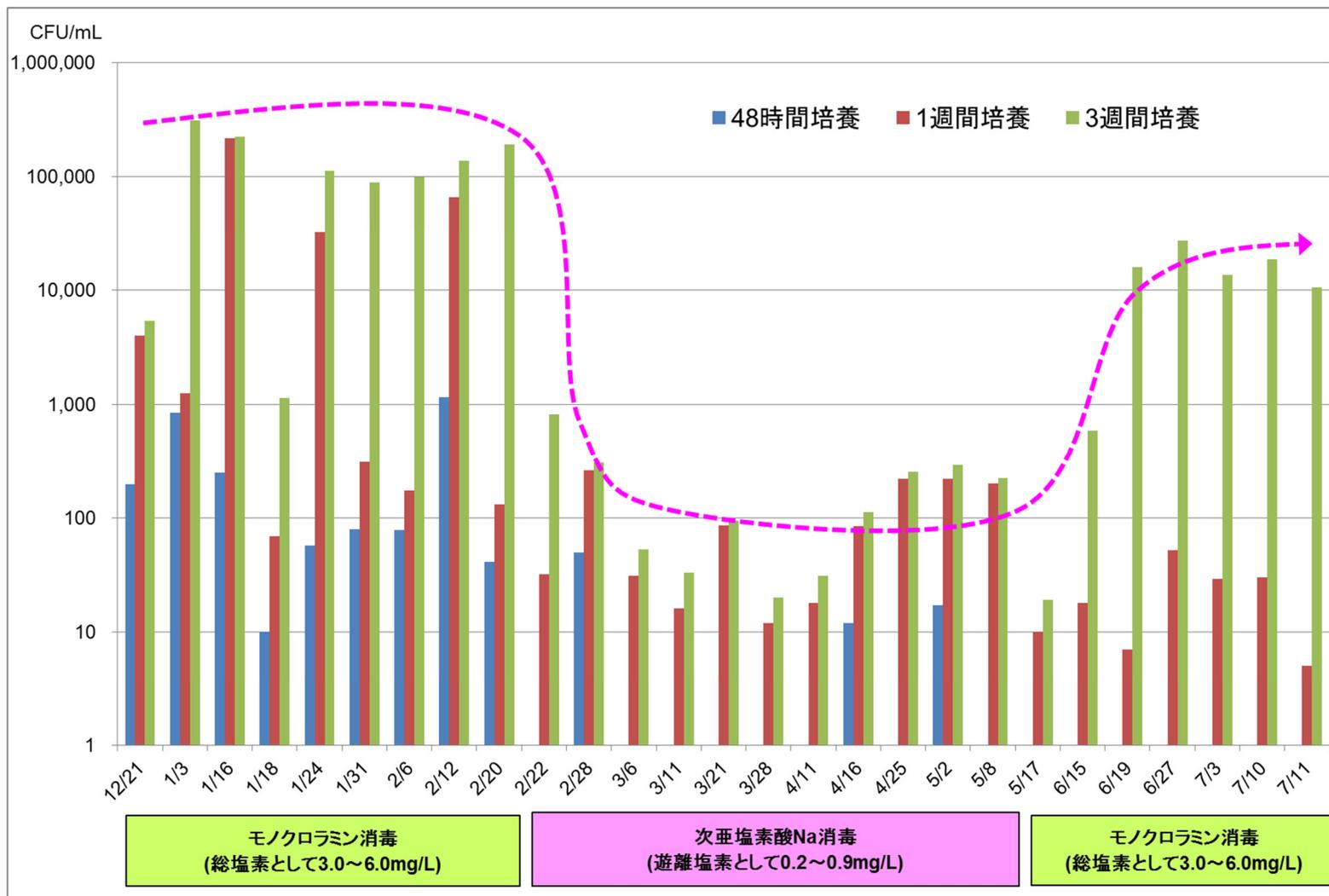


図5 モノクロラミン消毒時の従属栄養細菌数の推移

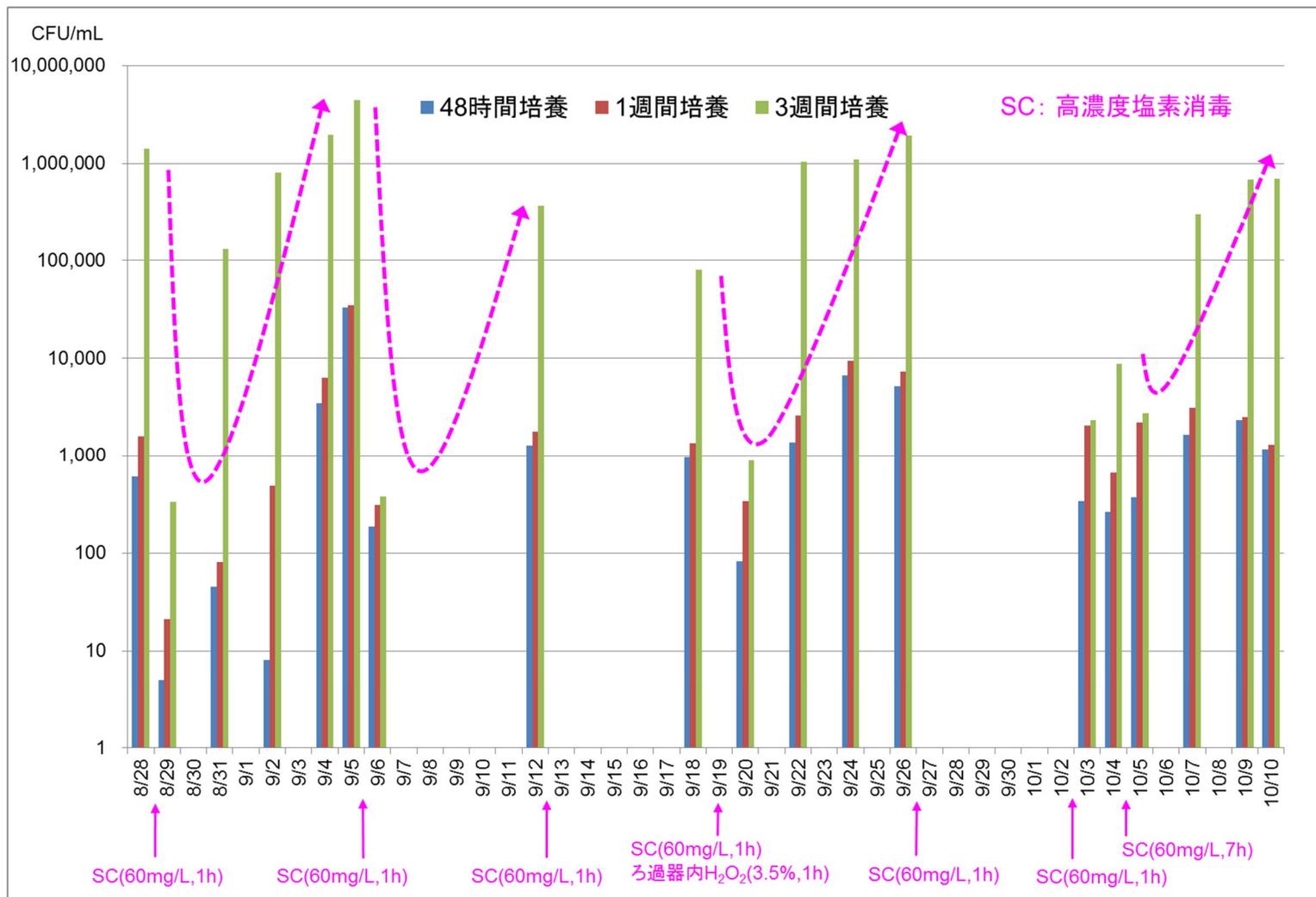


図6 高濃度塩素消毒後の従属栄養細菌数の推移

表 2 浴槽水中のレジオネラ属菌の消毒と LAMP 法検出の関係

消毒剤	測定項目	消毒剤添加後、経過時間				
		0h	1h	3h	5h	24h
無添加	培養菌数(CFU/100mL)	60	-	-	-	不検出
	LAMP (Tt 値:min)	21.1	-	-	-	19.9
	遊離塩素濃度(mg/L)	0	-	-	-	0
モノクロラミン	培養菌数(CFU/100mL)	-	不検出	不検出	不検出	不検出
	LAMP (Tt 値:min)	-	18.5	19.5	21.4	23
	総塩素濃度(mg/L)	3.5	3.6	3.5	3.5	3.5
次亜塩素酸 Na	培養菌数(CFU/100mL)	-	不検出	不検出	不検出	不検出
	LAMP (Tt 値:min)	-	19.1	不検出	不検出	不検出
	遊離塩素濃度(mg/L)	0.6	0.5	0.5	0.4	0.3

- :未実施

表 3 精製水中の DNA の消毒と LAMP 法検出の関係

消毒剤	測定項目	消毒剤添加後、経過時間						
		0min	15min	30min	1h	3h	5h	24h
モノクロラミン	LAMP(Tt 値:min)	21	21.1	41	20.2	23.4	23.9	21.5
	総塩素濃度(mg/L)	0	4.4	4.4	4.4	4.5	4.5	3.6
次亜塩素酸 Na	LAMP(Tt 値:min)	22.4	不検出	不検出	不検出	不検出	-	-
	遊離塩素濃度(mg/L)	0	0.5	0.4	0.5	0.4	-	-

- :未実施