

令和3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)  
公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究

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

有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒

研究分担者	柳本 恵太	山梨県衛生環境研究所 微生物部
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	望月 映希	山梨県衛生環境研究所 生活科学部
研究協力者	大森 雄貴	山梨県衛生環境研究所 生活科学部
研究協力者	山上 隆也	山梨県衛生環境研究所 微生物部
研究協力者	植松 香星	山梨県衛生環境研究所 微生物部
研究協力者	久田 美子	山梨県衛生環境研究所 微生物部
研究協力者	田中 慶郎	株式会社マルマ PC 営業部
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	茶山 忠久	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部
研究協力者	市村 祐二	ケイ・アイ化成株式会社 機能性薬品部

研究要旨

全有機体炭素 (TOC : Total Organic Carbon)の濃度が高い温泉水では、有機物との酸化反応により遊離塩素が消費され、その濃度が低下する。モノクロラミンはこのような泉質でも濃度の低下が少ないと期待され、稼働中の公衆浴場での有効性について検討した。有機物を含む温泉施設の協力を得て、モノクロラミン消毒の効果、濃度の安定性、菌叢の変化について調査した。対象施設は、TOCが9.2 mg/Lとアンモニア態窒素を多く含んだ温泉水を、週に3回換水しながら、循環利用していた。モノクロラミン導入前後の4週間に、週に1回採水した。浴槽水のモノクロラミン濃度は3 mg/L以上とし、週に1回20 mg/L、一晩の高濃度モノクロラミンによる配管消毒を行った。消毒の状況としては、モノクロラミン消毒導入前から結合塩素が確認されており、レジオネラ、自由生活アメーバ、大腸菌群は陰性であった。導入前後を比較すると、導入前定量値が高かった従属栄養細菌数は減少し、一般細菌数に増減はなく、16S rRNA 遺伝子量は増加した。塩素の使用量は、導入後わずかに減少した。菌叢解析の結果、*Methylomonas* 属菌、*Cloacibacterium* 属菌が優占菌種で、*Mycobacterium phlei* はモノクロラミン消毒時に減少傾向にあった。モノクロラミン消毒は、有機物が含まれている温泉においてもレジオネラの抑制が可能であったが、従属栄養細菌への対策は必要であると考えられた。

## A. 研究目的

公衆浴場におけるレジオネラ症の発生防止のため、次亜塩素酸ナトリウム（遊離塩素）により浴槽水の消毒が行われている。遊離塩素消毒は有効であるが、アンモニア態窒素、鉄、マンガンを含む温泉や、高 pH の泉質の場合、効果の減弱が知られている。全有機体炭素 (Total Organic Carbon、以下 TOC) が高い、有機物の多い温泉においても、遊離塩素の濃度が低下する。

一方、遊離塩素とアンモニア態窒素の反応により生成される、結合塩素のモノクロラミンは、前述の条件下でも、レジオネラ属菌に対する有効性が確認されている<sup>1)</sup>。有機物を含む温泉では遊離塩素消毒が困難となるが、モノクロラミンであれば消費量が少なく、濃度の維持が容易な可能性がある<sup>2)</sup>。このことは、試験管の中で確認されているものの、温泉施設での実証や事例の蓄積はこれからであった。

そこで、有機物を多く含む温泉を利用した公衆浴場において、モノクロラミン消毒の実証試験を計画した。具体的には消毒効果、濃度の安定性、菌叢に与える変化について調査した。

## B. 研究方法

### (1) 対象施設

対象施設は TOC が 9.2 mg/L、腐植質 0.2 mg/L、アンモニア態窒素 2.0 mg/L を含む、pH7.9 の源泉水を利用していた (表 1)。入浴者数は 1 日に 200~400 名程度で、浴槽水の循環系統を有しており、1 週間に 3 回換水していた。対象浴槽は約 22 m<sup>3</sup> の内湯で、モノクロラミン導入前後 4 週間の計 8 週間で試験期間とした (図 1)。

### (2) モノクロラミンの濃度管理

モノクロラミン生成装置 (クロラクター、ケイ・アイ化成) を設置し、遊離塩素製剤 (ケイミックス SP、ケイ・アイ化成) とアンモニウム製剤 (レジサイド、ケイ・アイ化成) からモノクロラミン溶液を用時調製し、2 台のクロラクターを用いて施設内全ての循環系統および貯湯槽に添加した。浴槽水のモノクロラミン濃度として、概ね 3~5 mg/L の範囲となるように一定の注入量を設定した。試験期間中のモノクロラミン濃度の測定は、全残留塩素 (全塩素) の測定で代替した。全塩素濃度が上記範囲に満たない場合は、手動操作によって追添加することで濃度管理を行った。

週 1 回の営業終了後に、循環配管を高濃度モノクロラミンで消毒した (図 1)。具体的には、モノクロラミン濃度を 20 mg/L 程度に上昇させ、翌朝まで約 9 時間の循環を行い、配管を消毒した。消毒後、浴槽水は全て排水し、浴槽を洗浄した。

源泉水における遊離塩素およびモノクロラミンの消費量を、事前に試験管内で比較した。また、モノクロラミン消毒導入前後における施設全体の薬剤使用量について、遊離塩素の使用量を比較した。

### (3) 各種測定

各種微生物試験は、定法に従い実施した。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し、ふきとり検体はヘアキャッチャー付近の配管から採取した。細菌培養用は冷蔵、アメーバ培養用の試料は常温にて、搬送・保存した。採水は週に 1 回、浴槽水に汚れが蓄積した、最終換水日から最も日数の経過した日の営業開始前に実施した。レジオネラ属菌は、0.20 μm メンブレンフィルター

(ADVANTEC)でろ過濃縮した 100 倍濃縮液を、ふきとり検体は懸濁した原液を、それぞれ熱処理または酸処理し、GVPC 寒天培地を用いて 35°C で 7 日間培養した。大腸菌群は浴槽水 100 mL を EC ブルー 100P「ニッスイ」、一般細菌数は標準寒天培地を用いて、35°C で 24 時間培養した。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地を用いた混釈培養の 42°C の 14 日間で求めた。モノクロラミン消毒導入前後の一般細菌数および従属栄養細菌数の比較については、t-検定の危険率 5%未満を有意差ありと判定した (Microsoft Excel 2016)。自由生活アメーバは、浴槽水、および 1,000×g の 5 分間で 50 倍に遠心濃縮した濃縮試料から、各 1mL を大腸菌塗布無栄養寒天培地を用いて 42°C で 14 日間培養した。

採水時に pH および遊離塩素、全塩素、モノクロラミン濃度を測定した。pH はガラス電極式 pH メーター (堀場)、遊離塩素と全塩素は DPD 法によるポケット残留塩素計 (HACH)、モノクロラミンはインドフェノール法によるポケットモノクロラミン・アンモニア計 (HACH) により測定した。

浴槽水中の 16S rRNA 遺伝子の定量、同遺伝子の V3/V4 領域を対象としたアンプリコンシーケンスによる菌叢解析、および菌叢の変化を比較する群間比較解析を行った (生物技研、神奈川県相模原市)。DNA 試料は、浴槽水 1L をろ過したフィルターから、腐植質を除去する目的で、DNeasy PowerSoil Pro kit (QIAGEN) を用いて抽出した。モノクロラミン消毒導入前後の 16S rRNA 遺伝子の定量値の比較は、前述の比較と同じ、t-検定の危険率 5%未満を有意差ありと判定した。

### C. 研究結果および考察

入浴客の増加によって源泉水から循環系統への補給が多くなった際に、浴槽水中の全塩素濃度は目標より低くなる傾向であったが、概ね安定的に推移していた (図 2)。濃度が下がっても手動操作を行い、追添加により、濃度は速やかに回復した。試験期間後半に、薬剤不足が発生した。これにより 2 日間にわたって全塩素が消失したが、このようなトラブルがなければ、多量な有機物を含む温泉においても、モノクロラミン消毒による管理は可能と考えられた。

モノクロラミン消毒導入の前後を通じて、レジオネラ属菌、自由生活アメーバ、大腸菌群はいずれも陰性であった (表 2)。

モノクロラミン消毒導入前の施設は、遊離塩素消毒が想定されていたが、源泉水に多量のアンモニア態窒素が含まれ、意図せずモノクロラミンが生じていると考えられた。実際、3 mg/L 前後の全塩素濃度が確認されており、仮に遊離塩素消毒を行うには、相当量の塩素添加を要したことが明らかであった。すなわち、モノクロラミン消毒を意図して導入する前から、モノクロラミンが主の結合塩素消毒が行われていたと考えられた。従って当該施設における遊離塩素消毒とモノクロラミン消毒の比較は困難であった。繰り返しになるが、有機物を含む温泉においてもモノクロラミン消毒によってレジオネラ属菌に対する安定的な消毒効果が得られ、良好な衛生状態を維持することが可能と考えられた。

浴槽水中の一般細菌数、従属栄養細菌数、16S rRNA 遺伝子の定量値について、結果を図 3 に示す。一般細菌数はモノクロラミン消毒導入後も 300 CFU/mL 前後であり、導入前と比較し定量値に大きな変化は確認さ

れなかった。一方、従属栄養細菌数は導入前よりも有意に減少し、16S rRNA 遺伝子のコピー数は導入後有意に増加した。

モノクロラミン消毒導入前後の大きな相違点として、導入前は高濃度遊離塩素、導入後は高濃度モノクロラミンによる配管消毒を実施したことが挙げられる。また、モノクロラミン消毒により増加する従属栄養細菌は *Mycobacterium phlei* が代表的であるが、同菌は試験管内の試験により、20 mg/L のモノクロラミン消毒の有効性が確認されている<sup>3)</sup>。これらのことから、今回の試験では高濃度モノクロラミンによる配管消毒により従属栄養細菌数が減少した可能性が考えられた。一方で、16S rRNA 遺伝子の定量値が増加したことは一見矛盾している。理由として考えられるのは2つあり、今回の培養条件で検出できない菌種が増加した可能性が1つ目である。2つ目は遊離塩素よりもモノクロラミンの方が浴槽水中の DNA を分解する能力が低く<sup>4)</sup>、残存した死菌由来の DNA が多く見えた可能性である。モノクロラミン導入以前は、浴槽水に次亜塩素酸ナトリウムが直接に添加されることで、DNA の直接的な不活化が生じていた可能性があり、どちらかといえば、後者である可能性が示唆された。

源泉水に対し、試験管内で行った遊離塩素およびモノクロラミンの消費量の比較では、後者のモノクロラミンの消費量が 1.25 mg/L 相当少なかった(図 4)。実際に、モノクロラミン消毒導入前後の薬剤使用量を比較すると、導入後は同等か、わずかに減少していた(図 5)。すなわち、モノクロラミン消毒の導入により、塩素の消費が増えることはなかった。

菌叢解析の結果、モノクロラミン消毒導入前、導入後ともに *Methylomonas* 属菌と

*Cloacibacterium normanense* が優占種であり、全体の 80~90%を占めていた(図 6)。*Methylomonas* 属菌は地下水<sup>5)</sup>から、*C. normanense* は下水<sup>6)</sup>から分離されたことがあり、水環境中に広く存在する細菌であると考えられる。消毒下に関わらず細菌が多く存在することは、バイオフィルムの増大とレジオネラ発生が心配されることから、こうした細菌への対応を検討することが重要になるかもしれない。モノクロラミン消毒下の増殖が疑われていた *M. phlei* については、モノクロラミン消毒導入後、経時的に減少傾向であった。この結果は、従属栄養細菌数の減少と関連していると考えられる。これらのことから考察すると、今回の施設で行っていた 20 mg/L、9 時間程度の高濃度モノクロラミンによる配管消毒は、*M. phlei* に対して有効な消毒方法と示唆された。ただし、従属栄養細菌数は多かったことから、減少させるよう、高濃度モノクロラミン消毒以外に、さらなるろ過器の洗浄等が必要と考えられた。

モノクロラミン消毒導入前後における菌叢の変化を比較するため、群間比較解析により系統ごとの増減を解析した。その結果、導入後に 14 系統が有意に減少し、75 系統が有意に増加した(図 7)。いずれも全体に占める割合は最大の系統でも 1~2%程度であり、菌叢に与える影響は限定的であると考えられた。増加した系統が多いことは、16S rRNA 遺伝子の定量値が増加したことから整合性があったかもしれない。繰り返しになるが、死菌 DNA の残存が原因であると考えられた。

#### D. 結論

有機物を多く含む温泉を利用した公衆浴

場において、モノクロラミン消毒を導入した。レジオネラ属菌は安定的に抑制されていた。高濃度モノクロラミンを用いた配管消毒により、*M. phlei* を含んだ従属栄養細菌数も抑えることができたと考えられた。ただし、高い従属栄養細菌数に対しては、追加の対策が必要と考えられた。薬剤使用量については、同等かわずかに減少する程度であり、大きく増えることはなかった。本試験における浴槽水中の優占種は、菌叢解析の結果、*Methylomonas* 属菌と *C. normanense* であった。

#### E. 参考文献

1. 杉山寛治:環境水からのレジオネラ・宿主アメーバ検出とその制御<sup>10)</sup> 浴槽のレジオネラ対策③ モノクロラミンによる消毒方法について, 防菌防黴, 47, (2019), 159~166
2. 柳本恵太, 高村知成, 植松香星:山梨県内のレジオネラ属菌の消毒が困難な浴用水におけるモノクロラミンの消毒効果, 山梨衛環研年報, 59, (2015), 55~57
3. 長岡宏美, 泉山信司, 八木田健司, 杉山寛治, 小坂浩司, 壁谷美加, 土屋祐司, 市村祐二, 青木信和: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(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 平成 28 年度分担研究報告書
4. 泉山信司, 藤井明, 松田宗大, 松田尚子, 枝川亜希子, 吉田光範, 星野仁彦:

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, 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 平成 30 年度分担研究報告書

5. 江口正浩, 明賀春樹, 佐々木正一, 三宅西作, 藤田正憲:汚染サイトから分離された *Methylomonas* sp. KSWⅢ株によるトリクロロエチレンの分解特性, 環境技術, 30, (2001), 65~72
6. Allen TD, Lawson PA, Collins MD, Falsen E, Tanner RS : *Cloacibacterium normanense* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium in the family *Flavobacteriaceae* isolated from municipal wastewater, Int J Syst Evol Microbiol., 56, (2006), 1311~1316

#### F. 研究発表

誌上発表

1. 柳本恵太, 堀内雅人, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司:山梨県のアルカリ性 (pH10程度) 温泉におけるモノクロラミン消毒の有効性の検討, 日本防菌防黴学会誌, 49, (2021), 261-267,

口頭発表

なし

#### G. 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

表 1. 源泉水の分析値

項目	分析値	項目	分析値
全塩素	<0.1 mg/L	Cl <sup>-</sup>	412.3 mg/L
pH	7.9	Br <sup>-</sup>	0.9 mg/L
ORP	+87 mV	I <sup>-</sup>	不検出
一般細菌数	不検出	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	不検出
TOC	9.2 mg/L	硫黄*	<0.1 mg/L
腐植質	0.2 mg/L	マンガンイオン	<0.1 mg/L
アンモニア態窒素	2.0 mg/L	総鉄イオン (鉄(II)イオン)	0.7 mg/L (<0.1 mg/L)

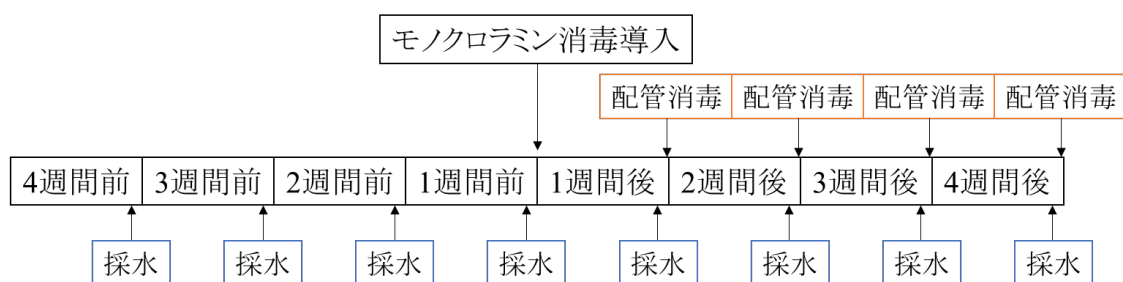


図 1. 試験期間中の採水・高濃度モノクロラミン配管消毒状況

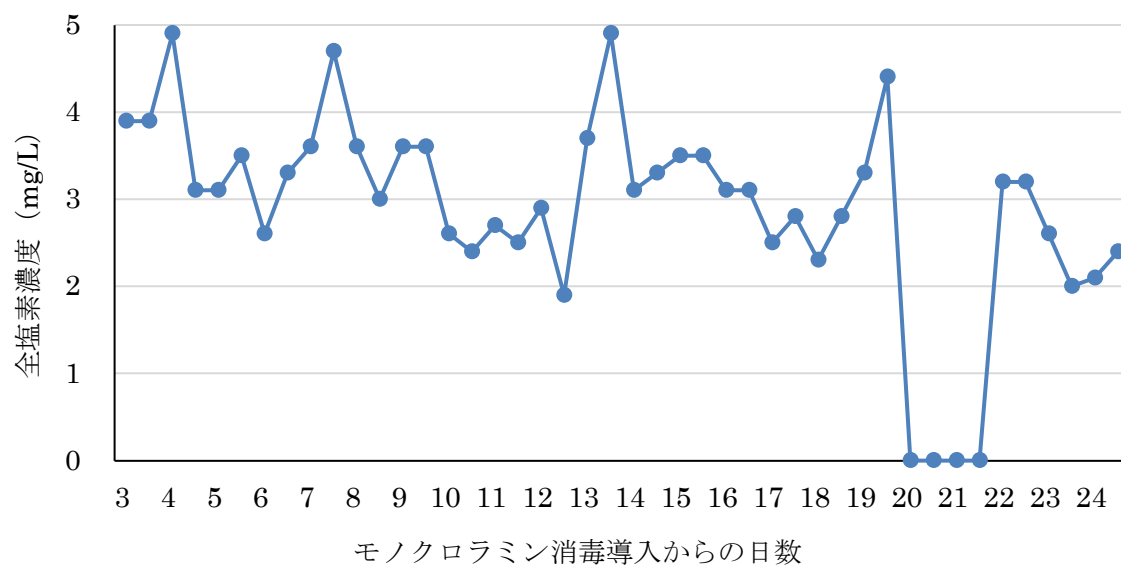


図2. モノクロラミン消毒導入後における浴槽水の全塩素濃度

表 2. 浴槽水の微生物試験結果

検査項目	レジオネラ属菌数 (CFU/100 mL)	レジオネラ属菌 (ヘアキャッチャー配管ふきとり)	アメーバ数 ( / 50 mL)	大腸菌群 ( / 100 mL)	pH	遊離残留塩素 (mg/L)	全残留塩素 (mg/L)	モノクロラミン (mg/L)
導入 4 週間前	<10	—	0	陰性	8.1	0.1	2.9	—
導入 3 週間前	<10	陰性	0	陰性	8.1	0.2	2.1	—
導入 2 週間前	<10	陰性	0	陰性	8.2	0.3	3.2	3.5
導入 1 週間前	<10	陰性	0	陰性	8.1	0.3	3.2	—
導入 1 週間後	<10	陰性	0	陰性	8.2	0.1	3.3	3.8
導入 2 週間後	<10	陰性	0	陰性	8.2	0.1	2.9	3.1
導入 3 週間後	<10	陰性	0	陰性	8.2	0.1	3.4	3.6
導入 4 週間後	<10	陰性	0	陰性	8.3	0.2	3.2	3.1

—:実施なし



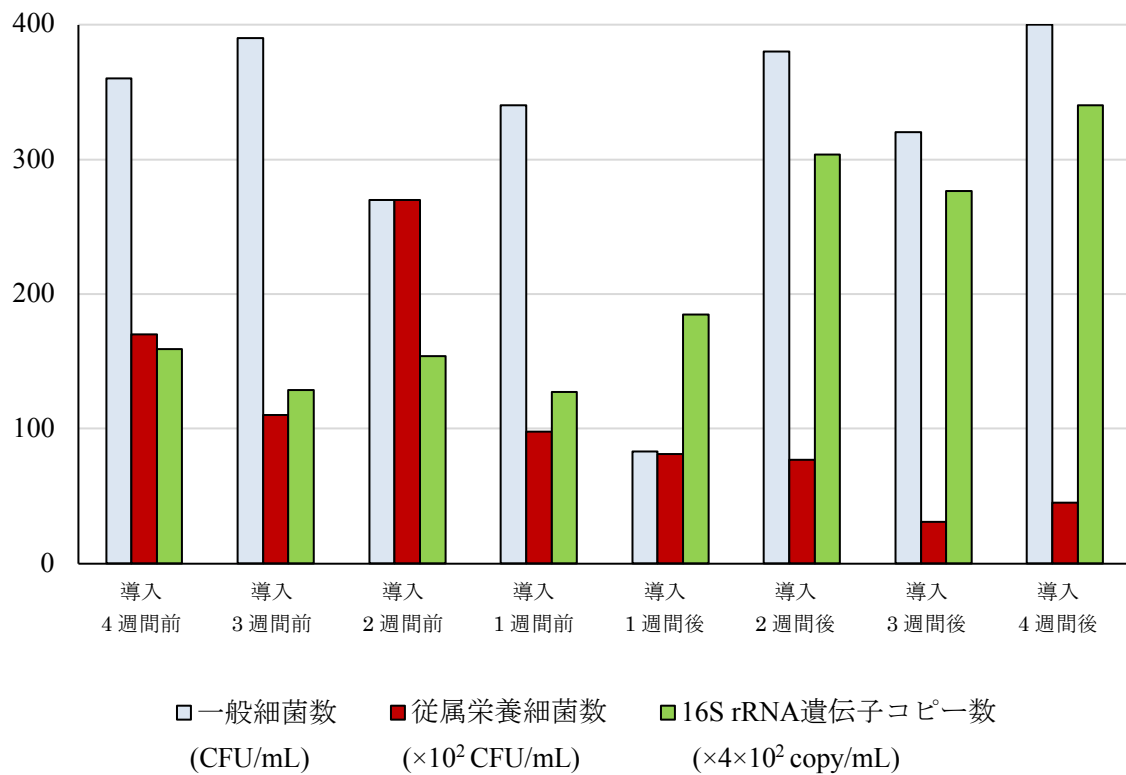


図 3. 浴槽水の一般細菌数、従属栄養細菌数、16S rRNA 遺伝子コピー数の推移

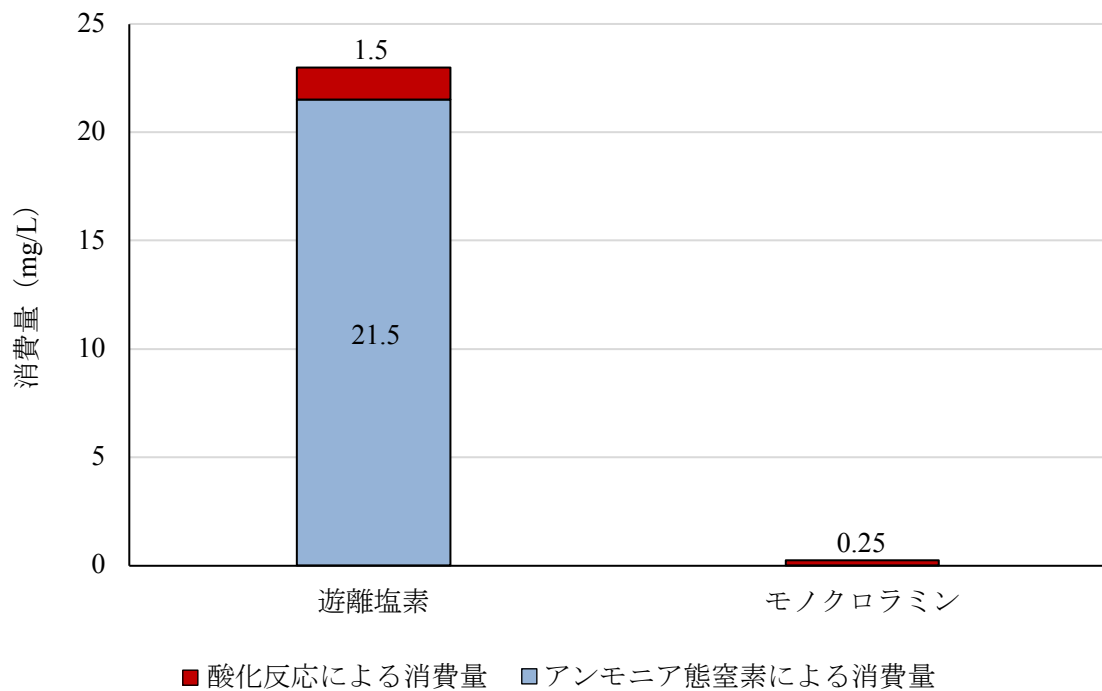


図 4. 源泉水に対する遊離塩素およびモノクロラミンの消費量

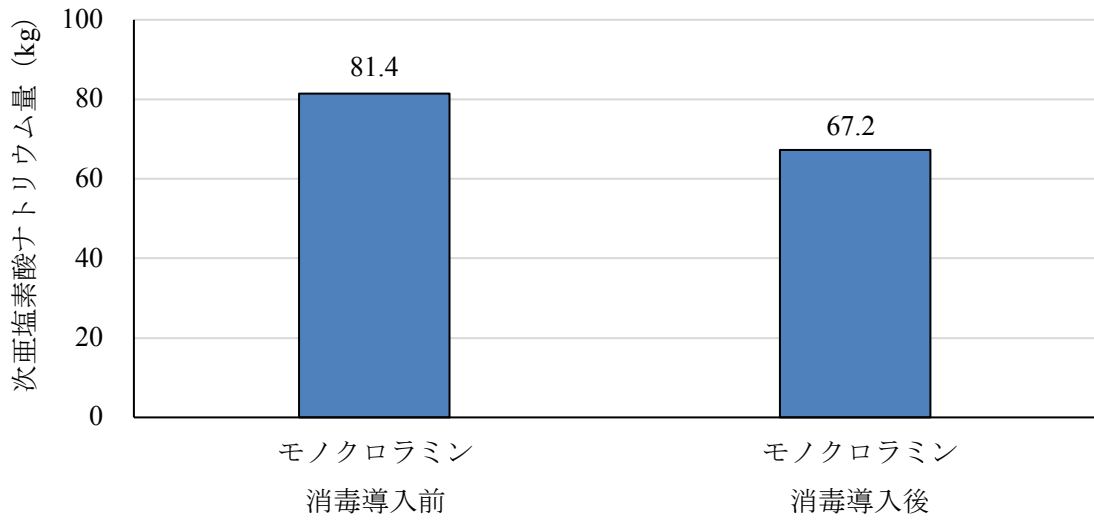


図 5. モノクロラミン消毒導入前後における次亜塩素酸ナトリウムの使用量  
(4 週間、施設全体の使用量)

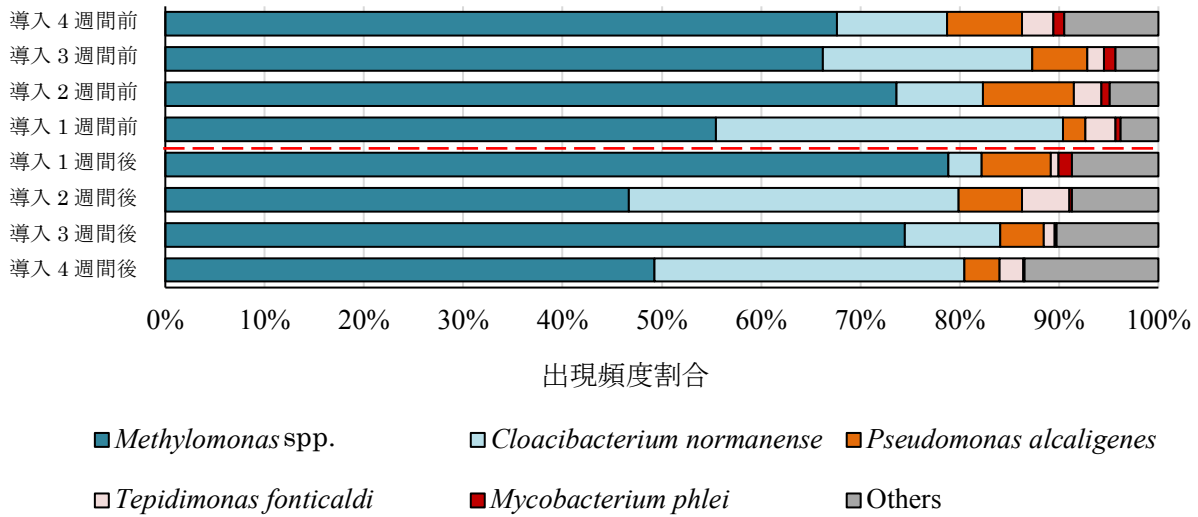


図 6. 菌種別出現頻度割合

■ モノクロラミン消毒導入前 ■ モノクロラミン消毒導入後

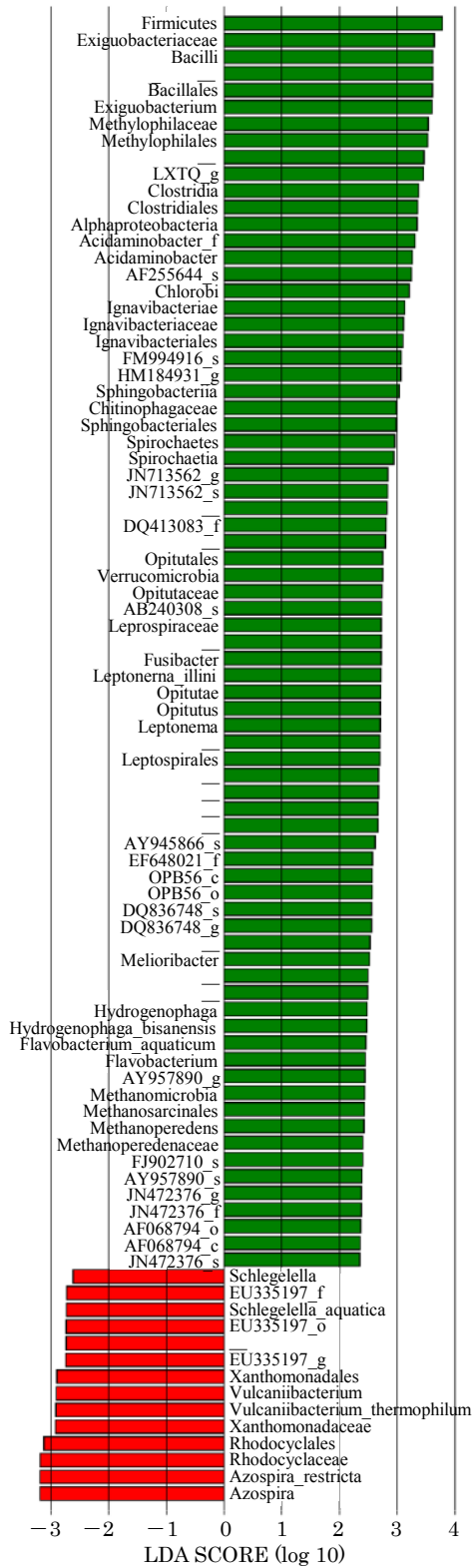


図 7. 群間比較解析結果

系統名末尾 c: Class, o: Order, f: Family, g: Genus, s: Species