

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
モノクロラミンと遊離塩素による
Mycobacterium phlei の試験管内不活化試験

研究分担者	森 康則	三重県保健環境研究所 衛生研究課
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	永井 佑樹	三重県保健環境研究所 微生物研究課
研究協力者	大市真梨乃	三重県保健環境研究所 衛生研究課
研究協力者	佐藤 大輝	三重県保健環境研究所 衛生研究課
研究協力者	小林 章人	三重県保健環境研究所 微生物研究課
研究協力者	枝川亜希子	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	藤井 明	株式会社ヘルスビューティー

研究要旨

アルカリ性の温泉では遊離塩素消毒の効果が低下し、レジオネラ属菌の増殖が抑えきれず問題となることから、代替の方法としてモノクロラミン消毒が提案され、レジオネラをよく抑えられることが実地試験で確認されている。モノクロラミン消毒は遊離塩素消毒に比べれば穏やかな消毒方法であり、モノクロラミンを連続的に使用していると、*Mycobacterium phlei* が従属栄養細菌数測定用の R2A 培地で検出されるようになり、バイオフィルムの生成が懸念される場面があった。本研究では、モノクロラミン消毒における必要な消毒の程度や対策の検討を目的として、実地試験で増殖した *M. phlei* 単離株を用いて、遊離塩素とモノクロラミンによる不活化を試験管内で試験した。*M. phlei* に対する消毒効果は、得られた不活化曲線から同じ CT 値で比較した場合、遊離塩素よりモノクロラミンの方が高く、想定とは逆の傾向であった。当初意図していなかった結果ではあるが、アルカリ泉におけるモノクロラミン消毒の優位性が改めて支持された。モノクロラミンを連続使用している浴槽では、モノクロラミンに弱い *M. phlei* がどうして増加してしまうのか。一連の実験結果をふまえて実地における *M. phlei* の挙動を推測すると、*M. phlei* はバイオフィルム中にあることで、モノクロラミン消毒に対する抵抗性を発揮しているものと考えられた。モノクロラミン消毒で *M. phlei* を制御するには、こまめな浴槽清掃はもとより、配管洗浄、高頻度の高濃度消毒、オーバーナイト洗浄等のバイオフィルム対策を徹底することの必要性や重要性が改めて示唆された。

A. 研究目的

従来の温泉利用施設における浴用水の消毒方法には、その経済性や取扱の簡便さから、次亜塩素酸ナトリウムの添加による遊離塩素消毒が広く使用されてきた。しかし近年、高 pH 等、遊離塩素消毒が阻害される一部の温泉では、必ずしも遊離塩素が最適ではない場合があると指摘されてきた¹⁾。

代替のモノクロラミン消毒は、高 pH の温泉浴用水において *Legionella* spp. の制御に効果的であることが多くの事例報告で明らかになっている²⁾。その一方で、浴用水中に *Legionella* spp. は検出されなかったものの、*Mycobacterium phlei* (以下、*M. phlei*) をはじめとする、従属栄養細菌数の増加が複数の施設で報告された^{3,4)}。雑菌が増殖するということは、消毒の不足が懸念される場所であった。そこで本研究では、モノクロラミンによる *M. phlei* への消毒効果の確認を企図した。

なお *M. phlei* は、非定型抗酸菌の一種とであり、その病原性は低いと考えられているが、国内でも免疫機能の低下した患者における日和見感染等の報告⁵⁾があるなど、注意を要する。加えて、*Mycobacterium* spp. は、芽胞を作らない細菌だが、消毒への抵抗性の高いことが問題となる⁶⁾。

B. 研究方法

(1) 試験方法

本研究では消毒試験の検液として、アルカリ泉と PBS を使用した (表 1、2)。アルカリ泉は、以前実施したモノクロラミン消毒実地試験³⁾と同一の温泉水を用いた。検液は、試験前に 121°C 15 分間のオートクレーブ滅菌処理を行った。

モノクロラミンの消毒液は、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (ケイ・アイ化成、ケイミックス SP) と硫酸アンモニウム溶液 (同社、レジサイド) を混合して用時調製した。

M. phlei は、先行研究⁷⁾で用いた浴用水由来の単離株を、16S rDNA 配列により菌種を確認したうえで使用した。

滅菌カップにそれぞれの検液 150 mL を入れ、濁度により菌数調整した *M. phlei* の菌液を、検液内でおよそ $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL になるように添加した。それぞれの滅菌カップに、消毒液を所定の濃度になるよう混合した。対照試験として、遊離塩素消毒も行った。モノクロラミン、遊離塩素とも、低濃度 (約 5ppm)、中濃度 (約 10ppm)、高濃度 (約 20ppm) の 3 段階に濃度を調整した。

菌数測定用検液と消毒濃度測定用検液は、消毒剤添加後 15 分、30 分、60 分、90 分、120 分の時点で、それぞれ同一カップからサンプリングした。菌数測定用検液は適量のチオ硫酸ナトリウム (関東化学) にて中和した後、適宜希釈してから、R2A 寒天培地 (栄研化学) に混釈した。それぞれの R2A 培地は、7 日間 37°C で培養した。

消毒濃度測定用検液は、それぞれモノクロラミン濃度および遊離塩素濃度を測定した。モノクロラミン濃度は、ポケットモノクロラミン・遊離アンモニア計 (HACH DR300 Pocket Colorimeter) によるインドフェノール法、遊離塩素濃度は、ポケット残留塩素計 (HACH Pocket Colorimeter II) による DPD 法を、それぞれ用いた。

(2) 不活化と消毒効果の評価

試験管内消毒試験で測定した消毒剤の濃度と、接触時間の積である、CT 値

(Concentration×Time value) を算出した。

縦軸をコロニー数(対数表示)、横軸を CT 値(線形表示)の相関図として不活化曲線を得た。不活化曲線の近似式は、菌液添加直後のコロニー数を切片とした。

C. 研究結果および考察

PBS における *M. phlei* の 3-Log 不活化に必要な CT 値は、モノクロラミンがおおよそ 500 mg/L・min であるのに対し、遊離塩素はおおよそ 1,200 mg/L・min となり、おおよそ 2.5 倍となった(図 1)。*Mycobacterium* 属は以前より消毒への抵抗性の高いことが知られており⁶⁾、本研究でも同様に高い抵抗性を示した。

アルカリ泉における *M. phlei* の 3-Log 不活化は、モノクロラミンが CT 値おおよそ 800 mg/L・min であるのに対し、遊離塩素は CT 値おおよそ 2,000 mg/L・min でも 1-Log 程度しか不活化されなかった(図 2)。アルカリ泉に次亜塩素酸ナトリウムを添加した場合、高い殺菌効果が期待される次亜塩素酸(HClO)はほとんど生成されず、次亜塩素酸イオン(ClO⁻)にイオン化し、消毒力が減弱することが知られている⁸⁾。すなわち、アルカリ泉の遊離塩素は、次亜塩素酸イオンとして存在し、消毒効果が著しく低下したことが推測され、このことから、*M. phlei* に対する消毒効果が、PBS で高く、アルカリ泉で低い理由が説明できる。

以上の通り、モノクロラミンと遊離塩素消毒の効果に、明瞭な違いが認められた。意外だったのは、*M. phlei* に対する消毒効果が、一般的な遊離塩素消毒のほうが低かったことであった。消毒効果は、同じ CT 値で比較すると、遊離塩素消毒よりモノクロ

ラミンの方が高かった。さらに言い換えると、PBS とアルカリ泉のいずれの消毒試験においても、モノクロラミンの方が、より効果的であった。このことは、別施設で行った試験管内試験が再現された内容だった⁷⁾。一方で、これまでの実地試験³⁾に目を向けると、モノクロラミン消毒下の浴用水に *M. phlei* の増殖が観察されてきたことと、試験管内でのモノクロラミン消毒の効果が高いことは、整合的でないと思われた。

このような現象が起こった理由としては、実地試験と試験管内試験の *M. phlei* では、水中での存在状態が異なる可能性⁶⁾が考えられた。試験管内試験の *M. phlei* は基本的に浮遊性と考えられるが、実施施設の浴用水中の *M. phlei* は必ずしも浮遊性であるとは限らないかもしれない。むしろ浴槽や循環ろ過システムの配管、ろ過器といった支持固体(担体)などに由来する、有機物や無機物が付着した状態にあるものが多いと考えられる。

一般に細菌は、いわゆるコンディショニングフィルムに対する可逆的付着状態を経て、細胞外多糖合成促進を伴う不可逆的付着状態に移行し、初期付着を完了する⁹⁾。その後、バイオフィルムの成熟が進むと、その消毒耐性は浮遊菌の数倍から数千倍に上昇する。*M. phlei* の初期付着やバイオフィルム形成過程のメカニズムの詳細はまだ明らかではないが、実地における *M. phlei* は初期付着前後で、モノクロラミン消毒に対する抵抗性を早期に獲得しているのではないかと推測される。

実地試験では、1 週間に 1 回、10~20ppm 程度の高濃度モノクロラミン消毒を実施したが、それでも *M. phlei* の増殖を完全には

制御しきれていなかった³⁾。いずれの理由やメカニズムがあるとしても、バイオフィルムが生じて、従属栄養細菌数が増加することは、衛生状態の低下につながり、何らかの対策を要することとなる。*M. phlei*を制御するためには、モノクロラミン消毒下においても、従来通りのこまめな浴槽清掃はもとより、過炭酸ナトリウム等の洗浄剤を用いた配管洗浄の必要性が改めて強調される。加えて、高頻度の高濃度消毒やオーバーナイト洗浄等、バイオフィルム対策を徹底することが必要と考えられる。

D. 結論

モノクロラミン消毒の実地試験で増殖した *M. phlei* 単離株に対して、モノクロラミンと遊離塩素による試験管内消毒試験を行った。消毒効果は、同じ CT 値で比較すると、遊離塩素消毒よりモノクロラミンの方が高かった。その傾向は、アルカリ泉で顕著であった。意図せず、アルカリ泉におけるモノクロラミン消毒の優位性を改めて確認した。それでも実地では *M. phlei* の増殖が見られており、従来どおりのこまめな浴槽清掃はもとより、配管洗浄、高濃度消毒、オーバーナイト洗浄の併用等の対策の重要性が合わせて確認された。

E. 参考文献

1. 泉山信司, 長岡宏美 他:高 pH 浴槽水、薬湯、並びに水泳プールへの、モノクロラミン消毒の応用、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

28~30 年度総合研究報告書.

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, 2015, **59**, 55-57.
3. 森 康則, 永井佑樹, 赤地重宏, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 西 智広, 濱口真帆, 吉村英基, 泉山信司:次亜塩素酸ナトリウム消毒を阻害する高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の実地検証—三重県津市の榊原温泉における検討—, 2019, 温泉科学, **69**, 90-102.
4. 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, 2018, 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会要旨集, p262.
5. Tanaka S, Hoshino Y, Sakagami T, Fukano H, Matsui Y, Hiranuma O. Pathogenicity of *Mycobacterium phlei*, a non-pathogenic nontuberculous mycobacterium in an immunocompetent host carrying anti-interferon gamma autoantibodies: a case report. BMC Infect Dis. 2019 May 22;19(1):454.
6. Oriani AS, Sierra F, Baldini MD. Effect of chlorine on *Mycobacterium gordonae* and *Mycobacterium chubuense* in planktonic and Biofilm State. Int J Mycobacteriol 2018;7:122-7.
7. 松田宗大, 枝川亜希子, 泉山信司, 小

倉 徹, 植園健一, 松田尚子, 藤井 明 :
循環式浴槽から分離された
*Mycobacterium phlei*に対するモノ
クロロミンの殺菌効果, 2019, 日本防
菌防黴学会第 46 回年次大会要旨集,
p232.

8. 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 縣 邦
雄, 遠藤卓郎 : モノクロロミン消毒に
よる浴槽レジオネラ属菌の衛生対策,
2010, 保健医療科学, **59**, 109-115.
9. 松村吉信 : バイオフィルムの構造と形
成過程, 「バイオフィルムの発生メカ
ニズムと評価・対策」より, 2020, 株式
会社 R&D 支援センター, 39-56..

F. 研究発表

誌上発表

1. Edagawa A, Matsuda N, Ogura T,
Uezono K, Izumiyama S, Fujii A,
Microbial Contamination of Rubber
Ducks Floating in Bathtubs of

Bathing Facilities, and an Evaluation
of Their Washing Methods, *Biocontrol
Sci.*, 2021, **26**, 187-192.

2. 森 康則, 井上源喜, 日本の温泉の利用
状況と経年変化—行政科学的アプロー
チを中心として, 2021, 地球化学, **55**,
43-56.

口頭発表

1. 森 康則, 温泉の利用状況と環境省「新・
湯治」プロジェクトへの期待、第 58 回日本
リハビリテーション医学会学術集会, 2021
年 6 月, 京都府.
2. 森 康則, 井上源喜, 日本における単位
面積・人口あたりの源泉数の経年変化と
地域的特徴, 日本温泉科学会第 74 回大
会, 2021 年 11 月, 群馬県.

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. 試験管内試験に用いたアルカリ泉の主要化学組成

陽イオン	mg/kg	陰イオン	mg/kg	非解離成分	mg/kg
Na ⁺	91.8	F ⁻	1.2	H ₂ SiO ₃	57.9
K ⁺	1.0	Cl ⁻	14.8		
NH ₄ ⁺	<0.1	Br ⁻	0.1		
Mg ²⁺	<0.1	NO ₃ ⁻	0.8		
Ca ²⁺	0.7	HPO ₄ ²⁻	0.3		
		SO ₄ ²⁻	32.4		
		BO ₂ ⁻	3.7		

※ pH, 9.64; EC, 39.4 mS/m、オートクレーブ滅菌後

表 2. 試験管内試験に用いた PBS の主要化学組成

陽イオン	mg/kg	陰イオン	mg/kg	非解離成分	mg/kg
Na ⁺	3,879	F ⁻	<0.1	H ₂ SiO ₃	<0.1
K ⁺	164.4	Cl ⁻	5,046	HBO ₂	0.6
NH ₄ ⁺	<0.1	Br ⁻	<0.1		
Mg ²⁺	<0.1	NO ₃ ⁻	<0.1		
Ca ²⁺	<0.1	HPO ₄ ²⁻	965.2		
		SO ₄ ²⁻	<0.1		

※ pH, 7.64; EC, 1.62 S/m、オートクレーブ滅菌後

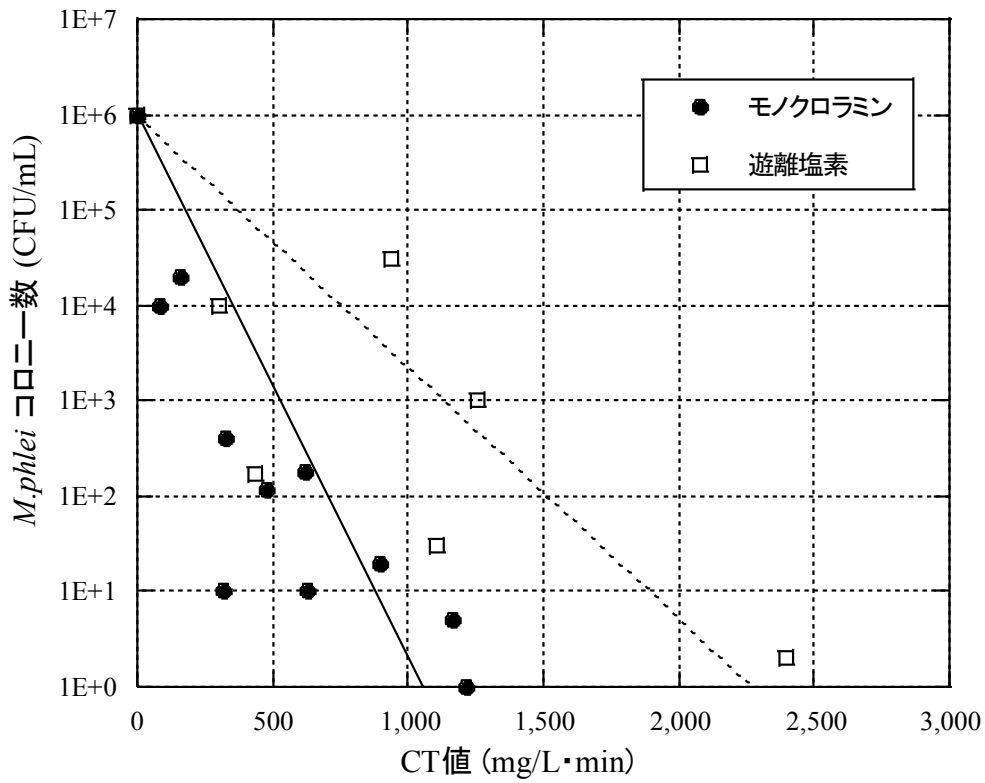


図1 PBS を用いた試験管内試験結果と不活化曲線

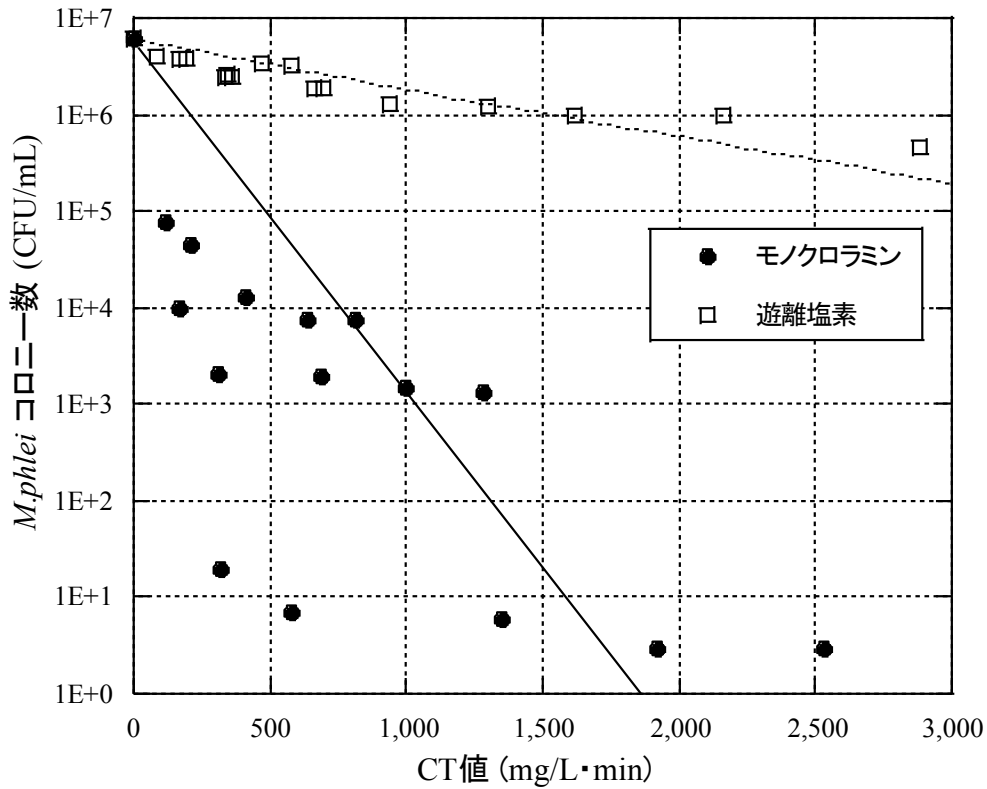


図2 アルカリ泉を用いた試験管内試験結果と不活化曲線