

令和元～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）

総合研究分担報告書

モノクロラミン消毒下のバイオフィルムを対策する省力化洗浄方法の開発

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	長岡 宏美	静岡県環境衛生科学研究所 微生物部
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	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	山本 哲司	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	細川 賢人	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	田中 孝典	花王株式会社 ハウスホールド研究所
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	田中 慶郎	株式会社マルマ PC 営業部
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	藤井 明	株式会社ヘルスビューティー
研究協力者	斎藤 利明	株式会社ヤマト 温浴事業部
研究協力者	小坂 浩司	国立保健医療科学院 生活環境研究部

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。ところがモノクロラミンを連続的に使用していると、*Mycobacterium phlei* が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。そこで本研究では、*M. phlei* のモノクロラミン消毒に必要な Ct 値（濃度×時間、すなわち消毒の程度）を確認するとともに、対策のひとつとして新たな洗浄方法を検討した。

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、改めてアルカリ泉におけるモノクロラミン消毒の優位性が支持された。試験管内試験ではモノクロラミン消毒の方が消毒効果が高いにも関わらず、実地においてはモノクロラミンを連続使用している浴槽で *M. phlei* の増殖が観察されてきた。その理由として、浴槽水の連続使用にはやはり問題が有り、汚染の蓄積、例えば *M. phlei* がバイオフィーム中にあるといったことで、モノクロラミン消毒に対する抵抗性が生じるものと考えられた。消毒だけに依存せず、バイオフィーム除去を目的とした定期的な洗浄の必要性が改めて指摘された。

現状において、ろ過器や配管は、ブラシを使った物理的な洗浄ができず、過酸化水素や過炭酸ナトリウムを使用した化学的な洗浄が行われている。しかし、これらの物質は劇物や危険物としての管理を要し、多量の薬剤を使った定期的かつ頻回の洗浄は容易ではない。そこで、使用する薬剤量の低減を目的として、過炭酸ナトリウムに助剤を併用する新規の洗浄方法に着目した。まず、ステンレス製試験片上に生成したバイオフィームを効率よく除去できる洗浄条件を検討し、次に最適条件による実地試験を行った。その結果、薬剤の使用量が重量にして従来の 3 割と低減したにも関わらず、9 割以上の微生物が除去される洗浄効果が確認された。洗浄後のすすぎの回数も多くなく、これまでより少ない労力で洗浄することが可能となった。この方法により、洗浄頻度と衛生の向上が期待される。

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、アルカリ泉をはじめとする、遊離塩素消毒が阻害される一部の温泉では、必ずしも遊離塩素消毒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、アルカリ泉の温泉浴用水において *Legionella* spp. の抑制に効果的であることが明らかになっている²⁾。

Legionella spp. が抑制できた一方で、モノクロラミン消毒下の浴用水中に、*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)}。従属栄養細菌数が増加するということは、ろ過器や配管にはバイオフィーム等の汚れが生じており、洗浄の徹底が課題となる⁷⁾。すなわち、当然のことではあるが、浴槽水の消毒だけではなく、定期的な配管洗浄が必要となる。

上述の *M. phlei* は、非定型抗酸菌の一種と

して、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⁾があり、注意を要する。加えて、*Mycobacterium* spp. は、芽胞を作らない細菌だが、消毒への抵抗性が高いことが問題となる⁶⁾。そこで本研究における一つの課題として、モノクロラミン消毒下に蓄積する汚染の代表として、*M. phlei* に対するモノクロラミン消毒効果を検討した。

浴槽水の衛生状態を保つには、浴槽だけでなく循環ろ過装置全体の洗浄の徹底が課題となるが、ろ過器や配管にブラシを使うといった物理的な洗浄は不可能であり、洗浄剤を使った化学的な洗浄方法に頼ることになる⁸⁻¹¹⁾。現状の化学的な洗浄には、主に過酸化水素や過炭酸ナトリウムが用いられているが、これらの物質は劇物や危険物であることから専門業者への委託が主となり、浴場施設にとっての金銭的な負担が大きい。前者の過酸化水素では、薬剤の使用量も多く、原液 30~35%濃度を終濃度 3~3.5%の 10 倍希釈で使用する場合、例えば 10 m³ の浴槽水に対して 1 m³ もの

原液を使用する計算になる。実際の洗浄作業には水位を可能な限り下げて、濃度をもっと薄くするとしても、洗浄範囲と洗浄効果を保つには減らすにも限度がある。後者の過炭酸ナトリウムであっても、例えば 10 m³ の浴槽水に対して 1%の 100 kg を使用し、固体であっても少なくない。つまりいずれの方法を使うにしても、肉体的な作業負荷も大きく、さらに、洗浄後のすすぎにかかる労力も考慮すると、頻繁な洗浄には困難を要する。逆に、薬剤量や作業負荷が少ない洗浄方法があれば、頻回の洗浄が可能となる。

そこで、本研究における二つ目の課題として、薬剤量の低減を可能とする、新しい洗浄方法を検討した¹²⁾。水が循環する環境のバイオフィームには、鉄などの金属が蓄積している。このバイオフィーム中の金属を触媒として利用するフェントン反応により、薬剤が除去目標のバイオフィーム中で特異的に働く。結果として、少ない薬剤量でバイオフィームを除去できることが、その特長である。洗浄条件の検討および実地での洗浄試験を行った。

B. 研究方法

B1. モノクロラミンと遊離塩素による *M. phlei* の試験管内不活化試験

消毒試験の検液として、アルカリ泉(表 1)と PBS(表 2)を使用した。アルカリ泉は、先行研究³⁾で使用した温泉水を、121°C15 分間のオートクレーブ滅菌処理後に使用した。*M. phlei* は、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¹³⁾。モノクロラミン消毒液は、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。

滅菌カップに検液 150 mL を入れ、濁度により菌数を調整した *M. phlei* の菌液を、終濃度 10⁶ ~ 10⁷ CFU/mL となるように添加した。その滅菌カップに、モノクロラミンあるいは遊離塩素を、低濃度(5 mg/L)、中濃度(10 mg/L)、高濃度(20 mg/L)の 3 段階の濃度となるよう添加した。消毒

開始後 15 分、30 分、60 分、90 分、120 分の時点で、菌数測定用検液と消毒濃度測定用検液を分取した。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、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に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、遊離塩素濃度にはポケット残留計(HACH Pocket Colorimeter II)による DPD 法を用いた。

試験結果から、縦軸を菌数(対数表示)、横軸を消毒濃度と接触時間の積である CT 値(線形表示)の相関図である不活化曲線を得た。不活化曲線の近似式は、消毒開始時の菌数を切片とした。

B2. 新規洗浄方法の試験管内試験と実地検証

循環水流の再現装置を用いて、バイオフィームの形成と洗浄後の残存バイオフィーム量の測定を行った¹⁴⁻¹⁵⁾。連続培養システム(アート科学社製)の中に 15 mm×20 mm(厚さ 1.5 mm)のステンレス製の試験片を設置し、(後述の施設 A から D とは異なる)とある施設から採取した浴槽水を 40°C で 14 日間循環させることで、試験片上にバイオフィームを発生させた。試験片を 6 ウェルプレートに移し、新旧の洗浄剤 5 mL に浸漬し、試験片を洗浄した。試験片から洗浄剤を除いて蒸留水 3 mL で 2 回すすいだ後に、0.1%クリスタルバイオレット 3 mL を加えて、30 分間バイオフィームを染色した。染色液を除いて蒸留水 5 mL で 2 回すすいだ後に、1 mL のエタノールを加えてバイオシェーカー(60rpm 回転)で 1 分間攪拌し、バイオフィームからクリスタルバイオレットを溶出した。溶出液の吸光度(波長 570 nm)を測定することで、クリスタルバイオレットの量、すなわち試験片上に残存したバイオフィーム量を測定した。

蒸留水による洗浄を基準として、他の洗浄条

件によるバイオフィルムの除去率を評価した。洗浄剤は、過炭酸ナトリウム、アスコルビン酸、酒石酸を混合して用い、量比を検討した(表 3)。比較対象として、従来から用いられてきた過炭酸ナトリウムの単独⁸⁻¹¹⁾、および過炭酸ナトリウムとクエン酸を有効成分とする市販品(本報告では現状の販売に配慮して、具体的な製品名を表示しない)を用いた。

試験管内試験で得られた最適な条件を用い、4箇所の入浴施設(施設 A~D、表 4)の協力を得て、実地の洗浄試験を行った。施設 A~C においては新規の洗浄方法を行い、施設 D においては 2 浴槽を用いて新旧の洗浄を並行して行った(新規方法 D1、従来方法 D2)。

新規の洗浄方法として具体的には、浴槽水 1 m³あたり過炭酸ナトリウム 1 kg(終濃度 0.1%)にアスコルビン酸 1 kg と酒石酸 1 kg を助剤として使用し、過酸化水素による洗浄効果を発揮させた。浴槽水の量を循環可能な最低限に減らした後、上記の 3 化合物を同時に浴槽水に添加し、浴槽水を循環した。60 分後に、1 m³あたり炭酸ナトリウム 0.5 kg 程を用いて排水可能な pH に調整し、すすぎの工程に移行した。

従来の洗浄方法として、浴槽水 1 m³あたり過炭酸ナトリウム 6 kg およびクエン酸 4 kg からなる市販の洗浄剤を用いた。新規の方法と同様に、浴槽の水量を循環可能な最低限に減らした後、先にクエン酸を浴槽水に添加して 30 分間循環、次に過炭酸ナトリウムを添加して 90 分間循環した。1 m³あたり亜硫酸ナトリウム 1.2 kg を用いて過炭酸ナトリウムを中和し、すすぎの工程に移行した。

洗浄後の浴槽から洗浄剤を除去するため、すすぎを行った。浴槽水を排水したら、循環可能な水量まで給水し、一定時間循環後、排水する工程を繰り返した。循環する時間は、系全体での 1 循環に要する時間を目安とし、すすぎ時点の浴槽の水量(m³)をポンプ能力(m³/hr)で除して求めた。すすぎは、次亜塩素酸ナトリウムまたはモノクロラミンとの反応性が消失して、消毒剤の濃度が維持できるまで繰り返した。具体的には、す

すぎ水 10 mL に 1,000 mg/L 程度に調整した次亜塩素酸ナトリウムまたはモノクロラミンを 10 μL 添加し、DPD 法によって対照の精製水と同じ塩素濃度を示すまで、すすぎを繰り返した。なお、次亜塩素酸ナトリウムは、次亜塩素酸ナトリウム溶液を精製水で 0.1%に希釈したもの、モノクロラミンは 0.3%次亜塩素酸ナトリウム溶液と 0.4%塩化アンモニウム溶液を 1:2 で混合したものをそれぞれ用いた。

洗浄前後にヘアキャッチャー近傍の配管 2 箇所(5 cm×5 cm)を拭き取り、ATP 検査および細菌検査を行った。施設 A においては、ろ過器内部からも拭き取り検査を実施した。ATP 検査には、UltraSnap (Hygiena)を使用した。細菌検査には、ふきふきチェック II (栄研化学)を用い、Voltex ミキサーを用いて拭き取り内容を付属の 10 mL りん酸緩衝液に懸濁した。懸濁液から、定法により一般細菌数、従属栄養細菌数、大腸菌、レジオネラ属菌の検査を実施した。

C. 研究結果および考察

C1. モノクロラミンと遊離塩素による *M. phlei* の試験管内不活化試験

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)。近縁の *Mycobacterium spp.*は、以前より消毒への抵抗性が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 1-Log 不活化でも CT 値おおよそ 2,000 mg/L・min が必要であった(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¹⁶⁾。

以上のとおり、モノクロラミンと遊離塩素消毒の効果には明瞭な違いが認められた。意外だった

のは、*M. phlei* に対する遊離塩素消毒の効果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¹³⁾が再現された内容だった。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系統の配管、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¹⁷⁾。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。

なお、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、洗浄によるバイオフィルム対策の徹底が必要と考えられる。

C2. 新規洗浄方法の試験管内試験と実地検証

過炭酸ナトリウム、アスコルビン酸、酒石酸の量比を変えた場合(6 通り)に、過炭酸ナトリウム

単独の場合と、市販の洗浄剤を使った条件を加えた計 8 通りでバイオフィルムの試験片を洗浄した(表 3)。その結果、従来の洗浄方法である過炭酸ナトリウムの単独(洗浄条件 7)あるいは市販品を使用した場合(洗浄条件 8)はいずれもバイオフィルムの除去率は 60%程度であった。市販品は説明書にしたがって洗浄時間を 90 分間と長くしたが、除去率の向上は見られなかった。

過炭酸ナトリウムにアスコルビン酸と酒石酸を混合した新規の洗浄方法では、それぞれ 0.1% 以上の等量で用いることで、除去率は 80 ないし 90%程度と従来法を上回ることができた(洗浄条件 3～5)。すなわち、薬剤の重量が従来の 3 割でも、従来以上の洗浄効果が得られたことになる(洗浄条件 3)。洗浄条件 5 のように、薬剤量を増やすことで除去率は向上したが、1 ないし 2 割の範囲であるため、一時の薬剤量を増やすよりも、少ない量で 3 回、5 回と洗浄回数を増やす方が、衛生状態の維持や改善に好ましいと考えられた。

また、新規の洗浄方法に使用したアスコルビン酸を減らすと、除去率が低下した(洗浄条件 1, 2)。一方、助剤だけでは洗浄効果がなく、洗浄には過炭酸ナトリウムが必要であることを確認した(洗浄方法 6)。すなわち、バイオフィルム中の金属イオンがアスコルビン酸の還元剤の存在下で触媒として働き、フェントン反応が生じて、過炭酸ナトリウムによるバイオフィルムの除去・殺菌が効率よく働いたと考えられた¹²⁾。以上の結果を受けて、洗浄条件 3 の条件を最善と判断し、この方法で実地の洗浄試験を進めた。

実地試験の浴場施設の概要を表 5 に示す。施設 A の試験では、新規の洗浄方法の実施中に、浴槽水が白濁する様子が見られたが、従来の方法にあった激しい発泡は認められなかった。配管内部およびろ過器内部のふき取りにおいて、ATP 値、一般細菌数、従属栄養細菌数ともに減少が確認され、高い洗浄効果を示した。施設 B の試験では、新規方法による洗浄中に、バイオフィルム由来と思われる汚染が確認された。洗浄後は、ATP 値の減少、一般細菌数、従属栄養細菌数ともに減少が見られた。施設 C の試験では、

新規方法による洗浄中に浴槽水の濃褐色への変化が確認された。洗浄前の ATP 値が低値であり評価不能であったものの、一般細菌数、従属栄養細菌数が検出下限未満まで減少した。

施設 D の試験では、2 浴槽を用いて新規の洗浄方法と従来法を並行して行った。新規方法による洗浄では、浴槽水の褐色への変化が確認された。ATP 値の減少、一般細菌数、従属栄養細菌数ともに減少が見られ、高い洗浄効果が確認された。従来の洗浄法を実施した別の浴槽では、激しい発泡と共に浴槽水の褐色への変化が確認された。ATP と細菌数は洗浄前の測定値が低く、洗浄効果については評価不能であった。すすぎには 5 回を要し(表 5、表 6)、新規方法と比べて繰り返し回数を要する結果となった。

以上のとおり、新規の洗浄方法は、薬剤量を低減しつつ、汚染の低減が可能であった。浴槽水 1 m³あたり 6 kg ないし 10 kg の過炭酸ナトリウムが使われていた従来の方法⁸⁻¹¹⁾に比べて、新規の洗浄方法では 1 kg と量が大きく減少した。従来の方法では発泡して過炭酸ナトリウムが消費されていくのに対して、新規の方法ではほとんど発泡せず、有効な過炭酸ナトリウムの残留が長いこと、直接的にバイオフィルムに作用できることが減量できた理由と考えられた。助剤を含めて計算すると、10 kg から 3 kg へと 7 割の重量が削減され、新規の洗浄剤は従来に比べて取扱が相当に有利と考えられた。

実地試験でいずれの施設においても、洗浄効果が目視および細菌検査により確認された。一部の配管の拭き取りから検出限界付近のレジオネラの残存が見られたものの、このわずかな菌数から浴槽水への汚染の可能性は極めて低いものと考えられたため、繰り返しの洗浄には至らなかった。実際に、いずれの施設においても洗浄後の浴槽水はレジオネラ属菌が不検出であった。

例数は少ないが新旧の比較において、薬剤量が減少することで、肉体的な作業負担は明らかに低減した。すすぎ回数も 5 回から 2 回に削減できた(表 6)。対象施設のすすぎ工程は 1 回

につき 60~90 分間を要し、3 回のすすぎ工程の削減は、4 時間以上の短縮を実現した。洗浄時間の短縮は、洗浄頻度の高頻度化にも資するものであった。

D. 結論

モノクロミン消毒の実地試験で増殖した *M. phlei* の単離株に対して、モノクロ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、遊離塩素消毒よりモノクロミンの方が高かった。その傾向は、アルカリ泉で顕著であり、アルカリ泉におけるモノクロミン消毒の優位性を改めて確認した。しかし実地では *M. phlei* の増殖が見られており、消毒だけに依存せず、バイオフィルムを除去する定期的な洗浄の必要性が改めて指摘された。

洗浄の労力低下と頻度向上を狙って、過炭酸ナトリウムに助剤を併用する新規の洗浄方法に着目した。薬剤の使用量が重量にして従来の 3 割と低減し、作業負担が低減したたにも関わらず、9 割以上の微生物除去の洗浄効果が得られた。この方法の活用により、洗浄頻度の衛生の向上が期待される。

謝辞

本研究に御協力頂きました浴場施設の関係者の皆様、管轄保健所の皆様に深く感謝いたします。

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 *Mycolicibacterium 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. 泉山信司, 長岡宏美 他: モノクロラミン消毒を導入した循環式浴槽を洗浄する必要性、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, 令和元年度分担研究報告書.
 8. 今関久和: 過炭酸ナトリウムを用いた洗浄と施設設備の衛生上の問題及びその解決策, 厚生労働省生活衛生課平成 30 年度生活衛生関係技術担当者研修会より, 平成 31 年 2 月 (<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/0/000483756.pdf>, 2022/3/30 現在) .
 9. 縣 邦雄, 配管洗浄の方法, 厚生労働省生活衛生課 平成 28 年度 生活衛生関係技術担当者研修会より, 平成 29 年 2 月 (<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000194934.pdf>, 2022/3/30 現在)
 10. 林 宏美, 源田 健, 吉田裕行: 塩素管理の改善に奏功した過炭酸ソーダによる配管洗浄事例, 2017, 生活と環境, **62**(1), 43-45.
 11. 藤井明, 河合自立, 松田和也, 杉山寛治, 大畑克彦, 鈴木光彰, 加藤宏一: 循環ろ過式モデル浴槽系内におけるバイオフィーム形成とその洗浄・殺菌について, 2006, 生活と環境 **51**(2), 67-73.
 12. 特開 2020-186228.
 13. 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 *Mycolicibacterium phlei* に対するモノクロラミンの殺菌効果, 2019, 日本防菌防黴学会第 46 回年次大会要旨集, p232.
 14. Garny, K., Horn, H. & Neu, T.R. Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors., 2008, Bioprocess Biosyst Eng **31**, 619–629.
 15. Wunder DB, Bosscher VA, Cok RC, Hozalski RM. Sorption of antibiotics to biofilm., 2011, Water Res. Mar; **45**(6), 2270-80.
 16. 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 縣 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, 2010, 保健医療科学, **59**, 109-115.
 17. 松村吉信: バイオフィームの構造と形成過程「バイオフィー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, 2021, *Biocontrol Sci.*, **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, *地球化学*, 2021, **55**, 43-56.
3. Mori Y, Yanagimoto K, Yamamoto T, Nagai Y, Yoshimura H, Akachi S, Yamagami T, Uematsu K, Hisada Y, Nishio M, Yagi J, Izumiyama S, Initial Trials of Monochloramine Disinfection of Circulating Bathtub Water at Public Hot Spring Facilities and Determining its Efficacy. *Journal of Hot Spring Sciences*, 2020, 70, 50-60.
4. 森 康則, 赤地重宏, 永井佑樹, 吉村英基, 泉山信司. 温泉付随ガス分離設備におけるレジオネラ属菌の実態調査と対策, 2020, *温泉科学*, **69**, 192-201.
5. 大河内由美子, 泉山信司, 前川純子, 紙上ミニシンポジウム I～水の衛生管理～3. 貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況, 2020, *日本防菌防黴学会誌*, **48(8)**, 377-

382.

口頭発表

1. 藤井 明, 松田宗大, 小倉 徹, 小倉諒太, 植園健一, 枝川亜希子, 泉山信司:モノクロラミン管理下の循環浴槽におけるろ材付着バイオフィルムに対する各種消毒剤の効果, 第47回建築物環境衛生管理全国大会、2020年1月, 東京都.
2. 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.
3. 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

特開 2021-188884

実用新案登録、その他

なし

表 1. 試験管内不活化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. 試験管内不活化試験に用いた 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

表 3. 試験管内試験による洗浄条件とバイオフィーム除去率

洗浄条件番号	1	2	3	4	5	6	7	8	
組成 (%)	過炭酸ナトリウム	0.1	0.1	0.1	0.3	0.5	-	1	0.6
	アスコルビン酸	0.01	0.03	0.1	0.3	0.5	0.1	-	クエン酸
	酒石酸	0.1	0.1	0.1	0.3	0.5	0.1	-	0.4 ※1
pH	4.2	4.2	4.1	4.1	4.1	4.0	10.7	- ※2	
洗浄時間(分)	60							90	
バイオフィーム除去率(%)	37.7	53.8	77.1	91.2	90.0	10.0	60.5	63.0	

※1 市販の洗浄剤を使用し、アスコルビン酸と酒石酸は 0% ※2 測定なし

表 4. 対象施設の概要

施設	A	B	C	D
泉質等	井水	アルカリ性単純温泉	Na・Ca-Cl 泉	Na-Cl 泉
消毒方法	モノクロラミン	モノクロラミン	モノクロラミン	遊離塩素
浴槽(循環系)の大きさ	約 7m ³	約 20m ³	約 5.2m ³	D1:約 8.3m ³ D2:約 4.7m ³
実施した洗浄方法	新規方法	新規方法	新規方法	D1:新規方法 D2:従来方法

表 5. 対象施設の洗浄試験結果

施設	採取場所	洗浄工程	ATP値	一般細菌数	従属栄養細菌数	L.spp.菌数	大腸菌数	すすぎ回数
A	配管部①	前	301	3.5×10 ⁴	4.1×10 ⁴	N.D.	-	2
		後	63	5.0×10 ³	2.5×10 ³	N.D.	-	
	配管部②	前	301	3.5×10 ⁴	4.1×10 ⁴	N.D.	-	
		後	63	5.0×10 ³	2.5×10 ³	N.D.	-	
	ろ過器内	前	1,723	1.3×10 ⁵	7.1×10 ⁴	N.D.	-	
		後	57	2.5×10 ³	5.0×10 ²	N.D.	-	
B	配管部①	前	9,237	2.7×10 ⁶	1.9×10 ⁶	N.D.	N.D.	3
		後	362	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	配管部②	前	3,598	1.7×10 ⁷	4.5×10 ⁶	N.D.	N.D.	
		後	118	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
C	配管部①	前	0	2.2×10 ³	3.8×10 ³	N.D.	N.D.	1
		後	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	配管部②	前	19	4.0×10 ²	3.4×10 ⁴	N.D.	N.D.	
		後	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
D1	配管部①	前	1,856	2.4×10 ⁷	2.2×10 ⁷	>2.0×10 ⁴	-	2
		後	46	3.0×10 ²	4.4×10 ⁴	N.D.	-	
	配管部②	前	19	4.0×10 ²	3.4×10 ⁴	>2.0×10 ⁴	-	
		後	3	N.D.	N.D.	140	-	
D2	配管部①	前	2	N.D.	N.D.	N.D.	-	5
		後	1	5.0×10 ²	2.0×10 ²	N.D.	-	
	配管部②	前	0	N.D.	2.0×10 ²	N.D.	-	
		後	0	N.D.	3.0×10 ²	N.D.	-	

※ATP(RLU/25 cm²) 菌数 (CFU/25 cm²)

※全ての施設で洗浄後の浴槽水のレジオネラ属菌が不検出であることを確認済

表 6. 新規方法と従来法の洗浄後のすすぎ回数の比較

すすぎ回数		1	2	3	4	5
塩素残留率 (%)	新規方法	63.8 ^{※1}	100	- ^{※2}	-	-
	従来方法	0	12.5	71.3	91.3	100

※1 塩素残留率は、100%になれば塩素消毒が消失せず、すすぎが完了したことを表し、0%は塩素消毒が全て消費されてしまい、すすぎが全く足りていないことを表す。

※2 測定なし。新規方法では塩素濃度が2回のすすぎだけで維持できるようになったため、3回目以降のすすぎは行っていない。

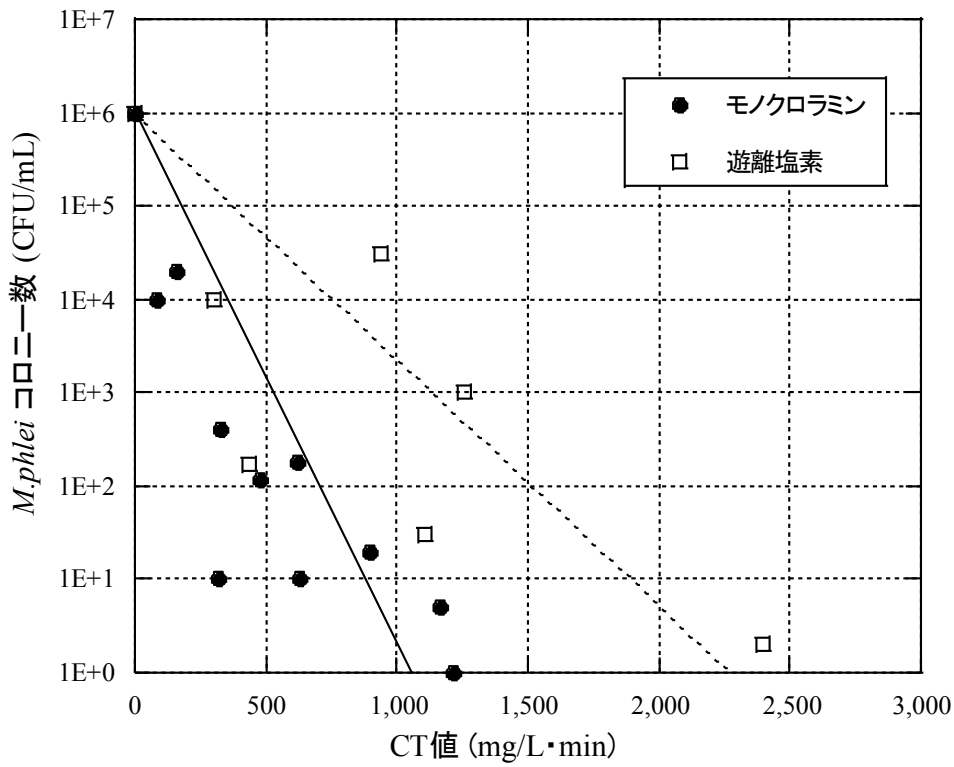


図1. PBS を用いた *M. phlei* 試験管内不活化試験の結果

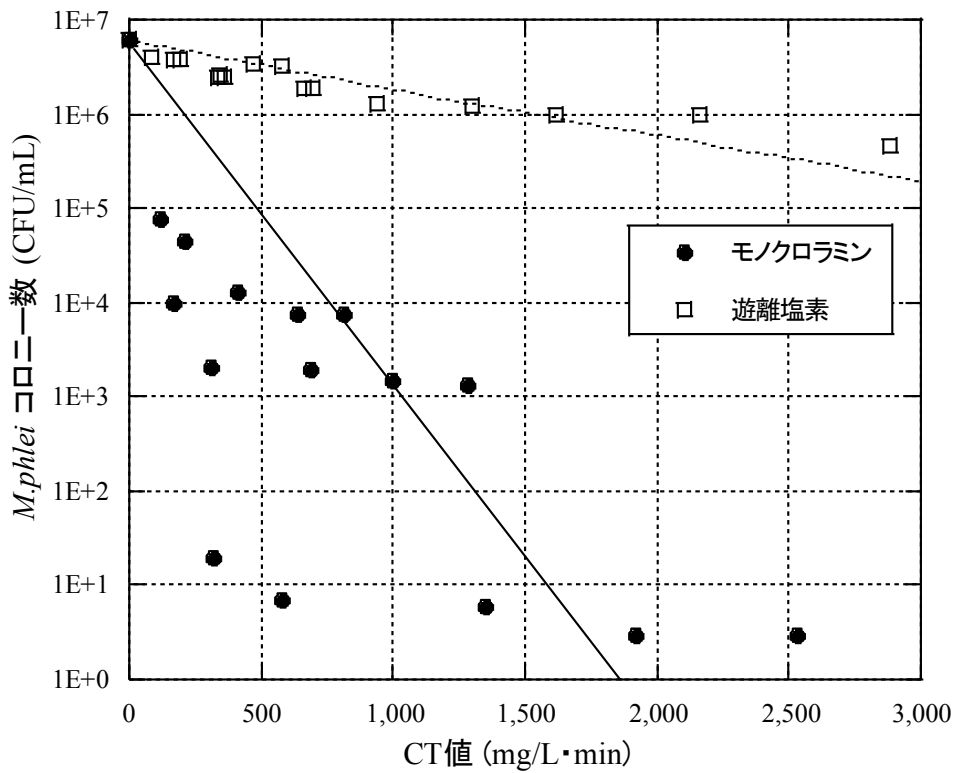


図2. アルカリ泉を用いた *M. phlei* 試験管内不活化試験の結果