

令和4年度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)

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

研究代表者 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部

### 分担研究報告書

#### モノクロラミン消毒実証試験における浴槽水の菌叢解析

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	望月 映希	山梨県衛生環境研究所	生活科学部
研究協力者	鶴田 芙美	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	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

遊離塩素による消毒が困難なアンモニア態窒素、有機物、鉄、マンガンを含む温泉や高pHの温泉であっても、結合塩素のモノクロラミンはレジオネラ属菌への有効性が確認されている。ただし、連用により従属栄養細菌数が増加することから、菌叢の変化に懸念がある。本研究では遊離塩素消毒が困難な、有機物を含む温泉利用の営業1施設の協力を得て、モノクロラミン消毒の実証試験を行い、濃度の安定性、消毒効果、菌叢の変化について調査した。モノクロラミン導入前の4週間と導入後の4週間に、週1回の頻度で営業終了後の浴槽水を採水した。モノクロラミンの濃度は、薬液注入量の調節により、概ね3~6 mg/Lを安定的に維持することができた。モノクロラミン消毒の結果として、遊離塩素消毒の管理時に検出されたレジオネラ属菌が、検出下限値未満になった。しかし従属栄養細菌数と16S rRNA遺伝子のコピー数が増加し、*Aquidulcibacter*属菌などが減少する一方で、非病原菌である*Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus*属菌、*Immundisolibacter*属菌などが増加した。レジオネラ属菌の抑制が可能であった一方で他の細菌の増加が確認され、洗浄等によりバイオフィルムを抑えることが重要と考えられた。

## 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、もっぱら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。多くの場合、遊離塩素消毒は有効に作用するが、アンモニア態窒素、鉄、マンガン、有機物を含む温泉では濃度が低下し、高pHの泉質の場合、十分な消毒効果を発揮しないことが知られている。

遊離塩素とアンモニアの反応により生成される結合塩素のモノクロラミンは、前述の条件下であって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>。ただしモノクロラミンの連用により、*Mycobacterium phlei* 等の細菌の増加が報告されている<sup>2)</sup>。*M. phlei* は非結核性抗酸菌症の近縁であることから、感染報告の例がほとんどなくても、一応の注意が払われている。そのような病原性細菌に類するものの増加が他にも生じるのか、モノクロラミン消毒による菌叢への影響を確認する必要がある。先の菌叢の検討では、元から源泉水にアンモニア態窒素が含まれており、遊離塩素管理をしているつもりが、結果としてモノクロラミンの結合塩素消毒が行われていた。そのためモノクロラミンの導入による菌叢の変化は、不明瞭な結果であった<sup>3)</sup>。

そこで本研究では、有機物を含んではいるが、アンモニア態窒素濃度が比較的低い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行った。消毒効果、濃度の安定性、並びに菌叢の変化を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 対象施設

対象施設は全有機体炭素 (TOC: 湿式酸化方式による測定) が 2.4 mg/L、アンモニア態窒素 0.2 mg/L を含む、pH7.5 の源泉水を利用していた (表 1)。入浴者数は 1 日に 400~800 名程度で、浴槽水の循環ろ過系統を有しており、毎日換水・清掃していた。試験対象浴槽は約 45 m<sup>3</sup> の内湯とした。

### (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、施設内全ての循環系統に添加した。浴槽水のモノクロラミン濃度として、概ね 3~6 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。

週 1 回、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 10~15 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。

事前に試験管内で、源泉水による遊離塩素およびモノクロラミンの消費量を確認した。

### (3) 各種測定

各種の微生物試験は、定法に従い実施した。浴槽水は、チオ硫酸ナトリウムを添加した滅菌容器に採水した。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、モノクロラミン導入前の 4 週間と導入後の 4 週間の、週に 1 回、営業終了後に実施した (図 1)。レジオネラ属菌は、

0.20 µm ポリカーボネート製メンブレンフィルター(ADVANTEC)でろ過濃縮した 100 倍濃縮液を、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」を用いて 35°C で 24 時間培養した。一般細菌数は、標準寒天培地を用いて 35°C で 48 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後の R2A 培地から、代表株の 16S rRNA 遺伝子配列(V3/V4 領域)を決定し、BLAST により相同性検索を行った。モノクロラミン導入前後の一般細菌数および従属栄養細菌数を比較し、t-検定の危険率 5%未満を有意差ありと判定した(Microsoft Excel 2016)。自由生活性アメーバは、浴槽水原液、および 1,000×g の 5 分間で 50 倍に遠心濃縮した濃縮試料の各 1mL について、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 遺伝子コピー数の定量、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)。DNA 試料は、浴槽水 1L をろ過したフィルターから、DNeasy PowerSoil Pro kit(QIAGEN)を用いて抽出した。モノクロラミン導入前後の 16S rRNA 遺伝子コピー数を比較し、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

源泉水中の遊離塩素およびモノクロラミンの消費量は、遊離塩素が 2.1 mg/L 相当に対して、モノクロラミンは 0.2 mg/L 相当と消費量が少なかった(図 2)。遊離塩素濃度は経時的に減少したが、モノクロラミン濃度は安定であった(図 3)。今回の施設におけるモノクロラミンの濃度維持は、遊離塩素よりも有利と考えられた。

浴槽水中の全塩素濃度は、当初不調であった薬剤注入ポンプの改善と、注入量の調整後に、3~6 mg/L 程度を安定的に維持していた(図 4)。前回の結果<sup>3)</sup>と同様に、有機物を含む温泉においても、モノクロラミン濃度の維持は可能であった。

浴槽水のレジオネラ属菌は、モノクロラミン導入前の 1 検体から検出され、*Legionella pneumophila* 血清群 1 が 10 CFU/100 mL であった。他は全て検出下限値未満で、モノクロラミンは有機物を含む泉質においてもレジオネラ属菌を安定的に抑制できていた。

モノクロラミン消毒導入の前後を通じて、自由生活性アメーバ、大腸菌群はいずれも検出されなかった(表 2)。

浴槽水中の一般細菌数はいずれも 40 CFU/mL 未満であり、モノクロラミン消毒導入前後で定量値に大きな変化は確認されなかった。一方、導入後の従属栄養細菌数は 1,000~4,000 CFU/mL と導入前よりも 100 倍程度に有意に増加した(図 5)。増加した従属栄養細菌の 16S rRNA 遺伝子は、解析した 7 株全てが *M. phlei* と 100%(446 bp/446 bp)一致していた。以前の試験<sup>4)</sup>に準じて、高濃度モ

ノクロラミン配管消毒の濃度を 10~15 mg/L で実施したが、*M. phlei* の増殖を抑えることができなかった。

以前の施設との相違点としては、今回の施設では浴槽水の pH が 2 程度低いことと、1 日当たりの入浴者数が 8 倍程度 (350~700 名) 多いことが挙げられる。pH については、高い浴槽水でも従属栄養細菌の増殖が確認されており<sup>4)</sup>、pH5 の人工炭酸泉では今のところ増殖がない。pH が低いほうが増殖しづらいのは、モノクロラミンであっても低 pH で消毒効果が高いことの反映と示唆された。入浴者数については、1 日当たりの入浴 400 名以上で従属栄養細菌数が増加し、100 名未満は増加しない傾向であった<sup>3,4)</sup>。現在までのところ、pH による消毒効果の強弱と、入浴者による汚染の負荷量に、従属栄養細菌数の増加との関連性が示唆された。繰り返しになるが、洗浄等の対策が必要と考えられた。

浴槽水中の 16S rRNA 遺伝子のコピー数は導入後、100 倍から 1,000 倍程度に有意に増加した (図 6)。これは *M. phlei* を主体とする従属栄養細菌数の増加と整合性があった。ただし、遊離塩素よりもモノクロラミンの方が浴槽水中の DNA 分解能力が低い<sup>5)</sup>ことが報告されており、分解されず残存した死菌由来の DNA を検出した可能性も考えられた。

菌叢解析で属や種まで判明したのとして、モノクロラミン導入前は *Staphylococcus* 属菌、*Corynebacterium* 属菌、*Aquidulcibacter* 属菌の順で存在割合が高かった。モノクロラミン導入後は *Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immundisolibacter* 属菌の順で割合が高く、モノクロラミン消毒により浴槽水中の菌叢が大きく変化していた。前回の菌叢解析<sup>3)</sup>で優占種であった

*Methylomonas* 属菌は経時的に増加傾向にあった (図 7)。前回の施設同様にモノクロラミン消毒を長期間連用した場合には、*Methylomonas* 属菌が優占種となる可能性が考えられた。

群間比較解析により細菌の系統ごとの増減を解析した結果、モノクロラミン導入により *Staphylococcus* 属菌、*Aquidulcibacter* 属菌などの 111 系統が有意に減少し、*Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immundisolibacter* 属菌など 152 系統が有意に増加した (図 8、図 9)。ただし大部分の細菌は存在割合が 1%未満であり、割合が大きい系統にはモノクロラミン消毒の影響が強くなる生じて、割合の少ない菌種の菌叢に与える影響は限定的と考えられた。レジオネラ属菌や、R2A 培地で増加を確認した *M. phlei* は、いずれも有意な増減はなかった。培養と結果が真逆に見える疑問が生じており、今後詳細な検討が必要である。*M. phlei* については、本研究班の森らが試験管内消毒試験を検討中である。

モノクロラミン消毒時に存在割合が高く、有意に増加した *Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immundisolibacter* 属菌はいずれも環境中に存在する細菌であり<sup>6-8)</sup>、病原性の報告はなかった。これらの細菌による健康影響はないと考えられるが、バイオフィーム抑制の観点から排除する必要があり、洗浄等の対策が必要と考えられた。

#### D. 結論

有機物を含む温泉の営業 1 施設の協力を得て、モノクロラミン消毒を行った。レジオネラ属菌を抑制することができた一方で、従属栄養細菌数や、16S rRNA 遺伝子コピー

数の増加が確認された。菌叢解析の結果、*Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immundisolibacter* 属菌の増加が確認された。バイオフィルム対策として、洗浄が必要と考えられた。

#### 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. 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
3. 柳本恵太, 泉山信司, 望月映希, 大森雄貴, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 田中慶郎, 杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二:有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒, 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 令和3年度分担研究報告書
4. 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
5. 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
6. Indrelid S, Kleiveland C, Holst R, Jacobsen M, Lea T: The Soil Bacterium *Methylococcus capsulatus* Bath Interacts with Human Dendritic Cells to Modulate Immune Function. *Front Microbiol.* 2017;8:320.
7. Beheshti Ale Agha A, Kahrizi D, Ahmadvand A, Bashiri H, Fakhri R: Identification of *Thiobacillus* bacteria in agricultural soil in Iran using the 16S rRNA gene. *Mol Biol Rep.* 2018;45(6):1723-1731.
8. Corteselli EM, Aitken MD, Singleton DR: Description of *Immundisolibacter cernigliae* gen. nov., sp. nov., a high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium within the class Gammaproteobacteria, and proposal of Immundisolibacterales ord. nov. and Immundisolibacteraceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(4):925-931.

#### F. 研究発表

誌上発表  
なし

口頭発表

1. 柳本恵太, 植松香星, 望月映希, 鶴田  
芙美, 山上隆也, 久田美子, 田中慶郎,  
杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山  
信司: 有機物が含まれる温泉における  
モノクロラミンの消毒効果、令和 4 年  
度山梨県公衆衛生研究発表会, 2023 年  
2 月, 山梨県
2. 柳本恵太, 植松香星, 望月映希, 鶴田  
芙美, 山上隆也, 久田美子, 田中慶郎,

杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山  
信司: 山梨県内の温泉施設におけるモ  
ノクロラミン消毒実証試験と浴槽水の  
菌叢解析について、第 34 回地方衛生研  
究所関東甲信静支部細菌研究部会、横  
浜市

**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>	414.8 mg/L
pH	7.5	Br <sup>-</sup>	0.8 mg/L
ORP	+59 mV	I <sup>-</sup>	<0.1 mg/L
一般細菌数	57 CFU/mL	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	<0.1 mg/L
TOC	2.4 mg/L	硫黄*	<0.1 mg/L
腐植質	<0.1 mg/L	マンガンイオン	0.1 mg/L
アンモニア態窒素	0.2 mg/L	総鉄イオン (鉄(II)イオン)	0.4 mg/L (0.1 mg/L)

\* 硫化水素(H<sub>2</sub>S)、硫化水素イオン(HS<sup>-</sup>)、硫化物イオン(S<sup>2-</sup>)の合計値

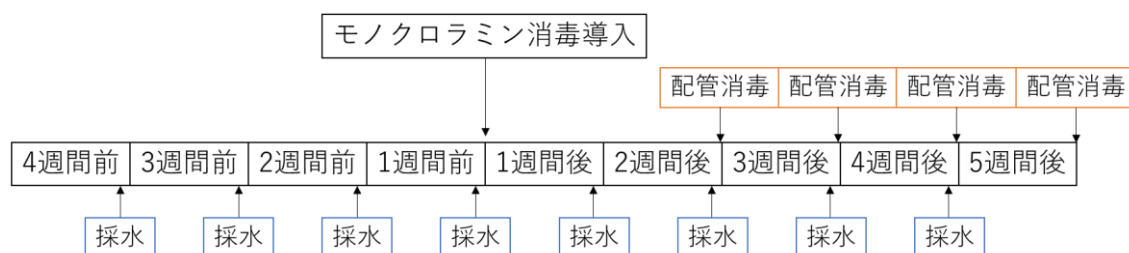


図 1. 試験期間中の採水・高濃度モノクロラミン配管消毒状況

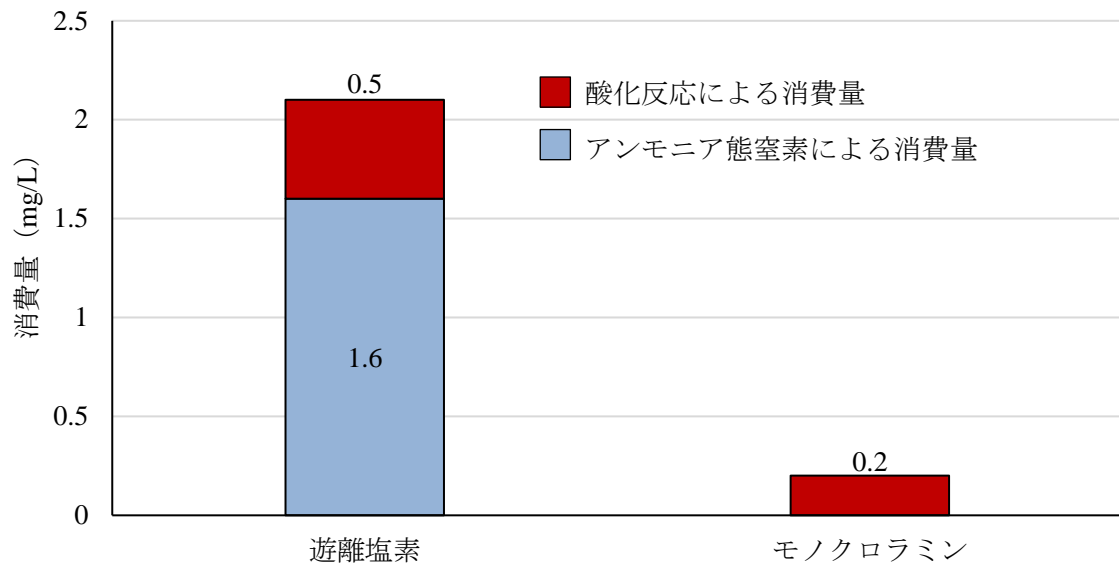


図2. 源泉水での遊離塩素とモノクロラミンの消費量

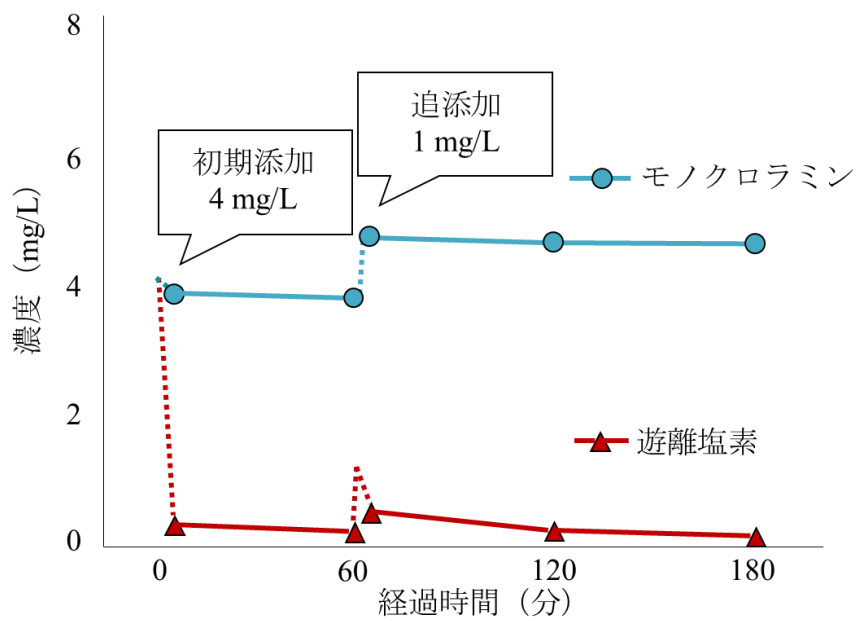


図3. 源泉水での遊離塩素とモノクロラミンの経時的濃度変化



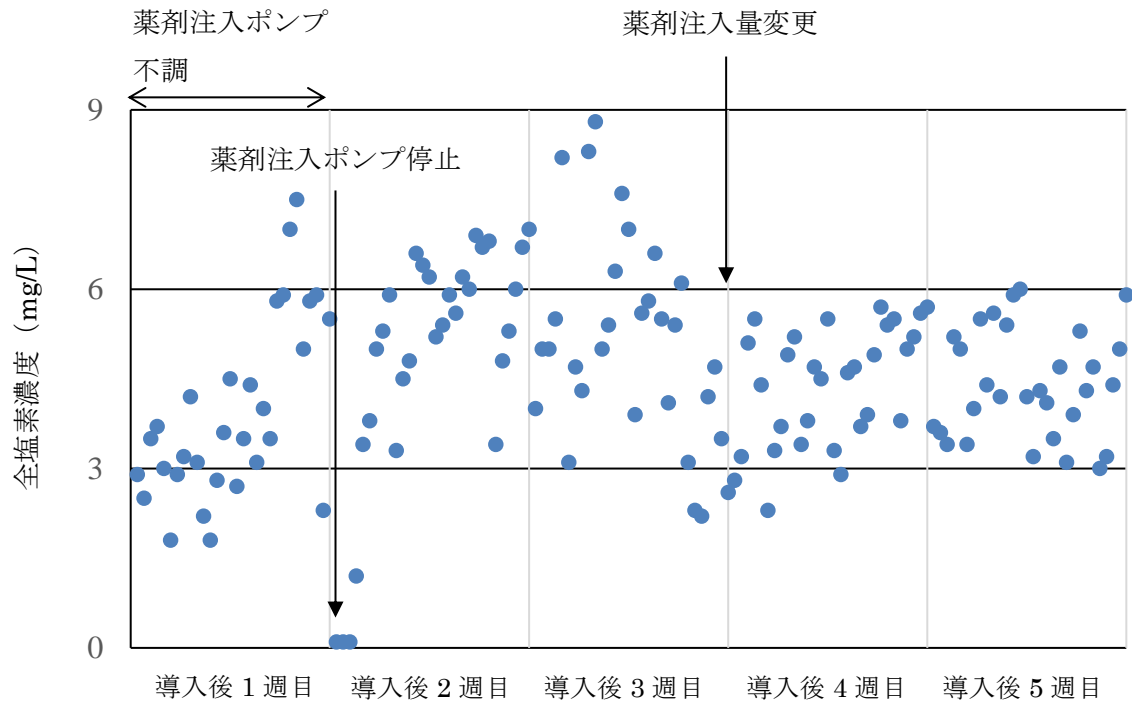


図 4. モノクロラミン消毒導入後における浴槽水の全塩素濃度

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)	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	8.3	0.34	0.48	—
導入 3 週間前	<10	0	陰性	8.4	0.54	0.63	—
導入 2 週間前	<10	0	陰性	8.5	0.16	0.26	—
導入 1 週間前	10	0	陰性	8.5	0.15	0.21	—
導入 1 週間後	<10	0	陰性	8.6	<0.10	4.9	5.3
導入 2 週間後	<10	0	陰性	8.7	<0.10	6.8	8.0
導入 3 週間後	<10	0	陰性	8.6	<0.10	5.1	7.3
導入 4 週間後	<10	0	陰性	8.6	<0.10	5.4	6.6

—:測定なし

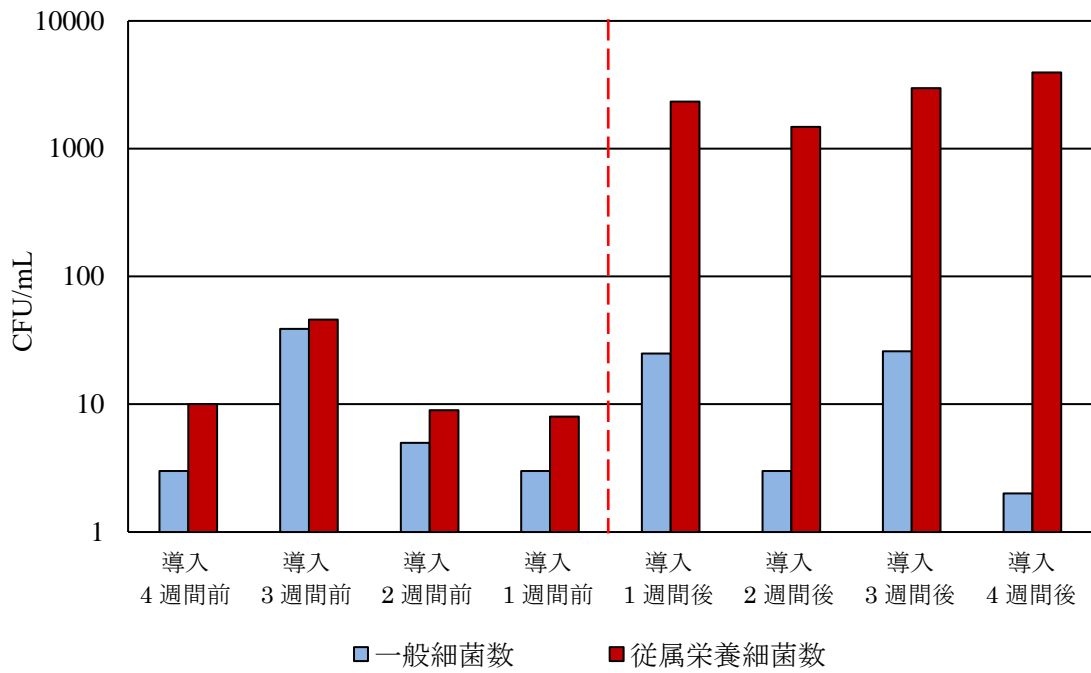


図 5. 浴槽水の一般細菌数、従属栄養細菌数

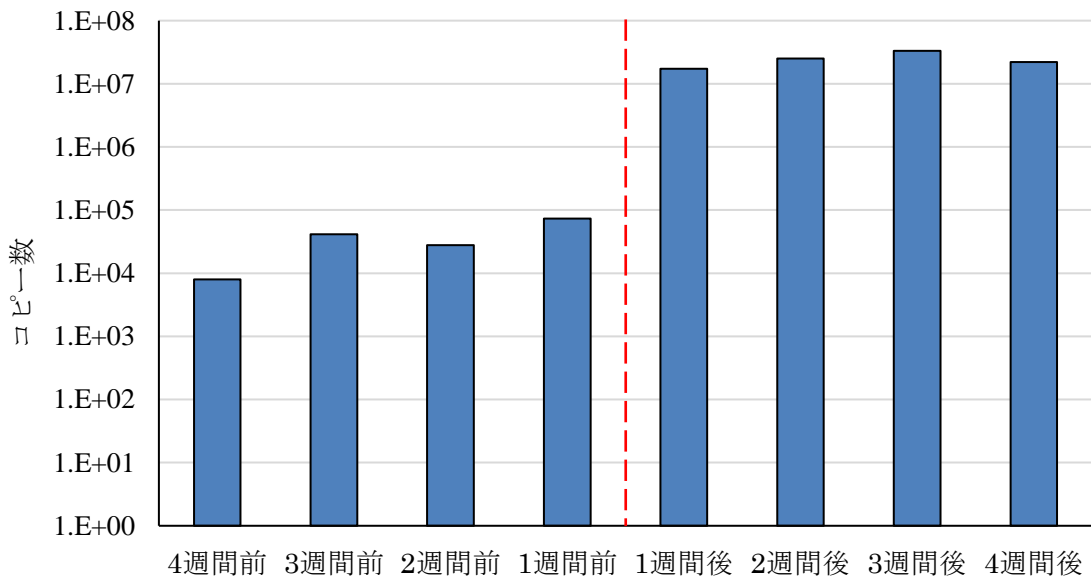


図 6. 浴槽水の 16S rRNA 遺伝子コピー数

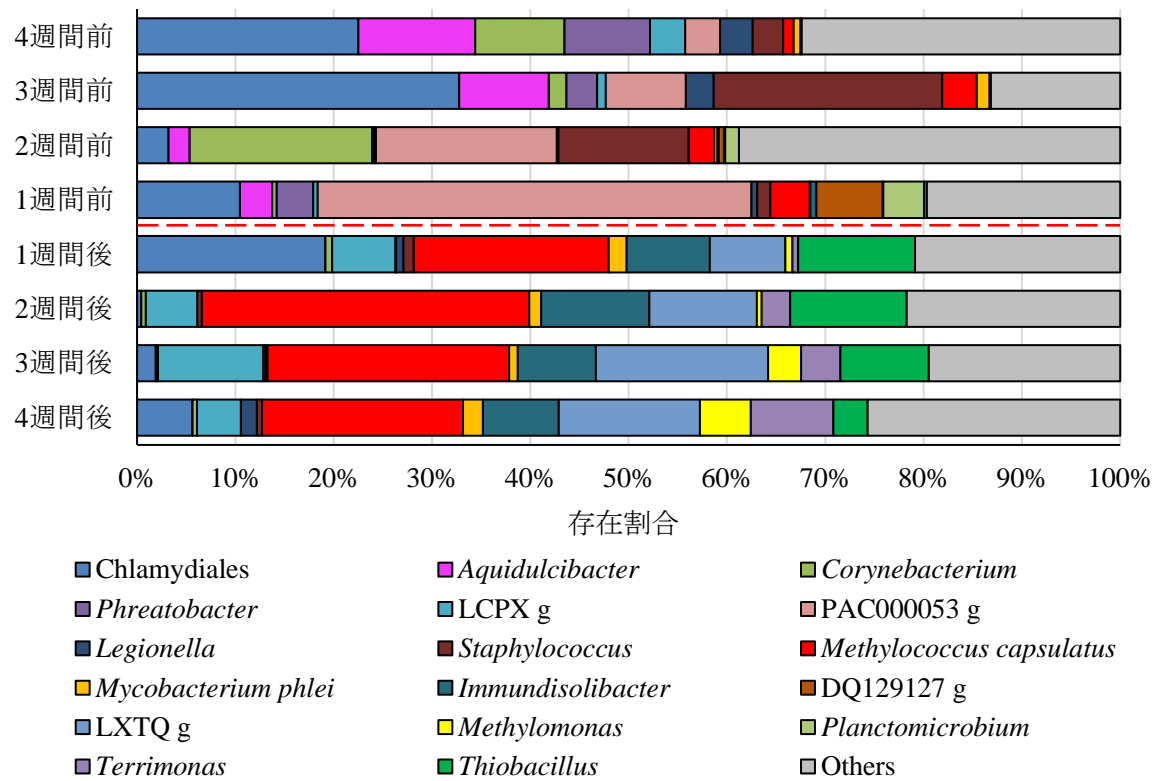


図 7. 浴槽水の菌叢解析結果

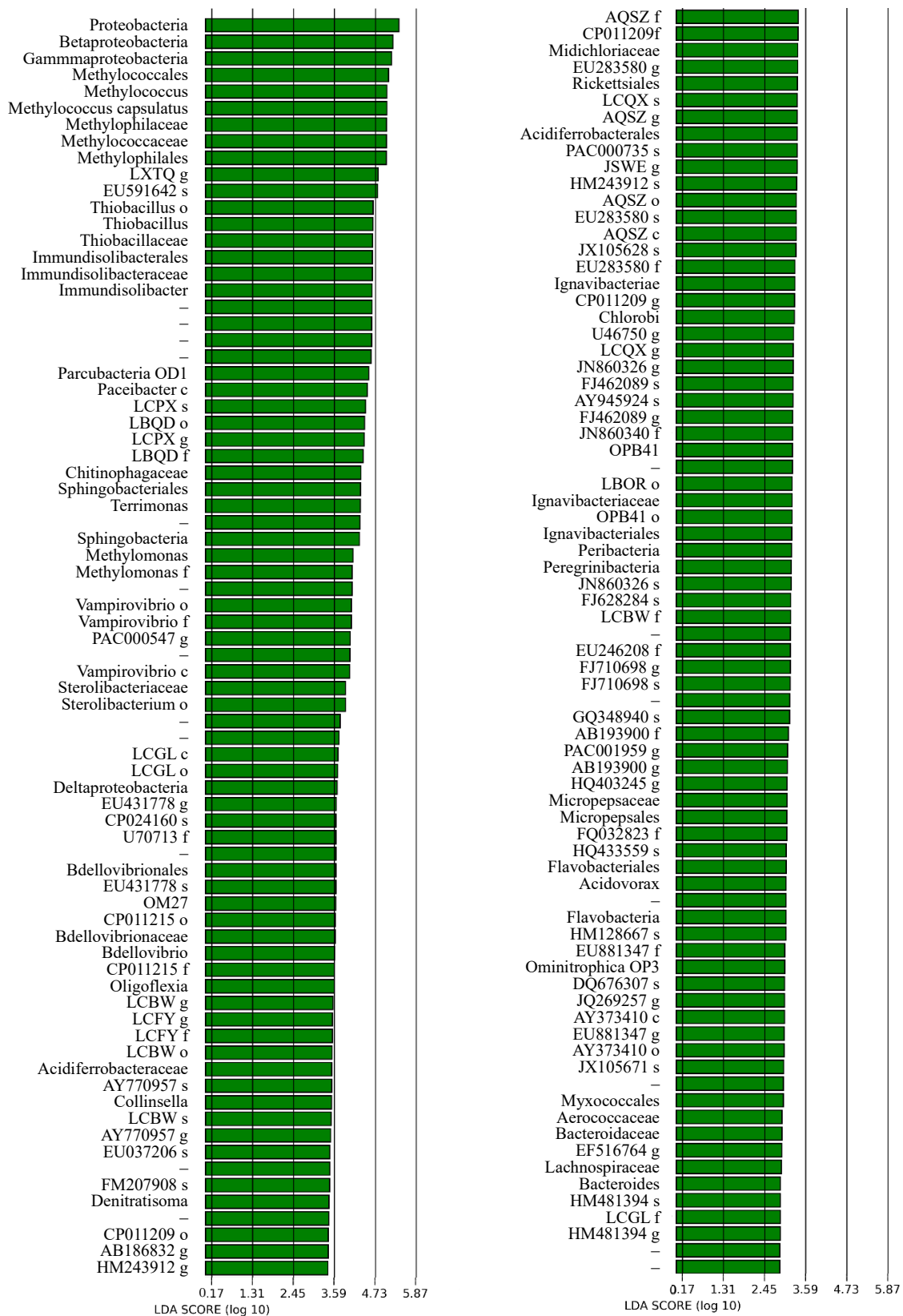


図 8.群間比較解析結果 (モノクロミン消毒導入後増加した系統)  
 系統名末尾 c: Class, o: Order, f: Family, g: Genus, s: Species

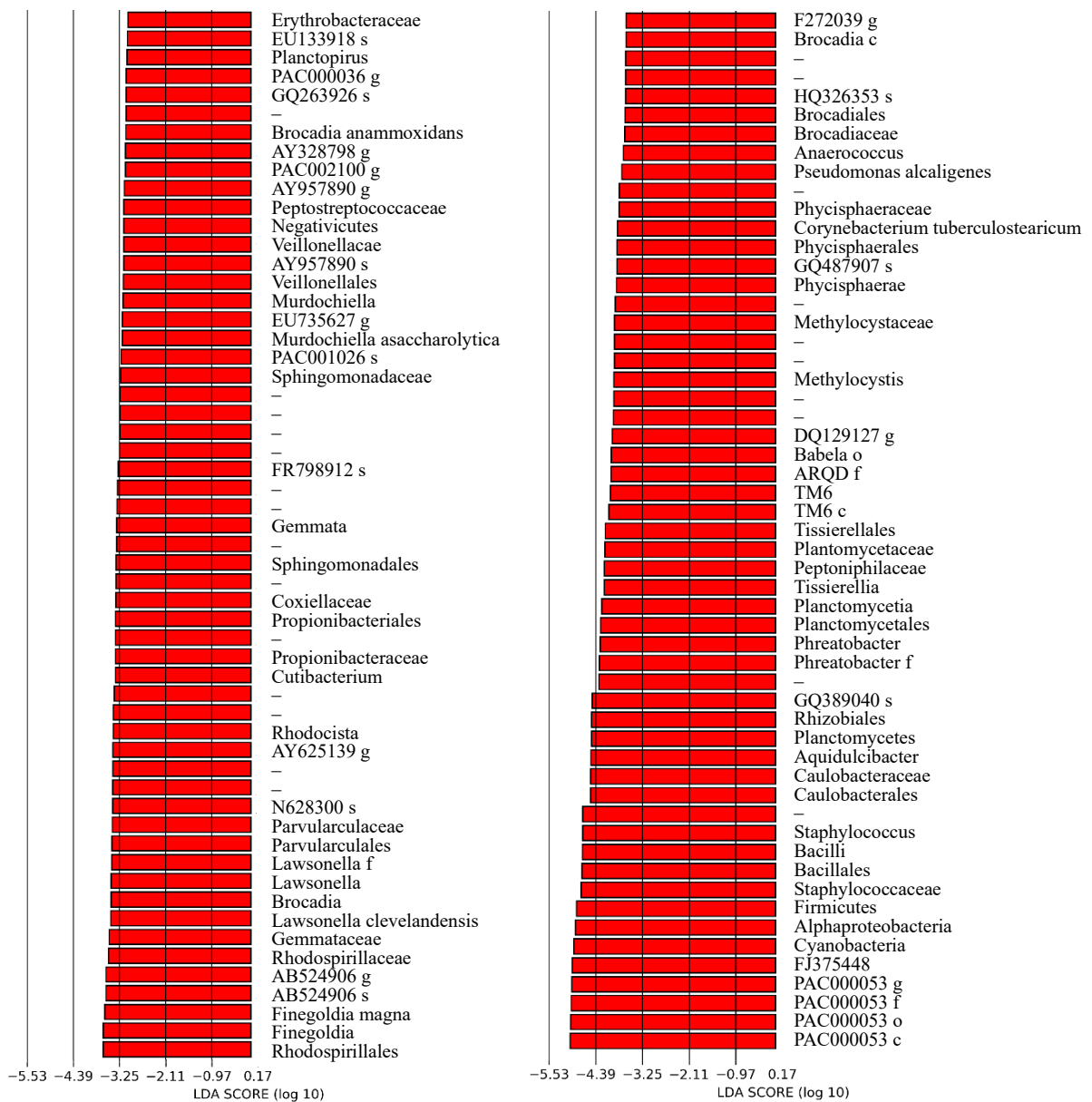


図9. 群間比較解析結果 (モノクロラミン消毒導入後減少した系統)

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