

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

令和4年度分担研究報告書

高 pH の遊離塩素によるレジオネラ消毒効果の低下

研究分担者 黒木俊郎 岡山理科大学 獣医学部

研究協力者 陳内理生 神奈川県衛生研究所 微生物部

研究協力者 中嶋直樹 神奈川県衛生研究所 微生物部

給水・給湯系のレジオネラ汚染は医療機関における院内感染の原因となり、衛生管理が重要となる。我々は継続的にレジオネラ属菌が検出される1医療機関の給水・給湯系において、受水槽に自動塩素添加装置を設置し、水道水の遊離塩素濃度を高く維持する対策を講じた。その結果、レジオネラ属菌が検出されていた水道蛇口において、レジオネラ属菌の不検出または減少を認めたが、完全な清浄化には至っていない。その要因として、当該医療機関の水道水の pH が高値のために、レジオネラ属菌に対して十分な消毒効果が得られていないと考えられた。これを検討するため、当該医療機関から分離した *Legionella pneumophila* SG1 を用い、異なる pH の条件下(pH 8.3 および pH 7.0 の PBS、ならびに当該医療機関の pH 7.9 未調整水道水および pH 7.0 調整水道水)で次亜塩素酸ナトリウムによる不活化試験を実施した。99 %不活化 Ct 値を比較した結果、PBS では pH 7.0 より pH 8.3 の条件の方が約 3.9 倍大きく、水道水では pH 7.0 調整より pH 7.9 未調整の方が約 2.9 倍大きかった。当該医療機関の水道水の pH では、遊離塩素濃度を高値に維持しても、消毒効果が十分に得られていない可能性が示唆された。

A. 研究目的

医療機関の給水・給湯系におけるレジオネラ属菌の汚染は、院内感染の原因となることから¹⁾、衛生管理が重要となる。我々は2015年に1医療機関の給水系におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査を実施したところ、複数の蛇口からレジオネラ属菌を検出した。レジオネラ汚染の改善に、2016年に自動塩素添加装置を受水槽に設置し、水道水の遊離塩素濃度を高く(約 1.0 mg/L)維持する対策を講じた。この対策により、レジオネラ属菌が検出されていた水

道蛇口において、不検出または減少の結果が得られた。しかし、2019年になっても完全な清浄化には至っておらず、3か所の水道蛇口からレジオネラ属菌が分離されている(菌数:10~360 CFU/100 mL、表1)²⁾。水道水の遊離塩素濃度は最大で 1.1 mg/L と高値を示しているにも関わらず、水道水からレジオネラ属菌が検出される要因として考えられたのが、水道水の pH が高値(7.9~8.6)であることだった。

水道水の消毒に使用している次亜塩素酸ナトリウム(NaOCl)は、水に溶けると次亜塩素酸

(HOCl)と水酸化ナトリウム(NaOH)になり、さらに HOCl が次亜塩素酸イオン(OCl⁻)と水素イオン(H⁺)に解離することが知られている。HOCl および OCl⁻の水中の割合は pH によって変化し、pH 4~6 で HOCl が、pH 8.5~10 で OCl⁻が優勢となる³⁾。HOCl および OCl⁻はいずれも強い酸化剤ではあるが、OCl⁻は HOCl より消毒効果が 1/80 しかないとされる⁴⁾。当該医療機関の水道水の pH は 7.9~8.6 であることから、水道水中では遊離塩素濃度が十分であっても OCl⁻が優勢であり、十分な消毒効果が得られていないと推測された。

当該研究では消毒効果の低下を確認する目的で、実際の水道水とそこから分離された菌の消毒実験を試験管内で行うこととした。当該医療機関の水道水から分離された *Legionella pneumophila* SG1 を対象に、pH 8.3 および pH 7.0 の PBS、ならびに当該医療機関の水道水(以下、未調整水道水) および pH 7.0 に調整した水道水の条件下で、次亜塩素酸ナトリウムによる不活化試験を実施した。既報にリン酸緩衝液を添加した水道水の、pH 7.6 における消毒試験があり、再現性について考察した⁵⁾。

B. 研究方法

1. レジオネラ菌液の調製

当該医療機関の水道水から分離した *L. pneumophila* SG1 を、吸光度計(550nm)で OD 値 0.5 程度になるように滅菌水に懸濁した。これを $n \times 10^8$ cfu/mL の濃度になるように滅菌水で希釈し、原液とした。原液の菌数は 10 倍段階希釈したものを、各段階で 2 枚の BCYE α 寒天培地に塗抹・培養することにより測定した。これを試験開始時の菌数とした。

2. 試験水の調製

(1) PBS

pH 7.2~7.4 程度の PBS を作製後、NaOH 水溶液および HCl 水溶液を用いてそれぞれ pH 8.3 および pH 7.0 になるように調整した。

(2) 水道水

医療機関の受水槽から採水し、0.2 μ m のフィルターで濾過滅菌した水道水を、pH 未調整水道水とした。pH は 7.8~7.9(以下 7.9)であった。この一部から、HCl 水溶液を用いて pH 7.0 に調整した水道水を作製した。

3. 試験水の遊離塩素濃度の調整

(1) PBS

5%次亜塩素酸ナトリウム溶液を 0.25 mg/L 程度になるように、pH 8.3 および pH 7.0 PBS でそれぞれ希釈した。

(2) 水道水

pH 7.9 未調整水道水および pH 7.0 調整水道水の遊離塩素濃度は 0.69 mg/L および 0.76 mg/L であった。これを 0.25 mg/L 程度になるように、5%次亜塩素酸ナトリウム溶液および 25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を用いて調整した。

遊離塩素濃度の測定は、DPD 法 (アクアブ AQ-101 : 柴田科学) を使用した。

4. 遊離塩素によるレジオネラ不活化試験

試験開始時に各試験水の遊離塩素濃度および pH を測定し、滅菌容器に 198 mL を分取した。ここに 2 mL の菌液を添加して試験液とし、菌液を添加した時点から一定の時間経過ごと (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 30, 60, 90 分) に試験液から 1 mL を分取するとともに、遊離塩素濃度および pH を測定した。なお、塩素の消失分を考慮し、各時点の遊離塩素濃度が試験開始前の遊離塩素濃度の 50%以下になった時点で試験

を終了した。

試験中の試験液は 20°Cの水浴中に静置した。分取した試験液 1 mL 中の塩素は 25%チオ硫酸ナトリウム水溶液 2 μ L を添加することで中和した。これを 10 倍段階希釈し、各段階 2 枚の BCYE α 寒天培地に塗抹・培養し、時間経過ごとの菌数を測定した。以上の試験を各試験液で 2 回実施した。

時間経過ごとに、レジオネラ属菌の生存割合と、遊離塩素濃度(C)と経過時間(t)を乗じた Ct 値を算出した。縦軸を生存割合、横軸を Ct 値として、2 回分の結果を合わせて不活化曲線を求め、近似式を算出した。近似式から、99%の不活化に必要な Ct 値を算出した。

C. 結果および考察

調製した菌液の原液は、各試験で $1.2\sim 2.2 \times 10^8$ cfu/mL だった。試験中の遊離塩素濃度は、開始前に 0.20~0.27 mg/L であったが、30~90 分後にその 50%以下となった(表 2)。試験中に遊離塩素濃度が低下したのは、添加した菌によって消費されたためと考えられたが、十分な試験水量に対して少量の菌液とすることで、すぐに塩素が消失せずに済んだと推察された。試験中の pH は、各試験で試験中に pH の変動はほとんど認められず、設定した pH を維持していた。

PBS および水道水を用いた遊離塩素による不活化試験の結果を図 1 に示した。PBS における 99 %不活化 Ct 値は、pH 8.3 で 1.40 、pH 7.0 で 0.36 となり、pH 8.3 の方が約 3.9 倍大きかった。水道水における 99 %不活化 Ct 値は、pH 7.9 未調整で 0.89、pH 7.0 で 0.31 となり、pH 7.9 未調整水道水の方が約 2.9 倍大きかった。

Kuchta らは、遊離塩素濃度 0.1 mg/L の水道

水(リン酸緩衝液添加)において、水温 21°C、pH 7.6 および pH 7.0 の条件下で、*L. pneumophila* SG1 の不活化試験を実施した⁵⁾。その結果、99%不活化に要する時間は、pH 7.6 で 30 分以上だったのに対し、pH 7.0 で 10 分以内だった。Ct 値を算出しておらず、数値での比較はできないが、pH 7.0 の中性の方が不活化は速やかであり、本試験の結果も同様であった。本研究では、遊離塩素濃度を測定することで Ct 値を算出しており、99 %不活化 Ct 値をより詳細に比較することができている。

以上の通り、水道水の pH が高いことでレジオネラ属菌に対する塩素の消毒効果が低く、レジオネラの検出が続いている以上は消毒が不十分である可能性が示唆された。

当該医療機関の水道水の pH が高値の要因として、この地域の水道は水源に地下水を利用していることが挙げられる。浄水場では塩素滅菌のみを実施しているため、凝集剤の使用を目的とした pH 調整がなされていないと推測された。これに対して、例えば当該医療機関の受水槽に pH 調整剤を添加することは、水道水の pH を低下させて、消毒効果を向上させる一つの方法と考えられる。しかし、この医療機関以外でも蛇口の衛生や消毒が問題になっている可能性があり、個別の施設が費用をかけて設備をするよりも、浄水場で pH 調整をしてもらうことで、地域全体の消毒効果を向上させることができるかもしれない。

D. 結論

遊離塩素によるレジオネラ不活化試験の結果、pH が高い条件の方が塩素の消毒効果が低かった。当該医療機関の水道水の pH は高く、塩素消毒の効果が不十分である可能性が示唆された。

E. 参考文献

1. 磯目賢一, 中島佳代, 池町真実, 山崎貴之, 中浴伸二, 宮川一也, 永澤浩志. 院内感染で判明したレジオネラ菌による給湯系汚染とその後の対応. 環境感染誌. 2020, 35 巻, 第 2 号.
2. 黒木俊郎, 泉山信司, 大屋日登美, 陳内理生, 鈴木美雪, 政岡智佳, 中嶋直樹. 「入浴施設及び医療機関におけるレジオネラ汚染実態調査」, 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)「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)」より令和元年度分担研究報告書.
3. Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. Biocontrol Sci. 2006;11:147-157.
4. Morris JC. Future of chlorination. Journal-American Water Works Association. 1966, 58, 1475-1482.
5. Kuchta JM, States SJ, McNamara AM,

Wadowsky RM, Yee RB. Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine in tap water. Appl Environ Microbiol. 1983, Nov;46(5):1134-9.

F. 研究発表

紙上発表

なし

学会発表

1. Nakajima N, Jinnai M, Izumiyama S, Kuroki T. Influence of high pH on chlorine disinfection against Legionella spp. The 10th International Conference on Legionella. September 2022. Yokohama.
2. 中嶋直樹, 陳内理生, 黒木俊郎. レジオネラ属菌に対する遊離塩素の消毒効果における高 pH の影響. 第 4 回 Hospital Water Hygiene 研究会学術集会. 2022 年 11 月. 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 医療機関のレジオネラ汚染実態調査結果(2019年度)

採水箇所	水系	種類	温度 (°C)	pH	遊離塩素 濃度 (mg/L)	LAMP (核酸検出)	レジオネラ属菌		従属栄養細菌数 (CFU/mL)
							検出菌種	菌数 (CFU/100 mL)	
病室	給水系	初流水	24.3	8.6	0.0	+	<i>L. anisa</i> <i>L. feeleii</i> SG1	360	24,000
		3L 流水後	26.6	8.5	0.9	+	レジオネラ属菌 <i>L. anisa</i> <i>L. feeleii</i> SG1	30	77
	給湯系	初流水	35.1	8.5	0.4	+	<i>L. anisa</i> <i>L. feeleii</i> SG1	20	46
		3L 流水後	35.8	8.4	0.4	+	<i>L. feeleii</i> SG1	40	21
トイレ	混合	初流水	24.7	8.1	0.9	+	<i>L. pneumophila</i> SG1 <i>L. feeleii</i> SG1	190	680
		3L 流水後	23.3	8.2	1.0	-	<i>L. feeleii</i> SG1	20	40
手術室1	給水系	初流水	25.1	8.1	1.0	-	不検出 ^a		19
		3L 流水後	24.3	8.1	1.0	-	<i>L. feeleii</i> SG1	10	4
	給湯系	初流水	41.7	8.1	0.3	-	不検出		4
		3L 流水後	52.9	8.0	0.5	-	不検出		1
手術室2	混合	初流水	30.7	8.1	0.6	-	不検出		6
		3L 流水後	38.1	7.9	0.8	-	不検出		5
受水槽	混合	初流水	22.2	7.9	1.0	-	不検出		9

^a<10 CFU/100 mL

引用元の表を一部修正・改変

表2 試験中の遊離塩素濃度

実験条件		実験	遊離塩素濃度(mg/L)			
溶媒	設定pH		0	30	60	90 ^a
PBS	8.3	1	0.27	0.16	0.12	N. D. ^b
		2	0.25	0.10	N. D.	N. D.
	7.0	1	0.25	0.13	0.09	N. D.
		2	0.25	0.10	N. D.	N. D.
水道水	未調整(7.9)	1	0.24	0.12	N. D.	N. D.
		2	0.25	0.17	0.13	0.11
	7.0	1	0.20	0.10	N. D.	N. D.
		2	0.22	0.12	0.05	N. D.

^a経過時間(分)、^b実施せず

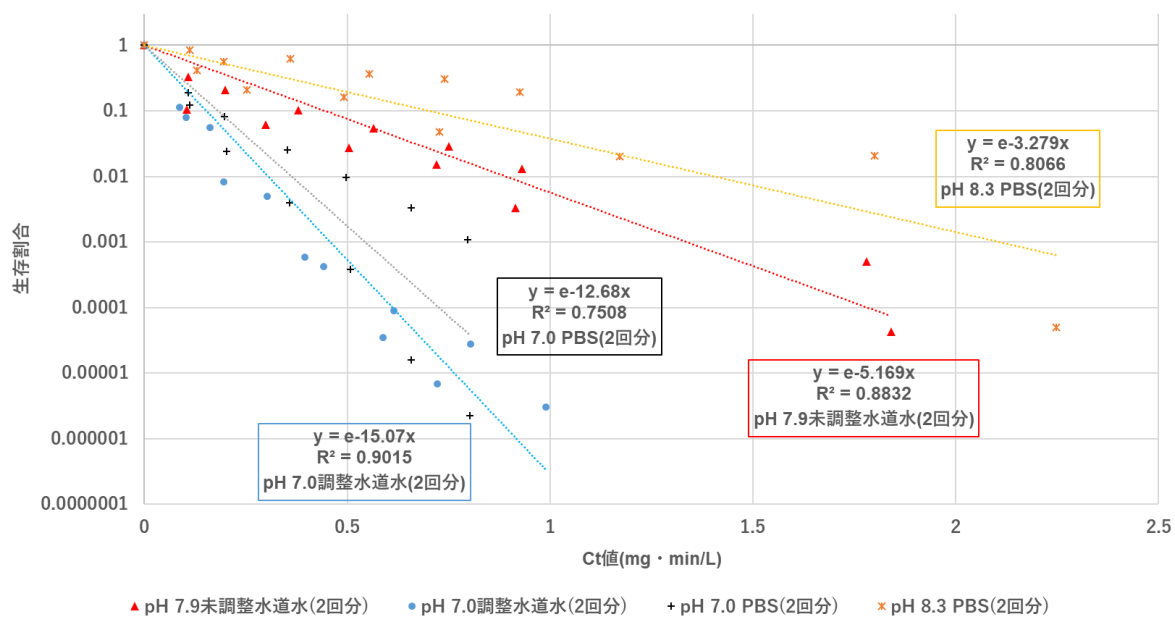


図1 医療機関由来の *L. pneumophila* に対する遊離塩素消毒による不活化曲線