

令和5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

#### pH10のアルカリ性温泉におけるモノクロラミン消毒効果と菌叢解析

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	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

遊離塩素による消毒が困難なアルカリ性温泉であっても、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や16S rDNA コピー数の増加、菌叢の変化が認められることがあり、汚染の蓄積に注意が払われている。これを受けて本研究では、モノクロラミン消毒が細菌叢に与える影響を詳細に検討した。具体的には pH10 のアルカリ性温泉利用の公衆浴場 1 施設の協力によりモノクロラミン消毒実証試験を行い、生菌と死菌の両方を検出する通常の遺伝子検査手法だけでなく、生菌を検出する EMA(Ethidium monoazide)-PCR の方法も用いて、菌叢の変化を確認した。まず、モノクロラミン消毒導入後に、導入前に検出されたレジオネラ属菌が不検出になり、アルカリ性温泉であってもモノクロラミン消毒はレジオネラ属菌に有効なことを再確認した。次に従属栄養細菌数と一般細菌数は、モノクロラミン導入前後で大きな変化がないことを培養検査で確認した。EMA 非処理では増加傾向にあった 16S rDNA コピー数が、EMA 処理により導入前と同等まで低下し、EMA 非処理の 16S rDNA コピー数の増加は死菌によるものと考えられた。さらに菌叢解析の結果では、モノクロラミン導入後に自然環境由来と思われる *Porphyrobacter* 属菌などが減少する一方で、生活環境やヒトの皮膚由来と思われる *Moraxella osloensis*、*Corynebacterium* 属菌などの割合増加を検出し、病原細菌が増加するといった特段の問題を認めなかった。なお、培養コロニーの 16S rDNA 配列は、菌叢解析で主要であった菌種と対応が得られて、両方の解析に問題がなかったと考えられた。最終的には、今回の実証試験では従属栄養細菌数の増加や病原細菌等の増殖はなく、浴槽水はモノクロラミン消毒により良好な衛生状態に維持できていた。

## A. 研究目的

公衆浴場ではレジオネラ属菌の増殖を抑えるため、主に次亜塩素酸ナトリウム(遊離塩素)による浴槽水の消毒が実施されている。ただし、アンモニア態窒素、鉄、マンガ、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、前述の泉質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*等の従属栄養細菌の増加が報告されている<sup>2)</sup>。*M. phlei*は非結核性抗酸菌の一種であり、感染報告の例はほとんどないが、増殖に対しては注意が払われている。我々はこれまでにその様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してきた。その結果、有機物を多く含む温泉2施設においては、16S rDNA コピー数の増加や、自然環境由来と思われる細菌の割合増加(菌叢の変化)が認められている<sup>3,4)</sup>。しかし、16S rDNA コピー数や菌叢解析結果は死菌を含むPCRを使用したもので、必ずしも生菌の増加を示していない点に注意が必要であった。

そこで本研究では、pH10程度の温泉を利用した公衆浴場において、生菌を検出するEMA(Ethidium monoazide)-PCRの手法を用いて、モノクロラミン消毒の消毒効果、菌叢に与える影響を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 対象施設

協力を得た対象施設は、消毒に影響を与える物質をほとんど含まない、pH10.1の源泉水を利用していた(表1)。試験対象浴槽は約40 m<sup>3</sup>の内湯とした。入浴者数は1日に100~300名程度で、浴槽水の循環ろ過系統を有しており、少なくとも1週間に1回の換水と清掃をしていた。

### (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、対象浴槽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3~5 mg/Lの範囲となるように一定の注入量を設定した。

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、約1時間の循環を行い、配管を消毒した。消毒後、浴槽水はチオ硫酸ナトリウムで中和後全て排水し、浴槽を洗浄した。

### (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3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「ニスイ」を用いて 35°C で 24 時間培養した。一般細菌は、標準寒天培地を用いて 35°C で 48 時間培養した。従属栄養細菌は、R2A 寒天培地を用いて 42°C で 14 日間培養した。標準寒天培地および R2A 培地から、代表株の 16S rDNA 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。

遺伝子解析に用いる浴槽水 3L をろ過と遠心分離で 10,000 倍に濃縮し、死菌の影響を抑制するための EMA 処理サンプルと非処理サンプルに分割した。EMA 処理は、グラム陽性菌用と陰性菌用試薬がある Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positive または Gram Negative、タカラバイオ)を用いて、4°C、5 分間処理し、15 分間 LED Crosslinker (タカラバイオ)で光照射した。なお、結果にある通り、グラム陽性陰性にはほぼ違いがなく、菌叢解析の一部は平均を求めた。DNA 抽出は NucleoSpin Soil (タカラバイオ)を用いた。浴槽水中の 16S rDNA コピー数の定量は Clokie らの方法<sup>5)</sup>により行った。モノクロラミン導入前

後のコピー数を比較し、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。また、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を行った (生物技研)。

### C. 研究結果および考察

浴槽水のレジオネラ属菌は、モノクロラミン導入前の 1 検体から血清群型別不能の *Legionella pneumophila* が検出され、定量値は 10 CFU/100 mL であった。他のサンプルは全て検出下限値未満であった。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)。モノクロラミンは pH10 の泉質においてもレジオネラ属菌を安定的に抑制でき、良好な衛生状態を維持できることを再確認できた。

浴槽水中の一般細菌数はいずれも 100 CFU/mL 程度かそれ以下であり、モノクロラミン消毒の導入前後に、菌数の有意な変化はなかった。また、従属栄養細菌数についても同様に 100 CFU/mL 程度かそれ以下であり、モノクロラミン導入後に増加しなかった (図 2)。

浴槽水中の 16S rDNA コピー数は、モノクロラミン導入後に増加傾向にあったが、(グラム陽性菌用と陰性菌用のいずれにおいても)、EMA 処理により大きく減少し、導入前の EMA 処理サンプルと同等となった (図 3)。すなわちモノクロラミン導入後に、細菌の増殖はなく、EMA 未処理の 16S rDNA コピー数は死菌が多く含まれていたと考えられた。その理由については、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>6)</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 を検出した可能性が考えられた。

以前の実証試験では、従属栄養細菌数が 100~5,000 倍程度増加した施設があった一方で、変化がない施設もあった<sup>3,4,7)</sup>。今回の施設も含め、増加しない施設の共通点として、浴槽水の pH が 10 程度であることと、一日の入浴者数が比較的少数 (100~300 名) であることが挙げられる。ただし、pH10 程度であっても消毒が不十分な場合に従属栄養細菌の増殖が確認されており<sup>7)</sup>、入浴者による汚染の負荷量が従属栄養細菌の増殖に関連している可能性が高いと考えられた。

浴槽水の菌叢解析で属や種まで判明したのものとして、モノクロラミン導入前は、温泉や河川などの水環境中に存在する<sup>8)</sup> *Porphyrobacter* 属菌が優占種であった。導入後は、洗濯物など生活環境中に存在する<sup>9)</sup> *Moraxella osloensis* や、ヒトの皮膚の常在菌<sup>10)</sup>である *Corynebacterium* 属菌の存在割合が高く、菌叢が変化していた。モノクロラミン導入前後のいずれにおいても、*Staphylococcus* 属菌が一定の存在割合を示した (図 4A)。

モノクロラミン消毒の導入により菌叢が変化することは以前の試験でも確認されており<sup>3,4)</sup>、今回はヒトの常在菌の増加が確認された (図 4A)。細菌数自体に大きな変化はなく低濃度 (概ね 100 CFU/mL 以下) であり、営業終了後の浴槽水から検出されるものは入浴の結果であり、病原細菌が増加すると言った特段の問題はなかった。

なお詳細は示していないが、グラム陽性菌用と陰性菌用の EMA 処理は、菌叢解析に大きな差異が生じることがなかったため、グラム陽性と陰性の結果を平均して用いた (図 4B)。

EMA 処理の前後で菌叢を比較したところ

*Staphylococcus* 属菌や *M. osloensis* が主要であるサンプルもあるなど、一部は類似していた。一方で、*Cutibacterium* 属菌、*Acinetobacter* 属菌など、異なる結果もあった (図 4A、4B)。一致しなかったものについては、16S rDNA コピー数がどのサンプルも低く、テンプレート DNA 量としては 10~50 コピー程度と非常に少なかったことから、解析に偏りが生じてしまったものであり、さほど強調して取り上げるものではないと考えられた。

一般細菌数測定用培地 (導入前 4 株、導入後 15 株) および従属栄養細菌数測定用培地 (導入前 6 株、導入後 13 株) からコロニーの 16S rDNA を解析した結果、導入前は *Porphyrobacter cryptus*、*Pseudomonas alcaligenes*、*Staphylococcus warneri* と、導入後は *Corynebacterium* 属菌、*Staphylococcus* 属菌 4 菌種 (*epidermidis*、*aureus*、*warneri*、*lugdunensis*)、*Streptococcus gordonii* と 441~466 塩基で 100%一致した (表 3)。これらの結果は、菌叢解析と一定の整合性が得られていた。

#### D. 結論

pH10 程度のアルカリ性温泉において、モノクロラミン消毒によるレジオネラ属菌に対する消毒効果を再確認することができた。一般細菌数、従属栄養細菌数の増加はなかった。モノクロラミン消毒時に増加傾向にあった 16S rDNA コピー数は、EMA 処理により遊離塩素消毒時と同程度まで低下した。モノクロラミン消毒により菌叢の変化が生じ、自然環境由来の菌種から、生活環境やヒト常在菌の菌種に変化したと考えられた。

## 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, 植松香星, 望月映希, 鶴田英美, 山上隆也, 久田美子, 田中慶郎, 杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二: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, 厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合研究事業)公衆浴場の衛生管理の推進のための研究 令和4年度分担研究報告書
5. Clokie BGJ, Elsheshtawy A, Albalat A, Nylund A, Beveridge A, Payne CJ, MacKenzie S: Optimization of Low-Biomass Sample Collection and Quantitative PCR-Based Titration Impact 16S rRNA Microbiome Resolution. *Microbiol Spectr.* 2022 21;10(6):e0225522.
6. 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
7. 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
8. Kristyanto S, Lee SD, Kim J: *Porphyrobacter algicida* sp. nov., an algalytic bacterium isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 ;67(11):4526-4533.
9. Kubota H, Mitani A, Niwano Y, Takeuchi K, Tanaka A, Yamaguchi N, Kawamura Y, Hitomi J: *Moraxella* species are primarily responsible for generating malodor in laundry. *Appl Environ Microbiol.* 2012 78(9):3317-24.
10. Ahmed N, Joglekar P, Deming C; NISC Comparative Sequencing Program; Lemon KP, Kong HH, Segre JA, Conlan S: Genomic characterization of the *C. tuberculostearicum* species complex, a

prominent member of the human skin  
microbiome. mSystems. 2023  
21;8(6):e0063223.

消毒を行った高アルカリ性温泉におけ  
る菌叢解析, 令和 5 年度山梨県衛生環  
境研究所成果発表会, 2024 年 3 月, 山  
梨県

#### F. 研究発表

誌上発表

なし

口頭発表

1. 柳本恵太, 田中慶郎, 杉山寛治, 茶山  
忠久, 市村祐二, 植松香星, 山上隆也,  
久田美子, 泉山信司: モノクロラミン

#### 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	Br <sup>-</sup>	<0.1 mg/L
pH	10.1	I <sup>-</sup>	<0.1 mg/L
ORP	+48 mV	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	<0.1 mg/L
一般細菌数	1.8×10 <sup>5</sup> CFU/mL	硫黄*	<0.1 mg/L
アンモニア態窒素	0.1 mg/L	マンガンイオン	<0.1mg/L
Cl <sup>-</sup>	3.4 mg/L	総鉄イオン (鉄(II)イオン)	<0.1 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

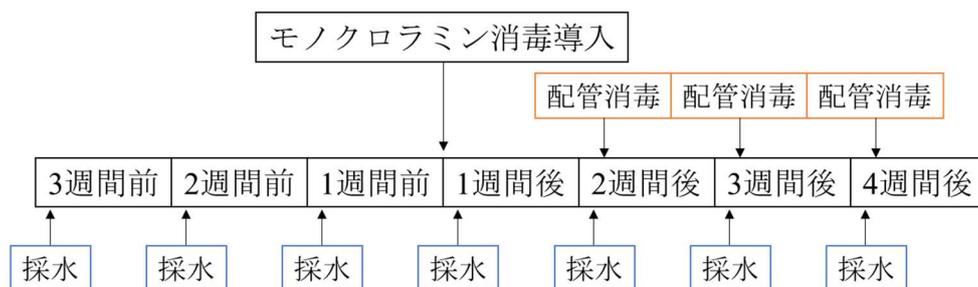


図 1. 試験期間中の採水・高濃度モノクロラミン配管消毒状況

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 3 週間前	10	0	陰性	9.9	0.4	0.5	—
導入 2 週間前	<10	0	陰性	9.8	1.2	1.4	—
導入 1 週間前	<10	0	陰性	9.9	1.2	1.3	—
-----							
導入 1 週間後	<10	0	陰性	9.7	—	5.9	6.1
導入 2 週間後	<10	0	陰性	9.8	—	4.3	4.9
導入 3 週間後	<10	0	陰性	9.8	—	3.9	4.7
導入 4 週間後	<10	0	陰性	9.8	—	4.6	5.0

—:測定なし

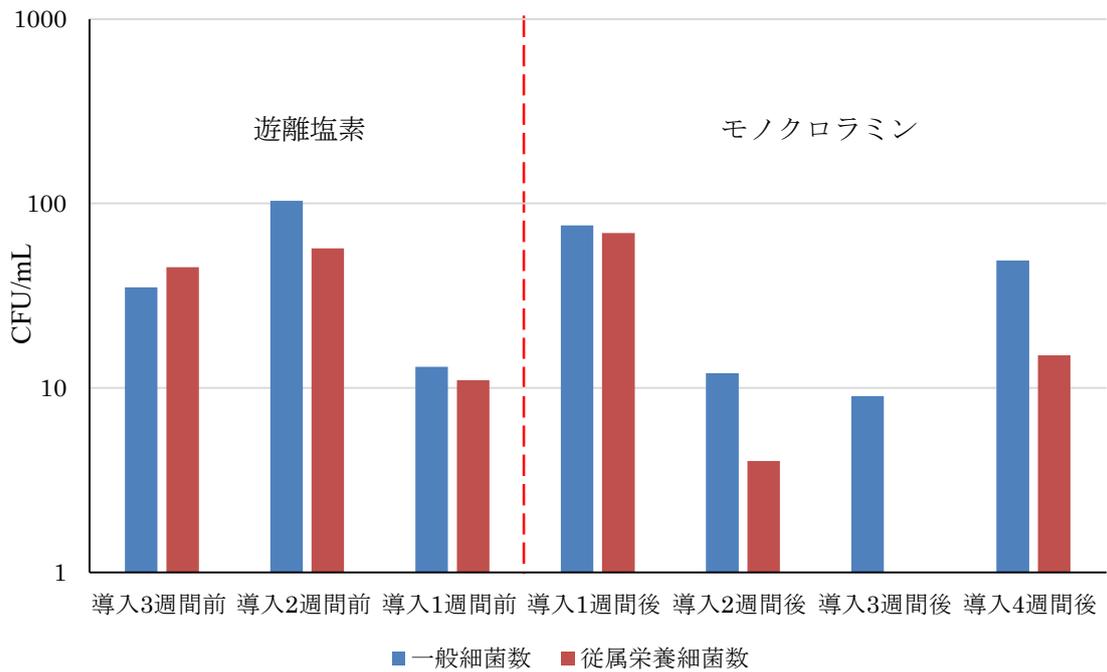
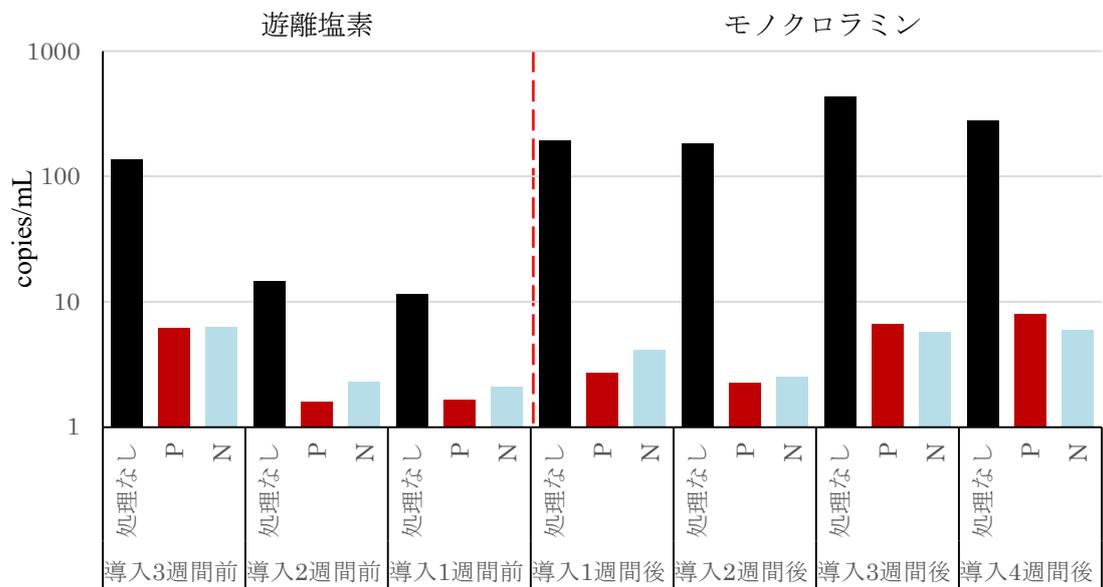


図2. 浴槽水の一般細菌数、従属栄養細菌数



P: グラム陽性菌用 EMA 試薬 N: グラム陰性菌用 EMA 試薬

図3. 浴槽水の 16S rDNA コピー数

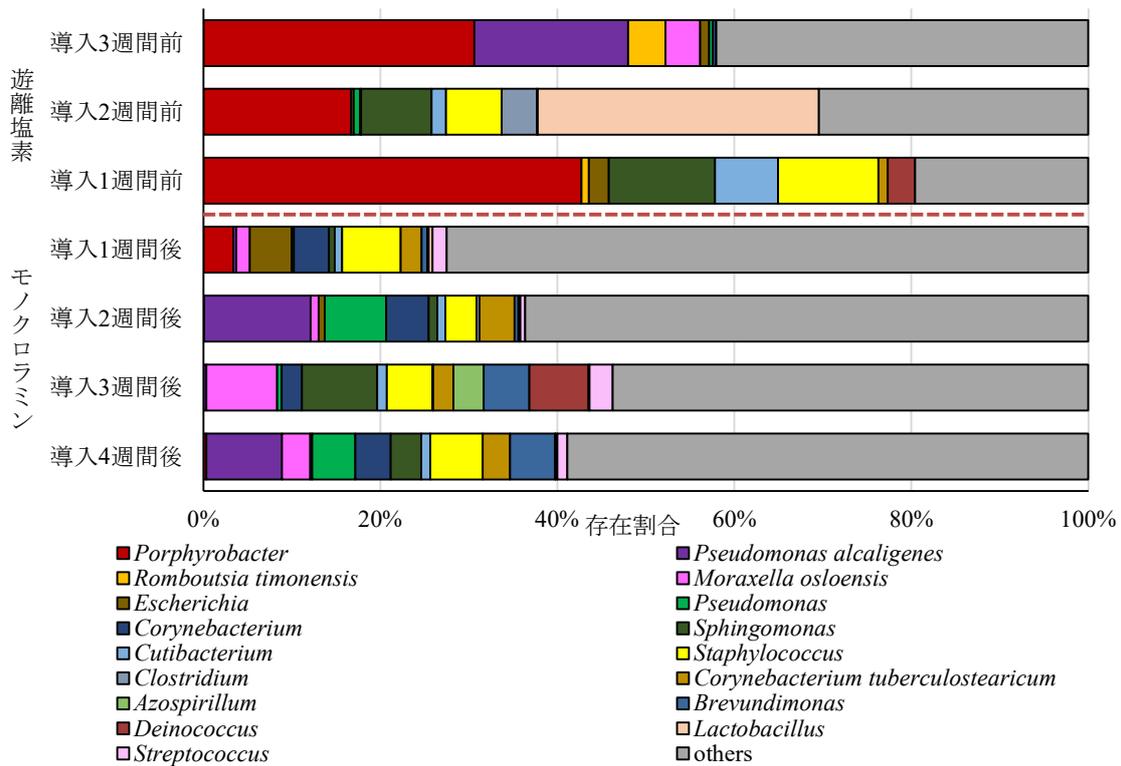


図 4. 浴槽水の菌叢解析結果 (EMA 非処理)

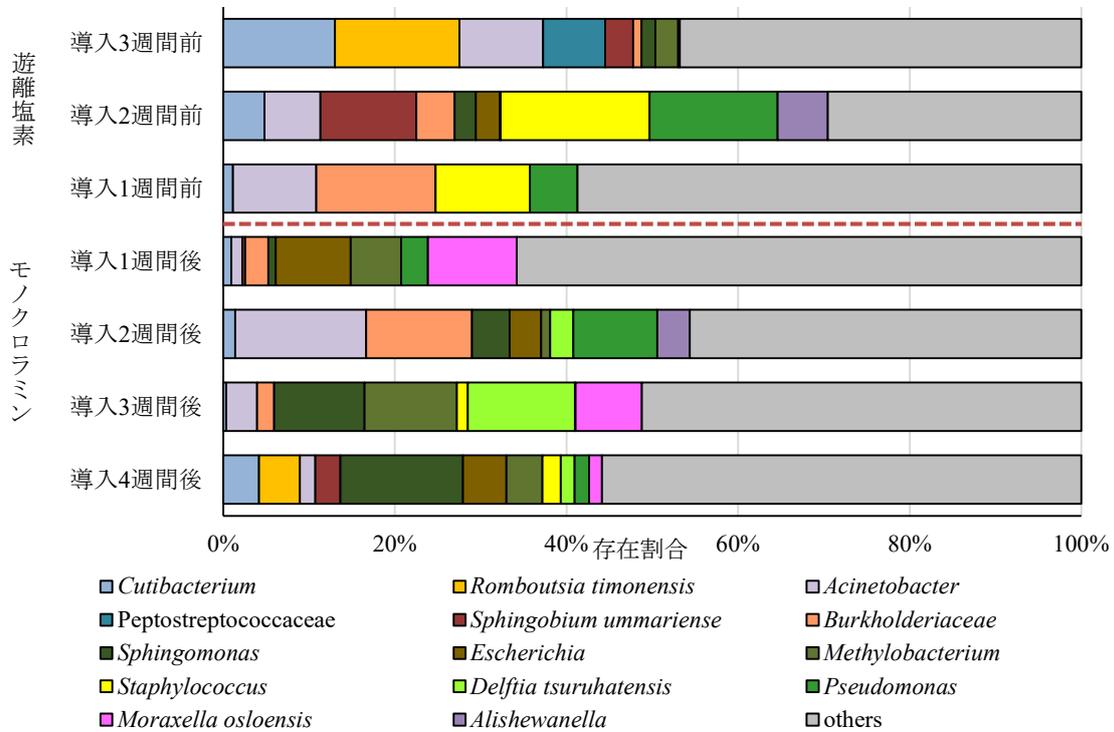


図 5. 浴槽水の菌叢解析結果 (EMA 処理)  
(グラム陽性菌用、陰性菌用の EMA 処理後の平均)

表 3. 一般細菌数と従属栄養細菌数の培養コロニーから取得した 16S rDNA の菌種 (括弧内は配列の取得回数)

	遊離塩素	モノクロラミン
一般細菌	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (2)	
	<i>Staphylococcus warneri</i> (2)	<i>Staphylococcus warneri</i> (4)
		<i>Staphylococcus epidermidis</i> (5)
		<i>Staphylococcus aureus</i> (4)
		<i>Staphylococcus lugdunensis</i> (1)
		<i>Streptococcus gordonii</i> (1)
従属栄養細菌	<i>Porphyrobacter cryptus</i> (1)	
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (2)	
	<i>Staphylococcus warneri</i> (3)	<i>Staphylococcus warneri</i> (2)
		<i>Staphylococcus epidermidis</i> (6)
		<i>Staphylococcus aureus</i> (4)
	<i>Corynebacterium</i> sp. (1)	