

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

薬湯および高アルカリ温泉水中の

*Legionella pneumophila* に対するモノクロラミンと遊離塩素の消毒効果

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	豊田真由美	三重県保健環境研究所	衛生研究課
研究協力者	亀山 有貴	三重県保健環境研究所	衛生研究課
研究協力者	谷本 健吾	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	藤井 明	健美薬湯株式会社	
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

#### 研究要旨

遊離塩素による浴槽水の消毒は、高 pH や薬湯などの条件下では効果が低下し、レジオネラ属菌による汚染が問題であった。本研究班では遊離塩素消毒の代替としてモノクロラミン消毒に着目したが、モノクロラミン消毒中に非結核性抗酸菌の一種である *Mycobacterium phlei* の増殖した浴槽水があったことから、消毒効果を詳細に検討している。本報告では、高 pH と薬湯の条件下において、レジオネラ (*Legionella pneumophila*) の不活化試験を行った。高アルカリ温泉水中の *L. pneumophila* に対して、モノクロラミンおよび遊離塩素は、比較対照の大腸菌と同程度の消毒効果が認められた。単独で浮遊するレジオネラには遊離塩素消毒の効果があっても、高アルカリ温泉のレジオネラ汚染に悩まされる状況を鑑みるに、バイオフィルムに保護された状態で浮遊するレジオネラへの消毒効果は低下し、より効果的であるモノクロラミン消毒や洗浄換水が必要と考えられた。遊離塩素の消毒効果が低下する薬湯の場合、濃度を維持できず、*L. pneumophila* に対する消毒効果がほとんど得られなかった。理由として薬湯中では、フェノール性水酸基の抗酸化作用をはじめとする植物性成分により、遊離塩素が消費され濃度が安定せず、その消毒効果が維持されないためと推測された。モノクロラミンでは濃度の問題がなく所定の消毒効果が得られた。以上の通り、薬湯および高アルカリ温泉中の *L. pneumophila* の消毒に、モノクロラミン消毒が有効であった。

## A. 研究目的

公衆浴場では、その経済性や取扱いの簡便さ等の理由から、従来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、高アルカリやアンモニア態窒素を多含するような一部の温泉では、必ずしも遊離塩素消毒が最適ではなく、こうした浴槽水にはモノクロラミン消毒が、遊離塩素に代替する消毒方法の選択肢のひとつと考えられてきている<sup>1)</sup>。モノクロラミン消毒は、厚生労働省通知にもその有用性が記載され<sup>2,3)</sup>、全国の自治体でモノクロラミン消毒の条例化の動きが広がってきた。

本研究班はこれまでに、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<sup>4,6)</sup>や、試験管内試験<sup>7)</sup>など、モノクロラミンの効果や実用性の検証を続けてきた。一方、モノクロラミン消毒の連用下で、非結核性抗酸菌 (Non-tuberculous Mycobacteria NTM) の一種である *Mycobacterium phlei* が増殖し、バイオフィルムの生成が懸念されている。*M. phlei* に対する消毒効果は、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を対照として、有効性を実験的に明らかにした<sup>8)</sup>。

高アルカリ温泉水とは別に、薬湯における消毒効果についても実地試験により報告してきた<sup>9,10)</sup>。薬湯を対象にした実地試験の場合、遊離塩素消毒では薬湯が退色し、かつ遊離塩素濃度の変動が大きく、濃度管理が困難であった。モノクロラミン消毒では、これらの問題が解消され、かつレジオネラ属菌も抑制されていた<sup>9)</sup>。

順序が逆になるが、本研究では経験的に明らかにされてきた高アルカリ温泉水と薬

湯における *Legionella pneumophila* の不活化について、*M. phlei*、*E. coli*、*B. subtilis* を比較対照とした試験管内試験により、その効果の検証を目的とした。一連の試験を総合した結果として、高アルカリ温泉水および薬湯における適切な衛生管理に資する知見が得られたので、以下に報告する。

## B. 研究方法

本研究は、先行研究の不活化試験の方法<sup>7,8)</sup>に準拠して実施した。

高アルカリ温泉水の検液として、三重県内で湧出する pH9.6 の温泉水を、オートクレーブ滅菌処理 (121°C15 分間) 後に使用した。この温泉水は、モノクロラミン消毒実地試験<sup>5)</sup>および試験管内試験<sup>7,8)</sup>で用いた温泉水と同一である。

薬湯は、過去に本研究班の実地試験において使用したことのあるケイヒ等の生薬が配合された薬湯 (健美泉、株式会社健美薬湯) を用いた。この生薬の配合品 25 g を 40°C の蒸留水 500 mL で 30 分間抽出し、規定の 1/10 の濃度で調製したりん酸緩衝液 (PBS Phosphate-buffered saline) で抽出液を 100 倍希釈し、さらにオートクレーブしたものを用いた。滅菌処理後に行った化学分析の結果を表 1 に示す。

菌株は、*L. pneumophila* の標準株 (ATCC33152) を用いた。マイクロバンク (イワキ株式会社) に -80°C 冷凍保存した菌株を、B-CYE  $\alpha$  寒天培地 (栄研化学 ポアメディア E-MP96) で 30°C4 日間好気培養し、増殖した菌を白金耳でかきとって、実験直前に菌原液を調製した。濁度により菌濃度を調整後、滅菌カップに入れた検液 200 mL に 10<sup>6</sup>CFU/mL 程度の終濃度となるよう菌

を添加した。

その後の消毒操作は、高アルカリ温泉水は消毒濃度がモノクロラミン約 3 mg/L、遊離塩素約 0.4 mg/L、薬湯はモノクロラミン約 1 mg/L、約 3 mg/L、約 5 mg/L、遊離塩素は約 0.2 mg/L、約 0.4 mg/L、約 1 mg/L の相当量をそれぞれ添加した。なお、これらの添加量は、高アルカリ温泉水と薬湯中のモノクロラミンは問題なかったが、薬湯中の遊離塩素は不足したことを後述している。各消毒液として、遊離塩素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)、モノクロラミンは次亜塩素酸ナトリウム溶液と硫酸アンモニウム溶液(同社、レジサイド)を希釈混合して用いた。消毒液の添加後、消毒時間が 15 分、30 分、45 分、60 分の時点で経時的にサンプリングし、菌および消毒の濃度測定に供した。

菌濃度測定は、サンプリング時に適量のチオ硫酸ナトリウム溶液(関東化学)にて中和した後、適宜希釈してから GVPC 寒天培地(島津ダイアグノスティクス アクキュレート 51059)を用いて、7 日間 37°C で培養した。

遊離塩素は DPD 法(ポケット残留塩素計 HACH Pocket Colorimeter II)、モノクロラミン濃度はインドフェノール法(ポケットモノクロラミン・遊離アンモニア計、HACH DR300 Pocket Colorimeter II)で測定した。なお、予め薬湯の色が各測定値に大きな影響を与えないことを確認し、念のため、測定毎にブランク補正も行った。いずれの項目も実測値 0.1 mg/L 未満は、報告下限値未満とした。消毒濃度の実測値(C)と、接触時間(T)の積から CT 値(Concentration × Time value)<sup>1)</sup>を算出した。消毒前の菌数

(N<sub>0</sub>)から消毒後の菌数(N)の割合を求め、これを対数化した細菌の生残率(Log(N/N<sub>0</sub>))を計算した。CT 値と生残率から不活化曲線をプロットした。

### C. 研究結果および考察

高アルカリ温泉水中の *L. pneumophila* をモノクロラミンと遊離塩素により消毒した(図 1・図 2)。モノクロラミンと遊離塩素のいずれにおいても、レジオネラは *E. coli* と同程度に不活化され、いずれも高い消毒効果が確認できた。先行研究の高アルカリ温泉水の遊離塩素消毒における、*M. phlei* や芽胞を含む *B. subtilis* の不活化が進まなかったのとは異なり、レジオネラは大腸菌と同様にグラム陰性の芽胞を作らない弱い細菌であることと対応した。一方で *L. pneumophila* の遊離塩素消毒は、速やかな不活化が認められたが、実際の浴槽水ではレジオネラが検出されることがあるのと矛盾した。理由としては、試験管内で単独で浮遊するレジオネラに遊離塩素消毒の効果があっても、浴槽水中のバイオフィームで保護された状態は消毒効果が低下することが考えられた。

次に、薬湯の試験管内試験について述べる。表 1 の分析結果から、薬湯(検水)中の TOC(全有機炭素)濃度は 41.4 mg/L と、薬湯成分に起因する有機物が多量に含まれていた。特に生薬には、フェノール性水酸基を有する有機物、つまり、一般にポリフェノールと呼ばれるカテキンやタンニンをはじめとする、植物性成分が多量に含まれ<sup>12)</sup>、遊離塩素に反応して消毒が阻害される可能性が考えられた<sup>4)</sup>。

薬湯中の *L. pneumophila* をモノクロラ

ミンと遊離塩素で消毒した (図 3)。モノクロラミン消毒においては全ての CT 値においてコロニーが確認されず、最も低い CT 値の検出限界を参考表示した。少なくとも実際の不活化曲線はこれよりも傾きが大きいと考えられ、薬湯のモノクロラミン消毒は、効果が高いと考えられた。

一方、遊離塩素消毒の試験においては、検液中の濃度変化に注意を要した (図 4)。薬湯における遊離塩素濃度の減少は顕著であり、初期濃度が 0.4 mg/L の場合、15 分後には初期濃度の 3 割程度、30 分後以降は報告下限値 (0.1 mg/L) 未満となった。表 1 のとおり、薬湯中にはアンモニア態窒素がほぼ含まれていないが、TOC 濃度は高く、薬湯起源の有機物が遊離塩素と反応し、塩素濃度を低下させていると推測された<sup>12,13)</sup>。

次亜塩素酸ナトリウム溶液の添加直後は *L. pneumophila* の菌数が減少したものの、薬湯の影響で遊離塩素濃度が消失し、それ以上の消毒ができていない (図 3)。実際の入浴施設における薬湯の遊離塩素消毒は、遊離塩素濃度が維持できず、結果的に *L. pneumophila* が浴槽水中に生残してしまう可能性が高いと考えられた。あるいは無理をして多量の次亜塩素酸ナトリウムを添加することで、レジオネラを不検出にできるのかもしれないが、先の報告のように薬湯の色が消失したり、もしかして薬湯成分が塩素と反応して効能を失ったり変質する様なことが懸念された。

#### D. 結論

高アルカリ温泉水と薬湯中の *L. pneumophila* に対して、試験管内消毒試験を行い、モノクロラミンによる不活化効果

を改めて検証した。高アルカリ温泉水中の *L. pneumophila* に対して、モノクロラミンおよび遊離塩素は、比較対照の大腸菌と同程度の消毒効果が認められた。薬湯中の *L. pneumophila* に対して、遊離塩素よりモノクロラミンの方が高い消毒効果が得られた。薬湯の消毒には、濃度が不安定となる遊離塩素消毒よりも、濃度安定性の高いモノクロラミン消毒が有効であった。

#### 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. 公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について、令和元年 9 月 19 日生食発 0919 第 8 号厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知 (令和 2 年 12 月 10 日生食発 1210 第 1 号一部改正)。
3. 循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル、令和元年 12 月 17 日薬生衛発 1217 第 1 号厚生労働省医薬・生活衛生局 生活衛生課長通知。
4. 柳本恵太, 泉山信司, 森 康則, 長岡宏美 他: 高 pH 温泉、有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒、厚生労働科学研究費補助金 (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)より、令和元～3年度 総合研究報告書。
5. 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.
  6. 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, 2021, **49**, 261-267.
  7. 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸浩, 枝川亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子, 温泉浴槽水中の *Mycobacterium phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素による消毒効果, 2022, 温泉科学, **72**, 26-37.
  8. MORI, Y., NAGAI, Y., SATO, D., TOYODA, M., KAMEYAMA, Y., TANIMOTO, K., KOBAYASHI, A., YOSHIMURA, H., IZUMIYAMA, S., Effects of monochloramine and free disinfection on alkaline hot spring water as shown by inactivation experiments with *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*, 2023, J. Hot Spring Sci., **73**, 46-55.
  9. 泉山信司, 藤井 明 他: 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 30 年度分担研究報告書。
  10. 藤井 明, 渡邊貴明, 松田宗大, 松田尚子, 小倉 徹, 植園健一, 枝川亜希子, 泉山信司, 薬湯使用時におけるモノクロラミン消毒の有用性評価, 2019, 第 46 回建築物環境衛生管理全国大会, 東京都。
  11. Hermanowicz, S.W., 微生物起因の水質: 規制, 科学, 工学, 1999, 水道協会雑誌, **68(7)**, 53-63.
  12. 谷真理子, 桜井智香, 田子元美, 田中美穂, 奥村美保, 臼田美香, Ngheim Nguyet Thu, 宇都春美, 清瀬千佳子, 貴堂としみ, 佐竹元吉, 近藤和雄: 各種生薬の LDL に対する抗酸化能の検討, 2003, 日本未病システム学会雑誌, **9**, 243-246.
  13. 柳本恵太, 泉山信司 他: 有機物を含む温泉におけるモノクロラミン消毒, 厚生労働科学研究費補助金(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)より、令和 3 年度分担研究報告書。

## F. 研究発表

### 誌上発表

1. Mori Y, Nagai Y, Sato D, Toyoda M, Kameyama Y, Tanimoto K, Kobayashi A, Yoshimura H,

Izumiyama S. Effects of monochloramine and free disinfection on alkaline hot spring water as shown by inactivation experiments with *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*, 2023, J. Hot Spring Sci., **73**, 46-55.

口頭発表

1. 森 康則, 永井佑樹, 佐藤大輝, 豊田真

由美, 亀山有貴, 谷本健吾, 小林章人, 吉村英基, 泉山信司, 高アルカリ温泉水中のモノクロラミンと遊離塩素による *Mycobacterium phlei* と枯草菌、大腸菌の消毒効果の比較, 日本温泉科学会第 76 回大会, 2023 年 9 月, 山口県.

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. 薬湯（希釈後の検液）の化学分析結果

項目	分析結果*1	分析方法*2
pH	7.33	pH/EC 計 <sup>1)</sup>
EC (mS/m)	185.8	
TOC	41.4	TOC 計 <sup>2)</sup>
Na <sup>+</sup>	371.8	AAS 法 <sup>3)</sup>
K <sup>+</sup>	22.4	
Mg <sup>2+</sup>	0.2	
Ca <sup>2+</sup>	0.2	
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N)	<0.1 (<0.1)	IC 法 <sup>4)</sup>
F <sup>-</sup>	0.3	IC 法 <sup>5)</sup>
Cl <sup>-</sup>	493.8	
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	93.7	
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.7	
H <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	2.7	ICP-AES 法 <sup>6)</sup>
HBO <sub>2</sub>	0.3	

\*1 表記のない箇所の単位は mg/L

\*2 使用分析機器は以下の通り：

- 1) TOA DKK MM-60
- 2) SHIMADZU TOC-V CPH
- 3) SHIMADZU AA-7000
- 4) Thermo DIONEX ICS-5000 EG
- 5) SHIMADZU HIC-ESP
- 6) SHIMADZU ICP-8100

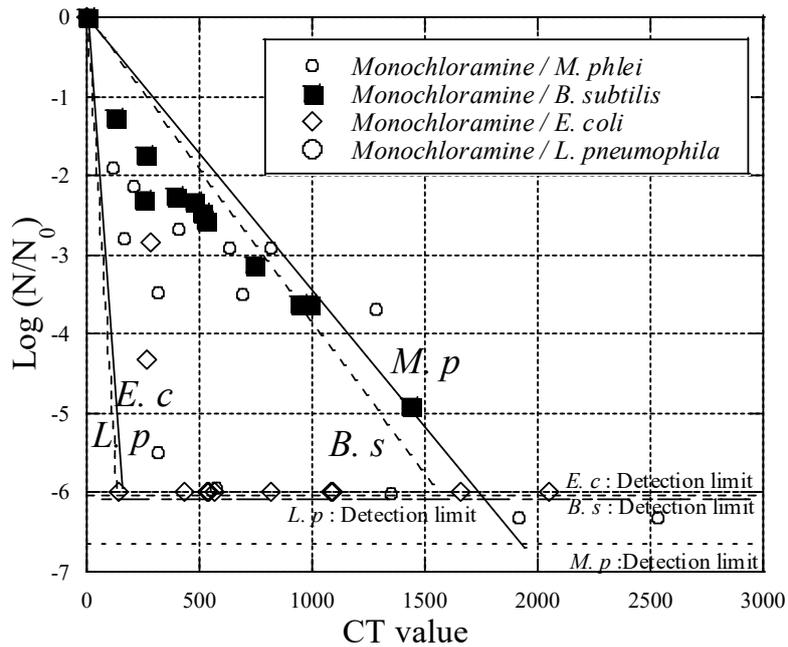


図1 高アルカリ温泉水中の *L. pneumophila*、*M. phlei*、*B. subtilis*、*E. coli* に対するモノクロアミン消毒の不活化の比較。実線が *M. phlei*、*E. coli*、破線が *L. pneumophila*、*B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。なお、*M. phlei*、*B. subtilis*、*E. coli* のデータについては、Mori *et al.*(2023) (文献 8) を用いた (図 2 も同じ)。

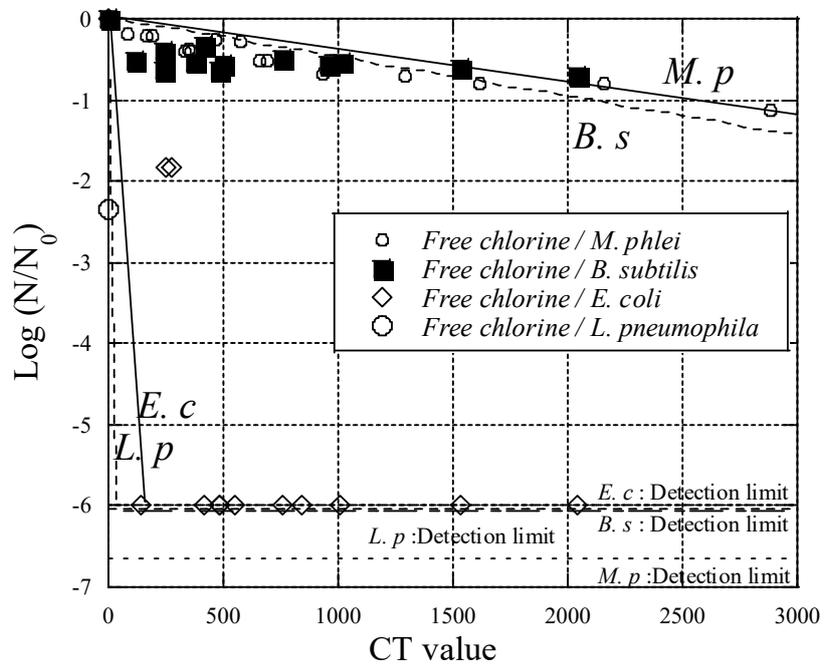


図2 高アルカリ温泉水中の *L. pneumophila*、*M. phlei*、*B. subtilis*、*E. coli* に対する遊離塩素消毒の不活化の比較。実線が *M. phlei*、*E. coli*、破線が *L. pneumophila*、*B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。

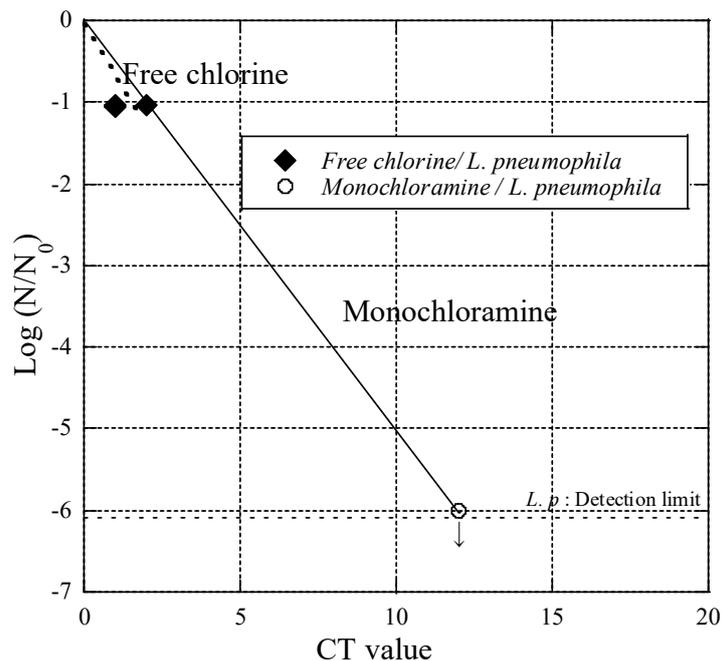


図3 薬湯中の *L. pneumophila* に対するモノクロラミン、遊離塩素消毒の不活化の比較。実線がモノクロラミン消毒、破線が遊離塩素消毒による不活化をそれぞれ示す。モノクロラミンの最も低い CT 値の条件下で菌数が検出限界未満に達していた (○) に ↓ 矢印で表示。不活化曲線は、最も CT 値が低いプロットと原点を結んだ線を参考表示した。遊離塩素消毒は、薬湯で塩素が消費されたことにより、低い CT 値 (CT2 以下) しか得られていない。

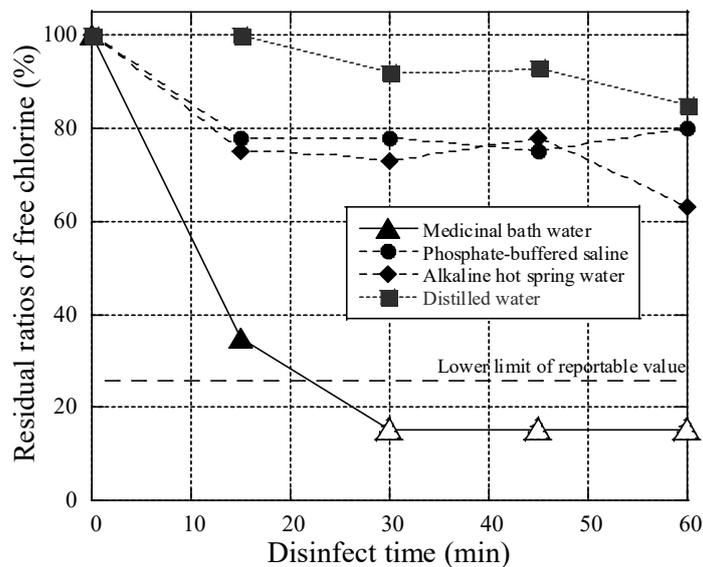


図4 各検液における遊離塩素濃度の経時変化。全ての検液で、遊離塩素濃度の初期濃度が 0.4mg/L となるよう相当量を添加した。なお、薬湯の 30 分後、45 分後、60 分後は、報告下限値未満まで低下し、偽陽性の可能性も考えられるため、△プロットの参考表示とした。