

令和 6 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

アルカリ性温泉 (pH10) におけるモノクロラミンの消毒効果と菌叢に与える影響

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	高村 知成	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	土屋 邦男	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

研究要旨

アルカリ性温泉では遊離塩素による消毒効果が低下するが、結合塩素のモノクロラミンはレジオネラ属菌を抑制することが確認されている。一方、モノクロラミン消毒下で従属栄養細菌数や 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、他の病原細菌が生じていないか懸念される。本研究では、アルカリ性温泉のモノクロラミン消毒において、消毒効果と菌叢への影響を検討した。pH10 のアルカリ性温泉の公衆浴場 1 施設の協力により、モノクロラミン消毒の実証試験を行った。生菌と死菌の両方を検出する通常の PCR 検査だけでなく、生菌を検出する PMA-PCR を用いて、菌叢の変化を確認した。その結果、モノクロラミン消毒導入前に検出されたレジオネラ属菌が導入後は不検出となり、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であることを再確認した。従属栄養細菌数と一般細菌数はモノクロラミン導入後に減少したが、16S rDNA コピー数は PMAxx 処理の有無に関わらず導入前と同等であった。菌叢解析の結果は、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、ヒトの皮膚由来と思われる *Staphylococcus* 属菌などの割合が増加した。PMAxx 処理時に培養陰性であったレジオネラ属菌の割合が増加したが、絶対数が増加したわけではなく、死菌を含む培養不能菌と考えられた。その他の病原細菌の増加は認めなかった。今回の実証試験では従属栄養細菌数や 16S rDNA コピー数の増加や病原細菌の増殖はなく、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たと考えられた。

A. 研究目的

レジオネラ属菌の増殖を抑えるため、公衆浴場では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で生成される結合塩素の一種であるモノクロラミンは、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¹⁾。ただしモノクロラミン消毒を継続して実施すると *Mycobacterium phlei* 等の従属栄養細菌が増加することがある²⁾。*M. phlei* は非結核性抗酸菌の一種であり、感染報告の例はほぼないが、バイオフィーム形成防止の観点からも、増殖に対しては注意が必要である。我々はこれまでにその様な病原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が菌叢に与える影響に注意を払ってきた。これまでのところ、有機物を多く含む温泉 2 施設においては、16S rDNA コピー数の増加や菌叢の変化が認められているものの、新たな病原細菌の出現は見えていない^{3,4)}。pH10 程度のアルカリ性温泉 1 施設においても同様に、死菌由来 16S rDNA コピー数が増加した一方で生菌由来は増加せず、自然環境由来細菌が減少し、ヒトの皮膚由来と思われる細菌の割合が増加した⁵⁾。

本研究ではアルカリ性温泉におけるモノクロラミン消毒の例数を増やしながら、消毒効果や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、pH9.8 の源泉水を利用していた（表 1）。試験対象浴槽は約 5 m³ の露天風呂とした。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、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、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、浴槽水のモノクロラミン濃度を 10~15 mg/L 程度に上昇させ、約 1 時間の循環を行った。

(3) 各種測定

試験に供する浴槽水は、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後の 4 週間に週 1 回、配管消毒 4 日後の営業開始前に実施した（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℃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℃で 24 時間培養した。一般細菌は、標準寒天培地を用いて 35℃で 48 時間培養した。従属栄養細菌は R2A 寒天

培地を用いて、浴槽水と同じ温度である 42℃で、14 日間培養した。モノクロラミン導入前後各 4 検体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、浴槽水を 1,000×g の 5 分間で 50 倍に遠心濃縮した濃縮試料の 1 mL について、大腸菌塗布無栄養寒天培地を用いて 40℃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。

PCR 用試料の一部は、浴槽水 1L を前述同様にろ過した後、死菌の影響を抑制するための DNA 修飾色素 (PMAxx、Biotium) で処理した。すなわち、ろ過装置上で濃縮操作後のフィルターに、PMAxx を加えて 5 分間待機した後、シャーレに移し 45 分間 LED Crosslinker (タカラバイオ) で光照射した。PMAxx (propidium monoazide xx) は、PMA (propidium monoazide) や EMA (ethidium monoazide) より死菌を抑える効果が高いとされることから使用した。PMAxx 処理および非処理フィルターから DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行った。16S rDNA コピー数の定量は Clokie らの方法⁶⁾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、PMAxx 処理の有無別に前述の比較と同じ、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 領域を対象として、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)。菌叢の割合は、モ

ノクロラミン消毒導入前後と PMAxx 処理の有無別にそれぞれ 4 週間分のデータを平均した。病原性細菌の種類については、少なくとも 1% 以上の存在割合の範囲に病原菌としての報告があるかを確認した。

C. 研究結果および考察

モノクロラミン導入前の全 4 検体から *Legionella pneumophila* 血清群 1 (および型別不能) が検出され、定量値は 70~300 CFU/100 mL であった。自由生活性アメーバについても、導入前の浴槽水 3 検体から検出された。大腸菌群はいずれも不検出であった (表 2)。モノクロラミン導入後は、浴槽水のレジオネラ属菌および自由生活性アメーバが安定的に抑制され、良好な衛生状態が得られることを再確認できた。

浴槽水中の一般細菌数はモノクロラミン消毒導入前に 300~5,000 CFU/mL 程度であったのに対し、導入後には 14 CFU/mL が 1 検体、検出下限値未満が 3 検体と有意に減少した。また、従属栄養細菌数については導入前には 400~24,000 CFU/mL 程度、導入後は 1~4 CFU/mL と、一般細菌数と同様に大幅に減少した (図 2)。なお、従属栄養細菌が大きく減少したのに対して有意差 (t 検定で $p=0.06$) ありとならなかったが、サンプル数が 4 と少ないのと、標準偏差が大きかったことが理由と考えられた。

これまでの実証試験では、従属栄養細菌数が増加した施設があった一方で、増加のない施設もあった^{3,4,7)}。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小数 (100~300 名) であり、汚染の負荷量と洗浄の頻度や程度、バイオフィルムの蓄積の有無が関連していると

考えられる。増加している従属栄養細菌の主な菌種としては *M. phlei* が確認されており^{2,4)}、非結核性抗酸菌の一種であり、感染報告の例はほぼないが、バイオフィルム形成防止の観点からも、増殖に対して注意を払っている。

浴槽水中の 16S rDNA コピー数は、モノクロラミン導入前後で有意な変化はなく、PMAxx 処理サンプルでは非処理サンプルと比較し 1/10~1/60 程度に減少した(図 3)。以前の実証試験では従属栄養細菌数、16S rDNA コピー数の両方が増加した場合⁴⁾、前者は減少し後者が増加した場合³⁾、後者だけが増加傾向にあった場合⁵⁾があったが、今回は前者は減少し後者は変化がなかった。モノクロラミン消毒で一定の結果になるとは限らず、雑菌とバイオフィルムの蓄積を防ぐように、洗浄の徹底が大事と考えられた。

浴槽水の菌叢解析の結果、モノクロラミン導入前の PMAxx 非処理サンプルでは、温泉、湖や土壌などの自然環境中に存在する⁸⁻¹²⁾ *Porphyrobacter* 属菌、*Pseudomonas alcaligenes*、*Aquidulcibacter* 属菌、*Tepidimonas fonticaldi*、*Acidovorax lacteus* が優占種であった。導入後は、これらの割合は大きく減少し、ヒトの皮膚の常在菌¹³⁾である *Staphylococcus* 属菌や *Corynebacterium tuberculoostearicum* の存在割合が増加するなど菌叢が変化した。病原菌として報告されている細菌の割合は増加しなかった。

PMAxx 処理をした場合、導入前では *Porphyrobacter* 属菌などの割合が PMAxx 非処理と変わらなかった一方で、割合が減少した *P. alcaligenes*、*Aquidulcibacter* 属菌の多くは死菌で、これらの菌種は遊離塩素消毒により死菌となったと考えられた。導入後

では導入前の PMAxx 処理時に優占していた *Porphyrobacter* 属菌、*Tepidimonas fonticaldi*、*Acidovorax lacteus* が大きく減少した。これらはモノクロラミン消毒により死菌となったと考えられた。

病原菌では、導入後の PMAxx 処理サンプルは非処理サンプルと比較し *Legionella* 属菌の割合が増加したが、培養からは検出されなかった(表 2)ため、病原性がないか弱いとされている^{14,15)}培養不能(VBNC)状態の同菌または死菌が検出されたと考えられた(図 4)。これに加えて、PMAxx 処理により検出できる全体の遺伝子量が減少したことにより、*Legionella* 属菌の割合が増加したと考えられた。これ以外では 1%以上の存在割合の範囲に病原菌は確認できなかった。

今回の試験において、モノクロラミン導入によりレジオネラ属菌の陰性化、一般細菌数、従属栄養細菌数の減少、菌叢の変化が確認された。16S rDNA コピー数に変化はなかったが、菌叢が変化したことにより一般細菌、従属栄養細菌として検出できない菌種が優占種となり、細菌数自体には大きな変化がなかった可能性が考えられる。または、細菌数自体は減少したが、遊離塩素と比較するとモノクロラミンは DNA の分解能力が低い¹⁶⁾ため、死菌由来 DNA が多く残存し、PMAxx 処理でも抑えきれずに高い値となったかもしれない。PMA 処理は完全に死菌を抑えるものではなく、多少なりと死菌が残ることから、EMA、PMA や PMAxx といった、より性能が良い化合物が求められてきた経緯がある。他に、モノクロラミンは VBNC 状態を誘起する可能性が指摘されている¹⁷⁾ため、培養では検出できないが生菌由来の 16S rDNA で検出できる状況となった可能性もある。これらのうち複数の要因が重

なって従属栄養細菌数と 16S rDNA コピー数の多寡に影響を与えた可能性が考えられた。

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、従属栄養細菌数は減少したが、16S rDNA コピー数は大きな変化がなかった。モノクロラミン消毒により菌叢の変化が生じたと考えられた。培養と菌叢解析の結果から病原菌の増加はなかったと考えられ、モノクロラミン消毒により良好な衛生状態に維持できたと考えられた。

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¹⁰⁾ 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: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. 柳本恵太, 植松香星, 山上隆也, 久田美子, 田中慶郎, 杉山寛治, 茶山忠久, 市村祐二: 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, 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5年度分担研究報告書
6. 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.
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, 防菌防黴, 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. Batrich M, Maskeri L, Schubert R, Ho B, Kohout M, Abdeljaber M, Abuhasna A, Kholoki M, Psihogios P, Razzaq T, Sawhney S, Siddiqui S, Xoubi E, Cooper A, Hatzopoulos T, Putonti C: *Pseudomonas* diversity within urban freshwaters. Front Microbiol. 2019; 10:195.
 10. Iwashita T, Tanaka Y, Tamaki H, Nakai R, Yoneda Y, Makino A, Toyama T, Kamagata Y, Morikawa M, Mori K: Isolation and characterization of novel plant growth-promoting bacteria from the fronds of duckweed; Jpn J Water Treat Biology, 2021; 57(1): 1–9.
 11. Chen WM, Huang HW, Chang JS, Han YL, Guo TR, Sheu SY: *Tepidimonas fonticaldi* sp. nov., a slightly thermophilic betaproteobacterium isolated from a hot spring. Int J Syst Evol Microbiol. 2013; 63: 1810-1816.
 12. Chun SJ, Cui Y, Ko SR, Lee HG, Srivastava A, Oh HM, Ahn CY: *Acidovorax lacteus* sp. nov., isolated from a culture of a bloom-forming cyanobacterium (*Microcystis* sp.). Antonie Van Leeuwenhoek. 2017 110(9):1199-1205.
 13. Ahmed N, Joglekar P, Deming C; NISC Comparative Sequencing Program; Lemon KP, Kong HH, Segre JA, Conlan S: Genomic characterization of the *C. tuberculoستearicum* species complex, a prominent member of the human skin microbiome. mSystems. 2023 21;8(6):e0063223.
 14. Epalle T, Girardot F, Allegra S, Maurice-Blanc C, Garraud O, Riffard S: Viable but not culturable forms of *Legionella pneumophila* generated after heat shock treatment are infectious for macrophage-like and alveolar epithelial cells after resuscitation on *Acanthamoeba polyphaga*. Microb Ecol. 2015; 69(1):215-24.
 15. Dietersdorfer E, Kirschner A, Schrammel B, Ohradnova-Repic A, Stockinger H, Sommer R, Walochnik J, Cervero-Aragó S. Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. Water Res. 2018 15;141:428-438.
 16. 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
 17. Casini B, Baggiani A, Totaro M, Mansi A, Costa AL, Aquino F, Miccoli M, Valentini P, Bruschi F, Lopalco PL, Privitera G. Detection of viable but non-culturable legionella in hospital water network following monochloramine disinfection. J Hosp Infect. 2018; 98(1):46-52.
- F. 研究発表
- 誌上発表 なし
- 口頭発表 なし

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 ⁻	<0.1 mg/L
pH	9.8	I ⁻	<0.1 mg/L
ORP	+62 mV	S ₂ O ₃ ²⁻	<0.1 mg/L
一般細菌数	2.0×10 ⁴ 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 ⁻	1.7 mg/L	総鉄イオン (鉄(II)イオン)	<0.1 mg/L (<0.1 mg/L)

* 硫化水素(H₂S)、硫化水素イオン(HS⁻)、硫化物イオン(S²⁻)の合計値

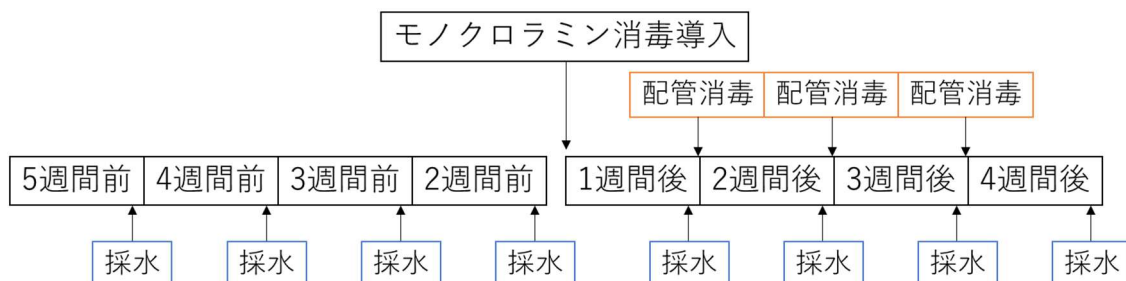


図 1. 試験期間中の採水・高濃度モノクロラミン配管消毒状況

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 5 週間前	70	0	陰性	9.7	0.1	0.2	—
導入 4 週間前	300	6	陰性	10.0	0.1	0.1	—
導入 3 週間前	80	17	陰性	10.0	0.1	0.1	—
導入 2 週間前	170	10	陰性	9.9	0.1	0.1	—
導入 1 週間後	<10	0	陰性	10.0	—	3.4	3.5
導入 2 週間後	<10	0	陰性	10.0	—	4.7	5.4
導入 3 週間後	<10	0	陰性	10.1	—	3.7	3.8
導入 4 週間後	<10	0	陰性	10.0	—	3.7	3.9

—:測定なし

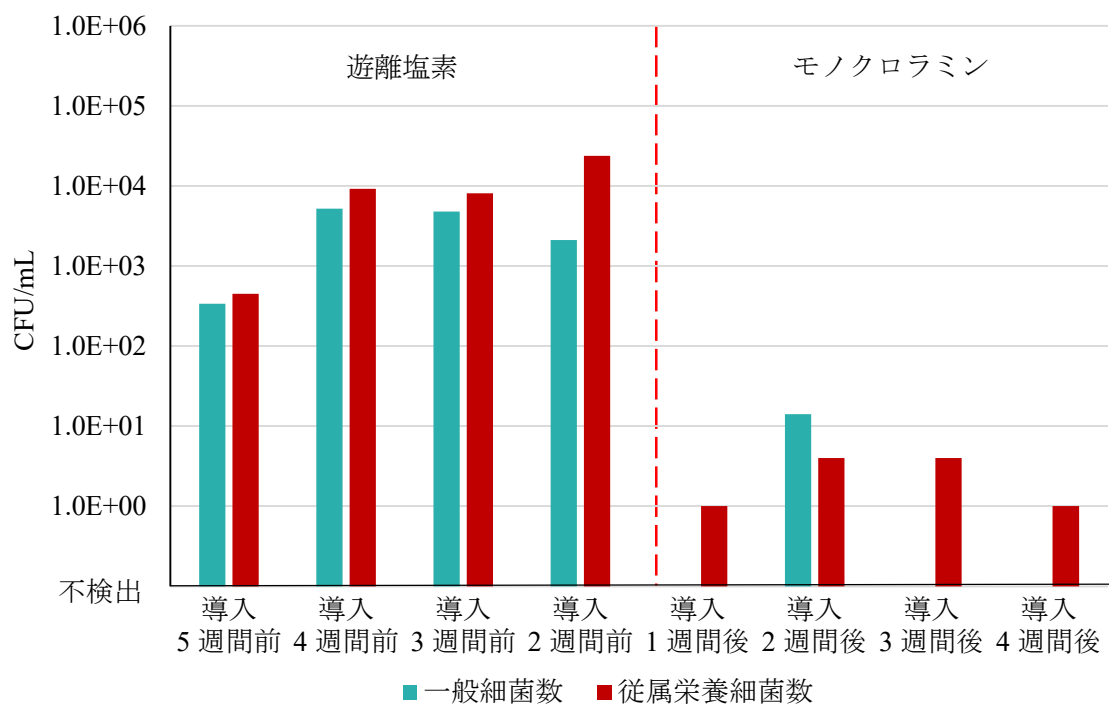


図 2. 浴槽水の一般細菌数、従属栄養細菌数

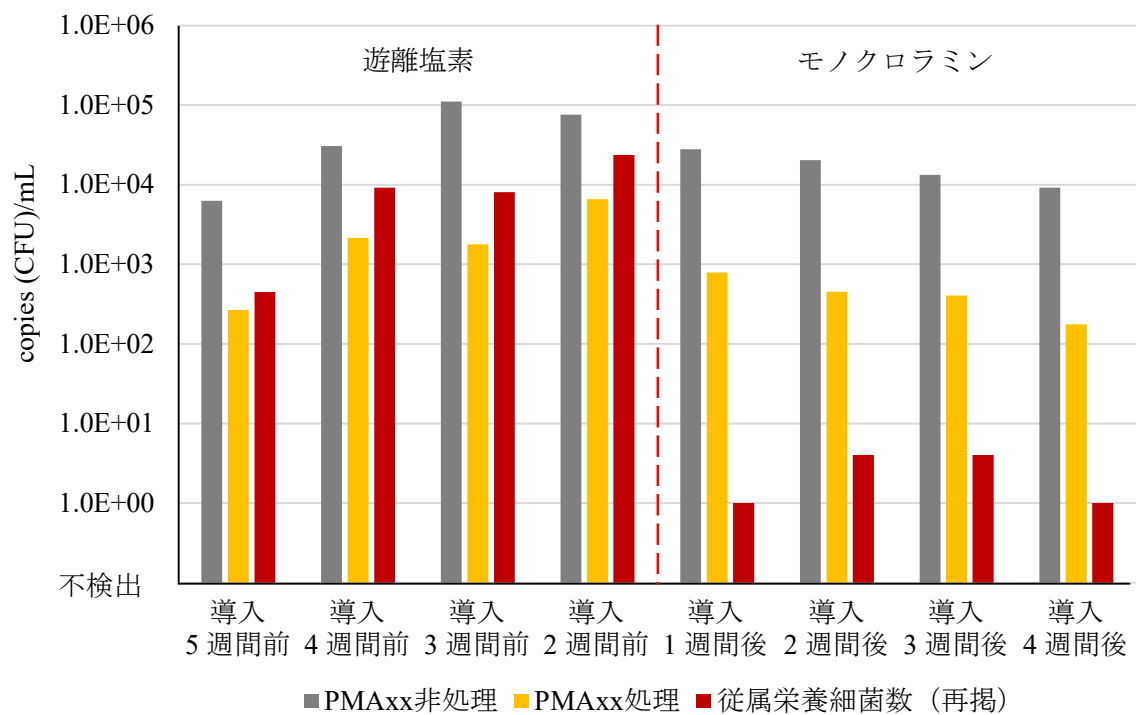


図 3. 浴槽水の 16S rDNA コピー数

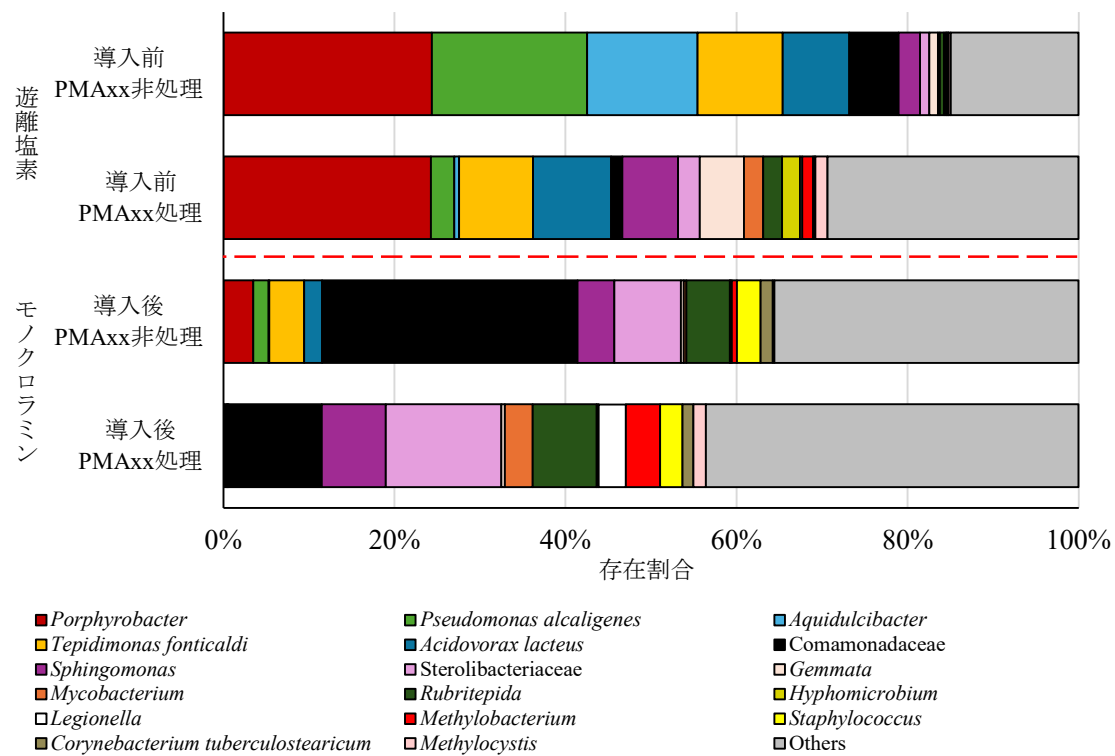


図 4. 浴槽水の菌叢解析結果（各 4 週間分データの平均）