

令和4年～6年度厚生労働科学研究(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

研究代表者 泉山 信司 国立感染症研究所 寄生動物部

### 総合研究分担報告書

#### モノクロラミン消毒による浴槽水の菌叢への影響

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	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	高村 知成	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	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

結合塩素のモノクロラミンは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、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場合があることから、菌叢の変化に懸念がある。本研究では有機物を含む温泉や高 pH の温泉を利用する 3 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、消毒効果と菌叢の変化について調査した。その結果、遊離塩素消毒時に検出されたレジオネラ属菌がモノクロラミン消毒により検出下限値未満になるなど、レジオネラ属菌に対する効果が確認された。一方で、従属栄養細菌数と 16S rDNA のコピー数の両方が増加する場合、後者のみが増加傾向にある場合、前者は減少し後者は増減のない場合があり、施設により結果が異なった。生菌のみを検出できる DNA 修飾色素を利用すると、16S rDNA のコピー数は 1/10 から 1/100 程度に減少したことから、死菌由来が多く含まれると考えられた。浴槽水の菌叢はいずれも自然環境由来と考えられる菌種が優占種であり、モノクロラミン消毒により優占種が変化した。特に高 pH の浴槽水ではヒトの皮膚の常在菌と思われる菌種の存在割合が増加した。いずれも病原菌として報告されている菌種の増加はないと考えられた。モノクロラミン消毒により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る場合もあり、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

レジオネラ症発生防止のため、次亜塩素酸ナトリウム(遊離塩素)により公衆浴場浴用水の消毒が行われている。遊離塩素は、アンモニア態窒素、鉄、マンガン、有機物を含む温泉や、高 pH の泉質の場合、効果が減弱する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、様々な温泉において、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、モノクロラミン消毒下における *Mycobacterium phlei* を主とする従属栄養細菌数の増加<sup>2)</sup>や、有機物を含む温泉では浴槽水中の 16S rDNA コピー数の増加<sup>3)</sup>が確認されている。非病原性の細菌であっても増殖によりバイオフィルムの蓄積が促進される可能性があり、細菌数の増減には注意が必要である。

従属栄養細菌の増加に伴い菌叢についても変化すると考えられるが、以前実施した試験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、不明瞭な結果であり<sup>3)</sup>、消毒方法の変更による菌叢への影響を確認する必要がある。

そこで本研究では、高 pH および有機物を含む温泉施設 3 施設の協力を得て、モノクロラミン消毒実証試験を実施した。従属栄養細菌数や 16S rDNA コピー数の増減、菌叢に与える影響について調査した。

## B. 研究方法

### 施設 1 有機物を含む源泉の温泉施設

#### (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。

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。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。

#### (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、配管消毒直前に実施した。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浴槽水と同じ 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 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。

浴槽水中の 16S rDNA 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 rDNA 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。

## 施設 2 高 pH 源泉の温泉施設の内湯

### (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 2)。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

施設 1 と同様の方法でモノクロラミンの濃度管理を行った。週 1 回、完全換水直前に浴用水のモノクロラミン濃度を 10~15 mg/L に調整し、1 時間消毒を行った。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

各種微生物試験と塩素濃度測定は、施設 1 同様、定法に従い実施した。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、配管消毒直前に実施した。

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>4)</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)。

### 施設 3 高 pH 源泉の温泉施設の露天風呂

#### (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 3)。試験対象浴槽は約 5 m<sup>3</sup> 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

施設 2 と同様の方法でモノクロラミンの濃度管理を行った。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

各種微生物試験は、施設 1 と同様であるが、自由生活性アメーバは 40°C で培養した。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。

浴槽水 1L を施設 1 と同様にろ過し、死菌の影響を抑制するための DNA 修飾色素 (PMAxx、Biotium) でフィルターを 5 分間処理後、45 分間 LED Crosslinker (タカラバイオ) で照射した。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 コピー数の定量は施設 2 と同様に行った。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)。菌叢解析の結果は、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。

### C. 研究結果および考察

#### 施設 1 有機物を含む源泉の温泉施設

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 4)

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 1)。増加した従属栄養細菌の 16S rDNA 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>5)</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。

浴槽水中の 16S rDNA 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 2)。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。

菌叢解析で属や種まで判明したものとして、モノクロラミン導入前はヒトの皮膚の常在菌である<sup>6)</sup> *Staphylococcus* 属菌、*Corynebacterium* 属菌や、水環境中に存在する<sup>7)</sup> *Aquidulcibacter* 属菌の存在割合が高かった。モノクロラミン導入後は自然環境中

に存在する<sup>8-10)</sup> *Methylococcus capsulatus*、*Thiobacillus* 属菌、*Immundisolibacter* 属菌の割合が高く、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 3)。前回の施設同様に有機物を含む源泉の温泉施設で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。

## 施設 2 高 pH 源泉の温泉施設の内湯

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 5)。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 4)。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 5)。

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>11)</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>12)</sup> *Moraxella osloensis* や、ヒトの皮膚の常在菌<sup>6)</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 6)。

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 7)。

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 6、7)。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。

## 施設 3 高 pH 源泉の温泉施設の露天風呂

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 6)。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 と標準偏差が大きく有意差ありと判定されなかったが、一般細菌数と同様に大幅に減少した (図 8)。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 9)。

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<sup>8-12)</sup> *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<sup>13)</sup>である *Staphylococcus* 属菌や *Corynebacterium tuberculostearicum* の存在割合が増加するなど菌叢が変化したが、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、*Porphyrobacter* 属菌などの割合が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ため、病原性がないか弱いとされている<sup>14,15)</sup>培養不能 (VBNC) 状態の同菌が検出されたと考えられた (図 10)。

今回試験を実施した 3 施設はいずれもモノクロラミン導入前には *Legionella pneumophila* が検出、導入後は不検出という結果で一致した。一方で、従属栄養細菌数、16S rDNA コピー数については施設ごとに異なる結果であった。具体的にはモノクロラミン導入後、施設 1 では両者ともに増加し、施設 2 では後者だけが増加傾向にあり、施設 3 では前者は減少し、後者は変化がなかった。施設 1 では *M. phlei* の増加により両者が増加したと考えられる。ただし、施設 2 および 3 で確認された EMA および PMAxx による 16S rDNA コピー数の抑制は、死菌由来 DNA の存在を明らかにしており、施設 1 でもこの影響があると考えられる。モノクロラミン消毒は遊離塩素と比較すると DNA の分解能力が低く<sup>18)</sup>、16S rDNA コピー数は従属栄養細菌数よりも増加しやすいと推定される。従属栄養細菌数については、これまでの試験結果から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。増加する従属栄養細菌の主な菌種としては、既報<sup>2)</sup>と同様に施設 1 では *M. phlei* が確認されたことから、同菌種の増殖に至適な環境であるかが重要と考えられる。菌種の同定は行っていないが、pH10 程度であっても消毒が不十分な場合には従属栄養細菌の増殖が確認されており<sup>5)</sup>、同菌が増殖できる可能性がある。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。

今回の試験では 3 施設いずれもモノクロラミン消毒の導入により菌叢が変化した。存在割合として施設 1 ではヒトの皮膚常在菌の減少と自然環境由来細菌の増加が、施

設 2 および 3 ではヒトの皮膚常在菌の増加と自然環境由来細菌の減少が確認された。このような真逆の変化が起こった原因として、いずれもヒトの皮膚常在菌の細菌数はモノクロラミン導入前後で大きく変わっていないが、自然環境由来細菌数の増減により全体の中での存在割合が変化したと考えられた。自然環境由来細菌数の増減について施設で異なる原因としては、泉質の違い以外に、施設 2 および 3 の遊離塩素消毒時の優占種である *Porphyrobacter* 属菌はモノクロラミンによる消毒効果が高く、逆に施設 1 のモノクロラミン消毒時の優占種である *Methylococcus* 属菌はモノクロラミンによる消毒効果が低いことが考えられた。いずれの施設においてもモノクロラミン消毒により病原細菌が増加すると言った特段の問題はなかった。

#### D. 結論

温泉施設 3 施設の協力を得て、3~4 週間にわたるモノクロラミン消毒の実証試験を行った。高 pH や有機物を含む温泉であっても、モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌の陰性化が可能であった。施設により従属栄養細菌数や 16S rDNA コピー数の増加が確認されたが、菌叢は自然由来またはヒト皮膚由来細菌が優占種であり、病原菌の増加はなかった。ただし、バイオフィルムの蓄積を防止するため、従属栄養細菌の増加には注意する必要がある。

#### 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. 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.
5. 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

6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.

17. Dietersdorfer E, Kirschner A, Schrammel B, Ohradanova-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.
18. 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

#### 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, 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, 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
3. 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

#### 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. 施設 1 の源泉水水質

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

表 2. 施設 2 の源泉水水質

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

表 3. 施設 3 の源泉水水質

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	9.8	I <sup>-</sup>	<0.1 mg/L
ORP	+62 mV	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	<0.1 mg/L
一般細菌数	2.0×10 <sup>4</sup> CFU/mL	硫黄 <sup>*</sup>	<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>	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(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

表 4. 施設 1 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)	モノクロアミン (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

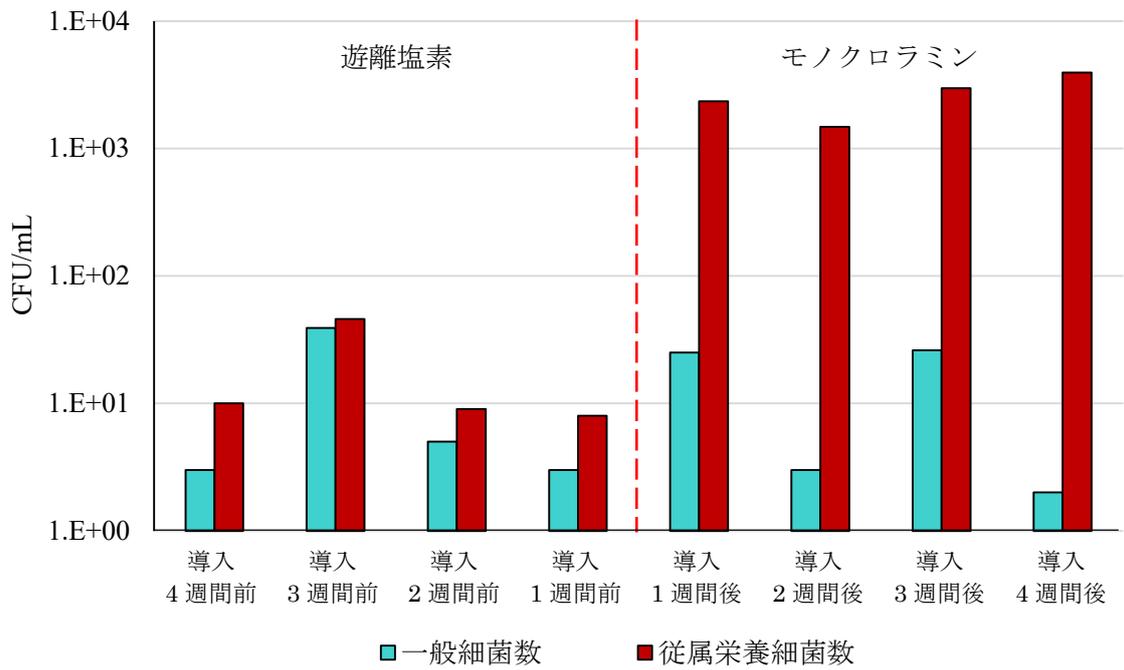


図 1. 施設 1 浴槽水の一般細菌数、従属栄養細菌数

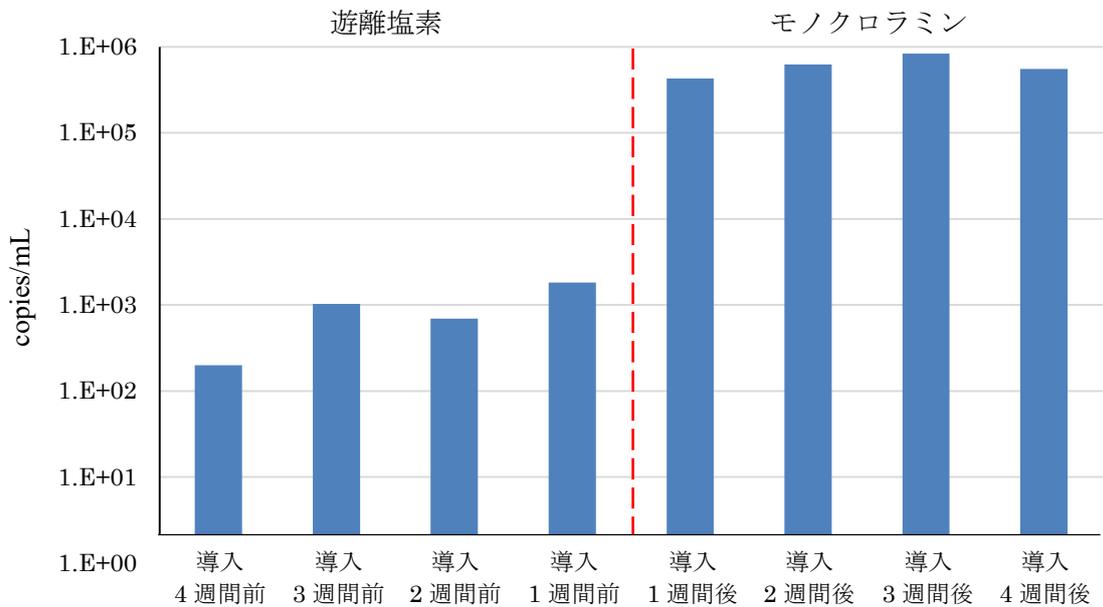


図 2. 施設 1 浴槽水の 16S rDNA コピー数

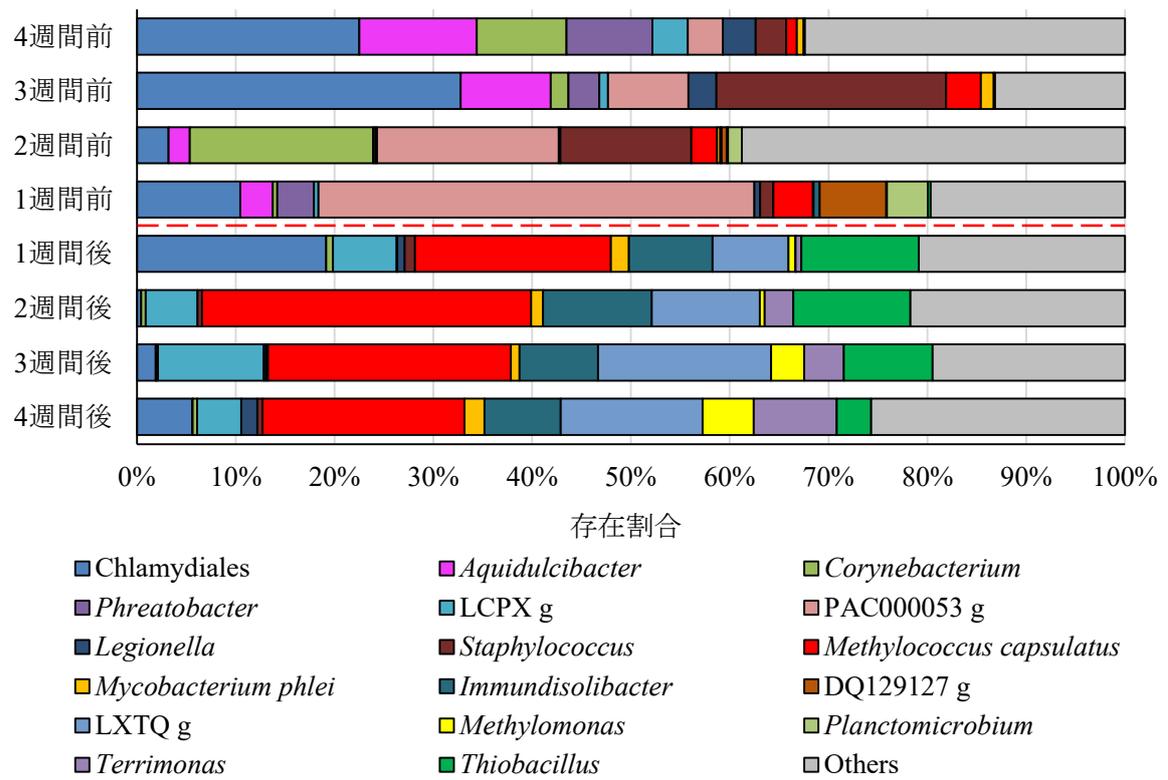


図 3. 施設 1 浴槽水の菌叢解析結果

表 5. 施設 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)	モノクロアミン (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

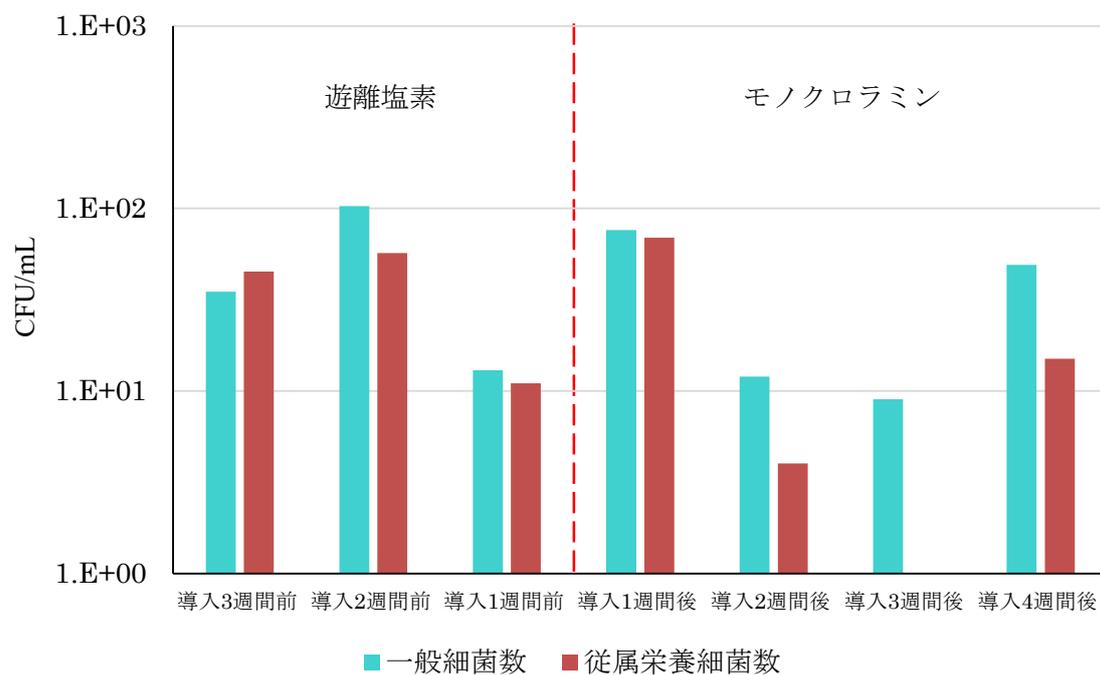
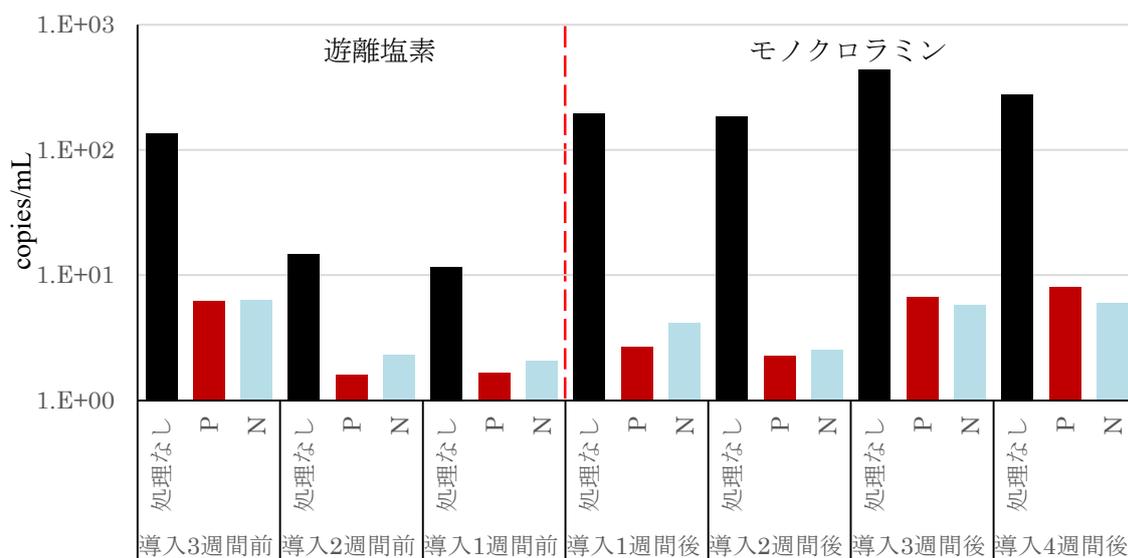


図 4. 施設 2 浴槽水の一般細菌数、従属栄養細菌数



P: グラム陽性菌用 EMA 試薬 N: グラム陰性菌用 EMA 試薬

図 5. 施設 2 浴槽水の 16S rDNA コピー数

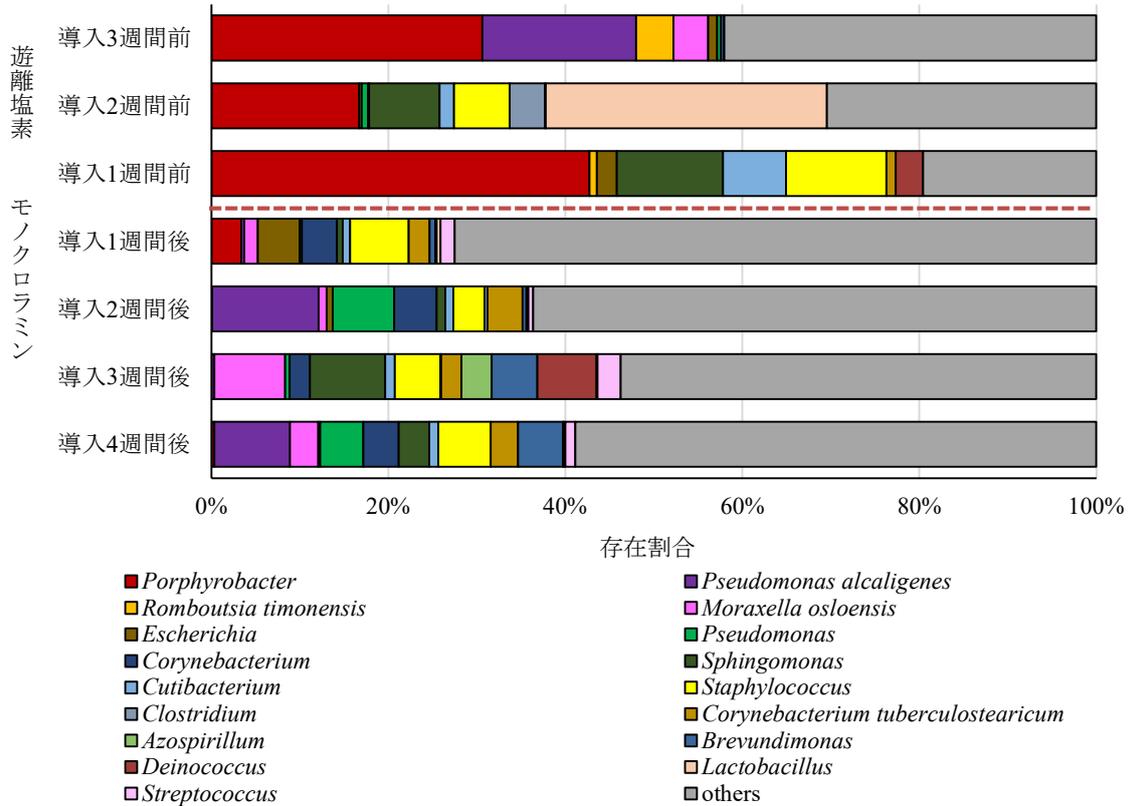


図 6. 施設 2 浴槽水の菌叢解析結果 (EMA 非処理)

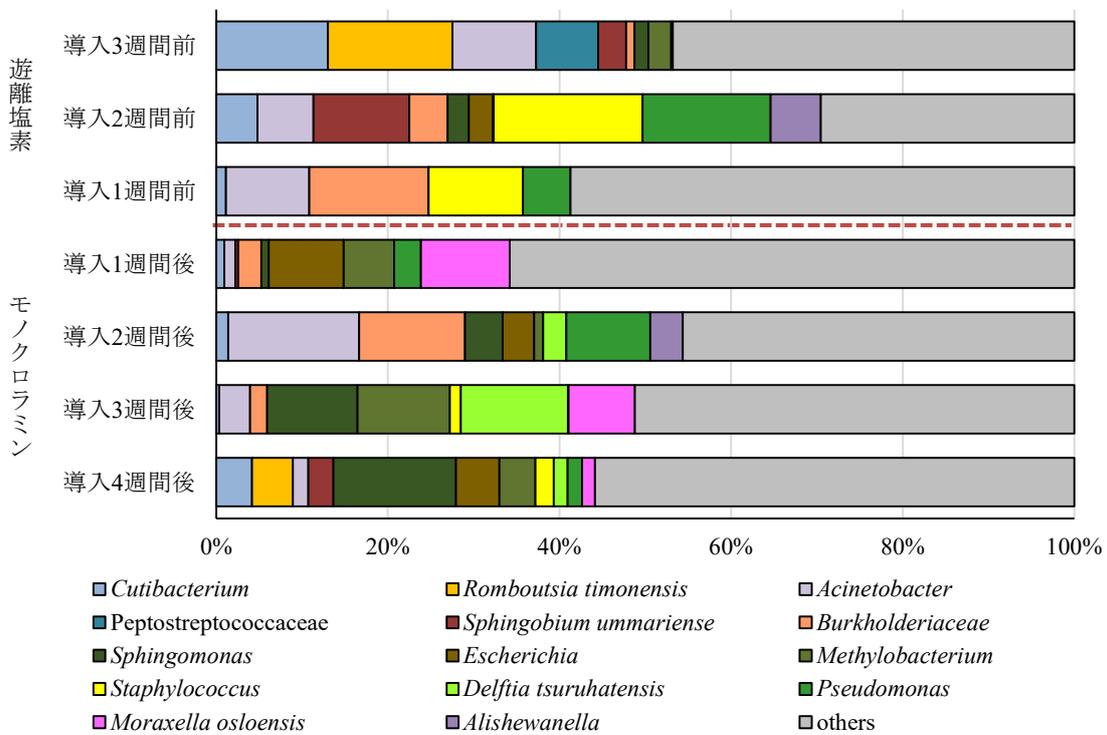


図 7. 施設 2 浴槽水の菌叢解析結果 (EMA 処理)  
(グラム陽性菌用、陰性菌用の EMA 処理後の平均)

表 6. 施設 3 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

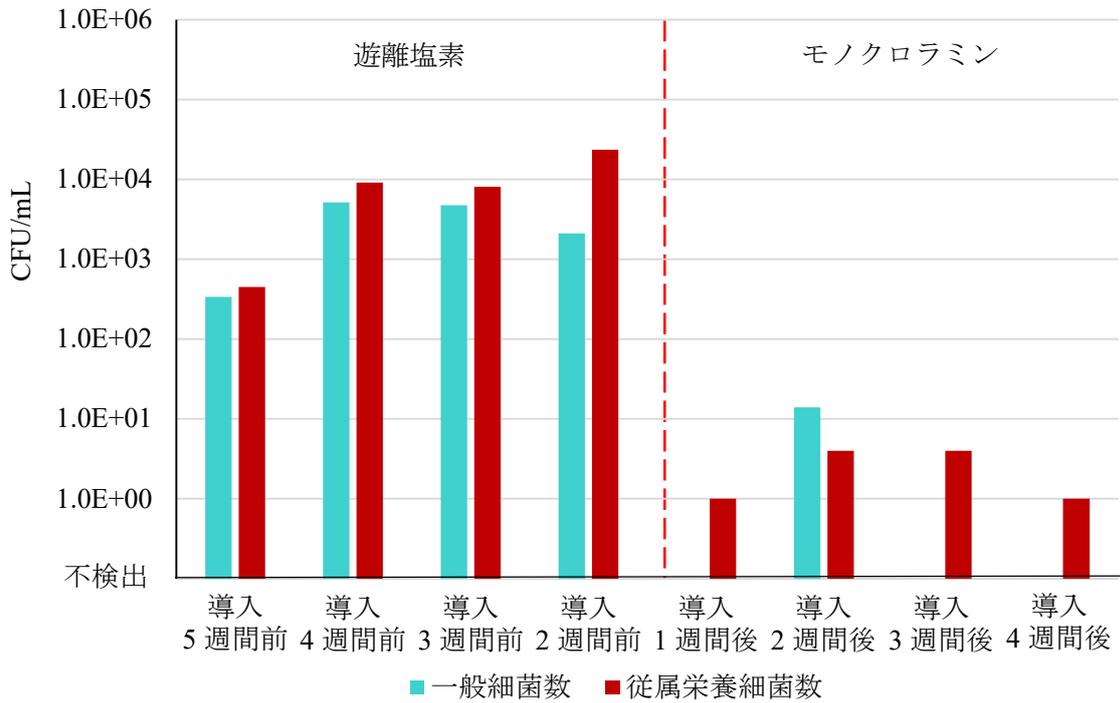


図 8. 施設 3 浴槽水の一般細菌数、従属栄養細菌数

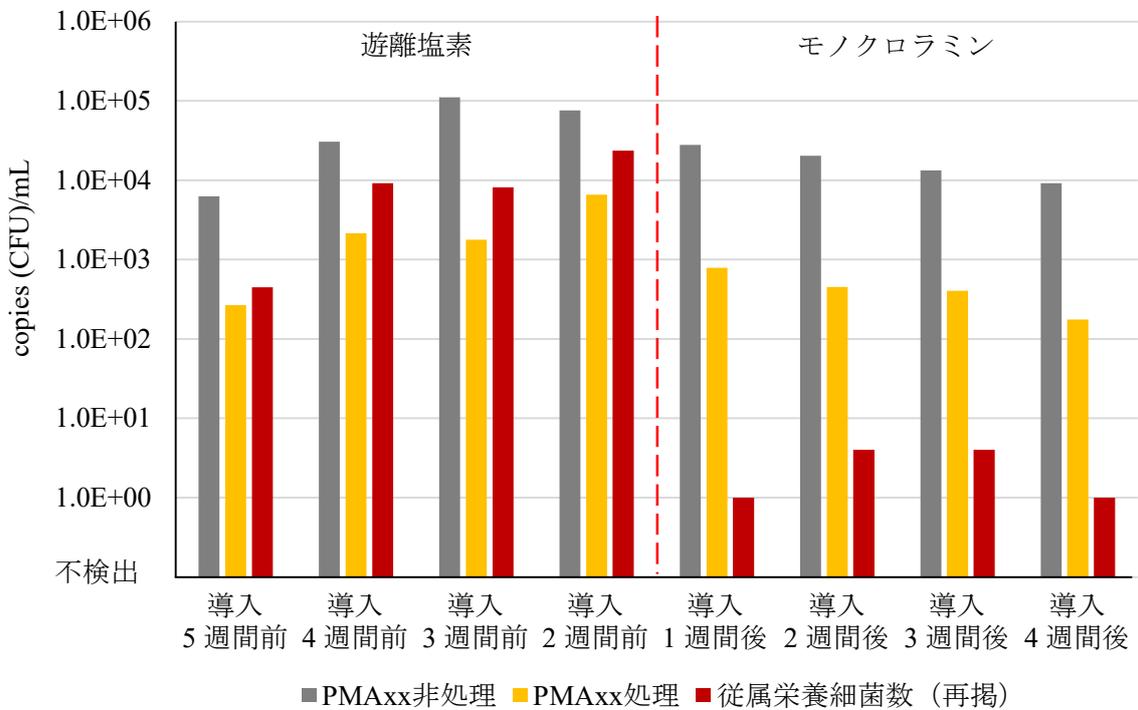


図 9. 施設 3 浴槽水の 16S rDNA コピー数

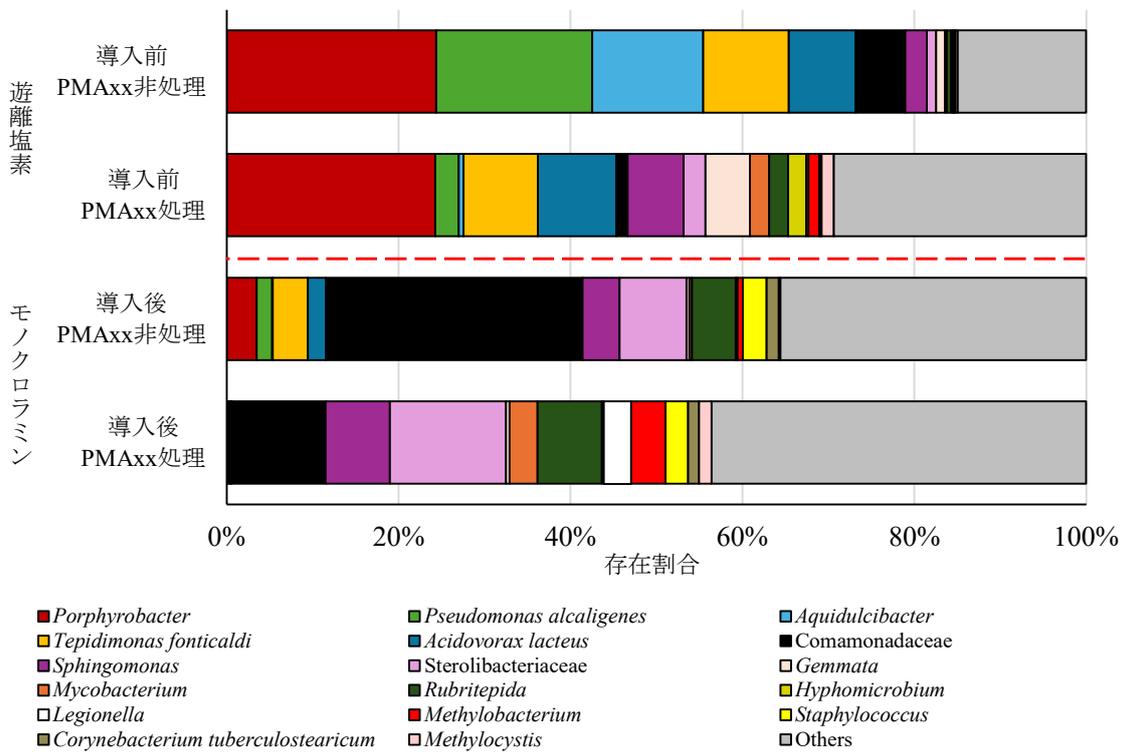


図 10. 浴槽水の菌叢解析結果（各 4 週間分データの平均）