

令和4～6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

総合研究分担報告書

高アルカリ温泉水および薬湯における

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

研究分担者	森 康則	名古屋大学 宇宙地球環境研究所
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	大市真梨乃	三重県保健環境研究所 微生物研究課
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	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
研究協力者	山田 耕造	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	細川 賢人	花王株式会社 ハウスホールド研究所
研究協力者	田中 孝典	花王株式会社 ハウスホールド研究所

研究要旨

遊離塩素は、高アルカリ温泉や薬湯などの浴槽水中ではその消毒効果が減弱し、レジオネラ属菌が検出されることがある。本研究では、遊離塩素の消毒効果の減弱が懸念される高アルカリ温泉水と薬湯中において、*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 (*Escherichia coli*) と同程度の消毒効果が認められた。一方、非結核性抗酸菌の一種である *Mycobacterium phlei* と、枯草菌の一種である *Bacillus subtilis*において、1-Log 不活化に必要な CT 値は、遊離塩素消毒でおよそ 2,000 mg/L・min、モノクロラミン消毒でおよそ 250 mg/L・min であり、遊離塩素とモノクロラミンの消毒効果は 8 倍程度異なることが示された。また、薬湯に関しては、そもそも遊離塩素は濃度が維持できず、*L. pneumophila*に対する消毒効果がほとんど得られなかつた。一方、モノクロラミンでは濃度が維持され、所定の消毒効果が得られた。このことから、遊離塩素の消毒阻害性が懸念される薬湯および高アルカリ温泉水中の*L. pneumophila*の消毒には、モノクロラミンが有効であることが実験的にも明らかになった。

A. 研究目的

従来、公衆浴場の浴槽水の消毒方法として、次亜塩素酸ナトリウムの添加による遊離塩素消毒が長く使用されてきた。しかし、一部の浴槽水には、遊離塩素消毒の阻害要因を有するものがあり、これらの浴槽水では必ずしも遊離塩素消毒が適切ではなく、これらの浴槽水にはモノクロラミン消毒が代替法の選択肢のひとつと考えられてきている¹⁾。

本研究班では、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や試験管内試験など、モノクロラミンの効果検証を続けてきた²⁻⁵⁾。その結果、モノクロラミン消毒の運用下で非結核性抗酸菌の一種である *Mycobacterium phlei* の増殖とバイオフィルム生成の懸念など、新たな課題も浮上している。

そこで本研究では、これまでに遊離塩素消毒の阻害性が懸念されている高アルカリ温泉水と薬湯を対象とし^{1,6,7)}、遊離塩素とモノクロラミンを用いた試験管内試験により、消毒効果の比較を試みた。その結果、浴槽水中の *L. pneumophila* の制御と衛生管理に資する有用な知見が得られたので、以下に報告する。

B. 研究方法

本研究の不活化試験は、既報^{5,8,9)}に準拠して実施した。概略は以下の通りである。

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°C 15 分間）後に使用した。薬湯は、ケイヒ等の生薬が配合された薬湯（健美泉、健美薬湯株式会社）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生理食塩水 (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検液とした。薬湯の検液は、TOC 計 (SHIMADZU TOC-V CPH) により、全有機炭素濃度 (TOC 濃度) を分析した。

L. pneumophila の菌株は、標準株の ATCC33152 を用いた。*L. pneumophila* の比較対照とする各細菌の不活化は、同一の温泉水を用いた先行研究⁸⁾による試験管内試験の結果を用いた。それらの研究では、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) はいずれも標準株 (ATCC25922、NBRC3134) を、非結核性枯草菌 *M. phlei* は、浴槽水から分離した環境株を試験に用いた⁹⁾。前培養から懸濁調製した菌液を、滅菌カップに入れた検液 200 mL に 10⁶CFU/mL 程度の終濃度となるよう添加した。

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) を希釈したもの、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) を希釈混合して生成したものを用いた。高アルカリ温泉水では消毒濃度がモノクロラミン約 3～20 mg/L、遊離塩素約 0.4～20 mg/L、薬湯ではモノクロラミン約 1～5 mg/L、遊離塩素約 0.2～1 mg/L の相当量を添加した。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では問題なかったが、薬湯中の遊離塩素では不足したことを見出している。菌液に消毒液を添加後、15～120 分の時点で経時的にサンプリングし、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、適宜希釈してから培養した^{5,8,9)}。

遊離塩素濃度は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、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 (mg/L))と、接触時間(T (min))からCT値(Concentration × Time value)¹⁰⁾を算出した。消毒前の菌数(N₀)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/N₀))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*と、比較対照としての*B. subtilis*、*E. coli*、既報の*M. phlei*をモノクロラミンと遊離塩素により消毒した結果^{8,9,11,12)}を図1・図2に示し、比較した。

その結果、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*は、芽胞を含む*B. subtilis*と同様に不活化が進まなかつた。*B. subtilis*の1-Log不活化に必要なCT値は、モノクロラミン消毒がおよそ250 mg/L・minであるのに対し、遊離塩素消毒がおよそ2,000 mg/L・minであった。このことから、*M. phlei*や*B. subtilis*に対し、モノクロラミンは遊離塩素のおよそ8倍程度の消毒効果を有するものと推測された。

一方*L. pneumophila*は、モノクロラミンと遊離塩素のいずれにおいても、*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。ただ、実際の浴槽水ではレジオネラ属菌が検出されることがある。実地と本実験結果の矛盾の理由としては、遊離塩素は試験管内で単独で浮遊するレジオネラ属菌に対しては消毒効果があつても、浴槽水中のバイオフィルムで保護された状態に対しては消毒効果が低下する可能性が考えられる。

次に、薬湯の試験管内試験の結果について述べる。薬湯は化学分析の結果から、TOC濃度が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¹¹⁾。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るため¹³⁾、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^{2,6,14)}。

薬湯中の*L. pneumophila*をモノクロラミンと遊離塩素で消毒した結果を図3に示す。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なかつた。このため、試験管内実験の際に最も低く得られたCT値における検出限界ラインとの交点と原点を結んだ線を参考として表示した。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、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の時、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)未満となつた(図4)。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ことが推測される結果となった¹¹⁾。遊離塩素消毒の添加直後は *L. pneumophila* の菌数が減少したものの、遊離塩素濃度は報告下限値未満まで消失した。報告下限値未満の測定値は、偽陽性の可能性が考えられ、その後が確認できなかった。このことから、実際の施設における薬湯も、遊離塩素消毒時には濃度維持ができず、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。

D. 結論

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高い消毒効果が認められた。一方、*M. phlei* と *B. subtilis* の実験から得られた CT 値から、これらの菌に対する高アルカリ温泉水のモノクロラミンと遊離塩素の消毒効果は、モノクロラミンの方が 8 倍程度高いと推測された。

薬湯では、遊離塩素の濃度を維持できなかつた。一方、モノクロラミンでは濃度が維持され、所定の消毒効果が得られた。

高アルカリ温泉水および薬湯の消毒による衛生管理には、モノクロラミンが有効と推察された。

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. 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.
3. 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—三重県津市の榎原温泉における検討—, 2019, 温泉科学, **69**, 90-102.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
 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. 森 康則, 永井佑樹, 佐藤大輝, 谷本健吾, 豊田真由美, 亀山有貴, 原 有紀, 中野陽子, 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対する *Legionella pneumophila* の消毒耐性の定量的評価, 2024, 温泉科学, **74**, 18-28.
 10. 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.
 11. 森 康則, 永井佑樹 他 : 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、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) より, 令和 5 年度分担研究報告書.
 12. 森 康則, 永井佑樹 他 : *Mycobacterium phlei*、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli*の不活化試験から示された高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒効果の有効性、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) より, 令和 4 年度分担研究報告書.
 13. 谷真理子, 桜井智香, 田子元美, 田中美穂, 奥村美保, 白田美香, Ngheim Nguyen 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.
 14. 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. 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦信浩, 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.
2. 森 康則, はじめて学ぶ ぼくたちの温泉科学, 2023, 三重大学出版会.
 3. 森 康則, 永井佑樹, 佐藤大輝, 谷本健吾, 豊田真由美, 亀山有貴, 原 有紀, 中野陽子, 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対する *Legionella pneumophila* の消毒耐性の定量的評価, 2024, 温泉科学, 74, 18-28.
- 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不活化, 日本温泉科学会第 75 回大会, 2022 年 9 月, 大分県.
2. 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.

口頭発表

1. 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦信浩,

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

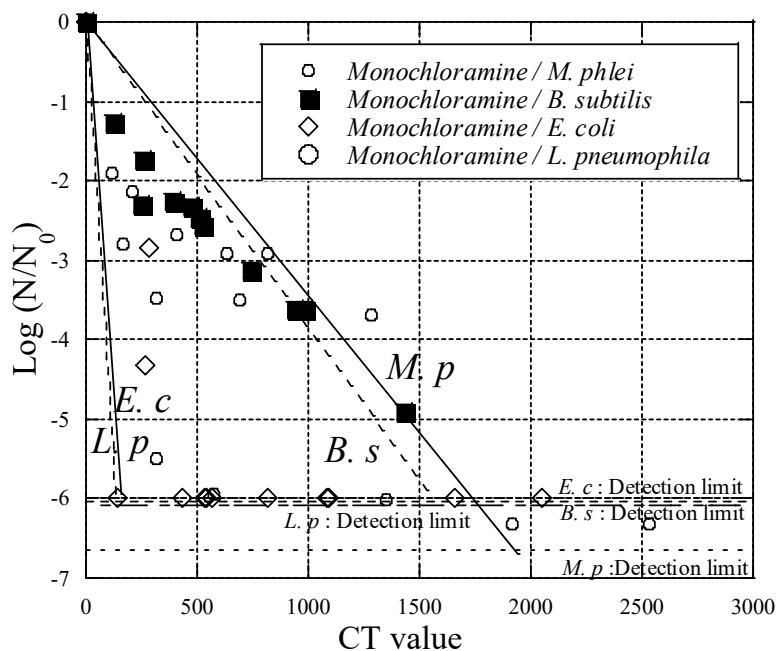


図 1 高アルカリ温泉水中の *Legionella pneumophila*、*Mycobacterium phlei*、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli* に対するモノクロラミン消毒の不活化の比較。実線が *M. phlei*、*E. coli*、破線が *L. pneumophila*、*B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。なお、*M. phlei*、*B. subtilis*、*E. coli* のデータについては、Mori *et al.*(2023)、森ら(2023)（文献 8・文献 11）を用いた（図 2 も同じ）。

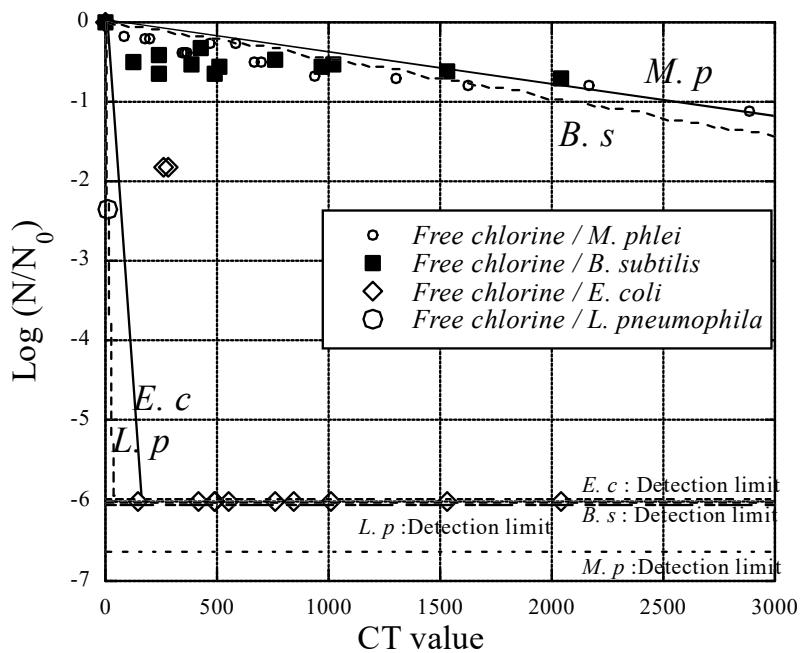


図 2 高アルカリ温泉水中の *L. pneumophila*、*M. phlei*、*B. subtilis*、*E. coli* に対する遊離塩素消毒の不活化の比較。実線が *M. phlei*、*E. coli*、破線が *L. pneumophila*、*B. subtilis* の不活化をそれぞれ示す。

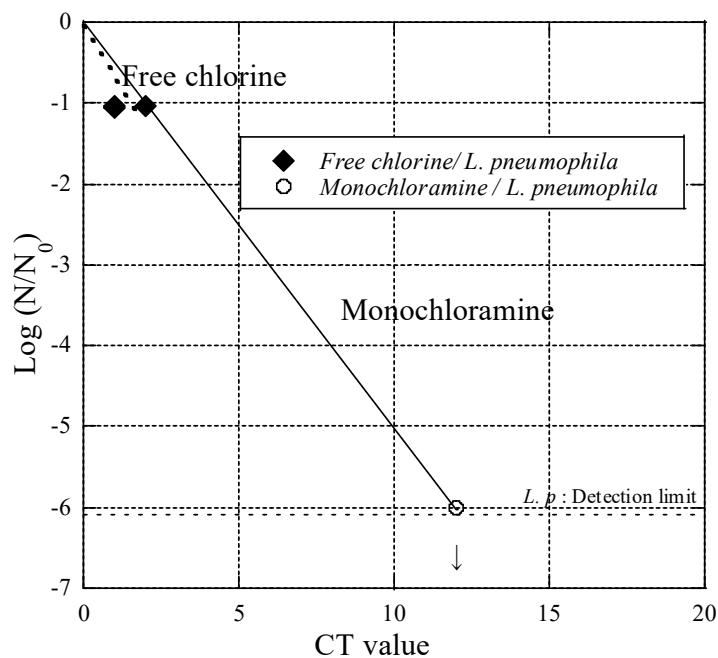


図3 薬湯中の *L. pneumophila*に対するモノクロラミン、遊離塩素消毒の不活化の比較。実線がモノクロラミン消毒、破線が遊離塩素消毒による不活化をそれぞれ示す。モノクロラミンの最も低いCT値の条件下で菌数が検出限界未満に達していた(○に↓矢印で表示)。不活化曲線は、最も低いCT値における検出限界ラインとの交点と原点を結んだ線を参考表示した。遊離塩素消毒は、薬湯で塩素が消費されたことにより、低いCT値(CT2以下)しか得られていない。

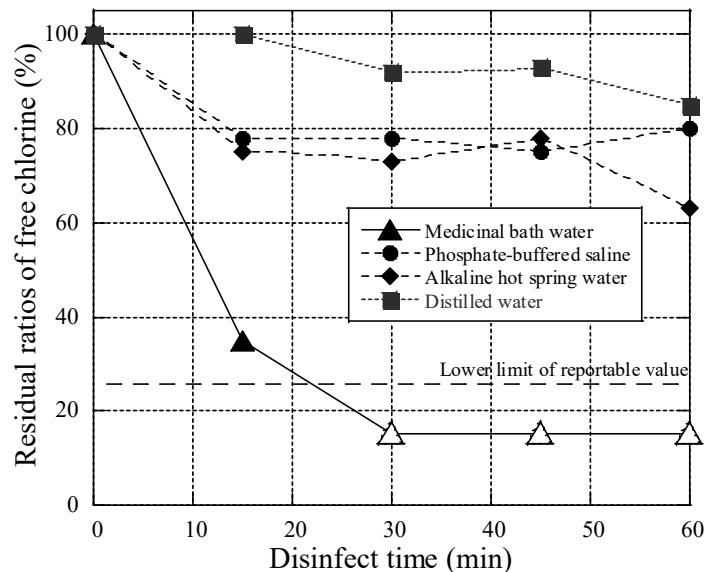


図4 各検液における遊離塩素濃度の経時変化。全ての検液で、遊離塩素濃度の初期濃度が0.4mg/Lとなるよう相当量を添加した。なお、薬湯の30分後、45分後、60分後は、報告下限値未満まで低下し、偽陽性の可能性も考えられるため、△プロットの参考表示とした。