

分担研究報告書

公衆浴場の浴槽水における抗酸菌について

研究協力者	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	井上 浩章	アクアス株式会社 つくば総合研究所
研究協力者	田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター
研究代表者	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部

研究要旨

結合塩素のモノクロラミンは、レジオネラ属菌に対する消毒効果が高いことが繰り返して確認されている。ただし、モノクロラミン消毒下で *Mycobacterium* 属菌（以下、抗酸菌）の一種である *Mycobacterium phlei* の増加が認められることも度々あり、注意が払われている。他方、消毒が遊離塩素とモノクロラミンとに限らず、浴槽水からレジオネラ属菌の検査を行う際に、夾雑菌として抗酸菌が培地に発育することがある。本研究では、*M. phlei* の増加がモノクロラミン消毒に限らず遊離塩素消毒でも生じること、並びに *M. phlei* の増殖に関する要因として温泉の pH、アンモニウムイオンについて検討し、GVPC 寒天培地を使用した際の浴槽水からの抗酸菌とレジオネラ属菌の発育状況について調査した。

モノクロラミン消毒以外での *M. phlei* を検索する目的で、同一施設内の 2 系統の遊離塩素消毒下の温泉水と 1 系統のモノクロラミン消毒下の井水について、菌叢を解析した。菌叢は遊離塩素およびモノクロラミン消毒下のいずれの浴槽水でも *M. phlei* が優占種となっており、R2A 培地に発育したコロニーの 16S rDNA の塩基配列も *M. phlei* と一致した。

143 検体の浴槽水から抗酸菌およびレジオネラ属菌が GVPC 培地で検出された検体数は、それぞれ 55 検体 (38.5%)、12 検体 (8.4%) であった。遊離塩素消毒された浴槽水からも抗酸菌が検出されて、残留塩素濃度の平均値は、抗酸菌が検出された浴槽水は 1.0 mg/L、検出されなかった浴槽水は 0.9 mg/L と大きな違いはなかった。

M. phlei の増加に関する要因を検討するために、過去にモノクロラミン消毒実証試験で *M. phlei* が増加した温泉水（以下、増加温泉水）、および増加しなかった温泉水（以下、非増加温泉水）を使用した。pH とアンモニウムイオン濃度を調整し、*M. phlei* を植菌して培養した。比較対象として R2A 培地も使用した。増加温泉水と R2A 培地の pH8 および 9 では *M. phlei* の増殖が確認された一方で、pH10 では増殖せず、非増加温泉水ではいずれの pH でも増殖しなかった。pH10 では *M. phlei* は増殖しなかったが、pH が中性に近ければ増殖するとはならず、増加温泉水に何らかの増殖しやすい因子があると示唆された。

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）により浴槽水が消毒されている。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遊離塩素濃度が低下し、高 pH の泉質の場合、消毒効果が低下することが知られている。

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抗酸菌の一種である *Mycobacterium phlei* が増加することがある²⁾。感染報告の多い他の抗酸菌（*M. tuberculosis* や *M. avium* の Slow Growing *Mycobacteria*）とは異なり、*M. phlei*（Rapid Growing *Mycobacteria*）による健康者の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。また、*M. phlei* はモノクロラミンだけでなく遊離塩素にも抵抗性があり³⁾、遊離塩素消毒下の浴槽水においても注意が必要となる可能性がある。

消毒剤に抵抗性を示す抗酸菌は *M. phlei* だけでなく様々な抗酸菌が浴槽水に存在することが確認されている^{4,5)}。レジオネラ属菌検査の際に、これらの抗酸菌が夾雑菌として培地に発育する場合にはレジオネラの検出に支障が出る可能性がある。

本研究では *M. phlei* の増加がモノクロラミン消毒特有の問題であるのかについて、遊離塩素消毒とモノクロラミン消毒を別系統で実施している施設のそれぞれの浴槽水対象に *M. phlei* の存在割合を調査した。また、モノクロラミン消毒下での *M. phlei* の増殖に関する要因について、主に pH に絞っ

て検討した。さらに、GVPC 寒天培地を使用した際の浴槽水からの抗酸菌とレジオネラ属菌の発育状況についても調査した。

B. 研究方法

(1) 遊離塩素消毒下での *M. phlei* の存在割合の検討

同一施設内の浴槽水の原水が塩化物泉の温泉水の 2 検体（遊離塩素消毒、内湯：容量 12 トン、露天風呂：容量 27 トン）と、井水の 1 検体（モノクロラミン消毒、ジェット風呂：容量 17 トン）を採水した。いずれも循環ろ過式で、遊離塩素は 1~2 mg/L、モノクロラミンは 3~5 mg/L で管理されていた。各検体から同時に 2 回ずつ採水し、従属栄養細菌数の測定および菌叢解析を実施し、平均値を採用した。

従属栄養細菌数の測定は、R2A 寒天培地を用いた混濁培養で 42°C、14 日間培養し、生じたコロニーの数を計測した。従属栄養細菌数の培地のコロニーより 16S rDNA V3-V4 領域の塩基配列を決定し、BLAST により相同性検索を行った。

菌叢解析は 16S rDNA の V3-V4 領域を対象として、アンプリコンシーケンスにより行った（生物技研）。

(2) 浴槽水中の抗酸菌とレジオネラ属菌の GVPC 寒天培地での発育状況

2025 年 10 月から 12 月にかけて採水した浴槽水 143 検体の抗酸菌とレジオネラ属菌を検査した。各検体を遠心濃縮（6000 × g, 10 min）で 100 倍濃縮した。濃縮液を酸処理し、GVPC 寒天培地を用いて 37°C で 7 日間培養した。得られたコロニーについて、レジオネラ属菌と抗酸菌の菌数を測定した。レジオネラ属菌はシステイン要求性試験、抗酸菌は Rocchetti らのプライマー⁸⁾を用いた PCR で判

定した。

(3) *M. phlei* の増殖に関する要因の検討

先の研究で実施したモノクロラミン消毒の実証試験において、*M. phlei*（を主な菌種とする従属栄養細菌数）が増加した施設⁶⁾の増加温泉水と、増加しなかった施設⁷⁾の非増加温泉水を使用した。水酸化ナトリウム又は塩酸を用いて、これら2つの温泉水のpHを8, 9, 10に調整した。これに加えて、これら2つの温泉水のアンモニウムイオン濃度を塩化アンモニウムを用いて、0, 0.5, 1 mg/Lになるよう調整した。なお、元となる温泉水のアンモニウムイオン濃度は0 mg/Lであった。以上の18通り（=2つの温泉×3通りのpH×3通りのアンモニウムイオン濃度）に調製した温泉水に、温泉施設で分離された*M. phlei*⁶⁾を10² CFU/mL程度になるよう添加した。40°Cで7日間まで静置し、1日ごとにR2A寒天培地を用いた混釈培養で、各条件2サンプルの菌数の平均値を算出した。

温泉水とは別に、R2A培地においても、pH（pH8、9、10）およびアンモニウムイオン（0, 0.5, 1 mg/L）の濃度を調整し、混釈培養で*M. phlei*の増殖を各条件2サンプルずつ試験した。1, 2, 3, 7日目の*M. phlei*の菌数（コロニー数）を測定した。

C. 研究結果および考察

(1) 遊離塩素消毒下での *M. phlei* の存在割合の検討

温泉水を遊離塩素消毒した浴槽水2検体の従属栄養細菌数は、内湯が26 CFU/mL、露天風呂が5 CFU/mLと低い濃度であった一方で、井水をモノクロラミン消毒したジェット風呂は 1.6×10^5 CFU/mLと高い濃度

であった。

菌叢解析を行った結果、*M. phlei*の存在割合は露天風呂とジェット風呂では1番目に多かった。内湯では大きい方から2番目に多い細菌が*M. phlei*であった（図1）。各検体をR2A培地で培養して得られたコロニーの16S rDNAの一部塩基配列も、*M. phlei*と99.8%または100%（445 bp/446bp または466bp/466 bp）一致した（表1）（なお、コロニーは特徴あるものを選んでおり、表1の菌株数は割合を表すものではない）。菌濃度に若干の多寡はあるものの、遊離塩素消毒下の浴槽水においても、*M. phlei*は優占種の一つであった。すなわち*M. phlei*は、モノクロラミン消毒であるから増加するのではなく、消毒の方法にかかわらず、条件が合えば、元から量と比率の多い細菌であったことが判明した。

(2) 浴槽水中の抗酸菌とレジオネラ属菌のGVPC寒天培地での発育状況

143 検体の浴槽水から、抗酸菌およびレジオネラ属菌が検出された検体数は、それぞれ55検体（38.5%）、12検体（8.4%）であった。ただし、本データはレジオネラ検査時に夾雑菌として発育してきた抗酸菌を調査したものであるため、選択が掛かっている。そのため、実際の抗酸菌の汚染率は今回のデータよりも高くなると予想される。

両方検出されたのは8検体（5.6%）、抗酸菌のみ検出が47検体（32.9%）、レジオネラ属菌のみ検出が4検体（2.8%）であった。抗酸菌の検出率は、レジオネラ属菌が検出された浴槽水（66.7%）は、レジオネラ属菌が検出されなかった浴槽水（35.9%）に比べて高かった。早く増殖する抗酸菌（Rapid Growing *Mycobacterium*）をレジオネラ属菌の指標と

して利用できる可能性は考えられるが、3 日間の抗酸菌の培養より PCR でレジオネラ属菌の検査をしたほうが迅速かつ精度も高いことから、現時点では抗酸菌を指標として積極的に推す段階には至っていないと考えられる。

遊離残留塩素が確認された検体数は合計 130 検体で、濃度の平均値は、抗酸菌が検出された浴槽水（54 検体）は 1.0 mg/L で、検出されなかった浴槽水（76 検体）は 0.9 mg/L と大きな違いはなかった。この程度の濃度では、抗酸菌を消毒しきれないと考えられた。

総残留塩素濃度の数値がある検体は 12 検体と少ないものの、3.4~5.0 mg/L の 11 検体では抗酸菌が検出されておらず、4.9 mg/L の 1 検体でのみ抗酸菌の濃度が 10 CFU/100 mL であった。この総残留塩素濃度はモノクロラミン濃度とは同じでないが、高濃度の結合塩素消毒（モノクロラミン消毒）であれば、抗酸菌を消毒できると示唆された。

(3) *M. phlei* の増殖に関する要因の検討

M. phlei 増加温泉水の pH を変化させたところ、pH8 および 9 では *M. phlei* が増殖し、pH10 では菌濃度が減少した（図 2）。R2A 培地の pH を変化させた場合も同様で、中性に近いほど増殖し、pH10 では 3 日目までは増殖が抑制された（図 3）。一方、非増加温泉水では、pH8~10 のいずれにおいても増殖しなかった（図 4）。すなわち、pH が中性に近ければ *M. phlei* が増加するというものではなかった。

過去のモノクロラミン消毒実証試験において、pH10 以上の浴槽水中では従属栄養細菌数は増加しない⁷⁾が、pH9 以下では増加するか、高い菌濃度を維持する^{6,8,9)}ことを

経験している。森ら¹⁰⁾の報告では pH9 程度の浴槽水でも従属栄養細菌数は増加しており、このあたりが上限のようであった。*M. phlei* の増殖に影響する因子の一つとして、増殖しやすい温泉があるということ、pH10 未満に注意する必要があると考えられた。

一方、非増加温泉水の pH を 10 から 8 にしたからといって、*M. phlei* の増殖は確認されなかったことから、pH 以外の要因が増殖に影響していると考えられた。

アンモニウムイオン濃度を変化させた結果では、今回の濃度域では *M. phlei* の増殖に影響がなかった。

D. 結論

M. phlei はモノクロラミン消毒下の浴槽水だけでなく、遊離塩素消毒下の浴槽水においても優占種となることが示唆された。GVPC 寒天培地に発育する抗酸菌は、レジオネラ属菌が検出される浴槽水において検出される確率が高く、遊離塩素消毒での抑制は困難であった。*M. phlei* の浴槽水中での増殖には、増殖しやすい温泉と、しにくい温泉があり、前者の pH10 未満は増殖に注意が必要と考えられた。

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. 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, 温泉科学, 72, (2022), 26–37
 4. 宮本幹, 山口義夫, 笹津備規: 環境中のレジオネラ属菌および非結核性抗酸菌の分布調査, 環境感染, 15, (2000), 127–132
 5. 宮田町子, 波多宏幸, 江崎孝行: 銭湯浴槽水の抗酸菌汚染と浴槽環境: 環境感染, 16, (2001), 279–284
 6. 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
 7. 柳本恵太, 高村知成, 山上隆也, 土屋邦男, 田中慶郎, 杉山寛治, 茶山忠久: 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, 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 6 年度分担研究報告書
 8. Rocchetti et al. Validation of a Multiplex Real-Time PCR assay for Detection of *Mycobacterium* spp., *Mycobacterium tuberculosis* Complex, and *Mycobacterium avium* Complex Directly from Clinical Samples by Use of the BD Max Open System. *J. Clin. Microbiol.*, **54**, (2016) 1644-1647
 9. 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
 10. 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
 11. 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—三重県津市の榑原温泉における検討, 温泉科学, 69, (2019), 90–102
- F. 研究発表**
- 誌上発表
なし

口頭発表

1. 柳本恵太, 高村知成, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 堀内雅人, 土屋邦男, 杉山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司:遊離塩素消毒が困難な県内温泉施設におけるモノクロラミン消毒の効果と細菌叢への影響、令和7年度総合理工学研究機構研究員研修会, 2027年2月, 山梨県
2. 柳本恵太, 高村知成, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 堀内雅人, 土屋邦男, 杉

山寛治, 田中慶郎, 茶山忠久, 市村祐二, 泉山信司:遊離塩素消毒が困難な県内温泉施設におけるモノクロラミン消毒の効果と細菌叢への影響、令和7年度山梨県衛生環境研究所研究成果発表会, 2027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

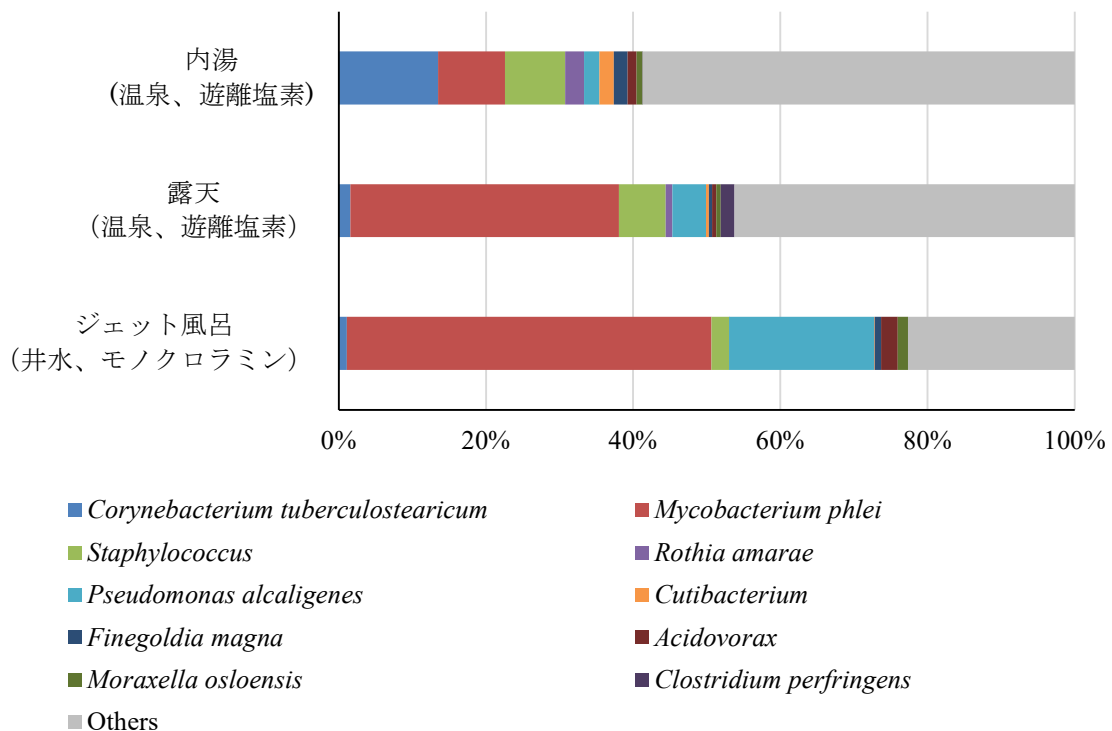


図1 遊離塩素およびモノクロラミン消毒下の浴槽水の菌叢解析

表 1 従属栄養細菌の 16S rDNA 解析

浴槽水	菌種	コロニー数
内湯 (温泉、遊離塩素)	<i>Mycobacterium phlei</i> 100% (466bp/466bp)	1
	<i>Cutibacterium acnes</i> 100% (446bp/446bp)	2
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 100% (466bp/466bp)	1
露天 (温泉、遊離塩素)	<i>Mycobacterium phlei</i> 99.8% (445bp/446bp)	1
	<i>Agrococcus</i> sp. 99.6% (444bp/446bp)	1
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 99.6% (466bp/468bp)	1
	<i>Paenibacillus</i> sp. 100% (465bp/465bp)	2
ジェット風呂 (井水、モノクロラミン)	<i>Mycobacterium phlei</i> 100% (466bp/466bp)	3

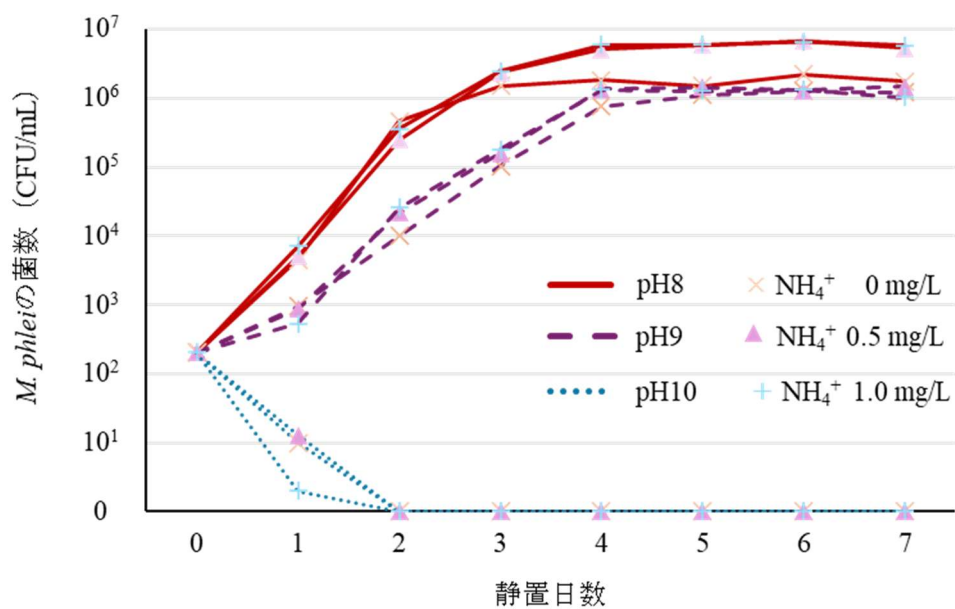


図 2 *M. phlei* 増加温泉水における pH、 NH_4^+ 濃度別（9 通り）の増殖曲線

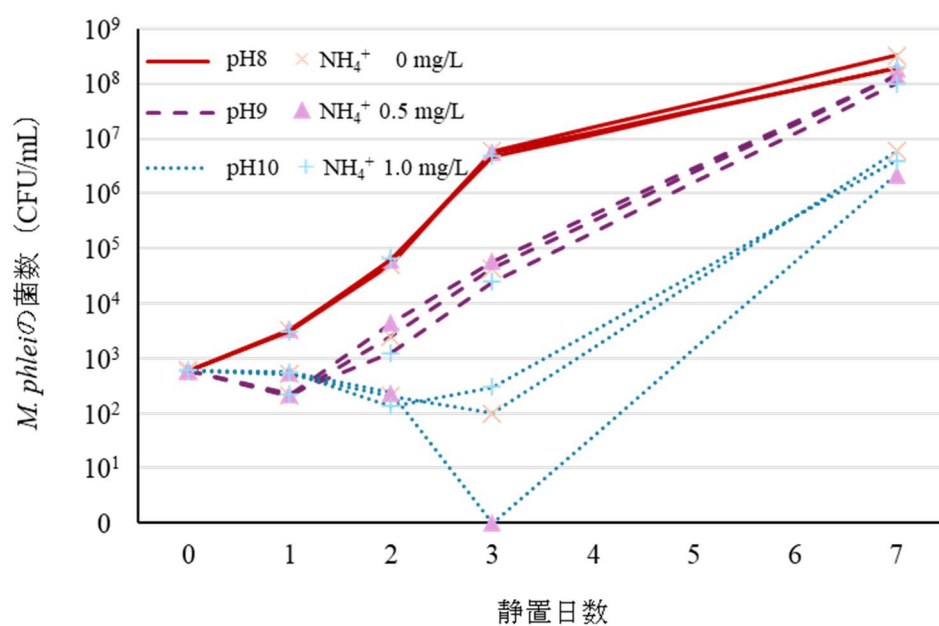


図3 R2A 培地における pH、 NH_4^+ 濃度別（9 通り）の増殖曲線

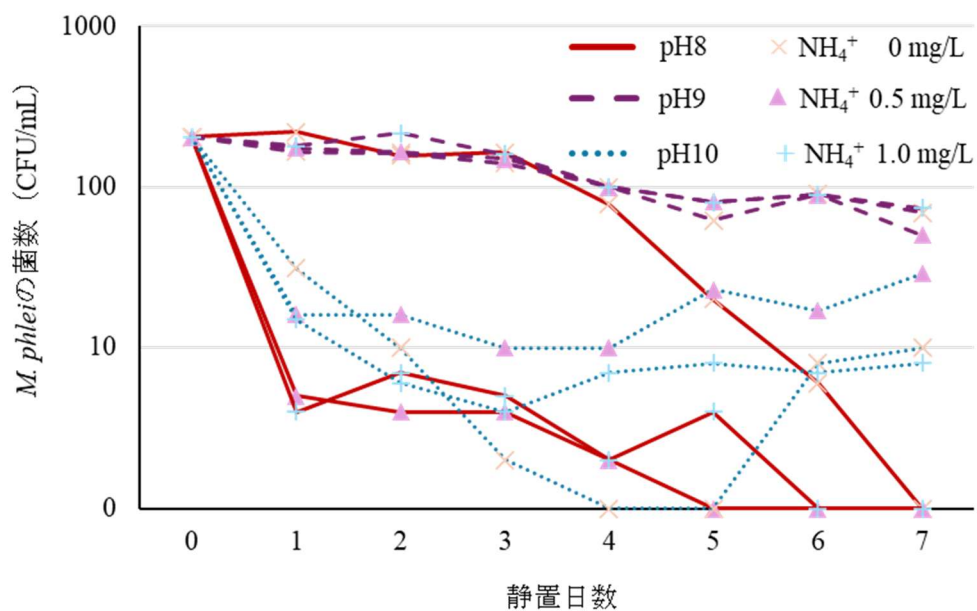


図4 *M. phlei* 非増加温泉水における pH、 NH_4^+ 濃度別（9 通り）の増殖曲線