

令和7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)

公衆浴場等におけるレジオネラ発生防止及び衛生管理推進のための研究

研究代表者 泉山 信司 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所

研究分担報告書

アルカリ性塩化物泉中の *Mycobacterium phlei* に対する 遊離塩素とモノクロラミンの消毒効果

研究協力者	吉田 真平	三重県保健環境研究所 衛生研究課
研究協力者	森 康則	名古屋大学 宇宙地球環境研究所
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	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	中村 亮太	三重県保健環境研究所 衛生研究課
研究協力者	青沼 柊	三重県保健環境研究所 衛生研究課
研究協力者	前田 千恵	三重県保健環境研究所 微生物研究課
研究協力者	柘植 亮	三重県保健環境研究所 資源循環研究課
研究協力者	近藤 笑加	三重県保健環境研究所 資源循環研究課
研究協力者	原 有紀	三重県保健環境研究所 衛生研究課
研究協力者	吉村 英基	三重県保健環境研究所 衛生研究課
研究代表者	泉山 信司	国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所

研究要旨

遊離塩素による浴槽水の消毒は、特に pH が高い温泉施設で効果が低下し、レジオネラ属菌による汚染が問題となっている。過去の研究課題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* が検出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。本年度は、アルカリ性塩化物泉において、消毒剤の残留性と *M. phlei* に対する消毒効果を検証した。

アルカリ性塩化物泉中の *M. phlei* の消毒は、消毒剤が残留しているにも関わらず、モノクロラミン消毒の効果が遊離塩素消毒の効果より低く、先行研究のアルカリ性温泉水と逆の結果になった。この結果は、営業施設の浴槽水中で *M. phlei* が検出したことと一致することから、むしろ納得のいくものであった。では先行研究と消毒効果が逆になった要因が気になるが、本研究は塩化物イオン濃度が 13,810mg/L と、温泉水としてはかなり高い濃度であったことが影響した可能性が考えられた。モノクロラミンは遊離塩素と比較して比較的安定な消毒剤とされるが、その他の成分との反応がないわけではなく、本研究で使用了塩化物泉のように、付随する成分と反応した可能性も否定できない。消毒効果が変化する要因に興味がもたれる。

A. 研究目的

公衆浴場では、経済性や取扱いの簡便さ等の理由により、従来から遊離塩素消毒が広く使用されている。しかし、高 pH やアンモニア態窒素を多含するような温泉では、必ずしも遊離塩素消毒が最適ではなく、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なった¹⁾。モノクロラミン消毒は、厚生労働省の通知にも記載され^{2,3)}、全国の自治体でモノクロラミン消毒の条例化の動きが加速している。

過去の研究課題において、アルカリ性温泉水に対するモノクロラミン消毒の実地検証⁴⁻⁶⁾や、試験管内試験⁷⁾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。一方で、モノクロラミン消毒を連続的に実施していると、非結核性抗酸菌 (Non-tuberculous Mycobacteria NTM) の一種である *Mycobacterium phlei* が検出されるようになり、バイオフィルムの生成等、衛生管理上の課題が懸念されてきた⁸⁻¹⁰⁾。*M. phlei* に対しても、これまでにアルカリ性温泉水に対するモノクロラミン消毒の実地検証⁴⁻⁶⁾や、試験管内試験⁷⁾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が、消毒効果の高い場合と低い場合があり、効果が変動する理由がはっきりしなかった。森らのアルカリ性温泉水に対する試験では^{7,11)}、Ct1,500 のモノクロラミン消毒で *M. phlei* の不活化が 5 ないし 6-Log も進行していた。温泉成分により、消毒の挙動が変化した可能性を想像するが、これまでの試験管内試験は、消毒の効果が高く、実地の営業施設で *M. phlei* が増殖することと対応していなかった。本研究では、各温泉水における消毒効果のデータ収集を目的として、泉質として

単純温泉の次に多い塩化物泉に着目し、アルカリ性塩化物泉条件下における遊離塩素とモノクロラミンの *M. phlei* 消毒効果について、試験管内試験を行うこととした。

B. 研究方法

本研究は、先行研究の不活化試験の方法^{7,9)}に準拠して実施した。

アルカリ性塩化物泉の検液として、三重県内で湧出する pH9 よりもアルカリ性が高く、塩化物イオン濃度が 10,000 mg/L 以上含有されている温泉水を使用した。検液の化学分析の結果を表 1 に示す。

菌株は、神奈川県内温浴施設の浴槽水由来の *M. phlei* を同施設に併設された検査室にて分離し、株式会社テクノスルガ・ラボにて菌種を同定したものを使用した (松田ら, 2019)¹²⁾。菌株は三重県保健環境研究所で -80℃ 冷凍でマイクロバンク (イワキ株式会社) に保存し、この株を消毒実験の 1 週間前から、R2A 寒天培地 (栄研化学 R2A AGAR Eiken E-MB68) で 37℃ で前培養し、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 10⁶CFU/mL 程度の終濃度となるよう菌を添加した。

検液の消毒は、遊離塩素の初期濃度が約 5 mg/L、約 10 mg/L 又は約 20 mg/L、モノクロラミンの初期濃度が約 5 mg/L、約 10 mg/L 又は約 20 mg/L になるよう、添加の操作をした。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)、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。

菌を含む検液に消毒液を添加した後、消毒時間が5分、30分、60分、90分、120分の時点で経時的に検液の一部をサンプリングし、菌数及び各消毒薬の濃度を測定した。

菌数は、サンプリング試料を適量のチオ硫酸ナトリウム溶液(関東化学)で消毒剤を中和した後、りん酸緩衝生理食塩水(PBS; Phosphate-buffered saline)で適宜希釈し、R2A寒天培地の7日間37℃の培養で測定した。

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。消毒濃度の実測値(C)と、接触時間(T)の積からCT値(Concentration × Time value)¹³⁾を算出した。CT値と菌の生残数から不活化曲線をプロットした。

C. 研究結果および考察

アルカリ性塩化物泉中の *M. phlei* を遊離塩素又はモノクロラミンにより消毒した(図1、図2及び図3)。

消毒剤添加120分後における遊離塩素濃度は、各濃度で添加直後より76~89%低下しており、モノクロラミン濃度は各濃度で添加直後より6~42%低下していた。この結果から遊離塩素と比較し、モノクロラミンの濃度安定性は確認できた。

しかし、遊離塩素消毒による *M. phlei* の不活化が確認できた一方で、CT2,000ものモノクロラミン消毒であっても不活化が1-Logも進まなかった。

先行研究では、モノクロラミン消毒により溶存物質が1000 mg/kg未満のアルカリ性

温泉水中の *M. phlei* が消毒されて、遊離塩素よりも効果が高かった。すなわち、本研究のアルカリ性塩化物泉では、先行研究^{7,11)}のアルカリ性温泉水と逆の結果が得られた。本研究の結果は、モノクロラミン消毒下における営業施設の浴槽水中で *M. phlei* が検出したことと一致することから^{8,10)}、むしろ納得のいくものであった。

この違いの要因として、本研究で用いた温泉水がアルカリ性に加えて、塩化物イオン濃度が13,810 mg/Lと温泉水としてはかなり高いイオン濃度を有する高塩泉であったことが影響した可能性が考えられた。

モノクロラミンは遊離塩素と比べて安定な消毒剤だが、有機物やその他の水質成分との反応が全く生じないわけではなく、特に有機物との反応はモノクロラミン分解の主要な要因の一つとされている(Duirk et al., 2005)¹⁴⁾。本研究では添加2時間後におけるモノクロラミン分解率は20~42%であった。

本研究で使用した塩化物泉に付随する成分と、モノクロラミンあるいは菌が何らかの反応を呈した可能性が示唆された。

D. 結論

pHが9以上、塩化物イオン濃度が13,810 mg/Lのアルカリ性塩化物泉中では、*M. phlei* はCT2,000ものモノクロラミン消毒であっても不活化が1-Logも進まなかった。この結果は、営業施設の浴槽水中で *M. phlei* が検出したことと対応するものであった。一方、先行研究のアルカリ性温泉水における試験管内の消毒試験とは対応しなかった。消毒効果に変化した要因に興味をもたれた。

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. 公衆浴場における衛生等管理要領等について, 平成12年12月15日生衛発第1,811号厚生省生活衛生局庁通知.
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について, 平成13年9月11日健衛発第95号厚生労働省健康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ー三重県津市の榊原温泉における検討ー, 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. 渡邊貴明, 松田宗大, 小倉 徹, 植園健一, 松田尚子, 枝川亜希子, 泉山信司, 藤井 明 (2018): 循環式浴槽においてモノクロラミン消毒下で増殖する従属栄養細菌の同定ならびにその制御法について, 日本防菌防黴学会第45回年次大会要旨集, p 262.
9. 長岡宏美, 泉山信司 他: 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
10. 柳本恵太, 植松香星 他: 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
11. 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.
12. 松田宗大, 枝川亜希子, 泉山信司, 小倉徹, 植園健一, 松田尚子, 藤井 明 (2019) : 循環式浴槽から分離された *Mycobacterium phlei* に対するモノクロロミンの殺菌効果, 日本防菌防黴学会第 46 回年次大会要旨集, p 232.
13. 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.
14. Stephen E. Duirk, B. Gombert, J. Croué, R. Valentine, Modeling monochloramine loss in the presence of natural organic matter, 2005 , Environmental Science, 39(14), 3418-3431.
- F. 研究発表
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

表 1. アルカリ性塩化物泉の化学分析結果

項目	分析結果*1	分析方法*2
pH	9.04	pH/EC 計 1)
EC (mS/m)	3,600	
TOC	1.4	TOC 計 2)
Na ⁺	8,144	AAS 法 3)
K ⁺	82.5	
Mg ²⁺	2.0	
Ca ²⁺	2.8	
NH ₄ ⁺	<0.1	IC 法 4)
(NH ₄ ⁺ -N)	(<0.1)	
F ⁻	29.6	IC 法 5)
Cl ⁻	13,810	
SO ₄ ²⁻	0.8	
H ₂ SiO ₃	13.9	ICP-AES 法 6)
HBO ₂	206.3	

*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-L CPH
- 3) SHIMADZU AA-7000
- 4) Thermo DIONEX ICS-5000 EG
- 5) SHIMADZU HIC-ESP
- 6) SHIMADZU ICP-8100

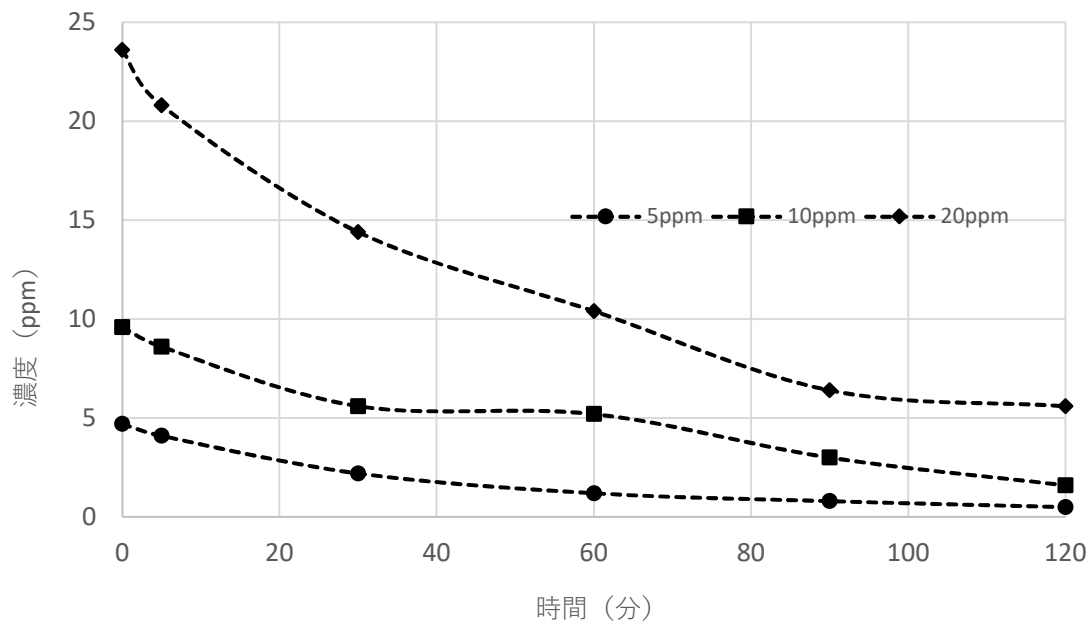


図1 アルカリ性塩化物泉中の遊離塩素濃度

低濃度 (約 5 ppm)、中濃度 (約 10 ppm)、高濃度 (約 20 ppm) の 3 つの異なる濃度で添加した。

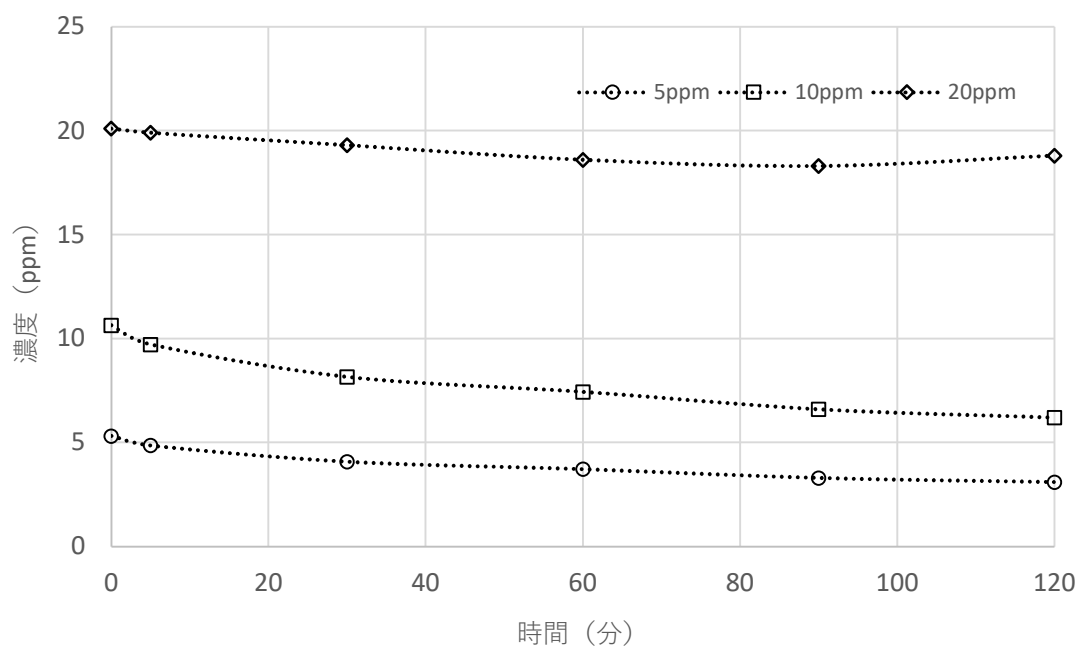


図2 アルカリ性塩化物泉中のモノクロアミン濃度

低濃度 (約 5 ppm)、中濃度 (約 10 ppm)、高濃度 (約 20 ppm) の 3 つの異なる濃度で添加した。

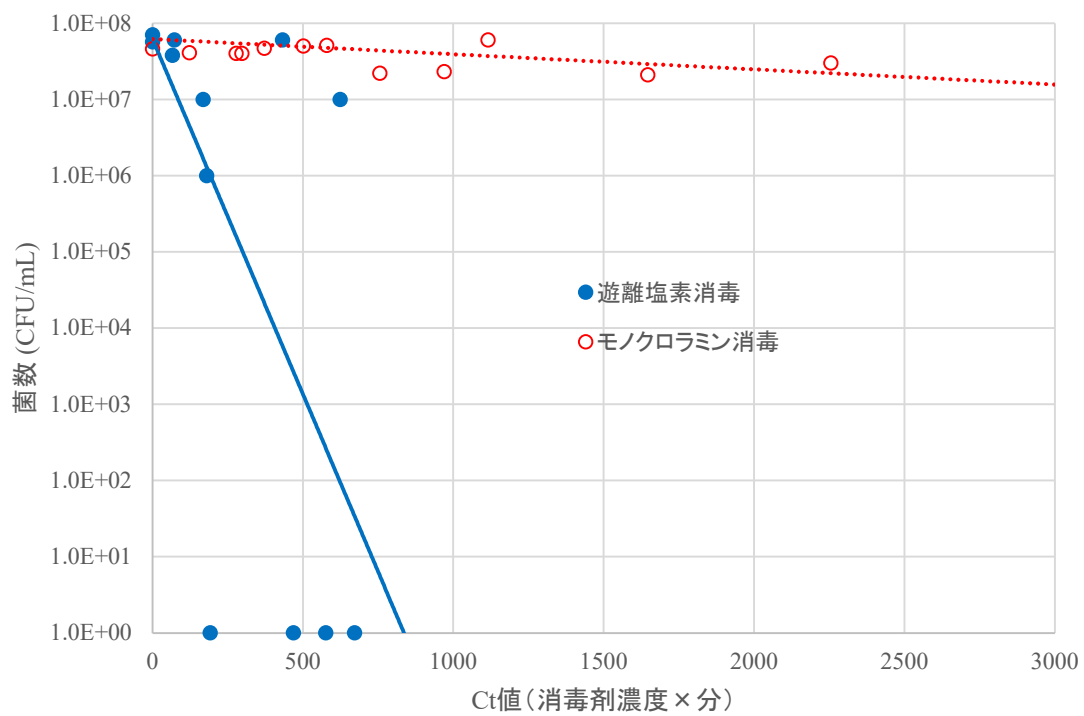


図3 アルカリ性塩化物泉中の *M. phlei* に対する遊離塩素
およびモノクロラミン消毒の不活化の比較
実線が遊離塩素、破線がモノクロラミンの不活化をそれぞれ示す。