

## 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

森 康則<sup>1)2)</sup>\*, 永井佑樹<sup>1)</sup>, 大市真梨乃<sup>1)</sup>, 佐藤大輝<sup>1)</sup>, 小林章人<sup>1)</sup>, 吉村英基<sup>1)</sup>,  
北浦伸浩<sup>1)</sup>, 枝川亜希子<sup>3)</sup>, 藤井 明<sup>4)</sup>, 泉山信司<sup>5)</sup>, 前川純子<sup>5)</sup>

(令和3年12月29日受付, 令和4年4月27日受理)

## Inactivating *Mycobacterium phlei* in Hot Spring Water with Monochloramine and Free Chlorine

Yasunori MORI<sup>1)2)\*</sup>, Yuki NAGAI<sup>1)</sup>, Marino OICHI<sup>1)</sup>, Daiki SATO<sup>1)</sup>,  
Akihito KOBAYASHI<sup>1)</sup>, Hideki YOSHIMURA<sup>1)</sup>, Nobuhiro KITAURA<sup>1)</sup>,  
Akiko EDAGAWA<sup>3)</sup>, Akira FUJII<sup>4)</sup>,  
Shinji IZUMIYAMA<sup>5)</sup> and Junko AMEMURA-MAEKAWA<sup>5)</sup>

### Abstract

In alkaline hot springs, the disinfecting effect of free chlorine is reduced and thus the growth of *Legionella* spp. is left unsuppressed, which poses potential hygiene problems. Therefore, monochloramine disinfection has been proposed as an alternative, and its disinfection effect on *L.* spp. has been demonstrated in field tests. On the other hand, considerable levels of *Mycobacterium phlei* were detected after the continuous use of monochloramine; this causes its own hygiene problems, such as biofilm production. In this study, we used an isolated strain of *M. phlei* in a field test to investigate the degree of disinfection required from the monochloramine, while its actual inactivation was verified in vitro using monochloramine and free chlorine. As a result of the examination, monochloramine was found to have a greater disinfecting effect than free chlorine at the same CT value. Although, this tendency was consistent across the solutions of phosphate buffered saline and

<sup>1)</sup>三重県保健環境研究所 〒512-1211 三重県四日市市桜町 3684-11. <sup>1)</sup>Mie Prefecture Health and Environment Research Institute, 3684-11 Sakura-cho, Yokkaichi, Mie 512-1211, Japan. \*Corresponding author: E-mail moriy04@pref.mie.lg.jp, TEL 059-329-2917, FAX 059-329-3004.

<sup>2)</sup>三重大学生物資源学部 〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577. <sup>2)</sup>Faculty of Bioresource, Mie University, 1577 Kurima-machiya-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan.

<sup>3)</sup>地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 〒537-0025 大阪府大阪市東成区中道1丁目3-69. <sup>3)</sup>Osaka Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari, Osaka, Osaka 537-0025, Japan.

<sup>4)</sup>株式会社ヘルスビューティー 〒457-0012 愛知県名古屋南区菊住2-5-8. <sup>4)</sup>Health Beauty Co., Ltd., 2-5-8 Kikusumi, Minami, Nagoya, Aichi 457-0012, Japan.

<sup>5)</sup>国立感染症研究所 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1. <sup>4)</sup>National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjyuku, Tokyo 162-8640, Japan.

alkaline hot spring water samples, monochloramine tended to be more effective in disinfecting *M. phlei* from alkaline hot spring water samples than from phosphate buffered saline solutions. Thus, the efficacy of monochloramine in disinfecting alkaline hot spring waters was demonstrated. Based on the results of this study, we speculated the reasons for the proliferation of *M. phlei* in bathtub water that continuously uses monochloramine and have proposed that *M. phlei* acquired resistance to monochloramine disinfection in the biofilm. The results of this study further highlight the importance of thoroughly cleaning bathtubs and pipes, disinfecting with high-concentrations, and overnight cleaning with monochloramine to control *M. phlei*.

Key words : *Mycobacterium phlei*, Monochloramine, Public bath, Alkaline hot spring water, CT value, *Legionella* spp.

## 要 旨

アルカリ性の温泉では遊離塩素消毒の効果が低下し、レジオネラ属菌の増殖が抑えきれず、問題が発生する危険性が高いことから、その代替の消毒方法としてモノクロラミン消毒が提案され、そのレジオネラ属菌に対する消毒効果は、実地試験でも確認されている。一方で、モノクロラミン消毒を連続的に実地使用していると、*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。本研究では、モノクロラミン消毒における必要な消毒の程度と対策の検討を目的として、実地試験で増殖した *M. phlei* の単離株を使用し、遊離塩素とモノクロラミンによる不活化を試験管内で検証した。その結果、実験により得られた不活化曲線から、同じ CT 値であれば、*M. phlei* に対するモノクロラミンの消毒効果は、むしろ遊離塩素消毒よりも高いことが明らかとなった。この傾向は、試験溶液が PBS でもアルカリ泉でも同様で、特にアルカリ泉がより顕著であり、特にアルカリ泉に対するモノクロラミン消毒の優位性が改めて支持される結果となった。一連の実験結果をふまえて、モノクロラミンを連続使用している浴槽で、なぜ *M. phlei* が増殖するかを考察したところ、*M. phlei* はバイオフィルム中にあることで、モノクロラミン消毒に対する抵抗性を獲得しているものと推測された。モノクロラミン消毒で *M. phlei* を制御するには、こまめな浴槽清掃はもとより、配管洗浄、高頻度の高濃度洗浄、オーバーナイト洗浄等、バイオフィルム対策を徹底することの必要性と重要性が改めて示唆された。

キーワード : *Mycobacterium phlei*, モノクロラミン, 公衆浴場, アルカリ泉, レジオネラ属菌, CT 値

## 1. はじめに

レジオネラ症は、レジオネラ属菌 (*Legionella* spp. 以下, *L. spp.*) を原因菌とする感染症である。レジオネラ症の予防対策のためには、公衆浴場の適正な衛生管理を含め、水系施設における感染リスクの低減を図る必要がある。

従来の温泉利用施設における浴槽水の消毒方法には、その経済性や取扱いの簡便さ等を理由として、次亜塩素酸ナトリウムの添加に伴う遊離塩素消毒が広く使用されてきた。しかし近年、高 pH やアンモニウムイオンの多含等、温泉そのものの化学的作用によって遊離塩素による消毒効果が阻害される一部の温泉では、必ずしも消毒剤として遊離塩素が最適でない場合があることが指摘されてきた (泉山ら, 2019)。

これらを背景に、厚生労働省から「公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について」(令和元年 9 月 19 日生食発 0919 第 8 号 厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知 Appendix 1 参照 令和 2 年 12 月 10 日生食発 1210 第 1 号 一部改正) および「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」(令和元年 12 月 17 日 薬生衛発 1217 第 1 号 厚生労働省医薬・生活衛生局

生活衛生課長通知 Appendix 2 参照)が発出された。この一連の通知には、特に高 pH やアンモニウムイオンを多含する温泉水など、次亜塩素酸ナトリウムによる遊離塩素消毒の効果が減弱する温泉水では、新たな消毒方法のひとつとして、モノクロラミンによる消毒を選択肢に加える旨が明記されている。

モノクロラミン消毒は、浴槽水、とりわけ遊離塩素による消毒効果が減弱する高 pH の温泉浴槽水において、*L. spp.* の制御に効果的であることが、数多くの事例報告で明らかになっている(柳本ら, 2015)。しかしながら、その一方で森ら(2019)が実施した高 pH の温泉浴槽水におけるモノクロラミン消毒の実地試験によると、モノクロラミン消毒下の高 pH の温泉水を用いる公衆浴場において、浴槽水中に *L. spp.* は検出されなかったものの、経時的に従属栄養細菌の増殖が認められたことが報告されている。その後、Mori *et al.* (2020) も、モノクロラミン消毒下のアンモニウムイオンを多含する温泉水を用いた公衆浴場において、同様に浴槽水中では *L. spp.* は検出されない中で従属栄養細菌の増殖が認められたことを報告している。他にも様々な条件の施設のモノクロラミン消毒実証研究において、従属栄養細菌の増殖が確認されており(長岡ら, 2017)、モノクロラミン消毒に抵抗性のある従属栄養細菌の存在が疑われてきた。

この背景の中で、渡邊ら(2018)は、モノクロラミン消毒下で増殖する細菌を同定し、その優占種が *Mycobacterium phlei* (以下、*M. phlei*) であったことを報告している。*M. phlei* は、非結核性抗酸菌(Non-tuberculous Mycobacteria, 以下、NTM)の一種である。NTM は一般的に土壌や海水、河川水等環境中に広く生息しているが、その至適環境の知見の詳細はほとんど得られておらず、近年は、NTM に起因する非結核性抗酸菌症(NTM 症)の増加が懸念されている(和田ら, 2017)。NTM の中で迅速発育菌に分類される *M. phlei* は、健常者に対する病原性は低いと考えられているが、国内で免疫機能の低下した患者に対する日和見感染の報告例がある(Tanaka *et al.*, 2019)。なお *M. phlei* は、2018 年に新設された *Mycolicibacterium* 属への移籍が提唱されたが(Gupta *et al.*, 2018)、現在は *Mycobacterium* 属に戻されている(Oren and Garrity, 2019; 大楠, 2021)。

また、*Mycobacterium* 属は芽胞を作らない細菌であるが、細胞壁に脂質を多く含むため消毒への抵抗性が高いことが問題視されている(Oriani *et al.*, 2018)。特に、前述の厚生労働省通知の発出を契機に、浴槽水の消毒剤として加速度的な普及が見込まれるモノクロラミンに対し、*L. spp.* については一定程度消毒可能であることが確認されているが、*M. phlei* についてはその検証が十分に進んでおらず、これまでの実地調査の結果からも *M. phlei* の実地制御が困難である可能性が示唆されている。加えて、一般に細菌類の増殖は、その捕食者であるアメーバの生育を促し(Thomas *et al.*, 2010)、そのアメーバは *L. spp.* の増殖の場となる。これらの細菌類の制御は、レジオネラ症未然防止の観点からも、浴槽水の衛生管理上の重要な課題として考えるべき重要な事項である。

以上の流れの中で、松田ら(2019)は、滅菌精製水中の *M. phlei* に対するモノクロラミンと遊離塩素の消毒効果を実験的に比較した。その結果、遊離塩素よりもモノクロラミンの方が、高い消毒効果が得られたことを報告した。このことは、実地と試験管内におけるモノクロラミン消毒に対する *M. phlei* の挙動が異なることから、新たな課題が浮上する結果となった。これらの温泉水を用いた温泉利用施設の衛生管理を十分なものとするためにも、*M. phlei* に対するモノクロラミンの消毒効果について、さらなる検証を深める必要がある。

そこで本研究では、モノクロラミンによる *M. phlei* に対する消毒力について、PBS ならびに高 pH の温泉水を用いた *in vitro* 実験による検証を試みた。実験の結果、温泉利用施設の衛生管理に関する有用な知見が得られたので、以下に報告する。

## 2. 方 法

### 2.1 培養試験方法

本実験では検液として、高 pH の温泉水（以下、アルカリ泉）と、りん酸緩衝液（以下、PBS）をそれぞれ使用した。アルカリ泉は、森ら（2019）の実地試験で対象とした温泉水と同一のものを使用し、PBS はその比較対象とした。試験に用いる検液を、121℃ 15 分間の滅菌処理を行った後、主成分について化学分析に供した。その分析結果を Table 1, 2 に示す。なお、化学分析の方法は、環境省自然環境局（2014）が定める鉱泉分析法指針（平成 26 年改訂）に準拠した。

モノクロラミンの消毒液には、ケイ・アイ化成株式会社製のケイミックス SP（次亜塩素酸ナトリウム溶液、以下、モノクロラミン調製用 A 液）とレジサイド（硫酸アンモニウム溶液、以下、モノクロラミン調製用 B 液）を用いた。

実験のプロトコールは、*M. phlei* に対するモノクロラミンの殺菌効果を報告した先行研究（松田ら、2019）を参考にして定めた。供試菌株は、神奈川県内に位置する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、16S rDNA 配列により菌種を同定したものを使用した（松田ら、2019）。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、実験 1 週間前から R2A 培地（栄研化学株式

Table 1 Chemical composition of the alkaline hot spring water used in this study, analyzed after sterilization. Components such as ammonium and iodide ions that interfere with the disinfecting effects of free chlorine (Agata *et al.*, 2014) are negligible in this alkaline hot spring water according to the "hot spring analysis report" based on the Hot Springs Law.

Cation	mg/kg	Anion	mg/kg	Non-dissociation Component	mg/kg
Na <sup>+</sup>	91.8	F <sup>-</sup>	1.2	H <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	57.9
K <sup>+</sup>	1.0	Cl <sup>-</sup>	14.8		
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<0.1	Br <sup>-</sup>	0.1		
Mg <sup>2+</sup>	<0.1	I <sup>-</sup>	<0.1		
Ca <sup>2+</sup>	0.7	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.8		
		HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.3		
		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	32.4		
		BO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	3.7		

pH, 9.64; EC, 39.4 mS/m

Table 2 Chemical compositions of the phosphate buffered saline used in this study.

Cation	mg/kg	Anion	mg/kg	Non-dissociation Component	mg/kg
Na <sup>+</sup>	3,879	F <sup>-</sup>	<0.1	H <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	<0.1
K <sup>+</sup>	164.4	Cl <sup>-</sup>	5,046	HBO <sub>2</sub>	0.6
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<0.1	Br <sup>-</sup>	<0.1		
Mg <sup>2+</sup>	<0.1	I <sup>-</sup>	<0.1		
Ca <sup>2+</sup>	<0.1	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<0.1		
		HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	965.2		
		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	<0.1		

pH, 7.64; EC, 1.62 S/m

会社 R2A AGAR Eiken E-MB68) で 37°C の前培養を行い, 増殖した *M. phlei* を白金耳でかき取って菌液を調製した。

実験は, 三重県保健環境研究所の 25°C に常時管理された実験室内で行った。本実験では 2 つの消毒系統の試験を実施した。滅菌カップに PBS とアルカリ泉 150 mL をそれぞれ入れ, 濁度により菌数調整を施した *M. phlei* の菌液を検液内で  $10^6 \sim 10^7$  CFU (Colony Forming Unit) の間となるように添加した。1 つ目の消毒系統はモノクロラミン消毒で, それぞれの滅菌カップにモノクロラミン調製用 A 液とモノクロラミン調製用 B 液を混合した消毒液を適量入れた。2 つ目の消毒は遊離塩素消毒で, モノクロラミン調製用 A 液のみを適量入れた。モノクロラミン, 遊離塩素とも調製濃度は, 低濃度 (約 5 ppm), 中濃度 (約 10 ppm), 高濃度 (約 20 ppm) の 3 段階とした。

菌数測定用検液と消毒濃度測定用検液のサンプリングは, 消毒剤添加後 15 分後, 30 分後, 60 分後, 90 分後, 120 分後にそれぞれ実施した。菌数測定用検液は, 適量のチオ硫酸ナトリウム (関東化学 鹿特級) にて中和した後, 適宜希釈してから, R2A 寒天培地に混釈した。それぞれの R2A 寒天培地を回分培養により 7 日間 37°C で培養し, その後の培地のコロニー数をカウントした。

また, 菌数測定用検液のサンプリングと同時に, 消毒濃度測定用検液をとり, モノクロラミン消毒の検液はモノクロラミン濃度, 遊離塩素消毒の検液は遊離塩素濃度をそれぞれ測定した。モノクロラミン濃度は, ポケットモノクロラミン・遊離アンモニア計 (HACH DR300 Pocket Colorimeter) によるインドフェノール法, 遊離塩素濃度は, ポケット残留塩素計 (HACH Pocket Colorimeter II) による DPD 法を用いた。

なお予備実験として, 滅菌カップに PBS とアルカリ泉 150 mL と同程度の菌液を入れた検液において, 菌液添加直後と, 消毒剤を添加しない状態で 120 分後の菌数を, それぞれ同一の方法にてカウントした。その結果, 菌液添加直後に比べてその 120 分後も菌数の大きな変化はなく, 本試験に使用する PBS やアルカリ泉の成分によって菌に対する消毒効果が生じないことを事前に確認した。

## 2.2 不活化指標と消毒効果の評価

本実験で得られた消毒剤濃度の測定値, 消毒剤の接触時間をもとに, 主に消毒工学の分野にて水中微生物の消毒による不活化指標として用いられている CT 値 (Concentration-time value) を式(1)に基づいて算出した (Hermanowicz, 1999)。

$$CT \text{ 値 (mg/L} \cdot \text{min)} = C \times T \quad \dots\dots\dots(1)$$

C: 消毒剤 (モノクロラミン/遊離塩素) 濃度 (mg/L)

T: 消毒剤の接触時間 (min)

縦軸をコロニー数 (対数表示), 横軸を CT 値 (線形表示) とした相関図に, 各測定結果をプロットし, 菌液添加直後の菌数を切片とした近似式 (不活化曲線) を得た。この不活化曲線の傾きは, CT 値の上昇に伴う菌数の減少度合を示すことから, その消毒剤の消毒効果と相関する。

## 3. 結 果

### 3.1 PBS およびアルカリ泉中における消毒剤の濃度安定性

PBS およびアルカリ泉中における, モノクロラミンおよび遊離塩素の濃度の経時変化を Fig. 1 に示す。

モノクロラミン, 遊離塩素とも, 添加から実験終了に相当する 120 分後に至るまで, 実験開始時

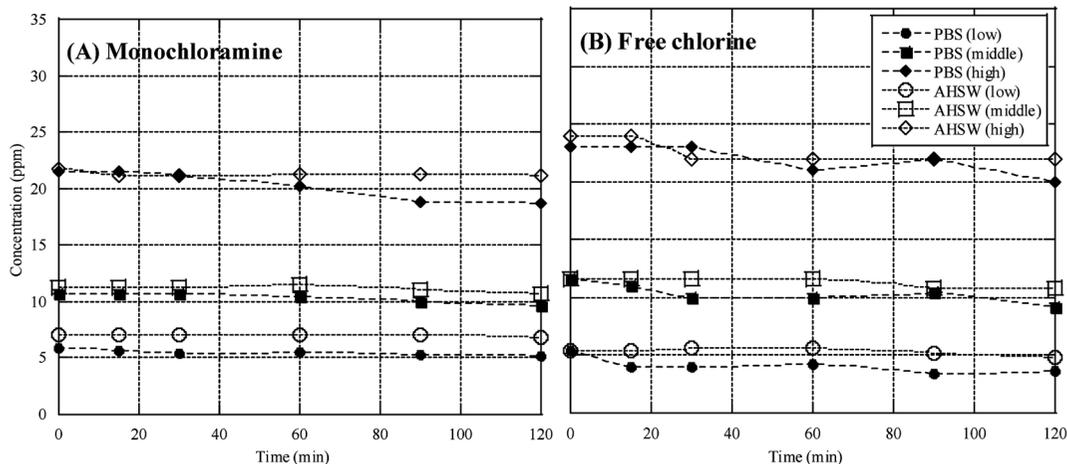


Fig. 1 Temporal changes in monochloramine (A) and free chlorine (B) concentrations in PBS and alkaline hot spring water. PBS : phosphate buffered saline, AHSW : alkaline hot spring water. Each disinfectant was added at different concentrations, namely low (approximately 5 ppm), middle (approximately 10 ppm), and high (approximately 20 ppm).

の消毒剤濃度の 8 割前後を維持しており、いずれも濃度安定性が高いことが確認された。

多様な溶存成分を含む温泉水においては、遊離塩素、モノクロラミンともにその濃度維持に妨害をもたらすアンモニウムイオンやよう化物イオンなどをはじめとする化学成分が含まれている場合がある (縣ら, 2014)。本実験においても検液の化学分析により、主要な妨害成分がほとんど含まれていないことは確認しているが (Table 1, Table 2)、本分析により、各検液中に消毒剤濃度の維持に妨害がほとんどないことを、再確認できたものと考えられる。

### 3.2 PBS とアルカリ泉における *M. phlei* の不活化

PBS における *M. phlei* と CT 値の相関プロットを Fig. 2 に、アルカリ泉における相関プロットを Fig. 3 に、それぞれ示す。

PBS を用いた実験の結果から、*M. phlei* の 3-Log 不活化に必要な CT 値は、モノクロラミンがおおよそ 500 mg/L・min であるのに対し、遊離塩素はおおよそ 1,200 mg/L・min となり、おおよそ 2 倍近くの CT 値を要求されることがわかった。

さらに、アルカリ泉を用いた不活化実験の結果では、*M. phlei* の 3-Log 不活化には、モノクロラミンが CT 値おおよそ 800 mg/L・min であるのに対し、遊離塩素は 1-Log 不活化でも CT 値 2,000 mg/L・min が必要であり、それぞれの消毒剤の消毒効果には、明瞭な違いが認められた。

## 4. 考 察

### 4.1 アルカリ泉におけるモノクロラミン消毒の優位性

従来汎用的に使用されてきた遊離塩素消毒に阻害性を有する化学的特徴のひとつに、高 pH が挙げられる。高 pH の浴槽水に次亜塩素酸ナトリウムを添加した場合、最も消毒効果が期待される次亜塩素酸 (HClO) はほとんど生成されず、高 pH 領域ではほとんどが次亜塩素酸イオン (ClO<sup>-</sup>) にイオン化し、消毒力が減弱することが知られている (Appendix 2 (9) 参照。泉山ら, 2019; 杉山ら, 2010)。

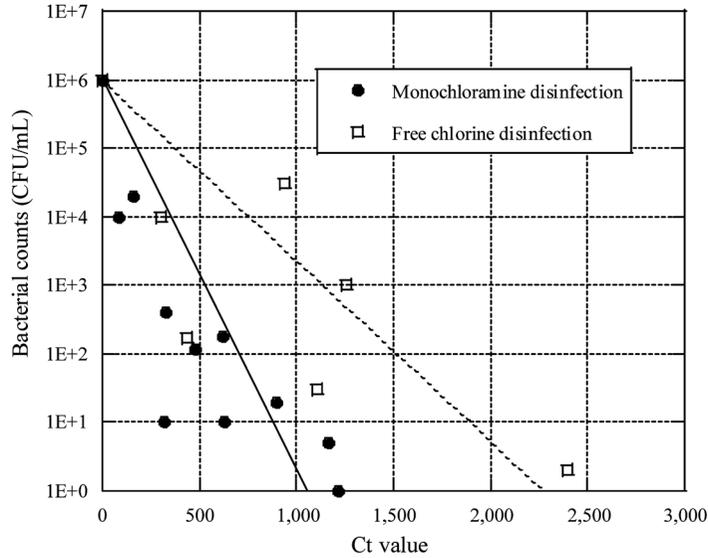


Fig. 2 Inactivation curves showing the inactivation of *M. phlei* due to monochloramine (solid line) and free chlorine (broken line), in phosphate buffered saline. These inactivation curves indicate a higher disinfecting effect of monochloramine than free chlorine at the same CT value.

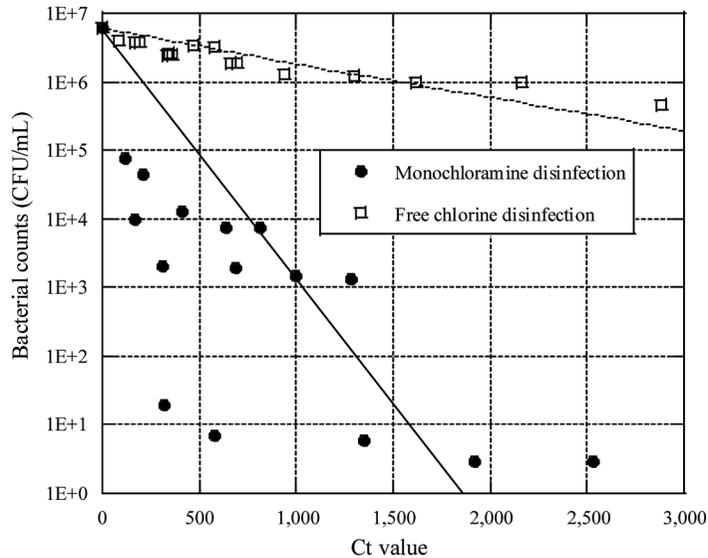


Fig. 3 Inactivation curves showing the inactivation of *M. phlei* due to monochloramine (solid line) and free chlorine (broken line) in alkaline hot spring water.

アルカリ泉を用いた本実験において、DPD法で検出された遊離塩素の指示値は、次亜塩素酸イオンによる発色であることが推測される。一方で、モノクロラミン消毒は、消毒のpH依存性が次亜塩素酸ナトリウムに比べて低く、アルカリ性の浴槽水でも、消毒効果を保てることが確かめられている。すなわち、アルカリ泉における消毒力の明瞭な違いは、この次亜塩素酸イオンへの解離に

よる消毒力の減弱が主な要因と推測される。

以上の結果から、モノクロラミン消毒は、特にアルカリ泉に対して効果的であることが改めて支持されたと考えられる。

#### 4.2 浮遊状態と付着状態の *M. phlei* に対するモノクロラミンの消毒効果

モノクロラミン消毒の実地試験の結果、*M. phlei* の増殖が数多く観察されてきたことから、従来、*M. phlei* はモノクロラミン消毒に対する抵抗性を有するものと考えられてきた (森ら, 2019)。今回のアルカリ泉を用いた実験では、モノクロラミン消毒は *M. phlei* に対して効果的という結果が得られた。また、ほぼ中性に近い pH=7.64 の PBS においても、同じくモノクロラミン消毒が効果的という結果が得られた。松田ら (2019) は滅菌精製水を検液とする実験を行い、やはり遊離塩素よりもモノクロラミン消毒の方が、消毒効果が高いという結果を報告しており、本実験でも同一性の高い実験結果を得ることができた。ただ、一見整合的でないと思われる実地試験による観察結果と、本研究の実験結果の違いについて、以下にその解釈を試みる。

実地試験と本実験の *M. phlei* について比較するとき、水中での *M. phlei* の存在状態の違いが異なる結果をもたらした可能性が考えられる。本実験で使用した *M. phlei* は、基本的にほとんどが浮遊性と考えられるが、実施設で存在する *M. phlei* は必ずしも浮遊性であるとは限らないかもしれない。むしろ浴槽や循環ろ過系統の配管、ろ過器といった支持固体 (担体) には、多少の有機物や無機物が付着した、いわゆるコンディショニングフィルムが形成されていると考えられるため、そういった支持固体において付着状態にあるものが多い可能性が考えられる。

一般に細菌は、このコンディショニングフィルムに対する可逆的付着状態を経て、細胞外多糖合成促進を伴う不可逆的付着状態に移行して、初期付着が完了する (古畑, 2021; 松村, 2020)。その後、細胞分裂を伴うバイオフィルムの成熟が進むと、モノクロラミンでも遊離塩素でも、その消毒耐性は、浮遊菌の数倍から数千倍に上昇する (Mark *et al.* 1988)。*M. phlei* の初期付着やバイオフィルムの形成過程のメカニズムには明らかになっていない部分が多いものの、本研究の実験結果から、実地における *M. phlei* は、支持固体表面のコンディショニングフィルムに対する初期付着を短時間で完了し、モノクロラミン消毒に対する抵抗性を早い段階で獲得しているのではないかと推測される。

なお、本実験と同じ温泉水を用いてモノクロラミン実地試験を実施した森ら (2019) の報告では、過炭酸ナトリウムによる配管洗浄の 1 週間後には  $3.9 \times 10^3$  CFU/mL、2 週間後には  $1.0 \times 10^4$  CFU/mL を超える従属栄養細菌が検出されており、これらの菌種の全てが *M. phlei* とは限らないものの、1 週間に満たない数日単位で支持固体のコンディショニングフィルムに対する初期付着およびバイオフィルム形成が進んだことが伺える。

同報告では、本施設では 1 週間に 1 回 10~20 ppm 程度の高濃度モノクロラミン消毒を実施していたが、それでも従属栄養細菌の増殖を完全には制御しきれていなかった。*M. phlei* を制御するためには、モノクロラミン消毒下においても従来通りのこまめな浴槽清掃はもとより、過酸化水素水や過炭酸ナトリウム等の洗浄剤を用いた配管洗浄により、支持固体のコンディショニングフィルムに対する初期付着およびバイオフィルムの形成を未然に防ぐことの重要性が改めて強調される。加えて、高濃度モノクロラミン消毒や、オーバーナイト洗浄など、高い CT 値を得られる消毒法を高頻度に行うことも効果的と考えられる。

## 5. ま と め

本研究では、数々の先行研究でモノクロラミン消毒の実地試験で増殖が認められている *M. phlei* に着目して、モノクロラミンと遊離塩素の消毒による不活化を実験的に検証し、その消毒効果の違いとそのメカニズムについて考察を試みた。

本研究における *in vitro* 実験の結果から、*M. phlei* に対するモノクロラミンの消毒効果は、むしろ遊離塩素消毒よりも高いことが明らかとなった。モノクロラミンの方が *M. phlei* に対する消毒力が高い傾向は、検液が PBS でもアルカリ泉でも同様であったが、アルカリ泉の実験結果の方がその傾向は顕著であった。このことから、特にアルカリ泉に対するモノクロラミン消毒の優位性が改めて支持される結果が得られたと考えられる。

さらに本研究の実験結果をふまえて、実地における *M. phlei* のモノクロラミン消毒に対する抵抗性について考察を試みた。実地においては、初期付着段階を含めたバイオフィーム形成期には、*M. phlei* はモノクロラミン消毒に対する抵抗性を数日単位の短期間で獲得することが推測された。実地において効果的に *M. phlei* を制御するためには、モノクロラミン消毒下においても従来通りのこまめな浴槽清掃はもとより、配管洗浄、高濃度消毒、オーバーナイト洗浄などの併用などが重要であろうと考えられる。

本研究は、実地のモノクロラミン消毒中で増殖する *M. phlei* が、試験管内でどのように不活化されるかの検証を企図して研究方法をデザインした。今後はモノクロラミン消毒下の標準株や他の細菌を対象にしたときのような不活性化曲線が得られるか、といったことが課題となりうる。

また、コンディショニングフィルムへの初期付着から始まるバイオフィーム形成能は、細菌によっても、また配管の材質等、支持固体の性質によっても様々である。加えて、それらの初期付着状態やバイオフィーム形成過程におけるモノクロラミン消毒に対する耐性の違いについても、詳細は明らかにはなっていない。本実験により抽出された研究課題については、今後、全国的な普及が見込まれるモノクロラミン消毒の将来的な課題のひとつとして位置付けておく。

## 謝 辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究費（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（19LA1006）」（研究代表者 国立感染症研究所 細菌第一部 前川純子）の補助を受けて実施しました。

試験に使用した菌株は、温泉利用施設の浴槽水から臨床検査技師の植園健一氏により分離されたものを御提供頂きました。温泉利用施設の管理者の方ならびに植園氏の御配慮に深く感謝申し上げます。また、実験に用いた温泉水の提供につきましては、温泉所有者、温泉利用施設管理者の方々に多大なる御協力を賜りました。ここに記して、深く感謝申し上げます。

## 引用文献

縣 邦雄, 青木信和, 市村祐二, 江口大介, 杉山寛治, 泉山信司, 小坂浩司, 片山富士男, 和田裕久, 富田敦子 (2014): アンモニウムイオン, ヨウ化物イオン等が塩素剤の安定性に与える影響. 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. レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究 (研究代表者 倉 文明) 平成 25 年度分担研究報告書, p 1-8.

古畑勝則 (2021): バイオフィームを知る—レジオネラバイオフィームの評価, ドージンニュース, 177, 1-7.

- Gupta, RS, Brian Lo, Jeen Son (2018) : Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Front. in microbial.*, **67**, 1-40.
- Hermanowicz, S.W. (1999) : 微生物起因の水質 : 規制, 科学, 工学. 水道協会雑誌, **68**, 7, 53-63.
- 泉山信司, 長岡宏美, 柳本恵太, 堀内雅人, 山上隆也, 植松香星, 久田美子, 森 康則, 赤地重宏, 永井佑樹, 杉山寛治, 田中慶郎, 市村祐二, 青木信和, 江口大介, 西尾正也, 山本哲司, 八木樹里奈, 藤井 明, 松田宗大, 松田尚子, 枝川亜希子, 吉田光範, 星野仁彦 (2019) : 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) 平成 28~30 年度総合研究報告書, p 120-137.
- 環境省自然環境局 (2014) : 鉱泉分析法指針 (平成 26 年改訂), 1-163.
- Mark W.L., Cheyl D.C., Ramon G.L. (1988) : Inactivation of Biofilm Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 2492-2499.
- 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 *Mycolicibacterium phlei* に対するモノクロラミンの殺菌効果, 日本防菌防黴学会第 46 回年次大会要旨集, p 232.
- 松村吉信 (2020) : バイオフィルムの構造と形成過程. バイオフィルムの発生メカニズムと評価・対策, 株式会社 R&D 支援センター, p 39-56.
- 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 (2019) : 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—三重県津市の榊原温泉における検討—, *温泉科学*, **69**, 90-102.
- Mori, Y., Yanagimoto, K., Yamamoto, T., Nagai, Y., Yoshimura, H., Akachi, S., Yamagami, T., Uematsu, K., Hisada, Y., Nishio, M., Yagi, J., Izumiyama, S. (2020) : Initial trials of monochloramine disinfection of circulating bathtub water at public hot spring facilities and determining its efficacy. *J. Hot Spring Sci.*, **70**, 50-60.
- 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 (2017) : 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), 平成 28 年度分担研究報告書, p 13-22.
- 大楠清文 (2021) : 医学的に重要な細菌についての分類学 抗酸菌の分類と同定のアップデート. *モダンメディア*, **67**, 391-407.
- Oren, Aharon, Garrity, GM. (2019) : List of changes in taxonomic opinion No. 29. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **69**, 13-32.
- Oriani, AS., Sierra, F., Baldini, MD. (2018) : Effect of chlorine an *Mycobacterium gordonae* and *Mycobacterium chubuense* in planktonic and biofilm state. *Int. J. Mycobacteriol.*, **7**, 122-127.
- 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 縣 邦雄, 遠藤卓郎 (2010) : モノクロラミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策. *保健医療科学*, **59**, 109-115.
- Tanaka, S., Hoshino, Y., Sakagami, T., Fukano, H., Matsui, Y., Hiranuma, O. (2019) : Pathogenicity of *Mycolicibacterium phlei*, a non-pathogenic nontuberculous mycobacterium in an immunocompetent host carrying anti-interferon gamma autoantibodies : a case report. *BMC Infect.*

Dis., 19 ; 454, p 1-6.

Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., Maillard, Jean-Yves (2010) : Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms : risks for water quality. FEMS Microbiol. Rev., 34, 231-259.

和田崇之, 吉田志緒美, 柳井徳磨 (2017) : ヒト, 動物, 環境をとりまく非結核性抗酸菌の浸淫状況と宿主適応. 日本臨床微生物学雑誌, 27, 139-148.

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.

柳本恵太, 高村知成, 植松香星 (2015) : 山梨県内のレジオネラ属菌の消毒が困難な浴用水におけるモノクロラミンの消毒効果. 山梨衛環研年報, 59, 55-57.

## Appendix 1 公衆浴場における衛生等管理要領 (抜粋)

### Ⅲ 衛生管理

#### 第 1 一般公衆浴場

##### 1 施設全般の管理

##### 5 浴室の管理

(5) 浴槽水の消毒に当たっては, 塩素系薬剤を使用し, 浴槽水中の遊離残留塩素濃度を頻繁に測定して, 通常 0.4 mg/L 程度を保ち, かつ, 遊離残留塩素濃度は最大 1 mg/L を超えないよう努めること. 結合塩素のモノクロラミンの場合には, 3 mg/L 程度を保つこと. また, 当該測定結果は検査の日から 3 年間保管すること.

ただし, 原水若しくは原湯の性質その他の条件により塩素系薬剤が使用できない場合, 原水若しくは原湯の pH が高く塩素系薬剤の効果が減弱する場合, 又はオゾン殺菌等他の消毒方法を使用する場合であって, 併せて適切な衛生措置を行うのであれば, この限りではない.

(注)

- ※1 温泉水等を使用し, 塩素系薬剤を使用する場合には, 温泉水等に含まれる成分と塩素系薬剤との相互作用の有無などについて, 事前に十分な調査を行うこと.
- ※2 塩素系薬剤が使用できない場合とは, 低 pH の泉質のため有毒な塩素ガスを発生する場合, 有機質を多く含む泉質のため消毒剤の投入が困難な場合, 又は循環配管を使用しない浴槽で, 浴槽の容量に比して原湯若しくは原水の流量が多く遊離残留塩素の維持が困難な場合などを指す. この場合, 浴槽水を毎日完全に換水し, 浴槽, ろ過器及び循環配管を十分清掃・消毒を行うこと等により, 生物膜の生成を防止すること.
- ※3 高 pH の泉質に塩素系薬剤だけをを用いて消毒をする場合には, レジオネラ属菌の検査により殺菌効果を検証し, 遊離残留塩素濃度を維持して接触時間を長くするか, 必要に応じて遊離残留塩素濃度をやや高く設定すること (例えば 0.5~1 mg/L など) で十分な消毒に配慮すること. あるいは, 結合塩素であるモノクロラミン消毒によること. アンモニア性窒素を含む場合や高 pH の温泉浴槽水の消毒には, 濃度管理が容易で, 十分な消毒効果が期待できるモノクロラミン消毒がより適していること.

## Appendix 2 循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル (抜粋)

### Ⅲ 循環式浴槽の管理方法

#### 5 浴槽の水質管理

2) 消毒方法

- (2) 塩素系薬剤にはどのようなものがありますか。

(略) しかし、どの塩素系薬剤を使用しても、水中で次亜塩素酸が生じ、その殺菌効果によって消毒が行われます。また、結合塩素のモノクロラミンも使用できること（浴槽水の終濃度 3 mg/L 程度）が厚生労働科学研究の調査により明らかにされています。モノクロラミンは安定な化合物ではないので現場で生成を行う必要があります。

- (4) 塩素系薬剤による消毒方法で注意すべきことは何ですか。

(略) なお、温泉成分と塩素系薬剤との反応で、有害あるいは不快な状態に変化する泉質としては、低 pH（塩素ガスの発生）、鉄やマンガン（酸化物の生成による着色）が考えられます。アンモニア性窒素を 1mg/L 以上含む場合は、遊離塩素を検出するまでには、多量の次亜塩素酸ナトリウムの投入（ブレイクポイント処理）を必要とし、現場での濃度調整の困難さや、消毒臭気、消毒副生成物の問題も生じるため、アンモニア性窒素を含む温泉浴槽水の消毒には、濃度管理が容易で、十分な消毒効果が期待できるモノクロラミン消毒がより適しています。

モノクロラミン消毒の薬剤は保存がきかないので、次亜塩素酸ナトリウムとアンモニア剤の各溶液を水道水に混合して、現場で生成する必要があります。酸性の温泉泉質ではトリクロラミン等の悪臭物質が生じる為、使用できません。

- (9) アルカリ性の温泉水では、塩素系薬剤の消毒効果が低下する理由は何ですか。

塩素系薬剤の消毒効果は、殺菌力の強い次亜塩素酸 (HClO) と、殺菌力がその 1/100 程度に過ぎない次亜塩素酸イオン (ClO<sup>-</sup>) の比率により異なりますが、その比率は pH により変動します。(中略) pH6.0 では、約 97% が HClO で占められていますが、pH7.5 では 50%、pH9.0 では 3.1% と激減しています。このため、アルカリ性の温泉水では、塩素系薬剤の効果が低下します。弱アルカリ性でアンモニア性窒素が少ない場合には遊離塩素消毒が有効ですが、アルカリ性でアンモニア性窒素が多い場合はモノクロラミン消毒が使用できます。