

千葉県内の温泉水における *Legionella pneumophila* に対する有効な消毒剤の検討田中智子、富田隆弘<sup>1)</sup>、横山結子、菌部真理奈<sup>2)</sup>、関根広幸<sup>3)</sup>、西條雅明<sup>4)</sup>、岸田一則Experimental Examination on Effectiveness of Disinfectant for *Legionella pneumophila* in Hot Spring Water in Chiba Prefecture

Satoko TANAKA, Takahiro TOMITA, Yuko YOKOYAMA, Marina SONOBE, Hiroyuki SEKINE, Masaaki SAJYO and Kazunori KISHIDA

キーワード：*Legionella pneumophila*、温泉水、消毒剤、次亜塩素酸ナトリウム、モノクロラミン、陽イオン界面活性剤、ブロム系消毒剤、銀イオン製剤、総硫黄Keywords: *Legionella pneumophila*, hot spring water, disinfectant, sodium hypochlorite, monochloramine, cationic surfactant, bromin disinfectant, silver ion, total sulfur

(平成28年8月12日受付 平成28年8月26日受理)

## はじめに

レジオネラ症は感染症法に基づき届出が義務付けられている4類感染症であり、全数把握を始めた1999年以降、届出数は年々増加傾向にある<sup>1)</sup>。日本における感染源として入浴施設や冷却塔や噴水などの人工環境がある<sup>2)</sup>が、特に衛生管理が不十分な循環式浴槽が感染の機会を増やしていると考えられる。

全国の約700施設の温泉水におけるレジオネラ属菌の検出率は約30%であり<sup>3)</sup>、千葉県では平成27年度は約14% (13検体/90検体) 検出<sup>3)</sup>されている。平成12年にレジオネラ属菌を殺菌する方法として「公衆浴場における衛生等管理要領」において「浴槽水の消毒に当っては、塩素系薬剤を使用し、浴槽水中の遊離残留塩素を頻りに測定して、通常0.2ないし0.4mg/L程度に保ち、かつ遊離残留塩素濃度は最大1.0mg/Lを超えないように努めること<sup>4)</sup>と定められた。しかし、遊離残留塩素で管理する次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果は、アルカリ性で減弱し、鉄(II)イオン、総硫黄、アンモニウム態窒素、腐植質などの成分との相互作用がある。

これらの現状から平成27年3月31日に循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルが改正された。その中で、消毒方法は「浴槽水中の遊離残留塩素を通常0.2~0.4mg/L程度に保つこと、またモノクロラミン消毒を用いる場合は総残留塩素で塩素消毒の状態を確認すること<sup>5)</sup>と明記された。総残留塩素は結合塩素と遊離残留塩素の総和である。結合塩素は、従来遊離残留塩素と比較して殺菌効果が弱いとされてきたが、最近の研究で優れた残留性とバイオフィルム抑制効果があることがわかった。総残留塩素濃度で管理するモノクロラミンは高pH、アンモニウム態窒素、腐植質などを含有する温泉水に対して効果がある<sup>6)</sup>とされている。すでに静岡市では、公衆浴場法施行条例において浴槽水の消毒としてモノクロラミンの使用が明記されている。しかし、千葉県ではさま

ざまな泉質を有する温泉水の消毒方法について十分に検討されていない。

そこで県内にある泉質や成分の異なる4施設の温泉水を採取し、塩素系消毒剤の次亜塩素酸ナトリウム、モノクロラミン、またそれ以外の消毒剤のブロム系消毒剤、陽イオン界面活性剤、銀イオン製剤の消毒効果を検討した。

## 実験方法

## 1. 試料

検査に供する温泉水を選定するため、県内の温泉施設について源泉および利用許可施設情報の調査を保健所に依頼した。その中から泉質や成分の異なるA~Dの4つの施設を選定し、温泉水を採取してこれを試料とした。

## 2. 温泉水の鉍泉分析

A~Dの4施設の温泉水について、鉍泉分析法指針(平成26年改訂)に基づいて、36種類(硫化水素を含む場合38種類)の鉍泉分析を実施した。なお、アンモニウム態窒素はアンモニウムイオン(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)の測定値に14/18を掛けて換算し、イオンクロマトグラフで測定不能の試料については、参考としてインドフェノール法で測定した。また総硫黄は定性試験で検出となった温泉水のみ硫化水素の定量試験を実施し、総硫化水素から遊離硫化水素、硫化水素イオン、硫化物イオンを求め換算した。

3. *Legionella pneumophila* に対する消毒剤の有効性

当所に保管していた *Legionella pneumophila* (以下 *L. pneumophila*) SG1 を GVPCa 寒天培地(極東製薬)に37℃で3日間培養した。平板状の *L. pneumophila* を掻き取って、滅菌精製水10mLに浮遊させ、ODが約0.15となるように菌浮遊原液を調製した。50mL滅菌遠沈管にA~Dの温泉水27mLをそれぞれに各6本ずつ(A:6本、B:6本、C:6本、D:6本、計24本)採り、ここに10倍希釈した菌浮遊液を100μL

1)現:健康福祉部疾病対策課、2)現:市原健康福祉センター、3)現:健康福祉部保険指導課、4)現:健康福祉部薬務課

ずつ添加した。この時の 50mL 遠沈管内の *L. pneumophila* の菌数は培養して計測したところ  $1 \times 10^4$  CFU/mL 以上であった。上記の遠沈管のうち 1 本は消毒剤を添加せず対照とし、*L. pneumophila* 添加直後、15 分後、60 分後に GVPC $\alpha$  寒天培地に 10 $\mu$ L 接種した。残り 5 本は次亜塩素酸ナトリウム 0.4mg/L、モノクロラミン 1.5~3mg/L、ブロム系消毒剤 0.4 mg/L、陽イオン界面活性剤 30~50 mg/L、銀イオン製剤 0.1 mg/L となるよう 50mL 遠沈管にそれぞれ添加し、この試験液を消毒剤添加直後、15 分後、60 分後、60 分後で不検出とならなかった消毒剤については対照とともに 24 時間後に GVPC $\alpha$  寒天培地に 10 $\mu$ L 接種した。消毒剤を添加していない温泉水 A~D とそれぞれの消毒剤を添加した温泉水で分離された *L. pneumophila* の菌数を観察し、24 時間後までに不検出となった消毒剤を有

効であると判定した。

### 結果及び考察

#### 1. 温泉水の鉱泉分析

泉質名はそれぞれ、A 含よう素-ナトリウム-塩化物強塩泉（高張性中性泉）、B ナトリウム-塩化物強塩泉（高張性弱アルカリ性泉）、C ナトリウム-炭酸水素塩泉（低張性弱アルカリ性泉）、D 温泉水法第 2 条の別表に規定するメタほう酸 (HBO<sub>2</sub>)、メタけい酸 (H<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>)、炭酸水素ナトリウム (NaHCO<sub>3</sub>) の項により温泉水に適合（低張性アルカリ性泉）に分類された。次亜塩素酸ナトリウムに影響するとされている pH、鉄 (II) イオン (Fe<sup>2+</sup>)、アンモニウム態窒素、総硫黄、腐植質、よう化物イオン (I) は下記のとおりである。

表 1 対象とした温泉水の鉱泉分析結果

	A	B	C	D
泉質名	含よう素-ナトリウム-塩化物強塩泉	ナトリウム-塩化物強塩泉	ナトリウム-炭酸水素塩泉	メタほう酸、メタけい酸、炭酸水素ナトリウムの項により温泉水に適合
pH	6.8	7.6	8.2	8.9
蒸発残留物 (g/L)	4.31	2.72	1.09	0.66
電気伝導度 (S/m)	32.76	17.70	0.17	0.10
密度 (20℃)	1.020	1.011	1.001	1.001
				(mg/kg)
リチウムイオン (Li <sup>+</sup> )	5.3	0.4	0.02	0.02
ナトリウムイオン (Na <sup>+</sup> )	8383	5515	379.9	238
カリウムイオン (K <sup>+</sup> )	152.2	86.1	19	3.6
アンモニウムイオン (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	ND	ND	17	1.2
マグネシウムイオン (Mg <sup>2+</sup> )	226.6	193.4	12	1.1
カルシウムイオン (Ca <sup>2+</sup> )	1693	412.6	24.5	3.7
ストロンチウムイオン (Sr <sup>2+</sup> )	99.4	8.3	0.2	0.4
バリウムイオン (Ba <sup>2+</sup> )	79.6	6.4	0.01	0.01
アルミニウムイオン (Al <sup>3+</sup> )	0.01	0.05	ND	0.04
クロム (III) イオン (Cr <sup>3+</sup> )	ND	ND	ND	ND
マンガン (II) イオン (Mn <sup>2+</sup> )	0.5	0.3	0.02	0.01
鉄 (II) イオン (Fe <sup>2+</sup> )	4.7	1.5	0.2	0.01
銅イオン (Cu <sup>2+</sup> )	ND	0.08	ND	ND
亜鉛イオン (Zn <sup>2+</sup> )	0.01	0.05	ND	ND
カドミウムイオン (Cd <sup>2+</sup> )	ND	ND	ND	ND
鉛イオン (Pb <sup>2+</sup> )	ND	ND	ND	ND
総ひ素 (As)	ND	ND	ND	ND
総水銀 (Hg)	ND	ND	ND	ND
ふっ化物イオン (F <sup>-</sup> )	2.5	ND	0.5	0.4
塩化物イオン (Cl <sup>-</sup> )	16920	9830	26	113
臭化物イオン (Br <sup>-</sup> )	62.0	34.6	0.2	0.4
よう化物イオン (I <sup>-</sup> )	64.6	4.9	0.1	0.1
硫化水素イオン (HS <sup>-</sup> )	NT	NT	0.4	0.5
チオ硫酸イオン (S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )	NT	NT	ND	ND
硫酸イオン (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	ND	13.5	1.9	16.6
亜硝酸イオン (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	ND	ND	ND	ND
硝酸イオン (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	ND	ND	ND	ND
りん酸水素イオン (HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	ND	ND	3.7	1.1
炭酸水素イオン (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	28.8	254	1100	334.9
メタけい酸 (H <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> )	17.2	69.8	64.6	82.7
メタほう酸 (HBO <sub>2</sub> )	97.3	8.9	3.1	7
腐植質	0	0	21.5	0
遊離二酸化炭素 (CO <sub>2</sub> )	67.7	2.2	6.4	0

ND : 定量下限値未満 NT : 検査未実施

表 2 アンモニウム態窒素と総硫黄の結果

	A	B	C	D
アンモニウム態窒素 <sup>※1</sup> (mg/L)	3	5	13.3	0.9
総硫黄 <sup>※2</sup> (mg/kg)	不検出	不検出	0.4	0.4

※1 アンモニウム態窒素

A、Bはインドフェノール法で測定、C、Dはイオンクロマトグラフ法で測定したアンモニウムイオン (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) の測定値に 14/18 をかけた値

※2 総硫黄

HS+S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>S に対応する値

### 1) pH

Aは6.8、Bは7.6、Cは8.2、Dは8.9となりA以外はすべてアルカリ性であった。遊離残留塩素はpH5で100%の効果を有し、アルカリ側になるほど消毒効果は低下するため、B、C、Dでは次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果が低下すると考えられた。

### 2) 鉄 (II) イオン (Fe<sup>2+</sup>)

Aは4.7mg/kg、Bは1.5mg/kg、Cは0.2mg/kg、Dは0.01mg/kgとなった。鉱泉のうち、泉質名に含鉄(II)と成分が記載されるのは、特殊成分を含む療養泉の定義で20mg/kg以上である<sup>6)</sup>がこれに該当するものはなかった。しかし、遊離残留塩素は1mg/kg以上から濃度に依存して減少するため、A、Bは次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果が低下すると考えられた。

### 3) アンモニウム態窒素

Cは13.3mg/L、Dは0.9 mg/Lとなった。A、Bはイオンクロマトグラフで測定できなかったため、参考としてインドフェノール法を実施したところ、Aは約3mg/L、Bは5mg/Lとなった。アンモニウム態窒素を1mg/L以上を含む場合は次亜塩素酸ナトリウムの管理が難しい<sup>7)</sup>が、ほぼすべての温泉水がこれに該当した。

### 4) 総硫黄

A、Bは定性試験の結果不検出、Cは0.4mg/kg、Dは0.4mg/kgとなった。特殊成分を含む療養泉の定義は2mg/kg以上<sup>6)</sup>であるがこれに該当する温泉水はなかった。

### 5) 腐植質

A、B、Dは0mg/kg、Cは21.5mg/kgとなり、腐植質を含む温泉水はCのみであった。遊離残留塩素への影響は腐植質の濃度に依存するためCは次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果が低下すると考えられた。

### 6) 陽イオン (F)

Aは64.6mg/kg、Bは4.9 mg/kg、Cは0.1mg/kg、Dは0.1mg/kgとなった。特殊成分を含む療養泉の定義は10 mg/kg以上である<sup>6)</sup>が、これに該当したのはAであった。

## 2. *L. pneumophila* に対する消毒剤の有効性

消毒剤添加による *L. pneumophila* の菌数の推移について表3に示した。

### 1) A

次亜塩素酸ナトリウムを添加した温泉水は15分後に、モノクロラミン、ブロム系消毒剤を添加した温泉水は投入直後に、

陽イオン界面活性剤、銀イオン製剤を添加した温泉水は15分後に、*L. pneumophila* が不検出となった。しかし、消毒剤を添加していない温泉水についても60分後には不検出となった。この結果より、温泉水自体に *L. pneumophila* の抑制効果があることがわかった。

3%程度の食塩泉では *L. pneumophila* は増殖しない<sup>8)</sup>が、Aは塩化物イオン (Cl<sup>-</sup>) 16920 mg/kg、ナトリウムイオン (Na<sup>+</sup>) 8383 mg/kg で約2.5%の食塩泉であったため *L. pneumophila* の発育に影響したと考えられた。

### 2) B

次亜塩素酸ナトリウムを添加した温泉水は、60分後に、モノクロラミンおよび陽イオン界面活性剤を添加した温泉水は15分後に、ブロム系消毒剤を添加した温泉水は24時間後に不検出となった。消毒剤を添加していない温泉水、銀イオン製剤を添加した温泉水では投入直後から24時間後まで *L. pneumophila* の菌数は1×10<sup>4</sup>CFU/mL以上であり変化はみられなかった。この結果より、次亜塩素酸ナトリウム、モノクロラミン、陽イオン界面活性剤、ブロム系消毒剤が有効であると判定した。

### 3) C

次亜塩素酸ナトリウム、モノクロラミン、ブロム系消毒剤、銀イオン製剤を添加した温泉水および消毒剤を添加していない温泉水は投入直後から24時間後までレジオネラ属菌数は1×10<sup>4</sup>CFU/mLで変化は見られなかったが、陽イオン界面活性剤を添加した温泉水は60分後に不検出となった。

この結果より、陽イオン界面活性剤が有効であると判定した。しかし、温泉水の色が濃茶色から薄茶色と変化し、また水面の泡立ちがみられた。

アルカリ性でアンモニウム態窒素、腐植質を含む温泉はモノクロラミン消毒が有効である<sup>9)</sup>とされているが、硫黄を含んでいたため塩素系消毒剤の効果が減弱した<sup>10)</sup>と考えられ有効でなかった。

### 4) D

次亜塩素酸ナトリウム、モノクロラミン、ブロム系消毒剤、銀イオン製剤を添加した温泉水および消毒剤を添加していない温泉水は投入直後から24時間後まで *L. pneumophila* の菌数は1×10<sup>4</sup>CFU/mL以上で変化は見られなかったが、陽イオン界面活性剤を添加した温泉水は15分後には不検出となった。この結果より、陽イオン界面活性剤が有効であると判定した。

表 3 消毒剤添加による *L. pneumophila* の菌数の推移

(1) A

	消毒剤添加なし	次亜塩素酸ナトリウム	モノクロラミン	ブロム系消毒剤	陽イオン界面活性剤	銀イオン製剤
投入直後 (0分後)	+++	+++	—	—	+++	+++
15分後	+	—	—	—	—	—
60分後	—	—	—	—	—	—
24時間後	NT	NT	NT	NT	NT	NT

(2) B

	消毒剤添加なし	次亜塩素酸ナトリウム	モノクロラミン	ブロム系消毒剤	陽イオン界面活性剤	銀イオン製剤
投入直後 (0分後)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15分後	+++	++	—	+++	—	+++
60分後	+++	—	—	++	—	+++
24時間後	+++	NT	NT	—	NT	+++

(3) C

	消毒剤添加なし	次亜塩素酸ナトリウム	モノクロラミン	ブロム系消毒剤	陽イオン界面活性剤	銀イオン製剤
投入直後 (0分後)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15分後	+++	+++	+++	+++	++	+++
60分後	+++	+++	+++	+++	—	+++
24時間後	+++	+++	+++	+++	NT	+++

(4) D

	消毒剤添加なし	次亜塩素酸ナトリウム	モノクロラミン	ブロム系消毒剤	陽イオン界面活性剤	銀イオン製剤
投入直後 (0分後)	+++	+++	+++	+++	+	+++
15分後	+++	+++	+++	+++	—	+++
60分後	+++	+++	+++	+++	—	+++
24時間後	+++	+++	+++	+++	NT	+++

各試験液を GVPCα 寒天培地にそれぞれ 10μL 接種し、培養した後の発育状況：

+++ 1×10<sup>4</sup>CFU/mL< ++ 1×10<sup>3</sup>CFU/mL～ 1×10<sup>4</sup>CFU/mL + 1×10<sup>1</sup>CFU/mL～ 1×10<sup>3</sup>CFU/mL — 不検出

NT 検査未実施

しかし温泉水の水面に泡立ちがみられ、色については淡黄色であったため変化はみられなかった。

高アルカリの温泉水はモノクロラミン消毒が有効である<sup>5)</sup>とされているが、C と同様硫黄を含んでいたため塩素系消毒剤の効果が減弱したと考えられた。

千葉県は約 13%が硫黄泉、もしくは含硫黄の温泉水(平成 26 年度薬務行政概要)となっており、また含硫黄と判定される濃度以下でも硫黄を含む温泉水は多く存在する。硫黄の含有量と消毒剤との相互作用について今後検討していく必要がある。

まとめ

今回の検討で、①*L. pneumophila* 抑制効果のある成分を含む

温泉水があること、②硫黄を含有する温泉水では、次亜塩素酸ナトリウム、モノクロラミン、ブロム系消毒剤、陽イオン界面活性剤、銀イオン製剤の 5 種類の消毒剤のうち有効なのは陽イオン界面活性剤のみであることがわかった。

引用文献

- 1) 斉藤 厚：レジオネラ感染症ハンドブック，日本医事新報社，254-257(2007)
- 2) 赤井 仁志，野知 啓子，津田 宏之，大塚 雅之，森林博之，門脇 正史：温泉水中の *L. pneumophila* に対する消毒剤の有効性についての実験的検討，空気調和・衛生工学会論文集，139，11-18(2008)
- 3) 浴槽水等のレジオネラ属菌検査について，千葉県健康福祉

部衛生指導課

URL:<https://www.pref.chiba.lg.jp/eishi/toukeidata/koyou/rejionera.html>

4)「公衆浴場における衛生管理等の改正について」

(平成15年2月14日付け健発第0214004号厚生労働省通知)

5)「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアルの改正について」(健衛発0331第7号 平成27年3月31日通知)

6) 鉱泉分析指針：環境省自然環境局(平成26年度改訂)

7) 懸 邦雄, 青木 清和, 市村 祐二, 江口 大介, 杉山 寛治, 小坂 浩司, 他: アンモニウムイオン、ヨウ化物イオン等が塩素系薬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, 平成25年度 総括・分担報告書, 49-56(2014)

8) 懸 邦雄, 神野 透人, 八木田 健司, 杉山 寛治, 小坂 浩司, 泉山 信司, 他: 種々の温泉水におけるモノクロロミンの消毒効果と高濃度洗浄の検証, 厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策事業 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, 平成25年度 総括・分担報告書, 33-42(2014)

9) 長岡 宏美, 懸 邦雄, 神野 透人, 八木田 健司, 杉山 寛治, 小坂 浩司, 他: 種々の温泉水におけるモノクロロミンによるレジオネラ属菌の消毒効果の検証, 厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策事業 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, 平成25年度 総括・分担報告書, 33-42(2014)