

## 資 料

## 温泉水中のレジオネラ属菌に対する塩素及び臭素殺菌に関する検討

神山恵理奈, 堀内 正

## 要 旨

アルカリ性単純温泉におけるレジオネラ属菌の塩素殺菌及び臭素殺菌について検討した。イオン交換水、水道水及び温泉水に次亜塩素酸ナトリウムあるいは1,3-ジブromo-5,5-ジメチルヒダントイン (DBDMH) を添加して、遊離塩素 (臭素) 濃度を測定したところ、アルカリ性単純温泉では次亜塩素酸ナトリウムを添加しても水道水と比較して遊離塩素濃度が上昇しづらく、一定の遊離塩素濃度を確保するためには、多量の薬剤が必要であるのに対し、次亜臭素酸を生成する DBDMH を添加した場合には、温泉水でも遊離臭素濃度を維持しやすいことが確認された。また、アルカリ性単純温泉水中のレジオネラ属菌に 0.5 mg/L の遊離塩素 (臭素) 濃度となるように次亜塩素酸ナトリウムまたは DBDMH を添加したところ、DBDMH 添加系では、次亜塩素酸ナトリウム添加系と比較して速やかなレジオネラ属菌の減少が見られ、DBDMH による 5 分間の処理で、次亜塩素酸ナトリウムにより 3 時間処理した場合と同等の殺菌効果があった。

キーワード：レジオネラ属菌, 次亜塩素酸, 次亜臭素酸, 温泉水

## 1 はじめに

レジオネラ属菌は土壌や河川・湖沼などの自然環境中に広く生息する細菌であるが<sup>1)</sup>、人工水系中にも高率に存在し、これらのレジオネラ属菌を含む水の飛沫を人が吸入した場合にレジオネラ症を発症することがある。感染症法に基づく感染症発生動向調査によると、レジオネラ症は、2010年以降、毎年報告数が増加しており、2013年には過去最多の1,111例が報告されている<sup>2)</sup>。中でも、入浴施設を感染源とする集団感染がたびたび発生していることから<sup>3)</sup>、その対策が求められている。

厚生労働省は平成13年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を示し、入浴施設の衛生管理に関する行政指導を行ってきた。岐阜県においても平成10年から毎年県内の公衆浴場、旅館等の入浴施設を対象にレジオネラ属菌汚染状況調査を実施しており、衛生管理の実態把握と対策に努めている。また、平成14年には「岐阜県公衆浴場又は旅館業に供する施設における浴槽水等の使用水に関する基準」を定め、施設の維持管理をするための指標を示すことにより、施設における衛生の向上及び確保を図ってきた。これに基づいて各入浴施設は、次亜塩素酸ナトリウムによる塩素消毒等のレジオネラ症防止対策に努めている。しかしながら、最近10年間の汚染状況調査によると、浴槽水からレジオネラ属菌が検出される施設は30%前後と依然として高い検出率で推移している。水源別の

検出率は温泉水、地下水、水道水の順に高いことが報告されている<sup>4)</sup>。また、立入採水時に浴槽水の遊離残留塩素濃度が適正範囲 (0.2~1 mg/L) にない施設が50%を超えており、維持管理が適切に行われていない状況が窺える。

公衆浴場や温泉などの浴槽水には、人が入ることで細菌とその栄養になる有機物が絶えず持ち込まれ、特に循環式浴槽では、浴槽水が配管やろ過装置などを循環するため、それらの内壁や内部は生物膜が形成されやすく、レジオネラ属菌の増殖しやすい環境となっている。また、pH や水に含まれる成分が塩素消毒の効果に影響を及ぼすことが報告されており<sup>5) 6)</sup>、泉質が温泉水の衛生管理を難しくする要因となっていると考えられる。

このような背景から、著者らはレジオネラ症防止対策において参考となるデータを提供することを目的として、アルカリ性単純温泉におけるレジオネラ属菌の殺菌について検討した。

## 2 材料と方法

## 2.1 材料

レジオネラ属菌は、*Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC33152 を用いた。供試験水には、イオン交換水、水道水及び温泉水を用いた。温泉水は pH 9.4 のアルカリ性単純温泉の源泉を用いた。

レジオネラ属菌を培養するための培地は、BCYE $\alpha$

寒天生培地(関東化学)及びBYEα培地を用いた。BYEα培地は、1.0gのイーストエキス末(関東化学)を90mLの水に溶解しオートクレーブ滅菌後、10mLの水に溶解した1バイアル分のレジオネラBCYEα発育サプリメント(関東化学)を添加して調製した。

2.2 レジオネラ属菌の培養

*L. pneumophila* ATCC33152株は、前培養のためBYEα培地に接種し、37°Cで一晩振とう培養した。この培養液の一部を新しいBYEα培地に添加し、37°Cで一晩振とう培養した。培養液は遠心分離して、菌体を回収し、生理食塩水で菌体を再懸濁し、再度遠心分離し、菌体を回収した。この洗浄操作を3回繰り返して、得られた菌体を検水に適宜懸濁して各試験に用いた。

2.3 遊離塩素濃度の測定

遊離塩素濃度はハンナインストルメント社製残留塩素計HI-93711を用いて、DPD吸光光度法により測定した。なお、遊離臭素もDPD法により塩素と同様に反応するため、同様に測定した。

2.4 薬剤による殺菌効果の測定

塩素系薬剤として次亜塩素酸ナトリウム溶液(関東化学, 図1a), 臭素系薬剤として1,3-ジブromo-5,5-ジメチルヒダントイン(DBDMH, 和光純薬, 図1b)を用いた。なお、図1に示したように、これらの薬剤は水と反応してそれぞれ次亜塩素酸及び次亜臭素酸を生じる。各薬剤を添加した40mLの温泉水に*L. pneumophila* ATCC33152株の菌体懸濁液を10mL添加した。遊離塩素濃度は、終濃度で0.5mg/Lになるように調製した。この試験液を一定時間処理した後、500分の1量の25%チオ硫酸ナトリウムを添加し、レジオネラ属菌数を測定した。対照として、次亜塩素酸ナトリウムを添加しない系についても同様に操作した。レジオネラ属菌数の測定は、適宜希釈もしくは遠心濃縮した試験液をBCYEα寒天生培地に塗抹し、37°Cで1週間培養して出現したコロニーを計数した。

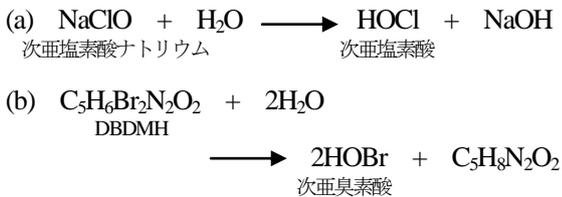


図1 実験に用いた薬剤

3 結果及び考察

3.1 薬剤添加による遊離塩素(臭素)濃度の変化

イオン交換水、水道水及び温泉水における次亜塩素酸ナトリウムの殺菌効果を評価するために、各検水に薬剤を添加した時の遊離塩素濃度を測定した。図2a

は検水10mLに対して100倍希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液(遊離塩素濃度350mg/L相当)を添加した時の添加量に対する遊離塩素濃度を示したものである。イオン交換水及び水道水では添加量の増加とともに遊離塩素濃度が上昇したが、温泉水では添加量50μL以下では遊離塩素濃度の上昇が見られず、添加量60μL以上で上昇した。同様に検水10mLに種々の濃度のDBDMHを添加したところ、温泉水においてDBDMH濃度1mg/L以下では遊離臭素濃度(遊離塩素相当)は上昇しなかったが、2mg/L以上では上昇した(図2b)。これらの結果から、温泉水では遊離塩素(臭素)を確保するために多量の薬剤が必要であることが示された。原因として、温泉水には塩素及び臭素を消費する物質が含まれていることが考えられた。

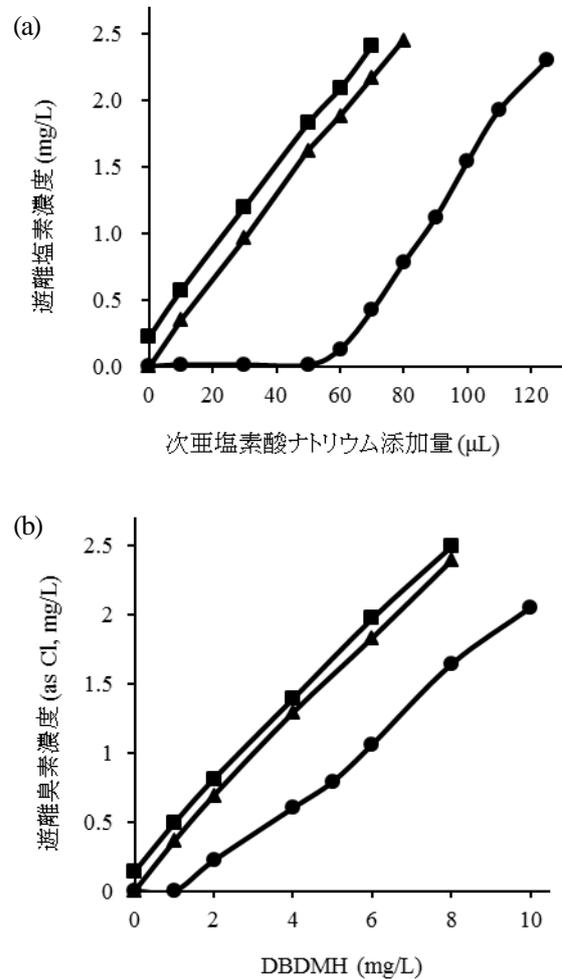


図2 薬剤添加による遊離塩素(臭素)濃度の変化  
 (a) 次亜塩素酸ナトリウム: 検水10mLに対して100倍希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加して測定, (b) DBDMH. ● 温泉水, ▲ イオン交換水, ■ 水道水.

図3は、薬剤添加量をイオン交換水中での遊離塩素濃度で表した場合の、温泉水あるいは水道水の遊離塩素濃度をプロットしたものである。図3から、アルカリ性単純温泉では次亜塩素酸と比較して次亜臭素酸の

方が遊離塩素濃度の低下度が小さいことが示された。今回試験に用いた温泉水で遊離塩素濃度を 0.5 mg/L にするためには、次亜塩素酸ナトリウムの場合、イオン交換水中で遊離塩素濃度約 2.2 mg/L に相当する量、DBDMH の場合は、約 1.1 mg/L に相当する量がそれぞれ必要であった。

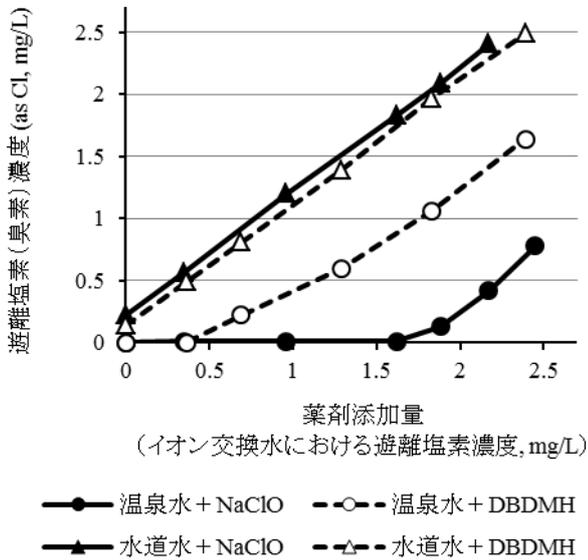


図3 遊離塩素 (臭素) 濃度の比較

### 3.2 薬剤による殺菌効果

温泉水中のレジオネラ属菌に 0.5 mg/L の遊離塩素 (臭素) 濃度となるように次亜塩素酸ナトリウムまたは DBDMH を添加して、1 分～3 時間処理した。その結果、薬剤を添加しない系では、菌数に変化が見られなかったのに対し、次亜塩素酸ナトリウムまたは DBDMH を添加した系では、処理時間とともにレジオネラ属菌数の減少が認められた (図4)。次亜塩素酸ナトリウムを添加した系では、菌数は処理時間 30 分で約 10 分の 1 に減少し、3 時間で 1000 分の 1 以上減少した。この結果から、温泉水でも塩素濃度を適切に維持すれば十分な殺菌効果が得られることが分かった。

一方、DBDMH を添加した系では、次亜塩素酸ナトリウムを添加した場合と比較して速やかなレジオネラ属菌の減少が見られ、菌数は処理時間 5 分で、次亜塩素酸ナトリウムで 3 時間処理した場合と同等に減少した。

### 3.3 薬剤濃度の殺菌効果への影響

温泉水中のレジオネラ属菌に 0.1～0.5 mg/L の遊離塩素 (臭素) 濃度となるように次亜塩素酸ナトリウムまたは DBDMH を添加して、10 分間処理した。その結果、DBDMH では 0.2 mg/L でレジオネラ属菌が 10 分の 1 以下、0.3 mg/L で 100 分の 1 以下となり (図5)、DBDMH の殺菌効果の高さが示された。

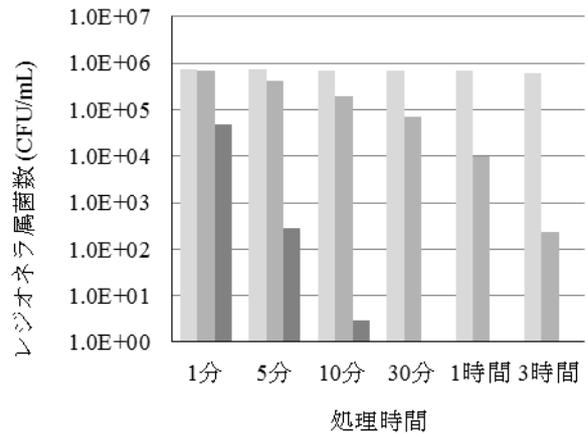


図4 薬剤による殺菌効果

■ 薬剤なし, ■ NaClO, ■ DBDMH

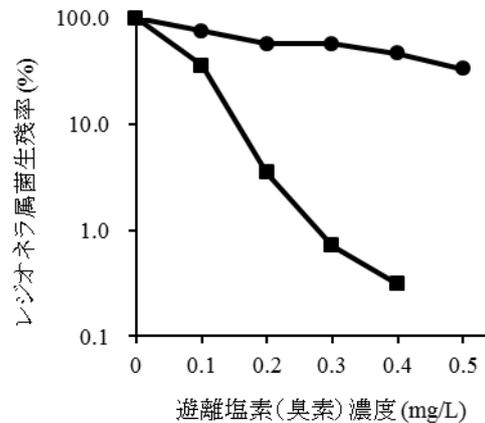


図5 薬剤濃度による殺菌効果の違い

● NaClO, ■ DBDMH

## 4 まとめ

今回、我々は pH 9.4 のアルカリ性単純温泉水中のレジオネラ属菌に対する薬剤の殺菌効果について検討した。その結果、アルカリ性単純温泉においては、次亜塩素酸ナトリウムを添加しても水道水と比較して遊離塩素濃度が上昇しづらく、一定の遊離塩素濃度を確保するためには、多量の薬剤が必要であるのに対し、次亜臭素酸を生成する DBDMH を添加した場合には、温泉水でも遊離臭素濃度が低下しにくいことが確認された。この結果から、アルカリ性単純温泉を使用する入浴施設では、次亜塩素酸による日常管理において、遊離塩素濃度が適切に維持されているかきめ細かいモニタリングが必要であると考えられる。

また、次亜塩素酸でも遊離塩素濃度を適切に維持し接触時間を長めにすることで、レジオネラ属菌に対して十分な殺菌効果が得られること、次亜塩素酸と比較して次亜臭素酸の方がレジオネラ属菌に対してより速やかに高い殺菌効果が得られることが示された。これらの結果は、アルカリ性単純温泉の源泉を用いた実験

室レベルでの結果であるため、実際の浴槽水でのさらなる検討が必要である。特に、次亜臭素酸には高い殺菌効果があるため、レジオネラ属菌数の増加を効果的に抑制できると期待されるが、設備構造への影響、臭気の種類、排水管理方法等を十分検討した上で、日常管理に取り入れることを検討することが望まれる。次亜臭素酸の活用方法としては、レジオネラ属菌が通常よりも高濃度で検出された場合や、一時期に入浴者が増加し汚染が懸念される場合などに、次亜塩素酸と併用して一時的に使用することが有効ではないかと考える。

### 謝 辞

本研究にあたり、温泉水の採取にご協力いただきました岐阜県立下呂温泉病院の関係諸氏に感謝いたします。

### 文 献

- 1) 国立感染症研究所 レジオネラ症とは  
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/kansennohanasi/530-legionella.html>
- 2) 有馬雄三, 福住宗久, 高橋琢理, 山岸拓也, 加納和彦, 大石和徳, 砂川富正, 倉 文明, 前川順子,

- 大西 真: 最近のレジオネラ症の発生動向, 感染症週報, 16 (25), 7-9, 2014.
- 3) 倉 文明, 登坂直規, 渡辺治雄: 5章 日本と世界のレジオネラ感染症情報, わが国の感染症法に基づいた届け出の現状, レジオネラ感染症ハンドブック, 齊藤 厚編, 254-266, 日本医事新報社, 東京, 2007.
  - 4) 古田紀子, 山田万希子, 原 信行, 白木 豊, 野田伸司, 村瀬真子 他: 岐阜県下の浴槽水および冷却塔水におけるレジオネラ属菌汚染状況調査 (2003-2007), 岐阜県保健環境研究所報, 16, 18-24, 2008.
  - 5) Kuchta JM, States SJ, McNamara SA, Wadowsky RM, and Yee RB : Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine in tap water, Appl. Environ. Microbiol., 46, 1134-1139, 1983.
  - 6) Landeen LK, Yahya MT, and Gerba CP : Efficacy of copper and silver ions and reduced levels of free chlorine in inactivation of *Legionella pneumophila*, Appl. Environ. Microbiol., 55, 3045-3050, 1989.

Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine and bromine in hot spring water

Erina KOHYAMA and Tadashi HORIUCHI

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:  
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu, 504-0838, Japan