

高アルカリ温泉水中のモノクロラミンと遊離塩素に対する *Legionella pneumophila* の消毒耐性の定量的評価

森 康則^{1)*}, 永井佑樹²⁾, 佐藤大輝²⁾, 谷本健吾²⁾, 豊田真由美²⁾, 亀山有貴²⁾,
原 有紀²⁾, 中野陽子²⁾, 小林章人²⁾, 吉村英基²⁾, 泉山信司³⁾

(令和6年6月7日受付, 令和6年8月15日受理)

Quantitative Evaluation of the Disinfectant Effect of Monochloramine and Free Chlorine on *Legionella pneumophila* in Alkaline Hot Spring Water

Yasunori MORI^{1)*}, Yuki NAGAI²⁾, Daiki SATO²⁾, Kengo TANIMOTO²⁾,
Mayumi TOYODA²⁾, Yuki KAMEYAMA²⁾, Yuki HARA²⁾, Yoko NAKANO²⁾,
Akihito KOBAYASHI²⁾, Hideki YOSHIMURA²⁾ and Shinji IZUMIYAMA³⁾

Abstract

Under free chlorine disinfection in alkaline hot spring water, *Legionella* spp. can be detected upon the attenuation of the disinfection effect. Free chlorine can potentially inhibit the disinfection of alkaline hot spring water. In this study, we examined the usefulness of monochloramine disinfection in alkaline hot spring water using *in vitro* testing. *In vitro* tests were performed to evaluate the inactivation of *Legionella pneumophila* in alkaline hot spring water (pH=9.64) under free chlorine and monochloramine disinfection and the resistance to disinfection under each condition. Alkaline hot spring water was placed in a sterilized cup and a pre-cultured *L. pneumophila* suspension was added. Free chlorine and monochloramine were added to maintain the concentrations close to that of the control standards. The lowest concentration-time (CT) values for free chlorine and monochloramine were already below the detection limit. On comparing the results of this study with those of *in vitro* tests of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Mycobacterium phlei* under the same conditions, *L. pneumophila* and *E. coli* were highly inactivated by both disinfectants. In addition, we

¹⁾名古屋大学宇宙地球環境研究所 〒464-8601 愛知県名古屋市中種区不老町. ¹⁾Institute for Space-Earth Environmental Research, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan.
*Corresponding author : E-mail mori.yasunorit3@f.mail.nagoya-u.ac.jp, TEL 052-747-6351 FAX 052-747-6334

²⁾三重県保健環境研究所 〒512-1211 三重県四日市市桜町 3684-11. ²⁾Mie Prefecture Health and Environment Research Institute, 3684-11 Sakura-cho, Yokkaichi, Mie 512-1211, Japan.

³⁾国立感染症研究所 〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1. ³⁾National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjyuku, Tokyo 162-8640, Japan.

calculated the disinfection time required at a field facility based on CT values. The results showed that *L. pneumophila* and *E. coli* could be inactivated in a few minutes, and *B. subtilis* and *M. phlei* could be inactivated to 1-log in less than 90 minutes. Thus, the usefulness of monochloramine disinfection for alkaline hot spring water was confirmed. These results suggest that *L. pneumophila* may be protected in some way by biofilms and cell clusters formed by *B. subtilis*, *M. phlei*, and other bacteria that are highly resistant to disinfection in real-world facilities. These findings support the importance of disinfecting bathtub water, as well as periodic high concentration flushing and pipe cleaning.

Key words : *Legionella pneumophila*, Monochloramine, Free chlorine, Alkaline hot spring water, Concentration-time (CT) value

要 旨

遊離塩素消毒は、高アルカリ温泉水における消毒力が減弱することにより、レジオネラ属菌が検出されて問題になることがある。代替消毒剤であるモノクロラミン消毒は、高アルカリ温泉水でも経験的には有効と考えられているが、その有効性を試験管内試験により定量的に検証した。高アルカリ温泉水 (pH=9.64) を入れた滅菌カップ内に、培養した *Legionella pneumophila* の菌液を添加し、遊離塩素、またはモノクロラミンを、浴槽水の一般的な管理濃度付近 (それぞれ 0.4 mg/L、または 3 mg/L) になるように添加した。その結果、遊離塩素、モノクロラミンのいずれにおいても、消毒剤添加 15 分後の本実験で最も CT 値が低い実験条件下で、すでにコロニー数がカウントできず、検出限界以下となった。

この結果を *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei* の同条件下における試験管内試験と比較すると、*L. pneumophila* と *E. coli* はいずれの消毒でも高い効果を確認できた。CT 値 (Concentration-time) から必要な消毒時間を計算したところ、モノクロラミン消毒では、*L. pneumophila* と *E. coli* は数分間、*B. subtilis* と *M. phlei* は 90 分間弱で 1-log の不活化が可能と推算され、モノクロラミン消毒は、遊離塩素消毒より短時間での消毒が可能であった。改めて高アルカリ温泉水に対するモノクロラミン消毒の有用性が確認された。なお、実地施設で遊離塩素が残留していてもレジオネラが検出されることがあるのは、*B. subtilis* や *M. phlei* など、消毒抵抗性の高い細菌のバイオフィームによって、レジオネラが保護されている可能性が考えられた。このことから、消毒だけではなく、定期的な高濃度消毒や配管洗浄といったバイオフィーム対策が欠かせないと考えられた。

キーワード : *Legionella pneumophila*, モノクロラミン, 遊離塩素, 高アルカリ温泉水, CT 値

1. はじめに

レジオネラ症は、*Legionella pneumophila* をはじめとするレジオネラ属菌 (*Legionella* spp.) を病原菌とする感染症である。レジオネラ症発生の主要原因のひとつとして、水系施設の不適切な衛生管理が考えられ、なかでも公衆浴場はその代表的な感染経路とされている。

従来、公衆浴場の浴槽水の消毒方法として、次亜塩素酸ナトリウムの添加による遊離塩素消毒が長く使用されてきた。しかし、一部の浴槽水には、遊離塩素消毒の阻害要因を有するものがあり、これらの浴槽水では必ずしも遊離塩素消毒が適切ではないことが明らかになっている (泉山ら, 2019)。遊離塩素の消毒阻害が起こりやすい例として、高アルカリ、アンモニウムイオンを多含する温泉水などが挙げられる (杉山ら, 2010; 縣ら, 2014; 泉山ら, 2019)。

遊離塩素の代替となる消毒方法として、近年、モノクロラミンが着目されている。モノクロラミンは、「公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について」(厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官, 2019) や、「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」(厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長, 2019) に追記されたことを契機として、全国の自治体でモノクロラミン

使用の条例化が進んでいる。

これまで著者らが実施してきた一連の研究により、モノクロラミンと遊離塩素に対するさまざまな細菌の消毒抵抗性が明らかになってきた。一連の研究により、以下の成果が得られている。まず、高アルカリ温泉水（以下、アルカリ泉）やアンモニウムイオンを多く含む温泉水を利用する温泉利用施設において、モノクロラミン消毒の実地検証を行った。モノクロラミン消毒下では浴槽水中に *Legionella* spp. が検出されなかったが、一部施設で経時的な従属栄養細菌の増殖がみられた（森ら, 2019; Mori *et al.*, 2020）。次に、モノクロラミン消毒下で増殖が観察された従属栄養細菌 *Mycobacterium phlei* に着目した。当初、この細菌は細胞壁の脂質に守られることで、モノクロラミン消毒への抵抗性が高いと考えられていた（Oriani *et al.*, 2018）。この菌株とアルカリ泉を使って、モノクロラミンと遊離塩素による消毒効果を比較した結果、アルカリ泉中の *M. phlei* に対するモノクロラミン消毒は十分に効果的であり、実地の施設で *M. phlei* が増殖したこととは矛盾するような結果であった。同じ CT 値（消毒濃度と接触時間の積、後述）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かった。このことから、浮遊性の *M. phlei* に対するモノクロラミン消毒は十分に効果的である一方、実地における *M. phlei* はバイオフィルムあるいは細胞塊を形成し、消毒に抵抗して増殖につながっている可能性が考えられた（森ら, 2022）。

さらに *M. phlei* の消毒抵抗性を明らかにする意味で、*Bacillus subtilis* と *Escherichia coli* を比較対照とした試験管内試験も行った（Mori *et al.*, 2023）。*M. phlei* は、モノクロラミン、遊離塩素ともに、*B. subtilis* の芽胞菌と同程度の消毒抵抗性を有していると判明した。その傾向はアルカリ泉でより顕著であったが、モノクロラミンであれば消毒可能であり、アルカリ泉におけるモノクロラミン消毒の有用性が改めて示される結果となった。

しかし、主たる *Legionella* spp. の定量的な消毒効果の検討が不十分であったことから、本研究では、アルカリ泉における *Legionella* spp. のモノクロラミン消毒試験を行い、これまでに得られてきた *E. coli*, *B. subtilis*, *M. phlei* の消毒抵抗性との違いを通じて、定量的な評価を試みた。本研究の結果、浴槽水中における *L. pneumophila* の制御およびアルカリ泉の衛生管理に関して有用な知見が得られたので、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、三重県津市で湧出するアルカリ泉を使用した。このアルカリ泉は、森ら（2019）、森ら（2022）、Mori *et al.*（2023）で使用した温泉水と同一であり、一連の研究結果との比較が可能である。

検液をオートクレーブにて 121℃ 15 分間の滅菌処理を行った後、鉍泉分析法指針（平成 26 年改訂）（環境省自然環境局, 2014）に準拠して、主成分の化学分析を行った結果を Table 1 に示す（森ら, 2022）。本研究で対象とするアルカリ泉は、アンモニウムイオン濃度をはじめ、遊離塩素消毒に阻害性が高いとされる化学成分は多く含まれてはいない一方で、pH は 9.64 と高いアルカリ性を示している。

試験管内試験のプロトコールは、*M. phlei* に対するモノクロラミンの消毒効果について報告した松田ら（2019）や森ら（2022）、*E. coli*, *B. subtilis* の消毒効果を報告した Mori *et al.*,（2023）の方法に準じて定めた。以下に概略を示す。

実験作業は、三重県保健環境研究所の 25℃ に常時管理された実験室内で行った。菌株は、*L.*

Table 1 Chemical composition of the alkaline hot spring water used in this study, analyzed after sterilization

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

*pH, 9.64; EC, 39.4 mS/m

*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 (Mori et al., 2022).

pneumophila の基準株 (ATCC33152) を用いた。マイクロバンク (イワキ株式会社) に -80℃ 冷凍保存した菌株を, B-CYE α 寒天培地 (栄研化学 ポアメディア E-MP96) で 30℃ 4 日間好気培養し, 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。濁度により菌数を調整後, 滅菌カップに入れた検液 200 mL に添加したときに, 10⁶ CFU/mL (CFU : Colony Forming Unit) 程度の濃度となるよう, 菌原液を添加した。

なお, 森ら (2019) の実地試験によると, 本研究と同一の温泉水を用いた浴槽水で, *Legionella* spp. がいずれも検出されなかったことが報告されている。アルカリ泉を用いた他の実地施設での先行研究でも, いずれも *Legionella* spp. は検出されていないことが報告されてきた (例えば, 倉ら, 2011; 田栗ら, 2011; 佐原ら, 2013; 柳本ら, 2015)。これらの報告事例をふまえると, 比較的速やかに *L. pneumophila* が不活化されることが仮説として想定される。そこで, 本研究では実験デザインとして, 消毒剤濃度をモノクロラミン濃度 3 ppm, 遊離塩素濃度 0.4 ppm と先行研究 (いずれも最大 20 ppm) よりも低くし, かつ消毒剤との接触時間も, 最大 60 分と先行研究 (最大 120 分) よりも短くした。これらの消毒剤濃度は, 厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知 (2019) や厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知 (2019) に示された, 通常の浴槽水の管理濃度に準拠する。

消毒剤の添加後の消毒剤との接触時間は, 15 分, 30 分, 45 分, 60 分の時点で, 検液を菌数測定用と消毒濃度測定用に, それぞれ適量をサンプリングすることとした。また, 実地検証で一定程度の消毒効果が予想されているアルカリ泉との比較のため, 検液には, リン酸緩衝液 (PBS Phosphate buffered saline) と蒸留水も用意し, 同一の菌株, 消毒条件を用いて各 1 回の実験を同時に実施した。消毒の薬剤には, 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, 同一の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) を適宜希釈混合して用いた。

コロニー数測定用の検液は, 適量のチオ硫酸ナトリウム溶液にて中和した後, 適宜希釈してから, B-CYE α 寒天培地 (栄研化学 ポアメディア E-MP96) に塗布し, 7 日間 37℃ で培養した。予備試験として, アルカリ泉中に適量の *L. pneumophila* の菌液を入れ, 消毒剤を添加しないブランク試験を実施した。消毒剤添加前と消毒剤添加 60 分後の検液を培養し, それぞれコロニー数を比較したところ, 大部分の *L. pneumophila* の生残 (添加前 100 CFU/mL, 添加 60 分後 96 CFU/mL) が

認められ、アルカリ泉そのものによる菌数変化に実験上の影響がないことを確認した。

消毒濃度測定用の検液は、遊離塩素濃度は、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、それぞれ測定した。なお、本実験の予備実験で測定値のばらつきが実験結果の考察に影響がないことを確認した上で、検液量の限界や測定に要する反応時間を考慮して、各消毒剤濃度測定は 1 回とした。消毒濃度の実測値（C）と、消毒剤との接触時間（T）の積から、CT 値を算出した（Hermanowicz, 1999）。

培養後は、コロニー数を複数人で確認しながら目視でカウントし、消毒剤添加前のコロニー数（ N_0 ）と消毒後のコロニー数（N）の割合を求め、これを対数化した細菌の生残率（ $\log(N/N_0)$ ）を算出し、CT 値を横軸、生残率を縦軸としたプロットから不活化曲線を得た。この不活化曲線の傾きは、CT 値の上昇に伴うコロニー数の減少度合を示し、傾きが大きくなるほど、その条件下における消毒効果が高いことを示すことから、消毒効果の比較と定量的評価に用いた。

3. 結 果

3.1 管理濃度付近における消毒剤濃度の安定性

アルカリ泉中の実験中における、遊離塩素とモノクロラミンの消毒濃度の経時的な変化を Fig. 1 に示す。

実験の結果、試験管内試験のサンプリングが終了する 60 分後には、遊離塩素は初期濃度の 78%、モノクロラミンは 86% が残存していた。なお、添加 30 分後から 60 分後にかけて遊離塩素濃度が上昇しているものの、その上昇幅としては 0.01 ppm であり、本研究で用いた測定機器の精度から、その濃度変化に有意性はないものと考えられる。

同一温泉水を利用した森ら（2022）の同試験の際にも、遊離塩素、モノクロラミンともに、120

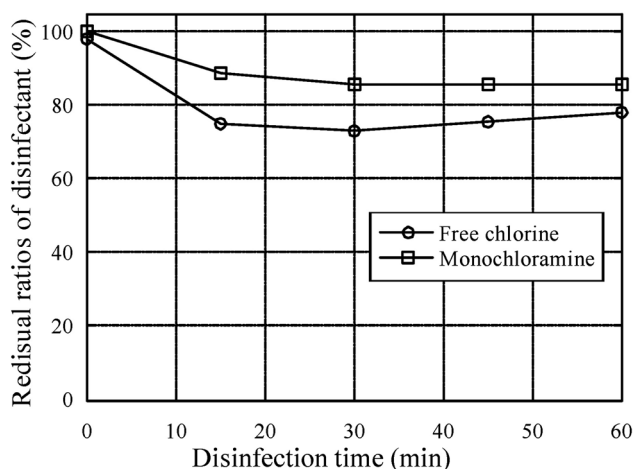


Fig. 1 Temporal changes in residual ratios of monochloramine and free chlorine concentrations in alkaline hot spring water. Each disinfectant was added at different concentrations : monochloramine, approximately 3 ppm ; free chlorine, approximately 0.4 ppm. A slight increase in the concentrations was observed at 30 and 60 min of free chlorine disinfection, although this was within the range of error due to the accuracy of the measuring equipment.

分間消毒剤濃度の 8 割前後を維持していたが、本研究の消毒条件でも、濃度安定性はほぼ同程度と考えられた。

3.2 遊離塩素およびモノクロラミン消毒下の *Legionella pneumophila* の消毒耐性

アルカリ泉における遊離塩素消毒に対する *L. pneumophila* の不活化曲線を Fig. 2 に、モノクロラミン消毒に対する不活化曲線を Fig. 3 に、それぞれ示す。

試験の結果、遊離塩素、モノクロラミンのいずれにおいても、*L. pneumophila* の不活化曲線の傾きは大きく、速やかに不活化されていることがわかった。

遊離塩素、モノクロラミンのいずれにおいても、消毒剤添加 15 分後の本実験で最も CT 値が低い実験条件下で、すでにコロニー数がカウントできず、検出限界以下となった。この結果、モノクロラミンでは少なくとも CT 値 45 程度、遊離塩素では CT 値 6 程度よりも低い値で 6-log の不活化が進んだことが示された。

また、同条件で実施した PBS や蒸留水についても、遊離塩素、モノクロラミンのいずれにおいても *L. pneumophila* は消毒添加後 15 分後にはすでにコロニー数がカウントできず、検出限界以下となった。

以上のことから、1 回の実験であることから再現性に若干の課題はあるものの、アルカリ泉、PBS、蒸留水いずれにおいてもほとんどが検出限界以下であることから、モノクロラミン、遊離塩素のい

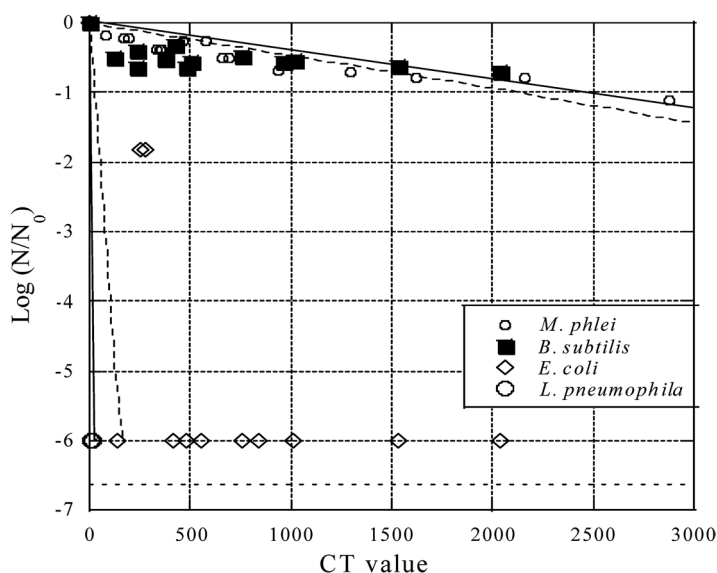


Fig. 2 Comparison of the inactivation of free chlorine disinfection against *L. pneumophila*, *E. coli*, *B. subtilis*, and *M. phlei* in alkaline hot spring water. The solid lines indicate the inactivation of *L. pneumophila* and *M. phlei*, and dashed lines indicate the inactivation of *E. coli* and *B. subtilis*. The detection limit for each bacterium was approximately 6- to -7-log. The inactivation line for each bacterium has been stopped at the detection limit. The data for *M. phlei* were cited from Mori *et al.* (2022), and the data for *B. subtilis* and *E. coli* were cited from Mori *et al.* (2023). The number of *L. pneumophila* colonies in free chlorine disinfection was already below the detection limit at 15 min after the addition of disinfectant under the lowest CT value in this experiment.

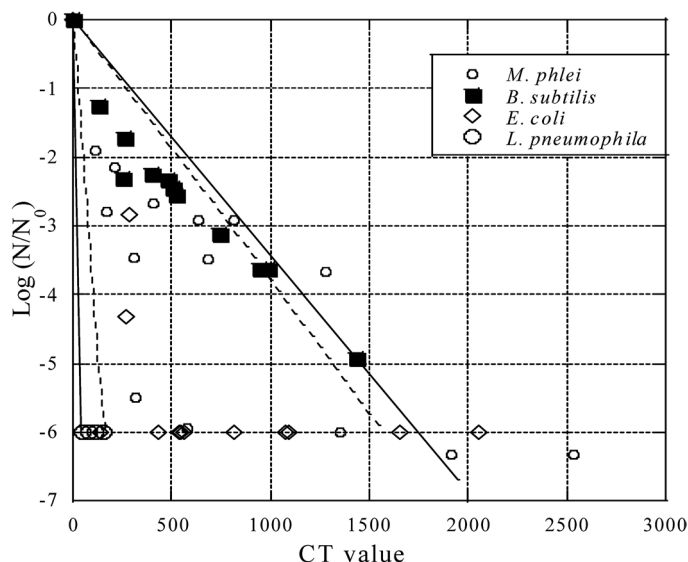


Fig. 3 Comparison of the inactivation of monochloramine disinfection against *L. pneumophila*, *E. coli*, *B. subtilis*, and *M. phlei* in alkaline hot spring water. The solid lines indicate the inactivation of *L. pneumophila* and *M. phlei*, and dashed lines indicate the inactivation of *E. coli* and *B. subtilis*. The detection limit for each bacterium was approximately 6- to 7-log. The inactivation line for each bacterium has been stopped at the detection limit. The data for *M. phlei* were cited from Mori *et al.* (2022) and those for *B. subtilis* and *E. coli* were cited from Mori *et al.* (2023). The number of *L. pneumophila* colonies in monochloramine disinfection was already below the detection limit at 15 min after the addition of disinfectant under the lowest CT value in this experiment.

ずれの消毒においても *L. pneumophila* は速やかに不活化されることが推測された。

4. 考 察

4.1 *Legionella pneumophila* と *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei* の不活化の比較

これまでに筆者らは、アルカリ泉の中におけるいくつかの特徴的な細菌の消毒耐性に関する研究を進めてきた（森ら, 2022; Mori *et al.*, 2023）。研究対象とした菌種は、*E. coli*, *B. subtilis*, *M. phlei* である。*E. coli* は浴槽水質基準として多くの自治体が規制対象とされている大腸菌群の代表的な菌種として、*B. subtilis* は、一般環境中に生息する芽胞形成菌の代表的な菌種として、*M. phlei* は、モノクロミン消毒下で検出されやすい非結核性抗酸菌の典型的な菌種として（渡邊ら, 2018）、研究対象として選択した。

本研究では、本研究の試験管内試験で得られた *L. pneumophila* の結果と、先行研究による他の細菌との消毒耐性を比較することにより、より詳細な消毒効果の評価を試みた。Fig. 2, Fig. 3 には、森ら（2022）や Mori *et al.*（2023）で示した *E. coli*, *M. phlei*, *B. subtilis* の不活化曲線も示している。これらと本研究で得られた結果を比較すると、*L. pneumophila* は、*E. coli* とほぼ同程度の傾

きを示していることから、*L. pneumophila* は *E. coli* と同程度に高い消毒効果があることが確認できた。前述のとおり森ら (2019) は、同一のアルカリ泉を用いた温泉利用施設での実地試験で、モノクロラミン消毒下の浴槽水で *Legionella* spp. が検出されなかったことを報告しているが、柳本ら (2015) による pH10 のアルカリ泉での実地試験や、杉山ら (2010) による pH8.4 アルカリ泉のモデル浴槽試験など、これらの先行研究において *Legionella* 属菌はいずれも検出されていないことから、本研究における試験管内試験の結果は、これらの実地試験やモデル浴槽試験で得られた、アルカリ泉に対するモノクロラミンの高い消毒効果を支持するものと言える。

4.2 実地施設における適切な消毒剤の選択と適用

次に、先行の試験管内試験により得られた結果と、本研究によって得られた *L. pneumophila* の消毒耐性を定量的に比較する。アルカリ泉中で研究対象とした細菌が、遊離塩素およびモノクロラミン消毒に伴って 1-log 不活化するときに必要な CT 値を、Table 2 に示す。

その結果、遊離塩素、モノクロラミン消毒による 1-log の不活化に必要な CT 値は、*L. pneumophila* が数 mg/L・min 程度、*E. coli* は高く見積もっても 15 程度と推測された。

一方、芽胞を形成する *B. subtilis* や、細胞壁に脂質を含む *M. phlei* が、1-log の不活化に必要とする CT 値は、モノクロラミン消毒で 250 程度、遊離塩素消毒で 2,000 程度と見積もられた。これは *E. coli* の CT 値と比較して、モノクロラミンで約 17 倍、遊離塩素では約 130 倍の消毒力を要することを意味する。

さらに、CT 値により示された各菌種の消毒耐性から、実地における消毒運用について試算し、アルカリ泉に対して、どのような消毒剤を選択することが適切かについて考察する。

Table 2 に示された各条件下の CT 値を、厚生労働省通知や多くの自治体の条例で定められている消毒剤の管理濃度であるモノクロラミン 3 mg/L、遊離塩素 0.4 mg/L で割ることで、通常の施設営業時に、どれだけの消毒剤との接触時間を与えれば、各細菌の 1-log の不活化が可能かを示す指標値が得られる。この指標値の計算結果を Table 3 に示す。

計算の結果、*L. pneumophila* は遊離塩素、モノクロラミンでも数分程度、*E. coli* も、モノクロ

Table 2 Concentration-time (CT) value required for 1-log inactivation of each bacterial species (mg/L・min)

	Free chlorine	Monochloramine
<i>Legionella pneumophila</i>	<1.0	<7.5
<i>Escherichia coli</i>	12.5–15	12.5–15
<i>Bacillus subtilis</i>	2,000	250
<i>Mycobacterium phlei</i>	2,000	266

Table 3 Time taken for 1-log inactivation under the same conditions

	Free chlorine	Monochloramine
<i>Legionella pneumophila</i>	<2.5 min	<2.5 min
<i>Escherichia coli</i>	37.5 min	5 min
<i>Bacillus subtilis</i>	5,000 min (83 h)	83.3 min
<i>Mycobacterium phlei</i>	5,000 min (83 h)	88.7 min

*The CT values in Table 2 are divided by the concentration of each disinfectant in bathtub water (free chlorine, 0.4 mg/L; monochloramine, 3 mg/L)

ラミンで5分弱, 遊離塩素で40分弱の接触時間を与えれば, 1-logの不活化が可能であることが算出された。

一方, *B. subtilis*や*M. phlei*については, モノクロラミンでは90分弱で1-logの不活化が進むが, 遊離塩素消毒では約5,000分の接触時間を必要とすると算出された。このことは, *B. subtilis*や*M. phlei*は, 約5,000分(=約83時間=約3.5日間)でようやく1-logの消毒が可能となるということの意味する。消毒に要する時間が長すぎて, その間に菌が減少するよりも増加してしまう危険性も考えられる結果となった。

以上のことから, アルカリ泉の*B. subtilis*や*M. phlei*の制御という観点では, モノクロラミン消毒の方が優位であることが示唆された。

4.3 試験管内試験と実地施設の挙動の違いとその対応策

本実験においては, *L. pneumophila*の遊離塩素消毒下で速やかな不活化が認められたが, 実際の施設では, 管理濃度を維持しても*L. pneumophila*が検出される事例が散見される。このことは, 管理濃度の維持により不活化を可能とする試験管内試験と結果が矛盾している。

その理由としては, 単独で浮遊する*L. pneumophila*には遊離塩素消毒が十分に効果があったとしても, *B. subtilis*や*M. phlei*など, 消毒耐性の高い細菌がバイオフィームを形成することで*L. pneumophila*が保護され, さらに集積したアメーバ等の原虫に貪食され, 増殖することで結果的に消毒効果が低下している可能性が考えられる。*B. subtilis*や*M. phlei*は, 単体では病原性が高い細菌ではないが(Tanaka *et al.*, 2019), *L. pneumophila*の制御のためには, バイオフィーム形成に寄与する菌種の制御も必要と考えられる。

以上のことから, アルカリ泉においては, *B. subtilis*や*M. phlei*にも消毒効果が高いモノクロラミン消毒の方が優位であることに加えて, どのような消毒方法であっても, バイオフィームの除去のために, 定期的な高濃度洗浄や配管洗浄が不可欠であることが改めて強調された。

5. ま と め

本研究では, アルカリ泉の遊離塩素およびモノクロラミン消毒下における*L. pneumophila*の不活化に係る試験管内試験を行い, それぞれの消毒剤に対する消毒耐性の定量的評価を試みた。その結果, アルカリ泉の*L. pneumophila*に対して1-logの菌数の不活化に必要なCT値は, 遊離塩素もモノクロラミン消毒も数mg/L・min程度と低く, いずれも十分な消毒効果があることが示された。他の菌種の消毒耐性との違いについて比較したところ, 遊離塩素もモノクロラミン消毒も*L. pneumophila*や*E. coli*は速やかに不活化されるものの, 芽胞を形成する*B. subtilis*や高い脂質を含む細胞壁を持つ*M. phlei*は不活化に時間を要し, *E. coli*と比べてモノクロラミン消毒で約17倍, 遊離塩素消毒では約130倍のCT値が必要であることがわかった。本研究のアルカリ泉を用いた*L. pneumophila*の培養試験は1回であったが, 今後は複数回の結果を積み重ね, 再現性を高めることが課題である。

この結果を用いて, 実地施設における消毒効果の試算を試みた。温泉利用施設が, 通常運用で維持する遊離塩素やモノクロラミンの管理濃度下において, *L. pneumophila*は数分程度で1-logの不活化を達成することがわかった。ところが, *B. subtilis*や*M. phlei*など高い消毒耐性を持つ細菌は, 1-logの不活化に, モノクロラミン消毒下で90分弱, 遊離塩素消毒下では約5,000分を要するため, 実地施設ではこれらの消毒耐性を持つ細菌がバイオフィームを形成する可能性と, そのことが*L. pneumophila*の検出を誘発する可能性が考えられた。

以上の結果から、アルカリ泉に対しては、遊離塩素消毒よりもモノクロラミン消毒の方が優位であることが改めて支持されるとともに、バイオフィルムの除去のために、定期的な高濃度洗浄や配管洗浄の重要性が示された。

本研究は、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）「公衆浴場の衛生管理の推進のための研究（22LA1008）」（研究代表者 国立感染症研究所 寄生動物部 泉山信司）の補助を受けて実施した。

謝 辞

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。匿名の2名の査読者には懇切丁寧な御指摘をいただきました。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.
- 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.
- 倉 文明, 杉山寛治, 縣 邦雄, 神田 隆, 泉山信司, 小坂浩司, 遠藤卓郎 (2011): 掛け流し式浴槽に対するモノクロラミン消毒方法の導入. 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属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究（研究代表者 倉 文明）平成 22 年度分担研究報告書, p 33-40.
- 厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官 (2019): 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.
- 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長 (2019): 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.
- 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.
- 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.
- 森 康則, 永井佑樹, 大市真梨乃, 佐藤大輝, 小林章人, 吉村英基, 北浦伸宏, 枝川亜希子, 藤井 明, 泉山信司, 前川純子 (2022) : 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**, 26-37.
- Mori, Y., Nagai, Y., Sato, D., Toyoda, M., Kameyama, Y., Tanimoto, K., Kobayashi, A., Yoshimura, H., Izumiyama, S. (2023) : Effects of monochloramine and free chlorine disinfection on alkaline hot spring water as shown by inactivation experiments with *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*. J. Hot Spring Sci., **73**, 46-55.
- Oriani, A.S., Sierra, F., Baldini, M.D. (2018) : Effect of chlorine on *Mycobacterium gordonae* and *Mycobacterium chubuense* in planktonic and biofilm state. Int. J. Mycobacteriol., **7**, 122-127.
- 佐原啓二, 縣 邦雄, 神野透人, 八木田健司, 杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 片山富士男, 富田敦子, 江口大介, 市村祐二, 道越勇樹, 八木美弥 (2013) : モノクロラミンによる循環式浴槽の消毒効果について—営業施設における検証試験—. 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属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究 (研究代表者 倉 文明) 平成 24 年度分担研究報告書, p 27-38.
- 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.
- 田栗利紹, 杉山寛治, 泉山信司, 小坂浩司 (2011) : モノクロラミン消毒による入浴施設の衛生管理 (長崎県の実施例). 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属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究 (研究代表者 倉 文明) 平成 22 年度分担研究報告書, p 41-46.
- Tanaka, S., Hoshino, Y., Sakagami, T., Fukano, H., Matsui, Y., Hiranuma, O. (2019) : Pathogenicity of *Mycobacterium phlei*, a non-pathogenic nontuberculous mycobacterium in an immunocompetent host carrying anti-interferon gamma autoantibodies : a case report. BMC Infect. Dis., **19**, p 454.
- 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.