

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 国立感染症研究所寄生動物部

分担研究報告書
不活化曲線に基づくレジオネラ属菌のモノクロラミン感受性評価

研究分担者 門屋俊祐 国土技術政策総合研究所 上下水道研究部
研究分担者 小坂浩司 国立環境研究所 環境リスク健康領域

研究要旨

モノクロラミン消毒はレジオネラ属菌の不活化に対して有効であるが、遺伝的に多様なレジオネラ属菌は種及び株ごとに異なるモノクロラミン感受性を示すことが報告されている。低いモノクロラミン感受性を示す菌株が存在する場合、それを基準に消毒条件を設定することが、公衆浴場の微生物学的安全性を維持する上で重要といえる。本研究では、3種のレジオネラ属菌（臨床分離株 *Legionella pneumophila*、冷却塔水由来 *L. anisa*、浴槽水由来 *L. dumoffii*）を対象として、不活化曲線（不活化速度定数および Hom 因子）に基づきモノクロラミン感受性の比較・評価を行った。初めに、不活化試験中にモノクロラミン濃度が減衰しない条件を整理し、一定の不活化率が得られるモノクロラミン濃度として 3 mg/L を設定した。次に、不活化試験に供する菌体の初期濃度が $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL の範囲においては、不活化率へ影響を与えないことを確認した。結果として最もモノクロラミン感受性が高かったのは *L. anisa* であり、*L. pneumophila* が最も低い感受性を示した。99.9%不活化に必要な消毒の濃度と接触時間の条件 ($CT_{99.9\%}$ [min・mg/L]) は、それぞれ 108.8 (*L. pneumophila*)、25.4 (*L. anisa*)、56.2 (*L. dumoffii*) と推定された。つまり本研究の結果からは、最も感受性の低い株を対象とした 99.9%不活化達成に必要な消毒条件は、モノクロラミン濃度 3 mg/L を一定とした 35 分以上の接触時間を確保することであった。モノクロラミン濃度 3 mg/L を常時維持することが可能な公衆浴場等は安全性が保たれていると言えるが、バイオフィームから遊離した直後のレジオネラ属菌濃度の急増及びバイオフィーム状態で浴槽水中の浮遊といった状況が発生しないように注意すべきと考えられた。

A. 研究目的

「公衆浴場における衛生等管理要領」では、浴槽水中の遊離残留塩素濃度を 0.4 mg/L 以上 1 mg/L 以下となるよう管理することを求めている1)。しかしながら、公衆浴場の水質は様々であり、塩素消毒による不活化効果に対して影響を与える。浴槽水の pH が中性付近以上の場合、遊離塩素は次亜塩素酸と次亜塩素酸イオンが平衡関係 ($pK_a=7.5$) にある。一方、高アルカリ原水を利用している場合、次亜塩素酸の存在比が減少し、消毒効果の低い次亜塩素酸イオンが優占するため、遊離塩素による不活化効果も低減してしまう2)。また、利用者に由来する垢等の有機物濃度が高くなることで残留遊離塩素濃度が減衰し、不活化効果を維持することが困難となる。

一方、アルカリ条件下において遊離塩素とアンモニアが反応することで、モノクロラミンが生成される。レジオネラ属菌はモノクロラミン

により十分不活化され3)、公衆浴場におけるレジオネラ属菌の制御に関してもモノクロラミン消毒が有効とされている。しかしながら、レジオネラ属菌は多様な種、さらには多様な配列型を内包しており、モノクロラミンへの感受性が異なる可能性がある。

先行研究4)では、モノクロラミン 1 mg/L の条件下において、99.9%不活化 (3 Log) に必要な CT 値 ($CT_{99.9\%}$: 消毒剤濃度の減衰曲線の積分値であり、直線の場合は初期濃度と接触時間の積) がレジオネラ属菌の種間及び種内においても7倍程度異なることが報告されている。しかしながら、わが国の「公衆浴場における衛生等管理要領」においては 3 mg/L 程度を保つことが推奨されており、先行研究4)で示された $CT_{99.9\%}$ を直接適用することは困難である。CT 値の算出において、モノクロラミン濃度の減衰を考慮しているかどうかについても不明瞭である。また、先行研究4)

では浴槽水由来のレジオネラ属菌株を対象としていない。

本研究では、レジオネラ属菌に対する適切なモノクロラミン消毒及び管理方法の提案を目的として、重篤な健康被害をもたらす *Legionella pneumophila* (以下、*L. pneumophila*)、冷却塔水から分離された *L. anisa*、そして浴槽水から分離された *L. dumoffii* を用いてモノクロラミンに対する感受性評価を行った。

B. 研究方法

1. レジオネラ属菌の取得及び培養

本研究では、ATCC 株である *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* *Philadelphia-1* (ATCC33152)、臨床分離株である *L. pneumophila*、冷却塔水から分離された *L. anisa*、浴槽水から分離された *L. dumoffii* を対象とした。*L. pneumophila* (臨床分離株)、*L. anisa* 及び *L. dumoffii* は、国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所細菌第一部 前川純子研究員から分与いただいた。

上記のレジオネラ属菌は BCYE α 寒天培地 (Oxoid 1203B; SR0251A) を用いて、30°C、湿潤条件下で培養を行った。寒天培地上のコロニーを BYE 液体培地に懸濁させ、不活化試験に供する菌試料を準備した。コロニー形成単位 (colony forming unit: CFU) を試料の菌濃度として、寒天培地への接種後 72 時間のコロニーを計数した。

2. モノクロラミン調整と濃度減衰評価

0.1 M リン酸緩衝液 pH 8.0 (以下、PBS(8.0); 和光純薬) で希釈した 1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (和光純薬) に対して、塩素濃度とアンモニア態窒素濃度の質量比が 4.5 以上となるように 1M 塩化アンモニウム溶液を添加した 5)。遊離塩素濃度及び全塩素濃度は、ポケット残留塩素計 (HACH DR300) により測定した。

培地成分のモノクロラミン濃度の減衰への影響を評価するため、0.1M ダルベッコ PBS(-) (以下、PBS(7.0); 島津ダイアグノスティクス) により 10^1 及び 10^2 倍希釈したレジオネラ属菌試料 (ATCC 株) を 1 mg/L モノクロラミン溶液に添加した (室温条件下)。0, 30, 60, 120 秒後の全塩素濃度を測定・記録した。また、First-order rate equation を改良したモデルを用いて (Eq. 1)、全塩素濃度の減衰曲線を描出し、減衰係数を推定した：

$$C_t = C_0 e^{-kt^m} \quad (\text{Eq. 1})$$

C_t は接触時間 t における濃度 [mg/L]、 C_0 は消毒前の濃度 [mg/L]、 k は減衰定数 [sec^{-1}]、 m は形状因子 [-] である 6,7)。 k は減衰曲線の傾きに関連する。減衰曲線は、 m が 1 を超える場合は *shouldering* (一定時間後に急減する現象)、1 と同等の場合は直線、1 未満となる場合は *tailing* (曲線が尾を引く現象) となる。R version 4.4.0 (<https://www.r-project.org/>) 上で最小二乗法によりモデルパラメータを推定した。

3. モノクロラミンによる不活化試験

菌試料を PBS (7.0) により希釈し、濃度調整済みのモノクロラミン溶液へ添加した (不活化試料)。なお、不活化試験はすべて室温条件、静置の下実施した。所定の接触時間において不活化試料の一部を新たな 1.5 mL チューブへ移し、0.1 M チオ硫酸ナトリウム溶液 (和光純薬) により残留塩素を消去した。中和後の不活化試料 100 μL を BCYE α 寒天培地へ接種し、72 時間後のコロニーを計数した N_t [CFU/mL]。また、消毒前の菌試料の濃度 N_0 [CFU/mL] についても毎回同時に測定した。

レジオネラ属菌の不活化動態ならびに株間のモノクロラミン感受性を定量的に把握するため、モノクロラミン濃度一定条件下における不活化速度定数 k [sec^{-1}] を推定した (Eq. 2)：

$$\text{Log}_{10}(N_t/N_0) = -kt^m \quad (\text{Eq. 2})$$

k は不活化速度定数 [sec^{-1}]、 m は Hom 因子 [-] である 6,7)。Eq.1 と同様、 k は不活化曲線の傾きに関連する。不活化曲線は、 m が 1 を超える場合は *shouldering*、1 と同等の場合は直線、1 未満となる場合は *tailing* を示す。パラメータの推定は、R version 4.4.0 (<https://www.r-project.org/>) 及び Stan version 2.32.2 (<https://mc-stan.org/>) 上においてマルコフ連鎖モンテカルロ法により推定した。

初期菌体濃度の多寡が不活化曲線に与える影響を確認するため、初期濃度 10^4 及び 10^5 CFU/mL の *L. pneumophila* (ATCC 株) 試料を用いた不活化試験も行った。不活化条件の設定のため、*L. pneumophila* 試料 (ATCC 株) を用いてモノクロラミン濃度 1、2、3 mg/L それぞれの条件における不活化曲線を得た。*L. pneumophila* (臨床株)、*L. anisa*、*L. dumoffii* の塩素感受性を比較するため、3 mg/L のモノクロラミン溶液中で 0、1、3、5、10、15 分接触させた際の不活化曲線を得た。

C. 研究結果およびD. 考察

1. モノクロラミン濃度の減衰

モノクロラミンによる消毒効果が確実に得られる試料の最小希釈倍率を求めるため、菌試料を 10^1 及び 10^2 倍希釈した際のモノクロラミン濃度減衰曲線を得た(図1)。菌試料を10倍希釈しただけでは、モノクロラミン濃度は5分間で99.0% (2 log) 減少するが、 10^2 倍希釈するとほとんど減衰しないことが確認された。一般に培地中には塩素消費物質が含まれているため、不活化試験において消毒効果を適切に評価するためには、 10^2 倍以上の希釈が必要であると言える。入浴施設においては、施設利用者由来の垢等の有機物が本研究の培地成分に相当し、溢水や完全換水による垢等の塩素消費物質を除去することが浴槽水におけるモノクロラミン消毒効果の確保に重要と言える。

2. 菌体濃度が不活化曲線に与える影響

L. pneumophila (ATCC株)の供試濃度を 10^4 及び 10^5 CFU/mLに調整し、菌体濃度が不活化率に与える影響を評価した(図2)。接触時間120秒までの不活化曲線について、両条件ともに一定時間後に急速に不活化が進行する傾向が見られた。不活化速度定数 k は、 10^4 CFU/mL試料では 1.2×10^{-5} [sec]、 10^5 CFU/mL試料では 1.6×10^{-5} [sec]であり近い値を示した。Shoulderingあるいはtailingの程度を決定するHom因子は双方ともに2.5 [-]と推定された。以上より、 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL程度の範囲であれば、菌体の多寡によってコロニー形成能やモノクロラミン減衰への影響は無視でき、一定の消毒条件下では一定の不活化効率が得られると期待されると言える。

3. モノクロラミン濃度が不活化に与える影響

十分な不活化効果が得られる消毒条件を検討するため、モノクロラミン濃度1、2、3 mg/Lそれぞれの不活化曲線を描出した(図3A)。なお、図1より試験期間中にモノクロラミン濃度は減衰しないと想定した。モノクロラミン濃度が1及び2 mg/Lの条件下では、不活化の特性にほとんど差が見られなかった。一方、3 mg/Lの場合、接触時間5分で90% (1 log) 以上の不活化率が得られるなど明らかに高い不活化効果が示された。不活化速度定数 k 及びHom因子 m 双方についても、3 mg/Lの条件下ではその他の条件と比べていずれも高い値を示していた(図3B, C)。特に、 m の値は1に近づいていることから不活化曲線

が直線的に変化することが期待されるが、300秒時点の不活化率のばらつきが大きい、tailingを呈している(図3C)。以上の結果を踏まえ、レジオネラ属菌間のモノクロラミン感受性の比較については、3 mg/Lの条件下で不活化試験を実施することとした。

4. 3種のレジオネラ属菌の塩素感受性評価

L. pneumophila (臨床株)、*L. anisa* (冷却塔水由来株)、*L. dumoffii* (浴槽水由来株)の塩素感受性を比較するために、モノクロラミン濃度3 mg/Lの条件下で不活化試験を実施した。その結果、いずれもtailing様の不活化曲線を示した(図4A)。冷却塔水から分離された*L. anisa*のモノクロラミン感受性が最も高く(10分で3 log程度の不活化)、Hom因子 m が1に近い値を示した(図4C)。*L. pneumophila* (臨床株)と*L. dumoffii*を比較すると(図4A, B)、大差ではないが*L. pneumophila* (臨床株)のモノクロラミン感受性がやや低いことが明らかとなった(10分で2 log程度の不活化)。

不活化曲線から99.9%不活化に必要な接触時間を推定し、消毒条件としてCT_{99.9%}を算出し(モノクロラミン減衰曲線の定積分により求める；本研究においては減衰しないことを確認しているため、初期濃度と接触時間の積となる)、株間で比較した。その結果、*L. pneumophila* (臨床株)、*L. anisa*、*L. dumoffii*のCT_{99.9%}は、108.8、25.4、56.2 [min・mg/L]となった。Jakubekらの報告においては、河川や冷却塔から分離された*L. pneumophila*のCT_{99.9%}は15～65程度の範囲であり4)、外挿領域の推定であることに留意する必要があるが、本研究で対象とした*L. pneumophila* (臨床株)のモノクロラミン感受性は比較的低いといえる。

いずれの株も分離元が異なっており、感受性が種レベルあるいは株レベルで異なるのか今後検討を行う必要がある。具体的には、*L. pneumophila*のATCC株、臨床株、冷却塔水、浴槽水由来の株について不活化試験を実施する必要がある。また、900秒(15分)と短い接触時間の検証にとどまっているため、今後はより長い接触時間を設定した際の不活化動態を把握し、推定した不活化曲線ならびにCT_{99.9%}の妥当性を検証する必要がある。本研究で使用した不活化モデルではやや当てはまりの弱い場合もあり、柔軟な不活化モデルの考案も今後検討する。

実際の浴槽水中には種々の塩素消費物質が含

まれているため、今後、モノクロラミン濃度が減衰する場合における不活化曲線の確認も必要となる。また、本研究は室温条件下（20℃程度）において実施したため、浴槽水や冷却塔水の水温（30–40℃）を考慮した不活化試験についても今後行う必要がある。

E. 結論

L. pneumophila、*L. anisa*、*L. dumoffii* の3種のレジオネラ属菌についてモノクロラミン感受性を評価し、それぞれの不活化曲線を推定した。*L. pneumophila* 及び *L. dumoffii* は同程度の感受性（10分で2 log 程度の不活化）を示した一方、*L. anisa* は10分で3 log の不活化と高い感受性を示した。モノクロラミン濃度 3 mg/L を常時維持することが可能な公衆浴場等は安全性が保たれていると言えるが、バイオフィームから遊離した直後のレジオネラ属菌濃度の急増及びバイオフィーム状態で浴槽水中の浮遊といった状況が発生しないように注意すべきと考えられた。

F. 参考文献

- 1)厚生労働省:公衆浴場における衛生等管理要領等について,令和5年11月15日健生発1115第5号 一部改正.
(<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/001171614.pdf>)
- 2)Deborde, M., von Gunten, U. 2008. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment – Kinetics and mechanisms: A critical review. *Wat. Res* 42(1-2), 13-51.
- 3)Cunliffe, D.A. 1990. Inactivation of *Legionella pneumophila* by monochloramine. *J. Appl. Bacteriol* 68(5), 453-459.
- 4)Jakubek, D., Guillaume, C., Binet, M., Leblon, G., Dubow, M., Brun, M.J. 2013. Susceptibility of *Legionella* strains to the chlorinated biocide, monochloramine. *Microbes. Environ* 28(3), 336-345.
- 5)Buse, H.Y., Morris, B.J., Struewing, I.T., Szabo, J.G.2019. Chlorine and monochloramine disinfection of *legionella pneumophila* colonizing copper and polyvinyl chloride drinking water biofilms. *Appl. Environ. Microbiol* 85(7), e02956-18.
- 6)Gyürék, L.L., Finch, G.R.1998. Modeling water treatment chemical disinfection kinetics. *J. Environ. Engineer* 124(9), 783-793.
- 7)Kadoya, S., Nishimura, O., Kato, H., Sano, D. 2019. Predictive water virology: Hierarchical Bayesian modeling for estimating virus inactivation curve. *Water* 11, 2187.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

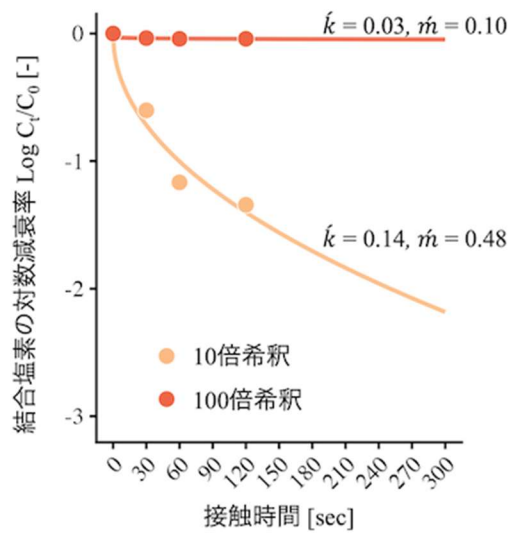


図1 レジオネラ属菌試料の希釈倍率（黄：10倍希釈、橙：100倍希釈）を変化させた際のモノクロラミン濃度の減衰曲線. 減衰曲線は $C_t = C_0 e^{-\bar{k}t^{\bar{m}}}$ を用いて推定した. プロットは実測値、実線は推定した減衰曲線を示す.

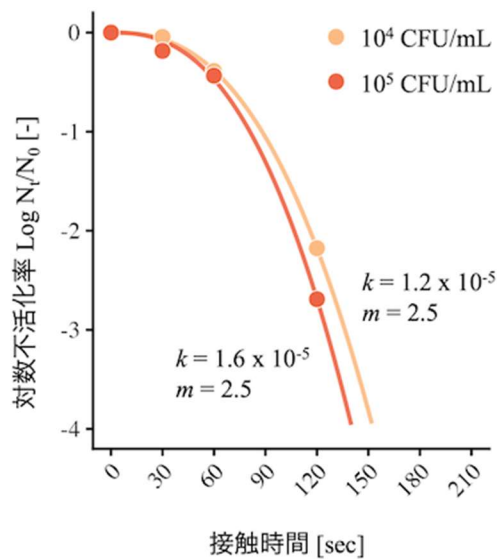


図2 *L. pneumophila* (ATCC 株)の供試濃度（黄： 10^4 CFU/mL、橙： 10^5 CFU/mL）を変化させた際のモノクロラミンによる不活化曲線. 不活化曲線は $\text{Log}_{10}(N_t/N_0) = -kt^m$ の近似により得た. プロットは実測値、実線は推定した不活化曲線を示す.

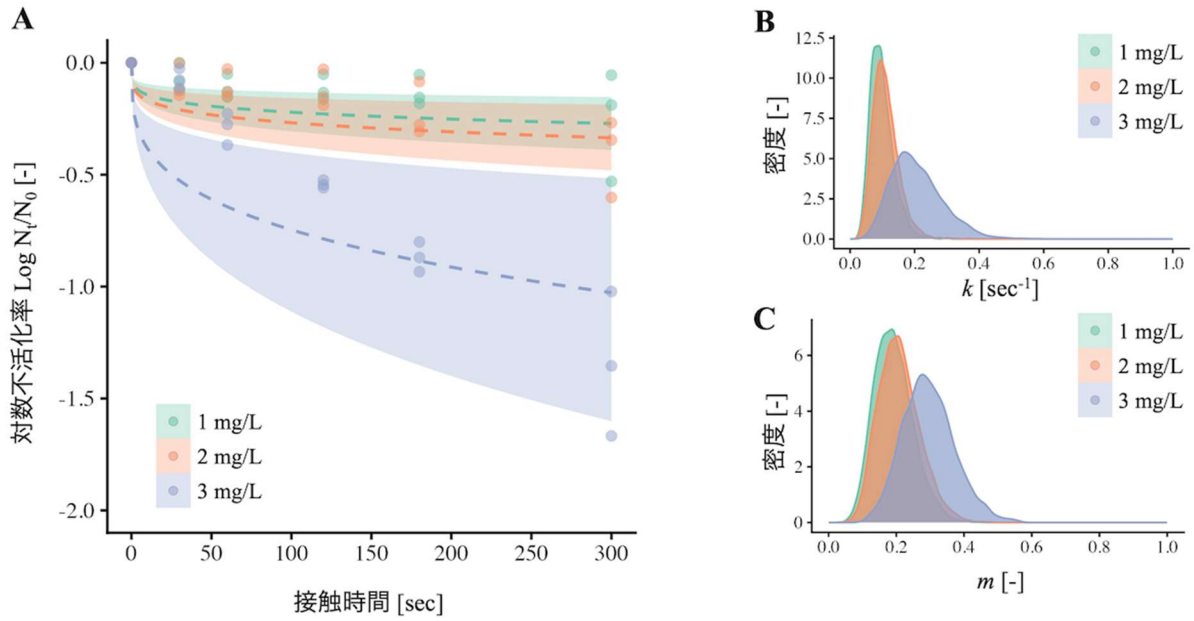


図3 モノクロラミン濃度を1、2、3 mg/L（それぞれ緑、橙、青）とした場合の *L. pneumophila* (ATCC 株) の不活化曲線 (A)、不活化速度定数 k (B) ならびに Hom 因子 m (C) . (A) : プロットは実測値、点線は推定した不活化曲線、影部分は 90%信用区間を示す. (B)、(C) : k および m の確率分布.

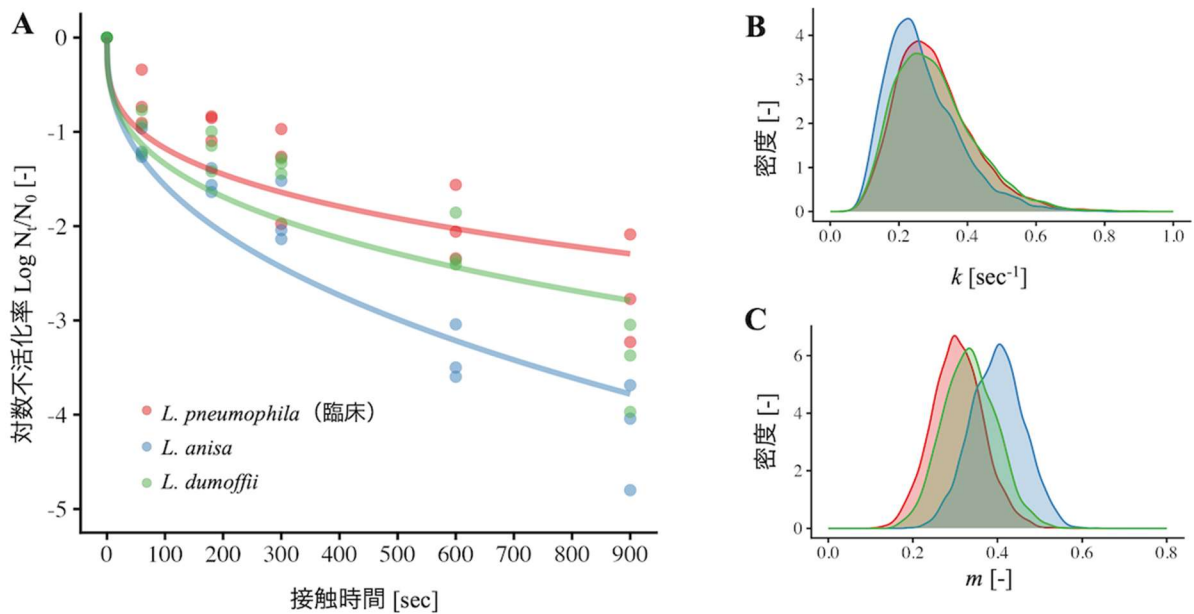


図4 *L. pneumophila* (臨床株 ; 赤)、*L. anisa* (冷却塔水由来 : 青)、*L. dumoffii* (浴槽水由来 : 緑) の不活化曲線 (A)、不活化速度定数 k (B) ならびに Hom 因子 m (C) . (A) : プロットは実測値、実線は推定した不活化曲線. (B)、(C) : k および m の確率分布.