

地域	試料採取 日付	施設名	試料	Am 陽性	Ng 陽性	NJ	Na	Nt	Nit	Nph	Nsp	その他 のAm	水温	pH	泉質	電導	過Mn	施設管理状況	残留濃度	大腸菌群数	一般細菌数
JH	xxxxxx	25	浴槽水(内湯,女)										39.4	7.8	ラドン	ND	ND		0.1	ND	3,800,000
JH	xxxxxx	25	浴槽水(露天)										40.0	7.3	ラドン	ND	ND		0.1	ND	27,000
JH	xxxxxx	26	浴槽水(内湯,女)										39.3	7.7	ラドン	ND	ND		0.6	ND	3,800,000
JH	xxxxxx	27	浴槽水(内湯,女)	+								+	42.3	7.4	ラドン	ND	循環式		0.1	ND	220,000
JH	xxxxxx	28	浴槽水(内湯,男)										39.9	8.4	ラドン	ND	ND		0.3	ND	ND
JH	xxxxxx	28	浴槽水(露天)										42.1	8.4	ラドン	ND	ND		0.2	ND	ND
JH	xxxxxx	29	浴槽水(内湯,女)										39.7	8.1	ラドン	ND	ND		1.4	ND	ND
JH	xxxxxx	28	浴槽水(露天)										40.4	7.9	ラドン	ND	ND		2.9	ND	ND
JH	xxxxxx	30	浴槽水(内湯,女)	+									39.7	7.8	ラドン	ND	循環式		0.1	ND	170,000
JH	xxxxxx	30	浴槽水(クアガーデン)	+								+	38.1	8.1	ラドン	ND	循環式		0	ND	210,000
JH	xxxxxx	31	浴槽水(主浴槽)										40.5	8.4	放射能泉	ND	ND		1.2	ND	ND
JH	xxxxxx	31	浴槽水(岩風呂)										40.3	8.5	放射能泉	ND	ND		2	ND	ND
JH	xxxxxx	31	浴槽水(露天)										37.2	8.2	放射能泉	ND	ND		1	ND	ND
JH	xxxxxx	32	浴槽水(介護用風呂)										40.3	7.8	放射能泉	ND	ND		<0.1	ND	ND
JH	xxxxxx	32	浴槽水(主浴槽)										38.9	8.2	放射能泉	ND	ND		<0.1	ND	ND
JH	xxxxxx	32	浴槽水(露天)										40.2	9.5	放射能泉	ND	ND		0.6	ND	ND
JH	xxxxxx	33	浴槽水(打たせ湯)	+	+							+	39.3	8.1	放射能泉	ND	循環式		0	ND	3,000
JH	xxxxxx	33	浴槽水(薬湯)										41.1	6.5	放射能泉	ND	循環式		測定不能	ND	ND
JH	xxxxxx	33	浴槽水(主浴槽、気泡)										39.7	8.2	放射能泉	ND	循環式		0	ND	ND
JH	xxxxxx	33	浴槽水(露天)										41.0	8.0	放射能泉	ND	循環式		0	ND	ND
JH	031107	1	浴槽水										ND	ND	単純弱放射能冷 鉱泉	ND	循環式		ND	ND	ND
JH	031121	10	浴槽水										ND	ND	温泉水(不明)	ND	循環式		ND	ND	ND
JH	031121	11	浴槽水										ND	ND	水道水	ND	循環式		ND	ND	ND
JH	031121	12	浴槽水	+								+	40.0	7.8	水道水	ND	循環式		0.0	ND	ND
JH	031128	13	浴槽水	+	+							+	40.5	7.5	水道水	ND	循環式		0.1	ND	ND
JH	031128	14	浴槽水	+	+							+	40.0	6.7	水道水	ND	循環式		0.0	ND	ND
JH	031128	15	浴槽水										ND	ND	水道水	ND	循環式		ND	ND	ND
JH	031128	16	浴槽水										ND	ND	水道水	ND	循環式		ND	ND	ND
JH	031128	17	浴槽水										ND	ND	水道水	ND	循環式		ND	ND	ND
JH	031128	18	浴槽水										ND	ND	水道水	ND	循環式		ND	ND	ND
JH	031205	19	浴槽水										ND	ND	水道水	ND	循環式		ND	ND	ND
JH	031107	2	浴槽水										ND	ND	水道水	ND	循環式		ND	ND	ND
JH	031205	20	浴槽水										ND	ND	水道水	ND	循環式		ND	ND	ND
JH	031205	21	浴槽水										ND	ND	水道水	ND	循環式		ND	ND	ND

地域	試料採取 日付	施設名	試料	Am mg/L	NE mg/L	NJ	NI	Nit	Nph	Nsp	CO ₂ H mg/L	水温	pH	泉質	電導度	過Mn	施設管理状況	異塩濃度	大腸菌群数	一般細菌数
JY	xxxxxx	1	浴槽水	+	+	+						ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	1	浴槽水	+	+	+					+	ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	1	浴槽水	+	+	+					+	ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	1	浴槽水	+	+	+					+	ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	1	浴槽水	+	+	+					+	ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	1	浴槽水	+	+	+					+	ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	2	浴槽水	+	+	+						ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	2	浴槽水	+	+	+						ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	3	浴槽水	+	+	+					+	ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	3	浴槽水	+	+	+						ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	3	浴槽水	+	+	+					+	ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	3	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	3	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	3	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	3	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	4	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	4	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	4	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	4	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	4	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	4	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	5	浴槽水	+							+	ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	5	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	6	浴槽水	+	+	+					+	ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	6	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	7	浴槽水	+							+	ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	7	浴槽水	+							+	ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	8	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	9	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	9	浴槽水									ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	10	浴槽水	+	+	+					+	ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND
JY	xxxxxx	10	浴槽水	+							+	ND	ND	アルカリ単純温泉	ND	ND	掛け流し	ND	ND	ND

地域	試料採取日付	施設名	試料	Am 陽性	Ng 陽性	NI	Na	Nt	Nit	Nph	Nsp	その他 のAm	水温	pH	泉質	電導度	過Mn	施設管理状況	異雑濃度	大腸菌群数	一般細菌数
K	0309xx	1	大浴場(男)	+	+	+							41.5	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	1	2,800
K	0309xx	1	岩風呂(男)	+	+	+		+				+	41.1	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	2	7,500
K	0309xx	1	岩風呂(女)	+	+	+		+				+	41.0	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	3	7,200
K	0309xx	1	榎風呂(男)	+	+	+		+				+	41.6	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	2	4,700
K	0309xx	1	榎風呂(女)	+	+	+		+				+	40.5	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	2	9,500
K	0309xx	1	大浴場(女)	+	+	+		+				+	41.0	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	2	3,300
K	0310xx	2	岩風呂(女)	+	+	+		+				+	42.0	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	1	13,000
K	0310xx	2	榎風呂(女)	+	+	+		+				+	42.5	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	1	23,000
K	0310xx	2	榎風呂(男)	+	+	+		+				+	42.2	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	1	20,000
K	0310xx	2	岩風呂(男)	+	+	+		+				+	42.0	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	1	34,000
K	0310xx	2	大浴場(女)	+	+	+		+				+	43.0	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	2	30x103
K	0310xx	2	大浴場(男)										42.5	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	13,000
K	0311xx	3	岩風呂(男)	+	+	+						+	41.0	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	3,100
K	0311xx	3	岩風呂(女)	+	+	+						+	41.5	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.1	0	1,800
K	0311xx	3	榎風呂(女)	+	+	+						+	42.0	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.1	0	39,000
K	0311xx	3	大浴場(女)										43.0	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.1	0	560
K	0311xx	3	大浴場(男)										41.9	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	1,700
K	0311xx	3	榎風呂(男)	+	+	+		+				+	41.7	8.5	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	850
K	0309xx	4	露天風呂(男)	+	+	+		+				+	40.0	8.6	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	4,500
K	0309xx	4	露天風呂(女)	+	+	+		+				+	41.0	8.7	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	9,000
K	0309xx	4	大浴場(女)										40.0	8.7	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	220
K	0309xx	4	大浴場(男)										40.3	8.8	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	290
K	0310xx	5	大浴場(女)	+	+	+							41.0	8.8	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	5,400
K	0310xx	5	露天風呂(女)	+	+	+		+				+	41.0	8.8	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	30,000
K	0310xx	5	露天風呂(男)	+	+	+		+				+	40.1	8.8	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	19,000
K	0310xx	5	大浴場(男)	+	+	+						+	40.5	8.8	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	930
K	0311xx	6	大浴場(女)										41.0	8.9	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.6	0	14
K	0311xx	6	大浴場(男)										40.9	8.9	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.4	0	12
K	0311xx	6	露天風呂(女)										41.0	9.0	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.6	0	3
K	0311xx	6	露天風呂(男)										39.5	9.0	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.5	0	2
K	0309xx	7	露天風呂(男)	+	+	+						+	40.2	8.1	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	740
K	0309xx	7	岩風呂(女)										41.5	8.1	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	370
K	0309xx	7	榎風呂(女)										33.5	8.1	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	13
K	0309xx	7	榎風呂(男)										39.2	8.2	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.6	0	1,700
K	0309xx	7	榎風呂(女)	+	+	+						+	41.5	8.2	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.6	0	160
K	0310xx	8	榎風呂(男)	+	+	+		+				+	40.2	8.6	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	2,500
K	0310xx	8	岩風呂(女)										41.0	8.2	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.1	0	51
K	0310xx	8	榎風呂(女)										45.0	8.9	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.0	0	23,000
K	0310xx	8	榎風呂(女)										42.5	8.6	アルカリ性単純泉	ND	循環式		0.1	0	14

地域	試料採取 日付	施設名	試料	Am 陽性	Ng 陽性	NJ	Na	Nit	Nit	Nsp	その他 のDAm	水温	pH	泉質	電導度	過Mn	施設管理状況	残塩濃度	大腸菌群数	一般細菌数
KK	xxxxxx	1	大浴場(女)									36.0	8.0	ND	ND	循環式	1.2	0	0	
KK	xxxxxx	1	大浴場(男)									36.6	8.0	ND	ND	循環式	1.5	0	0	
KK	xxxxxx	1	露天風呂(男)									36.9	8.0	ND	ND	循環式	1.0	0	0	
KK	xxxxxx	1	露天風呂(女)									36.0	8.2	ND	ND	循環式	0.6	0	0	
KK	xxxxxx	2	大浴場(男)									38.5	7.2	ND	ND	循環式	0.4	0	0	
KK	xxxxxx	2	大浴場(女)									39.0	7.3	ND	ND	循環式	0.1	0	0	
KK	xxxxxx	3	大浴場(男)									42.5	7.2	ND	ND	循環式	0.5	0	0	
KK	xxxxxx	3	大浴場(女)									42.3	7.2	ND	ND	循環式	0.5	0	0	
KK	xxxxxx	4	大浴場(男)									37.0	8.6	ND	ND	循環式	1.8	0	0	
KK	xxxxxx	4	大浴場(女)									39.5	8.6	ND	ND	循環式	1.0	0	0	
KK	xxxxxx	5	大浴場(男)									39.0	8.2	Na-塩化物高温泉	ND	ND	循環式	0.3	0	
KK	xxxxxx	5	大浴場(女)									39.3	8.3	Na-塩化物高温泉	ND	ND	循環式	0.3	0	
KK	xxxxxx	5	露天風呂(男)									38.0	8.2	Na-塩化物高温泉	ND	ND	循環式	0.2	0	
KK	xxxxxx	5	露天風呂(女)									41.0	8.6	Na-塩化物高温泉	ND	ND	循環式	1.5	0	
KK	xxxxxx	6	病院給水施設排水	+								37.0	9.8	ND	ND	ND	ND	7,300	640,000	
KK	xxxxxx	7	食品加工場排水	+	+		+					26.0	4.2	ND	ND	ND	ND	81,000	57,000,000	
KK	xxxxxx	8	食品加工場排水	+								29.0	4.0	ND	ND	ND	ND	10,000	700,000	
KK	xxxxxx	9	食品加工場排水	+								39.0	7.2	ND	ND	ND	ND	0	24	
KK	xxxxxx	10	公衆浴場	+	+		+					27.0	7.0	ND	ND	循環式	ND	35	160,000	
KK	xxxxxx	11	公衆浴場	+								22.0	6.9	ND	ND	循環式	ND	66	6,900	

地域	試料採取日付	施設名	試料	Am陽性	Ng陽性	Nj	Na	Nt	Nit	Nph	Nsp	その他 のAm	水温	pH	泉質	電導度	過Mn	施設管理状況	残塩濃度	大腸菌群	一般細菌数
L	030816	1	浴槽水(冷水)										ND	8.2	井戸水	ND	ND/ND		<0.1	ND	ND
L	030816	1	浴槽水(浮き風呂)										38.0	8.1	井戸水	ND	ND/ND		0.5	ND	ND
L	030816	1	浴槽水(薬湯)	+								+	37.0	7.7	井戸水	ND	ND/ND		<0.1	ND	ND
L	030816	1	浴槽水(ジャグジー)										39.0	8.0	井戸水	ND	ND/ND		1.4	ND	ND
L	030816	1	浴槽水(ジャグバス)										38.0	8.1	井戸水	ND	ND/ND		0.5	ND	ND
L	030816	1	浴槽水(露天)										ND	8.5	温泉(ナトリウム・硫酸塩・炭酸水素塩・塩化物泉)	ND	ND/ND		<0.1	ND	ND
L	030816	2	浴槽水(薬湯、アロエ)	+	+								ND	ND	中性低張性Ca-Na塩化物泉	ND	ND/ND		ND	ND	ND
L	030816	2	浴槽水(冷水風呂)										ND	ND	中性低張性Ca-Na塩化物泉	ND	ND/ND		ND	ND	ND
L	030816	2	浴槽水(主浴槽)										ND	ND	中性低張性Ca-Na塩化物泉	ND	ND/ND		ND	ND	ND
L	030816	2	浴槽水(薬湯、酵素)										ND	ND	中性低張性Ca-Na塩化物泉	ND	ND/ND		ND	ND	ND
L	030816	2	浴槽水(薬湯、ローズアンプル・サマルパット)	+								+	ND	ND	中性低張性Ca-Na塩化物泉	ND	ND/ND		ND	ND	ND
L	030816	2	浴槽水(薬湯)	+								+	ND	ND	中性低張性Ca-Na塩化物泉	ND	ND/ND		ND	ND	ND
L	030816	3	浴槽水(主浴槽)	+								+	ND	8.0	地下水	ND	ND/ND	循環式(物理、砂濾過)	0.3	ND	ND
L	030816	3	浴槽水(薬湯、イソト風呂)										ND	8.0	地下水	ND	ND/ND	循環式(生物濾過)	測定できず	ND	ND
L	030816	3	浴槽水(ジャグバス)										ND	8.2	地下水	ND	ND/ND	循環式(物理、砂濾過)	1.5	ND	ND
L	030816	3	浴槽水(露天)										ND	7.7	地下水	ND	ND/ND	循環式(物理、砂濾過)	測定できず	ND	ND
L	030816	3	ヘアキッカー(主浴槽)の水										ND	ND	地下水	ND	ND/ND	循環式(物理、砂濾過)	測定できず	ND	ND
L	030816	4	浴槽水(主浴槽、虹の湯)										40.0	8.0	水道水	ND	ND/ND	循環式(物理、砂濾過)	>2.0	ND	ND
L	030816	4	浴槽水(主浴槽、草の湯)										40.0	8.1	水道水	ND	ND/ND	循環式(物理、砂濾過)	>2.0	ND	ND
L	030816	4	浴槽水(歩行湯)										34.0	7.7	水道水	ND	ND/ND	循環式(物理、砂濾過)	1.5	ND	ND
L	030816	4	浴槽水(浮き湯)										40.0	8.2	水道水	ND	ND/ND	循環式(物理、砂濾過)	>2.0	ND	ND
L	030816	4	浴槽水(水風呂)										22.0	7.7	水道水	ND	ND/ND	循環式(物理、砂濾過)	>2.0	ND	ND
L	030816	4	浴槽水(露天)										40.0	7.9	水道水	ND	ND/ND	循環式(物理、砂濾過)	>2.0	ND	ND
L	030816	4	ヘアキッカー(露天風呂)の水										ND	ND	水道水	ND	ND/ND	循環式(物理、砂濾過)	ND	ND	ND
L	030816	5	浴槽水(薬湯)	+	+								ND	ND	井戸水	ND	ND/ND	毎日換水。循環なし。	ND	ND	ND
L	030816	5	浴槽水(薬湯、どくだみ風呂)	+	+								41.0	7.8	井戸水	ND	ND/ND	毎日換水。循環なし。	<0.05	ND	ND
L	030816	5	浴槽水(主浴槽、ひのき)										42.0	8.0	井戸水	ND	ND/ND	循環式(物理、砂濾過)	0.6	ND	ND
L	030816	5	浴槽水(薬湯、漢方風呂)										40.0	7.4	井戸水	ND	ND/ND	毎日換水。循環なし。	<0.05	ND	ND
L	030816	5	浴槽水(薬湯、ゆず風呂)	+								+	40.0	7.6	井戸水	ND	ND/ND	毎日換水。循環なし。	<0.05	ND	ND
L	030816	5	浴槽水(薬湯、漢方風呂)										39.0	7.3	井戸水	ND	ND/ND	毎日換水。循環なし。	<0.05	ND	ND

L	030816	5	ゆず風呂(この時点では前回検査結果を受けてゆずは入れていない)														41.5	7.8	井戸水	ND	毎日換水。循環なし。	1.3	ND	ND
L	030816	5	浴槽水(生浴槽、ハイレーション)														40.0	8.3	井戸水	ND	循環式(物理、砂濾過)	>2.0	ND	ND
L	030816	5	ヘアキャッチャー内の水														ND	ND	井戸水	ND	毎日換水。循環なし。	ND	ND	ND
L	030816	5	どくだみぶろ(この時点では前回検査結果を受けてどくだみは入れていない)														39.0	8.0	井戸水	ND	毎日換水。循環なし。	0.6	ND	ND
L	030816	6	浴槽水(浴槽、男)														42.0	7.6	水道水	ND	循環式(濾過方式不明)	<0.05	ND	ND
L	030816	6	浴槽水(浴槽、女)														40.0	7.8	水道水	ND	循環式(濾過方式不明)	0.4	ND	ND

地域	試料採取 日付	施設名	試料	Am 陽性	Ng 陽性	NI	Na	Nt	Nit	Nph	Nsp	その他 のAm	水温	pH	泉質	電導度	過Mn	施設管理状況	残塩濃度	大腸菌群数	一般細菌数
M	0310xx	1	排水	+								+	39.5	8.6	Na-炭酸水素塩温泉	ND	ND	ND	0.0	ND	ND
M	0310xx	2	清湯前溜水	+								+	39.5	8.2	メタケイ酸	ND	ND	循環式	0(オゾン)	ND	ND
M	0310xx	3	溶槽水										41.5	8.8	Na-炭酸水素塩温泉	ND	ND	循環式	0.2	ND	ND
M	0310xx	4	プール水										30.5	8.2	井戸水	ND	ND	ND	1.0	ND	ND
M	0310xx	5	排水										35.2	8.4	Na-塩化物泉	ND	ND	ND	0.0	ND	ND
M	0310xx	6	溶槽水	+									44.0	8.4	Na-塩化物炭酸水素塩泉	ND	ND	循環式	0.3	ND	ND
M	0310xx	7	溶槽水										40.7	7.8	ND	ND	ND	循環式	2.0	ND	ND
M	0310xx	8	溶槽水										41.8	7.2	Na-塩化物冷鉱泉	ND	ND	循環式	0.1	ND	ND
M	0310xx	9	溶槽水										43.3	7.4	単純温泉	ND	ND	循環式	0.2	ND	ND
M	0310xx	10	溶槽水										42.2	7.2	Na/Mg-炭酸水素塩温泉	ND	ND	循環式	0	ND	ND
M	0310xx	11	溶槽水										38.4	6.4	Na/塩化物泉	ND	ND	循環式	0.5	ND	ND
M	0310xx	12	溶槽水										41.1	7.4	Na/塩化物泉	ND	ND	循環式	0.2	ND	ND
M	0310xx	13	溶槽水										39.8	7.2	ND	ND	ND	循環式	0	ND	ND
M	0310xx	14	溶槽水										41.4	7.4	ND	ND	ND	循環式	0.55	ND	ND
M	0310xx	15	溶槽水										40.8	7.4	ND	ND	ND	循環式	0.4	ND	ND
M	0310xx	16	溶槽水										39.5	7.0	ND	ND	ND	循環式	0.9	ND	ND
M	0310xx	17	溶槽水										39.5	6.8	ND	ND	ND	循環式	1.4	ND	ND
M	0310xx	18	溶槽水										40.0	8.8	ND	ND	ND	循環式	1.4	ND	ND
M	0310xx	19	溶槽水										40.0	7.2	Na-塩化物強塩泉	ND	ND	循環式	0.08	ND	ND
M	0310xx	20	溶槽水										40.0	7.0	ND	ND	ND	循環式	0(オゾン)	ND	ND
M	0310xx	21	溶槽水										29.0	8.4	ND	ND	ND	循環式	2.0	ND	ND
M	0310xx	22	溶槽水										38.0	8.4	ND	ND	ND	循環式	0.1	ND	ND
M	0310xx	23	溶槽水										35.0	8.3	ND	ND	ND	循環式	2.0<	ND	ND
M	0310xx	24	溶槽水										29.0	8.8	ND	ND	ND	循環式	2.0	ND	ND
M	0310xx	25	溶槽水										37.0	7.9	ND	ND	ND	循環式	0.1	ND	ND
M	0310xx	26	溶槽水										41.0	6.4	Na-Ca-塩化物泉	ND	ND	循環式	0.5	ND	ND
M	0310xx	27	溶槽水										40.0	7.6	ND	ND	ND	循環式	0	ND	ND
M	0310xx	28	溶槽水										41.0	8.1	弱アルカリ性低硫酸性低温泉	ND	ND	循環式	2.8	ND	ND
M	0310xx	29	溶槽水	+									40.5	8.2	ND	ND	ND	循環式	0.24	ND	ND
M	0310xx	30	溶槽水										41.0	7.6	ND	ND	ND	循環式	<0.1	ND	ND
M	0310xx	31	溶槽水										38.5	8.2	ND	ND	ND	循環式	0.7	ND	ND
M	0310xx	32	溶槽水										40.0	7.2	含鉄(Ⅱ)-Na-Ca-Mg-塩化物泉	ND	ND	循環式	0.0	ND	ND
M	0310xx	33	溶槽水										39.0	7.8	ND	ND	ND	循環式	0.5	ND	ND
M	0310xx	34	溶槽水	+									36.0	8.0	ND	ND	ND	循環式	0.2	ND	ND
M	0310xx	35	溶槽水										41.3	7.4	ND	ND	ND	循環式	1.2	ND	ND
M	0310xx	36	溶槽水										39.0	7.2	Na-Ca塩化物泉	ND	ND	循環式	0.7	ND	ND

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

温泉・公衆浴場、その他の温水におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体
Naegleria fowleri の疫学と病原性発現に関する研究

ネグレリア属アメーバの遺伝子型別

分担研究者： 泉山 信司 (国立感染症研究所 寄生動物部)
八木田健司 (国立感染症研究所 寄生動物部)
黒木 俊郎 (神奈川衛生研究所 微生物部)

協力研究者： 下河原理江子 (国立感染症研究所 寄生動物部)
小村 麻子 (国立感染症研究所 寄生動物部)
朝倉 登喜子 (国立感染症研究所 寄生動物部)

(要旨)

温水環境中に存在する病原性アメーバの汚染防止対策を目的として、ネグレリア属アメーバの検出法の開発・検討を行っている。前年度までの調査に用いた PCR/RFLP 法では、PCR で増幅した Internal Transcribed Spacer Regions of Nuclear Ribosomal DNA 領域 (ITS1/ITS2 領域) の DNA を制限酵素 *Mse* I、*Nla* IV で消化し、その切断型から *N. fowleri*、*N. lovaniensis*、*N. australiensis* を分別、同定した。しかしながら、本方法は上記のアメーバ種に加え、*N. philippinensis*、*N. italica* 等の病原性を有するネグレリア属アメーバの型別には不適當であった。加えて、調査の過程で国内の温水環境には多様な種が存在することが明らかとなり、さらに詳細な鑑別指標が必要となった。そこで、PCR 反応で得られた ITS1/ITS2 領域の塩基配列を解析することで詳細な情報を得ることとした。追加情報が必要な場合には、18S rRNA の塩基配列を決定して種別鑑定の補助とした。

A. 研究目的

近年、個人住宅のみならず公衆浴場や旅館において循環式浴槽が普及し、アメーバの生育に好適な環境が整っていると考えられている。昨年度の研究では PCR/RFLP 法を導入した結果、実際に入浴施設から *N. australiensis* が検出され、マウスに対する病原性が認められた。

昨年の本研究班の調査では、ネグレリア属と同定されたアメーバのうち非病原種の *N. lovaniensis* が約半数を占めており、次いで *N. australiensis* が高頻度に検出された。本年度は ITS 領域ならびに 18S rRNA 領域の直接塩基配列決定による遺伝子型別を行い、病原種として知られる *N. philippinensis*、*N. italica* 近縁種などが確認された。併せて、我が国における *N. fowleri* 感染事例からの分離株の遺伝子型別を行ったので、その結果について報告する。

B. 研究方法

標準株

本研究で使用した株を表 1 に示した。ネグレリア属アメーバの標準株は基本的に SCGYEM 培地を用いて継代培養している。*Escherichia coli* は Antibiotic 培地 (DIFCO) を用いて培養した。

表 1 本研究で使用した標準株

株	由来
<i>Naegleria fowleri</i> NF66	J. F. De Jonckheere
<i>N. fowleri</i> KUL	J. F. De Jonckheere
<i>N. fowleri</i> Kurume	T. Fukuma ⁽¹⁾
<i>N. lovaniensis</i> Aq/1/9/45D	F. Marciano-Cabral
<i>N. australiensis</i> PP397	J. F. De Jonckheere
<i>N. philippinensis</i> PI	F. Natividad
<i>N. italica</i> AB-T-F3	S. Gatti
<i>Escherichia coli</i> DH1	K. Ito

アメーバ分離

アメーバの分離には大腸菌を塗布した寒天平板培地を使用し、試料水 50mL より遠心濃縮した 1mL あるいは、原液 1mL を接種した。42°C で 3 日間培養し、培地上にプラーク状に生育したアメーバを新しい寒天平板培地に移し (クローン化)、形態学的にネグレリア属アメーバであることを確認した。新たに増殖したアメーバを以降の同定に供した。5.8S rRNA 遺伝子を含む ITS 領域を標的とした PCR/RFLP と直接塩基配列決定、18S rRNA 領域の直接塩基配列決定を行った。本研究で用いた代表的な分離株を表 2 に示した。

表2 本研究で使用した主な分離株

株	想定された遺伝子型
105-12	<i>N. australiensis</i> *
END	<i>N. australiensis</i> *
G39	<i>N. australiensis</i> *
H4-9	<i>N. tihangensis</i> *
I75-1	<i>N. tihangensis</i> *
I61-1	<i>N. tihangensis</i> *
K187	<i>N. tihangensis</i> *
J2-2-4	<i>N. tihangensis</i> *
J2-6	<i>N. lovaniensis</i> *
J2-1-2	<i>N. lovaniensis</i> *
K415	<i>N. philippinensis</i> *
K612	<i>N. philippinensis</i> *
H25-4	<i>N. endoi</i> *
H25-8	<i>N. endoi</i> *
N121	<i>N. italica</i> *
N123	<i>N. italica</i> *
K611	<i>N. laresi</i> *
K336	<i>N. mexicana</i> *
NK16	<i>N. clarki</i>
K866	<i>N. jamiesoni</i> *
N174	<i>N. jamiesoni</i> *
NK23	<i>N. andersoni</i> *
K173	<i>Naegleria</i> sp. PNMA-1*
K63	<i>Naegleria</i> sp. PNMA-1*
DD28	<i>Naegleria</i> sp. PNMA-1*
K52	<i>Naegleria</i> sp. PNMR-1*
NK24	<i>Naegleria</i> sp. PNML*
N1	<i>Naegleria</i> sp. NC11-1*

DNA 調製

ITS 領域を標的とした PCR 反応の鋳型 DNA は以下の手順で用意した。アメーバが活発に増殖しているブランク辺縁部の寒天を切りとり、滅菌水 200 μ L を含む 1.5mL チューブ内に移し、ピペットを用いて細胞を懸濁した。この懸濁液を数秒間静置した後に上清を新しいチューブに移し、1,000 \times g、5 分間、4 $^{\circ}$ C の条件で微量遠心機を用いて遠心分離した。得られた沈渣に 1% の Triton-X100 を含む 100 μ L の TE 緩衝液を加え、100 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱処理し、ここから 1 ないし 2 μ L を PCR 用鋳型 DNA として用いた。加熱処理した細胞を用いた。すなわち、細胞を遠心洗浄した後、1% の Triton-X100 を含む 10 mM Tris- 1 mM EDTA 緩衝液(pH 8.0)を加え、100 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱処理を行なった。18S rRNA 領域の増幅では、PCR の反応効率の向上を目的として、鋳型 DNA の精製に QIAamp DNA mini kit (Qiagen) を使用した。

PCR/RFLP 解析

ITS 領域を標的とした PCR の設計は基本的に Pelandakis と Pernin の方法に従った⁽²⁾。すなわち、プライマーは、5'-GAA CCT GCG TAG GGA TCA TTT-3' および 5'-TTT CTT TTC CTC CCC TTA TTA-3' を使用した。PCR 反応液の組成は表 3 の通りである。反応プログラムは 94°C 5min の後、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 45 秒の反応を 35 サイクル行い、最後に 72°C 5 分の伸長反応を行った。PCR の陽性対象には、*N. lovaniensis* Aq/9/1/45D 株を使用した。

表 3 反応液の組成

鋳型	2 μ L
Buffer	2.5 μ L (酵素添付 10 倍濃度緩衝液)
MgCl ₂	1.5 μ L (終濃度 1.5mM)
dNTP	2 μ L (200mM each)
<i>Taq</i>	0.2 μ L (1unit Takara <i>Ex Taq</i>)
滅菌水	15.3 μ L
Primer1	0.75 μ L (15pmol)
Primer2	0.75 μ L (15pmol)
計	25 μ L

RFLP は制限酵素の *Mse*I または *Nla*IV (New England BioLabs) をメーカーの指示に従って用い、未精製の PCR 産物を 37°C で 2 時間反応させて切断した。切断した断片は 3% アガロースゲルあるいは 5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。

18S rRNA 領域の PCR

18S rRNA 領域を標的とした PCR は、基本的に Dykova らの方法に従った⁽³⁾。すなわち、プライマーは XY2 (5'-TAC CTG GTT GAT CCT GCC AG-3') ならびに Y25 (5'-AAA TGA TCC CTA CGC AGG TT-3') を使用した。PCR 反応液の組成は表 4 の通りである。反応プログラムは 94°C 5min の後、94°C 1 分、50°C 1 分、72°C 2 分の反応を 30 サイクル行い、最後に 72°C 8 分の伸長反応を行った。PCR の陽性対象には、*N. lovaniensis* Aq/9/1/45D 株を使用した。

表 4 反応液の組成

鋳型	2 μ L
Buffer	2.5 μ L (酵素添付 10 倍濃度緩衝液)
MgCl ₂	2 μ L (終濃度 2mM)
dNTP	2 μ L (200mM each)
Taq	0.2 μ L (1unit Takara Ex Taq)
滅菌水	14.3 μ L
Primer1	1 μ L (20pmol)
Primer2	1 μ L (20pmol)
計	25 μ L

塩基配列決定

代表的な分離株より ITS 領域ならびに 18S rRNA 領域の塩基配列を決定した。PCR 産物は QIAquick PCR purification kit (Qiagen)を用いて精製した。配列決定用試薬は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit V1.1 (Applied Biosystems)をメーカーの指示に従って用いた。塩基配列決定には ABI 310 (Applied Biosystems)を使用した。取得したデータの処理は SeqManII (Lasergene、DNAStar)を用いた。アライメントの作成は PileUp (GCG Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys)を使用した。アライメントの修正ならびに印刷は GeneDoc (Version 2.6、Nicholas et al., 1997)を使用した⁽⁴⁾。系統樹の作成は MEGA2 (Version 2.1、Kumar et al., 2001)を用いて NJ 法で行なった⁽⁵⁾。系統樹作成時のアウトグループとして ITS 領域では *Willaertia magna* (X96579)、18S rRNA 領域では *Learamoeba waccamawensis* (AF011455)の登録配列を使用した。ITS 領域の塩基配列決定のプライマーは PCR と同じプライマーを使用した。18S rRNA では PCR プライマーの他に塩基配列決定用プライマーとして N18R3 (5'-CAT CAC AGA CCT GTT ATG GC-3')、N18F1 (5'-ATC AGT GTT CGA TTC CGG AG-3')、N18F2 (5'-GTA CCA TGA GGC TAG AGG TG-3')、N18F3 (5'-GAT AAC GAA CGA GAC CTA AG-3')、N18R1 (5'-GCC GTC CTT AGA TGT GGT AG-3')、N18R2 (5'-GCC TTA GTT GGT CAC ATG AG-3')を使用した。

C. 結果及び考察

これまで ITS 領域を標的とした PCR/RFLP による型別の結果、わが国には全国的に *N. australiensis* が棲息していることが明らかとなったが、RFLP により型別されなかった他の多くの分離株は同定されないまま残されていた。これらの塩基配列を決定した結果、GenBank に登録の無い配列が複数取得され、多様なネグレリア属アメーバの存在が認められた。この3年間で ITS 領域の塩基配列を決定した分離株数と遺伝子型を図1に示した。遺伝子の決定には系統樹解析を行い、近縁種である事を確認した(図2)。代表的な分離株より得た塩基配列のアライメントを図3に示した。図示した系統樹の作成では GenBank の登録配列より可能な範囲で多くの配列を用いた(図2)。

ITS 領域はスペーサー領域であることから多様性に富み、塩基配列の変異を確認するには優れている。しかしながら、その一方で種内変異がどの程度の範囲に収まっているものかは必ずしも意見の統一を見ていない。本研究を通して *N. italica* や *N. philippinensis* の近縁株が取得されたが、これらの分離株の系統樹でのクラスタリングが明瞭ではなく、近縁株の病原性についての判断は困難であった。今回得られた *N. italica* の近縁種の ITS2 領域には 8 塩基の変異が存在した。

ITS1/ITS2 領域とは別に 18S rRNA 領域の塩基配列を決定した分離株の遺伝子型と標準株との異同について図 4 にまとめた。分離株ならびに GenBank に登録された塩基配列より作成した系統樹ならびにアライメントを図 5、図 6 に示した。GenBank のデータベースには 18S rRNA 領域の全長にわたる配列の登録は少なく解析に制限がかかるが、得られた系統樹の分岐は ITS1/ITS2 領域により作製したものとおおむね一致した。上記の結果を踏まえて、個々の分離株に係る検討結果を種ごとに記載した。

N. australiensis

N. australiensis は標準株の PP397 と完全に一致する配列を有する分離株が多数取得された。分離株を用いた感染実験でマウスに対する病原性が確認されたが、病原性は必ずしも一様でなく、株間で差が認められた（八木田健司、分担研究報告書）。

N. tihangensis

N. tihangensis は *N. australiensis* と ITS2 で 2 塩基のみ異なる分離株であるが、*N. australiensis* と同程度の分離株が得られた。*N. tihangensis* は De Jonckheere により 2002 年に提唱された種であるが⁽⁶⁾、18S rRNA の配列でも 4 塩基 (1976/1980) の違いが認められているに過ぎない。*N. australiensis* と別種と扱うべきか否かは今後も検討を続ける必要があると考えられた。これまでのところ、両研究室における感染実験でマウスに対する病原性は確認されていない。

N. lovaniensis

N. lovaniensis は 3 年間の調査を通じて最も多く取得された分離株であり、これまでに 77 株の ITS 領域の塩基配列を決定した。種間の塩基配列はよく保存されており、他の分離株における多様性とは対照的であった。本種は非病原性であるが、形態的にも生態的にも *N. fowleri* とよく類似することが知られており、*N. lovaniensis* の存在する環境は *N. fowleri* にとって好適環境とみなされている⁽⁷⁾。今後とも *N. fowleri* の存在の有無については注視していく必要がある。

N. fowleri

我が国のアメーバ性髄膜脳炎の患者から分離された *N. fowleri* Kurume 株は、*N. fowleri* 標準株である NF66 株と ITS1/ITS2 領域の配列を有していたが、他の株とは配列に違いが認められた。18S rRNA 領域においては標準株 NF66 と Kurume 株の間に 2 塩基の違いが認めら