

表 13 泉質別 病原微生物及び TOC 検出状況 (全試料)

泉質	レジオネラ属菌		アメーバ		抗酸菌		従属栄養細菌(42℃)		全有機炭素(TOC)	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	平均値±SD (log CFU/ml)	試料数	平均値±SD (mg/L)
酸性/弱酸性泉	15	0 (0.0) ***	13	0 (0.0)	15	0 (0.0)	15	2.5 ± 2.2	5	1.74 ± 1.34
塩化物/炭酸水素塩泉	19	14 (73.7) ***	13	5 (38.5)	13	0 (0.0)	13	3.5 ± 2.1	13	0.87 ± 0.76
塩化物泉	73	31 (42.5)	69	10 (14.5)	69	0 (0.0)	61	2.9 ± 1.9	53	0.77 ± 1.04
炭酸水素塩泉	14	3 (21.4)	14	2 (14.3)	14	1 (7.1)	14	3.0 ± 2.2	3	0.87 ± 0.64
硫酸塩泉	16	4 (25.0)	16	2 (12.5)	16	0 (0.0)	16	3.3 ± 2.6	16	0.66 ± 0.56
単純温泉	52	18 (34.6)	50	14 (28.0)	52	5 (9.6)	49	3.2 ± 2.1	36	0.64 ± 0.61
硫黄泉	27	6 (22.2)	27	8 (29.6)	27	1 (3.7)	27	3.2 ± 1.9	27	1.24 ± 1.31
その他・不明	16	5 (31.3)	12	9 (75.0) ***	14	0 (0.0)	14	3.2 ± 2.1	14	0.64 ± 0.47
計	232	81 (34.9)	214	50 (23.4)	220	7 (3.2)	209	3.1 ± 2.0	167	0.83 ± 0.94

泉質	大腸菌		大腸菌群		緑膿菌		黄色ブドウ球菌	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)
酸性/弱酸性泉	15	2 (13.3)	13	2 (15.4)	15	0 (0.0) *	15	1 (6.7)
塩化物/炭酸水素塩泉	19	7 (36.8)	19	14 (73.7) **	13	5 (38.5)	13	6 (46.2) **
塩化物泉	61	11 (18.0)	61	20 (32.8)	61	14 (23.0)	61	3 (4.9) *
炭酸水素塩泉	14	4 (28.6)	14	4 (28.6)	14	5 (35.7)	14	0 (0.0)
硫酸塩泉	16	3 (18.8)	16	4 (25.0)	16	5 (31.3)	16	5 (31.3)
単純温泉	49	9 (18.4)	49	14 (28.6)	49	13 (26.5)	49	10 (20.4)
硫黄泉	27	12 (44.4) *	27	14 (51.9)	27	5 (18.5)	27	5 (18.5)
その他・不明	14	8 (57.1) *	14	11 (78.6) **	14	4 (28.6)	14	3 (21.4)
計	215	56 (26.0)	213	83 (39.0)	209	51 (24.4)	209	33 (15.8)

*:P<0.05、**:P<0.01、***:P<0.001

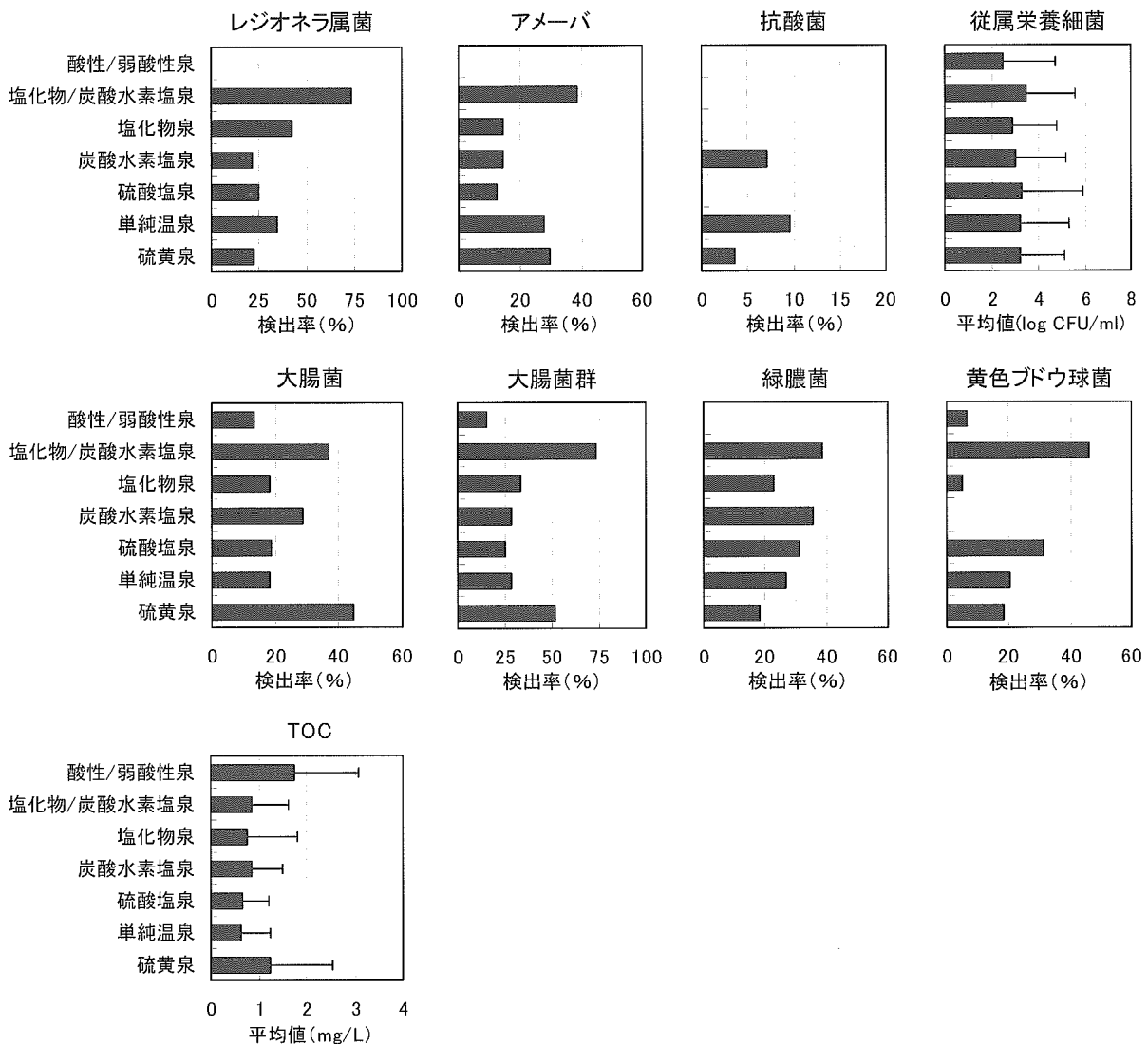


図 7 泉質別 病原微生物及び TOC 検出状況 (全試料)

表 14 泉質別 病原微生物及び TOC 検出状況 (浴槽水)

泉質	レジオネラ属菌		アメーバ		抗酸菌		従属栄養細菌(42℃)		全有機炭素(TOC)	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	平均値±SD (log CFU/ml)	試料数	平均値±SD (mg/L)
酸性/弱酸性泉	8	0 (0.0) *	7	0 (0.0)	8	0 (0.0)	8	3.9 ± 2.1	4	1.90 ± 1.49
塩化物/炭酸水素塩泉	12	10 (83.3) *	9	5 (55.6)	9	0 (0.0)	9	4.4 ± 1.4	9	0.88 ± 0.85
塩化物泉	37	25 (67.6) **	35	10 (28.6)	37	0 (0.0)	37	3.8 ± 1.6	34	0.69 ± 0.49
炭酸水素塩泉	6	3 (50.0)	6	2 (33.3)	6	1 (16.7)	6	5.4 ± 0.7	3	0.87 ± 0.64
硫酸塩泉	11	4 (36.4)	11	2 (18.2)	11	0 (0.0)	11	4.0 ± 1.3	11	0.59 ± 0.64
単純温泉	31	15 (48.4)	30	12 (40.0)	31	4 (12.9)	31	3.5 ± 1.9	24	0.74 ± 0.72
硫黄泉	19	5 (26.3) *	19	7 (36.8)	19	1 (5.3)	19	3.8 ± 1.9	19	1.51 ± 1.47
その他・不明	8	3 (37.5)	7	5 (71.4)	8	0 (0.0)	8	4.4 ± 2.0	8	0.79 ± 0.42
計	132	65 (49.2)	124	43 (34.7)	129	6 (4.7)	209	4.0 ± 1.7	167	0.90 ± 0.91

泉質	大腸菌		大腸菌群		緑膿菌		黄色ブドウ球菌	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)
酸性/弱酸性泉	8	2 (25.0)	6	2 (33.3)	8	0 (0.0)	8	1 (12.5)
塩化物/炭酸水素塩泉	12	7 (58.3)	12	11 (91.7) *	9	5 (55.6)	9	6 (66.7) *
塩化物泉	37	11 (29.7)	37	19 (51.4)	37	13 (35.1)	37	3 (8.1) **
炭酸水素塩泉	6	4 (66.7)	6	4 (66.7)	6	5 (83.3) *	6	0 (0.0)
硫酸塩泉	11	3 (27.3)	11	4 (36.4)	11	5 (45.5)	11	5 (45.5)
単純温泉	31	9 (29.0)	31	14 (45.2)	31	10 (32.3)	31	10 (32.3)
硫黄泉	19	12 (63.2) *	19	14 (73.7)	19	4 (21.1)	19	5 (26.3)
その他・不明	8	5 (62.5)	8	6 (75.0)	8	4 (50.0)	8	3 (37.5)
計	132	53 (40.2)	130	74 (56.9)	129	46 (35.7)	129	33 (25.6)

**: $P<0.05$ 、*: $P<0.01$

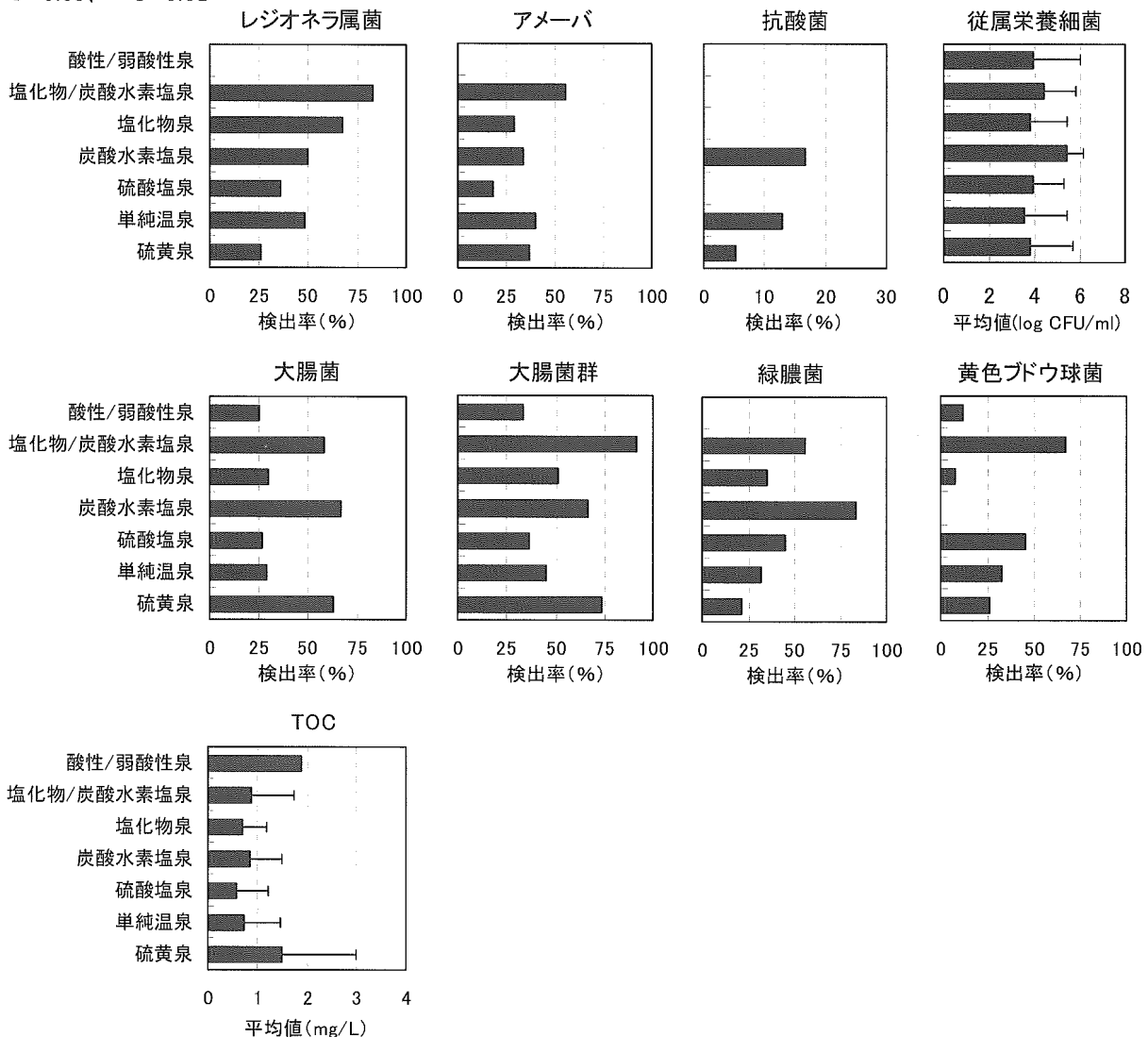


図 8 泉質別 病原微生物及び TOC 検出状況 (浴槽水)

表 15 浴槽水消毒の有無と浴槽水からの病原微生物検出状況

浴槽水の消毒	レジオネラ属菌		アメーバ		抗酸菌		従属栄養細菌(42℃)	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	平均値±SD (log CFU/ml)
消毒あり	31	14 (45.2)	30	8 (26.7)	31	3 (9.7)	31	3.5 ± 1.8 *
消毒なし	98	50 (51.0)	92	33 (35.9)	95	3 (3.2)	95	4.2 ± 1.7
計	129	64 (49.6)	122	41 (33.6)	126	6 (4.8)	126	4.0 ± 1.7

浴槽水の消毒	大腸菌		大腸菌群		緑膿菌		黄色ブドウ球菌	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)
消毒あり	31	9 (29.0)	31	10 (32.3) **	31	10 (32.3)	31	4 (12.9)
消毒なし	98	42 (42.9)	96	62 (64.6)	95	35 (36.8)	95	29 (30.5)
計	129	51 (39.5)	127	72 (56.7)	126	45 (35.7)	126	33 (26.2)

*: $P<0.05$ 、**: $P<0.01$

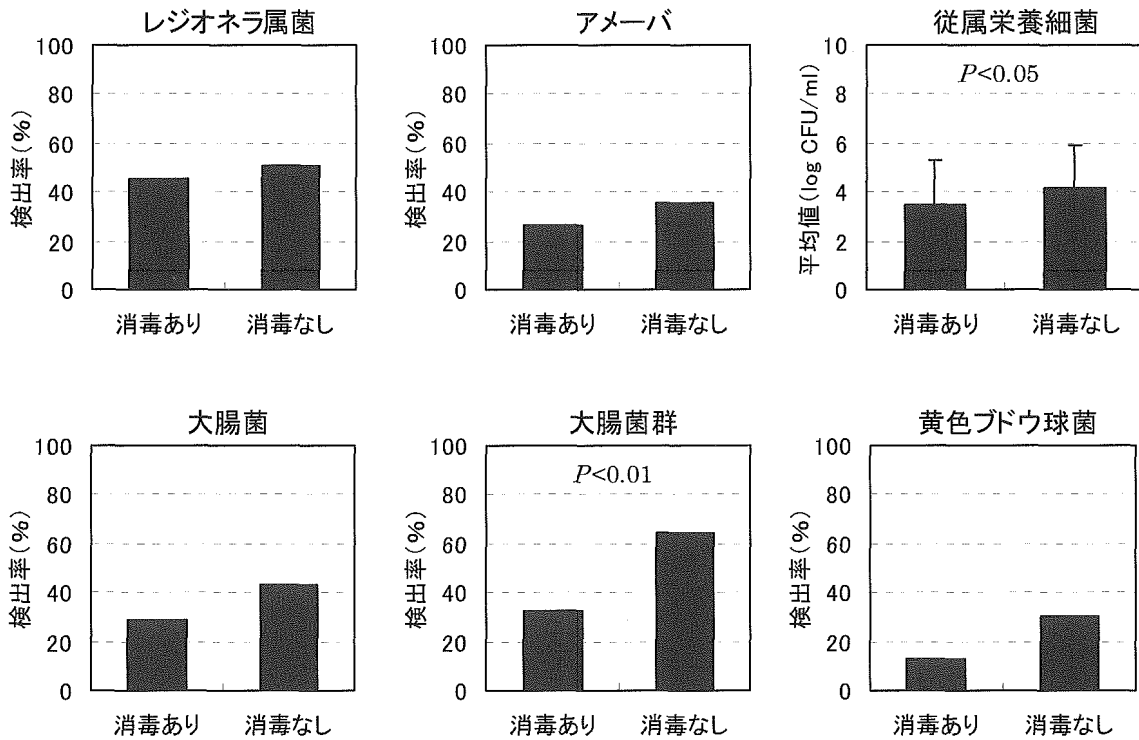


図 9 浴槽水消毒の有無と浴槽水からの病原微生物検出状況

表 16 浴槽水の遊離残留塩素濃度と浴槽水からの病原微生物検出状況

浴槽水の消毒	レジオネラ属菌		アメーバ		抗酸菌		従属栄養細菌(42°C)	
	試料数	検出数 (%)	試料数	検出数 (%)	試料数	検出数 (%)	試料数	平均値±SD (log CFU/ml)
≥0.2 mg/L	11	4 (36.4)	10	0 (0.0) *	11	2 (18.2)	11	2.4 ± 2.2 **
<0.2 mg/L	116	61 (52.6)	109	43 (39.4)	113	4 (3.5)	113	4.2 ± 1.6
計	127	65 (51.2)	119	43 (36.1)	124	6 (4.8)	124	4.0 ± 1.7

浴槽水の消毒	大腸菌		大腸菌群		緑膿菌		黄色ブドウ球菌	
	試料数	検出数 (%)	試料数	検出数 (%)	試料数	検出数 (%)	試料数	検出数 (%)
≥0.2 mg/L	11	3 (27.3)	11	3 (27.3)	11	3 (27.3)	11	2 (18.2)
<0.2 mg/L	116	48 (41.4)	114	69 (60.5)	113	41 (36.3)	113	31 (27.4)
計	127	51 (40.2)	125	72 (57.6)	124	44 (35.5)	124	33 (26.6)

*:P<0.05, **:P<0.01

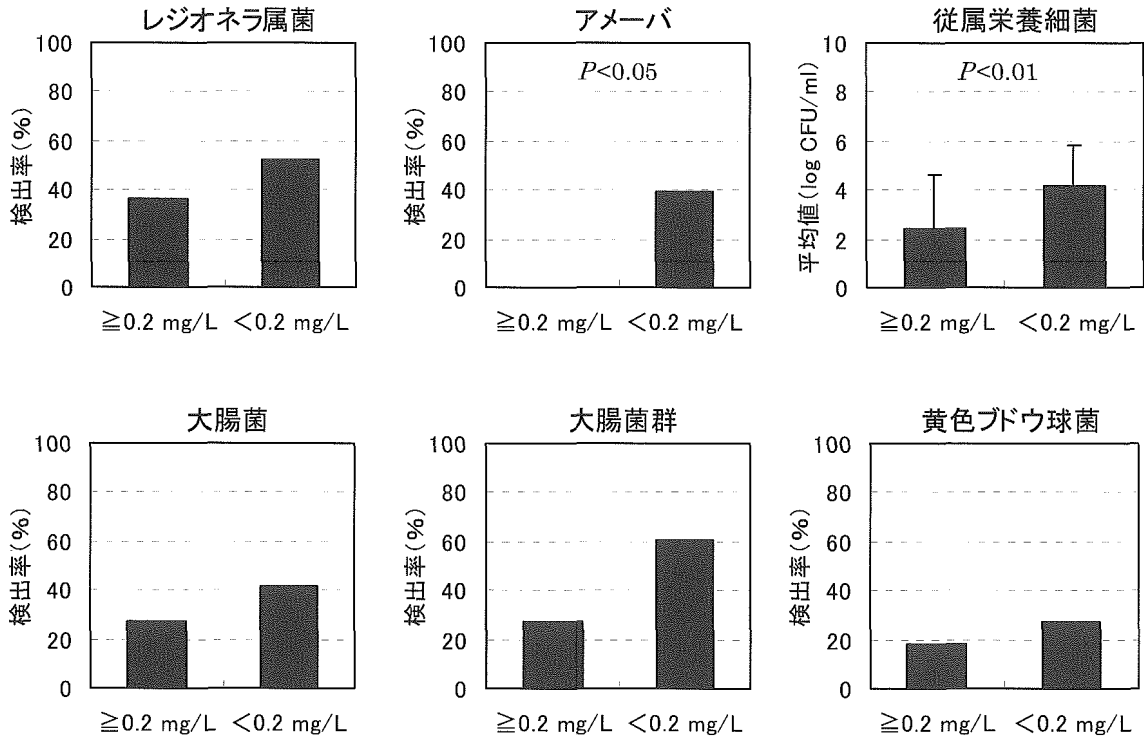


図 10 浴槽水の遊離残留塩素濃度と浴槽水からの病原微生物検出状況

表 17 貯湯槽の有無とレジオネラ属菌汚染

試料種別	貯湯槽の有無	レジオネラ属菌		アメーバ		従属栄養細菌(42°C)	
		試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	≥200 CFU/ml 試料数(%)
浴槽水	貯湯槽あり	93	45 (48.4)	87	30 (34.5)	91	73 (80.2)
	貯湯槽なし	34	17 (50.0)	33	9 (27.3)	33	29 (87.9)
注湯口水	貯湯槽あり	39	10 (25.6)	33	1 (3.0)	27	7 (25.9)
	貯湯槽なし	21	4 (19.0)	18	2 (11.1)	15	3 (20.0)
計		187	76 (40.6)	171	42 (24.6)	166	112 (67.5)

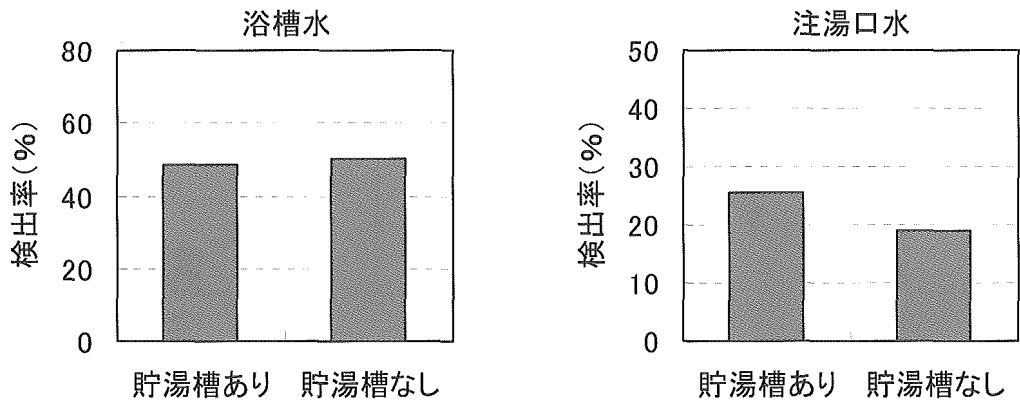


図 11 貯湯槽の有無とレジオネラ属菌検出率

表 18 貯湯槽水及び注湯口水の泉温とレジオネラ属菌汚染

泉温	レジオネラ属菌		アメーバ		従属栄養細菌(42°C)	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	≥200 CFU/ml 試料数(%)
55°C以上	8	0 (0.0)	7	0 (0.0)	7	0 (0.0)
50°C以上55°C未満	18	2 (11.1)	16	0 (0.0)	15	5 (33.3)
45°C以上50°C未満	17	6 (35.3)	17	0 (0.0)	12	4 (33.3)
40°C以上45°C未満	27	7 (25.9)	21	3 (14.3)	21	8 (38.1)
40°C未満	9	1 (11.1)	8	4 (50.0)	8	2 (25.0)
計	79	16 (20.3)	69	7 (10.1)	63	19 (30.2)

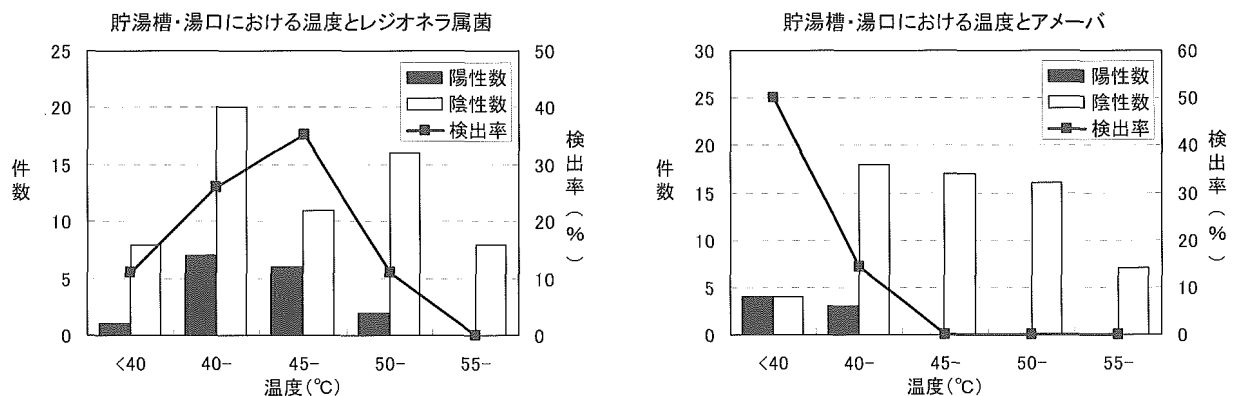


図 12 貯湯槽水及び注湯口水の泉温とレジオネラ属菌及びアメーバ検出率

表 19 貯湯槽水及び注湯口水における消毒剤注入場所別レジオネラ属菌検出率

消毒剤の注入場所	レジオネラ属菌		アメーバ		従属栄養細菌(42℃)	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	≥200 CFU/ml 試料数(%)
源泉、貯湯槽、配管系に注入	14	1 (7.1)	14	0 (0.0)	14	1 (7.1)
消毒なしor浴槽水に添加	69	15 (21.7)	61	7 (11.5)	49	18 (36.7)
計	83	16 (19.3)	75	7 (9.3)	63	19 (30.2)

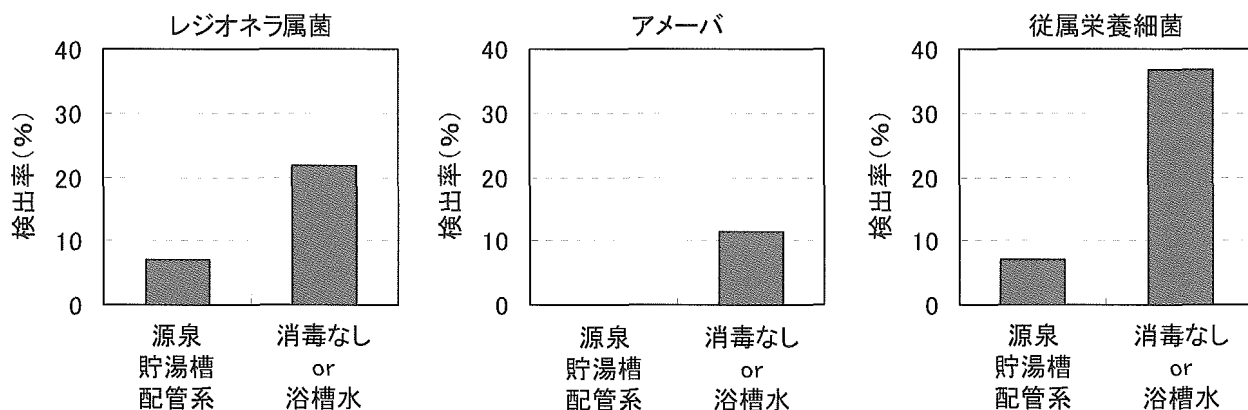


図 13 貯湯槽水及び注湯口水における消毒剤注入場所別レジオネラ属菌等検出率

表 20 貯湯槽水及び注湯口水に対する TOC 濃度の影響 (pH6 未満、泉温 55℃以上を除く)

試料種別	TOC濃度 (mg/L)	レジオネラ属菌		アメーバ		従属栄養細菌(42℃)	
		試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	≥200 CFU/ml 試料数(%)
浴槽水	≥0.5	56	27 (48.2)	53	23 (43.4)	56	42 (75.0)
	<0.5	41	21 (51.2)	40	10 (25.0)	41	36 (87.8)
貯湯槽水、注湯口水	≥0.5	15	6 (40.0)	12	0 (0.0)	15	5 (33.3)
	<0.5	23	2 (8.7)	23	7 (30.4)	22	10 (45.5)
計		135	56 (41.5)	128	40 (31.3)	166	112 (67.5)

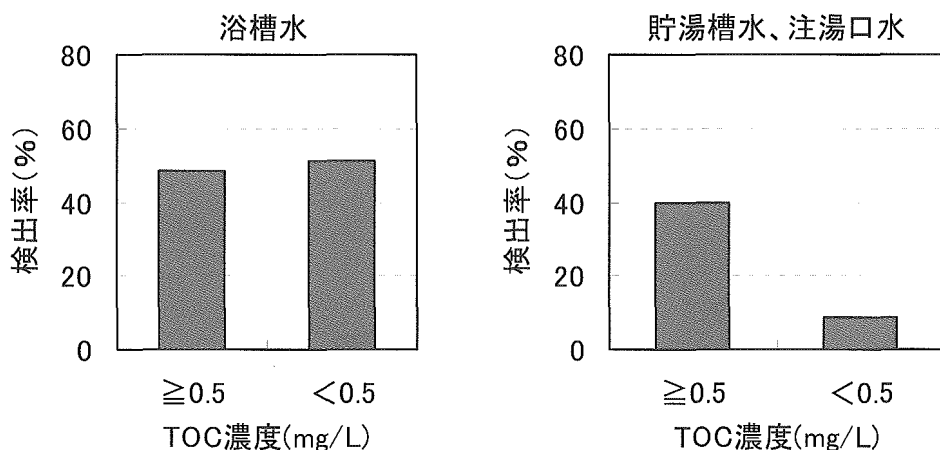


図 14 TOC 濃度別レジオネラ属菌検出率

表 21 浴槽の材質とレジオネラ属菌汚染（浴槽水）

浴槽の材質	試料数	検出試料数(%)
タイル（+木、コンクリート）	54	29 (53.7)
石（+木）	35	18 (51.4)
タイル+石	9	5 (55.6)
木（+コンクリート）	14	5 (35.7)
コンクリート	11	2 (18.2)
計	123	59 (48.0)

表 22 浴槽の洗浄方法とレジオネラ属菌汚染（浴槽水、複数回答）

洗浄方法	試料数	検出試料数(%)
ブラシ	101	47 (46.5)
洗剤	38	19 (50.0)
消毒（毎日）	37	24 (64.9)
消毒（毎週）	6	4 (66.7)
高压水	18	10 (55.6)
熱湯	4	3 (75.0)
計	204	107 (51.5)

表 23 浴槽の洗浄方法とレジオネラ属菌汚染（浴槽水）

洗浄方法	試料数	検出試料数(%)
ブラシなし（高压水、消毒）	13	10 (76.9)
ブラシ+毎日消毒（+高压水、熱湯）	23	17 (73.9)
ブラシ+洗剤（+高压水、熱湯）	32	18 (56.3)
ブラシ主体（+高压水、週1回消毒）	40	11 (27.5)***
ブラシ+洗剤+消毒（+高压水）	6	1 (16.7)
計	114	57 (50.0)

***: $P < 0.001$

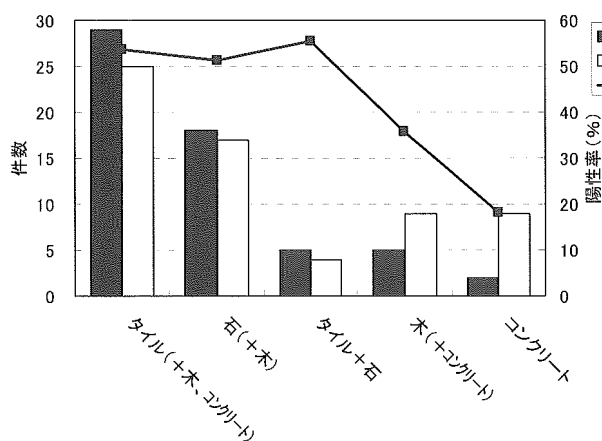


図 15 浴槽の材質とレジオネラ属菌検出率

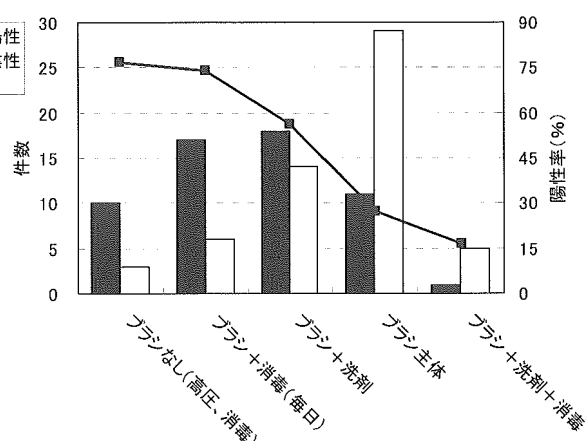


図 16 浴槽の洗浄方法とレジオネラ属菌検出率

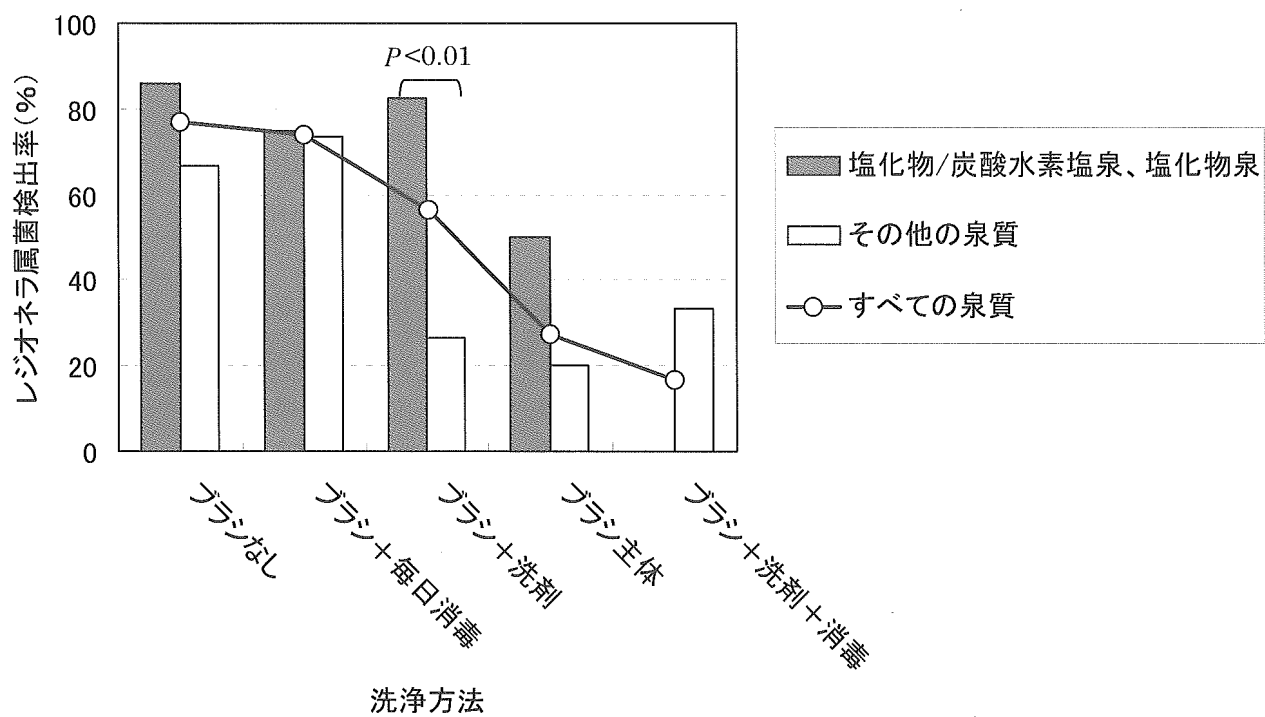


図 17 浴槽の洗浄効果に及ぼす泉質の影響

表 24 浴槽水の採取時刻と病原微生物汚染

採取時刻	レジオネラ属菌		アメーバ		抗酸菌		従属栄養細菌(42℃)	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	平均値±SD (log CFU/ml)
<11:00	33	20 (60.6)	31	9 (29.0)	31	1 (3.2)	31	3.9 ± 1.4
11:00-	37	19 (51.4)	36	8 (22.2)	36	2 (5.6)	36	3.8 ± 1.7
13:00-	16	5 (31.3)	16	5 (31.3)	16	2 (12.5)	16	2.8 ± 2.1
15:00-	19	8 (42.1)	18	10 (55.6)	19	1 (5.3)	19	4.5 ± 1.9
19:00-	21	10 (47.6)	17	6 (35.3)	21	0 (0.0)	21	4.7 ± 1.5
計	126	62 (49.2)	118	38 (32.2)	123	6 (4.9)	123	4.0 ± 1.7

採取時刻	大腸菌		大腸菌群		緑膿菌		黄色ブドウ球菌	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)
<11:00	33	11 (33.3)	33	22 (66.7)	31	6 (19.4)	31	6 (19.4)
11:00-	37	11 (29.7)	35	16 (45.7)	36	11 (30.6)	36	10 (27.8)
13:00-	16	5 (31.3)	16	9 (56.3)	16	3 (18.8)	16	3 (18.8)
15:00-	19	9 (47.4)	19	10 (52.6)	19	11 (57.9)	19	3 (15.8)
19:00-	21	12 (57.1)	21	11 (52.4)	21	9 (42.9)	21	7 (33.3)
計	126	48 (38.1)	124	68 (54.8)	123	40 (32.5)	123	29 (23.6)

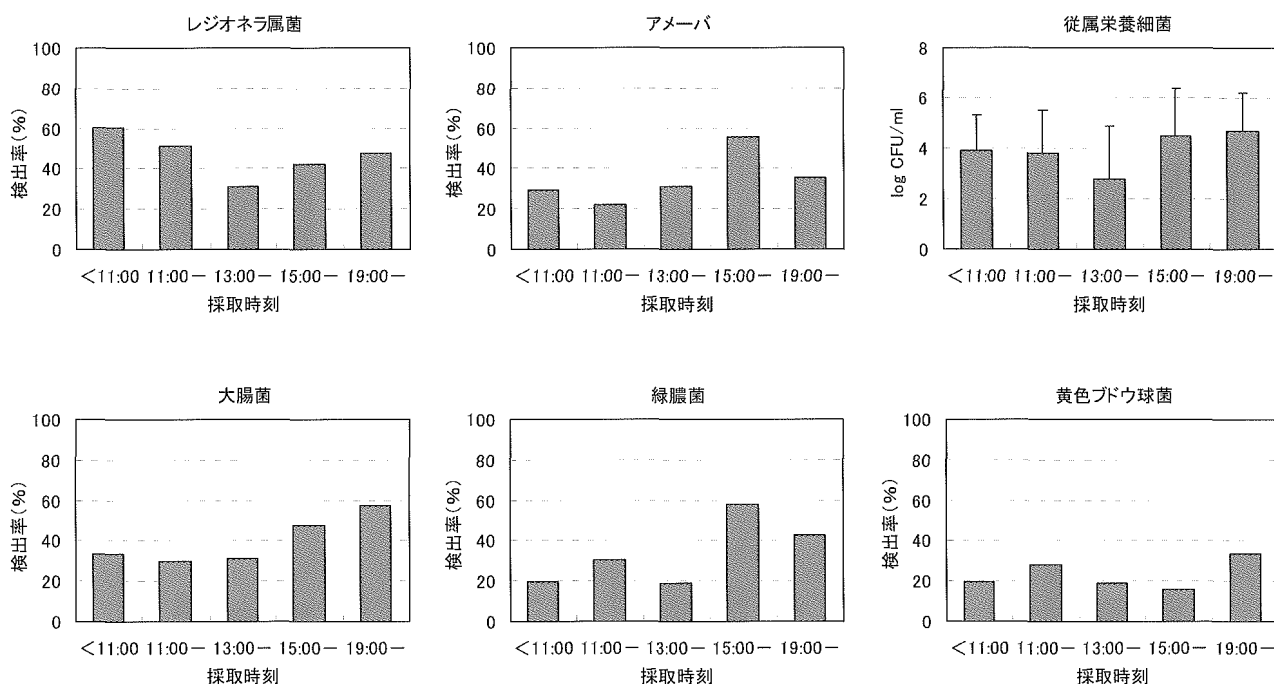


図 18 浴槽水の採取時刻と病原微生物汚染

表 25 入浴者数と病原微生物汚染（浴槽水）

入浴者数 (人)	レジオネラ属菌		アメーバ		抗酸菌		従属栄養細菌(42℃)	
	試料数	検出数 (%)	試料数	検出数 (%)	試料数	検出数 (%)	試料数	平均値±SD (log CFU/ml)
0	14	9 (64.3)	14	5 (35.7)	14	3 (21.4)	14	3.3 ± 1.1
0-9	25	14 (56.0)	25	7 (28.0)	25	0 (0.0)	25	3.5 ± 1.4
10-25	23	12 (52.2)	23	7 (30.4)	23	1 (4.3)	23	5.0 ± 1.1
26-50	20	8 (40.0)	19	7 (36.8)	20	0 (0.0)	20	4.5 ± 1.6
51-100	15	7 (46.7)	14	3 (21.4)	15	1 (6.7)	15	4.0 ± 2.0
101-	14	6 (42.9)	13	7 (53.8)	14	0 (0.0)	14	4.8 ± 1.7
計	111	56 (50.5)	108	36 (33.3)	111	5 (4.5)	111	4.2 ± 1.6

入浴者数 (人)	大腸菌		大腸菌群		緑膿菌		黄色ブドウ球菌	
	試料数	検出数 (%)	試料数	検出数 (%)	試料数	検出数 (%)	試料数	検出数 (%)
0	14	0 (0.0)	14	2 (14.3)	14	3 (21.4)	14	4 (28.6)
0-9	25	7 (28.0)	25	15 (60.0)	25	7 (28.0)	25	5 (20.0)
10-25	23	5 (21.7)	23	11 (47.8)	23	8 (34.8)	23	4 (17.4)
26-50	20	12 (60.0)	19	12 (63.2)	20	9 (45.0)	20	5 (25.0)
51-100	15	8 (53.3)	14	9 (64.3)	15	9 (60.0)	15	6 (40.0)
101-	14	8 (57.1)	14	9 (64.3)	14	5 (35.7)	14	6 (42.9)
計	111	40 (36.0)	109	58 (53.2)	111	41 (36.9)	111	30 (27.0)

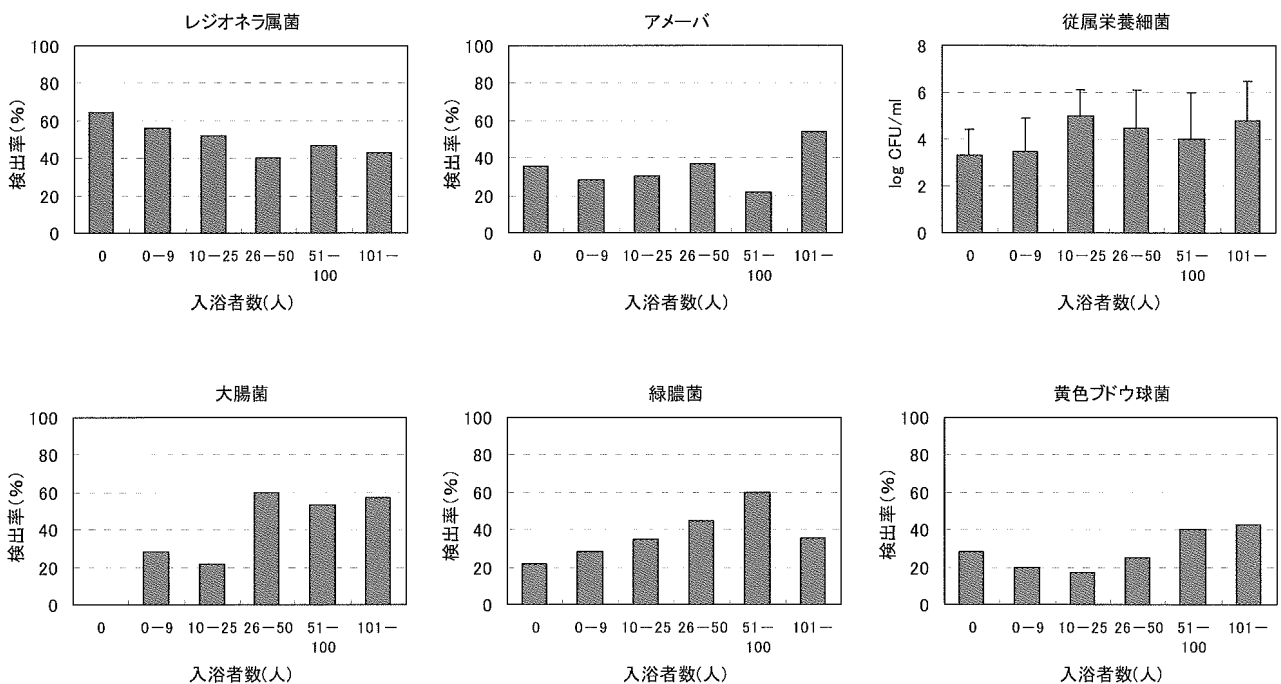


図 19 入浴者数と病原微生物汚染（浴槽水）

表 26 浴槽水の換水率と病原微生物汚染

換水率 (回/時間)	レジオネラ属菌		アメーバ		抗酸菌		従属栄養細菌(42°C)	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	平均値±SD (log CFU/ml)
<0.1	27	19 (70.4) *	27	11 (40.7)	27	3 (11.1)	27	4.5 ± 1.4
0.1-	23	12 (52.2)	23	8 (34.8)	23	0 (0.0)	23	3.4 ± 1.7
0.3-	14	6 (42.9)	14	6 (42.9)	14	1 (7.1)	14	4.8 ± 1.5
0.6-	4	2 (50.0)	4	2 (50.0)	4	0 (0.0)	4	4.7 ± 0.9
0.9≤	6	0 (0.0) *	6	1 (16.7)	6	0 (0.0)	6	5.1 ± 1.4
計	74	39 (52.7)	74	28 (37.8)	74	4 (5.4)	74	4.2 ± 1.7

換水率 (回/時間)	大腸菌		大腸菌群		緑膿菌		黄色ブドウ球菌	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)
<0.1	27	5 (18.5)	27	12 (44.4)	27	11 (40.7)	27	5 (18.5)
0.1-	23	11 (47.8)	23	11 (47.8)	23	9 (39.1)	23	4 (17.4)
0.3-	14	9 (64.3)	14	12 (85.7)	14	7 (50.0)	14	6 (42.9)
0.6-	4	3 (75.0)	4	4 (100)	4	1 (25.0)	4	2 (50.0)
0.9≤	6	4 (66.7)	6	4 (66.7)	6	4 (66.7)	6	2 (33.3)
計	74	32 (43.2)	74	43 (58.1)	74	32 (43.2)	74	19 (25.7)

*: $P < 0.05$ (χ^2 検定、期待値が5未満はYatesの補正值)

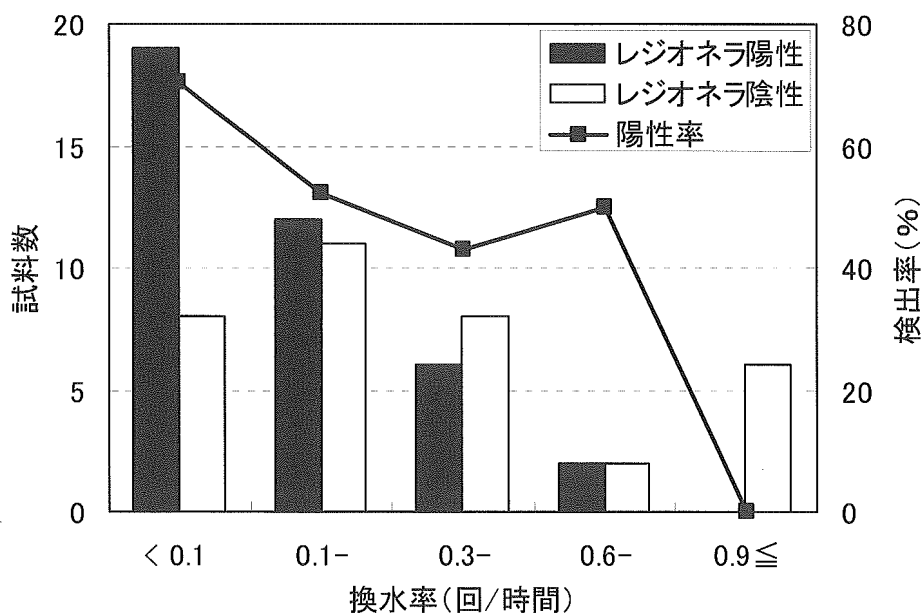


図 20 浴槽水の換水率とレジオネラ属菌検出率

表 27 浴槽水の完全換水日数と病原微生物汚染

完全換水日数	レジオネラ属菌		アメーバ		抗酸菌		従属栄養細菌(42°C)	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	平均値±SD (log CFU/ml)
1日	101	50 (49.5)	100	31 (31.0)	101	4 (4.0)	101	4.1 ± 1.8
2日	8	3 (37.5)	8	4 (50.0)	8	0 (0.0)	8	3.5 ± 1.6
3-7日	9	4 (44.4)	9	4 (44.4)	9	2 (22.2)	9	4.4 ± 0.9
30日	2	0 (0.0)	2	0 (0.0)	2	0 (0.0)	2	4.5 ± 0.1
計	120	57 (47.5)	119	39 (32.8)	120	6 (5.0)	120	4.1 ± 1.7

完全換水日数	大腸菌		大腸菌群		緑膿菌		黄色ブドウ球菌	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)
1日	101	42 (41.6)	101	57 (56.4)	101	40 (39.6)	101	29 (28.7)
2日	8	2 (25.0)	8	3 (37.5)	8	1 (12.5)	8	2 (25.0)
3-7日	9	2 (22.2)	9	5 (55.6)	9	3 (33.3)	9	1 (11.1)
30日	2	0 (0.0)	0	0	2	0 (0.0)	2	0 (0.0)
計	120	46 (38.3)	118	65 (55.1)	120	44 (36.7)	120	32 (26.7)

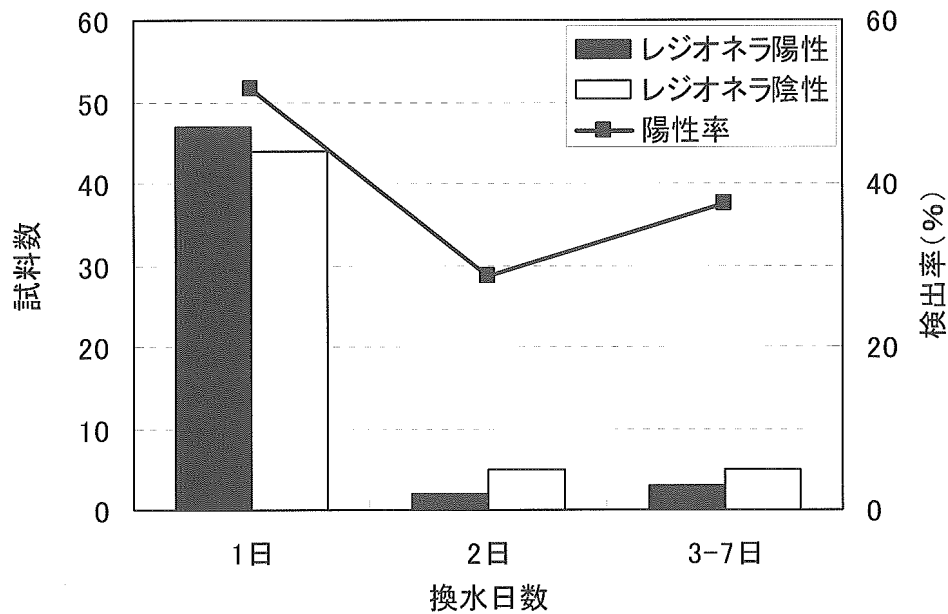


図 21 浴槽水の完全換水日数とレジオネラ属菌検出率 (pH 6 以上、n=106)

掛け流し式温泉実態調査 細菌検査マニュアル

1. 検体採取

- 最も汚染された状態を把握するため、入浴者のピーク時あるいは換水清掃前のサンプリングが望ましいが、この条件を踏まえて営業時間内に可能な範囲で採水する。
- 浴槽水は中央部で無菌的に採取する。検水は滅菌した適当な材質のビンに 500 ml 2本採取する。浴槽水が塩素で消毒されている場合は塩素中和用の 25%チオ硫酸ナトリウムを 1/500 に加えておく（チオ硫酸ナトリウムを添加した状態でオートクレーブしたビンを準備しておいてよい）。
- 採水に際して調査集計表に必要事項を記録する。
- 2本のうち1本はアメーバ分離用とし、もう1本は微生物学的検査用とする。
- 検体は採取後速やかに、微生物学的検査用はクーラーボックスに入れて、アメーバ分離用は室温で搬入し、検査は出来るだけ早く(2時間以内に、遅くとも48時間以内に)始める。残余の検水は4℃で保存しておく。
- 採取された検体の菌数を予測出来ないので、濃縮検体と非濃縮検体を並行して検査する。掛け流し式温泉の場合は菌数が少ないことが予想されるので、濃縮検体のみの検査を実施する。検査の結果、菌数が多ければ非濃縮検体の検査をやり直す。
- 濃縮検体（「レジオネラ属菌検査法」の2 ml）は、おおよそ3等分して、未処理、熱処理、アルカリ処理し、それぞれ一般細菌及びレジオネラ属菌、レジオネラ属菌、抗酸菌の検出用とする。
- 非処理濃縮検体の浮遊液の1白金耳（約20 μl）で塗抹標本を作る。→Z-N染色（抗酸菌用）
- 非濃縮検体は選択培地に未処理のもの100 μl、加熱処理したものを100 μl塗布する。その際、適宜10倍希釈で2~3段階希釈し、それぞれ100 μl塗布しておくこと菌数の算定がし易い。雑菌汚染がひどいと考えられる検体では熱処理後さらに低pH処理する。

2. レジオネラ属菌検査法

- (1) 滅菌した蓋付きの遠心管(注1)に検水200 mlを入れ、バランスを取った後6,000 G、10分(たとえば20℃で)遠心する。上清を捨てて滅菌蒸留水を2 ml加え、管内壁をよく洗い、沈渣を懸濁する。(この遠心法は、ISO11731で規定され、WHOのレジオネラ分離法にも採用されている。ちなみに300-500 mlの容器を使用して遠心するとされている)(注2、3)。濃縮液は未処理、熱処理、アルカリ処理用に3等分する。レジオネラ検査には未処理液と熱処理液を使用する。
- (2) レジオネラ検出用の検体処理は、熱処理法として沈渣懸濁液約1 ml(注4)を50℃で20分間加熱する。雑菌汚染がひどいと考えられる検体では熱処理後さらに酸処理する(注5)。

- (3) 未処理液および処理液 0.1 ml と適宜 10 倍希釈で 2~3 段階希釈した試料 100 μ l を GVPC 寒天平板（ビオメリュー）（注 6）に接種し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 10 日まで培養し、2~3 日ごとに観察する。
- (4) レジオネラ様のコロニーを血液寒天プレート（注 7）と BCYE α プレートで確認培養する。
- (5) 長波紫外線による自家蛍光を観察する。自家蛍光が無ければデンカ生研のレジオネラ免疫血清 7 種（*L. p* 1-6、*L. micdadei*）でスライド凝集反応を観察する。自家蛍光があればデンカ生研のレジオネラ免疫血清 3 種（*L. bozemanii*、*L. gormanii*、*L. dumoffii*）でスライド凝集反応を観察する。
- (6) スライド凝集反応陰性の場合、PCR により mip、5S rRNA を増幅して *L. p* かその他のレジオネラ属菌かを確認する。OXOID のラテックス凝集反応（*L. p* 2-14、他のレジオネラ属菌種 7 種）を用いる。
- (7) mip 陰性菌について、極東 DDH で種を同定する。mip 陽性菌について、デンカ生研のレジオネラ免疫血清 9 種（*L. p* 7-15）でスライド凝集反応を観察する。
- (8) 上記 7 の陰性菌について、16S rRNA の配列決定による同定を行う。この際、Accession No. Z49730 及び AJ919271 は *L. londiniensis* が *L. nautarum* として登録されたまま、訂正されていないので注意を要する（2006.3 現在）。

注 1：スクリーキャップのポリプロピレン性の白いボトルのものがオートクレーブ可能で、使いやすい。

注 2：ISO11731（Water quality - Detection and enumeration of Legionella）では、3,000 g for 30 min も認められているので、遠心の条件は遠沈管 50ml を使用し、3,000G 以上、30 分でも構わない。遠心の条件をデータに付記すること。

注 3：フィルターろ過法を使用する場合はデータに明記し、濃縮の手技は病原体検出マニュアル（感染研と地研全国協議会編）の中のレジオネラ症検査マニュアルによること。そこには以下のように記されている。【検水 500 ml を直径 47 mm、孔径 0.45 μ m のポリカーボネートメンブランフィルターで吸引ろ過する。混合エステルフィルターは膜に菌が入り込んで回収率が減るので使用しない。フィルターを剥がし 5 ml の滅菌蒸留水にひたし、フィルターがちぎれる程度に強く手で振盪（vortex mixer で 1 分間は回収率が低い）洗浄した液（100 倍濃縮）を遠心法と同じように熱処理を行う。】

注 4：沈査懸濁液は必要な量となるように適宜 3 つに分ける。

注 5：熱処理が簡単なので採用した。毎回熱処理後に酸処理することを要求しているわけではない。

注 6：ビオメリューの平板は培地量が多く、塗抹液の吸収が良いので使いやすいとのこと、会社名をあげている。他社の製品でも構わない。

注 7：基礎培地は普通寒天培地でも TSA 培地でも構わない。

3. 抗酸菌検査法

- (1) 3等分した濃縮液の抗酸菌用試料に、等量の4%NaOHを加えてボルテックスで軽く攪拌後、室温で20分間処理する。その間、時々手で震盪・攪拌する。このアルカリ処理試料0.1mlずつを2~3本の2%小川培地（極東）に接種し、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で培養し、コロニー数を毎週観察する。コロニー陰性の場合には8週間まで培養する。
- (2) 分離菌の純化のために、滅菌精製水で分離菌の微濁浮遊液（注1）を10倍希釈系列で希釈し、それぞれの0.1mlずつをMiddlebrook 7H10寒天培地に接種し、5%CO₂孵卵器内で $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で2~3週間培養後（注2）、単コロニーを釣菌し、Middlebrook 7H9ブロス（4ml）（注3）で増菌（注4）し、Z-N染色にて抗酸菌であること確認後、4°Cで保存する。純化された菌株は国立感染症研究所細菌第一部山崎先生に送付し、同定を依頼する（注5、6）。
- (3) 上記純化菌を接種した1%小川培地あるいはMiddlebrook 7h9 broth培養菌を供試菌として、培養・生化学的性状・DDH・塩基配列決定などの方法により同定試験を行う。

注1：McFarland No.0.5濁度程度。濁度計で調整する場合は、O.D. 0.1（530nm）。S型コロニーの場合は懸濁液を作りやすいが、R型コロニーの場合は、試験管壁でピペットの腹で菌を細かくしてから、精製水を加えて作る。最も簡単なのは、Middlebrook 7h9 brothにサスペンドして2~7日間O.D. 0.1以上になるまで培養し、O.D. 0.1に調製する。（ 10^7 CFU/ml程度の生菌数になる。）

注2：1%小川培地でも良いが、試験管で単コロニーを釣菌しづらいので、Middlebrook 7H10寒天培地を勧める。Middlebrook 7H10寒天培地は、通常シャーレにて作る。また、培養は5%CO₂存在化で孵卵器内で湿った状態で培養するので乾かない。もし、5%CO₂孵卵器がない場合には、ビニール袋で密封して通常の孵卵器でも増殖する。増殖速度や程度は比較的悪い。しかし、純化の目的にはこの方法でも大丈夫である。

注3：Middlebrook 7H9ブロス（4ml）は、液体培地であるのでスクリーキャップ付の試験管で培養する。

注4：O.D.が0.1~0.3（530nm）になるまで、迅速発育菌ならば2日程度、遅発育菌ならば7~14日程度かかる。増菌後なるべく早めに送る必要があるが、4°Cなら2週間以内に送付する。

注5：純化された菌であればブロスでも1%小川培地培養菌でもどちらでもよい。

注6：どうしても、純化作業ができない施設では、分離培養陽性で、抗酸菌であることが確認された菌の入った試験管を、病原体輸送規定にしたがって梱包し、できるだけ速やかに感染研へ郵パックで送付する。

小川培地について：分離培養には、2%小川培地であればどのメーカーでも自家製でも構わない。増菌用には1%小川培地を用いること。

Middlebrookについて：Middlebrook 7H9 broth、Middlebrook 7H10 agarは、どのメーカーでも構わない。

その他注意事項

今回の検査用水中には、結核菌はおそらく存在しないと思われる。しかし、レベル2の菌が分離される可能性が高いので、取り扱いには注意すること。また、感染研へ分離菌を送る場合には、菌を受け入れるためにバイオセーフティー委員会の承認手続きが必要になるので、事前に検体数と輸送手段、輸送計画予定日を必ず連絡すること。輸送手段は、公共交通手段（電車、地下鉄、バス、タクシー等）にて持参することは禁じられている。病原体輸送規定にしたがって梱包し、郵パックで送付する、自家用車で持参すること。

3. 大腸菌、大腸菌群検査法

- (1) 試料 10 ml、1 ml および 0.1 ml をコリラート培地（10 ml）各 3 本ずつに接種する。
試料 10 ml はコリラート培地の容器にそのまま接種する。試料 1 ml および 0.1 ml は滅菌精製水 10 ml を加えたコリラート培地に接種する。
(他社製品を用いても問題ない。データに使用した製品を付記すること。)
- (2) 35±1℃で 24±2 時間培養し、黄変したものを大腸菌群陽性、紫外線（365nm）下で蛍光のある場合を大腸菌陽性とする。
- (3) MPN により菌数を求める。

4. 緑膿菌検査法

食品衛生法の緑膿菌検査法に準じる。

- (1) 試料 10 ml、1 ml および 0.1 ml をアスパラギンブイオン培地各 3 本ずつに接種する。
試料 10 ml は倍濃度の培地 10 ml に接種する。

アスパラギンブイオン培地（自家調整）

DL-アスパラギン	3.0 g
リン酸 1 水素カリウム（無水）	1.0 g
硫酸マグネシウム（7 水塩）	0.50 g
精製水	1,000 ml
	pH 6.9~7.2

10 ml ずつ分注し、121℃、15 分滅菌する。

（上水試験法ではろ過滅菌となっているが、厚生労働省の食品、添加物等の規格基準に示されている微生物に係る試験法一覧に示された試験法では高圧滅菌となっているので、高圧滅菌に統一する。）

2 倍量アスパラギンブイオン培地

DL-アスパラギン	6.0 g
リン酸 1 水素カリウム（無水）	2.0 g
硫酸マグネシウム（7 水塩）	1.0 g
精製水	1,000 ml
	pH 6.9~7.2

10 ml ずつ分注し、121℃、15 分滅菌する。

- (2) $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養し、混濁があり、かつ長波長紫外線 (365 nm) 下で蛍光のある場合を推定試験陽性とする。混濁または蛍光が認められないときは 48 ± 3 時間まで観察する。
- (3) 推定試験陽性の培養液の 1 白金耳を NAC 培地 (ポアメディア) に画線塗抹し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で 48 ± 3 時間培養する。
- (4) 培養後、類緑色 (黄緑色から青色) または赤褐色の集落を普通寒天培地に接種し、 $41.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養し、オキシダーゼ試験を行う。オキシダーゼ陽性でグラム陰性無芽胞桿菌であれば確定試験陽性とする。
- (5) 確定試験陽性のチューブから MPN 法 (3 本法) により菌数を求める。

5. 黄色ブドウ球菌検査法

- (1) 試料 10 ml、1 ml および 0.1 ml を食塩加 (7.5%) トリプトソイブイオン各 3 本ずつに接種する。試料 10 ml は倍濃度の培地 10 ml に接種する。 35°C 、24~48 時間培養する。
- (2) 培養後、1 白金耳を卵黄加マンニット食塩寒天培地 (栄研器材) に接種し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 48 ± 3 時間培養する。
- (3) 卵黄反応陽性、グラム陽性、カタラーゼ陽性、コアグララーゼ陽性菌を黄色ブドウ球菌とし、MPN 法により菌数を求める。

6. 一般細菌数および従属栄養細菌数

必要に応じて未処理濃縮液と 10 倍希釈液を使用して菌数を計数する。必要がなければ試料の原液と 10 倍段階希釈液で菌数を測定する。

一般細菌数は標準寒天培地 (塗抹法) を用いて $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 48 時間培養する。

従属栄養細菌数は R2A 寒天培地 (塗抹法) を用いて 25°C および 42°C で 7 日間培養する。

【A】

1. 調査対象および検体採取

県内の温泉25施設を対象に浴槽水26件を採取し調査を実施した。また、一部の施設については注湯口や浴槽付近のぬめり、循環配管のぬめりを拭き取り試料とした。

2. 方法

拭き取り試料は、拭き取りに用いた滅菌ガーゼ等に滅菌蒸留水を加え、攪拌後にガーゼを取り除き滅菌蒸留水で20mLにメスアップしたものを試料として、浴槽水と同様に処理した。

3. 結果および考察

(ア) 今回の掛け流し式温泉の調査で、レジオネラ属菌は25施設26件中7件(27%)から検出された。7件のうち6件は掛け流し式温泉であったが、1件は温度を一定に保つための循環設備を備えていた。

掛け流し式温泉からはレジオネラ属菌は検出されないかのように、一般的に思われている。以前の調査で循環式浴槽から58件中24件(41%)検出され、循環式浴槽より低い検出率ではあるが掛け流し式温泉においても衛生管理を徹底していく必要があると考える。

レジオネラ属菌以外には、宿主アメーバは26件中9件(35%)、抗酸菌は26件中2件(8%)であった。従属栄養細菌については25℃培養と比較すると42℃培養では同程度または10倍多い菌数が検出された。

今回の調査ではレジオネラ属菌の検出と宿主アメーバ・大腸菌群などの検出状況に関連はみられなかった。

(イ) 施設の違いによるレジオネラ属菌の検出状況をみると、貯湯タンクの有無にかかわらず検出され、タイル、コンクリート、石、檜のどの材質からも検出された。しかし、檜を使用している浴槽は、清掃直後であっても残留塩素が低濃度の場合、すべての浴槽から *Hartmanella*、*N.lonaniensis*

などの宿主アメーバが検出された。

今回、檜で残留塩素濃度が2.0mg/L以上あった浴槽について、翌朝、再度採水を行った。残留塩素濃度が0.1mg/L未満に下がったもののアメーバが100pfu/100mL、レジオネラ属菌は10cfu/100mL検出され、この他、一般細菌数、従属栄養細菌、大腸菌群も検出された。一時的な塩素剤の投入では、これらの細菌を抑制することは困難であることが改めて確認された。

また、循環設備を備えていた1施設の汚染原因を追究したところ、循環している配管から多数のレジオネラ属菌が検出されたことから、これらの設備を有している浴槽は定期的な配管の清掃・消毒が必要になると考える。

【B】

目的

掛け流し式温泉に対する有効な衛生管理手法構築に資するため、県内の掛け流し式温泉の実態を把握することを目的として、レジオネラ属菌、アメーバ、一般細菌数、従属栄養細菌、大腸菌、抗酸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌検査等を実施した。

方法

対象施設：県内の掛け流し式温泉 11 施設

供試検体：9 施設からは浴槽水と注湯口水（施設によっては貯湯槽水あるいは源泉）をそれぞれ 1 検体ずつ、2 施設からは露天風呂の浴槽水 2 検体ずつ採取し、計 22 検体を供試した。検体採取時残留塩素が認められた検体にはチオ硫酸ナトリウムを加え中和後搬送した。

検体採取期間：平成 17 年 6 月～7 月

検体採取機関：検体採取、施設の調査は管轄保健所に依頼した。

検査項目：微生物学的検査（レジオネラ属菌、アメーバ、一般細菌数、従属栄養細菌（42、25℃）、大腸菌、大腸菌群、抗酸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌）、現地調査（湯温、pH、残留塩素）

結果・考察

1. レジオネラ属菌の検出結果

11 施設中 7 施設（63.6%）、22 検体中 9 検体（40.9%）からレジオネラ属菌が検出された。浴槽水は 13 検体中 6 検体（46.2%）、注湯口水は 6 検体中 3 検体（50.0%）、貯湯槽水 1 検体、源泉 2 検体からは不検出であった。分離頻度は *L. pneumophila* が 66.7%で、33.3%が *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌であった。注湯口にはそれぞれの温泉施設で趣向を凝らしており、形状が複雑な場合も多く、洗浄に不備がでる可能性が考えられた。

2. 残留塩素濃度との関連について

検体採取時に残留塩素が検出された 5 施設中レジオネラ属菌陽性は 3 施設、残留塩素未検出

6 施設中陽性は 4 施設と同等の検出状況であった。分離レジオネラ属菌数については、残留塩素が検出された施設の陽性検体の方がやや少ない傾向がみられたが、浴槽水の汚染防止・増殖抑制を塩素のみに依存することはできないと考えられた。

3. pH との関連について

1 施設の検体が pH3 と酸性が強く、42℃の従属栄養細菌以外の微生物はレジオネラ属菌を含めほとんど未検出であった。他の 10 施設の検体は pH7.2～8.9 であり、陽性検体で最も高かった pH は 8.1 であった。

4. その他の微生物学的検査との関連について

1) アメーバは浴槽水 6 検体から検出され、その内 4 検体はレジオネラ属菌陽性であった。

2) 抗酸菌は今回の調査では検出されなかった。

3) 大腸菌群は浴槽水 6 検体で陽性、その内 5 検体は大腸菌も陽性であり、黄色ブドウ球菌は 1 検体、緑膿菌は 3 検体で陽性であった。これらの陽性検体はアメーバ陽性検体と一致し、従属栄養細菌や一般細菌数も多い傾向が認められた。

大腸菌等は入浴者からの汚染も考えられ、入浴マナーの啓蒙を含めハード、ソフト両面の細心の衛生管理が必要と考えられる。

【C-1】

【方法】 調査対象温泉施設は、循環系配管を持たない毎日完全換水をしている県内9施設（A～I）とした。調査は平成17年9月に行った。検査は浴槽に入る湯口水及び浴槽水を対象とし、営業終了時に採水した。検査項目はレジオネラ属菌数、アメーバ数、一般細菌数、従属栄養細菌数、大腸菌群数、大腸菌数、緑膿菌数、黄色ブドウ球菌数及び抗酸菌とした。レジオネラ属菌が検出された施設については随時再調査（検査項目はレジオネラ属菌数、一般細菌数及び従属栄養細菌数）を行った。

【結果】 各施設の検査結果を表1に、再調査の検査結果を表2に示した。レジオネラ属菌は、湯口では施設Eからのみ検出された。浴槽からは、施設D、E、F、G、H及びIの6施設で検出され、検出数は 10^1 台が3施設、 10^2 台が2施設、 10^3 台が1施設であった。アメーバの検出はレジオネラ属菌の検出と関連性がみられた。一般的な汚染の指標となる一般細菌、従属栄養細菌数は施設Eを除く施設の湯口で 10^2 /ml以下であったが、施設Eの従属栄養細菌数は 10^4 /mlであった。浴槽では湯口の菌数に比べかなり多く、一般細菌数は 10^4 /ml～ 10^5 /ml、従属栄養細菌数は 10^3 /ml～ 10^6 /mlであり、施設により菌数の幅が大きかった。

大腸菌、緑膿菌及び黄色ブドウ球菌は全ての施設とも湯口からは検出されなかった。浴槽では、大腸菌が6施設で、緑膿菌、黄色ブドウ球菌は7施設で検出された。抗酸菌は全ての施設で湯口及び浴槽から検出されなかった。

浴槽の菌数と採水日の入浴者数及び換水率（湯口から供給される湯量/浴槽の大きさ）との有意な相関は、検査したいずれの微生物種とも認められなかった。

レジオネラ属菌が検出された6施設についての再調査の結果は、浴槽の清掃の徹底等により、4施設でレジオネラ属菌の不検出又は大幅な減少が認められた。

【考察】 レジオネラ属菌等の微生物は湯水

の貯留に伴って発生するが、掛け流し式温泉においては貯留箇所が貯湯槽、浴槽などに限定される。今回の成績では、施設Eを除き、湯口からレジオネラ属菌は検出されずアメーバも検出されなかった。このことは、貯湯槽の衛生管理が比較的良好に保たれていることを示しているものと考えられる。一方、6施設の浴槽からレジオネラ属菌が検出されたことは、浴槽内壁にバイオフィームが形成され、日常の清掃では除去されずに残っているためと思われる。内壁の破損や、不必要な構造物などのため、浴槽水を流しきっても死に水として残ってしまうことや、角や溝の清掃が十分に行われていないこと等が考えられる。これらの場所にバイオフィームが形成されていないか等留意する必要がある。また、清掃時に消毒剤を使用することも必要と考えられる。衛生指導を行い、再調査を行った結果6施設中4施設ではレジオネラ属菌の不検出又は大幅な減少が認められ、改善の方向性が明らかとなった。しかし、残りの2施設では、菌数は少ないものの検出が続いており、清掃の死角となっている部分があるものと思われる。

施設Eは、湯口からレジオネラ属菌、大腸菌群が検出され、従属栄養細菌数も多かった。貯湯槽や配管系も含めた管理の見直しが必要と思われた。この施設は貯湯槽に湯気抜きのような窓を有しており、外界から塵埃などが容易に入り込む形態であった。この窓を閉鎖すること及び貯湯槽の清掃消毒を行った結果、レジオネラ属菌は検出されなくなった。

大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌は入浴者が持ち込むものと考えられ、湯口からは検出されなかったが多くの浴槽から検出された。これらは、入浴者数に相関して増加すると想定されるが、今回の結果からは有意な相関を認めなかった。浴槽の大きさ、換水率等にも影響されるものと思われる。