

表 4 泉質別 病原微生物等検出状況 (全試料)

泉質	レジオネラ属菌 <sup>1)</sup>		アメーバ <sup>2)</sup>		抗酸菌		従属栄養細菌(42°C) <sup>3)</sup>		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)
酸性泉	92	3 (3.3) <sup>a</sup>	90	0 (0.0) <sup>a</sup>	92	0 (0.0)	92	0.9 ± 1.3 <sup>a</sup>	78	0.67 ± 0.61
アルカリ性単純温泉	60	33 (55.0) <sup>b,c</sup>	51	11 (21.6) <sup>b</sup>	42	5 (11.9)	58	3.1 ± 1.4 <sup>b</sup>	52	0.82 ± 1.03
塩化物/炭酸水素塩泉	41	18 (43.9) <sup>b</sup>	35	10 (28.6) <sup>b</sup>	35	1 (2.9)	35	3.4 ± 1.9 <sup>b</sup>	27	1.52 ± 1.95
塩化物泉	76	33 (43.4) <sup>b</sup>	70	12 (17.1) <sup>b</sup>	70	2 (2.9)	66	2.7 ± 2.0 <sup>b</sup>	54	0.75 ± 1.04
硫酸塩泉	43	14 (32.6) <sup>b</sup>	43	7 (16.3) <sup>b</sup>	43	0 (0.0)	42	3.4 ± 1.7 <sup>b</sup>	40	0.59 ± 0.54
単純温泉	60	18 (30.0) <sup>b</sup>	59	14 (23.7) <sup>b</sup>	60	1 (1.7)	56	3.4 ± 2.1 <sup>b</sup>	51	0.96 ± 1.81
硫黄泉	51	10 (19.6) <sup>b,d</sup>	51	9 (17.6) <sup>b</sup>	51	1 (2.0)	51	3.0 ± 2.0 <sup>b</sup>	39	1.00 ± 1.18
その他・不明	10	3 (30.0)	8	7 (87.5)	8	0 (0.0)	8	3.4 ± 2.0	8	0.96 ± 0.95
計	433	132 (30.5)	407	70 (17.2)	401	10 (2.5)	408	2.6 ± 2.0	349	0.83 ± 1.18

泉質	大腸菌 <sup>2)</sup>		大腸菌群 <sup>2)</sup>		緑膿菌 <sup>2)</sup>		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(%)
酸性泉	91	0 (0.0) <sup>a</sup>	91	0 (0.0) <sup>a</sup>	91	0 (0.0) <sup>a</sup>	91	7 (7.7)
アルカリ性単純温泉	56	15 (26.8) <sup>b</sup>	56	18 (32.1) <sup>b</sup>	56	7 (12.5) <sup>b</sup>	56	9 (16.1)
塩化物/炭酸水素塩泉	39	17 (43.6) <sup>b</sup>	39	21 (53.8) <sup>b</sup>	33	12 (36.4) <sup>b</sup>	33	9 (27.3)
塩化物泉	61	12 (19.7) <sup>b</sup>	61	16 (26.2) <sup>b</sup>	61	18 (29.5) <sup>b</sup>	61	8 (13.1)
硫酸塩泉	42	10 (23.8) <sup>b</sup>	42	15 (35.7) <sup>b</sup>	42	11 (26.2) <sup>b</sup>	42	10 (23.8)
単純温泉	54	15 (27.8) <sup>b</sup>	54	16 (29.6) <sup>b</sup>	53	10 (18.9) <sup>b</sup>	53	12 (22.6)
硫黄泉	45	14 (31.1) <sup>b</sup>	43	17 (39.5) <sup>b</sup>	45	6 (13.3) <sup>b</sup>	45	7 (15.6)
その他・不明	8	5 (62.5)	8	7 (87.5)	8	3 (37.5)	8	1 (12.5)
計	396	88 (22.2)	394	110 (27.9)	389	67 (17.2)	389	63 (16.2)

1) aとb, cとdとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P < 0.05$ )

2) aとbとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P < 0.05$ )

3) aとbとの間に平均値の有意な差が認められる。(Steel-Dwassの多重比較、 $P < 0.05$ )

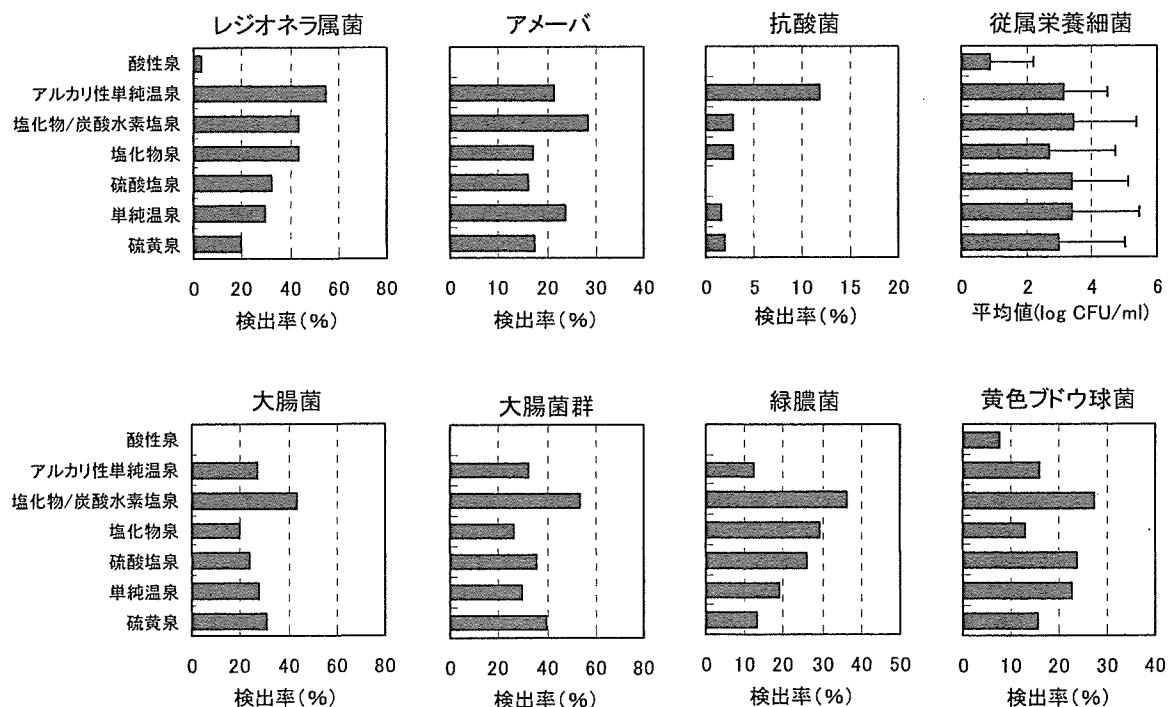


図 10 泉質別 病原微生物等検出状況

表5 pH別 病原微生物等検出状況

pH	レジオネラ属菌 <sup>1)</sup>		アメーバ <sup>2)</sup>		抗酸菌		従属栄養細菌(42°C) <sup>3)</sup>	
	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)
<3.0	78	0 (0.0) <sup>a</sup>	76	0 (0.0) <sup>a</sup>	78	0 (0.0)	78	0.8 ± 1.3 <sup>a</sup>
3.0-5.9	20	3 (15.0) <sup>b</sup>	20	0 (0.0)	20	0 (0.0)	20	2.0 ± 1.8 <sup>b,c</sup>
6.0-7.4	84	31 (36.9) <sup>b</sup>	80	18 (22.5) <sup>b</sup>	80	3 (3.8)	76	2.9 ± 1.9 <sup>b</sup>
7.5-8.4	157	62 (39.5) <sup>b</sup>	144	29 (20.1) <sup>b</sup>	150	3 (2.0)	150	3.2 ± 2.0 <sup>b</sup>
8.5≤	79	31 (39.2) <sup>b</sup>	72	19 (26.4) <sup>b</sup>	62	4 (6.5)	74	3.2 ± 1.5 <sup>b,d</sup>
不明	15	5 (33.3)	15	4 (26.7)	11	0 (0.0)	10	4.0 ± 1.3
計	433	132 (30.5)	407	70 (17.2)	401	10 (2.5)	408	2.6 ± 2.0

pH	大腸菌 <sup>4)</sup>		大腸菌群 <sup>5)</sup>		緑膿菌 <sup>6)</sup>		黄色ブドウ球菌 <sup>7)</sup>	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)
<3.0	77	0 (0.0) <sup>a</sup>	77	0 (0.0) <sup>a</sup>	77	0 (0.0) <sup>a</sup>	77	7 (9.1) <sup>a</sup>
3.1-5.9	20	1 (5.0) <sup>b</sup>	18	1 (5.6) <sup>b</sup>	20	0 (0.0)	20	1 (5.0)
6.0-7.4	74	27 (36.5) <sup>c,d</sup>	74	32 (43.2) <sup>c,d</sup>	70	17 (24.3) <sup>b</sup>	70	17 (24.3) <sup>b</sup>
7.5-8.4	143	39 (27.3) <sup>c</sup>	143	51 (35.7) <sup>c,d</sup>	140	32 (22.9) <sup>b</sup>	140	29 (20.7) <sup>b</sup>
8.5≤	72	19 (26.4) <sup>c</sup>	72	23 (31.9) <sup>c</sup>	72	15 (20.8) <sup>b</sup>	72	7 (9.7)
不明	10	2 (20.0)	10	3 (30.0)	10	3 (30.0)	10	2 (20.0)
計	396	88 (22.2)	394	110 (27.9)	389	67 (17.2)	389	63 (16.2)

- 1) aとbとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P<0.05$ )
- 2) aとbとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P<0.05$ )
- 3) aとb、cとdとの間に平均値の有意な差が認められる。(Steel-Dwassの多重比較、 $P<0.05$ )
- 4) aとc、bとdとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P<0.05$ )
- 5) aとc、bとdとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P<0.05$ )
- 6) aとbとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P<0.05$ )
- 7) aとbとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P<0.05$ )

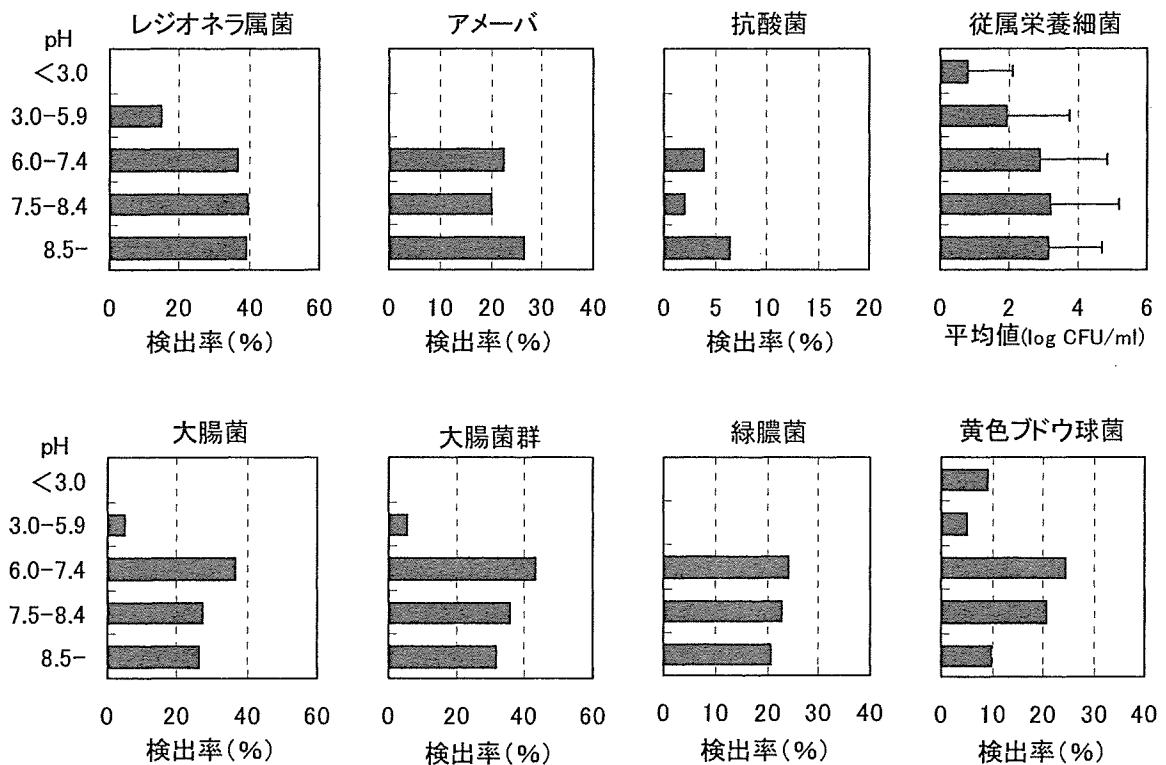


図11 pH別 病原微生物等検出状況

表 6 温度別 病原微生物等検出状況

温度	レジオネラ属菌 <sup>1)</sup>		アメーバ <sup>2)</sup>		抗酸菌		従属栄養細菌(42℃) <sup>3)</sup>	
	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)
55℃以上	29	1 (3.4) <sup>a</sup>	27	0 (0.0) <sup>a</sup>	24	0 (0.0)	24	0.8 ± 1.1 <sup>a</sup>
50℃以上55℃未満	36	4 (11.1) <sup>b</sup>	33	0 (0.0)	35	0 (0.0)	33	1.9 ± 1.5 <sup>b</sup>
45℃以上50℃未満	57	18 (31.6) <sup>c</sup>	55	5 (9.1) <sup>b,c</sup>	52	2 (3.8)	50	2.5 ± 1.7 <sup>b</sup>
40℃以上45℃未満	259	88 (34.0) <sup>c,d</sup>	243	49 (20.2) <sup>b</sup>	241	4 (1.7)	251	2.9 ± 2.1 <sup>b</sup>
40℃未満	47	19 (40.4) <sup>c,d</sup>	44	15 (34.1) <sup>b,d</sup>	44	4 (9.1)	45	2.9 ± 2.0 <sup>b</sup>
不明	5	2 (40.0)	5	1 (20.0)	5	0 (0.0)	5	2.0 ± 2.5
計	433	132 (30.5)	407	70 (17.2)	401	10 (2.5)	408	2.6 ± 2.0

pH	大腸菌 <sup>4)</sup>		大腸菌群 <sup>5)</sup>		緑膿菌 <sup>6)</sup>		黄色ブドウ球菌 <sup>7)</sup>	
	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)	試料数	検出数(%)
55℃以上	18	0 (0.0) <sup>a</sup>	18	0 (0.0) <sup>a</sup>	18	0 (0.0) <sup>a</sup>	18	0 (0.0) <sup>a</sup>
50℃以上55℃未満	29	1 (3.4) <sup>a</sup>	29	1 (3.4) <sup>b</sup>	29	1 (3.4)	29	1 (3.4)
45℃以上50℃未満	47	4 (8.5) <sup>a</sup>	47	6 (12.8) <sup>c</sup>	47	5 (10.6)	47	2 (4.3) <sup>b</sup>
40℃以上45℃未満	250	72 (28.8) <sup>b</sup>	248	86 (34.7) <sup>d,e</sup>	245	53 (21.6) <sup>b</sup>	245	53 (21.6) <sup>c,d</sup>
40℃未満	47	10 (21.3)	47	15 (31.9) <sup>d</sup>	45	8 (17.8) <sup>b</sup>	45	7 (15.6) <sup>c</sup>
不明	5	1 (20.0)	5	2 (40.0)	5	0 (0.0)	5	0 (0.0)
計	396	88 (22.2)	394	110 (27.9)	389	67 (17.2)	389	63 (16.2)

- 1) aとc、bとdとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P<0.05$ )
- 2) aとb、cとdとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P<0.05$ )
- 3) aとbとの間に平均値の有意な差が認められる。(Steel-Dwassの多重比較、 $P<0.05$ )
- 4) aとbとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P<0.05$ )
- 5) aとd、bとd、cとeとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P<0.05$ )
- 6) aとbとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P<0.05$ )
- 7) aとc、bとdとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P<0.05$ )

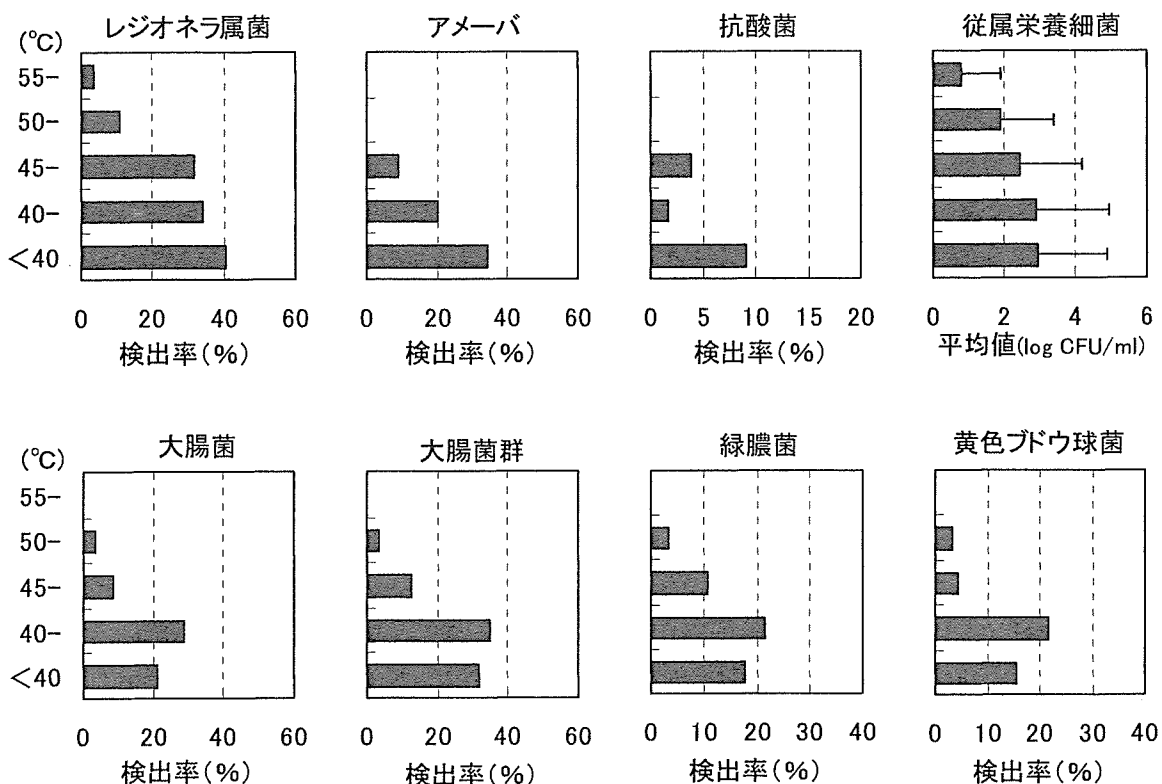


図 12 温度別 病原微生物等検出状況

表 7 浴槽の洗浄方法とレジオネラ属菌検出率  
(pH 3.0 未満、遊離残留塩素濃度 1mg/L 以上を除く)

洗浄方法	試料数	検出数(%) <sup>1)</sup>
ブラシなし (高圧、消毒)	19	13 (68.4) <sup>a</sup>
ブラシ+消毒 (+高圧水、熱湯)	29	18 (62.1) <sup>a</sup>
ブラシ+洗剤 (+高圧水、熱湯、消毒)	60	30 (50.0)
ブラシ主体 (+高圧水、週1回消毒)	34	10 (29.4) <sup>b</sup>
計	142	71 (50.0)

1) aとbとの間に比率の有意な差が認められる。(Tukeyの多重比較、 $P<0.05$ )

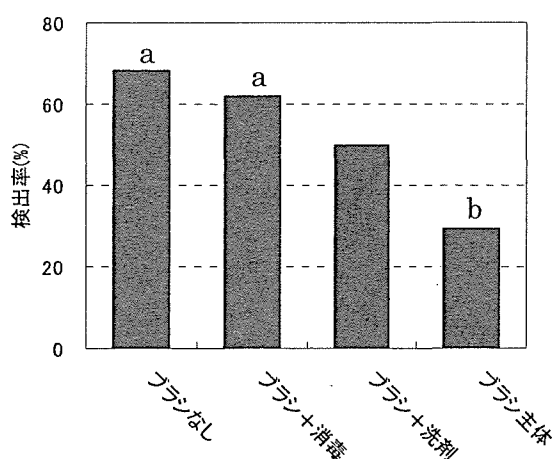


図 13 浴槽の洗浄方法とレジオネラ属菌検出率 (n=142)

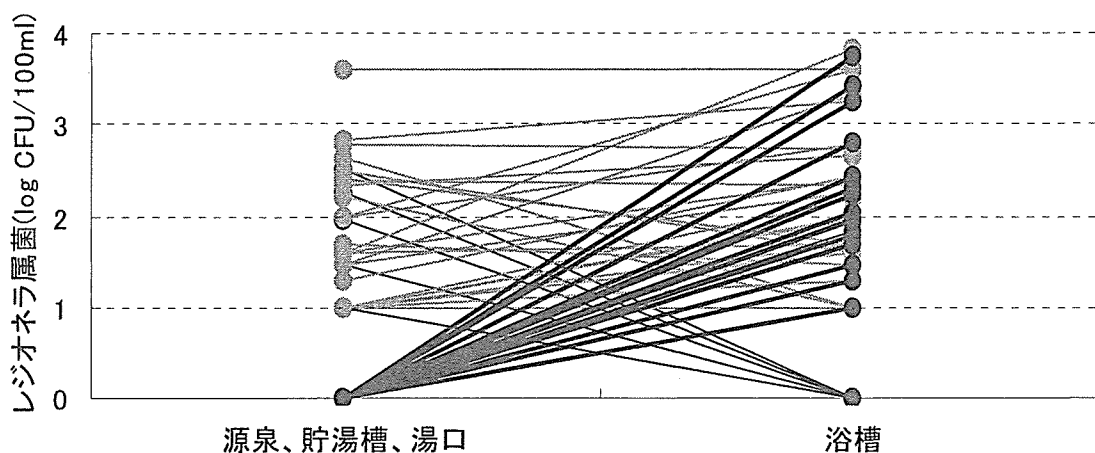


図 14 同一施設ペア試料でのレジオネラ属菌数の動向 (n=150)

表 8 遊離残留塩素濃度別 病原微生物等検出状況 (全試料)

遊離残留塩素 (mg/L)	レジオネラ属菌		アメーバ <sup>1)</sup>		抗酸菌		従属栄養細菌(42°C) <sup>2)</sup>	
	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)
≥1.0	6	0 (0.0)	6	0 (0.0) <sup>a</sup>	6	0 (0.0)	6	1.5 ± 2.5
0.5-0.9	10	2 (20.0)	9	0 (0.0)	10	0 (0.0)	10	1.7 ± 1.9
0.2-0.4	17	4 (23.5)	17	0 (0.0)	17	3 (17.6)	17	1.1 ± 1.2 <sup>a</sup>
<0.2	392	126 (32.1)	367	69 (18.8) <sup>b</sup>	360	7 (1.9)	367	2.7 ± 2.0 <sup>b</sup>
不明	8	0 (0.0)	8	1 (12.5)	8	0 (0.0)	8	2.2 ± 2.3
計	433	132 (30.5)	407	70 (17.2)	401	10 (2.5)	408	2.6 ± 2.0

遊離残留塩素 (mg/L)	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(%)
≥1.0	6	1 (16.7)	6	1 (16.7)	6	0 (0.0)	6	1 (16.7)
0.5-0.9	10	0 (0.0)	10	0 (0.0)	10	1 (10.0)	10	0 (0.0)
0.2-0.4	17	2 (11.8)	17	2 (11.8)	17	2 (11.8)	17	2 (11.8)
<0.2	355	83 (23.4)	353	105 (29.7)	348	62 (17.8)	348	59 (17.0)
不明	8	2 (25.0)	8	2 (25.0)	8	2 (25.0)	8	1 (12.5)
計	396	88 (22.2)	394	110 (27.9)	389	67 (17.2)	389	63 (16.2)

1) aとbとの間に比率の有意な差が認められる。(Fisher exact test、 $P<0.01$ )

2) aとbとの間に平均値の有意な差が認められる。(Steel-Dwassの多重比較、 $P<0.05$ )

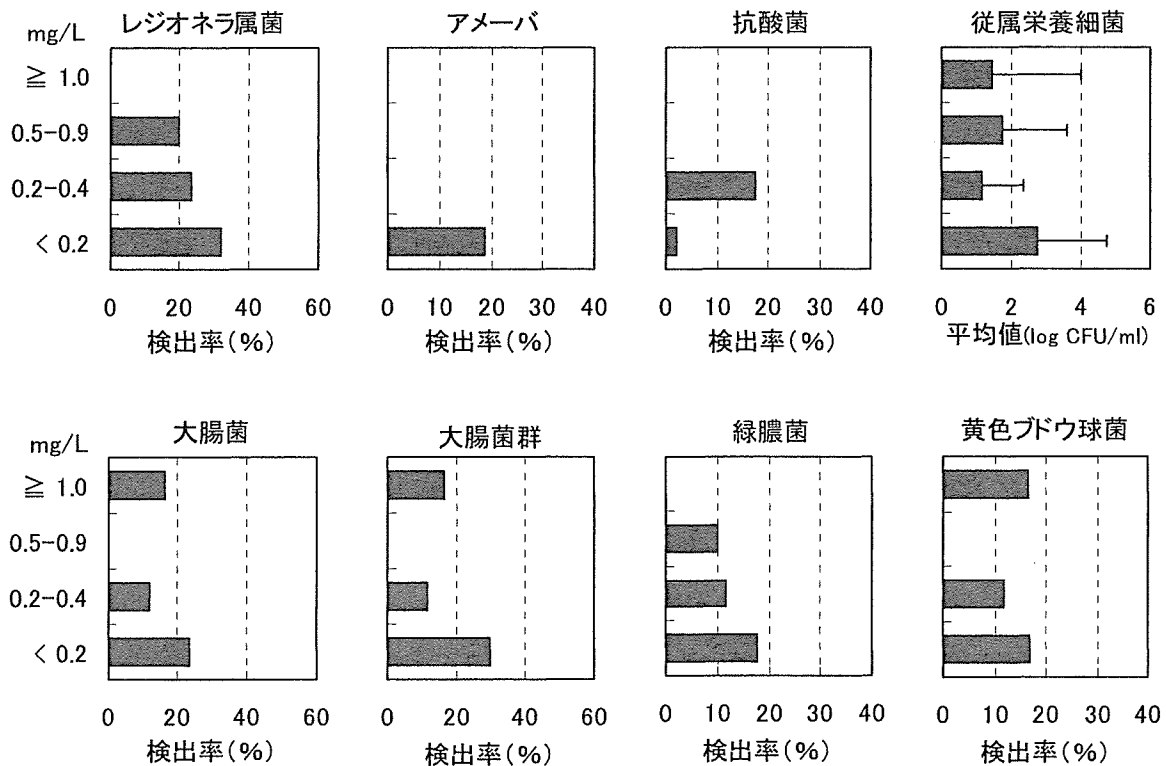


図 15 遊離残留塩素濃度別 病原微生物等検出状況 (全試料)

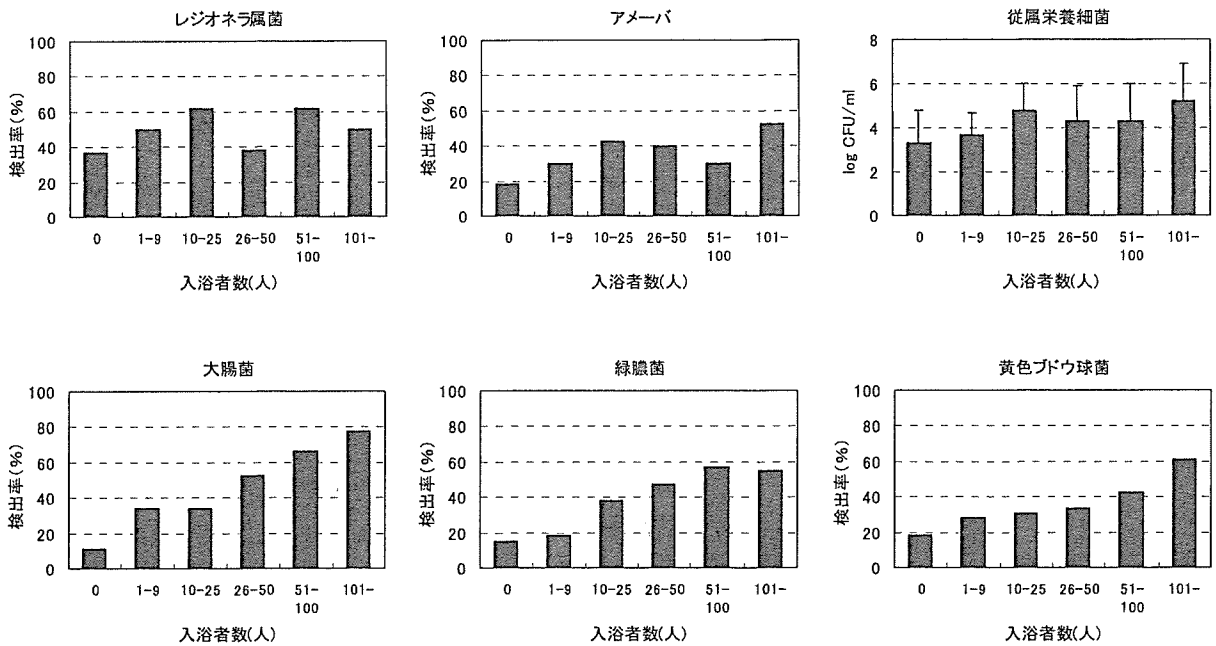


図 16 浴槽の入浴者数別 病原微生物等検出状況  
(pH 3.0 未満、遊離残留塩素濃度 1mg/L 以上を除く)

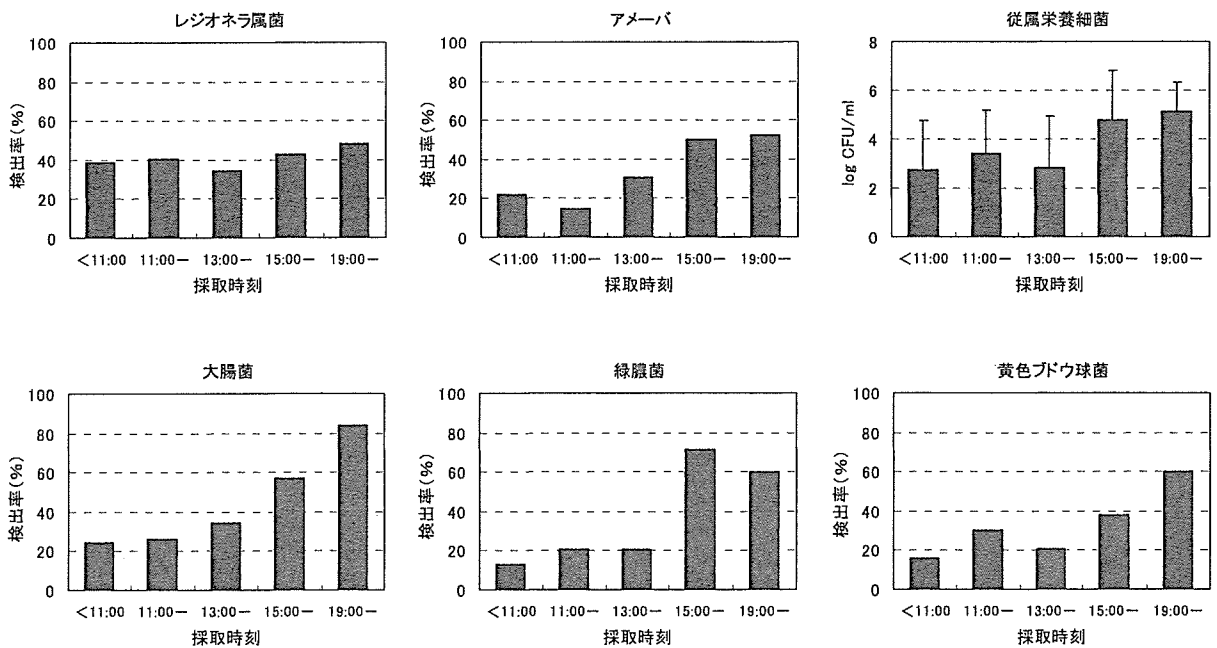


図 17 浴槽水の採取時刻別 病原微生物等検出状況  
(pH 3.0 未満、遊離残留塩素濃度 1mg/L 以上を除く)

表 9 浴槽の ATP ふき取り検査結果 (n=463)

	全施設		最大施設		最小施設	
	幾何平均 (RLU)	対数平均±SD (log RLU)	幾何平均 (RLU)	対数平均±SD (log RLU)	幾何平均 (RLU)	対数平均±SD (log RLU)
洗浄前 (n=135)	7,447	3.9±0.8	281,546	5.4±0.2	185	2.3±0.4
洗浄後 (n=259)	1,341	3.1±1.0	142,191	5.2±0.3	13	1.1±0.9
消毒後 (n=69)	44	1.6±1.0	11,398	4.1±0.7	8	0.9±0.4

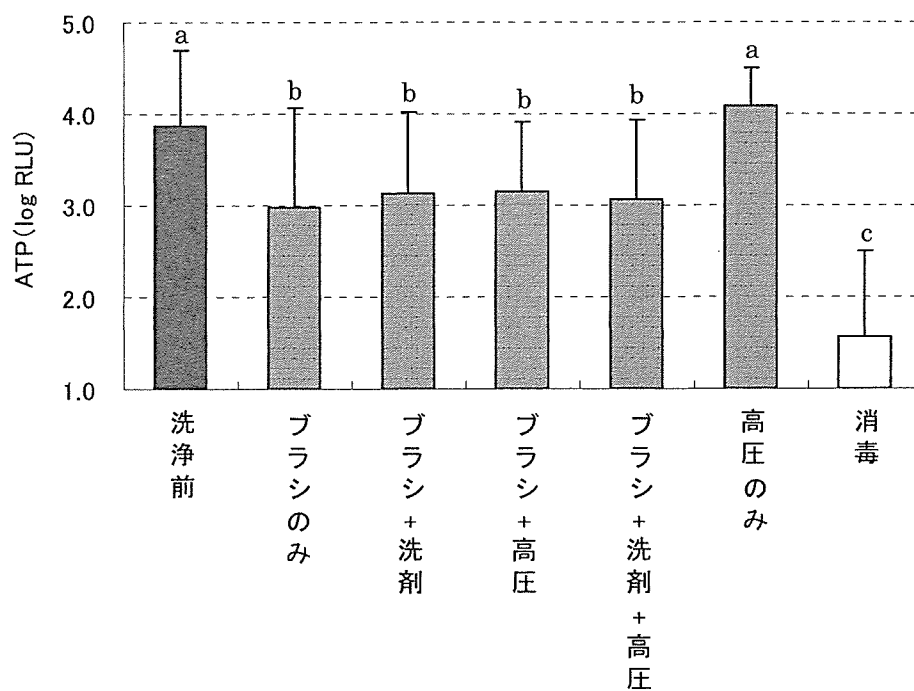


図 18 洗浄方法別 ATP 値の分布 (平均値)

グラフ上の同一英小文字は ATP 値に有意差がないことを示す。

(Tukey の多重比較、 $P<0.01$ )

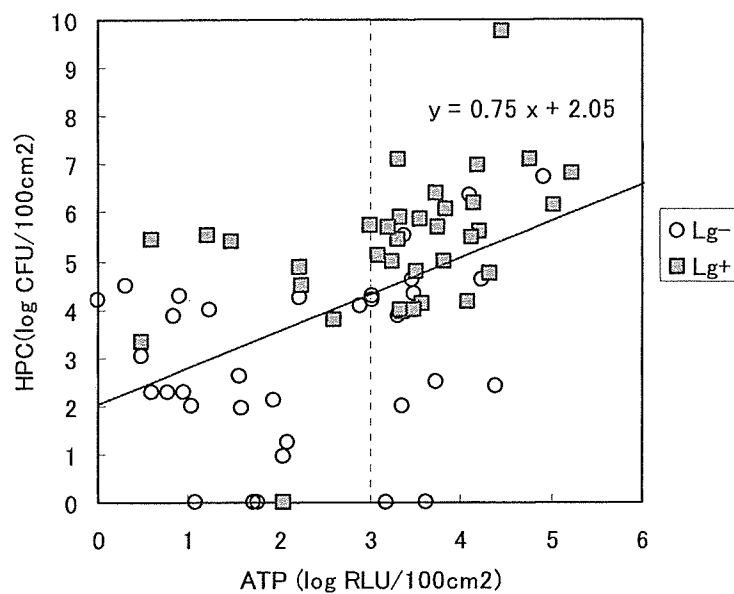


図 19 ふき取り検体の ATP 値と従属栄養細菌数 (n=69)  
(Spearman の順位相関係数 : 0.55、 $P < 0.01$ )

表 10 ふき取り検体の ATP 値とレジオネラ属菌検出の有無

RLU	レジオネラ属菌		計	陽性率 (%)
	陽性	陰性		
$\geq 1000$	26	14	40	65.0
$< 1000$	8	21	29	27.6
計	34	35	69	49.3

オッズ比 (95%信頼区間) : 4.9 (1.7 – 13.8)  $P < 0.01$  (Fisher exact test)



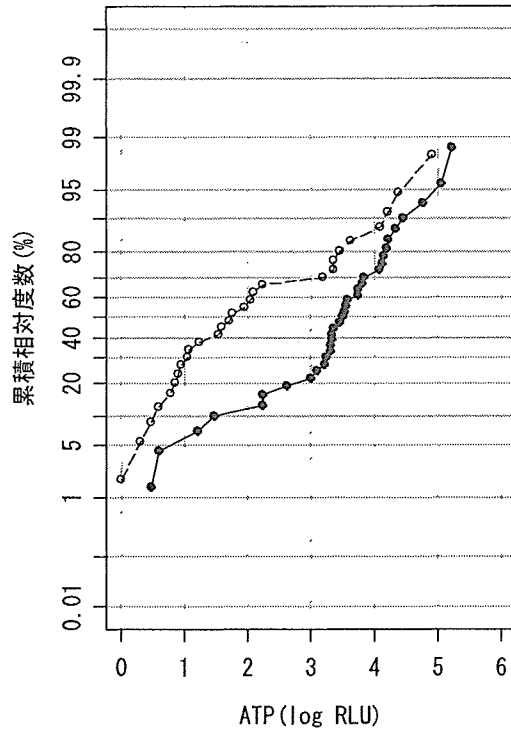


図 20 ふき取り検体の累積相対度数分布 (n=69)  
 (●-レジオネラ属菌陽性試料、○-レジオネラ属菌陰性試料)

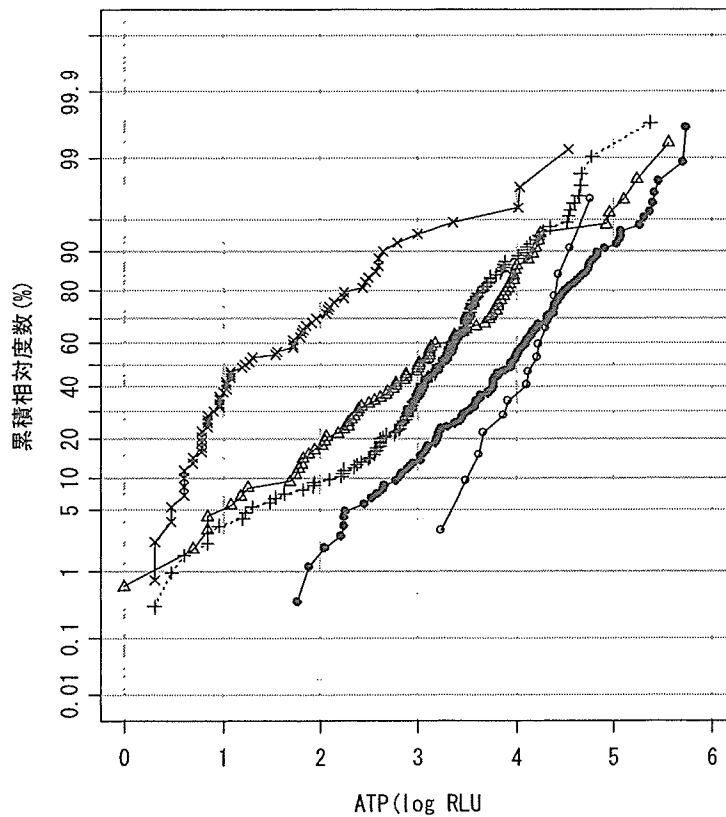


図 21 洗浄方法別累積相対度数分布 (n=450)  
 (●-洗浄前、○-高圧洗浄、△-ブラシのみ、+・ブラシ+α、×-消毒)

表 11 掛け流し式温泉における衛生管理の重要ポイント（例示）

貯湯槽

ポイント	ハザード	備考	対策
湯 泉質	スケールの付着	塩化物泉や鉄分の多い泉質ではスケール等が付きやすくバイオフィームが定着しやすい。清掃・消毒の効果も低下する。	定期的に内部を洗浄する。  泉質によってはスケールが付きやすかったり、バイオフィームが形成されやすい泉質があり、洗浄頻度を多くする。  必要に応じて酸でスケールを取り除く。
有機物 (AOC)	レジオネラの増殖 バイオフィームの形成 アメーバの増殖	有機物量が高い源泉は、バイオフィームの増殖が早い。	定期的に内部を洗浄する。  泉質によってはスケールが付きやすかったり、バイオフィームが形成されやすい泉質があり、洗浄頻度を多くする。  必要に応じて酸でスケールを取り除く。
湯温 (重要管理点)  管理基準: 55℃以上	レジオネラの増殖 バイオフィームの形成 アメーバの増殖	湯温が低いとレジオネラやバイオフィームが増殖しやすい。	レジオネラの増殖を防ぐために55℃以上に保つ。
貯湯槽の構造 材質	レジオネラの増殖 バイオフィームの形成 アメーバの増殖	内部の表面に凹凸があるとバイオフィームが形成されやすく、清掃・消毒も難しい。	内部の表面がスムーズで凹凸が少ないものにする。
貯湯量	レジオネラの増殖 バイオフィームの形成 アメーバの増殖	湯温が低い場合に、貯湯量が多いと55℃以上に保つために多量のエネルギーを必要とする。	貯湯量が多いと管理が難しくなるので、管理が可能な容量とする。具体的には55℃まで加温が可能な容量、源泉の湧出量に見合った容量などとする。
蓋	レジオネラ、アメーバの混入	蓋や貯湯槽の上面にある配管の接続部から雨水が入り、レジオネラが混入する。	密封することは困難であるため、可能な限り土埃や雨水等の入らない構造の蓋にする。  必要に応じて貯湯槽上部に配管接続部を設けなくて、側面にする。
エアー抜き、ドレイン管	レジオネラ、アメーバの混入	雨水や土埃とともにレジオネラやバイオフィームの元になる微生物が侵入する。	逆流防止対策、土埃の流入防止
配管	レジオネラ、アメーバの混入	浴槽側の配管からの逆流によりレジオネラが混入する。	逆流防止、湯温の低下、湯の滞留が起きない構造とする。
密封	レジオネラ、アメーバの混入	地下埋設型では外部からの地下水や表流水の浸入する。	外部から土埃や雨水、ゴミなどが入らない構造にする。

表 12 対策事例集（例示）

事例4

事例発生個所	貯湯槽を経由しない構造に変更
事象	<p>貯湯槽清掃、循環ろ過装置の清掃を含め衛生管理が出来ず、浴槽から大量のレジオネラ属菌検出があった。</p> <p>この段階では条例を遵守し、定期的な清掃を行うことと、再度レジオネラ検査の実施を伝えてきた。この公衆浴場の源泉は手ごろな温度で湧出量が豊富であった。</p> <p>源泉から浴槽に直接流した方が良いのではないかと、衛生管理の大変な貯湯槽、循環ろ過装置は必要ないのではと現場を見て感じたことを管理者に話をした。</p> <p>なお、貯湯槽、循環ろ過装置を経由しない配湯管構造としても衛生管理はマニュアルを作成し実施することが重要であることを付け加えた。</p>
対策	<p>当該施設では、時間をおかず早速、貯湯槽を経由せず直接浴槽とカラン及びシャワー配管工事を行った。</p> <p>また、これまで使用してきた循環ろ過装置を取り外し、掛け流し温泉の公衆浴場に切り替えることになった。</p> <p>なお、源泉から施設の間距離に、清掃消毒用に用いることが出来る取り外し可能な配管とした。</p> <p>また、源泉、配管、浴槽の衛生管理マニュアルに基づく衛生管理の徹底を指示した。</p>

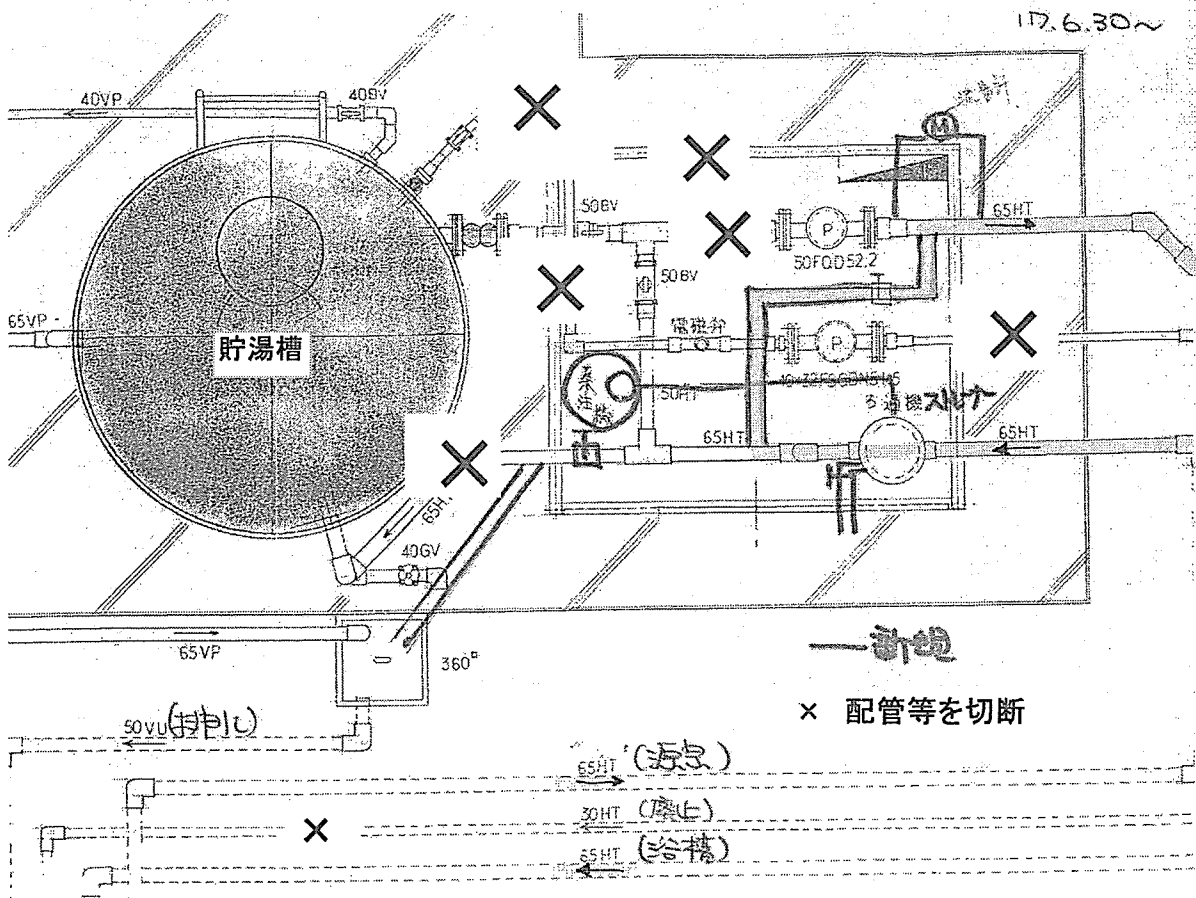


表 13 掛け流し式温泉のリスク一覧

項 目		ハイリスク群	↔	ローリスク群
全般	pH	pH 6 以上	pH 3~6	pH 3 未満(酸性泉)
	源泉・貯湯槽 温 度	50°C未満	50~55°C	55°C以上
	泉 質	アルカリ性単純温泉 塩化物/炭酸水素塩泉 塩化物泉	単純温泉 硫酸塩泉	硫黄泉
貯湯槽		貯湯槽あり		貯湯槽なし
浴槽	浴槽材質	石 目地の破損	タイル、木	コンクリート
	洗浄方法	高圧洗浄のみ		ブラシ洗浄の徹底 ブラシ後の高濃度塩素噴霧
	換水頻度	2日以上換水しない		毎日完全換水

## II 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）  
掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究  
主任研究者 井上 博雄 愛媛県立衛生環境研究所

分担研究報告書

温泉における微生物汚染ポテンシャルの評価

分担研究者	烏谷 竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
	遠藤 卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	浅野 由紀子	愛媛県立衛生環境研究所
	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部

研究要旨

循環系を持たない掛け流し式温泉においては、源泉から湯口に至る過程で外部からの汚染がない場合、源泉が本来持っている微生物汚染ポテンシャルに応じた微生物増殖が生じていると考えられる。温泉の微生物汚染ポテンシャルを評価するため、水道水等で微生物増殖の生じやすさの指標として用いられている同化性有機炭素（AOC：Assimilable Organic Carbon）を測定した。併せて全細菌数、ATP等をバイオマス量の指標とし、微生物汚染ポテンシャルとバイオマス量、レジオネラ属菌汚染との関係を解析した。その結果、有機炭素量（Dilution-AOC、TOC）とレジオネラ属菌検出との間に直接的な相関はみられなかったが、有機炭素量に応じてバイオマス量（全細菌、ATP）が増加することが確認された。レジオネラ属菌検出率は泉質によって大きく異なり、レジオネラ属菌が検出される場合は、バイオマス量に応じてレジオネラ属菌数が増加した。レジオネラ属菌の増殖に好適な泉質においては、有機炭素量がバイオマスの増加要因となることで二次的にレジオネラの増殖に関与していることが示唆された。ATPは現場で簡便・迅速に測定することが可能であり、湯口水のATP量を測定することで、レジオネラ属菌数の増加を未然に探知できる可能性を示した。

A. 研究目的

循環系を持たない掛け流し式温泉において、浴用水に消毒剤を常時添加しない状態でレジオネラ属菌による健康被害を防止するためには、湯口から浴槽に補給される原湯がレジオネラ属菌に汚染されていないことが前提となる。平成17年度に実施した本研究班の汚染実態調査結果によると、浴槽でレジオネラ属菌が検出された施設の約3割において、湯口水が既にレジオネラ属菌に汚染されていることが明らかになった。浴槽中では、入浴者由来の有機物や

微生物が加わることで、源泉よりもバイオフィルムの定着に有利な条件が整えられるため、浴槽水の完全換水や換水時の徹底洗浄が重要となってくる。一方、補給湯においては、外部からの汚染がないと仮定した場合、源泉が本来持っている微生物の汚染ポテンシャルを客観的に評価することができれば、施設ごとに洗浄消毒の方法や洗浄頻度を決定する際の有用な管理指標になると考えられる。

微生物汚染ポテンシャルの評価方法としては、微生物増殖の栄養素となる炭素量を測定する D. van

der Kooij らの同化性有機炭素 (AOC: Assimilable Organic Carbon) がある。これは、指定した微生物が同化する有機炭素量を示し、水道水等で微生物増殖の生じやすさの指標として用いられている。平成 17 年度の源泉を用いた予備的な調査では、源泉の AOC 濃度が高い施設においてレジオネラ汚染が見られたことから、今年度は調査施設数を拡大し、AOC 濃度が微生物汚染に及ぼす影響を検討した。併せて、全細菌数、ATP 量等をバイオマスの指標として測定し、微生物汚染ポテンシャルとレジオネラ汚染との関係を解析した。

## B. 研究方法

### 1. 試料採取

平成 18 年 7~11 月の間に、全国 13 府県の掛け流し式温泉を対象に、82 件の湯口水等を採取した。AOC 測定用の試料は、前処理したガラス製ねじ口瓶(シリコン製内張付き)に 100 ml 採取し、75 °C、30 分間加熱処理した後、測定施設まで 4 °C で輸送した。AOC 測定に使用したガラス瓶、ガラス器具は 500 °C で 5 時間の乾熱処理を行い、シリコン製ねじ口栓内張は 60 °C のペルオキソ二硫酸ナトリウム溶液に 1 時間浸した後、再精製水で洗浄したものをを用いた。

### 2. 検査方法

AOC 測定は、検水および Mili-Q による 10 倍希釈水の両方について、上水試験法の P17-NOX 法に準じて行った。すなわち、試料に *Pseudomonas fluorescens* P17 株並びに *Aquaspirillum* sp. NOX 株を接種し、20 °C の暗所で静置培養した。定期的により一部試料を取り出し、R2A 寒天培地 (Difco) 三重層平板とし、7 日間培養後の菌数を算出した。3~4 日ごとに菌数を測定し、試験菌株数の増加が停止したときの濃度を最大増殖量とし、あらかじめ用意した検量線から酢酸炭素当量の AOC 濃度を求めた (Standard-AOC)。なお、pH 2.0~3.8 の酸性群や一部の硫黄泉で菌株の増殖に明らかな抑制が見られたため、低 pH 試料については水酸化ナトリウムであらかじめ pH 6~7 に調整した後、すべての検水について Mili-Q による 10 倍希釈液を作成し、AOC

測定を行った (Dilution-AOC)。

ATP 測定は、温泉成分による酵素反応の阻害を避けるため、検水を 25mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) にて 10 倍に希釈した後、ルシフェール HS セット (キッコーマン) を使用して ATP アナライザ AF-100 (東亜ディーケーケー (株)) にて測定した。

全細菌数は、検水の適量 (0.1~10 ml) をポリカーボネート製黒色メンブランフィルター (φ 25 mm、孔径 0.2 μm) でろ過した後、LIVE/DEAD *Badlight* Bacterial Viability Kits (invitrogen) で染色し、落射蛍光顕微鏡を用いて B 励起で緑色の生菌を、G 励起で赤色の死菌を 10 x 100 倍で観察した。無作為に選んだ 30 視野の生菌および死菌を計数し、1 ml 当たりの全細菌数を算出した。

全有機炭素 (TOC) は上水試験法に準じて行い、レジオネラ属菌、従属栄養細菌 (HPC) は、本研究班が作成した平成 17 年度掛け流し式温泉実態調査細菌検査マニュアルに従った。

## C. 研究結果

### 1. 各検査項目の相関性

調査を行った湯口水等 82 件の内訳は、湯口水 76 件、貯湯槽水 3 件、源泉 3 件で、82 件中 17 件 (20.7 %) から、レジオネラ属菌が検出された。測定値の分布の特徴及び項目間の相関を把握するため、各項目の組み合わせすべてについて散布図及び相関行列を作成した (図 1、表 1)。

#### (1) 温度分布とレジオネラ属菌

試料の温度分布は 2 峰性を示し、50 °C 未満の低温群と 50 °C 以上の高温群に分けられた (図 1)。レジオネラ属菌の検出率は 50 °C 未満の低温群で 25.9% (15/58) に対し、50 °C 以上の高温群では 8.3% (2/24) に低下した (表 2)。レジオネラ属菌が検出された最高温度は 56.3 °C であり、60 °C 以上の 6 件からはレジオネラ属菌は検出されなかった。

#### (2) pH とレジオネラ属菌

pH 2.0~3.8 の酸性群と、pH 6.3~9.6 の中性~アルカリ性群の 2 つに明瞭にグループ化できた (図 1)。中性~アルカリ性群でのレジオネラ属菌検出率は

26.2% (16/61) であったのに対し、酸性群では pH 3.8 の 1 件でレジオネラ属菌が検出されたのみであり、検出率は 4.8% (1/21) であった (表 2)。

### (3) 全細菌と ATP 値

バイオマス量の指標となる全細菌と ATP 値との間には高い相関が認められ (Pearson の積率相関係数、0.862)、湯口水中の ATP 値は主に浮遊性細菌由来の ATP を反映していることが示唆された (図 2)。HPC と全細菌あるいは ATP 値との間に明瞭な相関は認められず (図 1、表 1)、全細菌中に占める従属栄養細菌の割合は温泉毎に多様と考えられた。

### (4) 有機炭素量 (AOC、TOC) と微生物汚染

Standard-AOC と Dilution-AOC の平均値を比較すると、Dilution-AOC の 1.4 mg/L に対して Standard-AOC では 33 µg/L と低値を示した (表 2)。特に、pH 3.8 以下の酸性群では試験菌株が 1 時間以内に死滅したため、Standard-AOC では 21 件すべて不検出となった。Standard-AOC では一部の硫黄泉においても菌株の増殖に明らかな抑制みられたことから、同化性有機炭素量の評価には Dilution-AOC の値を用いることとした。

レジオネラ属菌の検出に影響を及ぼす温度および pH 別に、有機炭素量及びバイオマス量を比較した。その結果、温度によって有機炭素量及びバイオマス量に有意な差は見られなかったが、pH では酸性群と中性～アルカリ性群とで有意な差が見られた (表 2)。酸性群においては AOC 及び TOC の有機炭素量と全細菌、ATP 値のバイオマス量ともに中性～アルカリ性群と比較して有意に高く (Mann-Whitney の U 検定、 $P < 0.01$ )、酸性泉には微生物が利用可能な有機物が多く含まれていると考えられた。AOC と TOC との間に相関は見られなかったが、両有機炭素量とも全細菌及び ATP 値のバイオマス量と有意な相関 (Spearman の順位相関係数、0.48～0.62) を示した (図 1、表 1、図 3)。これは、温泉中に含まれる有機炭素を利用して微生物が増殖する結果と考えられた。

## 2 レジオネラ属菌の検出に影響を及ぼす要因

レジオネラ属菌が検出されない 60°C 以上あるい

は pH 3.8 以下の酸性群 23 件を除いた 59 件を対象に、有機炭素量、微生物量、泉質とレジオネラ汚染について検討した (図 4、表 3)。

### (1) AOC

59 件の AOC の平均値は 1.1mg/L であった。レジオネラ属菌陰性試料 43 件の平均値 1.1mg/L に対して、陽性試料 16 件の平均値は 1.0mg/L で、両群に差は見られなかった (表 4)。レジオネラ属菌が検出された試料の AOC の最低値は 0.13mg/L であり、低濃度から高濃度に至るまでレジオネラ属菌の検出頻度に差は認められなかった (図 5)。

### (2) 泉質

泉質別にレジオネラ属菌検出率を比較すると、アルカリ性単純温泉、塩化物泉で高く、硫酸塩泉、単純温泉、硫黄泉で低い傾向がみられた (表 4)。AOC の平均値はアルカリ性単純温泉で 1.4 mg/L に対して硫酸塩泉では 0.8mg/L と低く、両者に有意な差 (Steel-Dwass の多重比較、 $P < 0.05$ ) がみられた (図 6)。また、HPC の平均値はアルカリ性単純温泉で 3.2 log CFU/ml に対して単純温泉では 1.3 log CFU/ml と低く、両者に有意な差 (Steel-Dwass の多重比較、 $P < 0.05$ ) が見られた。以上のことから、アルカリ性単純温泉は AOC 及び HPC が他の泉質よりも有意に高く、レジオネラ属菌を含む従属栄養細菌の増殖に適した環境である可能性が示唆された。

### (3) 全細菌、ATP、HPC

レジオネラ属菌数と、各微生物汚染指標との相関を検討した (図 7)。レジオネラ属菌が検出された 16 件のレジオネラ属菌数と、全細菌及び ATP の汚染指標値との間には明らかな相関が認められ (Pearson の積率相関係数、0.786 及び 0.639)、細菌汚染の増加に伴ってレジオネラ属菌数も増加することがわかった。HPC についても、外れ値 (HPC 10 CFU/ml 未満でレジオネラ属菌が検出された 1 件) を除くと、同様の相関が見られた (Pearson の積率相関係数 0.727)。

## D. 考察

同化性有機炭素 (AOC) は、原理上 *Pseudomonas fluorescens* P-17 株と *Aquaspirillum* sp. NOX 株の 2 種類の菌株の増殖能に依存した測定方法である。多



様な成分を含んだ温泉では、有機炭素量以外にも菌株の増殖に影響を及ぼす要因が多いため、より温泉成分による阻害を受けにくい Dilution-AOC を同化性有機炭素の指標として今後の評価を行った。Dilution-AOC、TOC とともに全菌数等のバイオマス量と有意な相関がみられたことから、貯湯槽、配管系においては、温泉中の同化性有機炭素量に応じた微生物増殖が生じていることが確認された。その際には、有機物量に応じて温泉成分に好適な微生物群が増殖し、レジオネラ属菌が好む泉質であればバイオマス量に応じてレジオネラ属菌数が増加すると考えられた (図 8)。

以上の結果は、湯口水中のバイオマス量を常時監視すれば、レジオネラ属菌数の増加を未然に探知できる可能性を示している。今回の調査で、湯口水の ATP 量が浮遊性のバクテリア量を直接反映していることが明らかとなった。温泉中の ATP 測定には、pH や NaCl など多様な温泉成分の影響を受けることが予想されたが、適正な緩衝液で希釈し、高感度試薬を用いるだけで充分評価可能な検出感度が得られることを示した。今回は ATP の測定に据え置きタイプのルミノメーターを使用した。携帯可能な高感度機器を利用すれば現場で迅速に微生物汚染レベルを把握することが可能であり、さらに検討を進めることで HACCP の重要管理点に設定できる可能性がある。

#### E. 結論

- 1 有機炭素量 (AOC、TOC) とレジオネラ属菌検出に直接的な相関はみられなかった。
- 2 有機炭素量 (Dilution-AOC、TOC) に応じてバイオマス量 (全細菌、ATP) が増加した。レジ

オネラ属菌検出率は泉質によって大きく異なり、レジオネラ属菌が検出される場合は、バイオマス量に応じて菌数が増加した。レジオネラ属菌の増殖に好適な泉質においては、有機炭素量がバイオマスの増加要因となることで二次的にレジオネラの増殖に関与していることが示唆された。

- 3 酸性泉は有機炭素量 (Dilution-AOC、TOC) 及びバイオマス量 (全細菌、ATP) が有意に高く、酸性を好むバクテリアが増殖しやすい環境であると推察された。pH 3.8 未満の酸性泉からレジオネラ属菌は検出されなかった。
- 4 全細菌数と ATP 量とは相関が高く、湯口水の ATP 量は主に浮遊性バクテリア由来であることが示唆された。
- 5 ATP 量は現場で簡便・迅速に測定することが可能であり、湯口水の ATP 量を測定することでレジオネラ属菌数の増加を未然に探知できる可能性がある。

#### F. 参考文献

- 1 上水試験法解説編、同化性有機炭素 (AOC)、p935-941、日本水道協会、2001
- 2 厚生労働科学研究費補助金健康科学総合研究事業「掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究」(主任:井上博雄) 掛け流し式温泉における病原微生物汚染の実態調査

#### G. 研究発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

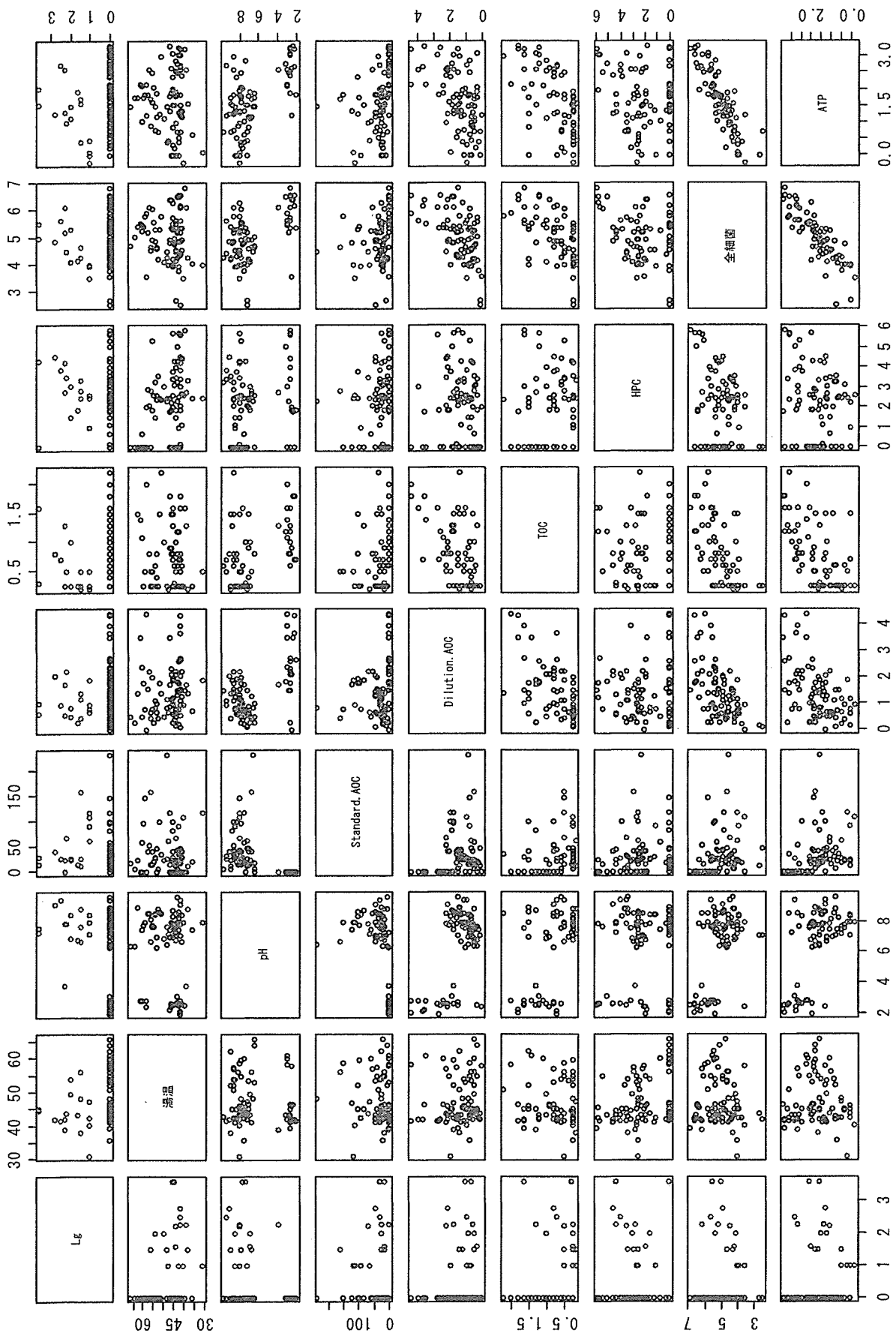


図1 各検査項目の散布図 (n=82) ○: レジオネラ属菌陽性、●: レジオネラ属菌陰性

表1 各検査項目の相関

相関行列(ヒアソンの積率相関行列) (n=82)	レジオネラ属菌 (log CFU/100ml)	温度 (°C)	pH	Standard AOC(μg/L)	Dilution AOC(mg/L)	TOC (mg/L)	HPC (log CFU/ml)	全細菌 (log cells/ml)	ATP (pmol/L)
レジオネラ属菌 (log CFU/100ml)	1.000								
温度 (°C)	-0.194	1.000							
pH	0.221 *	0.064	1.000						
Standard-AOC (μg/L)	0.079	0.087	0.423 **	1.000					
Dilution-AOC (mg/L)	-0.150	-0.104	-0.543 **	-0.186	1.000				
TOC (mg/L)	-0.167	0.096	-0.481 **	-0.273 *	0.551 **	1.000			
HPC (log CFU/ml)	0.201	-0.309 **	-0.029	-0.081	-0.047	-0.008	1.000		
全細菌 (log cells/ml)	-0.088	0.100	-0.494 **	-0.244 *	0.552 **	0.584 **	0.215	1.000	
ATP (pmol/L)	-0.089	0.051	-0.602 **	-0.311 **	0.497 **	0.580 **	0.181	0.862 **	1.000

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

相関行列(ヒアソンの順位相関行列) (n=82)	レジオネラ属菌 (log CFU/100ml)	温度 (°C)	pH	Standard AOC(μg/L)	Dilution AOC(mg/L)	TOC (mg/L)	HPC (log CFU/ml)	全細菌 (log cells/ml)	ATP (pmol/L)
レジオネラ属菌 (log CFU/100ml)	1.000								
温度 (°C)	-0.203	1.000							
pH	0.200	0.041	1.000						
Standard-AOC (μg/L)	0.230 *	0.122	0.627 **	1.000					
Dilution-AOC (mg/L)	-0.142	-0.210	-0.180	-0.209	1.000				
TOC (mg/L)	-0.264 *	0.087	-0.373 **	-0.408 **	0.508 **	1.000			
HPC (log CFU/ml)	0.243 *	-0.296 **	0.092	-0.040	0.037	-0.005	1.000		
全細菌 (log cells/ml)	-0.203	0.069	-0.360 **	-0.398 **	0.528 **	0.619 **	0.105	1.000	
ATP (pmol/L)	-0.165	0.002	-0.481 **	-0.515 **	0.483 **	0.615 **	0.109	0.888 **	1.000

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

表2 レジオネラ属菌の検出と有機炭素量等測定結果

分類	試料数	レジオネラ属菌 陽性数(%)	測定値 (平均±SD)						
			レジオネラ属菌 (log CFU/100ml)	Standard AOC (µg/L)	Dilution AOC (mg/L)	TOC (mg/L)	HPC (log CFU/ml)	全細菌 (log cells/ml)	ATP (log pmol/L)
全試料	82	17 (20.7)	0.4 ± 0.9	33 ± 42	1.4 ± 1.0	0.8 ± 0.5	2.1 ± 1.7	5.0 ± 0.9	1.6 ± 0.9
レジオネラ陽性	17		2.0 ± 0.8	50 ± 45	1.1 ± 0.6	0.5 ± 0.4	2.8 ± 1.2	4.6 ± 0.7	1.2 ± 0.9
レジオネラ陰性	65		0	29 ± 41	1.5 ± 1.0	0.9 ± 0.5	2.0 ± 1.8	5.1 ± 0.9	1.7 ± 0.9
温度 ≥50°C	24	2 (8.3)	0.1 ± 0.5	39 ± 45	1.3 ± 1.1	0.8 ± 0.6	1.6 ± 1.5	5.2 ± 0.6	1.7 ± 0.6
<50°C	58	15 (25.9)	0.5 ± 1.0	31 ± 41	1.4 ± 0.9	0.8 ± 0.5	2.3 ± 1.8	5.0 ± 1.0	1.6 ± 1.0
pH ≤3.8	21	1 (4.8)	0.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	0	2.4 ± 1.2 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.4 ± 2.1	5.9 ± 0.7 <sup>b</sup>	2.6 ± 0.6 <sup>b</sup>
≥6.3	61	16 (26.2)	0.5 ± 1.0	45 ± 44	1.0 ± 0.6	0.6 ± 0.5	2.0 ± 1.6	4.7 ± 0.7	1.3 ± 0.8

<sup>a</sup> pH 6.3以上に対して有意に低い(Mann-Whitney *U* test, *P*<0.05)

<sup>b</sup> pH 6.3以上に対して有意に高い(Mann-Whitney *U* test, *P*<0.01)