

表 11 pH とアメーバ汚染 (>0 PFU/100mL) との関係 (単変量解析)

	p 値	オッズ比	95%信頼区間
pH6 以上	0.0244*	11.63	1.37 -98.50

\*:p<0.05 (カイ二乗検定)

表 12 pH、一般細菌数とレジオネラ汚染との関係 (多重ロジスティック回帰、49 試料)

	p 値	調整した単位オッズ比	95%信頼区間
pH	0.5655	0.86	0.52 -1.42
一般細菌 log (CFU/mL)	0.0019**	3.75	1.63 -8.64

\*\* :p<0.01 (カイ二乗検定)

表 13 pH とレジオネラ検出率および一般細菌検出率の関係 (単変量ロジスティック回帰)

	p 値	調整しない 単位オッズ比	95%信頼区間
レジオネラ陽性 (10 CFU/100mL 以上) に対する pH (49 試料)	0.0225*	1.49	1.06 -2.10
一般細菌陽性 (30 CFU/mL 以上) に対する pH (50 試料)	0.0002**	1.86	1.33 -2.55

\*:p<0.05 \*\* :p<0.01 (カイ二乗検定)

表 14 一般細菌が検出されやすい (30CFU/mL 以上) 泉質 (単変量解析)

	p 値	オッズ比	95%信頼区間
マンガン 1mg/L 以上	0.0002**	28.42	4.98-162.21
pH6 以上	0.0002**	18.33	3.90-86.14
酸消費量 400mg/L 以上	0.0393*	9.71	1.12-84.30
炭酸イオン 1mg/L 以上	0.0163*	6.86	1.42-33.01
溶存酸素 2.6mg/L 以上	0.0164*	6.25	1.40-27.93
カリウムイオン 250mg/L 以上	0.0292*	6.18	1.20-31.72
ナトリウムイオン 250mg/L 以上	0.0292*	6.18	1.20-31.72

\*:p<0.05 \*\* :p<0.01 (カイ二乗検定)

表 15 塩素消毒を行っている施設の状況

施設名	浴槽水 残留塩素 濃度(mg/L)	浴槽水 レジオネ ラ属菌	湯口水 残留塩素 濃度(mg/L)	湯口水 レジオネ ラ属菌	注入場所	注入方法
A	0	+	0	+	ヘアー キャッチャー	連続
B	0	+	0	+	不明	時間設定
C	0	+	0.1	+	配管	連続
D	ND	+	ND	+	貯湯槽	投げ込み
E	ND	+	ND	-	浴槽	不明
F	0	+	ND	-	浴槽	投げ込み
G	0.1	+	ND	ND	専用タンク	連続
H	0	-*	0	-	浴槽	投げ込み
I	ND	-	ND	+	貯湯槽	投げ込み
J	0	-	0	-	不明	不明
K	0	-	0	-	配管	時間設定
L	0.1	-	0.2	-	貯湯槽	連続
M	0.1	-	0.8	-	貯湯槽	時間設定
N	0.4	-	2	-	貯湯槽	時間設定
O	2	-	0	-	浴槽	投げ込み

\*: 1CFU/100mL、ND: 調査せず

表 16 塩素注入場所と注入方法 (まとめ)

	連続	時間設定	投げ込み	不明	計
貯湯槽	1	2	2		5
浴槽			3	1	4
配水管	1	1			2
専用タンク	1				1
ヘアーキャッチャー	1				1
不明		1		1	2
計	4	4	5	2	15

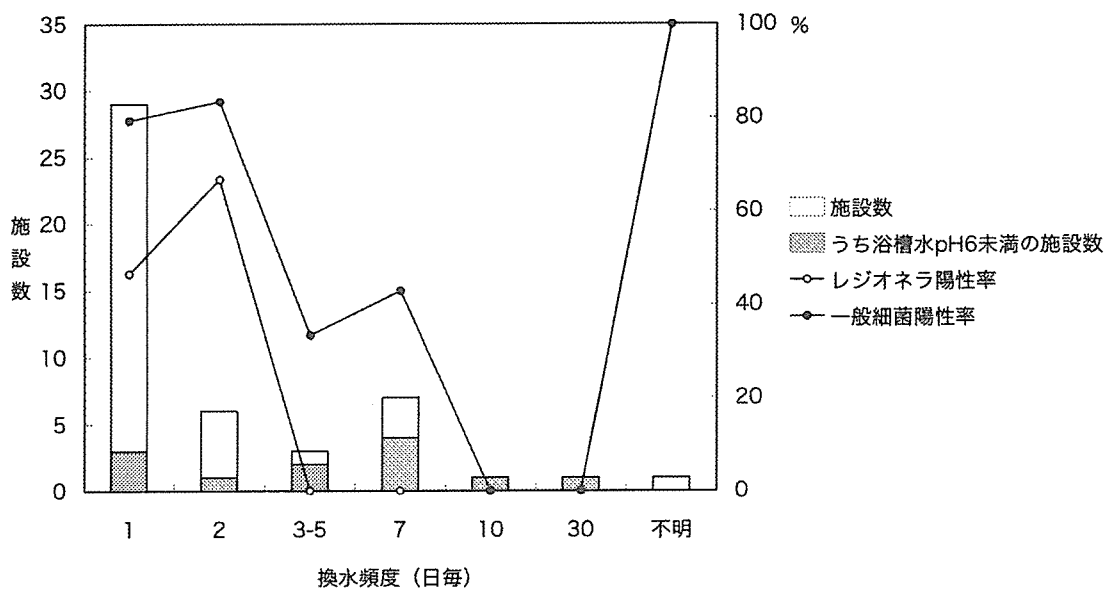


図4 浴槽水の換水頻度とレジオネラと一般細菌の検出率。

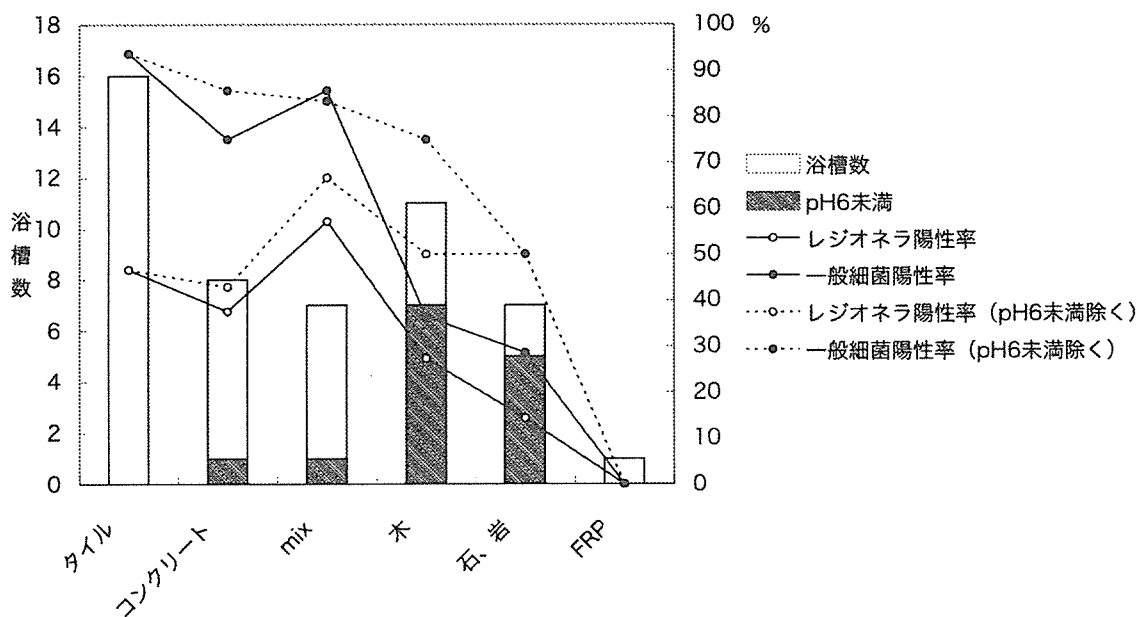


図5 浴槽の材質とレジオネラと一般細菌の検出率。

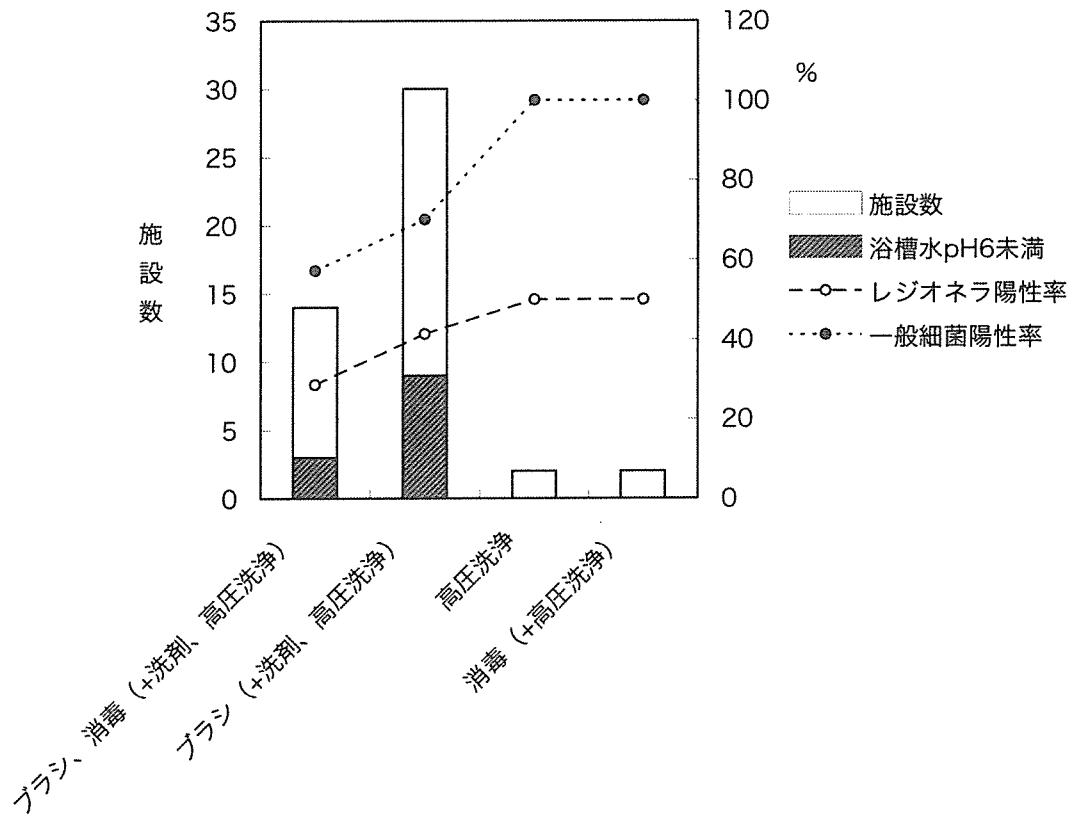


図6 浴槽の清掃方法

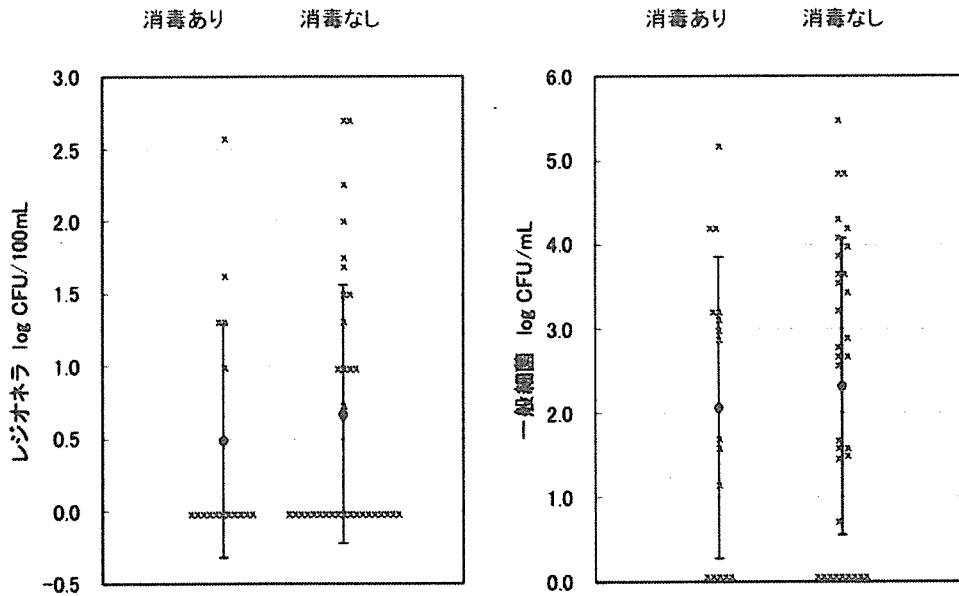


図7 浴槽の清掃時における消毒の有無と浴槽水のレジオネラ属菌数および一般細菌数との関係

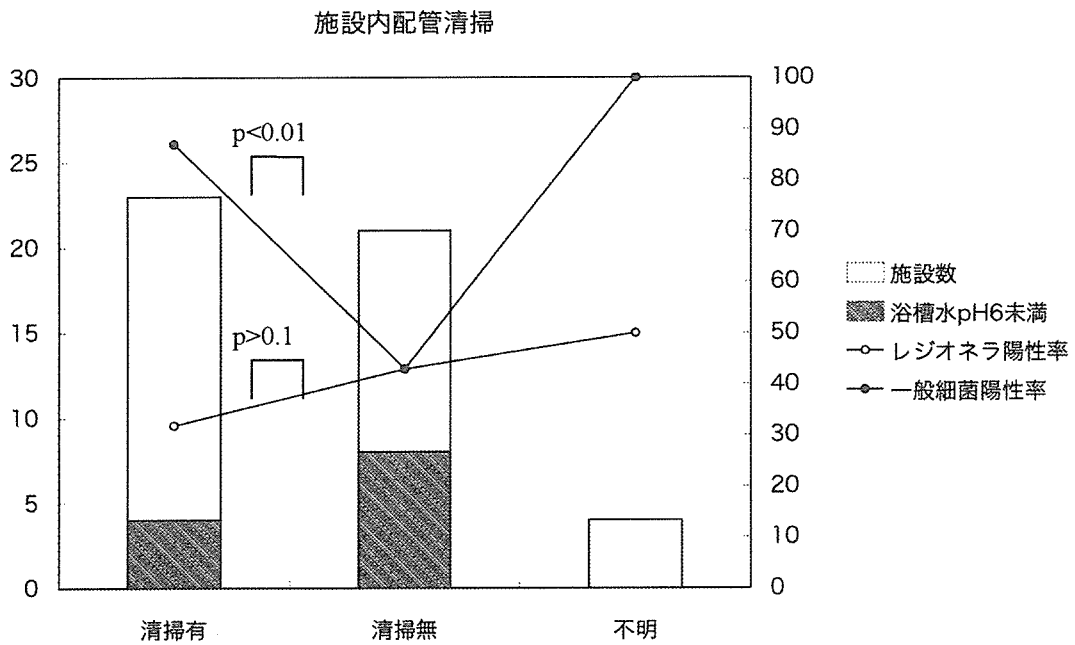
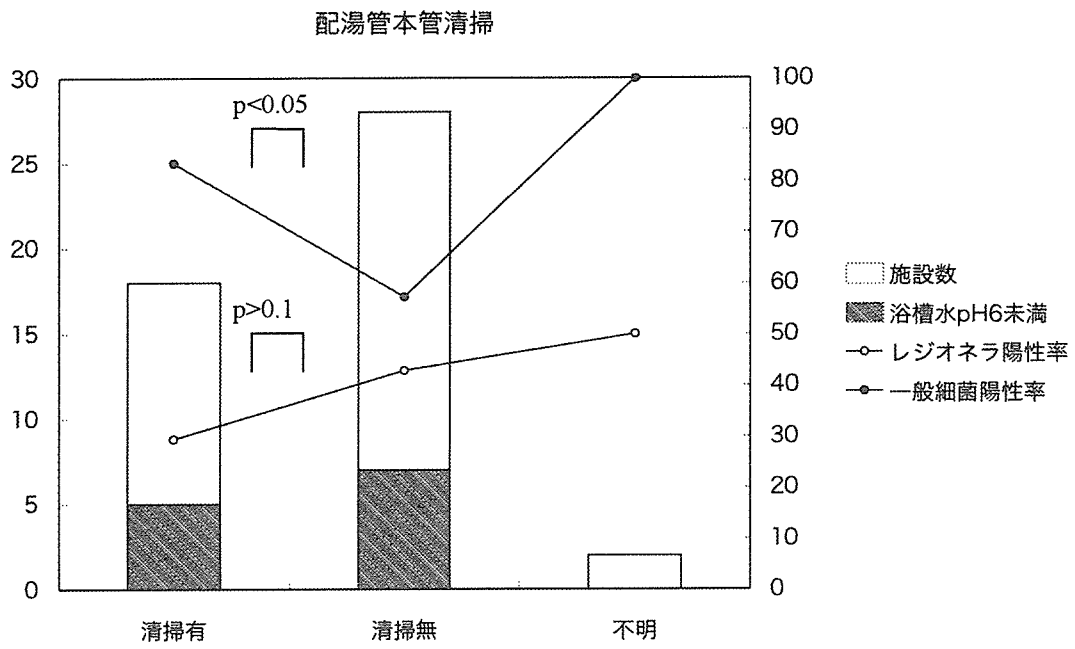


図 8 配湯管の清掃状況と微生物汚染状況  
p 値はカイ二乗検定

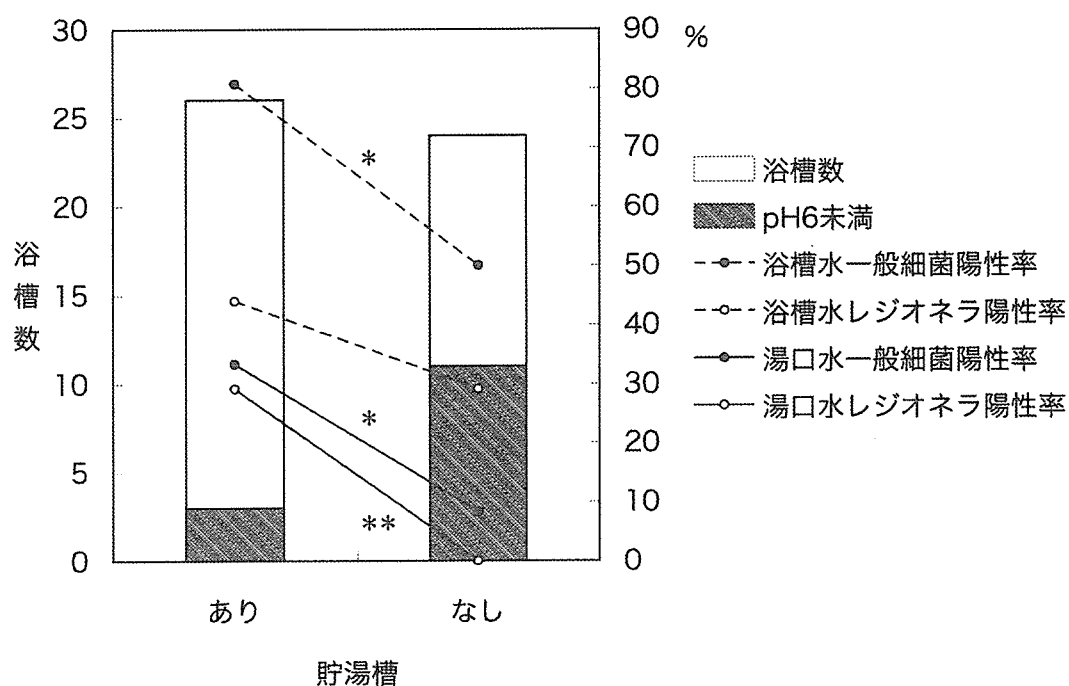


図9 調査施設における貯湯槽の有無と微生物汚染状況  
\*: $p<0.05$ , \*\*: $p<0.01$  (カイ二乗検定)

表17 貯湯槽の清掃頻度

	貯湯槽数 (計 26)	湯口水における レジオネラ陽性率 (%)	湯口水における 一般細菌陽性率 (%)
定期的	19	37	42
不定期	6	0	100
不明	1	0	0

定期的に実施	貯湯槽数 (計 19)	湯口水における レジオネラ陽性率 (%)	湯口水における 一般細菌陽性率 (%)
年に1回未満	1	0	100
年に1回	8	38	38
年に2回	2	50	50
年に3回	1	0	0
年に12回	2	0	50
年に52回	2	100	50
不明	3	33	67

表 18 貯湯槽の材質

	貯湯槽数 (計 26)	湯口水における レジオネラ陽性率 (%)	湯口水における 一般細菌陽性率 (%)
FRP	15	21	29
コンクリート	4	25	25
ステンレス	4	25	50
その他 (鉄、合成樹脂)	2	100	50
不明	1	不明	不明

表 19 貯湯槽の外気との遮断

	貯湯槽数 (計 26)	湯口水における レジオネラ陽性率 (%)	湯口水における 一般細菌陽性率 (%)
あり	20	26	37
なし	5	25	0
不明	1	100	100

表 20 貯湯槽の温度設定のための加温、加水の状況

貯湯槽の実際の設定温度が分かったものについては下に再掲した。

	貯湯槽数 (計 26)	湯口水における レジオネラ陽性率 (%)	湯口水における 一般細菌陽性率 (%)
源泉そのまま	13	36	18
加温	8	25	63
加水	5	20	20
設定温度 41-43℃	5	すべて加温	40
設定温度 50-53℃	3	加水 2、加温 1	0
設定温度 55℃	1	加温	0
設定温度 75℃	1	加温	0

## 温泉実態調査 細菌検査マニュアル

### 検体

- ・最も汚染された状態が知りたいので、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。
- ・浴槽水と注湯口の湯を検査する。TOCも測定する。
- ・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（別に泉質の調査のための1本があるが、資料3参照）。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で微生物検査、アメーバ検査用のビンに加えておく（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な事項を記録する。
- ・2本のうち1本はアメーバ分離用とし、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（下記の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  $\mu$ L）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  $\mu$ L、加熱処理したものを100  $\mu$ L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  $\mu$ L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。



### 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 6,000G、10 分（たとえば 20°C で）遠心する。上清を捨てて滅菌蒸留水を 2ml 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°C 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 0.1ml と適宜 10 倍希釈で 2~3 段階希釈した試料 100  $\mu$ L を GVPC 寒天平板（ビオメリュー）（注 6）に接種し、36 $\pm$ 1°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  $\alpha$  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. p1-6*、*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の観察をする。

これ以降、6，7，8 は国立感染症研究所細菌第一部 倉まで依頼することができる。

*L. pneumophila* については、遺伝子型やモノクローナル型の検査を感染研で行うので細菌第一部 前川まで菌株の送付をお願いします。

6. スライド凝集反応陰性の場合、PCR により *mip*、5SrRNA 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、16SrRNA の配列決定による同定を行う。

注 1: スクリュ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、使いやすいです。

注 2: ISO11731 (Water quality -- Detectioin and enumeration of Legionella) では、3000 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 分でも構いません。遠心の条件をデータに付記してください。

注 3: フィルターろ過法を使用した場合はデータに明記し、濃縮の手技は原則として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ようにしてください。そこには以下のように記されています。【検水 500ml を直径 47mm、孔径 0.45  $\mu$ 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 5ml 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つに分けてください。

注 5: 熱処理が簡単なので採用しました。毎回熱処理後に酸処理することを要求してはなりません。

注 6: ビオメリューの平板は、アクアスや静岡県環境衛生科学研によると、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で、会社名をあげました。しかし、他社の製品でも構いません。MWY 寒天平板がよいという地研がありますが、GVPC 寒天平板は必須です。今回、GVPC と MWY の比較ができて、明らかに MWY がより有効であった場合には、次年度以降の別の研究班で MWY 寒天平板が採用される可能性があります。

注 7: 基礎培地は普通寒天培地でも TSA 培地でも構いません。

## 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%CO<sub>2</sub> 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プロス（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、 $4^{\circ}\text{C}$ 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てください（注5、6）。以下の3は山崎先生に依頼します。

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濁度程度です。濁度計で調整する場合は、O.D.0.1(530nm)です。S型コロニーの場合は懸濁液を作りやすいのですが、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、精製水を加えて作ります。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に調製します。（10の7乗cfu/ml程度の生菌数になります。）

注2：1%小川培地でも良いのですが、試験管ですし単コロニーを釣菌しづらいため、Middlebrook 7H10寒天培地を勧めます。Middlebrook 7H10寒天培地は、通常シャーレにて作ります。また、培養は、5%二酸化炭素存在化で孵卵器内で湿った状態で培養するので乾きません。もし、5%二酸化炭素フランキがない場合には、ビニール袋で密封して通常のフランキでも増殖しますが、増殖速度や程度は比較的悪いです。でも、純化の目的にはこの方法でも大丈夫です。

注3：Middlebrook 7H9プロス（4ml）は、液体培地ですからスクリーキャップ付の試験管で培養してください。

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日程度かかります。増菌後なるべく早めに送っていただきたいのですが、 $4^{\circ}\text{C}$ なら2週間以内、 $-20^{\circ}\text{C}$ ならば、2006年12月24日までに感染研山崎までお送りください。

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結構です。

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ユースタックでお送りください。山崎が純化をします。

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いません。増菌用には1%小川培地を用いてください。

Middlebrookについて：Middlebrook 7H9 broth、Middlebrook 7H10 agarは、どのメーカーでも構いません。

#### お願い

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います。しかし、レベル2の菌が分離される可能性が高いので、取り扱いには注意をしてください。また、感染研へ分離菌を送られる場合には、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りますので、事前に検体数と輸送手段、輸送計画予定日を必ず、ご連絡ください。感染研のバイオセーフティーの基準が厳しくなり、輸送手段ですが、公共交通手段（電車、地下鉄、バス、タクシー等）にて持参されることは、禁じられております。病原体輸送規定にしたがって梱包し、ユースタックでお送りいただくか、自家用車でご持参ください。

### 大腸菌、大腸菌群検査法

1. 試料 10ml、1ml および 0.1ml をコリラート培地（10ml）各 3 本ずつに接種する。試料 10ml はコリラート培地の容器にそのまま接種する。試料 1ml および 0.1ml は滅菌精製水 10ml 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はありません。データに使用した製品を付記してください。）
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。

### 緑膿菌検査法

食品衛生法の緑膿菌検査法に準じます。

1. 試料 10ml、1ml および 0.1ml 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 10ml は倍濃度の培地 10ml 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	3.0g
リン酸 1 水素カリウム（無水）	1.0g
硫酸マグネシウム（7 水塩）	0.50g
精製水	1,000ml
	pH6.9~7.2

10ml 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ますが、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ますので、高圧滅菌に統一します）

2 倍量アスパラギンブイオン培地

DL-アスパラギン	6.0g
リン酸 1 水素カリウム（無水）	2.0g
硫酸マグネシウム（7 水塩）	1.0g
精製水	1,000ml
	pH6.9~7.2

10ml ずつ分注し、121℃、15 分滅菌する。

2. 35±1℃で 24±2 時間培養し、混濁があり、かつ長波長紫外線（365nm）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  $48\pm 3$  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  $24\pm 2$  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。

### 黄色ブドウ球菌検査法

1. 試料 10ml、1ml および 0.1ml 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 10ml は倍濃度の培地 10ml に接種する。 $35^{\circ}\text{C}$ 、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、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $48\pm 3$  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。

### 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（混釈法）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（混釈法）を用いて  $42^{\circ}\text{C}$  で 7 日間培養する。

### アメーバ分離法

アメーバ研究班の方法に準じて行う。平成 18 年 6 月 8～9 日に、この研究班によるアメーバ検査研修に参加された方は、それに従ってください。検査法が不明の場合は国立感染症研究所寄生動物部 八木田先生に問い合わせてください。

(資料2) 各自治体の調査概要報告書  
<自治体実態調査報告書1>

### 1 調査対象施設

管内の温泉入浴施設から、浴槽水の循環利用を行わず、清掃時に完全換水している掛け流し式の施設を対象として4施設(A～D)を選定し、浴槽水の泉質及び注湯水・浴槽水の微生物学的汚染の実態調査を行った。なお、選定した温泉の泉質は炭酸水素塩泉(Na・Ca・Mg-炭酸水素塩・硫酸塩温泉)、単純温泉(アルカリ性単純温泉)各2施設である。

### 2 施設利用状況

泉源により異なるが源泉の湯温は46～55℃であり、いずれの施設も加温は行わずに源泉からの配湯をそのまま施設に引き込み利用している。湯温は配管での自然放冷、給湯量で調節し、加水は行っていない。なお、A、Cの2施設は給湯量、湯温の調節を目的とした貯湯槽を有している。

入浴施設は4施設ともに宿泊客が到着する14時頃から利用を開始し、夜間も含め翌日の9時半頃まで入浴可能としており、利用時間内は湯口から常時注湯して浴槽水をオーバーフローさせている。

清掃は客の利用していない時間帯に実施し、浴室は毎日清掃、浴槽は利用状況(利用人数)、汚れ度合いにより1～2日に1回実施している。なお、浴槽の清掃時には浴槽水の全量を排水して入替えしている。浴槽、浴室の清掃は、ほとんどの施設が風呂用中性洗剤を散布してブラシがけをした後に流水で洗浄し、消毒を目的とした塩素系薬剤(カビ取り剤)での洗浄は2～4週の間隔で行っている。また、利用中の浴槽水の消毒を常時行っている施設はなく、1施設のみが固形の塩素剤を夜間に投入していたが、他の3施設ではなにもされていなかった。

### 3 泉質の調査

3施設は利用開始直後の14～15時頃の浴槽水を採取したが、1施設は当日換水されておらず、また、前日の利用者が比較的多かったため注湯水を採取して分析を行った。

湯温、pH値、電気伝導率、残留塩素、溶存酸素、遊離二酸化炭素は、現地で測定し、他の項目は持ち帰った検体について分析を行った。

測定した温泉成分の値と、掲示されている泉質分析表とを比較したが、泉質に著しい違いは見られなかった。これは加水がなく浴槽水の泉質に影響がなかったためと考えられる。

### 4 微生物の調査

各施設の浴槽注湯水(湯口)及び浴槽水の汚染微生物の調査を行った。浴槽水については、利用時間中に①利用開始直後(13～15時頃)、②利用負荷の大きい時間帯(22～23時頃)③翌日の朝(8～10時頃)の3時間帯(施設Aは2時間帯)に採取して調査した。

レジオネラ属菌は、注湯水からは検出されなかったが、4施設のすべての浴槽水から検出された(10～30 CFU/100ml)。アメーバは全ての検体から検出されなかった。

浴槽水の一般細菌数、従属栄養細菌は各施設ともに利用負荷が大きい22～23時に利用開始時、翌朝より多い菌数を検出した。施設Cは、利用開始時、翌朝においても比較的多い菌数であったが、これは調査当日に浴槽水の換水、清掃を行っておらず、汚染が残留していたためと思われる。また、施設Bも利用開始時において同様に前日の汚染が残留している傾向を示したが、夜間の利用負荷が小さかったためか翌朝の菌数は少なかった。また、施設Dは朝の一般細菌数、従属栄養細菌ともに大幅に菌数が減少しており、夜間(24時)に消毒剤を投入した効果が見られた。なお、注湯水の一般

細菌数はほとんど検出されず、従属栄養細菌数も 13~16 CFU/100ml の範囲で大きな汚染は見られなかった。

また、1 施設の浴槽水で大腸菌 430 MPN/100ml、大腸菌群 930 MPN/100ml を検出したが他の施設では大腸菌 3 未満~43 MPN/100ml、大腸菌群 3 未満~93 MPN/100ml と比較的少ない値であった。

その他の項目では、抗酸菌は4施設とも検出されなかったが施設Dで緑膿菌 3.6 MPN/100ml、施設Bで黄色ブドウ球菌 9.2、23 MPN/100ml を検出した。

## 5 まとめ

温泉水への加水は行っておらず、浴槽水の泉質は源泉とほぼ同じであった。

浴槽水の微生物汚染は利用負荷の大きい時間帯で多く、当日に換水、清掃を行っていない施設では利用開始時でも前日の汚染が残留し、清掃を行った施設では比較的汚染が少なかったことから、毎日の換水、清掃の重要性が再確認できた。

今回調査した施設は、いずれも比較的汚染の小さい施設であったが、レジオネラ属菌は全ての施設で検出されており、適正な衛生管理が望まれる。また、常時消毒を行っている施設はなかったが、1 施設において塩素剤の投入により消毒の効果が見られたことから、利用時間中に間欠方式の消毒剤投入もある程度は汚染対策に有効だと思われる。

## 微生物学的汚染実態調査結果

施設	検体名	採水日時	大腸菌 (MPN/100ml)	大腸菌群 (MPN/100ml)	一般細菌 (CFU/ml)	HPC (CFU/ml)	レジオネラ属菌 (CFU/100ml)	アモハ <sup>+</sup> (MPN/100ml)	緑膿菌 (MPN/100ml)	抗酸菌	黄色ブドウ球菌 (MPN/100ml)
A	注湯水	9/25 22:10	<3	<3	2	14	<10	不検出	<3	不検出	<3
	浴槽水	9/25 14:00	<3	<3	670	1670	<10	不検出	<3	不検出	<3
	浴槽水	9/25 22:15	430	930	8640	10800	10	不検出	<3	不検出	<3
B	注湯水	9/25 22:50	<3	<3	2	16	<10	不検出	<3	不検出	<3
	浴槽水	9/25 15:00	7.4	93	1460	1900	10	不検出	<3	不検出	9.2
	浴槽水	9/25 22:55	43	93	1580	7800	20	不検出	<3	不検出	23
	浴槽水	9/26 8:40	<3	<3	247	410	20	不検出	<3	不検出	<3
C	注湯水	10/16 22:10	<3	<3	1	14	<10	不検出	<3	不検出	<3
	浴槽水	10/16 13:40	<3	<3	5180	260000	10	不検出	<3	不検出	<3
	浴槽水	10/16 22:15	7	15	5220	417000	30	不検出	<3	不検出	<3
	浴槽水	10/17 9:30	15	15	2920	134000	20	不検出	<3	不検出	<3
D	注湯水	10/16 23:00	<3	<3	0	13	<10	不検出	<3	不検出	<3
	浴槽水	10/16 14:30	<3	<3	715	2230	<10	不検出	<3	不検出	<3
	浴槽水	10/16 23:05	9.2	9.2	15300	23800	20	不検出	3.6	不検出	<3
	浴槽水	10/17 8:50	<3	<3	89	160	<10	不検出	<3	不検出	<3

HPC：従属栄養細菌(42℃)

施設A：ナトリウム・カルシウム・マグネシウム-炭酸水素塩・硫酸塩温泉、調査日に浴槽の清掃有り、宿泊者数 30 人。

施設B：ナトリウム・カルシウム・マグネシウム-炭酸水素塩・硫酸塩温泉、調査日に浴槽の清掃無し、宿泊者数 6 人。

施設C：アルカリ性単純温泉、調査日に浴槽の清掃無し、宿泊者数 30 人。

施設D：アルカリ性単純温泉、調査日に浴槽の清掃有り、宿泊者数 15 人。



## <自治体実態調査報告書 2>

### 目 的

毎日換水を原則とする掛け流し式温泉において、泉質に応じた衛生的管理法を検討するため、浴槽水の化学成分・微生物の生息状況・入浴者数・湯の入れ替え頻度・消毒法・汚染指標（TOC）の状況について調査した。

### 調査方法

対象施設は9ヶ所を選定し、10月23日から12月12日にかけて各施設を採水するとともに実態調査を実施した。採取場所は各施設の湯口および浴槽の2ヶ所として「泉質測定用試料採取方法」に基づき採水し、「温泉実態調査細菌検査マニュアル」に従って検査を行った。また、レジオネラ属菌についてはLAMP法も併せて行った。実態調査は別添調査票による現地での聞き取り及び、施設管理者に作成依頼による方法で行った。

### 施設の泉質

対象施設を「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」平成17年度報告の「泉質分類」により分類した。内訳は酸性泉3ヶ所、塩化物泉1ヶ所、硫酸塩泉1ヶ所、単純泉3ヶ所、硫黄泉1ヶ所であった。

### 結 果

#### 1. レジオネラ属菌の検出結果

結果は表1の通りであった。

培養法では9施設のうち2施設の浴槽から検出され、湯口からは検出されなかった。LAMP法では9施設のうち湯口2施設、浴槽4施設が陽性となった。

泉質との関係のみてみると、培養法で検出された施設の泉質は塩化物泉1施設（施設A）、硫黄泉1施設（施設B）であった。

LAMP法の結果については、培養法で検出された施設ではLAMP法でも陽性であり、培養法で検出されずにLAMP法で陽性の施設は酸性泉1施設（湯口浴槽とも陽性）と単純泉の2

施設（湯口1施設、浴槽1施設）であった。

また、塩素消毒を行っている施設は9施設中5施設あり、培養法でレジオネラ属菌が検出された2施設は塩素消毒を行っている施設であった。

表 1

泉質	施設数	培養		LAMP法	
		湯口	浴槽	湯口	浴槽
酸性泉	3	0	0	1	1
塩化物泉	1	0	1	0	1
硫酸塩泉	1	0	0	0	0
単純泉	3	0	0	1	1
硫黄泉	1	0	1	0	1
計	9	0	2	2	4

#### 2. 施設Aについて（塩化物泉）

浴槽の細菌検査結果は、レジオネラ属菌について20CFU/100ml、LAMP法陽性、従属栄養細菌850/ml、大腸菌及び大腸菌群とも2MPN/100ml、黄色ブドウ球菌2MPN/100mlであり、アメーバ・緑膿菌・抗酸菌は検出されなかった。

清掃方法はお湯の換水時に洗剤を使用して高圧ブラシ洗浄、水洗後塩素剤使用して消毒、浴室内壁面も毎日行うことになっているが、浴槽に木製の溝になっている部分があり、ここにバイオフィルムが発生し浴槽を汚染したものと推定された。また、塩素消毒の方法は毎日営業開始前に液体塩素を投入する方法であるが、昼過ぎには残留塩素濃度は0.1mg/l未満であった。

以上のことから、レジオネラ属菌が検出された原因は清掃及び塩素消毒が不十分であったと推定され、清掃の徹底と塩素量の調整と残留塩素の測定記録について指導を行った。指導後の検査ではレジオネラ属菌の検査結果は10CFU/100ml未満となった。

### 3. 施設Bについて（硫黄泉）

浴槽の細菌検査結果は、レジオネラ属菌検査について、培養法ではレジオネラ属菌の発育はあったが菌数は10 CFU/100ml未満、LAMP法陽性であった。従属栄養細菌 380/ml、一般細菌数 810/ml、大腸菌 11MPN/100ml、大腸菌群 17 MPN/100ml、アメーバ・緑膿菌・抗酸菌・黄色ブドウ球菌は検出されなかった。

レジオネラ属菌の結果であるが、濃縮未処理液と濃縮加熱処理液を100 $\mu$ l接種したGVPC培地には発育せず、濃縮未処理液を10倍希釈した100 $\mu$ l接種したGVPC培地2枚に1個だけ発育した。この施設は塩素消毒を行っており、ダメージを受けながらも菌が発育したと思われる。また、温泉成分中に阻害物質があり検査に影響したことも考えられる。

この施設は自主検査で源泉からレジオネラ属菌が検出されたことがあり、塩素消毒をして衛生管理を行っている状況であるが、今回湯口からは培養法、LAMP法とも検出されなかった。

源泉温度が44.7 $^{\circ}$ Cと低く、配湯量(7.5 $\ell$ /min)と浴槽容積(1.35 $m^3$ )から浴槽の入れ替え時間を想定した場合、3時間と長いことから、浴槽にバイオフィームを作りやすく、清掃を徹底しないとバイオフィームを落としきれないのではないかと考えられた。

塩素消毒の方法は1日3回(9時・13時・20時から清掃で清掃後)、薬剤を浴槽に投入する方法である。採水した15時は塩素投入後2時間後であったが、残留塩素濃度の測定値は0.1mg/ $\ell$ 未満で、塩素が温度や入浴者の汚れなどで消費されてしまったと考えられた。

### 4. 湯口でLAMP法陽性の施設について

湯口のレジオネラ属菌が培養法は陰性であるが、LAMP法で陽性であった施設が2施設あった。2施設とも温度調整のため、湯口の手前で直接管に加水を行う施設である。

ひとつは酸性泉で、水道水を加水している。

もう一方の施設は単純泉で、加水に沢水を使用しており、配湯管の清掃を行ったことはない。塩素剤を浴槽に朝晩投入しているが、入れ替え時間4.5時間(配湯量30 $\ell$ /min浴槽容積8 $m^3$ )を考えると塩素量が一定に保たれているとは言い難い。また、当該施設の湯口はお湯がやや斜めに上に噴出す形で、エアロゾルが発生する構造となっていた。

加水が原因かどうかはさらに調査する必要があると思われる。また、培養では検出されなかったがLAMP法でレジオネラ属菌の存在が疑われ、衛生管理方法に注意が必要であると思われる。

### 考 察

今回の調査対象施設はレジオネラ属菌が生息しないと推察される酸性泉3施設を含め9施設のうち5施設が塩素消毒を行っていた。レジオネラ属菌が10CFU/100mlを超えて検出された場合、条例で営業自粛を行うこととなっているため掛け流し式温泉においても、取り扱いが簡便でコストが安価な塩素消毒に頼っていると考えられた。レジオネラ属菌が検出されたのは2施設、行政指導したのはそのうち1施設であった。

ただし、培養法で検出された2施設も塩素消毒による衛生管理を行っているが、塩素剤をいれたという安心感からか、量も一定ではなく、残留塩素濃度の測定も1日1回の施設と測定していない施設であった。他の施設でも、多量の塩素剤を投入しているなど、検証や記録等の管理が行われていない施設が多かった。塩素消毒の特性を理解して管理を行うことが必要であると考えられた。

また、塩素消毒のみが適切な衛生管理ではなく、泉質や清掃方法を考慮した衛生管理が必要であると思われる。

## <自治体実態調査報告書3>

### 【調査対象および検体採取】

平成18年9～12月、管内の掛け流し式温泉を有する8施設を対象とした。8施設中7施設が塩化物泉系、1施設が硫黄泉系であった。検体は浴槽に入る湯口及びその浴槽の温泉水から採取した。また、レジオネラ属菌が検出された施設のうち1施設については、施設との協議後、原因究明のための再調査を行った。

### 【方法】

#### 1. 泉質の分析検査

アクアス株式会社つくば総合研究所へ依頼した。

#### 2. 微生物学的検査

当所で実施した。調査対象施設の湯口水及びその浴槽水を試料とした（計16検体）。なお、浴槽水は営業終了近くの終い湯を検査に供した。検査項目は、レジオネラ属菌、アメーバ数、従属栄養細菌数、一般細菌数、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である。各検査方法は本研究実態調査細菌検査マニュアルに従った。

再調査では、湯口、浴槽、さらに上流域である湯圧調整弁付近、屋外貯湯槽、源泉井戸、計5カ所の温泉水を検査対象とした。

#### 3. 湯温、pH、遊離残留塩素濃度

現地で測定した。

### 【結果】

#### 1. レジオネラ属菌検査結果

8施設中5施設（62.5%）、16検体中9検体（56.3%）からレジオネラ属菌が検出された。そのうち湯口水では8検体中4検体（50.0%）、浴槽水では8検体中5検体（62.5%）から検出された。湯口、浴槽水ともに検出された施設は4施設（50.0%）であった。分離されたレジオネラ属菌は、*Legionella pneumophila* 血清群1、4、5、6、UT、*L. birminghamensis*、*L. maceachernii*、*L. micdadei*

であった。最も分離頻度が高かったのは *L. pneumophila* で、5施設中4施設から分離された。複数種類（血清群を含む）確認された施設は3施設で、それらの施設からは、*L. pneumophila* 血清群1及び6、*L. pneumophila* 血清群6及び *L. maceachernii*、*L. pneumophila* 血清群4及びUTさらに *L. micdadei* が検出された。検出菌数は、湯口水で  $10^1$  台が2施設、 $10^2$  台が2施設、浴槽水で  $10^1$  台が3施設、 $10^2$  台が2施設であった。湯口、浴槽水ともに検出された施設では、4施設中3施設で湯口水のレジオネラ属菌数が多かった。

再調査を行った施設は、浴槽水から *L. pneumophila* 血清群4、UT が、湯口水から *L. micdadei* が分離された施設である。再調査の結果、検査対象5カ所のうち、湯口を除く4カ所からレジオネラ属菌が検出された。分離された種類は、浴槽水で *L. pneumophila* 血清群UT、*L. micdadei*、湯口を挟みさらに上流域である湯圧調整弁付近及び屋外貯湯槽で *L. pneumophila* 血清群4、UT、*L. micdadei*、源泉井戸で *L. pneumophila* 血清群UT が分離された。

#### 2. その他の微生物学的検査結果

アメーバは3施設の浴槽水から検出され、うち1施設では湯口水からも検出された。一般細菌は1施設の湯口水を除き検出され、その菌数は湯口水に比べ浴槽水の方が数倍～約10万倍多かった。従属栄養細菌は全検体から検出され、その菌数は湯口水に比べ浴槽水の方が数倍～約90万倍多かった。大腸菌は6施設から検出されたが、湯口水からは検出されなかった。大腸菌群は8施設全てで検出され、1施設では湯口水からも検出された。大腸菌、大腸菌群数ともに、多い施設では460～1100MPN/100ml 確認された。緑膿菌は5施設から検出され、うち2施設では湯口水からも検出された。黄色ブドウ球菌は5

施設から検出されたが、湯口水からは検出されなかった。緑膿菌、黄色ブドウ球菌数ともに、多い施設では 1100MPN/100ml 以上確認された施設が 2 施設あった。抗酸菌は全施設から検出されなかった。

### 3. 湯温、pH、遊離残留塩素濃度

今回調査した検体の湯温は、湯口水では 39.0～54.0℃、浴槽水では 38.4～45.5℃の範囲であった。pH は、湯口水では 6.10～9.29、浴槽水では 6.24～9.28 の範囲であった。

常時塩素消毒を行っている施設が 2 施設あったが、遊離残留塩素が確認できたのは 1 施設の湯口水のみであり、0.12mg/L であった。この遊離残留塩素が確認された施設は再調査の対象施設であり、再調査での遊離残留塩素濃度は湯口水で 0.20mg/L、浴槽水で 0.15mg/L であった。残る 3 カ所の調査地点（湯圧調整弁付近、屋外貯湯槽、源泉井戸の温泉水）の遊離残留塩素濃度は、本施設での塩素剤投入場所が湯圧調整弁より下流側であったことから、全て検出限界未満であった。

#### 【考察】

レジオネラ属菌が複数種類（血清群を含む）確認された施設が 3 施設あった。分離培地上に出現してくるまでの日数が種類によって異なる場合があったことから、10 日間の培養期間中は、注意して観察する必要があると思われる。レジオネラ属菌が湯口、浴槽水ともに検出された施設では、4 施設中 3 施設で湯口水のレジオネラ属菌数が多かった。これは、浴槽水検体では分離培地上でレジオネラ属菌よりも他の雑菌が旺盛に繁殖したことによるものと考えられ、実際のレジオネラ属菌数は検出菌数よりも多い可能性がある。

今回の調査では、レジオネラ属菌の検査結果とレジオネラ属菌数の増加と関連の深い

アメーバや従属栄養細菌に対する検査結果、さらには大腸菌群等その他の細菌検査結果とを関連付けることはできなかった。

掛け流し式温泉は、一般的には微生物汚染が少なく非常に衛生的であるかのようなイメージとして思われがちである。しかしながら、今回の調査が浴槽水において終い湯であったことを考慮しても、半数以上の施設からレジオネラ属菌が検出されたこと、全施設から大腸菌群が検出され、また相当数の大腸菌、大腸菌群が検出された施設があったこと（「公衆浴場における水質基準等に関する指針」では大腸菌群は 50ml 中に検出されないこととなっている）、緑膿菌、黄色ブドウ球菌が相当数検出された施設があったこと、施設によってはこれら細菌が、湯口からも検出され、さらに上流域での汚染等の可能性も考えられたことから、掛け流し式温泉においても、これまで以上に衛生管理（入浴マナーを含め）に注意を払う必要があると思われる。

再調査施設では、日常的に塩素による消毒を行っていた。しかしながら、通常湯口から浴槽にかけて、遊離残留塩素濃度を 0.20mg/L（「公衆浴場における衛生等管理要領」での推奨濃度 0.20～0.40mg/L）に手動調整することになっていたが、1 回目の調査では湯口水で 0.12mg/L、浴槽水では 0.05mg/L 未満であった。再調査では湯口水で 0.20mg/L、浴槽水で 0.15mg/L であった。レジオネラ属菌が再調査の湯口水を除き検出されたことから、遊離残留塩素濃度が 0.2mg/L 未満であった場合、その効果が著しく低下していることが判明した。本施設では、源泉井戸からレジオネラ属菌が検出されたこと、屋外貯湯槽ではさらに外部環境からのレジオネラ属菌の混入増殖が示唆されたことから、貯湯槽を含む配管系の清掃消毒、