

平成 28-30 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
「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」
平成 28 年度分担研究報告書

「原湯等の糞便汚染指標菌及び検査法について」

研究代表者	前川純子	国立感染症研究所
研究分担者	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所
研究分担者	森本 洋	北海道立衛生研究所
研究分担者	磯部順子	富山県衛生研究所
研究協力者	緒方喜久代	大分県薬剤師会検査センター
研究協力者	倉 文明	国立感染症研究所

研究要旨

公衆浴場における水質基準等に関する指針においては原湯等の水質基準では、「水質基準に関する省令」(平成 4 年厚生省令第 69 号)に準じて糞便汚染指標として大腸菌群が 50ml 中に検出されないこととされている。水道の水質基準は平成 15 年に改訂され、糞便汚染指標菌は大腸菌群から大腸菌に変更され、検査法は特定酵素基質法が採用された。水道の水質基準において糞便汚染指標菌を大腸菌群から大腸菌に変更した経緯を参照し、原湯等の水質基準における大腸菌群を水道水の水質基準に準じて大腸菌に変更することの妥当性を検討した。検討の結果、原湯等における糞便汚染指標菌を大腸菌群から大腸菌に変更し、大腸菌検査に特定酵素基質法を適用することは妥当と考えられた。ただし、原湯等の性状によっては、そこに生息あるいは汚染する菌には、特定酵素基質法における反応において大腸菌様態度を呈する菌が存在し、偽陽性となる場合があることを留意する必要がある。

A. 研究目的

公衆浴場における水質基準等に関する指針においては、原湯、原水、上り用湯及び上り用水(以下「原湯等」)の水質基準は、
ア 色度は、5 度以下であること。
イ 濁度は、2 度以下であること。
ウ 水素イオン濃度は、pH 値 5.8~8.6 であ

ること。

エ 過マンガン酸カリウム消費量は、10mg/L 以下であること。
オ 大腸菌群(グラム陰性の無芽胞性の桿かん菌であって、乳糖を分解して、酸とガスを形成するすべての好気性又は通性嫌気性の菌をいう。)は 50mL 中

に検出されないこと。

カ レジオネラ属菌は、検出されないこと
(10cfu/100mL 未満)

と定められている。また、検査法は

ア 色度、濁度、水素イオン濃度、過マンガン酸カリウム消費量及び大腸菌群の検査方法は、それぞれ「水質基準に関する省令」(平成4年厚生省令第69号)で定める検査方法によること。

イ レジオネラ属菌の検査方法は、冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによること。また、その具体的手順は、「新版レジオネラ症防止指針」の「<付録> 1 環境水のレジオネラ属菌検査方法」を参照すること。

とされている。

一方、水道法第4条に基づく水質基準は、平成15年5月30日に水質基準に関する省令(厚生労働省令第101号)が発出され、新たな基準が定められた。新しい基準では、大腸菌群は大腸菌に変更され、検査法も新たに規定された。

そこで、変更後の水質基準で規定された検査法を原湯等に適用することの妥当性を検討した。

B. 方法

平成15年5月30日付けで行われた水質基準の変更の議論を後ろ向きに検証し、水質基準における大腸菌群から大腸菌への変更の経緯を確認した。

原湯等を対象にした大腸菌の検査法の妥当性及び制限等について、文献収集等に基づいて議論し、検証を行った。

C. 結果及び考察

1) 水道の水質基準における「大腸菌群」から「大腸菌」への改定の経緯

水道水の水質基準の改定は、消毒副生成物として種々の化学物質の問題が提起されていること、クリプトスポリジウム等の耐塩素性病源性微生物の問題が提起されていること、世界保健機関(WHO)が飲料水水質ガイドラインを全面的に改定すべく作業を進めていること、規制改革や公益法人改革の流れの中、水質検査についての見直しなど水道水質管理の分野においても、より合理的かつ効率的なあり方を検討すべきことが求められていることにより、平成14年7月24日に厚生労働大臣から厚生科学審議会に対して水質基準の見直し等についての諮問がなされた。これに対して厚生科学審議会生活環境水道部会の4回の開催と、厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会における9回の協議を経て、平成15年4月28日に厚生科学審議会から答申があり、これを踏まえて厚生労働省として水質基準等に係る制度の制定・改正が行われた。

水質基準の改定の協議を行った厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会においては、糞便汚染指標菌としての大腸菌群、大腸菌のそれぞれの有用性等についての確認が行われ、大腸菌群を大腸菌に変更することについての検討が行われた。

第2回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会においては、水質基準設定に当たっての考え方を再確認する目的で、微生物に係る基準項目についての基本的考え方を整理し、大腸菌群の定義と基準を以下のようにまとめた(文献1)。

定義：グラム陰性、無芽胞の桿菌で乳糖を分解して酸とガスを生じる好気性または通性嫌気性の菌をいう。大腸菌群には人畜の糞便に由来するものと、土壌等に由来するものがある。従って、大腸菌群の存在自体が直ちに糞便性汚染を意味するものではないが、病原生物により汚染されている疑いを示している。

基準値：人畜の排泄物等による汚染度を示す指標であることから、病原生物により汚染されていることを疑わせない値として、現行どおり検出されないこと。

第3回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会においては、水質に関する基準の見直し等に係る基本的考え方が提示された（文献2）。水道水を介して伝播する病原微生物は主に腸管系の病原微生物であり、糞便による水の汚染が原因となる。そのため、糞便性汚染指標として「大腸菌群数」が、現存量指標（また塩素消毒が適正に行われているか否かの判定指標）として「一般細菌」が規定されているとした。さらに、最新の知見に照らして見直されるべきであるとし、専門委員会において指標としての「大腸菌群」の再評価を行うこととした。具体的には、「大腸菌群」に替えて糞便由来である「大腸菌」を水質基準とすることの是非を協議するという、微生物指標に関する委員会の方向性が示された。

第4回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会においては、委員会委員以外の微生物学の専門家等の協力のもとに行われた微生物指標に関する協議の内容

が提示された（文献3）。以下にその概要を示す。

大腸菌群：*Escherichia* 属、*Citrobacter* 属、*Enterobacter* 属および *Klebsiella* 属からなる細菌群で、環境が整えば外界でも増殖することができる。そのため、糞便汚染としての特異性を欠き、糞便汚染との因果関係に乏しく、必ずしも糞便汚染の指標として精度が高いとはいえない。大腸菌群を糞便汚染指標とするのは大腸菌群の方が大腸菌あるいは他の糞便性指標微生物よりも多数存在するため、安全側の指標検査方法とされるからである、との意見がある。しかしながら、指標的価値の高さと数の多さのいずれかを選択するかは議論の余地がある。大腸菌群が検出される状況では、数の上で糞便性大腸菌群が大多数を占める場合が一般で、検出が容易である。菌量が多く、環境中で大腸菌よりも長命であることから、ある程度時間の経過した、あるいはより遠くの発生場所での糞便汚染を表現し得る。検査法としては、大腸菌群と大腸菌を同一の培地で同時に検出することができる。

大腸菌：人および動物の糞便から検出され、外界での増殖が無いことから糞便性の指標としての信頼性が高い。クリプトスポリジウムの暫定対策指針で、大腸菌が糞便汚染、ひいてはクリプトスポリジウム汚染の可能性を示す指標と位置付けられており、これらとの整合性を図る必要が

ある。他の糞便指標細菌と比べると環境中での生存期間が短く、塩素に対して感受性が高いことから用途が限られるとの説もある。他の糞便指標細菌と比べると環境中での生存期間が短いため、より特異的である。「特異性が高い分、検出量が少ない？」という問題点がある。

第6回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会においては、「大腸菌群」を「大腸菌」に替えることについて、以下のように議論が行われた(文献4)。水質基準項目である「大腸菌群」の再評価を行ったところ、「大腸菌群」に代えて直接的に糞便由来である「大腸菌」を水質基準とし、水質基準項目として「大腸菌」：検出されないこと(ただし、検水量は100ml)とすることが適当であるとされた。その理由として、大腸菌群が採用されたのは、単に旧来の培養技術が制約となっていたにすぎず、大腸菌群を代替指標として用いてきたが、糞便汚染の指標性は低い。水道水の品質保証という観点から糞便汚染の検知には高い精度が求められ、大腸菌は糞便汚染の指標として適当と判断される。今日では迅速・簡便な大腸菌の培養技術が確立されており、技術的問題は解決されている。大腸菌の検査方法は、(1)乳糖ブイヨン・ブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイヨン培地法、(2)特定酵素基質培地法のいずれかの方法によることが案として示された。この案に対して、委員会で特定酵素基質法による大腸菌の検査についての協議が行われた。特定酵素基質法はすでに複数のメーカーの製品が評価されており、試験法として問題がないこと

が確認され、特定酵素基質培地法を採用することが決定した(文献5)。

2)「大腸菌」を基準として原湯等への適用とその検査法の妥当性

水道水の糞便汚染の指標菌を大腸菌群から大腸菌に変更した経緯は、厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会における議論に示されたとおりである。検査法が進歩した現在では、大腸菌を検出することが容易になり、糞便汚染指標として大腸菌の有無を水質基準とした。これを原湯等の水質基準とすることに問題はないと考えられる。

水道水及び水道原水・表流水を対象として、乳糖ブイヨン・ブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイヨン培地法(LB-BGLB法)と特定酵素基質法を比較した場合、特定酵素基質法はLB-BGLB法と同等あるいはそれ以上の感度で大腸菌群及び大腸菌を検出することができると報告されている(文献6-9)。特に、大腸菌の検出は高い一致率を示している。さらに、特定酵素基質法はLB-BGLB法に比較して操作が簡単で、結果が得られるまでの時間が短縮されるという利点も備えている。

水道水や水道原水、表流水を対象にした特定酵素基質法と従来法の比較による評価を行った調査は数多くあるが、温泉水を対象としてLB-BGLB法と特定酵素基質法を比較検証した報告は少ない。しかし、特定酵素基質法は温泉水を対象にしてもLB-BGLB法と同等の結果が得られることが報告されている。すなわち、湧らが飲用温泉水を対象にして検討した報告(文献10)によれば、LB-BGLB法と特定酵素基質法で

あるMMO法及びX-GAL法を比較したところ、飲用泉での3法の一致率は90.0%であった。

3) 特定酵素基質法の適用の問題点

特定酵素基質法はLB-BGLB法と同等の性能を有していることが報告され、また、操作が容易であるという利点がある。その一方で、特定酵素基質法の問題点が指摘されている。原湯等のように様々な性状を示す水試料では使用に際して留意が必要である。既に報告されている留意点を記載する。

銅を20 mg/LあるいはH₂Sを52.6 mg/Lを含む試料では、特定酵素基質法で大腸菌群及び大腸菌の発育が阻害され、発色反応を呈さなかった(文献10)。X-GAL法の場合、低pHあるいは高塩濃度の試料では発色反応が遅延する場合がある(文献9, 10)。判定が困難になるほどではないが、強い着色と強混濁を示した天然温泉水の検査では、大腸菌群の判定が困難になるケースがMMO法で数例認められた(文献10)。Aeromonas属やVibrio属の海洋細菌を含む水試料を検査対象とすると、β-グルクロニダーゼ陽性菌があり、大腸菌群が偽陽性となることが報告されている(文献11, 12)。また、海水中にはβ-グルクロニダーゼ及びβ-ガラクトシダーゼ活性を持つ藻類等が含まれ、大腸菌が偽陽性となる場合がある(文献12)。

D. まとめ

糞便汚染の指標として大腸菌群を大腸菌に変更することは、検査技術の進歩に伴って妥当であるとされている。特定酵素基質法は、従来より用いられているLB-BGLB

法と同等あるいはそれ以上の感度で大腸菌を検出することが可能であるとして、水道水の水質基準の微生物汚染(大腸菌)の検査法として採用されている。従って、原湯等における糞便汚染の指標として大腸菌群を大腸菌に変更することは、水道水の水質基準と同様に妥当であり、検査法も特定酵素基質法を適用することができると思われる。ただし、原湯等の性状は水道水よりも多様であり、その性状によっては偽陽性あるいは偽陰性を呈することがあり、注意を要する。

E. 参考文献

1. 第2回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会、平成14年9月4日 資料6-1 現行の水質基準の考え方について
2. 第3回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会、平成14年10月7日 資料2 水質に関する基準の見直し等に係る基本的考え方(素案)
3. 第4回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会、平成14年11月8日 資料2-1 微生物に係る基準の考え方(案)
4. 第6回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会、平成15年2月3日 資料2 微生物に係る基準について
5. 第6回厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会、平成15年2月3日 議事録
6. 高野敬志、他：「特定酵素基質法」および「LB-BGLB法」による大腸菌群試験結果および陽性分離菌から考察した両試験方法の一致率について 北海道立

衛生研究所報 1995;45:54-57.

7. 上田修、他：水質検査における酵素基質培地の適用と本培地により検出された大腸菌群の菌種の検討 日本食品微生物学会雑誌 2003;20:111-116.
8. 淵祐一、他：飲料水大腸菌群試験における MMO-MUG 法と従来法との比較検討 大分県衛生環境研究センター 1993;21:50-53.
9. 勢戸和子、他：大腸菌群および大腸菌検査におけるフルオロカルト・ラウリル硫酸 X-GAL ブイヨンの評価 日本食品微生物学会雑誌 1996;13:69-73.
10. 淵祐一、他：発色酵素基質培地の飲用温泉水への適用 - LB-BGLB 法と発色酵素基質培地法との比較 - 日本食品微生物学会雑誌 1998;15:153-160.
11. Palmer CJ, Tsai YL, Lang AL, Sangermano LR.: Evaluation of colilert-marine water for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in the marine environment. Appl Environ Microbiol. 1993;59(3):786-90.
12. 井山洋子、磯部順子：コリラート・MW による海水域の大腸菌群測定について 富山県衛生研究所年報 1995;18:143-150.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし