

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）

公衆浴場の衛生管理の推進のための研究

令和6年度分担研究報告書

浴槽水における大腸菌検査法の検討

研究分担者 中西典子 神戸市健康科学研究所

研究協力者 小松頌子 神戸市健康科学研究所

研究協力者 武藤千恵子 東京都健康安全研究センター

研究協力者 梅津萌子 東京都健康安全研究センター

研究協力者 高久靖弘 東京都健康安全研究センター

研究協力者 佐々木麻里 大分県衛生環境研究センター

研究要旨：公共用水域の水質汚濁を防止するため、近年、放流水の基準が大腸菌群数から大腸菌数へと改正されている。本研究では、浴槽水における大腸菌検出法を検討するため、いくつかの特定酵素基質寒天培地の特徴づけと菌数比較を行い、実際の浴槽水における大腸菌の検出状況を定量・定性試験により調査した。特定酵素基質寒天培地では、培地によってコロニーの識別のしやすさや生育するコロニー数に差があり、一部の培地では大腸菌が非定型色を示すことが分かった。実際の浴槽水 126 検体のうち、定量法および定性法により 13 検体 (10.3%) から大腸菌が、15 検体 (11.9%) から大腸菌群が検出された。青色を呈するコロニーは大腸菌であり、赤色を呈するコロニーはエンテロバクター属、シトロバクター属、セラチア属が多かった。また、大腸菌の定性試験では、温泉水では偽陰性となる可能性があることが明らかとなった。

A. 研究目的

これまで、環境基本法に基づく水質汚濁に係る環境基準の内、生活環境の保全に関する環境基準（生活環境項目環境基準）における糞便汚染の指標には、大腸菌群が用いられてきた。大腸菌群には糞便由来の細菌の他、水系や土壤に生息する自然由来の細菌も含まれる。そのため、糞便汚染の指標性は低いというのが今日の国際的な理解となっている。一方で、大腸菌はヒトを含む温血動物の糞便由来の細菌の中で最

も菌数が多く、糞便汚染の指標として信頼性が高かったが、他の細菌と区別して大腸菌のみを検出することができないという、培養技術の制約があった¹⁾。

しかしながら今日では、特定酵素基質培地を用いることで大腸菌を簡便かつ迅速に検出できるようになった²⁾。本培地は、大腸菌が特異的に産生する酵素 β-グルクロニダーゼが分解する発色または蛍光基質を用いて、コロニーの色や培地の蛍光により大腸菌を検出できる。同時に、大腸菌

群が特異的に産生する β -ガラクトシダーゼを利用した反応によって、大腸菌と大腸菌群を区別することができる。このように、簡便な大腸菌の検出技術が確立されたことから、生活環境項目が大腸菌群数から大腸菌数へと見直された³⁾。以上の状況を踏まえ、公共用水域の水質汚濁を防止するため、下水放流水に関して、大腸菌群数から大腸菌数へ基準項目の改正が行われている^{4, 5)}。

公衆浴場の浴槽水の水質基準は、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」において、「大腸菌群は、1個/mL以下であること」、大腸群菌の検査方法は「下水の水質の検定方法によること」と定められている⁶⁾。しかしながら、上述のように、下水放流水の基準項目の改正に伴い、検定方法も改訂され、令和7年4月1日より施行される⁷⁾。

本研究では、浴槽水における水質基準が大腸菌群から大腸菌へと改正されるのに先立ち、浴槽水の大腸菌検査方法の比較検討と実際の浴槽水における大腸菌の検出状況を調査した。

B. 研究方法

1. 大腸菌と大腸菌群菌株を用いた特定酵基質寒天培地の特徴付けと菌数比較

特定酵素基質寒天培地は、ES コリマーク寒天培地（栄研化学）、アキュディアTMXM-G 寒天培地（島津ダイアグノスティクス）、クロモアガーTMECC 寒天培地（関東化学）、クロモカルトコリフォーム寒天培地（Merck）、Pro・media アガートリコ

ロール（エルメックス）の5種類を用いた（表1）。以降は匿名化のため、培地A、培地B、培地C、培地D、培地Eとする。

供試菌株は、*Escherichia coli* ATCC25922、大腸菌群として *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705、*Serratia* 属菌（*S. liquefaciens* NCTC10442 または環境由来 *S. marcescens*）とした。なお、定義としての大腸菌群には大腸菌も含まれるが、以下、「大腸菌群」は「大腸菌」以外の大腸菌群とする。各菌種の菌液を 10³ CFU/mL に調整し、*E. coli*、*K. pneumoniae* は 100 μL、*Serratia* 属菌は 50 μL、3 菌種の混合菌液は 100 μL を添加し、混釀培養した。各菌種の生育コロニー数を同程度にするため、3 菌種の混合菌液は、*E. coli* : *K. pneumoniae* : *Serratia* 属菌 = 2:2:1 の割合で混合した。培養時間・培養温度はマニュアルに従った。3 枚の菌数を平均し、現行の大腸菌群試験に用いられるデソキシコレート寒天培地（Merck）に生育した菌数を 1 としたときの各培地の菌数について、t 検定を用いて評価した。

2. 実際の浴槽水における大腸菌・大腸菌群検出状況

入浴施設 126 施設の浴槽水を用いた。浴槽水の泉質と採水時の遊離残留塩素濃度または結合残留塩素濃度の内訳を表 2 に示した。特定酵素基質寒天培地は、培地 A、培地 B、培地 D を用いた。検体 1 mL を混釀培養し、コロニーの色調に基づいて菌数を計数し、2 枚の平均値を算出した。生育したコロニーの菌種同定には MALDI-TOF MS (Bruker) を用いた。

また、定性試験用の特定酵素基質培地である EC ブルー100P「ニッスイ」（島津ダイアグノスティクス）または Colilert (IDEXX) 1 包を検体 100 mL に添加し、35~36°Cで 24 時間培養後、青～青緑色/黄色の呈色および蛍光の有無を判定した。

3. 温泉水を用いた定性試験法の評価

$10^2\text{--}10^3$ CFU/mL および 10^4 CFU/mL に調整した *E. coli* ATCC25922 を 1 mL ずつ温泉水 99 mL に添加した。ポジティブコントロール (PC) は、各濃度の菌液 1 mL を滅菌水 99 mL に添加し、ネガティブコントロール (NC) は菌液調整に用いた生食 1 mL を滅菌水 99 mL に添加した。供試試料 100 mL に EC ブルー100P「ニッスイ」1 包を添加し、35~36°Cで 24 時間培養後、青～青緑色の呈色および蛍光の有無を判定した（表 1）。

C. 研究結果

1. 特定酵素基質寒天培地間の比較

(1) 各培地における大腸菌・大腸菌群の増殖形態

各培地における菌株の増殖形態を図 1 に示した。いずれの培地でも大腸菌と大腸菌群はコロニーの色で区別でき、最長の培養時間において、明瞭に発色した。大腸菌群がピンク色に発色した培地 B、培地 C、培地 D、培地 E では、青～紫色に発色した大腸菌と容易に区別が可能であった。ただし、培地 B と培地 E においては、赤紫色を呈する *E. coli* コロニーがあった（図 1 の矢印）。また、*Serratia* 属菌のコロニー色は培地によって白色から

ピンク色に発色した。

(2) コロニー数の培地間差

各培地における大腸菌・大腸菌群のコロニー数を比較した（図 2）。培地 A および培地 D では、いずれの菌種においても対照であるデソキシコレート寒天培地でのコロニー数と同等であった。培地 B と培地 E では、大腸菌数と 3 菌種混合時の大腸菌数が、デソキシコレート寒天培地と比較して 52.2~80.9% であった。一方で、培地 C では大腸菌および大腸菌群数が有意に低かった。

2. 実際の浴槽水における大腸菌・大腸菌群検出状況

(1) 検査法別の大腸菌・大腸菌群検出率

特定酵素基質寒天培地を用いた定量試験の大腸菌検出率は 6.3% (8/126 検体)、大腸菌群検出率は 9.5% (12/126 検体) であった。一方で、定性試験による大腸菌陽性率は 10.3% (13/126 検体)、大腸菌群陽性率は 11.1% (14/126 検体) であった（表 3）。

(2) 大腸菌・大腸菌群陽性の浴槽水

表 4 には、定量試験または定性試験で大腸菌・大腸菌群が検出された 17 検体の結果を示した。17 検体中 14 検体 (82.4%) が温泉水であり、9 検体 (52.9%) の残留塩素濃度は基準値以下であった。

定量試験における大腸菌検出率は培地 B が 6.3% (8/126 検体)、培地 A が 4.0% (5/126 検体)、培地 D が 1.9% (2/107 検体) であった。また、大腸菌群検出率は、培地 A で 7.1% (9/126 検体)、培地 B で

6.3% (8/126 検体)、培地 D で 4.7% (5/107 検体) であり、現行法のデソキシコレート寒天培地における大腸菌群検出率 7.1% (9/126 検体) と同程度であった。

(3) 浴槽水で検出された菌種

特定酵素基質寒天培地で検出されたコロニーの色と菌種を表 5 に示した。青～青紫色を呈したコロニーはすべて *E. coli* であった。ピンク～紫色を呈したコロニーは *Enterobacter* 属菌、*Citrobacter* 属菌、*Serratia* 属菌等であった。1 検体において、培地 B 上で、全体が赤色で中心が黒色を呈したコロニーが *E. coli* であった。また、白色を呈したコロニーは、*Pseudomonas* 属菌や *Achromobacter* 属菌、*Acinetobacter* 属菌等であったが、培地 A や培地 B に生育したコロニーの一部は *S. marcescens* や *Cronobacter* sp. であった。

3. 温泉水における定性試験法の検討結果

$10^2\text{--}10^3$ CFU/mL の大腸菌を添加した 33 検体中 19 検体 (57.6%) が、定性試験法で偽陰性となった。さらに、 10^4 CFU/mL の菌液を添加した場合、4 検体は陽転したものの、15 検体 (45.5%) の偽陰性という判定は変わらなかった (表 6)。

D. 考察

浴槽水の大腸菌群検査が大腸菌検査へと移行されるのに先立ち、本研究では、浴槽水における大腸菌検査方法の検討と実態把握調査を行った。

菌株を用いた特定酵素基質寒天培地の検証により、培地間での菌数や識別能に

差が認められた。培地 C では他の培地に比べて、菌数が低値であったのは、ピルビン酸ナトリウムが含まれていないなどの培地組成の違いによるものと考えられた。また、一部の培地において、赤紫色を呈する *E. coli* コロニーがあったことから、正確な判別がされにくうことによる実験精度の低下を招来する可能性がある。実際の検体においても、全体が赤色で中心が黒色の非定型の色を呈した *E. coli* が検出されている。特定酵素基質寒天培地を用いての大腸菌検査を行うにあたっては、菌数・形状・識別能など複数の観点から適した培地を選択し、それらの特性を把握したうえで実施する必要があると考えられる。

今回調査した浴槽水の 6.3%~10.3% が大腸菌陽性となった。既報の浴槽水の大腸菌検出率 1.0% (1/102 検体)⁸⁾ と比較すると高値であった。この要因として、調査した浴槽水の 56.3% (71/126 検体) が温泉水であり、14.1% (10/71 検体) が大腸菌陽性であったことが影響していると考えられる。また、かけ流し式温泉における大腸菌検出率に関しては 22.2% (88/396 検体) と比較的高いことが報告されているが⁹⁾、今回の調査においても大腸菌数が 9 CFU/mL 以上検出された 1 検体は、かけ流し式温泉で消毒剤を使用していなかった。

大腸菌・大腸菌群の検出率を検査方法ごとにみた場合、定量試験よりも定性試験の方が高く、定性試験のみで大腸菌陽性となった検体が 5 検体あった。これは、

定性試験では供される試料の量が定量試験に比べて 100 倍多いために検出感度が 100 倍高くなるためと考えられた。定量試験における培地間での大腸菌検出率・検出菌数は、培地 A と培地 B で大きな差はみられず、現行のデソキシコレート寒天培地による大腸菌群数と比較しても同程度であった。一方で、培地 D では大腸菌検出率が低かった。培地 D で大腸菌が検出されなかった検体において、他の培地での菌数は 0.5~2 CFU/mL と少數であったことから、培地間の差の他に、確率的な要因も考えられた。

温泉水においては、大腸菌を添加した EC ブルー100P での定性試験により偽陰性となる検体が、50%以上存在することが明らかとなった。硬水では白濁することがあるが判定には支障がないという添付文書の記載があったが、温泉水においても検査試薬添加直後から白濁の現象がみられた。しかし、結果判定時には沈殿しており、陽性・陰性の判定に支障はなかつた。偽陰性となった検体の泉質としては、ナトリウム塩化物・炭酸水素塩温泉、カルシウム-硫酸塩温泉、含鉄ナトリウム塩化物強塩高温泉であった。大腸菌の添加量を増やすと陽転した検体がみられたことから、これらの泉質の何らかの成分と検査試薬の組成成分とが反応することで、大腸菌の特定酵素反応が抑制された可能性が考えられた。また、コリラートにおいては原水が海水の場合には適さず、コリラート 18 においては 10 倍希釈した上で使用することと記されている。従って、

温泉水や原水に海水を含むものを 100 mL 用いる場合には、大腸菌検出法として定性試験は適していないと考えられた。

E. 結論

特定酵素基質寒天培地を用いた定量試験は、大腸菌を簡便に識別可能であり、水源・泉源の多様な浴槽水に適用可能であることが示された。本試験は、浴場施設の衛生管理効果を把握するための大腸菌検査法として、適用可能な試験法であると考えられた。

F. 参考文献

- 1) 厚生労働省, II. 病原微生物に係る水質基準:
(<a href="https://www.mhlw.go.jp/stf/seisaku-choseisaku/000010001/000010002/000010003/000010004/000010005/000010006/000010007/000010008/000010009/000010010/000010011/000010012/000010013/000010014/000010015/000010016/000010017/000010018/000010019/000010020/000010021/000010022/000010023/000010024/000010025/000010026/000010027/000010028/000010029/000010030/000010031/000010032/000010033/000010034/000010035/000010036/000010037/000010038/000010039/000010040/000010041/000010042/000010043/000010044/000010045/000010046/000010047/000010048/000010049/000010050/000010051/000010052/000010053/000010054/000010055/000010056/000010057/000010058/000010059/000010060/000010061/000010062/000010063/000010064/000010065/000010066/000010067/000010068/000010069/000010070/000010071/000010072/000010073/000010074/000010075/000010076/000010077/000010078/000010079/000010080/000010081/000010082/000010083/000010084/000010085/000010086/000010087/000010088/000010089/000010090/000010091/000010092/000010093/000010094/000010095/000010096/000010097/000010098/000010099/0000100100/0000100101/0000100102/0000100103/0000100104/0000100105/0000100106/0000100107/0000100108/0000100109/0000100110/0000100111/0000100112/0000100113/0000100114/0000100115/0000100116/0000100117/0000100118/0000100119/0000100120/0000100121/0000100122/0000100123/0000100124/0000100125/0000100126/0000100127/0000100128/0000100129/0000100130/0000100131/0000100132/0000100133/0000100134/0000100135/0000100136/0000100137/0000100138/0000100139/0000100140/0000100141/0000100142/0000100143/0000100144/0000100145/0000100146/0000100147/0000100148/0000100149/0000100150/0000100151/0000100152/0000100153/0000100154/0000100155/0000100156/0000100157/0000100158/0000100159/0000100160/0000100161/0000100162/0000100163/0000100164/0000100165/0000100166/0000100167/0000100168/0000100169/0000100170/0000100171/0000100172/0000100173/0000100174/0000100175/0000100176/0000100177/0000100178/0000100179/0000100180/0000100181/0000100182/0000100183/0000100184/0000100185/0000100186/0000100187/0000100188/0000100189/0000100190/0000100191/0000100192/0000100193/0000100194/0000100195/0000100196/0000100197/0000100198/0000100199/0000100200/0000100201/0000100202/0000100203/0000100204/0000100205/0000100206/0000100207/0000100208/0000100209/0000100210/0000100211/0000100212/0000100213/0000100214/0000100215/0000100216/0000100217/0000100218/0000100219/0000100220/0000100221/0000100222/0000100223/0000100224/0000100225/0000100226/0000100227/0000100228/0000100229/0000100230/0000100231/0000100232/0000100233/0000100234/0000100235/0000100236/0000100237/0000100238/0000100239/0000100240/0000100241/0000100242/0000100243/0000100244/0000100245/0000100246/0000100247/0000100248/0000100249/0000100250/0000100251/0000100252/0000100253/0000100254/0000100255/0000100256/0000100257/0000100258/0000100259/0000100260/0000100261/0000100262/0000100263/0000100264/0000100265/0000100266/0000100267/0000100268/0000100269/0000100270/0000100271/0000100272/0000100273/0000100274/0000100275/0000100276/0000100277/0000100278/0000100279/0000100280/0000100281/0000100282/0000100283/0000100284/0000100285/0000100286/0000100287/0000100288/0000100289/0000100290/0000100291/0000100292/0000100293/0000100294/0000100295/0000100296/0000100297/0000100298/0000100299/0000100300/0000100301/0000100302/0000100303/0000100304/0000100305/0000100306/0000100307/0000100308/0000100309/0000100310/0000100311/0000100312/0000100313/0000100314/0000100315/0000100316/0000100317/0000100318/0000100319/0000100320/0000100321/0000100322/0000100323/0000100324/0000100325/0000100326/0000100327/0000100328/0000100329/0000100330/0000100331/0000100332/0000100333/0000100334/0000100335/0000100336/0000100337/0000100338/0000100339/0000100340/0000100341/0000100342/0000100343/0000100344/0000100345/0000100346/0000100347/0000100348/0000100349/0000100350/0000100351/0000100352/0000100353/0000100354/0000100355/0000100356/0000100357/0000100358/0000100359/0000100360/0000100361/0000100362/0000100363/0000100364/0000100365/0000100366/0000100367/0000100368/0000100369/0000100370/0000100371/0000100372/0000100373/0000100374/0000100375/0000100376/0000100377/0000100378/0000100379/0000100380/0000100381/0000100382/0000100383/0000100384/0000100385/0000100386/0000100387/0000100388/0000100389/0000100390/0000100391/0000100392/0000100393/0000100394/0000100395/0000100396/0000100397/0000100398/0000100399/0000100400/0000100401/0000100402/0000100403/0000100404/0000100405/0000100406/0000100407/0000100408/0000100409/0000100410/0000100411/0000100412/0000100413/0000100414/0000100415/0000100416/0000100417/0000100418/0000100419/0000100420/0000100421/0000100422/0000100423/0000100424/0000100425/0000100426/0000100427/0000100428/0000100429/0000100430/0000100431/0000100432/0000100433/0000100434/0000100435/0000100436/0000100437/0000100438/0000100439/0000100440/0000100441/0000100442/0000100443/0000100444/0000100445/0000100446/0000100447/0000100448/0000100449/0000100450/0000100451/0000100452/0000100453/0000100454/0000100455/0000100456/0000100457/0000100458/0000100459/0000100460/0000100461/0000100462/0000100463/0000100464/0000100465/0000100466/0000100467/0000100468/0000100469/0000100470/0000100471/0000100472/0000100473/0000100474/0000100475/0000100476/0000100477/0000100478/0000100479/0000100480/0000100481/0000100482/0000100483/0000100484/0000100485/0000100486/0000100487/0000100488/0000100489/0000100490/0000100491/0000100492/0000100493/0000100494/0000100495/0000100496/0000100497/0000100498/0000100499/0000100500/0000100501/0000100502/0000100503/0000100504/0000100505/0000100506/0000100507/0000100508/0000100509/0000100510/0000100511/0000100512/0000100513/0000100514/0000100515/0000100516/0000100517/0000100518/0000100519/0000100520/0000100521/0000100522/0000100523/0000100524/0000100525/0000100526/0000100527/0000100528/0000100529/0000100530/0000100531/0000100532/0000100533/0000100534/0000100535/0000100536/0000100537/0000100538/0000100539/0000100540/0000100541/0000100542/0000100543/0000100544/0000100545/0000100546/0000100547/0000100548/0000100549/0000100550/0000100551/0000100552/0000100553/0000100554/0000100555/0000100556/0000100557/0000100558/0000100559/0000100560/0000100561/0000100562/0000100563/0000100564/0000100565/0000100566/0000100567/0000100568/0000100569/0000100570/0000100571/0000100572/0000100573/0000100574/0000100575/0000100576/0000100577/0000100578/0000100579/0000100580/0000100581/0000100582/0000100583/0000100584/0000100585/0000100586/0000100587/0000100588/0000100589/0000100590/0000100591/0000100592/0000100593/0000100594/0000100595/0000100596/0000100597/0000100598/0000100599/0000100600/0000100601/0000100602/0000100603/0000100604/0000100605/0000100606/0000100607/0000100608/0000100609/0000100610/0000100611/0000100612/0000100613/0000100614/0000100615/0000100616/0000100617/0000100618/0000100619/0000100620/0000100621/0000100622/0000100623/0000100624/0000100625/0000100626/0000100627/0000100628/0000100629/0000100630/0000100631/0000100632/0000100633/0000100634/0000100635/0000100636/0000100637/0000100638/0000100639/0000100640/0000100641/0000100642/0000100643/0000100644/0000100645/0000100646/0000100647/0000100648/0000100649/0000100650/0000100651/0000100652/0000100653/0000100654/0000100655/0000100656/0000100657/0000100658/0000100659/0000100660/0000100661/0000100662/0000100663/0000100664/0000100665/0000100666/0000100667/0000100668/0000100669/0000100670/0000100671/0000100672/0000100673/0000100674/0000100675/0000100676/0000100677/0000100678/0000100679/0000100680/0000100681/0000100682/0000100683/0000100684/0000100685/0000100686/0000100687/0000100688/0000100689/0000100690/0000100691/0000100692/0000100693/0000100694/0000100695/0000100696/0000100697/0000100698/0000100699/0000100700/0000100701/0000100702/0000100703/0000100704/0000100705/0000100706/0000100707/0000100708/0000100709/0000100710/0000100711/0000100712/0000100713/0000100714/0000100715/0000100716/0000100717/0000100718/0000100719/0000100720/0000100721/0000100722/0000100723/0000100724/0000100725/0000100726/0000100727/0000100728/0000100729/0000100730/0000100731/0000100732/0000100733/0000100734/0000100735/0000100736/0000100737/0000100738/0000100739/0000100740/0000100741/0000100742/0000100743/0000100744/0000100745/0000100746/0000100747/0000100748/0000100749/0000100750/0000100751/0000100752/0000100753/0000100754/0000100755/0000100756/0000100757/0000100758/0000100759/0000100760/0000100761/0000100762/0000100763/0000100764/0000100765/0000100766/0000100767/0000100768/0000100769/0000100770/0000100771/0000100772/0000100773/0000100774/0000100775/0000100776/0000100777/0000100778/0000100779/0000100780/0000100781/0000100782/0000100783/0000100784/0000100785/0000100786/0000100787/0000100788/0000100789/0000100790/0000100791/0000100792/0000100793/0000100794/0000100795/0000100796/0000100797/0000100798/0000100799/0000100800/0000100801/0000100802/0000100803/0000100804/0000100805/0000100806/0000100807/0000100808/0000100809/0000100810/0000100811/0000100812/0000100813/0000100814/0000100815/0000100816/0000100817/0000100818/0000100819/0000100820/0000100821/0000100822/0000100823/0000100824/0000100825/0000100826/0000100827/0000100828/0000100829/0000100830/0000100831/0000100832/0000100833/0000100834/0000100835/0000100836/0000100837/0000100838/0000100839/0000100840/0000100841/0000100842/0000100843/0000100844/0000100845/0000100846/0000100847/0000100848/0000100849/0000100850/0000100851/0000100852/0000100853/0000100854/0000100855/0000100856/0000100857/0000100858/0000100859/0000100860/0000100861/0000100862/0000100863/0000100864/0000100865/0000100866/0000100867/0000100868/0000100869/0000100870/0000100871/0000100872/0000100873/0000100874/0000100875/0000100876/0000100877/0000100878/0000100879/0000100880/0000100881/0000100882/0000100883/0000100884/0000100885/0000100886/0000100887/0000100888/0000100889/0000100890/0000100891/0000100892/0000100893/0000100894/0000100895/0000100896/0000100897/0000100898/0000100899/0000100900/0000100901/0000100902/0000100903/0000100904/0000100905/0000100906/0000100907/0000100908/0000100909/0000100910/0000100911/0000100912/0000100913/0000100914/0000100915/0000100916/0000100917/0000100918/0000100919/0000100920/0000100921/0000100922/0000100923/0000100924/0000100925/0000100926/0000100927/0000100928/0000100929/0000100930/0000100931/0000100932/0000100933/0000100934/0000100935/0000100936/0000100937/0000100938/0000100939/0000100940/0000100941/0

- 5) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部長 (2024) 下水道法施行令の一部を改正する政令等の施行について, 国水下企第 108 号
- 6) 厚生省生活衛生局長 (2000) 公衆浴場における衛生等管理要領等について, 生衛発第 1,811 号, 2024 年 10 月 4 日閲覧
- 7) 国土交通省水管理・国土保全局 下水道部流域管理官付課長補佐 (2024) 大腸菌数の検定方法について, 事務連絡
- 8) 枝川亜希子, 安達史恵, 小池真生, 肥塚利江, 松島加代, 土屋誠, (2023) 大阪府内中核市における公衆浴場等浴槽水のレジオネラ属菌および水質状況調査. 大阪健康安全基盤研究所年報, 7: 94-101
- 9) 井上博雄ら, (2007) 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 : (https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/2006/064061/200639020B/200639020B0001.pdf), 2024 年 10 月 4 日取得

G. 研究発表

論文発表

- 1) 小松頌子、武藤千恵子、佐々木麻里、梅津萌子、高久靖弘、大谷彩恵、田中和良、木下輝昭、猪又明子、藤永千波、田中忍、中西典子. 浴槽水における大腸菌検査法の検討. 日本防菌防黴学会誌 Vol53-3. 2025.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 大腸菌および大腸菌群の定量・定性試験培地

培地	定量試験					定性試験	
	ESコリマーク 寒天培地	アキュディア™ XM-G寒天培地	クロモアガー™ ECC寒天培地	クロモカルト コリフォーム 寒天培地	Pro·media アガートリコロール	EC ブルー100P 「ニッスイ」	コリラート
培養温度	35-37°C	34-36°C	37°C	35-37°C	35-37°C	35-37°C	34.5-35.5°C
培養時間	18-22 h	18-22 h	24 h	24 h	18-24 h	24-28 h	24 h
大腸菌 (基質) (発色)	X-Gluc	X-Gluc	特殊酵素基質	X-Gluc	X-Gluc	MUG	MUG
	青～青紫	青～青紫	青	青	青～青紫	青～青緑色 &蛍光	黄色&蛍光
大腸菌群 (基質) (発色)	Magenta-Gal	Magenta-Gal	特殊酵素基質	Salmon-Gal	Magenta-Gal	X-Gal	ONPG
	ピンク～赤紫	ピンク～赤紫	赤	淡紅～赤	赤～紫	青～青緑色	黄色

X-Gluc: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide, MUG: 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide, Magenta-Gal: 6-bromo-5-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, Salmon-Gal: 6-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, ONPG: o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside

培地	培養時間	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Serratia</i> spp.	3菌種混合
A	18 h				
	22 h				
B	18 h				
	22 h				
C	24 h				
D	24 h				
E	18 h				
	24 h				
F	18-22 h				

図1 大腸菌および大腸菌群の培養時間によるコロニーの大きさと色調の変化
矢印は *E. coli* の非定型コロニーを示す。

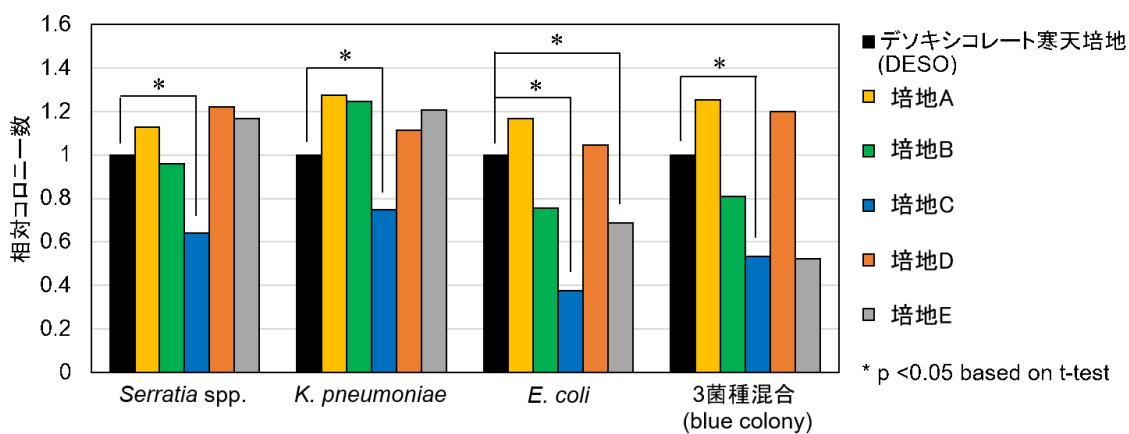


図2 5種類の酵素基質寒天培地におけるコロニー数の比較

各酵素基質寒天培地の相対コロニー数は、デソキシコレート寒天培地に生育したコロニー数を1として算出した。3菌種混合時のデソキシコレート寒天培地上の大腸菌のコロニー数は、大腸菌単独接種時のコロニー数から算出した。 $p < 0.05$ はt検定に基づく。

表2 浴槽水の種類と残留塩素濃度

サンプル数	残留塩素濃度 ¹⁾				測定不能／不明
	基準値未満	基準値内	基準値超過	測定不能／不明	
井戸水(ボーリング水含む)	18	3	8	7	0
水道水	33	1	24	7	1
井戸水&水道水	4	2	1	1	0
温泉水	71	25	24	18	4
合計	126	31	57	33	5

¹⁾遊離残留塩素濃度は、<0.4 mg/Lを基準値未満、0.4~1 mg/Lを基準値内、>1 mg/Lを基準値超過とした。モノクロラミン濃度については、<3 mg/Lを基準値未満、3~4 mg/Lを基準値内、>4 mg/Lを基準値超過とした。

表3 定量・定性試験における大腸菌および大腸菌群の検出率

サンプル数	定量試験		定性試験	
	大腸菌陽性のサンプル数 (%)	大腸菌群陽性のサンプル数 (%)	大腸菌陽性のサンプル数 (%)	大腸菌群陽性のサンプル数 (%)
井戸水(ボーリング水含む)	18	1	1	1
水道水	33	1	1	2
井戸水&水道水	4	0	0	0
温泉水	71	6	10	10
合計	126	8 (6.3%)	12 (9.5%)	13 (10.3%)
				14 (11.1%)

表4 大腸菌・大腸菌群陽性となった検体のリスト

サンプル No.	水源	残留塩素濃度 ¹⁾	培地A (CFU/plate)			培地B (CFU/plate)			培地D (CFU/plate)			ECブルー100P 「ニッスイ」		コリラート	デソキシコレート 寒天培地 (CFU/plate)	
			大腸菌	大腸菌群	他	大腸菌	大腸菌群	他	大腸菌	大腸菌群	他	大腸菌	大腸菌群	大腸菌	大腸菌群	
E-002	井戸水	基準値未満	0	0	3+	0.5	0.5	3+	0	0	3+	+	+	実施せず	0.5	
E-007	温泉水	基準値未満	0	0	0	0	0	1+	0	1.5	0	-	+	実施せず	0	
E-018	温泉水	基準値内	0	0.5	1+	0	0	0	0	0	1+	-	-	実施せず	0	
E-035	温泉水	基準値未満	0	>4	2+	0.5	>4	1+	2	2	2+	+	+	実施せず	1.5	
E-057	温泉水	基準値未満	9	1	3+	9	1.5	3+	実施せず			+	+	実施せず	9	
E-063	温泉水	基準値未満	0	0	2+	0	0	1+	実施せず			-	+	実施せず	0	
E-064	温泉水	基準値未満	0	1	1+	0	0	0	実施せず			+	+	実施せず	0.5	
E-066	温泉水	基準値未満	11.5	0	2+	9.5	0.5	0	実施せず			+	+	実施せず	13	
E-070	水道水	基準値未満	0.5	1	3+	0.5	0.5	3+	0	0	3+	実施せず		+	+	0
E-073	温泉水	基準値内	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	1	実施せず		+	+	1.5
E-076	温泉水	基準値内	0	0	0	0	0	0	0	0	0	実施せず		+	+	0
E-080	温泉水	測定不能	0	4	1	4.5	0	0	1.5	1.5	1.5	実施せず		+	+	3
E-081	温泉水	測定不能	0	0	0	0	0	0	0	0	0	実施せず		+	測定不能	0
E-082	温泉水	測定不能	0	0	0	0	0	0	0	0	0	実施せず		+	測定不能	0
E-083	温泉水	基準値内	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	実施せず		-	+	1
E-084	水道水	基準値内	0	0	0	0	0	0	0	0	0	実施せず		+	+	0
E-098	温泉水	基準値未満	0.5	0.5	2	3	0	0.5	実施せず			+	+	+	0.5	

¹⁾ 遊離残留塩素濃度は、< 0.4 mg/Lを基準値未満、0.4~1 mg/Lを基準値内、> 1 mg/Lを基準値超過とした。モノクロラミン濃度については、< 3 mg/Lを基準値未満、3~4 mg/Lを基準値内、> 4 mg/Lを基準値超過とした。

表5 各培地で検出されたコロニーの色調と菌種

コロニーの色調	菌種 ¹⁾ (サンプル数)		
	培地A	培地B	培地D
青~青紫	<i>Escherichia coli</i> (5)	<i>Escherichia coli</i> (8)	<i>Escherichia coli</i> (2)
ピンク~紫	<i>Citrobacter koseri</i> (1) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1) <i>Enterobacter cloacae complex</i> (3) <i>Enterobacter aerogenes</i> (1)	<i>Escherichia coli</i> (1) <i>Citrobacter koseri</i> (2) <i>Enterobacter cloacae complex</i> (1) <i>Serratia marcescens</i> (1) <i>Aeromonas caviae</i> (1)	<i>Citrobacter koseri</i> (1) <i>Cronobacter sp.</i> (1)
白	<i>Serratia marcescens</i> (1) <i>Pseudomonas alcaligenes</i> (2) <i>Pseudomonas mendocina</i> (2) <i>Achromobacter xylosoxidans</i> (1) <i>Providencia stuartii</i> (1)	<i>Serratia marcescens</i> (1) <i>Cronobacter sp.</i> (1) <i>Pseudomonas alcaligenes</i> (3) <i>Pseudomonas mendocina</i> (1) <i>Providencia stuartii</i> (1)	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (3) <i>Pseudomonas mendocina</i> (1) <i>Pseudomonas alcaliphila</i> (1) <i>Pseudomonas balearica</i> (1) <i>Pseudomonas otidis</i> (1) <i>Pseudomonas oleovorans</i> (1) <i>Achromobacter xylosoxidans</i> (1) <i>Acinetobacter baumannii</i> (2) <i>Acinetobacter lactucae</i> (1) <i>Providencia stuartii</i> (1)

¹⁾ 非典型的なコロニーには下線を引いた。

表6 温泉水におけるECブルー100P「ニッスイ」による大腸菌偽陰性率

サンプル数	大腸菌偽陰性のサンプル数 (%)	
	10 ² -10 ³ CFU/mL	10 ⁴ CFU/mL
33	19 (57.6%)	15 (45.5%)