

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」

研究代表者 泉山信司 国立感染症研究所

総合分担研究報告書

「浴槽水の糞便汚染指標細菌の変更の妥当性の検討」

研究分担者	黒木俊郎	岡山理科大学
研究分担者	枝川亜希子	大阪健康安全基盤研究所
研究分担者	中西典子	神戸市健康科学研究所
研究分担者	前川純子	国立感染症研究所
研究協力者	工藤剛	宮城県保健環境センター
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	鍋田信吾	静岡県環境衛生科学研究所
研究協力者	小松頌子	神戸市健康科学研究所
研究協力者	烏谷竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
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	太田奈保美	岡山理科大学

浴槽水の水質基準のうち、糞便汚染指標は大腸菌群とされている。しかし近年、各種水環境の糞便汚染指標細菌は大腸菌群から大腸菌に移行しており、浴槽水の糞便汚染指標細菌を大腸菌に移行することとそれに伴う検査法ならびに基準の設定について、妥当性を検討した。検査法は現行法の使用培地を特定酵素基質寒天培地に変更する定量法と、プール水の検査法に準じた特定酵素基質液体培地を用いた定性法の2法が議論に上がり、それぞれの検査法での基準の設定も検討した。過去の入浴施設のレジオネラに関する研究班において実施した浴槽水の大腸菌群と大腸菌の汚染実態調査に基づいて、浴槽水における大腸菌/大腸菌群数の比率を算出した。浴槽水の大腸菌群と大腸菌の実地調査を実施し、塩素消毒の有無による汚染状況の違いを確認した。さらに、現行法と定量法あるいは定性法による結果に統計学的差がないことを明らかにした。大腸菌と大腸菌群に属する菌種の標準株を用いて、定量試験法における市販の特定酵素基質寒天培地での集落の特徴と発育菌数を比較した。さらに、定性試験法において大腸菌の標準株を用いて温泉水の影響を調査した。基準については、欧米の recreational water の大腸菌の基準に関する文献等のレビューを行った。

A. はじめに

水環境の糞便汚染指標細菌は長らく大腸菌群とされてきた。しかし、大腸菌群と大腸菌の迅速定性および定量検査法が近年開発されたことで、水道水をはじめとする種々の水環境の指標細菌が大腸菌群から大腸菌へと変更されている（水質基準に関する省令 厚生労働省令第 101 号 平成 15 年 5 月 30 日）。大腸菌群には糞便由来ではなく環境に由来する細菌が含まれていることから、大腸菌群の存在が糞便汚染の実態を正しく反映していないことが以前から指摘されており、大腸菌を選択的に検出することを可能にする検査技術が開発されたことが移行の大きな理由となっている。

浴槽水の糞便汚染指標は現行では大腸菌群とし、検査法は「下水の水質の検定方法等に関する省令（昭和 37 年厚生省・建設省令第 1 号）別表第 1（第 6 条）」に規定する大腸菌群数の検定方法に準じて実施し、基準は 1 個/mL 以下とされている。ところが、下水の水質の検定方法が令和 7 年 4 月 1 日からデソキシコレート寒天培地培養法から特定酵素基質寒天培地培養法に変更されることとなった。そこで、浴槽水の糞便汚染指標細菌の検査法を、下水の水質の検定方法の変更と同様にすることが妥当であるか、あるいは別の検査法を適用するかを検討することとした。さらに、変更した際の大腸菌の基準の設定についても協議した。

B. 材料と方法

1. ワーキンググループにおける協議

浴槽水の糞便汚染指標細菌の検査法と基準について協議するために、ワーキンググ

ループ (WG) を立ち上げた。当研究班の分担研究者ならびに研究協力者からメンバーを募り、黒木、枝川、前川、工藤、武藤、鍋田がメンバーとなった。

2. 浴槽水における大腸菌群と大腸菌の比率の推定

平成 18 年度の研究班（平成 18 年度 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：研究代表者 井上博雄（掛け流し式温泉研究班）、および平成 18 年度 温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究：研究代表者 倉文明（温泉の泉質研究班））において実施された浴槽水の大腸菌群・大腸菌汚染実態調査のデータに基づいて大腸菌群数と大腸菌数の比率を計算した。比率を求めるために大腸菌群と大腸菌のいずれも検出された検体のデータを抽出し、各検体の大腸菌数/大腸菌群数の比率を求めた。あらかじめ、大腸菌数および大腸菌群数について、Smirnov-Grubbs 検定を用いて外れ値の判定を行い、残ったデータから大腸菌数/大腸菌群数の比率の平均値を計算した。解析は黒木、烏谷、緒方が担当した。

3. 欧米の recreational water における大腸菌の基準の文献調査

欧米においては水浴場の水や浴槽水の水質基準は、recreational water にかかる基準とされている。今回の浴槽水の糞便汚染指標細菌の対象を大腸菌群から大腸菌への移行に伴う基準の検討に際して参考とするために、欧米の基準やその根拠に関連した文献等の調査を行った。文献調査は太田が担当した。

4. 浴槽水の大腸菌群・大腸菌汚染の実態調査

令和6年5月から9月にかけて、3つの自治体の管轄内の137の入浴施設に由来する浴槽水の大腸菌群ならびに大腸菌の汚染実態を調査した。実態調査及び後述の特定酵素基質寒天培地の特徴付けと菌数比較、ならびに温泉水を用いた定性試験法の評価は中西、小松、武藤、梅津、高久、佐々木が担当した。

各入浴施設から浴槽水を1検体ずつ採取した。各検体はチオ硫酸ナトリウムを添加したポリ容器に採取し、冷蔵で輸送し、検査を開始するまで冷蔵で保管した。遊離残留塩素濃度および結合残留塩素濃度は採水時にDPD法により測定した。

検査法は、現行法と特定酵素基質培地法による定量法および定性法とした。現行法として、検水1mLを2枚のデソキシコレート寒天培地に混和し、35℃で20時間培養した。培養後、コロニーの色調に基づいて、プレート2枚の平均値から大腸菌群数を算出した。定量法で用いる特定酵素基質寒天培地は、アキュディア™XM-G寒天培地（島津ダイアグノスティクス）あるいはES Colimark Agar（栄研化学）とした。検体1mLを混和し、35℃で20時間培養後に判定した。コロニーの色調に基づいて、プレート2枚の平均値から大腸菌・大腸菌群数を算出した。

定性法の検査には、特定酵素基質培地であるECブルー100P（島津ダイアグノスティクス）またはColilert(IDEXX)を用いた。あらかじめ培地が分包されたボトルに検水を100mL添加あるいは検体100mLに培地の1包を添加し、35～36℃で24時間培養

後、青～青緑色/黄色の呈色および蛍光の有無により大腸菌群および大腸菌の判定を行った。

残留塩素濃度が基準値未満（遊離残留塩素濃度<0.4mg/L または結合塩素濃度<3mg/L）の浴槽水と基準値以上（遊離残留塩素濃度 \geq 0.4mg/L または結合塩素濃度 \geq 3mg/L）の浴槽水に分け、それぞれの大腸菌群あるいは大腸菌の検出率の差の検定を、フィッシャーの正確確率検定をOpenEpiサイト (<https://www.openepi.com>) を利用して行った。

定量法の大腸菌の基準を「1個/mL以下」、「1個/mL未満」、「不検出」の3通りと、定性法の基準を「不検出」とそれぞれ設定し、それらによる判定結果と現行法による大腸菌群の基準「1個/mL以下」の判定結果との比較をフィッシャーの正確確率検定 (OpenEpiサイト:<https://www.openepi.com>) により検定した。

5. 大腸菌と大腸菌群菌株を用いた特定酵素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™XM-G寒天培地（島津ダイアグノスティクス）、クロモアガー™ECC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 10^3 CFU/mL に調整し、*E. coli*、*K. pneumoniae* は 100 μ L、*Serratia* 属菌は 50 μ L、3 菌種の混合菌液は 100 μ L を添加し、混釈培養した。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。

6. 温泉水を用いた定性試験法の評価

10^2 - 10^3 CFU/mL 及び 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. 結果と考察

1. WG における協議

浴槽水の糞便汚染指標細菌に関する検討会では、糞便汚染指標菌を大腸菌群から大腸菌への基準の変更の妥当性ならびに変更する場合の検査法について協議を行った。

その結果、浴槽水以外の水環境における糞便汚染指標細菌が大腸菌群から大腸菌へ変更されている状況を鑑み、浴槽水の糞便汚染指標細菌を大腸菌群から大腸菌に変更することは妥当であるとした。

検査法については、現行の検査法において利用する培地をデソキシコレート寒天培地から特定酵素基質寒天培地に変更して定量法で検査することが適当であるという意見と、プール水の検査法と同じにして特定酵素基質液体培地により定性法で検査することが妥当であるとの意見があった。

そこでこうした議論を受けて、1) 水環境の糞便汚染指標細菌検査の意義、2) 指標細菌が大腸菌群から大腸菌に移行する背景、3) 各種水環境の大腸菌群と大腸菌にかかる水質基準の比較、4) 糞便汚染指標細菌の定量法と定性法の比較の課題を立ち上げ、それぞれの検討を行った。

1) 水環境の糞便汚染指標細菌検査の意義

水環境における糞便汚染指標細菌検査の意義としては、次の 2 点が挙げられる。

- i. 人、その他の温血動物の糞便による汚染の有無を判定する。
- ii. 衛生管理の効果を判定する。

人やその他の温血動物の糞便中には腸管感染性の病原微生物が含まれている可能性があり、汚染を受けた水を介して感染するリスクがある。こうしたリスクを避けるために、水環境における糞便汚染の有無を調べることは非常に重要である。水が清浄 (糞便汚染を受けていない状態) であれば当然感染のリスクは低い、糞便汚染が起きる環境にあっては衛生管理 (清掃や消毒等) に

より病原微生物を除き、感染のリスクを低減させている。そこで、大腸菌群や大腸菌の存在の有無は、衛生管理が適切に行われているか、効果が十分であるかの評価や判定に役立つ。

2) 指標細菌が大腸菌群から大腸菌に移行する背景

水域に糞便汚染がある場合には種々の腸管系病原体が存在する可能性がある。そこで糞便汚染の指標として、温血動物の腸管内に数多く常在する大腸菌が注目される。しかし、過去においては培養技術の制約から大腸菌のみを検出することは困難であった。そのため、糞便に由来しない菌が含まれているものの、培養が容易な大腸菌群が糞便汚染の指標とせざるを得なかった。

現在は培養技術が発達し、特定酵素基質培地を用いることで簡便・短時間に大腸菌を検出することが可能となり、糞便汚染の指標として大腸菌群に代えて大腸菌を用いることができるようになった。近年、水道水、環境水、下水、放流水を対象にした大腸菌群検査が大腸菌検査に変更されてきている。

3) 各種水環境の大腸菌群と大腸菌にかかる水質基準の比較

ここに、現行の浴槽（原水等および浴槽水）ならびに参考としてその他の水環境の糞便汚染指標細菌の基準と検査法を列举する。

(1) 現行の大腸菌群と大腸菌に係る入浴施設の水質基準

原水、原湯、上がり用湯及び上がり用水

- ・基準：大腸菌は検出されないこと

- ・検査法：水質基準に関する省令（平成15年厚生労働省令第101号）で定める検査方法
検水 100mL と特定酵素基質培地を混和し、定性試験

浴槽水

- ・基準：大腸菌群は1個/mL以下であること
- ・検査法：下水の水質の検定方法等に関する省令（昭和37年厚生省令・建設省令第1号）別表第1（第6条）の大腸菌群数の検定方法による。試料は希釈せず使用する。

(2) 参考となる水環境の現行の基準と検査法

水道水

- ・基準：大腸菌は検出されないこと
- ・検査法：検水 100mL と特定酵素基質培地を混和し、定性試験

プール水

- ・基準：大腸菌は検出されないこと
- ・検査法：検水 100mL と特定酵素基質培地を混和し、定性試験

下水・放流水

- ・基準：大腸菌群が3000個/mL以下（令和7年3月末まで）
- ・検査法：100倍希釈した検水 1mL をデソキシコレート寒天培地で混濁培養

(参考情報) 下水・放流水の水質基準の変更

(令和 7 年 4 月以降)

下水道法施行令 (昭和 34 年政令第 147 号)

第 6 条第 1 項第 2 号

排水基準を定める省令 (昭和 46 年総理府令第 35 号) 別表第 2 (第 1 条関係)

- ・基準: 大腸菌が 800 個/mL 以下 (実態調査による大腸菌/大腸菌群の比から算出)

- ・検査方法: 10 倍希釈した検水 1mL を特定酵素基質培地で混釈培養

4) 浴槽水の糞便汚染指標細菌の定量法と定性法の比較

WG において浴槽水の大腸菌検査法への意見が定量法と定性法に分かれたことから、それぞれの概要とメリットおよびデメリットをまとめた。

(1) 現行法を特定酵素基質寒天平板培地に変更した検査法 (定量法)

検査法の概要

検体 1mL を特定酵素基質寒天培地に加えて混釈培養する。培養後に大腸菌に相当する集落数を数える。

大腸菌数の基準の設定は、現行の「1 個/mL 以下」を採用することの他に、「1 個/mL 未満」および「検出されないこと」とすることが想定される。

メリット

- ・現行法の培地を変えることで移行できる。
- ・基準の設定次第で現行の基準よりも厳しくできる可能性がある。
- ・定量法であるため汚染の程度を把握することができる。

- ・1mL の試料を 20mL の培地に加えて希釈するため、培養に水質 (泉質) の影響を受ける可能性が低い。
- ・基準の設定の仕方により消毒していない浴槽水でこれまでと同等以上の衛生管理が求められるとの意見がある。

デメリット

- ・定性法と比べて操作がやや煩雑である。
- ・基準を「1 個/mL 以下」とした場合は大腸菌群の基準を大腸菌に充てることになるので、基準が緩くなる。
- ・検水量が 1mL であるため、検出感度が低い。

(2) プール水の基準に準拠した検査法 (特定酵素基質液体培地を用いた定性法)

検査法の概要

検体 100mL と特定酵素基質培地を混和し、培養する。培養後に大腸菌群陽性であることを確認後に紫外線を当てて蛍光を発することを確認する。

大腸菌の基準は「検出されないこと」とする。

メリット

- ・水道水の検査を実施している機関においては移行が容易である。
- ・定性法であるため菌数を決める必要がなく、操作も簡便である。
- ・検水量を 100mL としているため、高感度で大腸菌を検出することができる。

デメリット

- ・新たに導入する場合には購入しなければならない装置がある。
- ・定性法であるため汚染の程度を把握することができない。
- ・試料を希釈せずに培養するため、水質(泉質)の影響を受ける可能性がある。
- ・消毒している浴槽水は基準をクリアしやすいが、消毒していない浴槽水では徹底的な衛生管理を求められ、「検出されないこと」を維持するのは厳しいとの意見がある。

2. 浴槽水における大腸菌群と大腸菌の比率の推定

大腸菌群と大腸菌のいずれも検出された検体は、掛け流し式温泉研究班では 187 検体中 70 検体、温泉の泉質研究班では 61 検体中 25 検体であった。大腸菌群数と大腸菌数の範囲は、それぞれ大腸菌群数が $<3 \sim 24,000$ MPN/100mL および $<3 \sim \geq 2,400$ MPN/100mL、大腸菌数が $<3 \sim 2,400$ MPN/100mL および $<3 \sim 1,100$ MPN/100mL であった。これらのデータを対象にして、Smirnov-Grubbs 検定を行ったが外れ値に該当するデータはなかった。そこで、すべての検体のデータを使って調査対象の検体における大腸菌数/大腸菌群数の比率を求めたところ、掛け流し式温泉研究班では 0.006 \sim 1.0、平均 0.55、温泉の泉質研究班では 0.04 \sim 1.0、平均 0.62 であった。

3. 欧米の recreational water における大腸菌の基準の文献調査

欧米においては、人が直接汚染に曝露さ

れる水環境における大腸菌群あるいは大腸菌の基準は、曝露集団における胃腸疾患の発生の有無により基準が評価され、決定されている。そこで、欧米の浴場環境の大腸菌群数・大腸菌数に関する文献調査を行った。

米国 EPA が 2012 年に定めた recreational water における大腸菌の基準は 126cfu/100mL 及び 100cfu/100mL としている¹⁾。この基準値のうち、前者は 1986 年のガイドラインで設定されたものである²⁾。2012 年のガイドライン設定時には腸球菌のみを対象に疫学調査を実施したため、大腸菌の基準値は Dufour が 1984 年に報告した大腸菌群、大腸菌、腸球菌の数と水浴関連の胃腸疾患の発生数の疫学調査の結果³⁾を元にして 100cfu/100mL が算出された。

Dufour の報告では大腸菌群の数と疾患数の関連性は低かった。主な理由として、調査した水環境におけるクレブシエラ属菌の存在が挙げられる。クレブシエラ属菌は環境中で増殖がしやすく塩素消毒に強い。そのため、塩素消毒等から生き残ったクレブシエラ属菌が排水から流入しやすく、大腸菌群数と疾患数の関連性が低くなった理由の 1 つである可能性があると報告されている。

一方、大腸菌数と胃腸疾患は強い関連性を示した。1986 年の基準(126cfu/100mL)を作成するにあたり使用された症状の基準 HCGI (Highly Credible Gastrointestinal Illness:高信頼性胃腸炎)の定義には発熱を含めていたが、2012 年の基準(100cfu/100mL)の作成に使用された症状の基準 NGI (NEEAR - GI: National Epidemiological and Environmental Assessment of Recreational Water-Gastrointestinal Illness)の定義では発熱を

含めなかった。そのために発熱を伴わない下痢症をカウントするようになり、1986年の基準（126cfu/100mL）よりも基準菌数あたりの症例数が増える結果となった。すなわち、1986年のHCGIでは腸球菌35cfu/100mLあたりの症例数は8HCGI/1000人となるが、NGIでは36人/1000人となった。この腸球菌数を元に定められた8HCGI/1000人をDufourが算出した大腸菌数の回帰曲線*に当てはめると126cfu/100mLと計算された。同様に腸球菌30cfu/100mLあたりの症例数は7HCGI/1000人で、NGIに換算すると32NGI/1000人となり、これを元に大腸菌数を計算すると99cfu/100mL（四捨五入して100cfu/100mL）となった。

また、海水浴場での9回の調査の結果、平均腸球菌数は18.9cfu/100mLであったのに対し大腸菌数は71.9cfu/100mLだった。1000人あたり8HCGIという症例数は1986年時点で“Acceptable swimming associated gastroenteritis rate per 1000 swimmers”と表記されており、受け入れられる症例数ということで決められた。

この基準126cfu/100mLよりも菌数が多い場合には胃腸疾患の発生の相対リスク

（リスク比）は1.94（95%信頼区間：1.27-2.96）であるが、少ない場合には有意差はないと報告している⁴⁾。EUの浴場に関する基準では大腸菌数は $\leq 500\text{cfu}/100\text{mL}$ がexcellentとされており、ドイツにおける調査では大腸菌のNOAEL（最大有害無作用レベル：有害な影響を示さない最大数）は100cfu/100mLと報告されている⁵⁾。

米国とEUの浴場の大腸菌の基準と疫学調査の結果からすると、日本の浴槽水の大腸菌数の基準を1.0個/mL以下とすることは妥当であるといえる。上述したように浴槽水の調査から得られた大腸菌数/大腸菌群数の比率が0.55あるいは0.62であったことから、1個に比率0.55あるいは0.62を乗じた新たな基準（0.55個/mL以下あるいは0.62個/mL以下）とすることも考えられるが、米国⁴⁾およびドイツ⁵⁾の疫学調査により1個/mL以下（126cfu/100mLまたは100cfu/100mLとほぼ同等）としても胃腸疾患が有意に発生するリスクがないのであれば、敢えて1個/mL以下の基準を変える必要はないと考えられる。なお、集落数の単位である「個」は細菌学で用いるcolony forming unit (cfu)に相当する。

*大腸菌の回帰曲線（Dufour, 1984）

$$1000 \text{ 人あたりの HCGI} = -11.74 + 9.397(\log_{10} \text{ 大腸菌数}/100\text{mL})$$

$$\therefore \text{大腸菌数} = \text{antilog}_{10} \frac{\text{症例数}/1000 \text{ 人} + 11.74}{9.397}$$

4. 浴槽水の大腸菌群・大腸菌汚染の実態調査

(1) 大腸菌群及び大腸菌の検出状況

調査で対象にした 137 検体の浴槽水の原水の内訳は、井戸水(ボーリング水を含む) 22 検体、水道水 35 検体、井戸水と水道水の混合 4 検体、温泉 76 検体であった。

採水時の消毒効果のカテゴリー分けについては、「公衆浴場における衛生等管理要領」に浴槽水の遊離残留塩素濃度は 0.4mg/L 程度とし 1mg/L を超えないように努め、モノクロアミンでは 3mg/L 程度とされていることに準じて、遊離残留塩素濃度 0.4～1 mg/L・結合残留塩素濃度 3～4 mg/L を基準値内とし、さらに基準値未満と基準値超で分類すると、基準値未満が 38 検体、基準値内が 61 検体、基準値超が 33 検体、測定不能または不明が 5 検体となった。

定量法と定性法のいずれかの方法により大腸菌群あるいは大腸菌が検出された検体を大腸菌群陽性あるいは大腸菌陽性としたところ、137 検体のうち 20 検体 (14.6%) から大腸菌群が、14 検体 (10.2%) から大腸菌が検出された。残留塩素濃度別・原水の種類別の大腸菌群と大腸菌の検出結果を表 2 および表 3 に示した。大腸菌群と大腸菌のいずれでも残留塩素濃度が基準値を満たす浴槽水で検出されることがあり、消毒効果が不足していることが推測され、大腸菌群・大腸菌検査に意義があることが改めて示された。

現行法で検出された大腸菌群数は 0.5～13cfu/mL であり、定量法により検出された大腸菌数は 0.5～11.5cfu/mL であった。塩素濃度を基準値未満と基準値以上で検体を分けると、基準値未満では定量法で検出

された大腸菌群数は 0.5～11.5cfu/mL、大腸菌数は 0.5～4.5cfu/mL、現行法での大腸菌群数は 0.5～13cfu/mL であり、基準値以上では定量法にて大腸菌群数は 0.5～1cfu/mL、大腸菌数は 1cfu/mL、現行法での大腸菌群数は 1～1.5cfu/mL であった。残留塩素濃度の濃度別で比較すると、基準値未満の浴槽水において大腸菌群数と大腸菌数が多いことが示された。大腸菌数を計数できることで衛生管理の状況を推定することができるのは、定量法の大きな利点である。

残留塩素濃度が測定不能あるいは不明であった 5 検体を除外し、浴槽水の残留塩素濃度が基準値未満の 38 検体と基準値以上(基準値内&基準値超)の 94 検体における大腸菌群と大腸菌のそれぞれの検出率を比較した。大腸菌群が基準値未満では 31.6% (=12/38)、基準値以上では 5.3% (=5/94) であり、大腸菌が基準値未満では 21.1% (=8/38)、基準値以上では 3.2% (=3/94) であった。残留塩素濃度が基準値未満の浴槽水での大腸菌群あるいは大腸菌の検出率が、基準値以上の浴槽水での検出率よりも高いことが示された。

基準値未満の浴槽水と基準値以上の浴槽水における大腸菌群あるいは大腸菌の検出と不検出の検体数から 2 x 2 表を作成し(表 4 および表 5)、フィッシャーの正確確率検定により検出率の差の検定を行った。その結果、残留塩素濃度が基準値未満の浴槽水からの大腸菌群あるいは大腸菌の検出率は、基準値以上の浴槽水における検出率よりも有意に高いことが示された。このことは、塩素消毒を行わないかあるいは基準値未満の不適切な消毒により大腸菌は生存

し、検査により検出されることとなり、一方で適切な塩素消毒により大腸菌が不活化されていることを示唆している。

大腸菌の定量法の基準を「1 個/mL 以下」、「1 個/mL 未満」、「不検出」、大腸菌の定性法の基準を「不検出」とそれぞれ設定したと想定し、浴槽水が基準値超過と判定される検体数を基準値別に表 6 に示した。さらに、現行法と定量法あるいは定性法による糞便汚染指標細菌の判定結果の一致の状況をフィッシャーの正確確率検定により検定した。その結果、定量法と定性法のいずれの基準でも、現行法と同じ結果が得られていることが示された（表 7～10）。表 6 で示したように、定量法の基準を「1 個/mL 未満」にした場合の結果が現行法と類似の結果となった。理由として、現行法と定量法の検体量がともに 1mL であることや、大腸菌群と大腸菌の比率を反映している可能性がある。ただし、検体数が少ないため、これをもって基準を決めるにはデータが十分ではないと考えられる。一方で、定性法は 100mL の検体量で検査を実施することから現行法よりも検出感度が高いことを示唆する結果になっている（表 6）。

定量法の 3 種の基準あるいは定性法の基準を設定し、これに基づいて適合の判断を行った場合に、現行法の結果と定量法あるいは定性法を用いた大腸菌による汚染の判定結果は統計的には一致していた（表 7～10）。したがって、いずれの基準を設定したとしても今回の調査からは、現行法による判定と同じが得られることが示唆された。しかし、今回の調査では 137 検体を対象にし、そのうち 14 検体から大腸菌が検出される結果であったが、解析に十分な検体数で

あったとは必ずしもなかった。検体数を増やすことで、さらに詳細な評価を行うことができる可能性がある。

(2) 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 11 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、アキュディア™XM-G 寒天培地上で、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、ES コリマーク寒天培地やアキュディア™XM-G 寒天培地に生育したコロニーの一部は *S. marcescens* や *Cronobacter* sp. であった。

5. 大腸菌と大腸菌群菌株を用いた特定酵素基質寒天培地の特徴付けと菌数比較

(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。

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い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。

6. 温泉水を用いた定性試験法の評価

10^2 - 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 12）。

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った。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見られたことから、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。

D. まとめ

浴槽水の水質基準における糞便汚染指標を大腸菌群から大腸菌に変更すること、ならびに変更する場合の基準と検査法の妥当性について、WG において検討した。糞便汚染指標細菌を大腸菌群から大腸菌に変更することについては、他の水環境の基準との整合性や入手可能な検査法の存在から、妥当であるとした。大腸菌の検査法については、現行の検査法で使用されているデソキシコレート寒天培地を特定酵素基質寒天

培地に変更した定量法とする意見と、特定酵素基質液体培地による定性法にするとの意見があった。大腸菌の基準は、定量法の場合は現行の1個/mL以下、1個/mL未満および検出されないことの3案が、定性法の場合は検出されないことが挙げられた。過去のレジオネラ研究班において得られた浴槽水の大腸菌群と大腸菌の汚染実態調査のデータに基づく大腸菌数/大腸菌群数の比率は0.55および0.62（平均0.59）であった。欧米の水浴場の大腸菌の基準は、米国は100cfu/100mLと126cfu/100mLであり、ドイツは100cfu/100mLとしている。3自治体の浴槽水137検体における大腸菌群と大腸菌の汚染実態調査では、大腸菌にかかる定量法の3種の基準と定性法の基準（不検出）のいずれの基準でも、統計学的には現行法の大腸菌群の結果と有意差はなかった。事例数は少ないものの、定量法の大腸菌の基準を「1個/ml未満」での検出数が現行法での検出数と近い結果であった。残留塩素濃度が基準値未満の浴槽水では、基準値以上の浴槽水よりも検出率が有意に高いことが示された。

E. 参考文献

- 1)USEPA: Recreational Water Quality Criteria. pp63, Office of Water, United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C., USA, 2012.
<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/rwqc2012.pdf>
- 2)USEPA: Ambient water quality criteria for bacteria-1986. pp18, US

Environmental Protection Agency, Washington D.C., USA, 1986.
<https://www.epa.gov/sites/default/files/2019-03/documents/ambient-wqc-bacteria-1986.pdf>

- 3)Dufour: Health effects criteria for fresh recreational waters. pp33, US Environmental Protection Agency, Washington D.C., USA, 1984.
<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/300000H7.PDF?Dockkey=300000H7.pdf>
- 4)Wade et al.: Do U.S. Environmental Protection Agency water quality guidelines for recreational waters prevent gastrointestinal illness? A systematic review and meta-analysis. Environ Health Perspect. 2003;111(8):1102-9.
doi: 10.1289/ehp.6241.
- 5)Wiedenmann et al.: A randomized controlled trial assessing infectious disease risks from bathing in fresh recreational waters in relation to the concentration of *Escherichia coli*, intestinal enterococci, *Clostridium perfringens*, and somatic coliphages. Environ Health Perspect. 2006;114(2):228-36.
doi: 10.1289/ehp.8115.

F. 研究発表、学会発表 論文発表なし

G. 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℃	34-36℃	37℃	35-37℃	35-37℃	35-37℃	34.5-35.5℃
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)	X-Gluc	X-Gluc	特殊酵素基質	X-Gluc	X-Gluc	MUG
	(発色)	青～青紫	青～青紫	青	青	青～青紫	青～青緑色 & 蛍光
大腸菌群	(基質)	Magenta-Gal	Magenta-Gal	特殊酵素基質	Salmon-Gal	Magenta-Gal	X-Gal
	(発色)	ピンク～赤紫	ピンク～赤紫	赤	淡紅～赤	赤～紫	青～青緑色 ONPG 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

表2 浴槽水の大腸菌群・大腸菌汚染実態調査における大腸菌群の検出

原水の種類	検体数	残留塩素・モノクロロミン濃度別検出数				大腸菌群 検出検体数
		基準値 未満	基準値 内	基準値 超	測定不能 /不明	
井戸水	22	2	0	0	0	2(9.1)
水道水	35	1	1	0	0	2(5.7)
井戸水+水道水	4	0	0	0	0	0
温泉	76	9	4	0	3	16(21.1)
合計	137	12(8.8)	5(3.6)	0	3(2.2)	20(14.6)

() 内は%

表3 浴槽水の大腸菌群・大腸菌汚染実態調査における大腸菌の検出

原水の種類	検体数	残留塩素・モノクロロミン濃度別検出数				大腸菌 検出検体数
		基準値 未満	基準値 内	基準値 超	測定不能 /不明	
井戸水	22	2	0	0	0	2(9.1)
水道水	35	1	1	0	0	2(5.7)
井戸水+水道水	4	0	0	0	0	0
温泉	76	5	2	0	3	10(13.2)
合計	137	8(5.8)	3(2.2)	0	3(2.2)	14(10.2)

() 内は%

表4 浴槽水における残留塩素濃度と大腸菌群検出の関連性

		大腸菌群		合計
		検出	不検出	
残留塩素濃度	基準値未満	12	26	38
	基準値以上	5	89	94
合計		17	115	132

フィッシャーの正確確率検定により塩素濃度の違いによる
検出率の差は有意。 $p=0.00031<0.01$

表5 浴槽水における残留塩素濃度と大腸菌検出の関連性

		大腸菌		合計
		検出	不検出	
残留塩素濃度	基準値未満	8	30	38
	基準値以上	3	91	94
合計		11	121	132

フィッシャーの正確確率検定により塩素濃度の違いによる
検出率の差は有意。 $p=0.0042<0.01$

表6 現行法と大腸菌の定量法および定性法による基準値超過検体数^a

原水の種類	検体数	定量法			定性法	現行法
		1 個/mL 以下	1 個/mL 未満	不検出	不検出	1 個/mL 以下
井戸水	22	0	0	1	2	0
水道水	35	0	0	1	2	0
井戸水+水道水	4	0	0	0	0	0
温泉	76	3	5	6	10	6
計	137	3	5	8	14	6

a：定量法の基準値を「1 個/ml 以上」、「1 個/ml 未満」、「不検出」、
定性法の基準値を「不検出」と設定した場合の検出検体数

表7 現行法と大腸菌定量法（1個/mL以下）の比較

		現行法		合計
		基準値超過	基準値内	
定量法（1個/mL以下）	基準値超過	2	1	3
	基準値内	4	130	134
合計		6	131	137

フィッシャーの正確確率検定により2法の結果に差はない。 $p=0.0095<0.01$

表8 現行法と大腸菌定量法（1個/mL未満）の比較

		現行法		合計
		基準値超過	基準値内	
定量法（1個/mL未満）	基準値超過	4	1	5
	基準値内	2	130	132
合計		6	131	137

フィッシャーの正確確率検定により2法の結果に差はない。 $p=0.000011<0.01$

表9 現行法と大腸菌定量法（不検出）の比較

		現行法		合計
		基準値超過	基準値内	
定量法（不検出）	基準値超過	5	3	8
	基準値内	1	128	129
合計		6	131	137

フィッシャーの正確確率検定により2法の結果に差はない。 $p=0.0000018<0.01$

表 10 現行法と大腸菌定性法（不検出）の比較

		現行法		合計
		基準値超過	基準値内	
定性法 (不検出)	基準値超過	5	9	14
	基準値内	1	122	123
合計		6	131	137

フィッシャーの正確確率検定により 2 法の結果に差はない。 $p=0.000061<0.01$

表 11 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)	<u><i>Escherichia coli</i></u> (1)	<i>Citrobacter koseri</i> (1)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	<i>Citrobacter koseri</i> (2)	<i>Cronobacter</i> sp. (1)
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (3)	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (1)	
	<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)	<i>Serratia marcescens</i> (1)	
		<i>Aeromonas caviae</i> (1)	
白	<u><i>Serratia marcescens</i></u> (1)	<u><i>Serratia marcescens</i></u> (1)	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (3)
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (2)	<u><i>Cronobacter</i> sp.</u> (1)	<i>Pseudomonas mendocina</i> (1)
	<i>Pseudomonas mendocina</i> (2)	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (3)	<i>Pseudomonas alcaliphia</i> (1)
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (1)	<i>Pseudomonas mendocina</i> (1)	<i>Pseudomonas balearica</i> (1)
	<i>Providencia stuartii</i> (1)	<i>Providencia stuartii</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。

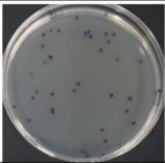
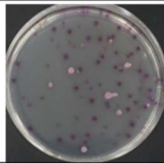
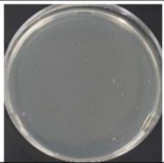
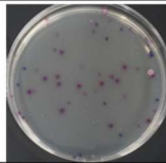
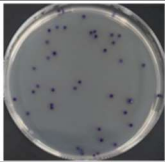
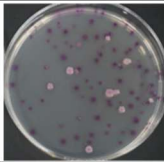
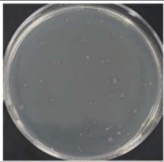
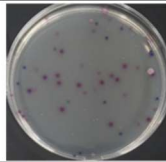
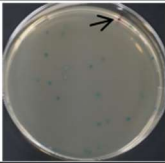

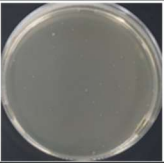
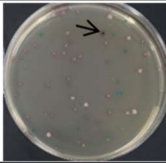
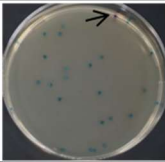
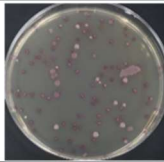
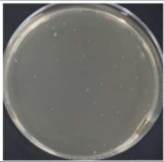
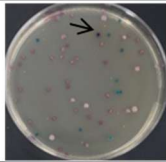
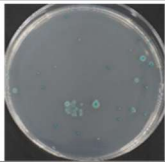

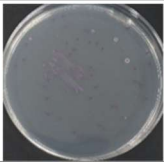
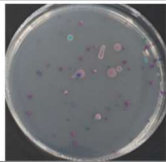
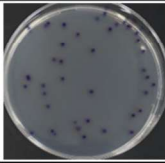
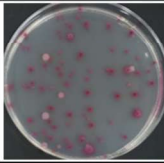
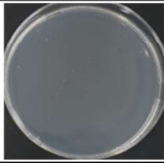
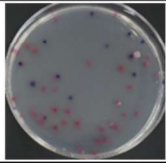
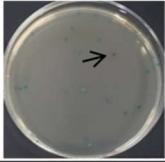
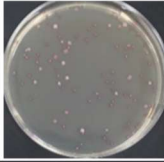
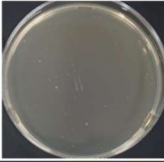
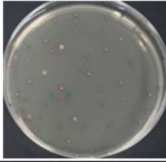
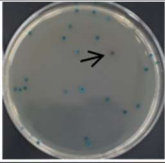
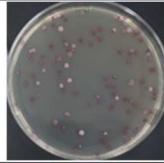

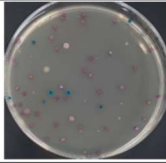
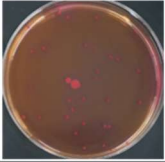
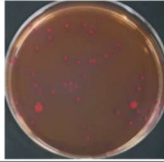
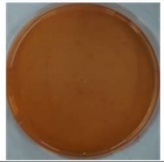
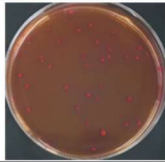
培地	培養時間	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Serratia</i> spp.	3菌種混合
A	18 h				
	22 h				
B	18 h				
	22 h				
C	24 h				
D	24 h				
E	18 h				
	24 h				
F	18-22 h				

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。

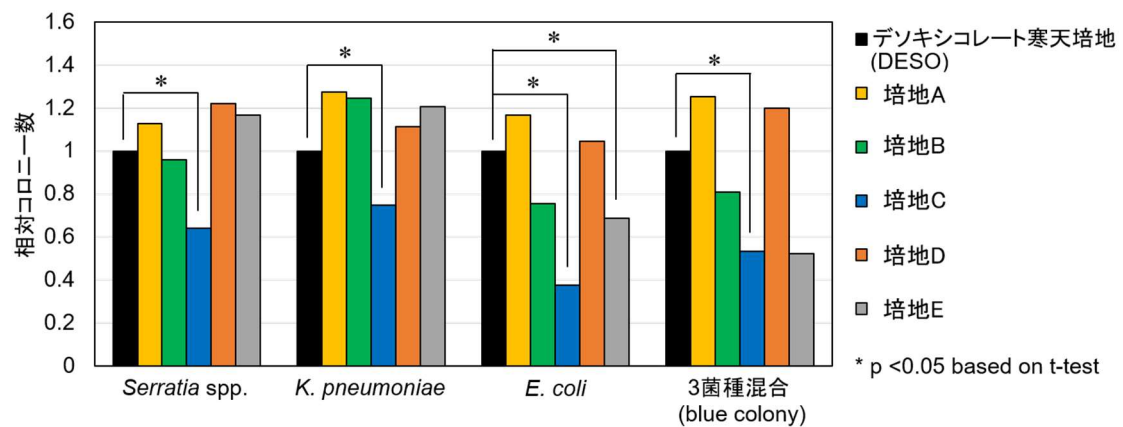


図2 5種類の酵素基質寒天培地におけるコロニー数の比較

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12 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%)