

資 料

レジオネラ対策における ATP 測定法を用いた温泉水の衛生管理に関する検討

門倉由紀子, 越 勝男, 野田万希子, 林 佐代子, 葛口 剛, 亀山芳彦

要 旨

レジオネラ対策のための迅速検査法として、ATP 測定法を温泉水の汚染指標として用いる方法を検討した。泉質の影響による ATP 反応の阻害を確認するため、県内の源泉及び温泉水 10 検体のろ過水に、ATP 標準液及びレジオネラ菌液を添加し、ATP 値を測定した。その結果、レジオネラ菌液を添加した塩化物泉において、滅菌水に対し 89.6% の ATP 値低下を認めた。また、アルカリ性単純温泉を源泉とする県内の温泉施設 1 施設において、温泉水の ATP 値、従属栄養細菌数及びレジオネラ属菌数を経時的に測定した。その結果、全体の ATP 値と従属栄養細菌数は相関したが、換水後に採水した検体において ATP 値がベースライン付近に局在し、レジオネラ属菌汚染を反映しなかった。温泉施設において ATP 測定法をレジオネラ属菌対策に活用する場合には、施設ごとに温泉成分の影響や検水のタイミングを考慮する必要があることが示唆された。

キーワード：レジオネラ属菌, ATP 測定法, 温泉水, 残留塩素濃度, 従属栄養細菌

1 はじめに

レジオネラ属菌を起因菌とするレジオネラ症は、近年患者報告数が増加しており、2018 年には集計開始以来最多となる全国で 2,142 例の報告があった¹⁾。レジオネラ属菌は人工水系中で増殖することが知られており、感染源としては浴槽水や冷却塔が多く、循環ろ過装置を利用した入浴施設におけるレジオネラ症集団感染事例も度々報告されており、レジオネラ症の発生を抑制するために入浴施設の衛生管理を徹底する必要がある。

浴槽水のレジオネラ属菌検査は一般的に平板培養法によって行われるが、判定まで一週間以上を要するため、迅速にレジオネラ属菌汚染を把握することは困難である。また、レジオネラ属菌の迅速検査法として PCR 法や LAMP 法などの遺伝子検査法が利用されているが、専門の検査機関による検査が必要で、事業者の自主的な衛生管理に用いることは難しい。レジオネラ属菌は、水中に形成された生物膜中のアメーバ等を宿主として増殖する。アメーバは細菌を捕食して増殖するため、水環境の衛生指標となる従属栄養細菌数によりレジオネラ属菌汚染リスクを評価することができる²⁾。しかし、従属栄養細菌数も実験室において 4 日以上培養する必要があるため、迅速にレジオネラ属菌汚染を把握する項目として適していない。

微生物汚染を評価するための迅速検査法の一つとして、ATP 測定法が利用されている。ATP 測定法は、

あらゆる生物に必須のエネルギー物質である ATP (アデノシン三リン酸) の量を、ルシフェラーゼの酵素反応により相対発光量 (RLU : Relative Light Unit) として検出する方法である。ハンディタイプの簡易測定器と測定キットを用いれば、現場で数分間に汚染具合を数値化し評価できることから、食品製造現場や医療現場で活用されている³⁾。環境分野においても、ATP 値と従属栄養細菌数には関連がみられることから⁴⁾、レジオネラ対策のための迅速検査として浴槽水の ATP 測定が試みられている。ATP 測定法を浴槽水の日常的な衛生管理項目として利用できれば、浴槽水の汚染度を監視し、迅速に清掃や消毒の対応につなげることができる。しかしながら、温泉水については温泉成分が ATP の発光反応に影響を与える可能性があるため、泉質の影響を考慮して用いる必要があるとされている⁵⁾。

今回、ATP 測定法の導入にあたり泉質の影響がどの程度あるのか把握するため、県内で採取した源泉及び温泉水を用いて、泉質が ATP 値に及ぼす影響を調査した。また、アルカリ性単純温泉を源泉とする県内温泉施設において、経時的にサンプリングを実施し、汚染度のモニタリング項目として ATP 測定法の活用を検討した。

2 材料と方法

2.1 対象

2.1.1 源泉及び温泉水の ATP 値に対する影響の検討

県内で採取した源泉及び温泉水 10 検体を用いた。鉱泉分析法の療養泉により分類した泉質の内訳は、単純温泉 3 検体 (No. 1~No. 3), 炭酸水素塩泉 5 検体 (No. 4~No. 8), 塩化物泉 1 検体 (No. 9), 硫黄泉 1 検体 (No. 10) であった (表 1)。

2.1.2 温泉施設における検証

県内の温泉施設 1 か所の協力を得て調査を行った。2017 年 10 月から 2018 年 3 月までの期間に、1 か月に 1~2 回の頻度で、浴槽水換水前 8 検体、換水後 (塩素注入前) 8 検体の計 16 検体の温泉水を採取した。温泉水は循環ろ過されており、原水はアルカリ性単純温泉 (表 1, No. 3) を使用していた。

2.2 方法

2.2.1 ATP 測定法の感度測定

ATP 標準液とレジオネラ菌液を用いて、ハンディタイプの簡易測定器と測定キットの感度を確認した。ATP 標準液は、ルシフェール ATP 標準試薬セット (キッコーマンバイオケミファ株式会社) を使用し、Distilled Water (Deionized, Sterile, autoclaved, DNase free, RNase free) (和光純薬工業株式会社) (以下, DDW) により $2 \times 10^{-7} \sim 2 \times 10^{-11}$ M の希釈系列を作製した。レ

ジオネラ菌液は、*L. pneumophila* 長崎株 (80-045 株) を使用し調製した。30 °C で 4 日間培養したレジオネラ属菌を DDW に懸濁し、 $1.1 \times 10^8 \sim 1.1 \times 10^4$ CFU/mL の希釈系列を作製した。測定はルミテスター PD-30 及びルシパック A3 Water (いずれもキッコーマンバイオケミファ株式会社) を用いた。ルシパック A3 Water は ATP に加えて AMP と ADP も同時に測定する方法であるが、本稿では ATP 値とする。ATP 標準液又はレジオネラ菌液をマイクロピペットで 150 μ L 採取し、採水部に添加した後、すみやかに試薬と混合し測定した。各系列 3 回繰り返し測定を行った。

2.2.2 源泉及び温泉水の ATP 値に対する影響の検討

源泉及び温泉水 10 検体について、実験室にて pH、電気伝導率、色度、濁度、従属栄養細菌数及び ATP 値を測定した。pH、色度及び濁度は「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法」(平成 15 年 7 月 22 日付け厚生労働省告示第 261 号) に準じて測定した。電気伝導率は日本工業規格「電気伝導率測定法通則」により測定した。従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地 (日水製薬株式会社) を用いて混釈し、30 °C で 4 日間混釈培養して菌数を計測した。ATP 値は、

表 1 検体の種類及び測定結果

No.	泉質	由来	pH	電気伝導率 (mS/m)	色度 (度)	濁度 (度)	ATP 値 (RLU)	従属栄養 細菌数 (CFU/mL)
1	単純温泉	浴槽水	8.2	41	0.6	0.41	111	3.7×10^5
2	アルカリ性単純温泉	浴槽水	8.6	82	9.6	0.06	5	0
3	アルカリ性単純温泉	源泉	9.4	56	0.1	0.09	15	5.8×10^3
4	ナトリウム - 炭酸水素塩泉	源泉	7.6	110	2.5	0.31	33	4.7×10^2
5	ナトリウム - 炭酸水素塩・塩化物泉	浴槽水	8.9	460	0.4	0.20	1	5
6	ナトリウム - 炭酸水素塩・塩化物泉	源泉	7.9	130	6.9	1.6	10	4
7	含硫黄 - ナトリウム・カルシウム - 炭酸水素塩・塩化物泉	源泉	7.6	140	2.1	1.0	110	1
8	カルシウム・ナトリウム・マグネシウム - 炭酸水素塩・硫酸塩泉	源泉	7.7	160	24	28	7	5.3×10^2
9	ナトリウム・カルシウム - 塩化物泉	浴槽水	7.9	710	16	6.7	30	3.1×10^5
10	単純硫黄泉 (硫化水素型)	源泉	7.4	16	0.3	0.04	9	8.2×10^3

「2.2.1 ATP 測定法の感度測定」と同様の方法で測定した。また、検体を孔径 0.2 μm のポリカーボネートフィルター (ADVANTEC) でろ過し、検体中の細菌を除いたろ液 (以下、ろ過水) を調製した。ATP 標準液及びレジオネラ菌液を「2.2.1 ATP 測定法の感度測定」と同様に調製し、ろ過水に添加した後、同様に ATP 値を同様に測定した。ATP 標準液及びレジオネラ菌液の添加は、 2.0×10^8 M の ATP 標準液 100 μL 又は 1.1×10^8 CFU/mL のレジオネラ菌液 100 μL を各々ろ過水 900 μL と混合し行った。対照として、DDW 900 μL に同量の ATP 標準液とレジオネラ菌液を添加し測定した。

2.2.3 温泉施設における検証

採取した 16 検体について残留塩素濃度、ATP 値、従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数を測定した。残留塩素濃度は現地地で測定した。ATP 値は採水翌日にルミテスター PD - 20 及びルシパック A3 Water により取扱説明書に従い測定した。従属栄養細菌数は R2A 寒天培地 (日水製薬株式会社) を用いて混釈し、35 °C で 4 ~ 7 日間混釈培養して菌数を計測した。レジオネラ属菌の分離は、「第 4 版レジオネラ症防止指針」⁶⁾ に従ってフィルター濃縮法により実施した。

3 結果

3.1 ATP 測定法の感度測定

ATP 標準液とレジオネラ菌液に対する ATP 値は、どちらも良好な直線関係が認められ、決定係数は 0.99 以上であった (図 1)。各希釈系列について変動係数を算出したところ、ATP 濃度 $2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^{10}$ M のとき 0.2 ~ 1.6 % であったのに対し、 2×10^{11} M のとき 10.4 % となった。レジオネラ菌液については、 $1.1 \times 10^8 \sim 1.1 \times 10^6$ CFU/mL のとき 0.4 ~ 1.9 % であったのに対し、 1.1×10^5 CFU/mL のとき 4.5 %、 1.1×10^4 CFU/mL のとき 70.7 % となり、ともに 10 RLU 付近の低濃度域でばらつきが大きくなる傾向がみられた。

3.2 源泉及び温泉水の ATP 値に対する影響の検討

源泉及び温泉水 10 検体について、pH、電気伝導率、色度、濁度、ATP 値及び従属栄養細菌数を測定した結果を表 1 に示す。pH は、アルカリ性単純温泉の No. 3 が 9.4 と最も高く、単純硫黄泉の No. 10 が 7.4 と最も低かった。10 検体の pH の平均は 8.1 で、アルカリ性の検体が多かった。電気伝導率は、単純温泉及び単純硫黄泉で低く (16 ~ 82 mS/m)、炭酸水素塩泉と塩化物泉で高い傾向を示した (110 ~ 710 mS/m)。5 度以上の色度を示した検体が 4 検体 (No. 2, No. 6, No. 8 及び No. 9)、2 度以上の濁度を示した検体が 2 検体 (No. 8 及び No. 9) 認められた。

ATP 値は 1 ~ 111 RLU (0.00 ~ 2.05 log RLU) の範囲

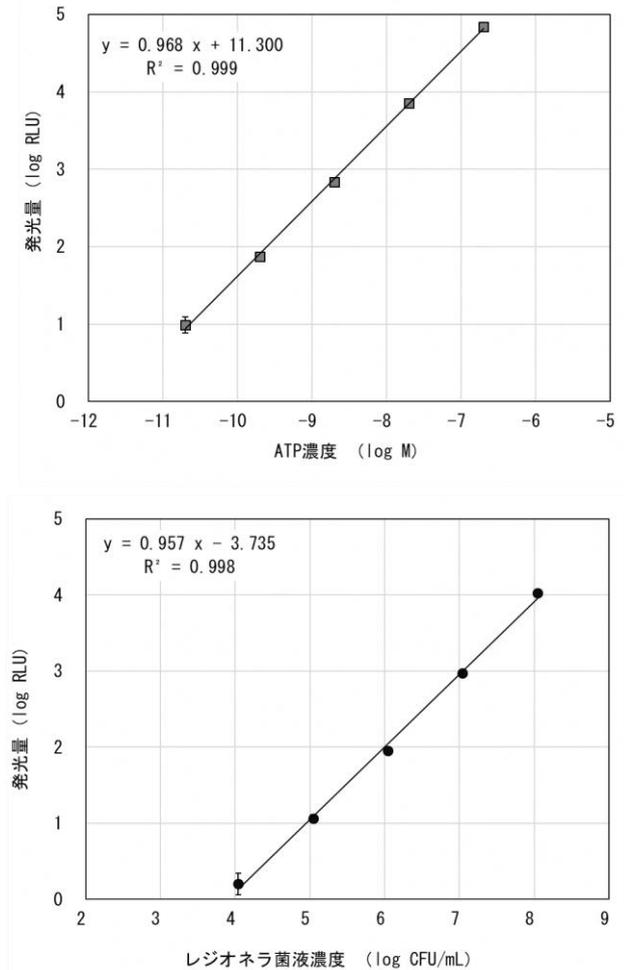


図 1 ATP 測定法の感度測定

で、平均±標準偏差は 1.18 ± 0.62 log RLU であった。従属栄養細菌数は $0 \sim 3.7 \times 10^5$ CFU/mL (0.00 ~ 5.57 log CFU/mL) の範囲で、平均±標準偏差は 2.83 ± 0.21 log CFU/mL であった。ATP 値と従属栄養細菌数の相関を調べたところ、相関係数は 0.39 で両者の相関はみられなかった。

ろ過水と、ATP 標準液及びレジオネラ菌液を添加した検体の ATP 値を図 2 に示す。ろ過水の ATP 値 (ブランク) は $0 \sim 51$ RLU (0.48 ~ 1.71 log RLU) の範囲で、No. 3 が最も低く、No. 9 が最も高かった。ろ過前の ATP 値 (表 1) よりも減少した検体が 6 検体 (No. 1, No. 3, No. 4, No. 6, No. 7, No. 10) 認められた。また、平均±標準偏差は 1.05 ± 0.39 log RLU となり、ろ過前の平均より減少した。

ATP 標準液を添加したときの ATP 値は 626 ~ 897 RLU (2.80 ~ 2.95 log RLU) の範囲で、平均±標準偏差は 2.89 ± 0.05 log RLU であり、検体間の差は認められなかった。DDW に ATP 標準液を添加したときの ATP 値は 907 RLU (2.96 log RLU) であった。DDW の ATP 値を 100 % とすると、すべての検体で ATP 値

は 100%以下となり, No. 9 の 94.6% が最も ATP 値が低かった。

レジオネラ菌液を添加したときの ATP 値は 678~1523 RLU (2.83~3.18 log RLU) の範囲で, 平均±標準偏差は 3.09 ± 0.10 log RLU であり, No. 9 の ATP 値 2.83 log RLU が他検体より低かった (<平均 -2SD)。DDW にレジオネラ菌液を添加したときの ATP 値は 1447 RLU (3.16 log RLU) であった。DDW の ATP 値を 100% とすると, No. 4 と No. 10 がそれぞれ 100.6%, 100.7% と 100% を越え, No. 9 の ATP 値は 89.6% であった。

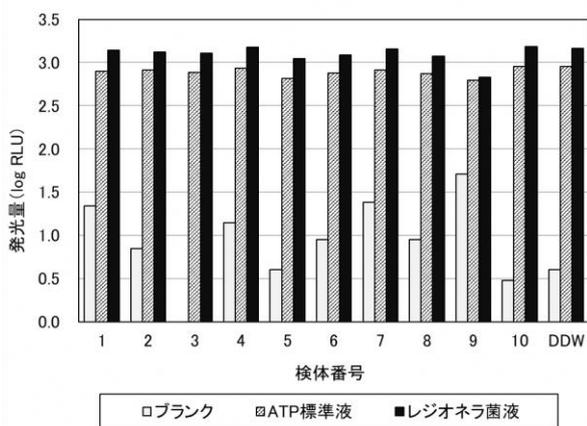


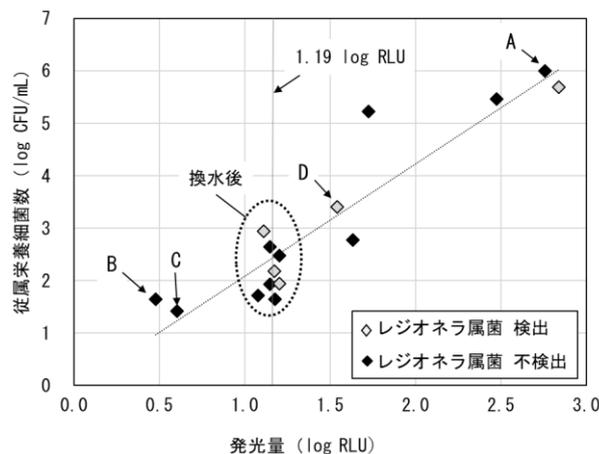
図 2 源泉及び温泉水の ATP 値に対する影響

3.3 温泉施設における検証

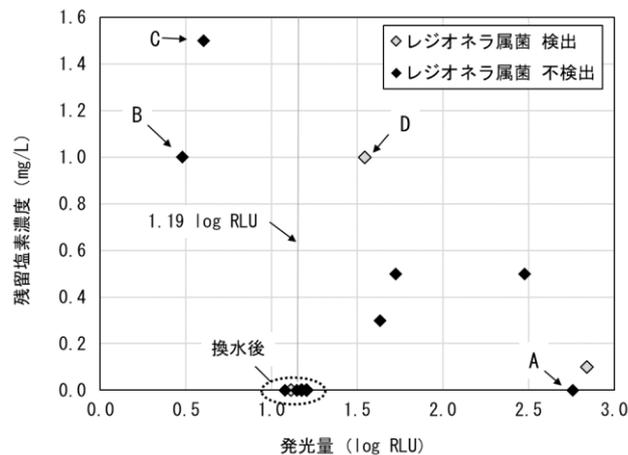
調査した 16 検体のうち, 5 検体からレジオネラ属菌が検出された。菌数の内訳は 10 CFU/100 mL が 3 検体, 30 CFU/100 mL が 2 検体であった。5 検体のうち 3 検体は換水後の検体であった。レジオネラ属菌が検出された検体のうち, 最も低い ATP 値は 13 RLU, 最も少ない従属栄養細菌数は 86 CFU/mL であった。

ATP 値と従属栄養細菌数及び残留塩素濃度の関係を図 3 に示した。ATP 値と従属栄養細菌数には相関がみられ, 相関係数は 0.92 であった (図 3 (a))。16 検体の ATP 値の平均±標準偏差は 1.46 ± 0.69 log RLU, 中央値は 1.19 log RLU であった。残留塩素が検出されなかった検体が 9 検体あり, このうち 8 検体は換水後 (塩素注入前) の検体であった (図 3 (b))。換水後の ATP 値は 12~16 RLU (1.08~1.20 log RLU) の範囲に局在しており, 従属栄養細菌数と相関しなかった。残りの 1 検体 (図 3, A) の ATP 値は 575 RLU (2.76 log RLU), 従属栄養細菌数は 1.0×10^6 CFU/mL (6.00 log CFU/mL) と高値であった。残留塩素濃度 1.0 mg/L 及び 1.5 mg/L の検体で, ATP 値がそれぞれ 3 RLU, 4 RLU と低い検体が認められた (図 3, B 及び C)。また, 残留塩素濃

度 1.0 mg/L の検体でレジオネラ属菌が検出された (図 3, D)。



(a) ATP 値と従属栄養細菌数の関係



(b) ATP 値と残留塩素濃度の関係

図 3 アルカリ性単純温泉を原水とする温泉施設における検証結果

4 考 察

ATP 測定法を使用し, 泉質が ATP 値に及ぼす影響と, 温泉施設において ATP 測定法を温泉水の汚染度の指標として活用するための方法を検討した。

測定にあたり, ATP 測定法の検量線を作成したところ, ATP 標準液とレジオネラ菌液は, それぞれ ATP 値に対して良好な直線性を示した (図 1)。また, 10 RLU 以下で変動係数が大きくなる傾向がみられ, ATP 測定法によるレジオネラ属菌の検出下限は 1.0×10^4 CFU/mL 程度と推察された。レジオネラ属菌の平板培養法の検出下限値は, 通常 10 CFU/100 mL であることから, ATP 値が低くても培養法でレジオネラ属菌が検出されることは十分ありうることを示された。

検水中には、微生物とともに微生物以外の ATP (遊離 ATP) が存在しており、ATP 測定法は、微生物の ATP と遊離 ATP の総和を測定している。源泉及び温泉水の ATP 値に対する影響 (図 2) においてフィルターろ過水から検出された ATP 値は、微生物以外の遊離 ATP と考えられた。最もブランクの高かった No. 9 の 51 RLU は、図 1 の検量線を参照するとレジオネラ属菌 5.0×10^5 CFU/mL に相当する。浴槽水の ATP 測定は、ATP 値の低い領域で評価しており、遊離 ATP の量が多くなると微生物量との相関に影響し、微生物汚染を的確に把握できない可能性がある。遊離 ATP は、入浴者や浴槽の構造物、死菌から放出された ATP などに由来すると考えられる。これらの ATP 値は採取場所や時間により異なると推察されるため、採取条件を可能な限り一定にし、ブランクを継続的に測定した上で ATP の基準値を設定する方法が適していると考えられた。

また、ろ過水に ATP 標準液とレジオネラ菌液を添加し ATP 値を測定した結果、No. 9 の塩化物泉において ATP 値の低下を認めた (図 2)。No. 9 は DDW に対し、ATP 標準液を添加した場合は 94.6%、レジオネラ菌液を添加した場合は 89.6% の ATP 値に低下した。No. 9 の温泉分析書によると、塩化物イオンは 3092 mg/kg であった。ATP 反応は 0.2% (w/v) の塩化ナトリウムで 78% 発光率が低下するが⁷⁾、それほど大きな ATP 値の低下はみられなかった。一方、pH 10 以上で ATP 値が増加するとの報告もあるが⁸⁾、最も pH の高かった pH 9.4 の No. 3 について ATP 値の増加は認められなかった。よって、今回検討した源泉及び温泉水において、塩化物泉では ATP 値が低下するが、その他の泉質は ATP 測定に影響を与えないことが示唆された。ただし、ATP 測定は溶液そのものの色や濁りの影響をうける場合があるため、ろ過前の検水を用いて温泉成分の影響を精査する必要がある。

また、温泉施設において汚染度のモニタリング項目として ATP 測定法の活用を検討した。遊離 ATP の変動を最小限にするため、採水のタイミングを浴槽水の換水前又は換水後に限定し測定を行った。その結果、全体の ATP 値と従属栄養細菌数は相関し、ATP 値は温泉水の微生物汚染を把握できていると考えられた。しかし、換水後の検体に限ってみると、ATP 値は 12~16 RLU (1.08~1.20 log RLU) の範囲に局在し、従属栄養細菌数と相関しなかった。レジオネラ属菌汚染の指標として ATP 値を適用できるのは浴槽水に限られ、湯口水には適さないとされている²⁾。塩素を注入した浴槽水で検証する必要があるが、換水後の検体は入浴前であり、湯口水と同様にレジオネラ属菌汚染の指標には適さない可能性がある。一方、温泉水のベースライン

は、源泉の ATP 値が 15 RLU (1.18 log RLU) であったことから (表 1, No. 3)、中央値 (1.19 log RLU, 約 16 RLU) 付近であると考えられた (図 3 (a))。しかし、ベースラインよりも低い 13 RLU (1.11 log RLU) の検体でレジオネラ属菌が検出されており、1.19 log RLU を基準値として衛生管理を行うことは、レジオネラ対策として不十分であると考えられた。また、2 検体のみであるが残留塩素濃度が高い検体において ATP 値の低い検体がみられ (図 3, B 及び C)、残留塩素濃度によりベースラインが低下する可能性があった。これらのことから、今回の施設において ATP 測定法を微生物汚染のモニタリング項目として用いる場合には、残留塩素濃度を一定にした条件で、換水前のタイミングに測定する方法が適していると推察された。なお、残留塩素濃度 1.0 mg/L であってもレジオネラ属菌が検出された検体が認められ、ATP 値も高値であった (図 3, D)。アルカリ性単純温泉はレジオネラ属菌が生息しやすく、塩素が効きにくいというリスクがある⁹⁾。このような場合には、残留塩素濃度の管理に加え、生物指標として ATP 測定法を追加することが有用である。今回は 1 施設における検証であったが、泉質や衛生管理状況は施設によって異なるため、今後さらに多くの施設における ATP 測定法の検証が望まれる。

今回の検討から、温泉施設において ATP 測定法をレジオネラ属菌対策に活用する場合には、施設ごとに温泉成分の影響や検水のタイミングを考慮する必要があることが示唆された。ATP 測定法は微生物そのものを測定する方法ではないが、ATP 値は生物に由来する汚染の指標であり、汚れの蓄積は細菌類の増殖につながるため、ATP 値を低く保つよう衛生管理を行うことは有用である。さらに、その場で結果が得られることの実用性は高く、迅速な汚染度の評価がレジオネラ汚染事故防止につながると考える。

謝 辞

本調査に際し、検体採取にご協力いただきました施設の皆様及び生活衛生指導センターの皆様には深謝いたします。また、源泉及び温泉水を提供して下さった飛騨保健所担当者の皆様に厚く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター、発生動向調査年別報告数一覧 (全数把握)
(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/9009-report-ja2018-20.html>) .
- 2) 黒木俊郎, 渡辺祐子, 寺西大, 佐々木美江, 藤田雅弘, 荒井桂子, 杉山寛治, 磯部順子, 中嶋洋,

- 田栗利紹, 緒方喜久代, 倉文明: ATP 測定による入浴施設の衛生管理・レジオネラ汚染リスク評価, 病原微生物検出情報, **34**, 167-168, 2013.
- 3) 本間茂: 清浄度検査法“ATP ふき取り検査”の活用事例 食品分野から環境管理全般へ, クリーンテクノロジー, **27**(1), 9-17, 2017.
- 4) 倉文明, 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)「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成 20 年度総括・分担研究報告書, 91-106, 2009.
- 5) 大黒寛: 平成 22・23 年度「保健所のレジオネラ対策における簡易迅速な検査方法の実用化と自主管理の推進に関する研究」報告書, 2012.
- 6) 第 4 版レジオネラ症防止指針, 35, (財) 日本建築衛生管理教育センター, 2017.
- 7) ATP + ADP + AMP ふき取り検査 (A3 法) TECHNICAL SHEET「ルシパック A3 の諸性質 測定値に対する阻害成分の影響」キッコーマン株式会社, 2017.
- 8) 井上博雄, 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」平成 18 年度総括・分担研究報告書, 165-179, 2007.
- 9) 井上博雄, 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」平成 17 年度～平成 18 年度総合研究報告書, 1-44, 2007.

Hot Spring Water Management for *Legionella* Control by Using ATP Bioluminescence Assay

Yukiko KADOKURA, Katsuo KOSHI, Makiko NODA, Sayoko HAYASHI, Tsuyoshi KUZUGUCHI and Yoshihiko KAMEYAMA

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan