

令和元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）
「化学物質等の検出状況を踏まえた水道水質管理のための総合研究」
分担研究報告書

微生物（細菌）に関する研究
レジオネラ汚染に対する従属栄養細菌の指標性に関する検討

研究分担者	秋葉道宏	国立保健医療科学院 生活環境研究部
研究協力者	大河内由美子	麻布大学 生命環境科学部
	浅田安廣	国立保健医療科学院 生活環境研究部
	中西智宏	京都大学大学院 工学研究科

研究要旨

水道システムの細菌汚染問題、特にレジオネラ汚染に関連する文献調査ならびに実態調査を行った。まず、生物活性炭処理での細菌挙動に関する情報を整理し、バイオフィルムが形成している生物活性炭層(BAC)内には、レジオネラ属菌やマイコバクテリウム属菌などの細菌が定着・再増殖し、処理水へ流出していく可能性が指摘された。続いて、従属栄養細菌数とレジオネラ汚染の関係性に関する文献考察を行い、HPC によるレジオネラ陽性判定が可能とした報告が確認されたものの、相反する報告も多数あり、各給水システム特性の影響を排除可能な評価法の確立が求められる。最後に山間部の小規模な配水区域で実施したレジオネラ属菌の実態調査において、管網の流下過程での遊離残留塩素の減少に従ってレジオネラ属菌や従属栄養細菌数が増加していることが確認され、残留塩素の管理の重要性を改めて指摘した。

A. 研究目的

水道水の微生物学的安全性の持続的な確保を目指すため、水道システムの微生物汚染問題、特に細菌による汚染に着目し、関連する文献調査ならびに実態調査を行った。なお、本研究では細菌汚染として従属栄養細菌、そして再増殖可能な病原細菌としてレジオネラ属菌に着目している。

具体的には文献調査について、浄水処理システムにおいて生物活性炭処理に着目し、生物活性炭処理での細菌挙動に関する情報を整理した。

続いて、水質管理目標設定項目である従属栄養細菌数（以下 HPC，暫定値：2000 CFU/mL 以下）とレジオネラ汚染に関する関係性を定量的に評価した既往文献の調査を行った。

実態調査について、小規模な配水区域を対象として、遺伝子レベルでのレジオネラ属菌の存在量を定量化し、残留塩素濃度や従属栄養細菌数との関連を評価した。

B. 研究方法

生物活性炭に関連する文献調査では、J-Stage、CiNii 等の論文検索サイト及び Google を用いたインターネット検索、水道研究発表会講演集、水道協会雑誌等の専門誌等を対象とした書籍検索を行った。HPC とレジオネラ汚染に関連する文献調査では、主に 2008 年以降に出版された文献を対象として調査を行った。

実態調査では、急速ろ過プロセスを実施する A 浄水場の給水エリアのうち、山間部の小規模な配水区域を調査区域とした。対象地域の管網形状と採水地点を図 1 に示す。配水池～末端に至るまでの 6 地点を採水地点とし、配水池、屋外の給水栓（3 箇所）、末端ドレン（2 箇所）からチオ硫酸ナトリウム溶液の入ったガラス瓶に水道水 2～3 L を採水した。採水期間は 2019 年 5～9 月、12 月であり、全 8 回行った。

試料 1～2L を孔径 0.2 μm のポリカーボネート

製ろ紙でろ過し、DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNA試料に対して、レジオネラ属菌と中でも病原性を持つとされる *Legionella pneumophila* (以降 *L. pneumophila* と記載)の遺伝子数を定量PCR法で測定した。増幅対象領域は既報^{1, 2)}に示す通りである。定量PCRには StepOnePlus™ RealTime PCR System (Applied Biosystems)を用いた。また自由生活性アメーバの存在の可能性を把握するため、18S rRNA 遺伝子³⁾の検出を行った。

その他の測定項目として、各地点の遊離残留塩素濃度をハンディ水質計(アクアブ AQ-201 型)で測定した。従属栄養細菌数は検水 1~10 mL を滅菌済みメンブレンフィルターにろ過後、R2A 寒天培地(ダイゴ, 日本製薬)に貼付して 20℃ で培養した。なお、損傷状態の細菌や増殖速度の遅い細菌類まで検出するため、培養期間を通常の 7 日間から 21 日間に延長した。

C. 結果及び D. 考察

1. 生物活性炭処理での細菌挙動に関する文献調査

生物活性炭(BAC)中にはアンモニア態窒素の生物分解に寄与する硝化細菌など、処理を補助する機能性微生物が存在している。細菌の活性炭への付着能力は、各細菌が有する性質に依存するものと考えられ、特にグラム陰性細菌は陽性細菌より活性炭に対する付着能が高い傾向を示している⁴⁾。そして、BACとしての機能を有する活性炭粒子への付着細菌として *Pseudomonas* 属、*Bacillus* 属、*Micrococcus* 属等が確認されている⁵⁻⁷⁾。

BAC 前後での微生物挙動において、オゾン処理 - BAC 処理の組み合わせにおいて、オゾン処理水に比べ BAC 処理水で HPC が高い傾向が確認されており^{8,9)}、BAC で増殖した細菌が処理中に流出しているといえ、後段処理に細菌制御に必要な処理を加える必要がある。

再増殖可能な病原細菌の一つであるレジオネラ属菌に着目した場合、粒状活性炭(GAC)に微生物群の定着が進みバイオフィームが発達すると *L. pneumophila* は GAC 上に定着し、増殖したこと

を確認している。さらに、*L. pneumophila* が GAC 粒子内よりもバイオフィーム内での増殖率が高く、バイオフィームが *L. pneumophila* の生育環境として重要であることを示している¹⁰⁾。また中国のオゾン処理 + BAC 処理を含む実処理施設において、オゾン処理水と比較して BAC 処理水でレジオネラ属菌遺伝子数が増加しており、また BAC 層内にもレジオネラ属菌遺伝子が検出された¹¹⁾ことから、BAC 層内でレジオネラが再増殖し、さらに処理水に流出する可能性がある。また BAC 層通過水に含まれる微生物のバイオフィームへの定着実験より、BAC 層通過水に由来するレジオネラ属菌のほか *Acanthamoeba* 属、*Mycobacterium* 属菌、*Hartmannella vermiformis* といった微生物が自然定着¹²⁾し、BAC がこのような微生物の定着・発生源となる可能性を示している。そのため、BAC 処理を適用する場合、後段での再凝集、砂ろ過処理の配置や塩素消毒の徹底など微生物の流出防止を含む適切な施設運用が重要である。

2. 従属栄養細菌数とレジオネラ汚染の関係性に関する文献調査

ここで取り上げた文献情報を表 1 にまとめて示す。HPC は各種の培地を用いてさまざまな培養条件(温度・時間)で測定されている点に注意が必要である。

既往文献調査の結果、HPC レベルとレジオネラ属菌数またはその陽性率の間の関係については、相反する報告が出されており、議論継続中であることがわかった。HPC によるレジオネラ陽性判定が可能とした報告では、そのカットオフ値として 27~150 CFU/mL が提案されており、現在の日本の水質管理目標値(2000 CFU/mL(暫定))と比較して極めて低い点にも注目すべきである。HPC の測定法(使用培地、培養温度、培養期間)が研究者ごとに異なるため、各培地や培養温度における HPC 検出特性が影響している可能性がある。収集した文献は、各建物内の温水供給システムを対象とした実態調査の結果に基づいているため、微生物学的パラメータ以外にも水温や残留塩素濃度、その他の水質因子、配管長、設置年数やその状態、

配管材質といった複数の要因が重なり合っており、あるシステムを対象として得られた両者の関係性はそのシステムにのみ特異的と考えるのが妥当であるといえる。よって、HPC とレジオネラ汚染の関係性を定量的に評価するためには、少なくとも配管や塩素消毒の影響を排除した試料を用いて、水温等をコントロール可能な条件下で HPC の変動とレジオネラ再増殖を調べることが望ましいと考えられる。

3. 配水システムにおけるレジオネラ属菌の分布

表 2 にレジオネラ属菌、*L. pneumophila*、18S rRNA 遺伝子の検出・定量結果を示す。流下過程での残留塩素濃度の低下(図 1)に応じて従属栄養細菌が増加している様子が確認された。これより、対象管網の末端地域においては残留塩素の低下によって生物膜が形成していると考えられる。

次にレジオネラ属菌は地点 1 では検出せず、上流部の地点 2, 3 でそれぞれ 57, 43%、下流部(地点 4~6)では 100%の検出率であった。また陽性試料の遺伝子濃度は上流部よりも下流部の方が高濃度であった。*L. pneumophila* は多くが LOQ 未満であったものの各地点で 14~75%の割合で検出された。18S rRNA 遺伝子の検出率は上流(地点 1~3)で 14~38%、下流部(地点 4~6)ではいずれも検出率 100%であり、流下過程で検出率は増加した。

以上を踏まえれば、給水分岐前の配水管内においても、特に残留塩素濃度の低い管網末端部を中心にレジオネラが存在することが示された。さらに、残留塩素濃度と HPC、レジオネラ属菌との関係を図 2 に示す。遊離塩素が 0.4 mg/L 以上の試料では 1 つを除いた全試料で LOQ 未満となった。また遊離塩素が 0.9~1.2 mg/L の試料では約 70%が qPCR でも不検出であった。これより遺伝子レベルではあるがレジオネラを制御するためには高濃度の遊離塩素の残留が必要といえる。

E. 結論

E1. 配水システムにおけるレジオネラ属菌の分布

・BAC 層の中でレジオネラ属菌やマイコバクテリウム属菌が定着・再増殖する可能性があり、BAC 処理後にこれらの細菌の流出防止を含む適切な施設運用が重要であることを指摘した。

・HPC によるレジオネラ陽性判定が可能とした報告が確認されたが、HPC レベルとレジオネラ属菌数またはその陽性率の間の関係については、議論継続中であることが明らかとなった。これらの情報に基づき、HPC とレジオネラ汚染の関係性を定量的に評価するための、各給水システムごとに異なる特性の複合的影響をできるだけ排除可能な実験方法の検討が必要であることを指摘した。

・山間部に位置する小規模な配水区域において、管網の流下過程での遊離残留塩素の減少に従ってレジオネラ属菌や従属栄養細菌数が増加していることが確認された。また遊離残留塩素が 0.4 mg/L 以上の大半の試料で定量下限未満であったことから、残留塩素の管理の重要性を改めて指摘した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 1) 廣瀬円, 中西智宏, 浅田安廣, 伊藤禎彦: 配水末端地域における水道水中レジオネラ属菌の分布調査, 第 54 回日本水環境学会年会講演集, p. 53, 2020.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

I. 参考文献

- 1) Lu, J., Struewing, I., Yelton, S. and Ashbolt, N. Molecular survey of occurrence and quantity of *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in municipal drinking water storage tank sediments. *J. Appl. Microbiol.*, 119(1), 278–288, 2015.
- 2) Nazarian, E. J., Bopp, D. J., Saylors, A., Limberger,

- R. J. and Musser, K. A. Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62 (2), 125-132, 2008.
- 3) Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D. S. and Greub, G. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (4), 2428-2438, 2006.
 - 4) 金周永, 杉浦則夫, 伏見聡, 稲森悠平, 西村修, 須藤隆一. 生物活性炭における細菌の付着能と高濃度基質分解特性. 日本水処理生物学会誌, 30(1), 49-56, 1994.
 - 5) Camper, A. K., LeChevallier, M. W., Broadaway, S.C., and McFeters, G.A. Bacteria associated with granular activated carbon particles in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 434-438, 1986.
 - 6) Brewer, W. S. and Carmichael, W. W. Microbial characterization of granular activated carbon filter systems. *Journal of the American Water Works Association*. 71, 738-740, 1979.
 - 7) Tobin, R. S., Smith, D. K., and Lindsay, J. A. Effects of activated carbon and bacteriostatic filters on microbiological quality of drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 646-651, 1981.
 - 8) 川西敏雄, 堤行彦, 杉本隆仁. 高度浄水処理における生物活性炭処理と活性炭吸着池の構造について. 環境技術, 17(9), 575-578, 1988.
 - 9) 大河内由美子, 石川卓, 高橋恭介, 伊藤禎彦. 水環境におけるエンドトキシンの変動要因と浄水処理過程におけるエンドトキシン除去特性. 環境工学研究論文集, 44, 247-254, 2007.
 - 10) Sharma, H. Colonization of Granular Activated Carbon Media Filters by *Legionella* and Heterotrophic Bacterial Cells. Masters Thesis, Arizona State University, 2014.
 - 11) Li, Q., Yu, S., Li, L., Liu, G., Gu, Z., Liu, M., Liu, Z., Ye, Y., Xia, Q. and Ren, L. Microbial communities shaped by treatment processes in a drinking water treatment plant and their contribution and threat to drinking water safety. *Front. Microbiol.*, 8, 2465, 1-16, 2017.
 - 12) Wang, H., Pryor, M. A., Edwards, M. A., Falkinham III, J. O. and Pruden, A. Effect of GAC pre-treatment and disinfectant on microbial community structure and opportunistic pathogen occurrence. *Water Res.*, 47(15), 5760-5772, 2013.
 - 13) Edagawa, A., Kimura, A., Doi, H., Tanaka, H., Tomioka, K., Sakabe, K., Nakajima, C., and Suzuki, Y. Detection of culturable and nonculturable *Legionella* species from hot water systems of public buildings in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 105(6), 2104-2114, 2008.
 - 14) Bargellini, A., Marchesi, I., Righi, E., Ferrari, A., Cencetti, S., Borella, P., and Rovesti, S. Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: association with trace elements and heterotrophic plate counts. *Water Res.* 45(6), 2315-2321, 2011.
 - 15) De Filippis, P., Mozzetti, C., Amicosante, M., D'Alò, G. L., Messina, A., Varrenti, D., Giammattei, R., Di Giorgio, F., Corradi, S., D'Auria, A., Fraietta, R., and Gabrieli, R. Occurrence of *Legionella* in showers at recreational facilities. *J. Water Health*, 15(3), 402-409, 2017.
 - 16) De Filippis, P., Mozzetti, C., Messina, A., D'Alò, G.L. Prevalence of *Legionella* in retirement homes and group homes water distribution systems. *Sci. Total Environ.*, 643, 715-724, 2018.
 - 17) Ghanizadeh, G., Mirmohamadlou, A., and Esmaeli, D. Predictive parameters of *Legionella pneumophila* occurrence in hospital water: HPCs and plumbing system installation age. *Environ. Monit. Assess.*, 188(9),

536. 2016.

- 18) Völker, S., Schreiber, C., and Kistemann, T. Modelling characteristics to predict *Legionella* contamination risk - Surveillance of drinking water plumbing systems and identification of risk areas. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, 219(1), 101-109, 2016.
- 19) 大屋日登美, 鈴木美雪, 政岡智佳, 中嶋直樹, 古川一郎, 前川純子, 倉文明, 泉山信司, 黒木俊郎. 医療機関の給水設備におけるレジオネラ属菌の汚染実態. *感染症学雑誌*, 92(5), 678-685, 2018.
- 20) Wiik, R. and Krøvel, A.V. Necessity and effect of combating *Legionella pneumophila* in municipal shower systems. *PLoS One.*, 9(12), e114331, 2014.
- 21) Pierre, D., Baron, J.L., Ma, X., Sidari III, F.P., Wagener, M.M., and Stout, J. E. Water quality as a predictor of Legionella positivity of building water systems. *Pathogens*, 8(4), 295, 2019.
- 22) Duda, S., Baron, J.L., Wagener, M.M., Vidic, R.D., Stout, J.E. Lack of correlation between *Legionella* colonization and microbial population quantification using heterotrophic plate count and adenosine triphosphate bioluminescence measurement. *Environ. Monit. Assess.*, 187(7), 393, 2015.

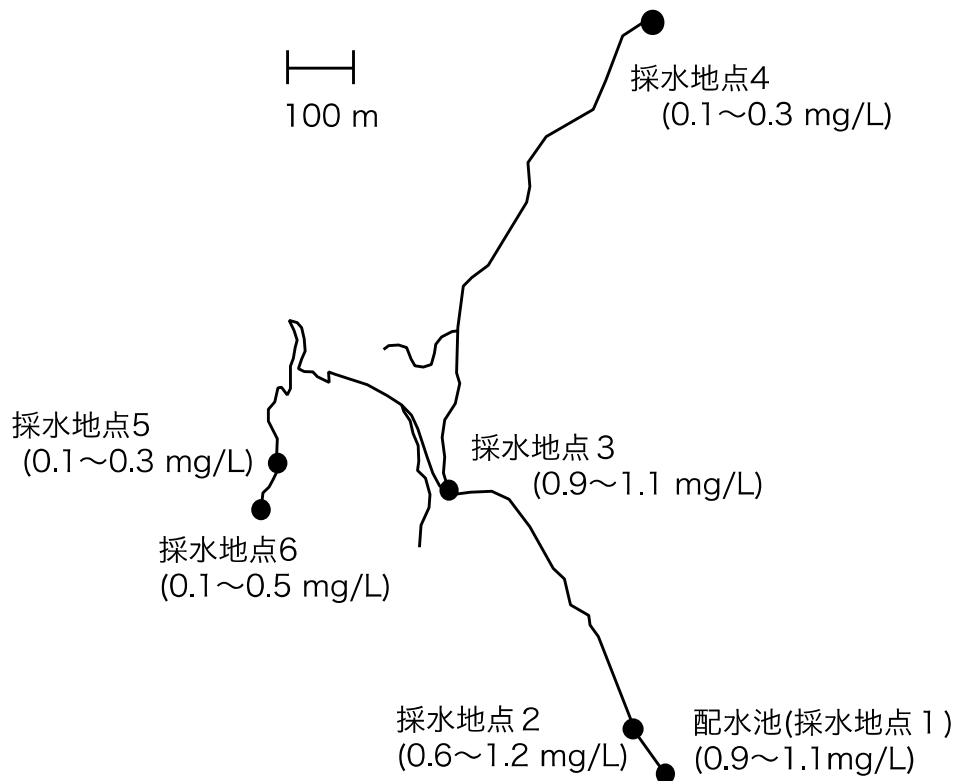


図1 調査区域の管網形状と採水地点ごとの遊離残留塩素濃度

表1 既往研究(2008以降)で報告された給水システムにおけるレジオネラ汚染と従属栄養細菌数の定量的評価の一覧

文献名	Edagawa et al. (2008) ¹³⁾	Bargellini et al. (2011) ¹⁴⁾	De Filippis et al. (2017) ¹⁵⁾	De Filippis et al. (2018) ¹⁶⁾	Ghanizadeh et al. (2016) ¹⁷⁾
対象システム	温水供給システム	温水供給システム	温水供給システム	温水供給システム	病院の給水栓水(冷水・温水)
レジオネラ検出方法・検出種	培養法/ qPCR法・レジオネラ属菌	培養法・ <i>L. pneumophila</i>	培養法・ <i>L. pneumophila</i>	培養法・ <i>L. pneumophila</i>	培養法・ <i>L. pneumophila</i>
HPC測定用培地	R2A寒天培地	標準プレートカウント培地	標準プレートカウント培地	標準プレートカウント培地	R2A寒天培地
HPC培養条件	30 °C, 7 days	37 °C・48 hr以上 22 °C・72 hr以上	37 °C・48 hr以上 22 °C・72 hr以上	37 °C・48 hr以上 22 °C・72 hr以上	35±0.5 °C, 48±2 hr
レジオネラ汚染とHPCの関係	陽性試料のHPC: 2.8 ± 8.8 × 10 ⁴ CFU/mL 陰性試料のHPC: 0.6 ± 2.9 × 10 ⁴ CFU/mL (p<0.05)	レジオネラ陽性に対する カットオフ値: HPC(22°C)→27CFU/mL HPC(37°C)→150CFU/mL	HPC(37°C)<10 CFU/mLの 場合, レジオネラ陽性率 が有意に低い	HPC(22°C)が10~300 CFU/mLの時, レジオネラ陽性率が有意 に高い	HPC>500 CFU/mLでは <i>L. pneumophila</i> が再増殖 (1000 CFU/L)
	Völker et al. (2016) ¹⁸⁾	大屋ら (2018) ¹⁹⁾	Wilk&Krøvel (2014) ²⁰⁾	Duda et al. (2015) ²¹⁾	Pierre et al. (2019) ²²⁾
対象システム	給水システム(冷水・温水・混合水)	医療機関給水設備	温水供給システム	冷却塔水・シャワー水(飲用水)	温水供給システム
レジオネラ検出方法・検出種	培養法・レジオネラ属菌	培養法/LAMP法・レジオネラ属菌	培養法・ <i>L. pneumophila</i>	培養法・レジオネラ属菌	培養法・レジオネラ属菌
HPC測定用培地	DEV培地	R2A培地	プレートカウント培地	R2A寒天培地	R2A寒天培地
HPC培養条件	36 °C・44±4 hr 20 °C・44±4 hr	20 °C, 7 days	37 °C・48 hr	36 °C, 5 days	35±0.5 °C, 48±3 hr
レジオネラ汚染とHPCの関係	100 CFU/mL超のHPC(20 °C)のみがレジオネラ汚染を精度良く予測可能	単変量ロジスティック回帰では, レジオネラ検出(培養+DNA)とHPCに正の関連あり	開栓直後の水でも30秒流した後のシステム水でも, レジオネラ汚染とHPCの間の相関は極めて低い	飲用水ではレジオネラ陽性試料を64%判別可能, しかし偽陽性率も高い	HPCとレジオネラ陽性率には明確な相関なし

表 2 調査配水区域におけるレジオネラと関連項目の検出状況

採水地点	従属栄養細菌		レジオネラ属菌		<i>L. pneumophila</i>		18S rRNA
	検出率* (%)	濃度 (log CFU/L)	検出率* (%)	濃度** (log copies/L)	検出率* (%)	濃度** (log copies/L)	検出率* (%)
地点 1	25 (2/8)	3.3, 3.9	0 (0/8)	<LOQ (0/0)	25 (2/8)	<LOQ (0/2)	38 (3/8)
地点 2	100 (7/7)	3.2~4.2	57 (4/7)	<LOQ (0/4)	43 (3/7)	<LOQ (0/3)	14 (1/7)
地点 3	100 (7/7)	3.6~4.7	43 (3/7)	<LOQ (0/3)	14 (1/7)	<LOQ (0/1)	29 (2/7)
地点 4	100 (8/8)	4.8~5.6	100 (8/8)	3.4~4.0 (7/8)	75 (6/8)	3.0~3.1 (3/6)	100 (8/8)
地点 5	100 (7/7)	3.9~5.6	100 (7/7)	3.0~4.2 (7/7)	29 (2/7)	<LOQ (0/2)	100 (7/7)
地点 6	100 (8/8)	4.9~5.6	100 (8/8)	3.0~4.4 (8/8)	50 (4/8)	<LOQ (0/4)	100 (8/8)

* ()内は陽性数/検体数

** LOQ 以上の試料での濃度範囲。()内は>LOQ の試料数/陽性数

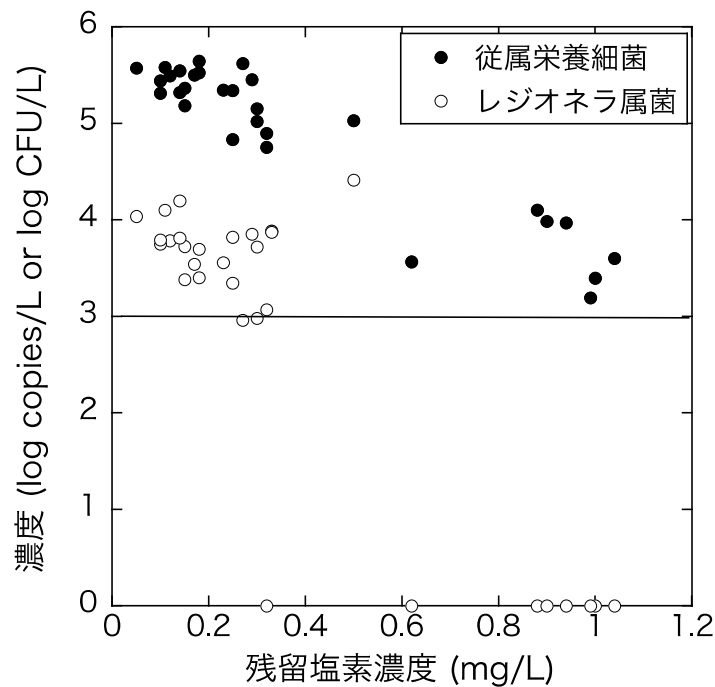


図 2 遊離残留塩素濃度と従属栄養細菌/レジオネラ属菌の関係
(実線はレジオネラの定量下限。定量下限未満の検出データは全て 0 log copies/L と表示)