

厚生労働科学研究（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」
令和元～3年度分担研究報告書

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、レジオネラ汚染に対する従属栄養細菌の指標性に関して検討を行った。

まず浄水処理システムの細菌類の挙動に関連する文献調査を行うとともに、従属栄養細菌に関する実態調査を実施した。文献調査では、生物活性炭処理での細菌挙動に関する情報を整理し、バイオフィー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。実態調査では、全国 21 浄水場の原水、ろ過水、浄水について、一般細菌数と従属栄養細菌数の調査を行い、一般細菌数と従属栄養細菌数との間に相関関係が確認されたが、従属栄養細菌数は一般細菌数よりも再増殖の影響を受けやすく、目標値設定には細菌類再増殖を考慮した上で検証する必要があることが示された。

次に、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ならびに室内実験を行った。文献調査では、従属栄養細菌数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ことが示された。文献調査を踏まえ、室内試験によりレジオネラ汚染に対する従属栄養細菌数の指標性評価に関する基礎的検討を実施した。まず、残留塩素消失過程を模擬した微生物再増殖試験を実施した結果、試験期間中の遊離塩素濃度変化から計算された Ct 値が小さかった試料を中心に塩素処理後の試料からレジオネラ属菌が確認された。さらに残留塩素濃度が 0.1 または 0.2 mg/L に調整した塩素処理試料において微生物再増殖試験を実施した結果、レジオネラ属菌の安定的な再増殖は確認できなかったが、自由活性アメーバ(FLA)は多くの試料で再増殖が起こることが確認された。さらに FLA の再増殖確認日より 3-12 日前の従属栄養細菌の再増殖が確認されたことから、従属栄養細菌数が FLA 再増殖の先行指標となりうる可能性が指摘された。

最後にレジオネラ汚染の制御方法に関する検討では、まず、山間部の小規模な配水区域を対象としてレジオネラ属菌に関する調査を実施し、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。そして室内実験に基づき、残留塩素による生物膜の不活化、水流による生物膜の剥離、剥離したレジオネラの不活化といった過程を把握し、給水管内のレジオネラ存在量と残留塩素濃度から水道水中のレジオネラ濃度を推定可能な数理モデルを構築した。さらに、間欠的な塩素接触条件での生物膜形成やレジオネラ再増殖の過程を把握した結果、レジオネラ属菌の再増殖は週 1 回以上の塩素接触によって抑制される可能性が示された。

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、実態調査ならびに室内実験による検討を行った。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。

まず、浄水処理システムでの細菌類の挙動について、生物活性炭処理に着目し、生物活性炭処理での細菌類の挙動に関する情報を整理した。そして、水質基準項目である一般細菌数と水質管理目標設定項目である従属栄養細菌数(HPC)について、全国 21 浄水場での実態を調査し、水質基準項目の一般細菌数との関係性について評価した。

次に、レジオネラ汚染に対する従属栄養細菌の指標性評価に関する文献調査ならびに室内実験を行った。室内実験では、浄水プロセス試料に対して異なる条件で塩素処理を行った後、残留塩素消失過程を模擬することで、レジオネラ属菌、従属栄養細菌数、自由生活性アメーバ(FLA)の再増殖を経時的に調べた。

最後に、レジオネラ汚染の制御方法の検討について、実態調査ならびに室内実験を実施した。実態調査では、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。室内実験では、給配水管内でのレジオネラの挙動を数理モデルで表現することを試みるとともに、給水管内面が間欠的に残留塩素と接触する状況でのレジオネラや生物膜の増殖特性を評価した。

B. 研究方法

1. 浄水処理システムでの細菌類の挙動に関する調査

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。実態調査では、全国 21 浄水場を対象とし、各浄水場の原水、ろ過水、浄水について一般細菌数と従属栄養細菌数の調査を 2 回(2021 年 10 月、2022 年 1 月)行った。原水については、滅菌

PBS により段階希釈を行い、平板培養法で培養した。ろ過水、浄水については試料 1mL を培養するとともに、100 mL (必要に応じて 1 L) を滅菌済みメンブレンフィルター(孔径: 0.22 μm) でろ過し、そのろ紙をあらかじめ準備した平板寒天培地上に置き、培養を行った。一般細菌数は、標準寒天培地を用いて $37\pm 1^\circ\text{C}$ で 24 時間培養し、従属栄養細菌数は、R2A 寒天培地を用いて $20\pm 1^\circ\text{C}$ 、7 日間、14 日間培養した。

2. 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基礎的検討

従属栄養細菌数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。

続いて、高度浄水処理施設において採水した活性炭処理水を被験水とし、室内実験による培養実験を行った。まず、遮光した滅菌ガラス瓶に分注し、GVPC 培地であらかじめ培養した *Legionella feeleii* 血清群 1 (過去に水道水から単離した株) を初期濃度が 10^3 CFU/L 程度となるよう植菌し、 20°C または 30°C で 24 時間程度静置した。この静置は、レジオネラ属菌の宿主である自由生活性アメーバ(FLA)によるレジオネラ属菌の取り込みを目的としたものである。静置後、測定した塩素消費量・塩素要求量に基づいて、次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加して塩素処理を実施した。塩素処理後の各試料を 20°C または 30°C に静置し、残留塩素濃度(HACH Free Chlorine Reagen/Total Chlorine Reagent)を毎日測定するとともに、2~3 日おきに以下の各方法で微生物数の測定を行った。レジオネラ属菌は 100~250 mL の試料を孔径 0.20 μm の Isopore メンブレンフィルターを用いて捕集した後、上水試験方法¹⁾に準い 10 分間の酸処理を行い、GVPC 培地を用いて 37°C で 7 日間培養した。従属栄養細菌数は R2A 平板培地を用いて 20°C 、7 日間の培養後にコロニーを計数して求めた。FLA 測定は 250 mL の試料を孔径 3 μm のメンブレンフィルターで 1 mL に濃縮した。この濃縮液を熱不活化した大腸菌液を塗布した無栄養寒天培地を用いて 30°C で培養し、位相差顕微鏡観察を実施するとともに、形成されたプラーク数を計数した。

3. レジオネラ汚染に対する感染リスク制御に関する基礎的検討

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。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。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。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 寒天培地に貼付して 20°C 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。

次に、室内実験によって、給水管内のレジオネラや生物膜の挙動をモデル化した。具体的には、残留塩素による生物膜の不活化、水流による生物膜の剥離、剥離したレジオネラの不活化といった過程を把握した。給配水管内の水理条件を再現可能なアニュラーリアクター (Model 1320LS, Biosurface Technologies) 3台とエポキシ樹脂粉体塗膜製の試験片を用いて、淀川表流水を流量 25~50 mL/min で循環通水することで、レジオネラを含む生物膜を作り出した。生物膜の不活化実験では、生物膜形成後のアニュラーリアクターに対して、遊離残留塩素濃度が約 1.5 mg/L となるように調整した京都大学実験室の水道水を連続的に供給した (流量: 40 mL/min)。その後、時間的に試験片を取り出し、PBS 中でセルスクレーパーによる生物膜の剥離と超音波による分散処理を施した後、得られた試験水の従属栄養細菌を測定した。生物膜の剥離実験では、生物膜を形成させた試験片を設置したアニュラーリアクターに対して実験室の水道水 (塩素中和済み) を流量 80~84 mL/min で連続的に流入させた。運転中、リアクター内部のシリンダ回転数を約 230 rpm と設定することで、内径 20 mm の給水管に水道水を約 0.5 m/s の流速で流した場合に生じるせん断力を再現した。試験片を時間的に取り出し、PBS 中で試験片の超音波

処理を行って得られた検水を孔径 0.2 μm のポリカーボネート製メンブレンフィルターでろ過し、DNeasy® PowerWater Kit (QIAGEN)でろ紙上の DNA を抽出した。この抽出液に対して、全細菌 (16S rRNA 遺伝子)とレジオネラ属菌の遺伝子濃度を qPCR 法によって測定した。最後に、水流によって剥離されたレジオネラの不活化過程を把握するため、生物膜からの剥離物に対して消毒実験を行った。具体的には、PBS で満たしたアニュラーリアクター内で生物膜形成させた試験片を高速回転 (230 rpm、4時間×2回) させて生物膜を剥離・懸濁させ、得られた懸濁液に対してバッチ式で塩素処理を行い、時間的に従属栄養細菌/レジオネラ属菌の培養と残留塩素濃度の測定を行った。以上で得られた結果をモデル式に当てはめ、管内面からの生物膜の剥離速度定数 $k_d(\text{min}^{-1})$ や、水中でのレジオネラの不活化速度定数 $k_{c12}(\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1})$ を推定した。

最後に3台のアニュラーリアクターに水道水を異なる塩素接触条件で供給し、装置内のポリ塩化ビニル製試験片上に形成した生物膜やレジオネラ数を測定した。まず水温約 35~40 °C に調整した水道水をリアクターに供給した。この時、30分間の通水 (流量 50 mL/min) と 30分間の止水を繰り返し、通水時にはチオ硫酸ナトリウム溶液によって水道水中の残留塩素を中和した。3台のリアクターのうち1台はこのようにして残留塩素のない水道水を常に通水し続けた。2台目と3台目のリアクターは、それぞれ週に1回と2回の頻度でチオ硫酸ナトリウム溶液の代わりに次亜塩素酸ナトリウム溶液を注入し、リアクター流出水中の残留塩素濃度を 0.3~0.7 mg/L となるように維持した。なお、1回の塩素接触時間は3時間とした。上記の運転を開始してから約1~2週間に1回の頻度でリアクター内部の試験片を2枚ずつ取り出した。原則、試験片は塩素接触後3日以上経過してから取り出したが、通水74日目と92日目の試験片は消毒効果を確認するために塩素接触してから1時間後に取り出した。試験片を滅菌 PBS 150 mL 中に浸してセルスクレーパーで生物膜を剥離させた後、1分間の超音波処理で生物膜などを懸濁させ、得られた試料水中の従属栄養細菌数とレジオネラ属菌数を測定した。

C. 結果及びD.考察

1. 浄水処理システムでの細菌類の挙動に関する調査

まず、生物活性炭（BAC）を中心とした文献調査の結果を下記にまとめる。

BAC 前後での微生物挙動において、オゾン処理+BAC 処理の組み合わせでは、オゾン処理水に比べ BAC 処理水で従属栄養細菌数が高い傾向が確認されておた^{2,3)}。また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⁴⁾。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⁵⁾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。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と言える。

続いて、従属栄養細菌数に関する実態調査について下記にまとめる。

全国 21 浄水場の原水、ろ過水、浄水での一般細菌数と従属栄養細菌数の測定結果により、相関関係が確認された（決定係数 $R^2=0.75$ ）（図 1）。得られた回帰式に基づき、一般細菌数 100 CFU/mL に相当する従属栄養細菌数を算出した結果、431 CFU/mL [95%信頼区間: 194 CFU/mL、956 CFU/mL] となり、現行の暫定目標値の 2000 CFU/mL を大幅に下回る結果となった。一方、浄水あるいはろ過水試料において、一般細菌と比較して従属栄養細菌の濃度範囲が広い結果となった。また本調査では、フィルター濃縮法を用いることでより低濃度での存在状況を評価しており、一般細菌が十分に制御されている状況下でも従属栄養細菌自体は再増殖し、比較的高い濃度で検出されるケースがあることが確認された。そのため、従属栄養細菌の方が、細菌類の再増殖状況を表現できていると考えられる。以上を踏まえると、一般細菌数と従属栄養細菌数の関係性より目標値を設定する際には、細菌類の再増殖を考慮した設定方法を検証

する必要があると言える。

2. 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基礎的検討

まず、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の結果を下記にまとめる。

従属栄養細菌数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。従属栄養細菌数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。従属栄養細菌数の測定法（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従属栄養細菌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、従属栄養細菌数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従属栄養細菌数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。

続いて、残留塩素消失過程を模擬した微生物再増殖試験に関する結果を下記にまとめる。

室内実験での塩素処理条件ならびに 24 時間後の実測塩素濃度、試験期間中の遊離塩素濃度変化から計算された Ct 値、ならびにレジオネラ検出結果を表 1 にまとめて示す。塩素処理なしの試料では、すべての試料でレジオネラ属菌の増殖が確認され、植菌操作後 6 日目には増殖が定常期に達した。定常期における平均レジオネラ属菌数は 20 °C 培養試料では 3.2×10^6 CFU/L（1 回目）、 2.3×10^6 CFU/L（2 回目）、30 °C 培養試料では 4.4×10^6 CFU/L（1 回目）、 7.3×10^6 CFU/L（1 回目）となり、30 °C 培養の方が増殖量が大きかった。一方、塩素処理を行った試料では、表 1 に示すように Ct 値

が最小であった設定塩素濃度 0.1 mg/L、30 °C 培養試料において 6 回のサンプリング中 3 回と、最も高頻度でレジオネラ属菌が検出された。この試料の残留塩素濃度、レジオネラ属菌数、従属栄養細菌数の経時変化を図 2 に示す。塩素処理後に不検出となった後、再度検出されたレジオネラ属菌数は 200~760 CFU/L であり、植菌量よりも明らかに減少していた。

次に、残留塩素濃度が 0.1 または 0.2 mg/L に調整した塩素処理試料において微生物再増殖試験を実施した。塩素処理なしの試料では、再増殖試験開始時から従属栄養細菌数が $10^3 \sim 10^5$ CFU/mL と高い値を示した。一方、塩素処理試料では、塩素注入により従属栄養細菌数がいったんほぼ不活化された後に再増殖したが、再増殖開始日は試料により大きく異なった。レジオネラ属菌については 1 試料のみ、GVPC 培地上に生育したコロニーを対象として確定試験を行った結果、塩素処理なしの試料では最大 $10^5 \sim 10^6$ CFU/L の濃度で検出されたが、塩素処理試料ではいずれの残留塩素濃度でも不検出 (<40 または <100 CFU/L) となった。FLA については塩素処理なしの試料では 8~192 PFU/L の濃度範囲で検出され、塩素処理試料においても多くの試料で 4~56 PFU/L の濃度に到達した。

残留塩素消失に伴って起こる FLA の再増殖に対する従属栄養細菌数の指標性を検討するため、再増殖試験の結果に基づき、各塩素処理条件における従属栄養細菌の再増殖確認日と FLA の検出日を比較した。結果を表 2 に示す。FLA の再増殖は 8 月試料では 8 日目以降、10 月試料では 11 日目以降、12 月および 1 月試料では 14 日目にそれぞれ初確認され、水温が低下するにつれて活性炭処理水中に残留する FLA の再増殖開始が遅れることが示された。また、試験期間中に FLA の再増殖が見られた試料では、1 試料 (21 年 8 月採水試料/設定残留塩素 0.2 mg/L/培養温度 20 °C) を除いて FLA の増殖確認日より 3~12 日前に従属栄養細菌の増殖が確認されていた。

この結果を踏まえて、FLA 再増殖が起こりやすくなる従属栄養細菌数レベルを探るため、各塩素処理試料のうち FLA が再増殖した群を対象として、初めて FLA の増殖が確認された日より 3 日前または 6 日前の従属栄養細菌数の分布を調べた。その結果、6 日

前の従属栄養細菌数濃度は不検出 (<1 CFU/mL) ~ 1.3×10^5 CFU/mL に広く分布し、偏りは見られなかった一方、FLA 増殖確認 3 日前の従属栄養細菌数は前述の異常値 1 点を除いて 9.5×10^3 CFU/L 以上に偏っており、従属栄養細菌数の先行増殖が FLA 増殖の指標となりうると考えられた。

3. レジオネラ汚染に対する感染リスク制御に関する基礎的検討

まず、給配水システムにおけるレジオネラ属菌の実態調査結果について、残留塩素濃度と HPC、レジオネラ属菌との関係を図 3 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レジオネラ属菌の遺伝子が LOQ 未満となった。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重要であると考えられた。

続いて、給配水管内におけるレジオネラ属菌に関する挙動モデルに関する検討結果について、下記にまとめる。まず、室内実験の結果から、生物膜の剥離速度定数 k_d を 0.023, 0.047 min^{-1} と推定でき、不活化速度定数 k_{Cl_2} を 0.21, 0.25 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ と推定できた。以上の結果を踏まえて、給配水管内でのレジオネラの挙動を定式化した。仮想的な給水管 (内径 20 mm、長さ 1 m) における押し出し流れを想定し、まず管内の任意の場所において生物膜から剥離したレジオネラの濃度 C_T を以下の式(1)に従って表現した。なお、この濃度 C_T は生死を区別しない全レジオネラ濃度を意味する。

$$\frac{\partial C_T}{\partial t} = -u \cdot \frac{\partial C_T}{\partial x} + SA \cdot k_d \cdot C_{b,0} \cdot \exp(-k_d \cdot t) \cdot CF \quad (1)$$

C_T : 時刻 t 、位置 x におけるレジオネラ濃度 (死菌含む) (cells/L)、 u : 管内流速 (m/s)、 SA : 給水管単位体積辺りの内面積 (200 m^2)、 $C_{b,0}$: 流速増加開始時の給水管内面のレジオネラ密度 (cells/cm²) (生菌状態, 0.1 cells/cm² と設定)、 CF : 単位換算用の定数 (1/6)、 u : 流速 (0.5 m/s) である。 k_d として 0.023、0.047 min^{-1} の値を用いて計算したところ、図 4(a) のように剥離したレジオネラの管出口での濃度変化を推定できた。

続いて、流速増加して時間 t 後に排出された水道水は時間 t だけ塩素消毒されたものと仮定し、剥離したレジオネラ濃度 C_T のうちの生菌状態のレジ

オネラ濃度 C_v を以下の式(2)に従って推定した。
 k_{Cl_2} には消毒実験で得られた $0.21, 0.25 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ を用い、残留塩素濃度 C_{Cl_2} は 0.5 mg/L (一定) とした。

$$C_v = C_w \cdot \exp(-k_{Cl_2} \cdot C_{Cl_2} \cdot t) \quad (2)$$

k_d, k_{Cl_2} の全てのパラメータセットを用いて蛇口での生菌状態のレジオネラ濃度変化を推定した結果、給水管内のレジオネラ存在量($C_{b,0}$)が 0.1 cells/cm^2 の場合、管出口におけるレジオネラ生菌数は最大で $0.01 \sim 0.03 \text{ cells/L}$ 程度となり、その後水道水の使用に伴って下がっていった(図 4(b))。このように、給水管内の任意のレジオネラ存在量と残留塩素濃度のもとで水道水中のレジオネラ濃度を推定可能とした。

最後に、給配水管内におけるレジオネラ汚染の制御方法に関する検討結果について、下記にまとめる。

塩素接触頻度に対する従属栄養細菌数への影響について、通水期間における試験片上の従属栄養細菌数の推移結果を図 5 にまとめる。通水開始後、約 20 日で従属栄養細菌数は約 $4 \sim 5 \text{ log CFU/cm}^2$ 程度に達し、その後は $3 \sim 5 \text{ log CFU/cm}^2$ の範囲で変動した。塩素接触頻度が 0 回/週の条件で従属栄養細菌数が最も大きい場合が多かったものの、総じて塩素接触頻度の違いによる明確な影響は見られなかった。また、74 日目と 92 日目には塩素接触直後の従属栄養細菌を測定したところ $2.3 \sim 3.0 \text{ log CFU/cm}^2$ となり、塩素接触前後で $1 \sim 2 \text{ log}$ 程度減少していることが確認された。以上より、毎回の塩素接触によって生物膜中の従属栄養細菌は不活化されるものの、次の塩素接触までの数日間で急速に再増殖していることが推察された。

レジオネラ属菌は通水開始後 74 日目までは全てのリアクターで不検出であったが、77、92 日目には塩素接触のない条件のみ、レジオネラが $0.9 \sim 22 \text{ CFU/cm}^2$ の密度で検出された。塩素接触のある系では全期間で不検出であったことから、間欠的な塩素接触によって生物膜でのレジオネラ増殖が抑制された可能性が考えられる。ただし、今回の試験期間は 3 ヶ月程度と非常に短く、レジオネラや宿主アメーバ等の関連微生物からなる微生物相の成熟には至っていないことには注意が必要である。

E. 結論

本研究では、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、レジオネラ汚染に対する従属栄養細菌の指標性に関して検討を行った。得られた知見を以下に示す。

- ・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。

- ・全国 21 浄水場の原水、ろ過水、浄水での一般細菌数と従属栄養細菌数の測定結果に基づき、相関性を評価した結果、回帰式は得られたものの、浄水、ろ過水において従属栄養細菌数にバラツキが大きく、細菌類の再増殖による影響であると考えられた。

- ・従属栄養細菌数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、従属栄養細菌数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、従属栄養細菌数とレジオネラ汚染の関係性を定量的に評価するための、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。

- ・残留塩素消失過程を模擬した微生物再増殖試験を実施した結果、試験期間中の遊離塩素濃度変化から計算された Ct 値が小さかった試料を中心に塩素処理後の試料からレジオネラ属菌が検出された。

- ・塩素処理試料(設定残留塩素 $0.1, 0.2 \text{ mg/L}$)においてレジオネラ属菌の安定的な再増殖は確認できなかったが、FLA は多くの試料で再増殖が起こることが確認された。1 試料を除いて、FLA の増殖確認日より $3 \sim 12$ 日前に従属栄養細菌の増殖が確認され、特に再増殖確認日より 3 日前の従属栄養細菌数が顕著に増加しており、従属栄養細菌数が FLA 再増殖の先行指標となりうる可能性が指摘された。

- ・山間部に位置する小規模な配水区域において、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レジオネラ属菌の遺伝量が定量下限未満で

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。

・室内実験により残留塩素による生物膜の不活化、水流による生物膜の剥離、剥離したレジオネラの不活化といった過程を把握し、給水管内のレジオネラ存在量と残留塩素濃度から水道水中のレジオネラ濃度を推定可能な数理モデルを構築できた。

・間欠的な塩素接触条件での生物膜形成やレジオネラ再増殖の過程を把握した。生物膜の形成状況は週 0～2 回の塩素接触条件で顕著な差は見られなかったものの、レジオネラの再増殖は週 1 回以上の塩素接触によって抑制される兆しが確認された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 大河内由美子, 泉山信司, 前川純子: 貯水槽水道で滞留した水道水からのレジオネラ属菌および関連微生物の検出状況, 日本防菌防黴学会誌, 48(8), pp. 377-382, 2020.

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) 日本水道協会. 上水試験方法 V. 微生物編 2011 年版, 2011.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Sharma, H. Colonization of Granular Activated Carbon Media Filters by Legionella and Heterotrophic Bacterial Cells. Master's Thesis, Arizona State University, 2014.
- 5) 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.

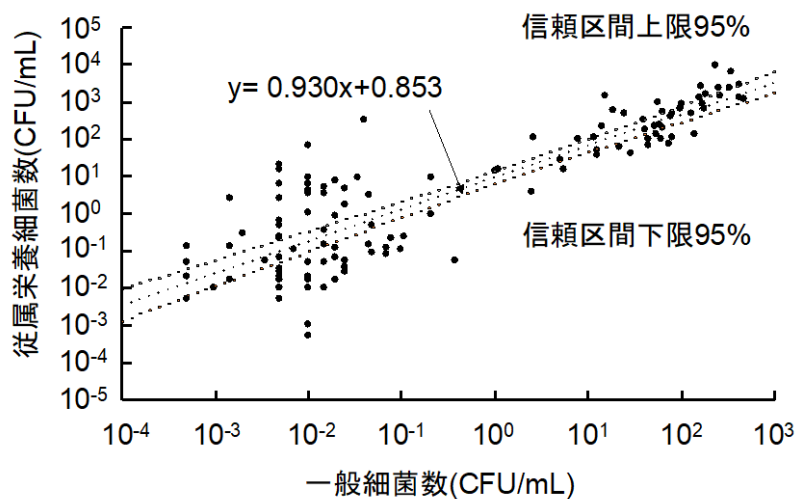


図1 一般細菌数と従属栄養細菌数の関係性評価

表1 塩素処理・培養条件とレジオネラ検出結果

被験水	20~24時間後の 設定塩素濃度 (mg/L)	培養温度 (°C)	24時間後の実測塩素濃度(mg/L)		算出されたCl値 (mg・min/L)	レジオネラの 検出回数	検出された レジオネラ属菌数 (CFU/L)
			全塩素	遊離塩素			
1回目採水試料 (2021年1月)	0	20	—	—	—	6/6	3.2×10^6
		30	—	—	—	6/6	4.4×10^6
	0.3	20	0.40	0.27	1548	1/6	80
		30	0.24	0.11	814	2/6	80~160
	0.8	20	0.87	0.74	7668	0/6	<40
		30	0.70	0.58	3334	2/6	40~80
2回目採水試料 (2021年3月)	0	20	—	—	—	6/6	2.3×10^6
		30	—	—	—	6/6	7.3×10^6
	0.1	20	0.14	0.06	284	2/6	40~120
		30	0.07	0.02	169	3/6	200~760
	0.2	20	0.25	0.12	562	1/6	40
		30	0.13	0.03	234	2/6	120

塩素処理試料のレジオネラ検出下限値：40 CFU/L

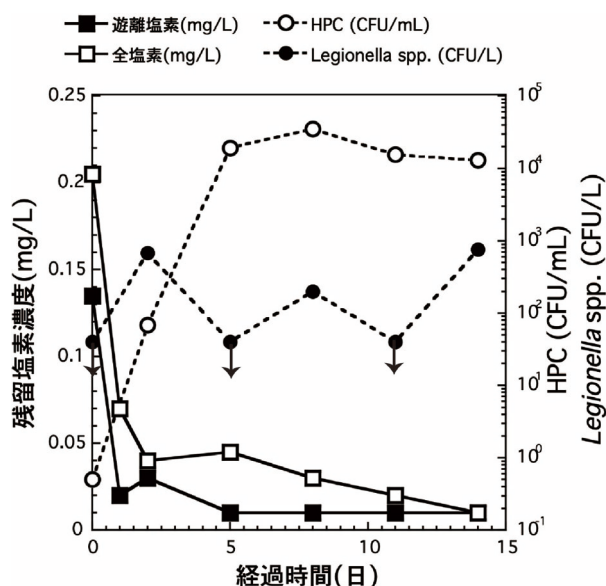


図2 残留塩素消失過程における従属栄養細菌数およびレジオネラ属菌数の経時変化 (設定塩素濃度 0.1 mg/L・培養温度 30 °C) 図中の↓は定量下限値 (40 CFU/L) 未満を表す。

表2 微生物再増殖試験における各微生物の増殖確認日

培養温度	設定塩素条件	対象微生物	2021年8月	2021年10月	2021年11月	2022年1月
20 °C	0.1 mg/L	HPC確認日	5日目	2日目	5日目	5日目
		FLA確認日	不検出	11日目	14日目	14日目
	0.2 mg/L	HPC確認日	8日目	8日目	14日目	8日目
		FLA確認日	8日目	14日目	不検出	14日目
30 °C	0.1 mg/L	HPC確認日	2日目	2日目	5日目	2日目
		FLA確認日	8日目	14日目	14日目	14日目
	0.2 mg/L	HPC確認日	5日目	2日目	5日目	2日目
		FLA確認日	8日目	11日目	不検出	14日目

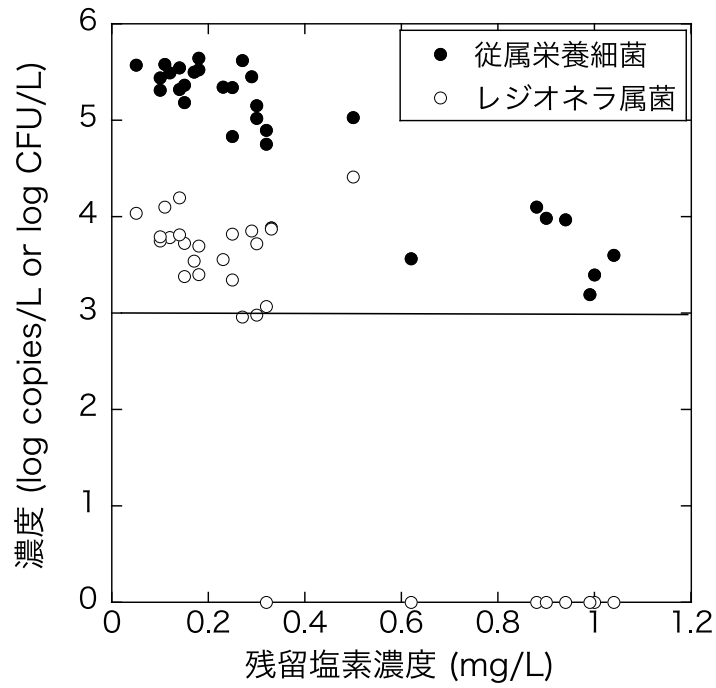


図3 遊離残留塩素濃度と従属栄養細菌/レジオネラ属菌の関係
(実線はレジオネラの定量下限。定量下限未満の検出データは全て 0 log copies/L と表示)

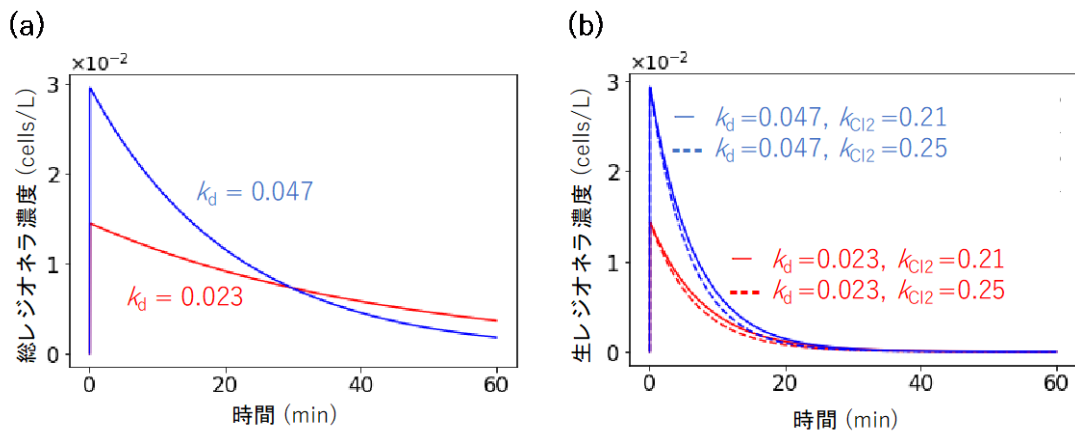


図4 各速度定数によって推定されたシャワー水中のレジオネラ濃度変化
(a) : 全レジオネラ濃度、(b) : 生菌状態のレジオネラ濃度)

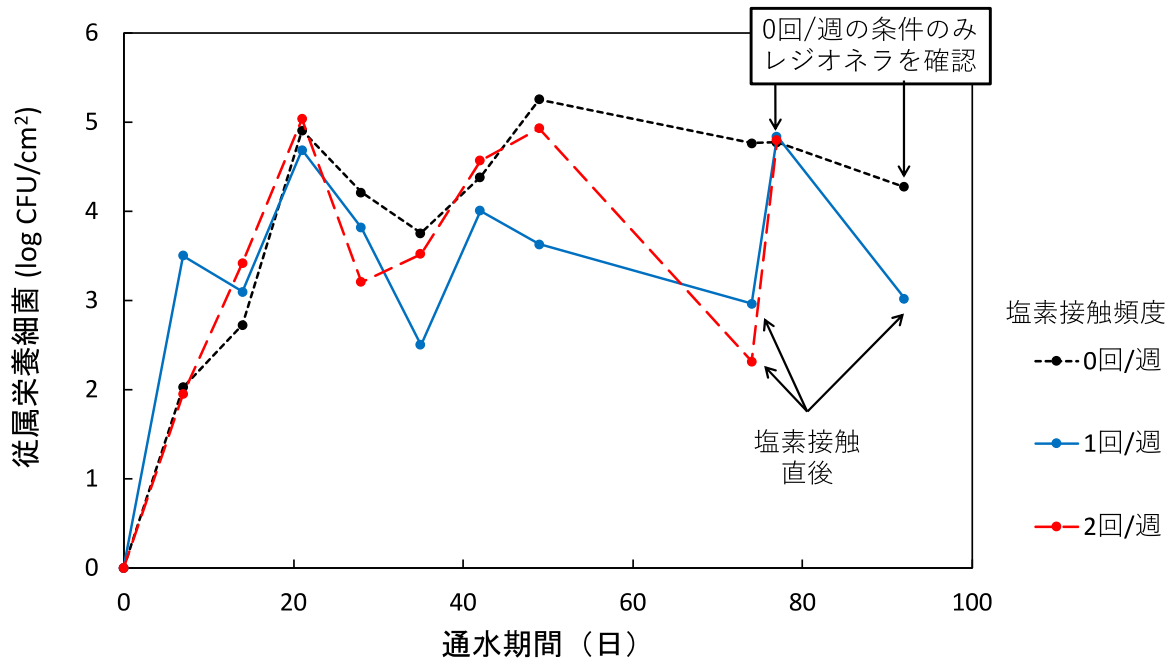


図5 異なる塩素接触頻度のもとでの試験片上の従属栄養細菌数の推移 (77日目以降、0回/週の条件においてはレジオネラが毎回確認された。)

