

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2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

水道システムの細菌汚染問題、特にレジオネラ汚染とその指標性の検討として取り上げられた従属栄養細菌の測定に関する調査を行った。まず、浄水処理プロセスで、オゾン処理、活性炭処理、急速ろ過処理を対象とし、各処理水での従属栄養細菌数を測定した結果、培養時間の延長に伴う従属栄養細菌数の増加傾向は処理水ごとに異なることが示された。続いて、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。最後にラボスケール試験により、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。

具体的には水質管理目標設定項目である従属栄養細菌数(HPC)測定について、浄水処理プロセスでの培養時間の違いによるコロニー数の変化について調査した。

続いて、室内実験により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、HPC、自由生活性アメーバ(FLA)の再増殖を経時的に調べた。

最後に室内実験に基づき、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た。

B. 研究方法

オゾン-活性炭処理を導入している高度浄水処理施設での3つの処理水（オゾン処理水、活性炭処理水、急速ろ過処理水）を対象として、HPC測定における培養時間（1週間、2週間）による影響を評価した。

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被験水を分注し、GVPN 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  $8.5 \times 10^3$  CFU/L となるよう植菌し、20 °C または 30 °C で 24 時間静置した。24 時間経過後に、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、2~3 日毎に採水して残留塩素濃度および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、上水試験方法に従い 10 分間の酸処理を行い、GVPN または 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 0, 8, 14 日目のみ実施した。500 mL の試料を孔径 3.0 μm のメンブレンフィルターを用いて 1 mL に濃縮し、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。

最後に実験室内でレジオネラを含む生物膜を作り出し、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。まず実験室でレジオネラを含む生物膜を形成させた。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 台にエポキシ樹脂粉体塗膜製の試験片を 20 枚ずつ装着し、淀川流域の浄水場における原水 (淀川表流水) を流量 25~50 mL/min で循環通水した (回転数: 12 rpm)。原水は毎週新しいものに取り替え、通水期間は実験の目的に合わせて 12~80 日間とした。次に生物膜やその内部のレジオネラの遊離塩素による不活化効果の有無を把握するため、以下の通りに作製した生物膜に対する消毒実験を行った。まず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)。なお、内部シリンダの回転数は生物膜形成時と同様に 12 rpm とした。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。また、流入・流出水の遊離塩素濃度も定期的に測定した。次に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試

験水を孔径 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。なお、本実験は生物膜形成期間の異なる 2 セットの試験片 (13 日間と 75 日間) を用いて 2 回行った。最後に、水流によって剥離されたレジオネラの不活化速度をより実際に近い形で把握するため、生物膜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。

## C. 結果及び D. 考察

### 1. 従属栄養細菌測定における培養時間の影響

表 1 にオゾン処理水、活性炭処理水、急速ろ過処理水での HPC 測定結果 (合計 3 回分) をまとめる。本調査で得られた結果より、オゾン処理、急速ろ過処理と活性炭処理水で従属栄養細菌測定に対する培養時間の影響が異なることが明らかとなった。活性炭処理水で検出された従属栄養細菌の特徴として、2 週間後に検出されたコロニーは非常に小さい形状であった。その点も踏まえると、今回の培養条件 (R2A 平板培地, 20°C) では非常に増殖が遅い細菌が、2 週間の培養によりコロニーとして出現したと考えられる。

保坂ら (2001) は、下水処理水、タンク水、給水栓水に対する従属栄養細菌試験における培地並びに培養条件の検討を行っており、R2A 寒天培地を用いた場合、試料水ごとに培養時間とコロニー数の増加割合が異なる傾向が確認されている<sup>1)</sup>。本調査においても処理水ごとに傾向が異なることから、処理プロセス内での細菌の除去・不活化効果を含め、従属栄養細菌の挙動を正確に把握するためには、培養時間、そして培養温度も含め検討が必要であると考えられる。

## 2. 残留塩素消失過程を模擬した微生物再増殖試験

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2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℃培養試料では $3.2 \times 10^6$  CFU/L(1回目)、 $2.3 \times 10^6$  CFU/L(2回目)、30℃培養試料では $4.4 \times 10^6$  CFU/L(1回目)、 $7.3 \times 10^6$  CFU/L(1回目)となり、30℃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2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℃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1に示す。塩素処理後にいったん不検出となった後、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。

また、今回の実験では、レジオネラ属菌の宿主となるFLAは設定塩素濃度0.3 mg/L、30℃培養試料の8日目、塩素処理なしの20℃/30℃培養試料の14日目の500 mLサンプリング試料からのみ検出された。従属栄養細菌数は塩素処理により不活化されて0.5 CFU/mL以下に減少したが、遊離塩素濃度が0.1 mg/Lを下回ると急激に増殖し始め、最大濃度は $10^5$  CFU/mLオーダーに到達した。

Kuiperらは、水道水試料を用いた回分試験により、塩化ポリビニルチューブ上の微生物再増殖は*L. pneumophila*を植種後、始めにATPおよびHPCの増加が起こり、その2~3日後に*L. pneumophila*が増殖したと報告している<sup>2)</sup>。そこで、塩素処理を行った試料を対象として、各微生物が増殖を始める時間差を考慮に入れて、各採水試料のレジオネラ属菌数とレジオネラ測定日より2~3日前時点における各試料のHPC濃度を比較した。結果を図2に示す。浴槽水のレジオネラ水質基準(10 CFU/100 mL)を参考として、レジオネラ属菌数が100 CFU/L以上で検出された試料に着目すると、2~3日前の時点でHPCが $1.9 \times 10^3$  CFU/mL

以上に再増殖していた。

## 3. 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の構築

図3に消毒実験におけるリアクター流入/流出水中の残留塩素濃度と試験片上の従属栄養細菌数の変化を示す。リアクター内部の残留塩素濃度が約1.5 mg/Lに安定するのに5時間程度要したものの、試験期間を通じて試験片上の従属栄養細菌数は初期の $4.4 \log$  CFU/cm<sup>2</sup>から顕著な減少は見られなかった。生物膜は内部の細菌を消毒剤から保護することが知られており<sup>3)</sup>、本実験でもその様子が確認された。今回はレジオネラの培養は行っていないが、生物膜内部に存在するレジオネラは同様に塩素による不活化を免れると考えられる。したがって、モデル式の構築時には、給水管内面のレジオネラは残留塩素によって不活化しないものと想定した。

続いて、図4に剥離実験における全細菌(16Sr DNA)とレジオネラ属菌の定量結果を示す。初期の全細菌やレジオネラ遺伝子密度は $4.6 \sim 5.5 \log_{10}$  copies/cm<sup>2</sup>(1回目)、 $6.3 \sim 6.9 \log_{10}$  copies/cm<sup>2</sup>(2回目)であったが、いずれの回でも3時間程度で全細菌とレジオネラ密度は急激に減少し、その後減少速度は緩やかとなった。特に3時間経過後のレジオネラの減少幅は2回目の方が1回目よりも $1.9 \log_{10}$ 程度大きかった。これは実験に供した生物膜の形成期間が異なり(1回目:13日間、2回目75日間)、水流によるせん断力に対する生物膜の剥離特性が異なったためと考えられる。これら実験2回分の開始後0~3時間の結果に対する線形近似によって、以下の式(1)で表される1次の剥離速度定数 $k_d$ を0.023,  $0.047 \text{ min}^{-1}$ と推定できた。

$$\ln \frac{C_b}{C_{b,0}} = -k_d \cdot t \quad (1)$$

$C_b$ : 生物膜中のレジオネラ密度 ( $\log$  copies/cm<sup>2</sup>)、  
 $C_{b,0}$ : 生物膜中の初期レジオネラ密度 ( $\log$  copies/cm<sup>2</sup>)、 $t$ : 経過時間(min)

図5に生物膜から剥離した従属栄養細菌を対象とした消毒実験2回分の結果を示す。20~30 mg・min/L程度のCT値で2~3  $\log_{10}$ 程度の急激な不活

化が確認され、その後不活化のカーブは緩やかとなった。レジオネラは元の生物膜における存在量が小さかったため、消毒後の検体からは培養法で検出できなかった。そこで、剥離後のレジオネラの不活化速度は上述の従属栄養細菌の結果で代替することとした。レジオネラの不活化は式(2)

$$\ln \frac{C_v}{C_{v,0}} = -k_{Cl_2} \cdot C_{Cl_2} \cdot t \quad (2)$$

で表される Chick-Watson 式に従うと仮定した(図 5)。 $C_v$ : 水中の生レジオネラ数(cells/L)、 $C_{v,0}$ : 初期の生レジオネラ数(cells/L)、 $k_{Cl_2}$ : 不活化速度定数(L · min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>)、 $t$ : 経過時間(min)

最後に、上記の実験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(3)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。

$$\frac{\partial C_T}{\partial t} = -u \cdot \frac{\partial C_T}{\partial x} + SA \cdot k_d \cdot C_{b,0} \cdot \exp(-k_d \cdot t) \cdot CF \quad (3)$$

$C_T$ : 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<sup>2</sup>)、 $C_{b,0}$ : 流速増加開始時の給水管内面のレジオネラ密度(cells/cm<sup>2</sup>)(生菌状態(感染能を有する)、0.1 cells/cm<sup>2</sup>と設定)、 $CF$ : 単位換算用の定数(1/6)、 $u$ : シャワー利用時の流量(0.5 m/sと設定)

上述のように、生物膜の塩素による不活化は確認されなかったため、モデル上でも剥離前の生物膜中レジオネラは不活化されないものとした。 $k_d$ として0.023, 0.047 min<sup>-1</sup>の値を用いて計算したところ、図 6(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(4)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 L · min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>を用い、残留塩素濃度 $C_{Cl_2}$ は0.5 mg/L(一定)とした。

$$C_v = C_w \cdot \exp(-k_{Cl_2} \cdot C_{Cl_2} \cdot t) \quad (4)$$

$k_d$ 、 $k_{Cl_2}$ 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<sup>2</sup>の場合、管出口におけるレジオネラ生菌数は最大で0.01~0.03 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 6(b))。

## E. 結論

本研究では、水道システムの細菌汚染問題、特にレジオネラ汚染とその指標性の検討として取り上げられた従属栄養細菌の測定に関する調査を行った。

- ・オゾン処理、活性炭処理、急速ろ過処理を対象とし、各処理水での従属栄養細菌数を測定した結果、培養時間の延長(1週間から2週間)に伴う従属栄養細菌数増加の傾向は処理水ごとに異なることが示された。

- ・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。しかし、FLA内でのレジオネラ属菌の再増殖は再現できなかった可能性があり、FLA存在下における HPC およびレジオネラ属菌の再増殖評価が必要である。

- ・ラボスケール試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。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 誌上発表

- 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

該当なし

## 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) 保坂三継, 眞木俊夫. 水の従属栄養細菌試験における培地並びに培養条件の検討. 東京衛研年報, 52, 245-249, 2001.

- 2) Kuiper, M. W., Wullings, B. A., Akkermans, A. D. L., Beumer, R. R., and van der Kooij, D. Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(11), 6826-33, 2004.
- 3) Xue, Z., Sendamangalam, V. R., Gruden, C. L., and Seo, Y. Multiple roles of extracellular polymeric substances on resistance of biofilm and detached clusters. *Environ. Sci. Technol.*, 46(24), 13212-13219, 2012.

表1 従属栄養細菌数測定に対する培養時間の影響

サンプル名	1回目			2回目			3回目		
	1week	2week	増加率	1week	2week	増加率	1week	2week	増加率
	CFU/mL	CFU/mL	(%)	CFU/mL	CFU/mL	(%)	CFU/mL	CFU/mL	(%)
オゾン処理水	6.7	7.7	15.0	0.7	0.7	0.0	0.7	1.0	50.0
活性炭処理水	37.7	436.3	1058.4	0.3	10.3	3000.0	10.3	88.3	754.8
急速ろ過処理水	3.0	12.0	300.0	0.9	1.0	10.8	0.3	0.3	6.3

表2 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Ct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 <sup>6</sup>
		30	—	—	—	6/6	4.4×10 <sup>6</sup>
	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 <sup>6</sup>
		30	—	—	—	6/6	7.3×10 <sup>6</sup>
	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

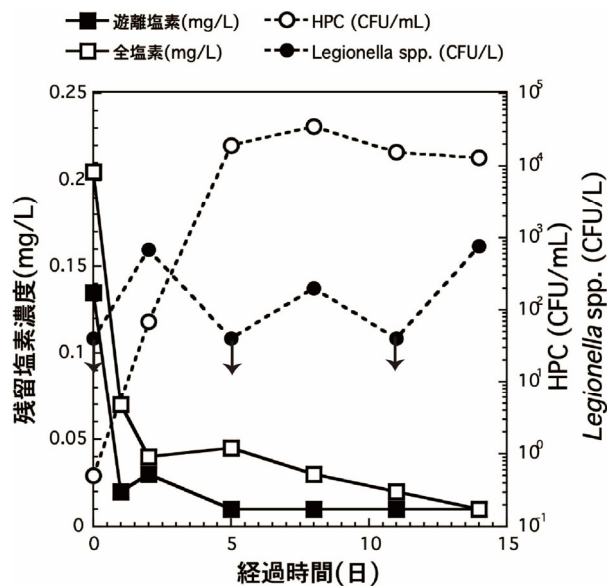


図1 残留塩素消失過程における従属栄養細菌数およびレジオネラ属菌数の経時変化 (設定塩素濃度 0.1 mg/L・培養温度 30 °C) 図中の↓は定量下限値 (40 CFU/L) 未満を表す。

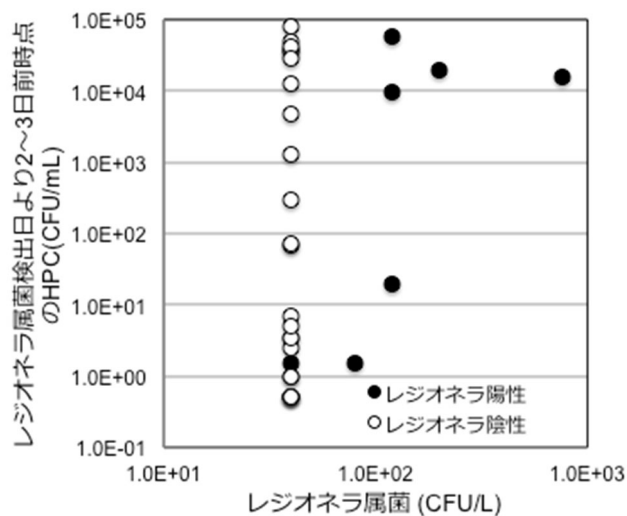


図2 各試料におけるレジオネラ属菌数とレジオネラ測定日より2～3日前の時点の従属栄養細菌数の関係

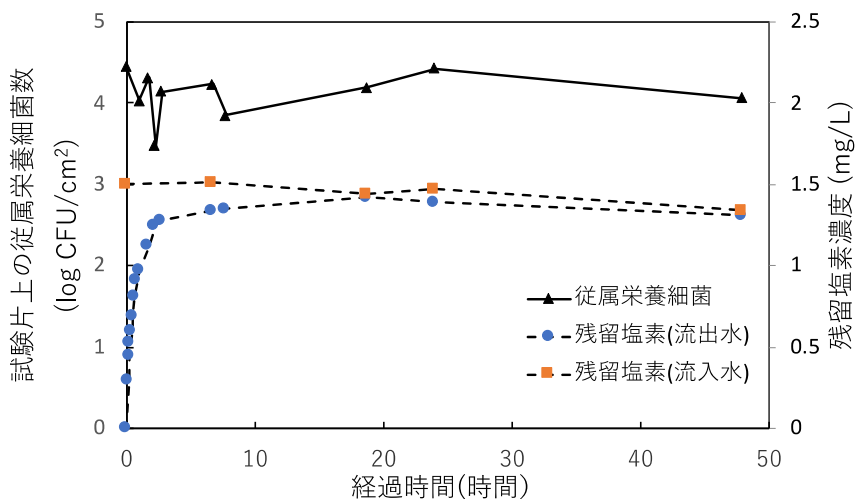


図3 生物膜の消毒実験結果

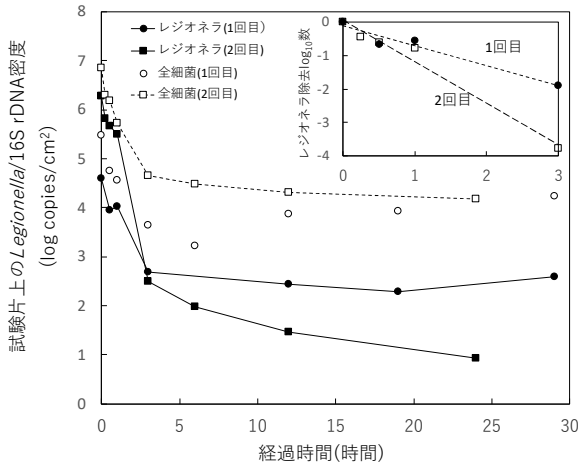


図 4 生物膜の剥離実験結果 (図中右上は運転初期のレジオネラ除去  $\log_{10}$  数)

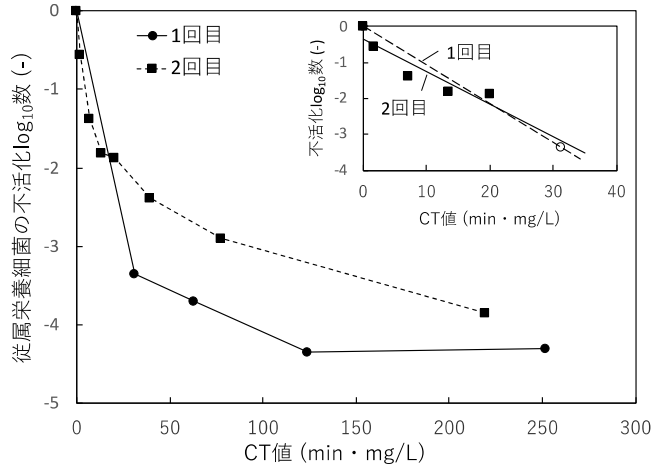


図 5 生物膜の剥離物に対する消毒実験結果 (図中右上は消毒初期における直線近似)

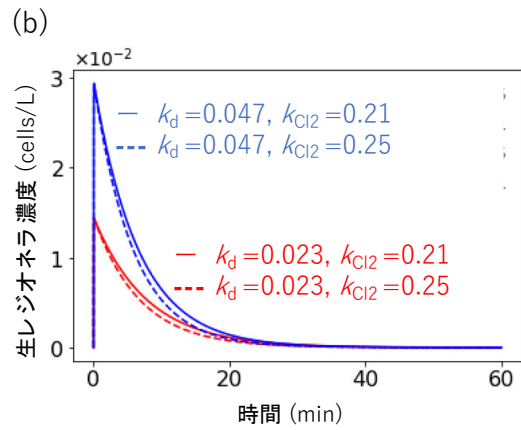
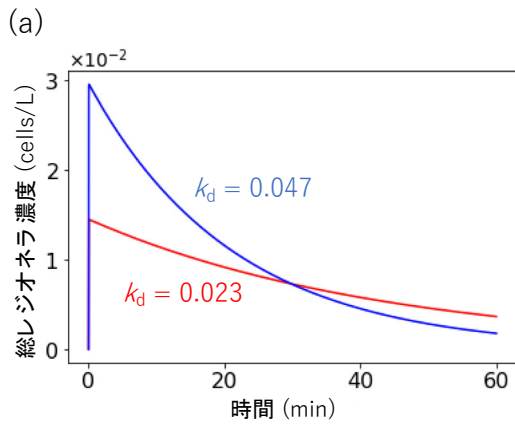


図 6 各速度定数によって推定されたシャワー水中のレジオネラ濃度変化 ((a) : 全レジオネラ濃度、(b) : 生菌状態のレジオネラ濃度)

