

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に関する調査を行った。まず、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った。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細菌類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。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、塩素処理試料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、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、全国21浄水場での実態について調査した。

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

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、100mL(必要に応じて1L)を滅菌済みメンブレンフィルター(孔径:0.22 μ m)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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C、7日間、14日間培養した。

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) を初期濃度が約 2×10^3 CFU/L となるよう植菌し、20 °C または 30 °C で 22 時間静置した。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、22 時間後の全塩素濃度が 0.1 または 0.2 mg/L となるよう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⁾に従い 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 0、8、14 日目の測定を基本として、11 月以降の測定では 5、11 日目の測定も追加して実施した。250 mL の試料を孔径 3 μm のメンブレンフィルターで濃縮し、上述の方法で培養検出を試みた。到着時試料の培養により得られた FLA 株は継代培養により分離した後に、PCR により FLA 分離株の属推定を行った。

最後に給水管内の水理条件を模擬できる 3 台のアンユラーリアクター (Model 1320LS、Biosurface Technologies) 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す、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 台はこのような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。従属栄養細菌数は上水試験法¹⁾に従って 20 度で 7 日間培養後に測定した。レジオネラ属菌は検水を孔径 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た後、酸処理を行い、GVPC 寒天培地 (ビオメリュー・ジャパン) を用いて 36 °C で 5~7 日間培養した。生育したレジオネラ様コロニーは L-システイン要求性試験と PCR によるレジオネラ確定試験²⁾ののち、計数した。

C. 結果及び D. 考察

1. 一般細菌数と従属栄養細菌数の関係性評価

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、相関関係を評価した (図 1)。決定係数は 0.75 と相関性が高い傾向を示した。また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、一般細菌数が 1 CFU/mL を下回る試料において、従属栄養細菌数の範囲が広く、バラツキが大きい結果となった。これは、細菌類の再増殖が影響していると推察される。真柄らにより求められた関係式²⁾は試料量 1 mL で従属栄養細菌、一般細菌ともに検出可能であったデータのみで算出されたものである。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可能とした。その結果、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。つまり、一般細菌数

と従属栄養細菌数の関係性より基準値を設定する際には、細菌類の再増殖を考慮した上で検証する必要があると言える。

2. 残留塩素消失過程を模擬した微生物再増殖試験による従属栄養細菌の指標性評価

再増殖試験に用いた活性炭処理水の微生物濃度を測定した結果、従属栄養細菌数は $4.7 \times 10^2 \sim 4.9 \times 10^3$ CFU/mL、FLA は $4 \sim 8$ PFU/L の濃度範囲であった。21 年 8 月、11 月、22 年 1 月の活性炭試料から FLA を分離・増菌培養し、PCR による属推定を行った結果、いずれも *Vermamoeba vermiciformis* であると判断された。この種は水道水試料から広く検出され、レジオネラ属菌の宿主となりうることが知られている^{3,4)}。また、各活性炭処理水に対して求めた塩素消費量および塩素要求量に基づいて各試験水の塩素処理を実施した。

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 月試料のみ、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各回の試験で $8 \sim 192$ 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 $4 \sim 56$ 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 HPC 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 1 に示す。この表からわかるように、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た。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、再増殖試験期間中に 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。

FLA の再増殖が従属栄養細菌数の増加に遅れて起こる、という上記の結果を踏まえて、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。結果を図 2 に示す。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る。

さらに、FLA の増殖と先行する従属栄養細菌の増殖の間に定量的な関係があると仮定して、両者の濃度分布を比較した結果を図 3 に示す。図 3 からわかるように、異常値となった 1 点を除いてプロットが左上領域に偏って分布し、かつ FLA 再増殖試料のうち一部では FLA の再増殖量と従属栄養細菌数に定量的な関係性が示唆された。この左上領域が FLA 再増殖領域となるため、得られた FLA 再増殖プロット全てを包括できる 2 点を選び、FLA 再増殖が可能な従属栄養細菌数の境界下限(以下、暫定境界線)を決定した。今回の結果では $\text{FLA} > 25$ PFU/L 以上のプロットが一点しか得られていないため、今後 FLA 濃度がより高い領域のデータを収集して検証する必要があるが、暫定境界線に基づくと FLA が 1 PFU/L で検出される場合の従属栄養細菌数が 2500 CFU/mL と試算され、現在の従属栄養細菌数の暫定目標値 2000 CFU/mL を十分に下回る結果となった。

今後は、FLA の生息数が増大する高水温期の生活性炭処理水を用いた再増殖試験を追加で行う必要がある。また、必要に応じて、FLA 細胞と共培養することで細胞内に取り込まれた状態のレジオネラ属菌を植種する等、実際の水道システムに近いレジオネラ属菌の生息環境の再現についても検討する必要がある。

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

通水期間における試験片上の従属栄養細菌数の推移を図4に示す。通水開始後、約20日で従属栄養細菌数は約4~5 log CFU/cm²程度に達し、その後は3~5 log CFU/cm²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2.3~3.0 log CFU/cm²となり、塩素接触前後で1~2 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、次回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0.9~22 CFU/cm²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に関する調査を行った。

・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。

・室内実験により、塩素処理試料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3~12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。

・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を確認された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

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) 日本水道協会. 上水試験方法 V. 微生物編 2011年版, 2011.
- 2) 眞柄泰基、遠藤卓郎、宮川徹也、泉山信司. 従属栄養細菌の検出濃度の評価. 厚生労働科学研究費補助金健康科学総合研究事業「最近の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究」平成17年度研究報告書, 217-223, 2006.
- 3) 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), 6826-6833, 2004.

- 4) Berry, D., Xi, C., and Raskin, L. Microbial ecology of drinking water distribution systems, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17(3), 297-302, 2006.

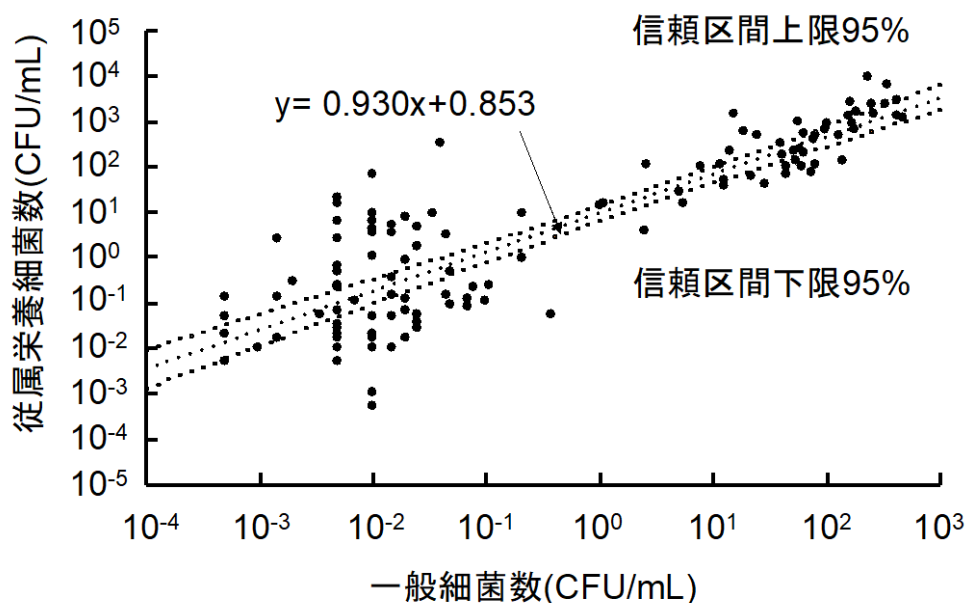


図1 一般細菌数と従属栄養細菌数の関係性評価

表1 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 |

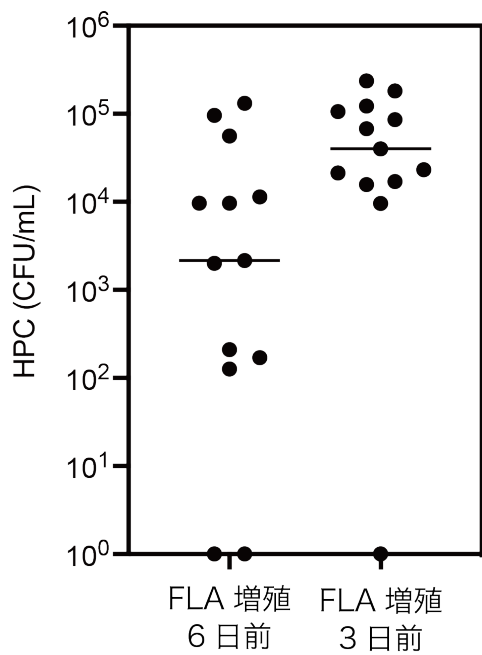


図2 FLA 再増殖試料における FLA 増殖に先行する HPC の分布

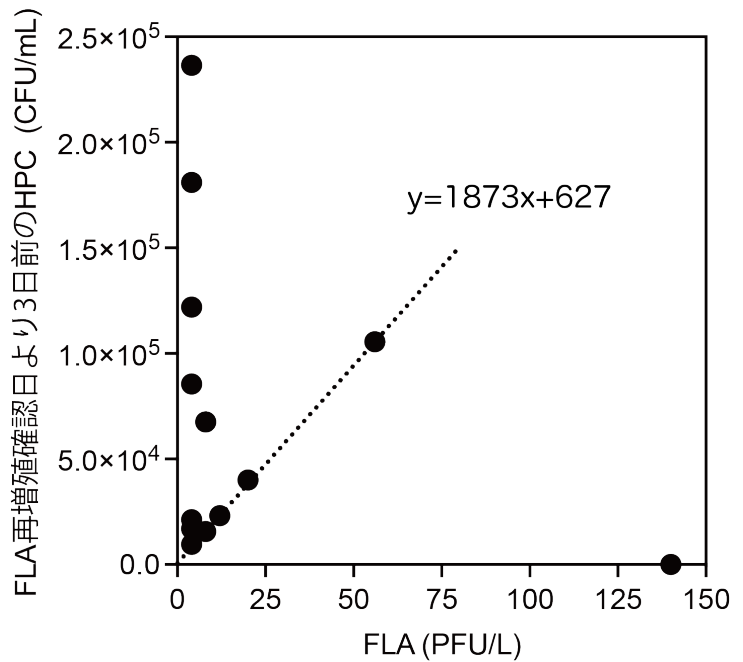


図3 FLA 再増殖試料における FLA 増殖量と FLA 増殖確認より 3 日前の HPC の関係

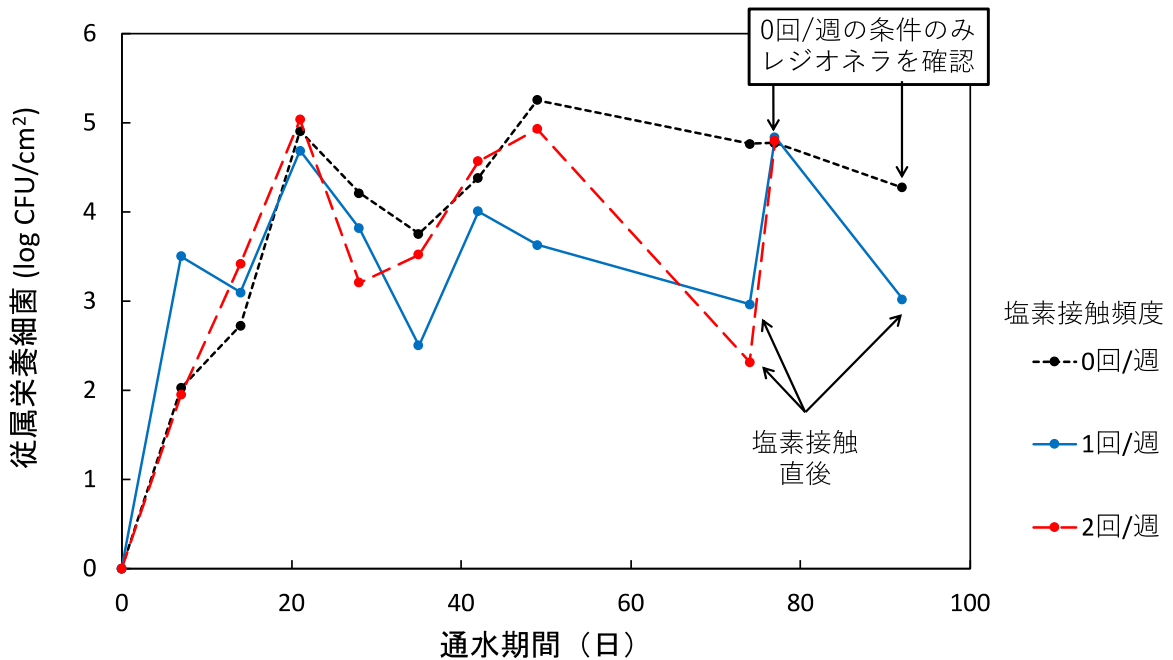


図4 異なる塩素接触頻度のもとでの試験片上の従属栄養細菌数の推移 (77日目以降、0回/週の条件においてはレジオネラが毎回確認された。)