

令和 2 年 4 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04940

研究課題名（和文）日和見病原細菌の水道水中における再増殖機構の解明と制御条件の検証

研究課題名（英文）Elucidation of regrowth mechanism of opportunistic pathogens in drinking water and verification of their control strategies

研究代表者

春日 郁朗（Kasuga, Ikuro）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・准教授

研究者番号：20431794

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 17,900,000 円

研究成果の概要（和文）：宅内給水系では水道水の滞留により残留塩素が消失し、微生物が再増殖するリスクが懸念されている。実際の給水末端において滞留前後の水道水中の微生物を調査したところ、滞留により Legionella 属や Mycobacterium 属を含む多様な細菌群が増加することが明らかになった。また、こうした微生物再増殖を支える有機物についても調査を行い、特にプラスチック製の給水管から溶出する有機物の組成や微生物再増殖に及ぼす影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人口減少が進む日本では、給水量の減少に伴って宅内での水道水の滞留が頻発し、微生物再増殖が顕在化することが懸念されている。しかし、わが国では微生物再増殖の実態について詳細なデータがない。本研究の学術的意義は、日和見病原細菌の動態や微生物再増殖を促進する因子を明らかにした点である。水道水中の微生物再増殖に起因するリスクが低いことを確認できたことは社会的に有意義な知見ではあるが、微生物学的に安定な水道水質を実現することは潜在的なリスクを低減する上でも必要である。

研究成果の概要（英文）：Chlorine residual diminishes during stagnation in premise plumbing, which can cause microbial regrowth. This study demonstrated that microbial community including Legionella spp. and Mycobacterium spp. increased after stagnation in premise plumbing. Additionally, we investigated organic matter supporting microbial regrowth in drinking water. In particular, the composition of organic matter migrating from polymeric plastic pipes and its impact on microbial regrowth was revealed.

研究分野：水道工学

キーワード：微生物再増殖 日和見病原細菌 水道水

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫弱者に健康影響を及ぼす日和見感染性の病原細菌(以下、日和見病原細菌)が、水道水中で再増殖するリスクが懸念されている。浄水場で処理された水道水は、残留塩素を保持したまま給水末端に到達するのが理想だが、実際には水が滞留しやすい貯水槽や宅内の給水系では、残留塩素の消失や水温の上昇など細菌の再増殖に適した水質変容が生じている。残留塩素を用いないオランダでは、*Legionella pneumophila*、*Mycobacterium avium*、*Pseudomonas aeruginosa*等の日和見病原細菌が水道水から実際に検出され、水道水と日和見感染症との疫学的な関連も指摘されている。また、残留塩素を用いる米国でも、*Legionella* を原因とする水系感染症が報告されている。一方、我が国では、水道水中で再増殖する日和見病原細菌に関する体系的な調査研究はなく、そのリスクの実態すら不明である。現行の水質基準では一般細菌や大腸菌が監視されているが、これらの基準遵守が日和見病原細菌の制御を保証するという科学的根拠は全くない。院内感染など限られた事例を除き、日和見病原細菌の調査がされていないだけで、実際には水道水に起因する日和見感染症のリスクは身近に存在することが推察される。今後、急速な人口減少に伴って水道水が管路内で滞留しやすくなり、残留塩素の保持は更に困難になると想定される。また、高齢化の進行も、日和見感染に脆弱な免疫弱者を増加させるであろう。このように、水道水由来の日和見病原細菌の問題が顕在化するような社会状況の変化が予測される中、再増殖リスクの実態把握と、科学的知見に基づいたリスク制御のスキームの構築が必要である。

2. 研究の目的

免疫弱者に健康影響を及ぼす日和見病原細菌が水道水中で再増殖することが懸念されている。浄水場出口から給水末端に行くほど増加する日和見病原細菌の挙動は、リスクの変容という点で古典的な病原微生物とは全く異なり、科学的知見に基づいた新たな管理体制を構築することが必要である。また、水道水中に残存する生分解性有機物は細菌再増殖を促進する重要な因子であるが、従来、生分解性有機物は同化性有機炭素などの包括的な指標で評価されており、その組成については十分に明らかになってはいない。そこで本研究では、水道水における日和見病原細菌を含む細菌群の再増殖の実態を解明すると共に、これらの再増殖を引き起こす生分解性有機物の特性を、高分解能質量分析計を活用して明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)水道水の滞留に伴う細菌再増殖の実態評価

実際の給水末端における細菌再増殖の実態、日和見病原細菌の存在状況を明らかにするために、東京大学構内建物の複数の給水末端を対象にして、年4回の採水を行った。まず各給水末端で水道水を十分に放水して新鮮な水道水を採取した後、放水を止めて24時間の滞留後に採水を行った。採水は100 mLずつ分取した。検水の水温、残留塩素濃度、従属栄養細菌、全菌数を測定すると共に、DNAを抽出して定量PCRで日和見病原細菌(*Legionella* 属、*Legionella pneumophila*、*Mycobacterium* 属、*Mycobacterium avium*、*Pseudomonas aeruginosa*)を定量した。また、16S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンシングを行い、微生物群集構造を解析した。

(2)浄水処理と宅内給水システムにおける細菌再増殖の関係

学内に水道水を供給する主要な浄水場において、浄水の採水を毎月行った。浄水に含まれる日和見病原細菌の量を定量PCRで解析すると共に、16S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンシングによって微生物群集構造を解析し、給水末端における微生物群集構造との比較を行った。

(3)細菌再増殖を引き起こす生分解性有機物の特性評価

まず水道水中に残存する生分解性有機物を解析するために、浄水場から採水した水道水に水道水中で再増殖する微生物を植種し、再増殖させた。再増殖前後の試料から溶存有機物を固相抽出して、高分解Orbitrap質量分析計で有機物組成を解析し、再増殖後にピーク強度が減少する成分を生分解性有機物の候補として探索した。

宅内給水システムでは、プラスチック製の給水管が多用されている。水道水が滞留する場合にはこうしたプラスチック製の給水管との接触時間が長くなることから、こうした素材から溶出する有機物が細菌再増殖に及ぼす影響が懸念される。そこで、架橋ポリエチレン製の給水管に水道水を封入する系と、水道水をガラス瓶に封入する系を用意して、それぞれの系における残留塩素、溶存有機物、微生物群集の変化を解析した。更に、架橋ポリエチレン製の給水管を細かく裁断し、超純水に浸漬した際に溶出する溶存有機物をOrbitrap質量分析計で評価した。溶出後の試料に水道水中の微生物を植種することで、こうした成分が細菌再増殖に及ぼす影響を比較した。

4. 研究成果

(1) 水道水の滞留に伴う細菌再増殖の実態評価

大学キャンパス内の給水栓等において調査を行ったところ、24時間の滞留に伴って水温の上昇、残留塩素の低減・消失が生じると同時に、全菌数や従属栄養細菌数の増加が認められた。従属栄養細菌数については、水質管理目標設定項目を超過する給水栓も見られた。図1に24時間滞留させた前後における遊離塩素と全菌数の変化の例を示す。滞留後の放水によって、残留塩素の回復、全菌数及び従属栄養細菌数の減少が観察された。1L程度放水することで元のレベルに戻ったことから、滞留に伴う水質変化と細菌再増殖は極めて局所的であることが明らかになった。次世代シーケンシングを用いて微生物群集構造を解析したところ、滞留前の水道水では *Phreatobacter* 属が優占していたが、滞留後には *Sphingomonas* 属、*Sediminibacterium* 属、*Comamonadaceae* 科などが優占していた。優占の程度は給水末端によって異なっていたことから、細菌再増殖は同一の建物内であっても使用頻度等に依存することが示された。また、滞留前後で相対割合が増加した細菌群を抽出すると、蛇口によっては日和見病原細菌を含む *Mycobacterium* 属や *Legionella* 属が含まれていた。16S rRNA 遺伝子全長を対象とした解析を行ったところ、*Legionella* 属の多くは日和見病原性の *Legionella feelei* に近縁であったが、*Mycobacterium* 属は種レベルでは未同定のグループが多かった。

定量 PCR を用いて日和見病原細菌の量を解析したところ、*Legionella pneumophila*、*Mycobacterium avium*、*Pseudomonas aeruginosa* はすべて定量下限未満であり、水道水の再増殖に起因するこれらの日和見病原細菌のリスクは低いことが明らかになった。しかし、次世代シーケンサーでも明らかになったように、*Legionella* 属及び *Mycobacterium* 属のコピー数は、滞留後に 10^0 - 10^2 copies/L に増加することが確認された。次世代シーケンシングの結果が示すように、これらには *Legionella feelei* やリスク因子が未同定の *Mycobacterium* 属が含まれている可能性が高いことから、更なる解析が必要である。

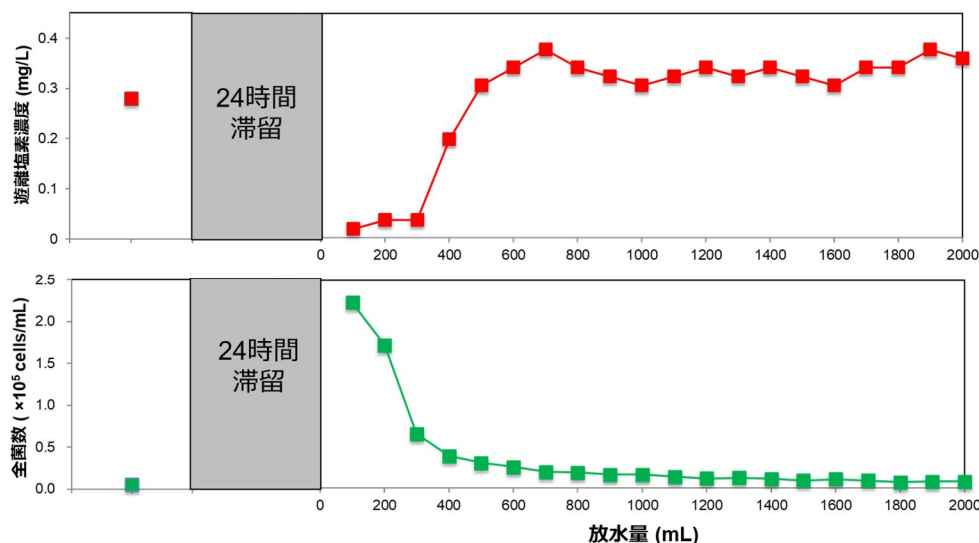


図1 給水末端における滞留前及び滞留後の放水における遊離塩素濃度と全菌数の変化

(2) 浄水処理と宅内給水システムにおける細菌再増殖の関係

浄水場の出口の全菌数は 10^2 - 10^3 cells/mL であったが、給水末端における滞留前の全菌数は 10^2 - 10^3 cells/mL、滞留後の全菌数は 10^4 - 10^5 cells/mL に変化しており、浄水場出口から給配水する過程で水質が変容していることが明らかになった。次世代シーケンサーを用いて微生物群集構造を解析したところ、浄水中の群集構造は、滞留前あるいは滞留後の群集構造とも異なっている場合が多かった。滞留前であっても配水や貯留の過程で微生物群集構造が変化していることが推測された。個々の微生物群の挙動を解析したところ、*Comamonadaceae*、*Cyanobacteria*、*Sphingomonas*、*Pseudomonas*、*Sediminibacterium*、*Dechloromonas*、*Phreatobacter* などが浄水から給水末端（滞留後）に増加していることが明らかになった。

(3) 細菌再増殖を引き起こす生分解性有機物の特性評価

浄水中に残存する生分解性有機物の探索を、Orbitrap 質量分析計による解析を通して行った。残留塩素を除去した浄水中では、全菌数が 10^5 cells/mL 程度まで増加した。再増殖前後の試料から溶解有機物を固相抽出で濃縮して Orbitrap 質量分析計で解析した。再増殖前後でピーク強度が減少した 22 のコンポーネントを生分解性有機物の候補として抽出した。これらのコンポーネントの浄水処理における挙動を評価すると、ほぼすべてのコンポーネントが塩素消毒後にピーク強度が増加しており、塩素消毒により副次的に生成していることが示唆された。実際に塩素消

毒前の試料に塩素を注入して溶存有機物組成の変化を評価したところ、確かに同一のコンポーネントが塩素消毒によって生成することが明らかになった。このことから、浄水処理直後の水道水には塩素消毒によって副次生成する生分解性有機物が含まれていることが示された。

宅内給水系における水道水の滞留において、プラスチック管から溶出する溶存有機物が細菌再増殖に及ぼす影響について解析を実施した。実際に滞留前後の水道水中の溶存有機物濃度を測定すると、給水末端によっては滞留後に溶存有機物濃度がわずかに増加している場合も観察され、こうした付加的な溶存有機物が細菌再増殖と関連していることが推察された。水道水を新しい架橋ポリエチレン製の給水管に封入して培養した場合、再増殖する微生物は水道水をガラス瓶中で培養した際に増殖する微生物と種類も量も異なっていた。このことから、水道水中に残留する生分解性有機物とは異なる成分がプラスチック管から溶出し、微生物再増殖に影響を与えていることが推察された。

次に、架橋ポリエチレン製の給水管をピース状に裁断し、超純水に浸漬して溶出される溶存有機物を解析した。残留塩素が存在している場合の方が、溶出する溶存有機炭素濃度は高い傾向が見られた。微生物を植種して再増殖現象を再現してみると、全菌数は 10^6 cells/mL 程度まで増加した。このことから、架橋ポリエチレン製の給水管から溶出する溶存有機物が細菌再増殖を促進する因子の一つになっていることが確認された。また、溶出する溶存有機物は水温が高いほどより多く溶出した。Orbitrap 質量分析計を用いて、溶出した溶存有機物の組成を解析すると、300-500 種類のコンポーネントが検出された。残留塩素の有無と検出されたコンポーネントとの関係性を評価すると、両者に共通している成分はあるものの、残留塩素の有無によって特異に検出されるコンポーネントにも差異が見られた。このことから、架橋ポリエチレンと残留塩素が反応することで、溶出する溶存有機物の組成に変化が生じていることが推察された。微生物の再増殖前後において、これらの溶出成分の一部はピーク強度が減少しており、生分解性有機物として作用していることも示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iftita Rahmatika, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, and Hiroaki Furumai	4. 巻 18
2. 論文標題 Impacts of organic matter migrating from pipe materials on microbial regrowth in drinking water	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Water and Environment Technology	6. 最初と最後の頁 45-53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.2965/jwet.19-078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Ikuro Kasuga, Miyu Suzuki, Futoshi Kurisu, and Hiroaki Furumai
2. 発表標題 Molecular-level analysis of biodegradable organic matter supporting microbial regrowth in drinking water
3. 学会等名 8th IWA Microbial Ecology and Water Engineering Specialist Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iftita Rahmatika, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, and Hiroaki Furumai
2. 発表標題 Evaluation of organic compounds migrated from polyethylene and their impacts on microbial regrowth in drinking water
3. 学会等名 8th IWA Microbial Ecology and Water Engineering Specialist Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikuro Kasuga
2. 発表標題 Drinking Water Quality Management After Treatment -Risks of microbial regrowth in distribution system and premise plumbing-
3. 学会等名 The 9th International Forum Green Technology and Management（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ifitita Rahmatika, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, and Hiroaki Furumai
2. 発表標題 What is going on in pipes? -A hot spot for microbial regrowth in drinking water-
3. 学会等名 Water Environment Technology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikuro Kasuga
2. 発表標題 Control of microbial regrowth in premise plumbing -Challenge of aging water supply systems-
3. 学会等名 Vietnam-Japan Science and Technology Towards Sustainable Development 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ifitita Rahmatika, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu and Hiroaki Furumai
2. 発表標題 Influence of water stagnation on microbial regrowth at different faucets in a building plumbing
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木美有, 春日郁朗, 栗栖太, 古米弘明
2. 発表標題 細菌再増殖に関わる生分解性有機物の分子組成の推定と高度浄水処理における動態評価
3. 学会等名 第52回日本水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikuro Kasuga
2. 発表標題 Evaluation of biodegradable organic matter causing regrowth in drinking water
3. 学会等名 The 3rd International Forum on Asian Water Environment Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 春日郁朗
2. 発表標題 非培養法を活用した迅速かつ網羅的な細菌管理
3. 学会等名 東京大学水環境制御研究センター (RECWET) ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考