

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06618

研究課題名(和文) レジオネラ属菌の潜在的リスクからみた高度浄水処理方式の選択

研究課題名(英文) Understanding survival of Legionella spp. in advanced water treatment

研究代表者

浅田 安廣 (Asada, Yasuhiro)

国立保健医療科学院・その他部局等・主任研究官

研究者番号：60610524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生物活性炭(BAC)処理でのレジオネラの再増殖性について Legionella pneumophila を用いて評価し、高度浄水処理でのレジオネラ管理について考察を行った。L. pneumophila は存在状態に関わらず活性炭表面ではなく細孔内部に付着・蓄積することが確認された。長期増殖試験の結果より、BAC層への流入水中のレジオネラの生存状況がBAC層での再増殖に寄与することが示された。レジオネラはアメーバが生存するバイオフィーム内で再増殖が可能であることから、レジオネラ再増殖の可能性を管理する上で従属栄養細菌などによるモニタリングを行うことが重要であると指摘した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レジオネラに関する多くの研究は不活化効果に関する知見が主となるが、浄水処理工程内での存在状態と再増殖性も含めた挙動については検証が十分ではない。本研究ではVBNC状態も含めBAC層での再増殖性について評価を行い、存在状態の違いにより再増殖の傾向が異なることを指摘したことに学術的な意義があるといえる。さらに社会的意義として、本研究の成果と文献情報を踏まえて、高度浄水処理においてレジオネラの挙動を管理する上で処理プロセス前後での従属栄養細菌の変動を監視することが重要であることを指摘している。

研究成果の概要(英文)：The regrowth of Legionella pneumophila in biological activated carbon (BAC), which is effective for the removal of organic matters during water treatment, was investigated. L. pneumophila adhered and accumulated inside the pores of activated carbon. As results of the long-term test, viable cells of L. pneumophila were able to regrow in BAC and be released into the effluent water. In some cases, L. pneumophila in VBNC state was not able to regrow in BAC. The obtained results suggested that the presence of viable Legionella spp. in the inflow water of BAC treatment contributes to its regrowth in BAC. Legionella spp. can regrow in the biofilm with Ameba. A monitoring of heterotrophic bacteria is important to estimate the possibility of regrowth of Legionella spp. during advanced water treatment processes.

研究分野：衛生工学

キーワード：レジオネラ 再増殖 高度浄水処理 生物活性炭

## 様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本におけるレジオネラ症の報告数は年々増加傾向にあり、その制御・管理が求められている。そしてレジオネラ感染の主たる経路は水系感染であり、その中でも温泉施設や入浴設備での感染事例が多く確認されている。一方、レジオネラは生存環境状況次第では水道システム中で再増殖する可能性がある。病院でのレジオネラ調査研究では複数の病院の蛇口を調査し、レジオネラが培養検出された報告がある<sup>1)</sup>。レジオネラは土壌など様々な環境下で生存していることから、給水栓でのレジオネラ属菌の検出が必ずしも浄水場から配水される水道水由来と直結するとは限らないが、消毒設備のトラブル等で消毒処理が十分に機能しなかった場合には再増殖性も含めレジオネラが検出する可能性も考慮する必要がある。

給配水システムで実施するレジオネラ対策を考える上で、浄水処理システムでのレジオネラの挙動について把握することは重要な知見の一つとなりうる。浄水処理システムでは、レジオネラを含む細菌類は効果的に除去・不活化が行われている。一方、高度処理の一つとなる生物活性炭(BAC)は細菌類が増殖しやすい環境であり、レジオネラ自体が再増殖する可能性が考えられる。さらにレジオネラは消毒処理を含むストレス環境下では生存しているが培養できない(Viable but non-culturable: VBNC)状態となることから、培養可能、VBNC、死滅の3つの状態でのBACでの再増殖性について知見を集めることが、BAC処理を含む処理プロセスでのレジオネラの挙動を評価する上では重要となる。

現行の高度浄水処理プロセスではオゾン処理と活性炭処理が組み合わさっており、その中で活性炭処理がBAC処理としての効果を持ち、活性炭層内での微生物による有機物分解が期待されている。しかしながら、上述したように活性炭層内で微生物が多く存在する状況において、レジオネラが活性炭内で増殖し感染リスクを増大させる危険性も考えられる。そのため、高度浄水処理システムでのレジオネラ挙動を把握するためには、前段のオゾン処理といった酸化処理でのレジオネラの不活化効果と後段のBAC処理でのレジオネラ再増殖性について評価する必要がある。

### 2. 研究の目的

レジオネラに対するオゾン処理などの酸化処理による不活化効果については既に検証されているが、BAC処理での再増殖性については限定的であり、さらにはVBNC状態でのレジオネラの再増殖性については検討されていない。

そこで、本研究では高度浄水処理システムでのレジオネラの重要管理点を示すべく、前段のオゾン処理の不活化効果について文献調査により整理すると共に、後段のBAC処理でのレジオネラの再増殖について、ラボスケール実験に基づき評価することを目的とする。

目的達成に向けて本研究では、レジオネラ属菌の中でヒトに感染する *Legionella pneumophila* を対象として、まず培養可能なレジオネラ菌のBAC処理での再増殖の可能性について検証を行った。続いて、VBNC状態レジオネラのBAC層内再増殖の可能性について把握するために、VBNC状態のレジオネラ菌試料作製し、BACを用いたレジオネラ再増殖試験を実施した。

### 3. 研究の方法

#### BAC中でのレジオネラ生菌の再増殖試験

本研究に向けて粒状活性炭カラムを3本用意した。まず4ヶ月間、粒状活性炭内に微生物を増殖させるために脱塩素した水道水(2週間に一回の頻度で交換)を粒状活性炭カラム内で循環させた。事前準備したカラムに対してレジオネラ添加試料(*Legionella pneumophila* (JCM7571))を1 mL 添加した(最終レジオネラ濃度:  $1.3 \times 10^{10}$  CFU/mL)。1時間接触後、カラム内水を排出しつつ、完全に入れ替わるまで脱塩素した水道水を加えた。3本の内1本はカラム内水を除去した後、粒状活性炭を採取(表層、中層、下層)し、DNA抽出に供した。残りの2本について、2週間に1回の頻度でカラム内水の入れ替えを行った。試験から約1ヶ月経過した試料(カラム内水)より採水を実施し、採水試料はフィルターろ過(Millipore エクスプレスプラス(孔径0.2 μm))した後、DNA抽出に供した。最後にカラム解体後(実験期間: 約2ヶ月半)、粒状活性炭を採取(表層、中層、下層)し、DNA抽出に供した。また、ブランクとして使用した水道水についてもカラム内水と同様に100 mL フィルターろ過し、DNA抽出に供した。

StepOnePlus™リアルタイムPCRシステム(Thermo Fisher Scientific)を用いて、各DNA抽出試料について、カラム内水および水道水試料についてはSYBR Green法、活性炭試料についてはTaqManプローブ法により、レジオネラ遺伝子の定量を行った。試験に用いたプライマー、プローブ情報についてSYBR Green法ではMiyamotoら(1997)<sup>2)</sup>、TaqManプローブ法についてNazarianら(2008)<sup>3)</sup>に従った。

#### VBNC状態のレジオネラ試料の作製

まず、培養した *L. pneumophila* (*Legionella pneumophila* Philadelphia1株 ATCC33152) を適量のPBSで懸濁し洗菌処理(8,000 × g で10分間遠心分離し、上澄を除去)の後、再びPBSに懸濁し、濃度調製後の生細胞濃度をCFDA蛍光染色法により把握し、 $10^5$  cells/mL オーダーの培養可能 *L. pneumophila* 試料を作製した。続いて培養可能 *L. pneumophila* 試料を厳重に密閉し、20 °Cのインキュベーター内に静置した。完全にVBNC化していると判断した83日間後の試料をVBNC状態 *L. pneumophila* 試料とした。なお、VBNC化状態の判断として培養法で培養可能

菌が検出されない、かつ CFDA 蛍光染色法による生菌数の変動がない試料を選定した。

#### BAC 中での VBNC 状態レジオネラの再増殖試験

実験で用いた全 9 本のカラム(三宝理化)はガラス製、内径 2.5 cm、筒部高さ 30 cm で、250 °C で 2 時間の乾熱滅菌を行った後、121 °C で 20 分間オートクレーブ滅菌を行った。本実験では、活性炭は浄水場で BAC 処理に使用された粒状活性炭 (GAC)、カラム内水には浄水場において各種浄水工程の後オゾン接触処理の行われた水 (以下、オゾン処理水と表記) を用いた。

BAC 層へのバイオフィーム形成期間として 70 日間の間、約 24 時間ごとに 1 回各カラム内水を 4 °C で冷蔵保存された新しいオゾン処理水 (100 ~ 150 mL 程度、保存残量の都合により変動) を上部から通水して入れ替えた。続いて、下記の通りカラムを設定した。

- i) VBNC 状態 *L. pneumophila* (No. 1, No. 2)
- ii) VBNC 状態 *L. pneumophila*, 培養可能 *Acanthamoeba castellanii* 混合 (No. 3, No. 4)
- iii) 培養可能 *L. pneumophila* (No. 5, No. 6)
- iv) 培養可能 *L. pneumophila*, 培養可能 *A. castellanii* 混合 (No. 7, No. 8)
- vi) 滅菌処理 *L. pneumophila*, *A. castellanii* 混合 (No. 9)

各カラムに対して試料添加後の排出水中の *L. pneumophila* 遺伝子の定量を添加翌日 (0 日目とする) から 56 日目まで 7 日間ごと、および 66 日目にオゾン処理水の入れ替えと同時に排水水を 100 mL 採りし、孔径 0.2 μm ポリカーボネートメンブレンフィルター上に濃縮したものを DNA 抽出に供した。また添加前の BAC と添加後 61 日目のカラム内 BAC (表層部) について採取した活性炭をそれぞれ PBS20 mL 内で 1 分間ボルテックスにより混合し、静置した後の上澄液を直径 25 mm、孔径 0.2 μm ポリカーボネート製メンブレンフィルターに濃縮し、フィルターを DNA 抽出に供した。

DNA 試料分析は Applied Biosystems StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) を用いて qPCR 法 (SYBR Green 法)<sup>3)</sup> により *L. pneumophila* 遺伝子の定量を行った。

#### 4. 研究成果

##### BAC 中でのレジオネラ生菌の再増殖性

2 ヶ月半の再増殖試験を行ったカラム 2, 3 でのカラム内水中レジオネラ遺伝子は、 $10^5$ - $10^6$  copies/L のレベルで確認された。カラム内水に利用する脱塩後の水道水からはレジオネラ遺伝子がほぼ検出されなかったことから、カラム水内のレジオネラ遺伝子は活性炭より移動したレジオネラ菌由来のものであると判断できる。

続いて活性炭内の *L. pneumophila* 遺伝子数の結果を表 1 にまとめる。カラム 1 の活性炭について、表面について *L. pneumophila* 遺伝子はほとんど検出されなかったが、超音波処理を行った場合に中層、下層ともに遺伝子が検出された。高濃度で 1 時間程度接触させたが、レジオネラ自体は表面に付着せず、細孔内部に侵入・付着すると考えられる。一方で、2 ヶ月半再増殖試験をしたカラム 2, 3 について、カラム 1 と同様で活性炭表面にはレジオネラが検出されなかったが、表層内部は *L. pneumophila* 遺伝子数が高いことが確認された。つまり、長期試験期間中にレジオネラが表層部分で再増殖したといえる。今回使用した *L. pneumophila* (JCM7571) は生菌であることから、微生物が存在する粒状活性炭内にレジオネラの生菌が取り込まれた場合に再増殖することが示唆された。

一方、表層部分とは変わり、中層、下層部分では長期試験後にも *L. pneumophila* 遺伝子がほとんど検出されない結果となった。この可能性として、活性炭層内ごとに存在する微生物相の違いが考えられる。本研究では、事前準備で下向流方式により水を循環させたため、表層部に多くの微生物が存在すると可能性がある。レジオネラはアメーバなどの特定の微生物細胞内で再増殖が可能であることから、本試験では表層部のみにアメーバが存在し、レジオネラが再増殖しやすい環境が整えられていた可能性が考えられる。

表 1 活性炭内のレジオネラ遺伝子数測定結果

		超音波処理	レジオネラ遺伝子濃度
			(copies/g-wet)
カラム 1	表層	あり	N.D.
		なし	N.D.
	中層	あり	$1.3 \times 10^3$
		なし	N.D.
	下層	あり	$6.4 \times 10^2$
		なし	N.D.
カラム 2	表層	あり	$9.0 \times 10^6$
		なし	N.D.
	中層	あり	N.D.
		なし	N.D.
	下層	あり	N.D.
		なし	N.D.
カラム 3	表層	あり	$6.9 \times 10^5$
		なし	N.D.
	中層	あり	$1.8 \times 10^2$
		なし	N.D.
	下層	あり	$4.0 \times 10^1$
		なし	N.D.

##### BAC 中での VBNC 状態レジオネラの再増殖性

活性炭内での *L. pneumophila* 遺伝子検出結果より、No.5 と添加前 BAC を除いて対象遺伝子の

検出が確認された。*L. pneumophila* 遺伝子濃度は  $10^3$ - $10^6$  copies/g-wet とばらつきが確認されたが、*L. pneumophila* 添加試料の特徴ごとに濃度が変化する傾向は確認されなかった。一方、試料添加前 BAC からは *L. pneumophila* 遺伝子が検出されなかったことを踏まえ、BAC 層内には *L. pneumophila* が存在状態に関わらず定着できたと判断できる。つまり、死菌の状態であっても BAC 層内にはレジオネラが蓄積していく可能性が考えられ、BAC 層中の細菌叢解析でレジオネラ遺伝子が確認されたことが必ずしも BAC 層中でレジオネラが生存・再増殖していることを示すとは限らないといえる。

排出水中の *L. pneumophila* 遺伝子濃度の変動 (図 1) では、全てのカラムで試験開始 21 日間は減少の傾向がみられた。この期間は BAC に吸着した *L. pneumophila* が脱着して排出水に流出したものを検出したと考えられる。21 日目以降の遺伝子数を各カラムで比較すると、培養可能

*L. pneumophila* 試料を添加したカラム (No.5-8) は、21 日目に  $10^1$  copies/mL オーダーで確認されており、28 日目には遺伝子数の増加が確認され、それ以降は多少の増減を繰り返しながらも排出水から安定した遺伝子濃度が確認されている。全てのカラムの BAC 層内から対象遺伝子が検出されたことを考慮すると、No.5-8 の濃度変動は脱着のみでは説明ができず、*L. pneumophila* の再増殖が BAC 層内で生じていると判断できる。

VBNC 状態 *L. pneumophila* 試料を添加したカラムでは、No.1 と No.3 が滅菌処理試料を添加したカラム (No.9) と似た濃度変動を示している。これらは再増殖による影響ではなく、BAC 層内に付着した *L. pneumophila* が脱着して検出したものであると考えられる。一方、No.2, 4 は 42 日目以降に安定した遺伝子濃度が排出水から確認されている。特に No.2 については、No.5-8 と同程度の遺伝子濃度が確認されていることから、BAC 層内で再増殖が生じていると推察される。つまり、VBNC 状態 *L. pneumophila* でも BAC 層内での生存環境が上手く適合した場合は再増殖する可能性があると考えられる。

#### レジオネラの再増殖性からみた高度浄水処理の重要管理点

本実験での研究結果より、レジオネラは生菌状態であれば BAC 層で再増殖が生じ、VBNC 状態であれば環境が上手く適合した場合にのみ再増殖する可能性が指摘された。浄水場に設置されている BAC 層中の細菌類は水温が低い冬期は活性が低い傾向が確認されている。レジオネラが増殖する温度が 20 - 45 °C と言われており、本試験では室温 (25 °C 前後) で実験を行っているため再増殖ができたと考えられる。

BAC 処理の前段処理においてオゾン処理が導入されている。また将来的には、促進酸化処理の導入が検討されている。BAC 処理でのレジオネラ再増殖においては、前段の処理までにレジオネラ自体を不活化あるいは少なくとも VBNC 状態まで変化させる必要がある。レジオネラ自体は大腸菌よりも消毒耐性があることが確認されているが、オゾン<sup>4)</sup>や促進酸化処理で組み合わせられる紫外線<sup>5)</sup>やヒドロキシラジカル自体<sup>6)</sup>の不活化効果は高く、BAC 処理の前段処理としてオゾン処理や促進酸化処理が導入された場合は BAC 層への流入水はレジオネラが十分に不活化さ

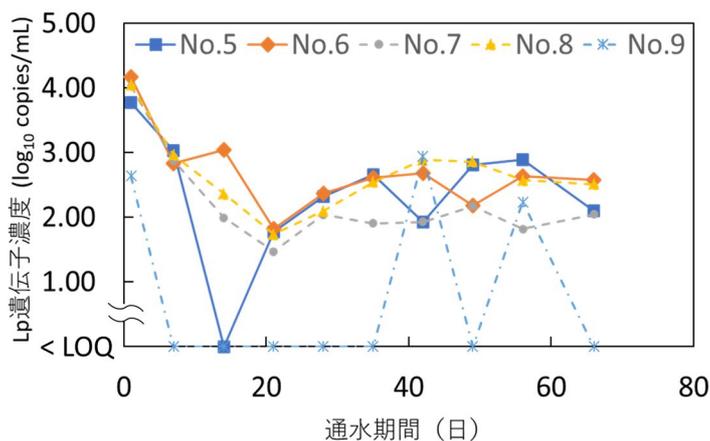
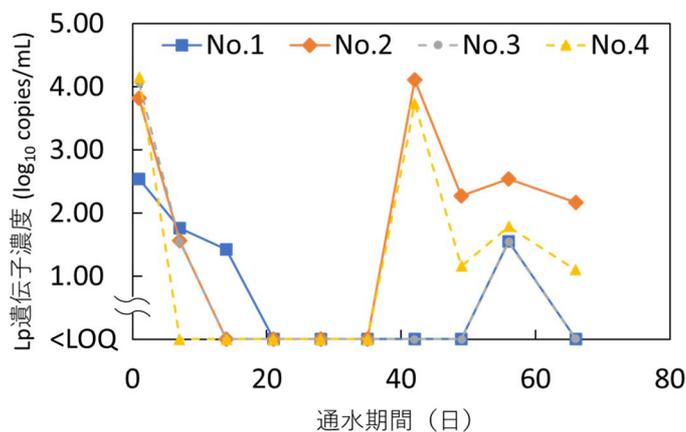


図 1 カラム排出水中の *L. pneumophila* 遺伝子数の変動 (LOQ: 10 copies/mL)

れた状態であると考えられ、BAC 層ではレジオネラの再増殖は生じない可能性が高いと推察される。

一方で、中国の実処理プロセスでのレジオネラ属菌調査では、遺伝子数による評価ではあるが凝集沈殿で減少傾向、砂ろ過では若干の増加、オゾン処理では季節により異なる傾向がみられた（冬：増加、夏：減少）。そして、BAC 処理で増加し、直後の塩素処理で遺伝子数でもほとんど検出されない結果となっている<sup>7)</sup>。また、オゾン処理の反応槽においてデッドスペースでオゾンによる不活化が進まず細菌が再増殖し、その中にはレジオネラ属菌も確認されている<sup>8)</sup>。このように、オゾン処理や促進酸化処理の反応槽中にデッドスペースが存在し、細菌類に対する処理効果が十分に機能せず培養可能状態でレジオネラがデッドスペースで再増殖した場合、BAC 層でもさらにレジオネラが再増殖する可能性が高いといえる。レジオネラ属菌の再増殖が生じる環境条件としては少なくともアメーバが生存しやすいバイオフィームの形成が重要であることから、BAC 処理とその前段処理前後での従属栄養細菌といった増殖可能な細菌類のモニタリングがレジオネラ属菌の管理を行う上で最低限必要であると考えられる。そして、BAC 処理後段に塩素処理等の消毒処理を徹底することで浄水場からの生存したレジオネラ属菌の流出を制御することが可能といえる。

#### 「参考文献」

- 1) 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), pp.678-685, 2018.
- 2) Miyamoto H., Yamamoto H., Arima K., Fujii J., Maruta K., Izu K., Shiomori T. and Yoshida S. (1997) Development of a new seminested PCR method for detection of Legionella species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(7), pp.2489-2494.
- 3) Nazarian E. J., Bopp D. J., Saylor A., Limberger R. J. and Musser K. A. (2008) Design and implementation of a protocol for the detection of Legionella in clinical and environmental samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 62(2), pp.125-132.
- 4) Kim, B. R., Anderson J.E., Mueller S. A., Gaines W. A. and Kendall A. M. (2002) Literature Review--Efficacy of Various Disinfectants Against *Legionella* in Water Systems, *Water Res.*, 36(18), pp. 4433-4444.
- 5) Cervero-Aragó S., Sommer R. and Araujo R.M. (2014) Effect of UV irradiation (253.7 nm) on free *Legionella* and *Legionella* associated with its amoebae hosts, *Water Res.*, 67, pp.299-309.
- 6) Dadjour M.F., Ogino C., Matsumura S., Nakamura S. and Shimizu N. (2006) Disinfection of *Legionella Pneumophila* by Ultrasonic Treatment with TiO<sub>2</sub>, *Water Res.*, 40(6), pp.1137-1142.
- 7) Li, Q., Yu, S., Li, L., Liu, G., Gu, Z., Liu, M., Liu, Z., Ye, Y., Xia, Q. and Ren, L (2017) 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, pp.1-16.
- 8) Kotlarz N., Rockey N., Olson T. M., Haig S. J., Sanford L., LiPuma J. J. and Raskin L. (2018) Biofilms in Full-Scale Drinking Water Ozone Contactors Contribute Viable Bacteria to Ozonated Water, *Environ. Sci. Technol.*, 52(5), 2618-2628.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 浅田安廣, 中西智宏, 伊藤禎彦	4. 巻 33
2. 論文標題 粒状活性炭中におけるレジオネラ再増殖に関する基礎的検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 環境衛生工学研究	6. 最初と最後の頁 56-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 浅田安廣, 木村政貴, 中西智宏, 伊藤禎彦	4. 巻 34
2. 論文標題 生物活性炭内でのレジオネラ再増殖性に関する検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 環境衛生工学研究	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅田安廣
2. 発表標題 粒状活性炭中におけるレジオネラ再増殖に関する基礎的検討
3. 学会等名 第41回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅田安廣
2. 発表標題 生物活性炭内でのレジオネラ再増殖性に関する検討
3. 学会等名 第42回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム
4. 発表年 2020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
研究 分担 者	中西 智宏  (Nakanishi Tomohiro)  (90824293)	京都大学・工学研究科・助教    (14301)	