

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K04411

研究課題名(和文) 給配水過程における病原細菌リスク増大に対する自由生活性アメーバの寄与とその制御

研究課題名(英文) Contribution of free-living amoebae to increased risk of pathogenic bacteria in water supply systems and their control

研究代表者

大河内 由美子 (Ohkouchi, Yumiko)

麻布大学・生命・環境科学部・准教授

研究者番号：00391079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では水道システムにおける自由生活性アメーバ(FLA)とレジオネラ属菌の管理強化を目的として、微生物再増殖と水質の調査と、FLA細胞の除去による増殖抑制効果を調べるための回分試験を実施した。FLAは0.5 mg/L超の遊離塩素が残留する給水栓からも検出され、残留塩素管理によるFLA管理の困難さが示された。孔径3 μmのメンブレンフィルターによりFLA細胞は除去され、一定のレジオネラ増殖抑制効果が確認された。

また、水道水に優占するFLA分離株を用いて、2種類の自家蛍光物質を指標とした定量法を検討した。10 cells/mL以上の濃度範囲で、濃度対数値に比例した蛍光強度の増大が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象とした自由生活性アメーバ(FLA)は、レジオネラ属菌等の日和見感染症細菌の増殖に重要な役割を果たしているにも関わらず、水道システムにおける挙動や存在実態は不明なままであった。本研究で取り組んだ研究内容は、FLAを対象に含めた水質管理について、新しい考え方となる基礎情報を提供するとともに、そのモニタリングの必要性とモニタリング手法の提案を提唱している。

研究成果の概要(英文)： In this study, to establish the control of free-living amoeba (FLA) and Legionella spp. in water supply systems, the sampling survey of microbial re-growth and water quality and the batch-mode tests were conducted to evaluate the effect of removal of FLA cells by microfiltration on regrowth prevention. FLA was detected in tap water with free chlorine residual exceeding 0.5 mg/L, suggesting the difficulty of controlling FLA through chlorine residual control. FLA cells were removed by a membrane filter with a pore size of 3 μm, and a certain effect of prevention for Legionella regrowth was confirmed.

Two autofluorescent substances were used as biomarkers for determination of FLA cells using FLA isolates dominant in tap water. A increase in fluorescence intensity in proportion to concentration was observed in the concentration range of 10 cells/mL or higher.

研究分野：環境微生物 水道システム

キーワード：水道システム 自由生活性アメーバ レジオネラ属菌 水質管理 自家蛍光物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水使用量の多い施設や中層以上の建造物を中心として普及してきた貯水槽水道では、1) 給水時間が長時間化、2) 建物によっては給水栓が数多く設置され、ほとんど使用されない給水栓が存在、3) 外気温の影響を受けやすい地上部配管、などを原因として、給水栓付近で水が長期間滞留することにより細菌の再増殖が起こる。再増殖細菌の多くはヒトに対する健康影響がないか不明な従属栄養細菌類であるが、近年の国内外における調査によりレジオネラ属菌に代表される病原微生物の再増殖をも引き起こすことがわかってきた。本来レジオネラ属菌は塩素消毒に対する感受性が高く、浄水中にフリーな状態のレジオネラが生残するとは考えにくいにも関わらず、残留塩素が低下した給水システムを中心として普遍的に検出されている。レジオネラ属菌は自由生活性アメーバ(FLA)の細胞内に寄生し、かつ増殖可能なアメーバ抵抗性細菌(ARB)であることが知られている。また塩素消毒に対してもシスト化することで耐性を示すことから、FLA が水道システムにおけるレジオネラ属菌のリザーバーとなっている可能性がある。しかし、水道システムにおける FLA のモニタリングは実施されておらず、それらの生残や挙動はほとんど調査されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では水道システムにおける自由生活性アメーバの生息状況の把握と健康リスク増大因子としての寄与度の評価、ならびにその制御管理方法の探索を目的として、水道システムにおける FLA の再増殖を招く水質条件、浄水中の FLA およびレジオネラ属菌の再増殖特性と FLA 細胞の物理的除去による増殖抑制効果、浄水試料に生残する FLA の属をそれぞれ明らかにするとともに、培養を介さない FLA の迅速分離・定量方法の確立についても取り組む。

3. 研究の方法

1) 水道システムにおける FLA 再増殖条件の探索

FLA が検出されやすくなる水質条件を抽出するため、使用頻度の異なる貯水槽水道システムの給水栓から採水し、残留塩素濃度と従属栄養細菌数(HPC)を測定した。同時に、FLA を測定するため試料 1 L を孔径 8 μm または 3 μm のメンブレンフィルターを用いて濃縮し、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℃ で培養した。また、試料の残留塩素を中和後、未ろ過試料(FLA 共存系)とメンブレンフィルターによる過剰み試料(FLA 非共存系)に分け、それぞれ 20℃ と 30℃ で 1 週間静置して FLA の再増殖を比較した(再増殖促進試験)。

2) 生物活性炭処理水中の FLA およびレジオネラ属菌の再増殖特性

河川水を原水とする高度処理を実施している浄水場において生物活性炭処理水を採取した。この生物活性炭処理水を用いて①未処理試料、②3 μm フィルターろ過試料を調製し、前培養した *Legionella feeleii* SG1(環境株)を植種した後に一晚 20℃ または 30℃ に静置した後、20~24 時間後の残留遊離塩素が 0~0.8 mg/L となるよう次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加することで、塩素処理を行った。塩素処理後の各試料を 20℃ および 30℃ で 14~15 日間静置し、残留塩素濃度、レジオネラ属菌数、従属栄養細菌数(HPC)、FLA プラーク数の経時変化を培養法により調べた。レジオネラ属菌数は GVPN または GVPC 培地で培養後、システイン要求性と PCR による確定試験を実施した。HPC は R2A 培地を用いて 20℃ で 7 日間培養し、計測した。

3) 浄水処理試料で再増殖した FLA 種の解析

給水栓および生物活性炭処理水から検出された FLA プラークを切り取り、抗生物質を添加した PYG 液体培地を用いて分離した。給水栓由来 71 株および生物活性炭処理水由来 4 株を対象として、3 種の FLA 属を対象とした属特異的プライマー対を用いて、PCR 解析を行った。PCR は、*Acanthamoeba* 属用のプライマー対¹⁾(JDPI/JDP2)、*Naegleria* 属用プライマー対²⁾(NGITSE/NGITSR)、および *Vermamoeba vermiformis* 用プライマー対³⁾(HV1227F/HV1728R)をそれぞれ使用し、それぞれの属特異的な増幅断片を電気泳動により確認した。同時に、代表的なアメーバ抵抗性細菌(ARB)である *Legionella* 属と *Mycobacterium* 属の PCR 検出も、レジオネラ属菌特異的なプライマー対⁴⁾(LEG225/LEG858)および抗酸菌特異的なプライマー対⁵⁾(246/264)をそれぞれ用いて試みた。

4) 培養を介さない FLA 検出法開発に向けた基礎的検討

給水栓試料から分離培養した *V. vermiformis* の細胞数を計数後、PYG 培地または PSA バッファーを用いて $10^0 \sim 10^5$ cells/mL となるよう希釈液を作成し、96 穴マイクロプレートに分注した。自家蛍光物質として NADPH とリボフラビンに着目し、それぞれ Ex350 nm/Em450 nm、リボフラビンは Ex475 nm/Em520 nm 波長で蛍光プレートリーダーによる測定を行った。

4. 研究成果

1) 水道システムにおける FLA 再増殖条件の探索

貯水槽水道システム内の給水栓を対象とした FLA 調査の結果、FLA は FLA は 1~58 PFU/L の濃度

で採水直後の試料から検出された。FLA は水温が低下した冬期の試料からも検出され、また残留塩素がほぼ消失した給水栓のみならず、0.5 mg/L 超の遊離塩素が残留する試料からも検出された。この結果は、残留塩素管理のみで水道システム内の FLA 再増殖を抑制することは困難であることを示す。

一方、再増殖促進試験の結果、採水直後に FLA が検出されたほぼ全ての未ろ過試料(①)において FLA ブラークの増加が確認された。その増加量は 20°C よりも 30°C 静置下で大きく、今回検出された FLA は 30°C でより増殖しやすい種であったと推測される。なお、30°C に静置した一部のろ過済み試料からも FLA が低濃度で検出され、栄養体の FLA の場合、孔径 8 μm のメンブレンフィルターでは完全に阻止できないことが判明した。その後、孔径 3 μm のメンブレンフィルターに変更してろ過試料を調製したところ、再増殖促進試験中の試料からの FLA 検出は見られなくなった。そのため、以降の実験では、再増殖促進試験用のろ過試料の調製は、孔径 3 μm のメンブレンフィルターを用いて行った。

2) 生物活性炭処理水中の FLA およびレジオネラ属菌の再増殖特性

生物活性炭処理水から FLA を検出するための検水量を検討した結果、100 または 250 mL とした場合に最も高い FLA 濃度が得られた。未ろ過試料(:FLA 共存系)では、塩素消毒なしの試料ではほとんどの場合、再増殖促進試験初日から FLA が検出された。水温 20°C よりも 30°C の方が FLA が高濃度で検出される試料が多かった。一方、塩素消毒を行った試料のうち、約 20 時間後の残留塩素濃度を 0.2 mg/L 以下に設定した試料では、塩素消毒直後にいったん不活化された FLA の再増殖が確認された。しかし、最大増殖濃度は大幅に抑制されていた。

これに対して、孔径 3 μm のメンブレンフィルターを使用したろ過試料(:FLA 非共存系)では、FLA は塩素消毒の有無に関わらず、試験期間を通して不検出となり、物理的除去による FLA の高い増殖抑制効果が確認された。

レジオネラ属菌についてはあらかじめ低栄養状態に馴致した *L. feeleii* SG1 株を植種して、さらに約 24 時間静置して試料中の FLA にレジオネラ属菌を取り込ませ、塩素消毒を実施した。残留塩素消失過程における再増殖特性を調べたが、FLA 共存系であっても塩素消毒によりレジオネラ属菌が不活化されてしまい、塩素消毒試料においては安定的な再増殖は見られなかった。この結果から、レジオネラ属菌は FLA に取り込まれず、フリーな状態で存在していたと考えられる。一方、塩素消毒なしの試料については未ろ過試料、ろ過試料ともに再増殖が起こったが、ろ過により FLA を除去した系ではレジオネラ濃度が増大する期間が FLA 共存系と比べて短期間であった。

3) 浄水処理試料で再増殖した FLA 種の解析

浄水中に生残する FLA 情報を集積するため、給水栓から分離した 71 株を対象として、属特異的プライマー対を用いた推定を行った。海外の水道システムで検出事例の多い *Acanthamoeba* 属、*Naegleria* 属、*Vermamoeba vermiformis* の 3 種を検出対象とした。71 株中、38 株が 3 種のアメーバ属のいずれかのプライマー対で PCR 増幅が確認された。28 株と最も多かった FLA が *V. vermiformis* で、3 株が *Acanthamoeba* 属、2 株が *Naegleria* 属の PCR で目的断片の増幅が見られた。一方、生物活性炭処理水由来の 4 株の FLA については、すべて *V. vermiformis* と判定された。

なお、ARB 属の推定は、FLA 属の推定を行った給水栓由来 71 株を対象として行った。これらの給水栓には、以前から *Mycobacterium* 属が検出されている給水栓も含まれていたが、どの分離株でも *Mycobacterium* 属、*Legionella* 属は不検出であった。

4) 培養を介さない FLA 検出法開発に向けた基礎的検討

分離培養により得られた *V. vermiformis* の栄養体細胞懸濁液を調製した。初めに、液体培地による希釈列を作成して蛍光強度測定を行ったところ、どの細胞濃度においてもほぼ同等の蛍光強度が得られた。この結果は PYG 液体培地自体が強い蛍光を発することを示しており、希釈列の作成には適さないことがわかった。一方、PSA バッファーで調製した希釈列の場合には、リボフラビンをマーカーとした場合は 10^2 cells/mL 以上の濃度範囲で、NADPH をマーカーとした場合は 10^1 cells/mL 以上の濃度範囲で、それぞれ細胞濃度の対数値に比例した蛍光強度の増大が見られた。蛍光強度の回帰式を求めたところ、リボフラビンと NADPH の細胞濃度に対する応答性はほぼ同等であったが、特に低濃度域における感度は NADPH の方が高いことから、NADPH の方が高感度と考えられる。

ただし、前述の給水栓試料または生物活性炭処理水中の FLA 濃度を踏まえると、マイクロプレート測定法により自家蛍光物質を指標とした FLA の定量を行う際には、少なくとも 1000 倍程度の浄水試料の濃縮が必要になると考えられる。そのため、より高感度な測定法の探索とともに、濃縮方法の効率化を図る必要がある。

参考文献

- 1) Schroeder, J. M., Booton, G. C., Hay, J., Niszl, I. A., Seal, D. V., Markus, M. B., Fuerst, P. A., and Byers, T. J. (2001) Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge, *J. Clin. Microbiol.*, 39(5), pp. 1903-11.
- 2) De Jonckheere, J. F. (2004) Sequence variation in the ribosomal internal transcribed spacers, including the 5.8S rDNA, of *Naegleria* spp., *Protist*, 149(3), pp.221-8.

- 3) Kuiper, M. W., Wullings, B. A., Akkermans, A. D. L., Beumer, R. R., and van der Kooij, D. (2004) Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(11), pp. 6826-33.
- 4) 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, pp. 2489-2494.
- 5) Boddinhaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H., and Bottger, E. C. (1990) Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA, *J. Clin. Microbiol.*, 28, pp. 1751-1759.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Ohkouchi Yumiko, Ase Tomonobu	4. 巻 18
2. 論文標題 Determination of log removal values of bacteria by spiral-wound reverse osmosis modules and a hollow fiber ultrafiltration module using Escherichia coli and indigenous heterotrophic bacteria as indicators	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Water and Health	6. 最初と最後の頁 956 - 967
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2166/wh.2020.153	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 -

1. 著者名 阿瀬智暢, 大河内由美子	4. 巻 48
2. 論文標題 スパイラル型RO膜モジュール透過水における細菌数の経時変化と影響因子の評価	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本防菌防黴学会誌	6. 最初と最後の頁 101-110
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 有
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 大河内由美子, 泉山信司, 前川純子	4. 巻 48
2. 論文標題 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	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本防菌防黴学会誌	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 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大河内由美子, 泉山信司, 前川純子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第 45 回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿瀬智暢, 西村直人, 脇本愛子, 大河内由美子
2. 発表標題 異なる分離膜モジュールの細菌阻止率の評価
3. 学会等名 第52回日本水環境学会年会講演集
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------