

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651024

研究課題名(和文)安曇野における水資源有効活用としての雨水貯留水の生物学的・医学的解析

研究課題名(英文)Biomedical analyses of roof-harvested rainwater in household storage tanks for efficient use of water resources in Azumino area

研究代表者

小穴 こず枝(OANA, Kozue)

信州大学・学術研究院保健学系・助教

研究者番号：60115334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：安曇野市の雨水貯留槽43箇所から定期的に採取した雨水を対象に、レジオネラ属菌・大腸菌群・従属栄養細菌の汚染調査を実施した。レジオネラ培養は6月に1検体から分離、6,8月各12検体、10月17検体がPCR陽性であった。

アースプラス加工ビーズはレジオネラ・大腸菌群・従属栄養細菌に対し殺菌活性が証明された。貯留槽内にアースプラス加工ビーズを浸すとレジオネラの根絶をもたらした。アースプラス加工ビーズの殺菌活性は即効性だけでなく、*L. pneumophila*に対し長期持続性も確認できた。大腸菌群・従属栄養細菌数著減には至らなかった。より信頼性の高い細菌制御法が雨水貯留槽内の細菌汚染対策に必要とされる。

研究成果の概要(英文)：Water samples were collected periodically from 43 household rainwater tanks in Azumino, and tested for the presence of Legionella, coliforms and for the extent of heterotrophic bacteria. Only one sample yielded positive culture for Legionella during the investigation periods. In contrast, PCR assays gave positive results against each 12 samples in June and August, and 17 in October. The ceramic micro-beads coated with "Earth-plus" were proved to have bactericidal activities against Legionella, coliforms and heterotrophic bacteria. Immersing the ceramic micro-beads in the tanks yielded the favorable eradication of Legionella. Not only rapid-acting but also long-lasting bactericidal activities of the ceramic micro-bead were exhibited against *L. pneumophila*. However, time-dependent attenuation of the bactericidal activities were noted in the sustainability appraisal experiment. More reliable methods are needed for bacterial contamination measures in rainwater storage tanks.

研究分野：臨床微生物

キーワード：雨水貯留水 細菌汚染制御 アースプラス

## 1. 研究開始当初の背景

雨水利用に関するこれまでの研究は、雨水の水質・水量および雨水の利用効率に関する事項や、雨水貯留により浸水被害を緩和することに期待する、特に都市型洪水防止効果の検討についてのものが主流で、大型建築物における大規模システムを想定した研究が多い。一般住宅という小規模システムでは、単に雨水利用の実例が報告されているに過ぎない。

一方、家庭での小規模システムの雨水貯留槽の普及には、補助金助成制度を運用している地方自治体もあり、長野県安曇野市でも既に「住宅用雨水貯留施設設置補助金」制度を運用している。種々の活用法がある雨水貯留水であるが、安曇野地域では畑への水やりや庭の花木のガーデニングに、また屋外の清掃や道路への打ち水やマイカーの洗車等に活用されている。ガーデニングでは、既にレジオネラ肺炎発症との関連性が指摘されている。レジオネラ症は全ての患者の発生について届出を行う四類感染症に位置付けられている。本邦では自家製腐葉土が感染源と推定されるレジオネラ属菌の感染事例が報告されている。

レジオネラ属菌は自然界の土壌や淡水に広く棲息分布していることから、一般家庭の屋根に降った雨水を集水して蓄える貯留水が、大腸菌群を含めた従属栄養細菌以外にレジオネラ属菌による汚染を受けている可能性は高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

一般家庭における雨水貯留槽の貯留水は水道水とは異なり、飲用を前提としていないことから、健康の安全を脅かす事態に対して行われる健康被害の発生予防、拡大防止等の危機管理に関する基準も全く示されていないのが実状である。定期的な水素イオン濃度 (pH)、化学的酸素要求量 (COD) 等の簡易な水質調査さえ十分に実施されているとはいえず、また、大腸菌群を含めた従属栄養細菌やレジオネラ属菌等の細菌学的な汚染状況調査はなされていない。さらに定期的な貯留槽の清掃を呼びかけているものの、貯留槽の清掃を実施している一般家庭はほとんどなく、清掃を推奨することの科学的根拠も示されていない。これまで健康被害に対する安全性についての評価は殆ど実施されていない。

限りある地球資源を無駄なく効率的に活用するために、また貯蔵水をより安全に使用するために、大腸菌群を含む従属栄養細菌およびレジオネラ属菌による汚染状況に焦点を当て、天候、気温、降水量、pH、COD 等の変動要因との相互関係を統計学的に評価する。生物学的・医学的観点からの検証により、安曇野における「安全な雨水」の利用拡大へと繋げていくために、雨水貯留水による健康被害の未然回避に益する実際の提言を

発信することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 雨水貯留水の細菌学的汚染状況とその解析評価

#### 対象および採水時期

安曇野市との連携により、安曇野市の「住宅用雨水貯留施設設置補助金」制度を活用して雨水貯留槽を設置した一般家庭 (約 100 戸) に対して、貯留槽内の貯留水の定期的採水への協力を要請した。協力が得られた 40 戸 43 個の雨水貯留槽について、6、8、10 月の 3 回採水し、総計 129 サンプルを対象に調査した。

#### 評価項目

採水日の天候、気温、降水量等は、気象庁の安曇野市穂高における気象データを利用した。雨水貯留水の COD は、常温アルカリ性過マンガン酸化法によるパックテスト COD を用いて測定した。

細菌学的評価として、デゾキシコレート寒天培地による大腸菌群および R2A 寒天培地による従属栄養細菌の菌数検査を実施した。レジオネラ属菌については、0.22 $\mu$ m メンブランフィルターによる 100 倍濃縮および熱処理後に GVPC 寒天培地により定量培養に供すると同時に 16S rRNA 遺伝子におけるレジオネラ属菌の特有領域を標的とした PCR 法<sup>1)</sup> による検出を実施した。さらに PCR 法陽性については *Legionella pneumophila* に特有の *mip* 遺伝子を標的とした 2-step PCR 法<sup>1)</sup> を実施した。

従属栄養細菌、pH、COD 等の変動要因とレジオネラ属菌の挙動との相互関係を統計学的に解析した。

### (2) 雨水貯留水の細菌汚染制御法の新規開発と有用性の実証的評価

細菌に対して抗菌活性を示す、ハイドロキシアパタイト結合銀/二酸化チタンセラミック複合剤アースプラス<sup>2)</sup> でコーティングされたセラミックのマイクロビーズ (以下アースプラス加工ビーズ、株式会社信州セラミックス) を用いた雨水貯留水の細菌汚染制御法の開発とその有用性の実証的評価を行った。

#### アースプラス加工ビーズによる細菌制御法の in vitro 評価

雨水貯留槽と類似した環境下でのレジオネラ属菌の制御を実験的に評価した。*L. pneumophila* ATCC33215 株菌液を添加した雨水 100mL に、アースプラス加工ビーズを投入して、投入量、普通光と遮光の比較、静置と振とうの比較、抗菌効果の持続性を検討した。

#### アースプラス加工ビーズによる細菌制御法の雨水貯留槽への適用

雨水貯留槽 6 個 (C-A~F、貯留槽容量 100~230L) を対象にアースプラス加工ビーズによる細菌制御法を評価した。アースプラス加工ビーズを直径 34mm あるいは直径 11mm の 2 種類のメッシュ状のポリエチレン製チューブに充填し、アースプラス加工ビーズの充填

量を 250g あるいは 500g として、評価した。貯留槽からの採水はアースプラス加工ビーズ投入前後に定期的に行い、pH・COD、レジオネラ属菌数・大腸菌群数・従属栄養細菌数を測定した。1 戸には許可を得て、アースプラス加工ビーズ投入直前に *L. pneumophila* ATCC 33215 株菌液を添加した。

アースプラス加工ビーズとゼオライトあるいは活性炭との併用による細菌制御法の評価

アースプラスの抗菌効果をさらに高めるために雨水貯留水中の有機物等による汚染物質の除去方法として、ゼオライト（ジークライト株式会社、粒サイズ 10-20mm）あるいは活性炭（和光純薬工業株式会社、顆粒状）との併用を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 雨水貯留水の細菌学的汚染状況とその解析評価

雨水貯留水 1mL あたりの大腸菌群菌数は、6 月が  $0 \sim 1.0 \times 10^3$ （平均 40）、8 月が  $0 \sim 1.1 \times 10^3$ （平均 80）、10 月が  $0 \sim 9.6 \times 10^2$ （平均 38）であった。1mL あたりの従属栄養細菌数は、6 月が  $1.0 \times 10^3 \sim 1.9 \times 10^7$ （平均  $7.2 \times 10^5$ ）、8 月が  $5.5 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^7$ （平均  $4.2 \times 10^6$ ）、10 月が  $1.0 \times 10^3 \sim 5.2 \times 10^7$ （平均  $2.0 \times 10^6$ ）であった。雨水貯留水中の大腸菌群菌数と従属栄養細菌数の季節的変動は有意差がみられなかった。

調査期間中のレジオネラ属菌の分離培養は、6 月に 1 検体からの検出のみであった。これとは対照的に、PCR 法によるレジオネラ属菌の検出では、6、8 月は 43 検体中各 12 検体（27.9%）、10 月は 17 検体（39.5%）が陽性であった。そのうち *L. pneumophila* 特有の *mip* 遺伝子による PCR 法により、6 月は 12 検体中 10 検体（83.3%）、8 月は 12 検体中 5 検体（41.6%）、10 月は 17 検体中 4 検体（23.5%）が陽性であった（表 1）。PCR 法の結果は、実際には雨水貯留槽内のレジオネラ汚染を示しており、汚染対策措置をとるべきと考えられた。

表 1 雨水貯留水におけるレジオネラ属菌 PCR 陽性サンプル中の *L. pneumophila* 陽性サンプルの占める比率

| 採取月 | レジオネラ属菌 PCR 陽性数 | <i>L. pneumophila</i> 陽性サンプル数 | <i>L. pneumophila</i> 陽性率(%) |
|-----|-----------------|-------------------------------|------------------------------|
| 6月  | 43              | 12                            | 83.3                         |
| 8月  | 43              | 5                             | 41.6                         |
| 10月 | 43              | 4                             | 23.5                         |
| 計   | 129             | 41                            | 46.3                         |

採水日前に晴天が続いた後にレジオネラ属菌 PCR 法の陽性率が高く、雨天が続いた後には陽性率が低い傾向が認められた。また、交通量の多い地点でレジオネラ属菌の高い検出率が認められ、粉塵中のレジオネラ属菌

が飛散し、降雨と共に雨水貯留槽に滞留したと考えられた。

COD は 6、8、10 月の採水において 1~10mg/L で、約半数が 1mg/L であった。レジオネラ属菌 PCR 法陽性サンプルの 45.4% が COD 値 1mg/L を示した。COD 値の増加に伴い陽性率が低下する傾向が観察され、COD 値 5mg/L 未満がレジオネラ属菌の汚染状況の指標になりうることを示唆された（表 2）。

レジオネラ属菌 PCR 法が陽性であるサンプルの従属栄養細菌数について、対数データに対するヒストグラムを作成すると正規分布を示し（図 1）、統計学的に解析した結果、レジオネラ属菌 PCR 法陽性サンプルと  $1.0 \times 10^4$ /mL 以上の従属栄養細菌数とが高い関連性を示した。

雨水貯留水の pH は 3.6~7.0 と偏りがあったが、各家庭では 3 回の測定を通してほぼ一定であり、従属栄養細菌数およびレジオネラ属菌 PCR 法陽性との有意な関連性は確認できなかった。

表 2 雨水貯留水における COD 値と PCR 法によるレジオネラ属菌の検出

| COD (mg KMnO <sub>4</sub> /L) | PCR 陽性数 | PCR 陰性数 | レジオネラ属菌 陽性率(%) |
|-------------------------------|---------|---------|----------------|
| 1                             | 25      | 30      | 45.4           |
| 2-4                           | 15      | 39      | 27.7           |
| 5<                            | 1       | 17      | 5.5            |
| 計                             | 41      | 86      | 32.3           |

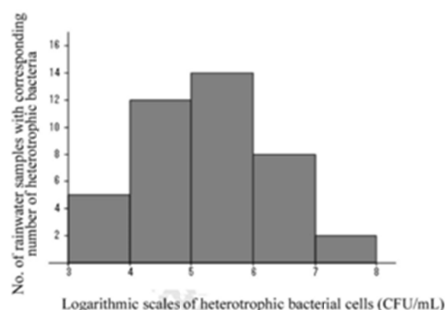


図 1 雨水貯留水の従属栄養細菌数におけるレジオネラ属菌 PCR 陽性数のヒストグラム

##### (2) 雨水貯留水の細菌汚染制御法の新規開発と有用性の実証的評価

アースプラス加工ビーズによる細菌制御法の in vitro 評価

雨水 100mL 中の *L. pneumophila* ATCC 33215 株に対する抗菌効果はビーズ投入量 0.2g 以上で認められた（図 2）。投入後の処置は、遮光中での効果も認められ（図 3）、また、静置より振盪の方がより抗菌効果が高かった（図 4）。

抗菌効果の速効性が認められたのは投入後約 1 か月で、その後は急激な菌数減少はないが約 3 か月後も効果の持続性が確認された（図 5）。

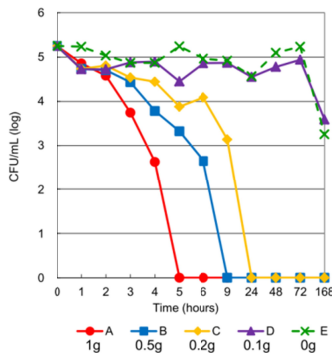


図 2 アースプラス加工ビーズ投入量の違いによる *L. pneumophila* ATCC 33215 株に対する抗菌活性

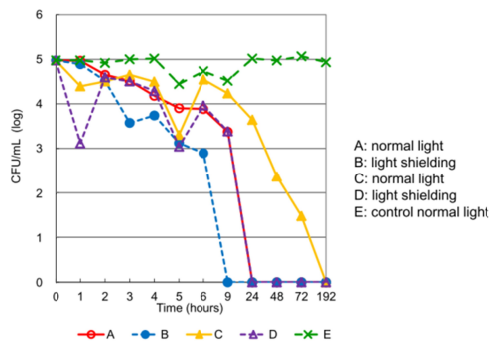


図 3 アースプラス加工ビーズ投入による普通光と遮光における *L. pneumophila* ATCC 33215 株に対する抗菌活性

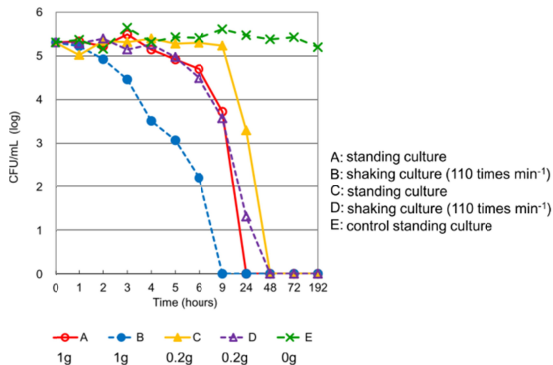


図 4 アースプラス加工ビーズ投入による静置と振盪における *L. pneumophila* ATCC 33215 株に対する抗菌活性

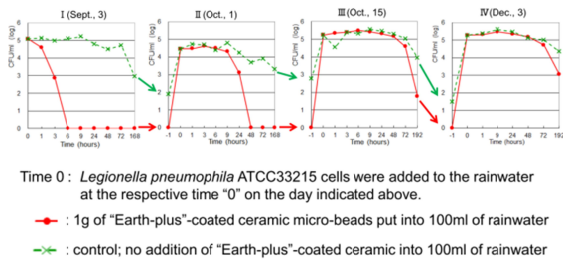


図 5 アースプラス加工ビーズ投入量による *L. pneumophila* ATCC 33215 株に対する抗菌活性の持続性

### アースプラス加工ビーズによる細菌制御法の雨水貯留槽への適用

雨水貯留槽へのアースプラス加工ビーズ投入直前に *L. pneumophila* ATCC 33215 株菌液を添加した貯留槽では、250g と 500g いずれも投入翌日以降の培養では検出されなかった。図 6 に 500g 投入時のレジオネラ属菌に対する抗菌活性を示した。

大腸菌群・従属栄養細菌に対する抗菌効果は 250g と 500g いずれも翌日に認められた。図 7 にアースプラス加工ビーズ 500g 投入時の大腸菌群に対する抗菌活性を示したが、2 種類のチューブでの比較では直径 34mm よりも直径 11mm チューブで優れた抗菌効果が得られた。従属栄養細菌に対する抗菌効果もほぼ同様であったが、顕著な菌数の減少には至らなかった。

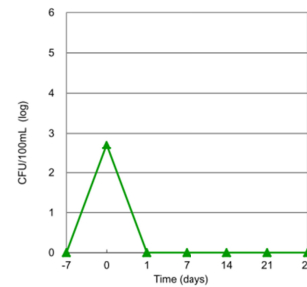


図 6 *L. pneumophila* ATCC 33215 株添加貯留槽へのアースプラス加工ビーズ 500g 投入時のレジオネラ属菌に対する抗菌活性

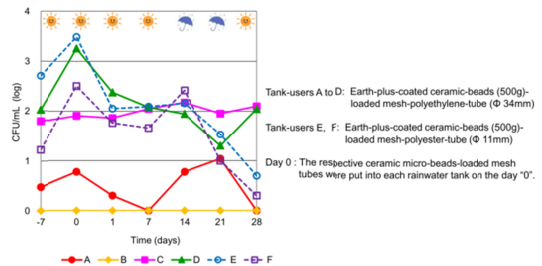


図 7 貯留槽 (A ~ F) へのアースプラス加工ビーズ 500g 投入時の大腸菌群に対する抗菌活性

### アースプラス加工ビーズとゼオライトあるいは活性炭との併用による細菌制御法の評価

ゼオライトとアースプラス加工ビーズとの併用は in vitro 実験と雨水貯留槽に適用、活性炭との併用は in vitro 実験を実施した。雨水貯留水中の汚染物質の除去方法として、ゼオライトあるいは活性炭を用いてアースプラス加工ビーズの抗菌効果を評価したが、ゼオライト、活性炭ともにレジオネラ属菌・大腸菌群・従属栄養細菌すべてに対して抗菌効果を高める結果は得られなかった。

ゼオライトあるいは活性炭との併用では

なく、アースプラス単独の方が抗菌効果は高く、特にレジオネラ属菌に対しては有効な方法であった。しかし、大腸菌群・従属栄養細菌の制御は難しかった。雨水貯留水は単純な細菌制御だけでは解決できない点があり、微生物の他に屋根・雨樋、環境中からの様々な物質の混入による汚染、雨水貯留水の使用量や気象条件等による影響も受ける。アースプラスはレジオネラ属菌に対する制御に有効であるが、今後、より信頼性の高い細菌制御法が雨水貯蔵槽内の細菌汚染対策に必要とされる。

<引用文献>

- 1) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル レジオネラ症 平成 23 年 10 月 7 日改訂 <http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>
- 2) Kasuga E, Kawakami Y, Matsumoto T, et al. Bactericidal activities of woven cotton and nonwoven polypropylene fabrics coated with hydroxyapatite-binding silver/ titanium dioxide ceramic nanocomposite “Earth-plus”. Int J Nanomedicine 2011; 6:1937-1943.

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kobayashi M, Oana K, Kawakami Y. Incidence of *Legionella* and heterotrophic bacteria in household rainwater tanks in Azumino, Nagano prefecture, Japan. Microbiol Immunol ,58(1) ,15 - 21 ,2014 , 査読有  
DOI: 10.1111/1348-0421.12113

6．研究組織

(1)研究代表者

小穴 こそ枝 (OANA, Kozue)  
信州大学・学術研究院保健学系・助教  
研究者番号：60115334

(2)研究分担者

川上 由行 (KAWAKAMI, Yoshiyuki)  
信州大学・医学部・特任教授  
研究者番号：90283275

(3)連携協力者

なし

(4)研究協力者

小林 路子 (KOBAYASHI, Michiko)  
信州大学・大学院医学系研究科保健学専攻  
(博士後期課程)・大学院生  
研究者番号：なし  
八巻 大 (YAMAKI, Dai)  
株式会社信州セラミックス・研究員  
研究者番号：なし