

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 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：2015～2017

課題番号：15K06275

研究課題名(和文) 給配水システムに内在するレジオネラリスク増大因子の多面的探索

研究課題名(英文) A search of risk factors associated Legionella spp. in water distribution systems from multifaceted perspective

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、給配水システムの微生物リスク管理において重要なレジオネラ属細菌を対象として、リスク増大因子の探索を行った。特に、水道システムにおける生態情報が不十分な自由生活性アメーバ(FLA)のレジオネラ再増殖に対する寄与を評価するため、貯水槽水道の給水栓を対象として、レジオネラおよびFLAによる汚染と塩素中和後のFLA共存/非共存系におけるレジオネラ再増殖を調べた。その結果、FLA共存試料中でレジオネラの再増殖や生残性が高まる反面、従属栄養細菌は非共存系においてFLAの捕食を免れて増殖量が増大する傾向であった。また、0.4 mg/L以上の塩素残留条件では、FLAは不検出となることが示された。

研究成果の概要(英文)：Legionella spp. is known as a high-priority pathogen in microbial risk management in water distribution systems, and this investigation, therefore, attempted to determine risk factors of Legionella spp.. In particular, water samples from the faucets located in distribution systems via cisterns were taken to survey regrowth of Legionella spp. and free-living amoeba (FLA) and to check possibility of Legionella and heterotrophic bacteria regrowth in water with/without FLA after quenching chlorine residual. The regrowth or survival of Legionella spp. was tended to be higher in the unfiltered (FLA possibly living) water samples, while HPC was tended to increase in the filtered (FLA removed) samples. This result suggests that HPC can be escaped from FLA predation in filtered water samples, but that Legionella spp. prefers conditions with FLA to survive in water distribution systems. Also, in water with chlorine residual above 0.4 mg/L, no FLA detection was observed.

研究分野：環境微生物 水道工学 微生物リスク

キーワード：レジオネラ 自由生活性アメーバ 貯水槽水道 従属栄養細菌 残留塩素 滞留水

1. 研究開始当初の背景

水道利用者のカルキ臭に対する不満や消毒副生成物の健康影響に対する懸念の高まりを背景として、水道システムにおいても残留塩素濃度の低減化の検討が始められているが、残留塩素濃度の低減化は給配水システムにおける微生物リスクの増大を引き起こすと考えられるため、リスク管理上優先順位の高い微生物を対象とした管理体制の強化が不可欠となる。水道システム、特に給配水システムを対象としたレジオネラ汚染と、レジオネラ増殖のリザーバーとしての役割が危険視されている自由生活性アメーバの生息状況に関する調査は端緒についたところであり、その実態ならびにレジオネラ等のアメーバ抵抗性細菌(amoeba-resistant bacteria; ARB)の再増殖および感染能増強に対するアメーバの寄与はよくわかっていない。水道システムにおいて潜在するレジオネラリスクの評価、ならびにそのリスク管理方法を考える上で、自由生活性アメーバを視野に入れた調査研究の実施が急務の課題である。

2. 研究の目的

本研究では、給配水システム～末端給水栓における水道水利用に起因する微生物リスク管理の強化を目的として、リスク管理上優先度の高いレジオネラ属細菌を対象として、内在する種々のリスク増大因子の探索・抽出に取組む。具体的には、水道水中のレジオネラ属細菌の量的変化・感染能変化に關与する疑いがあるものの、データが集積されていない自由生活性アメーバを生物学的側面からのリスク因子として取り上げ、水道システムにおけるレジオネラ再増殖に対する寄与ならびに管理の重要性を評価する。また、種々の浄水用デバイスの家庭内使用を行動面からのリスク因子として捉え、末端給水栓までを視野に入れた適切な水利用・リスク管理方法の提案に繋がる情報整備を行う。

3. 研究の方法

1) 給水栓のレジオネラ/自由生活性アメーバ汚染状況の把握とレジオネラ/HPCの再増殖特性  
 大学キャンパス内の貯水槽水道を対象として、各給水栓を開栓した直後から4Lを採取し、採水前後の残留塩素濃度の変化を詳細に調べた。まず、1Lを孔径0.2μmのメンブレンフィルターを用いて濃縮後、酸処理してレジオネラ検出に供した。また、別の1Lを孔径8μmのメンブレンフィルターを用いて濃縮し、アメーバ検出用の試料とした。一方、生きているが培養できない(Viable but non-culturable; 以下 VBNC)状態に陥ったレジオネラの存在可能性を探ることを目的として、採水試料(500mL)を褐色びんに封入し、20 または 30 で静置培養した後に、HPCの定量を行うとともに、残りの試料を孔径0.2μmのメンブレンフィルターを用いて濃縮・酸処理した後に、レジオネラの再増殖

の有無を確認した。なお、レジオネラはGVPN培地またはGVPC培地を用いて37℃で～10日間、従属栄養細菌数(HPC)はR2A平板培地を用いて20 で1週間、自由生活性アメーバは熱不活化大腸菌を塗布した無栄養寒天培地を用いて30℃で～7日間、それぞれ培養後に形成した集落またはプラークを計数した。GVPN/GVPC培地上に生育したレジオネラ様コロニーを対象としてL(+)-システイン要求性試験を行った後に、LEG228-LEG858プライマー対またはJFP-JRPプライマー対を用いてレジオネラ確定試験を行った。

2) 自由生活性アメーバ汚染を引き起こしやすい水質・環境因子の抽出

続いて、自由生活性アメーバの汚染を引き起こしやすい水質・環境因子の抽出を目的として、貯水槽水道内の給水栓および直結給水栓を対象として、1)と同様の方法により自由生活性アメーバの調査を重点的に実施した。試料採取時に水温、pH、残留塩素濃度、HPCも同時に測定した。

3) 浄水用デバイス処理水からの自由生活性アメーバの検出

浄水用デバイスの種々の処理方式のうち、特にレジオネラリスク増大を招きやすいと考えられる活性炭処理を対象とした。実験室で連続運転中の小型透析用水製造装置に装着した脱塩素用の活性炭フィルター処理水を100mL採取し、1)と同様の方法で濃縮、自由生活性アメーバの検出を試みた。

4. 研究成果

1) 給水栓のレジオネラ/自由生活性アメーバ汚染状況の把握とレジオネラ/HPCの再増殖特性

使用頻度が異なる貯水槽水道内の給水栓計27箇所を対象として試料1Lを延べ41回採取し、レジオネラによる汚染状況を調べた。その結果、8箇所の給水栓からレジオネラが繰り返し検出された。研究室で過去に蓄積した調査データも加えて、自由生活性アメーバ調査も同時に行った試料を対象として、アメーバが検出される際にレジオネラが陽性となるオッズ比を求めたところ、1.92と計算された(表1)。一方、レジオネラが500CFU/L超の高い濃度で検出された試料の中には自由生活性アメーバが不検出となるケースも散見され、水中に生息するアメーバ細胞内で増殖したレジオネラがアメーバ細胞を破壊して水中に放出された可能性が考えられる。以上の結果から、水道システムにおいてもアメーバ汚染がレジオネラリスクを増加させる可能性が高いと判断される。

表1 レジオネラ/自由生活性アメーバ同時測定試料における検出状況

		レジオネラ	
		陽性	陰性
アメーバ	陽性	9試料	15試料
	陰性	5試料	16試料

残留塩素中和後の試料を 20 または 30 において一週間インキュベート（以下、再増殖操作と呼ぶ）した後、レジオネラおよび HPC 再増殖を調べた結果、採水直後にレジオネラが検出された試料のみ再増殖操作後試料からレジオネラが検出された。図 1 に示すように、ほとんどの試料で採水直後よりもレジオネラ濃度は低下し、再増殖操作中にレジオネラの不活化が進んだと考えられるが、3 試料のみレジオネラ濃度が上昇した。全体的に 20 における再増殖操作試料や、また試料中の自由生活性アメーバ除去のための孔径 8  $\mu\text{m}$  フィルター処理を行っていない試料の方で、レジオネラの再増殖や生残性が高まっていることがわかった。

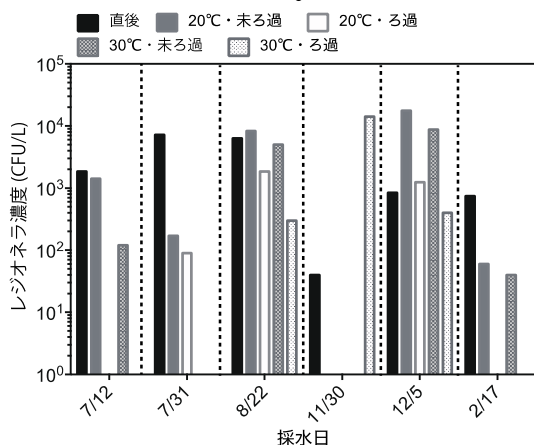


図 1 再増殖操作におけるレジオネラ濃度変化

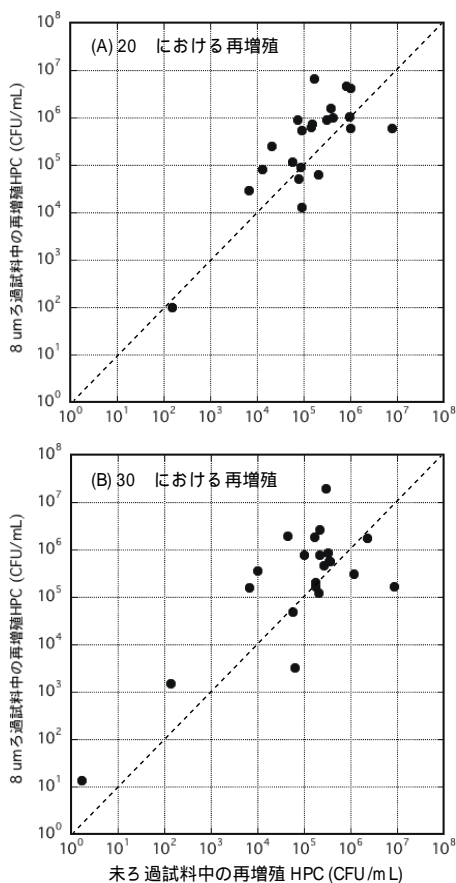


図 2 アメーバ除去を目的としたろ過操作が再増殖 HPC に与える影響

一方、8  $\mu\text{m}$  フィルター処理した試料と未ろ過試料における HPC の再増殖を比較したところ、図 2 に示すようにレジオネラとは対照的にフィルター処理した試料で HPC 濃度が高くなるケースが多かった。アメーバ細胞を除去することで、アメーバによる HPC の捕食が抑制されたと推測できる。これらの結果も、水道水中におけるレジオネラリスク増大に自由生活性アメーバの存在が寄与する可能性を示すものである。

2) 自由生活性アメーバ汚染を引き起こしやすい水質・環境因子の抽出

1) の結果を踏まえて、貯水槽水道内の給水栓から 27 試料水、直結給水方式の給水栓から 6 試料水を採取し、自由生活性アメーバの生息状況を調査した結果、18 試料水から検出され、これらの給水栓はすべて貯水槽水道方式のものであった。季節別に比較すると、4 月～10 月の期間は、17 試料水中 11 試料水から、11～1 月の期間では 16 試料水（貯水槽：11 試料水、直結給水：5 試料水）中 7 試料水からアメーバが検出された。冬季のデータに限定されているが、直結給水栓ではアメーバは検出されておらず、これらの給水栓では遊離残留塩素濃度が 0.42～0.69 mg/L と高く維持されていたため、自由生活性アメーバの増殖が抑制されたと考えられる。また、水温測定を実施した貯水槽水道の給水栓水試料を対象として、一般的に生物活性が活発になると考えられる水温 20 以上とそれ以下の水温でアメーバの検出状況を比較した結果を図 3 に示す。水温 20 以下の試料水のうちアメーバ陽性となったのは 10 検体中 7 検体、水温 20 以上の試料水では 5 検体中 3 検体で、それぞれの陽性率は前者 70%、後者 60%であった。また、検出されたアメーバ濃度（検水 1 L を濃縮して得られたプラーク数）の中央値も同程度であり、アメーバ検出に対する水温の影響は小さいことがわかった。反面、前述のように残留塩素濃度によるアメーバ抑制効果は大きく、0.4 mg/L 以上の塩素が残留している条件下では、自由生活性アメーバは不検出となる傾向が確認できた。

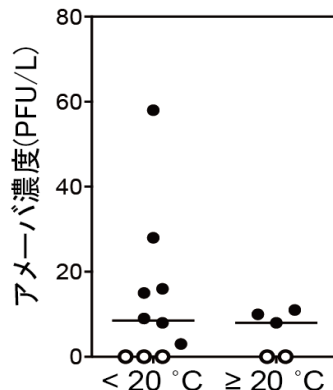


図 3 自由生活性アメーバ検出およびその濃度に対する水温の影響（図中のバーは中央値，○はアメーバ不検出）

3) 浄水用デバイス処理水からの自由生活性アメーバの検出

過酢酸消毒剤でシステム全体を消毒後、連続通水運転している小型透析用水製造装置に装着した活性炭フィルター処理水を経時的に 100 mL 採取し、自由生活性アメーバの検出を試みたが、すべて不検出であった。この活性炭フィルターは直径 10 μm 程度の粒子阻止性能を有するとされており、自由生活性アメーバの細胞も阻止された可能性がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

大河内由美子：浄水中の有機物が引き起こす給配水システムにおける微生物再増殖問題，第 20 回日本水環境学会シンポジウム，2017.

大河内由美子：給配水システムにおける微生物再増殖 -レジオネラを例として-，RECWET ワークショップ「水道給配水系の細菌管理の課題と最新の動向」，2017.

阿瀬智暢，大河内由美子：異なる分離膜モジュールの細菌阻止率の評価，第 52 回日本水環境学会年会，2017.

大河内由美子：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，日本防菌防黴学会第 45 回年次大会，2018 (予定)。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )