水道水中の従属栄養細菌の同定における DNA塩基配列解析法と表現性状試験との比較

猪 又 明 子* 千 葉 隆 司* 保 坂 三 継*

Comparison of DNA Sequencing Analysis with Phenotypic Test for Identification of Heterotrophic Bacteria Isolated from Drinking Water

Akiko INOMATA *, Takashi CHIBA * and Mitsugu HOSAKA *

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Hyakunin-cho 3-24-1, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

Abstract

Heterotrophic bacteria isolated from finished and tap water samples were examined for hemolysis activity to determine their virulence factors. Eleven colonies expressing hemolysis activity were identified by partial 16S rDNA sequencing and phenotypic test using Biolog™. All eleven strains were identified at the genus level and eight strains were identified at the species level by 16S rDNA sequencing. On the other hand, phenotypic test could identify only two strains at the genus level and four strains at the species level. Furthermore, three of four strains identified at the species level by phenotypic test might have been misidentified. Therefore, it was suggested that phenotypic test is inadequate identifying heterotrophic bacteria in drinking water, whereas 16S rDNA sequencing is a useful identification tool for them. The eleven strains identified have been reported to be food poisoning bacteria or opportunistic pathogens. Since these opportunistic pathogens exist in heterotrophic bacteria, both appropriate water quality control and further study should be continued for safe tap water supply.

Key words: heterotrophic bacteria, drinking water, hemolysis assay, 16S rDNA sequencing, opportunistic pathogen

1. はじめに

平成 20 年 4 月 1 日から従属栄養細菌が水質管理目標設定項目に追加された¹⁾。その目的は「水道施設の健全性を判断するため、また、わが国における従属栄養細菌の存在量等必要な情報、知見の收拾を図るため²⁾」であり、当面の目標値として「1 ml の検水で形成される集落数として 2,000 以下（暫定）²⁾」が示された。従属栄養細菌は水道水中に一般細菌よりも著しく多く存在することから、浄水処理過程や消毒過程での細菌の挙動を知る上で一般細菌よりも優れており、また配水施設内での水の滞留や塩素の消失に伴って増加することから、配水施設における水質管理上の指標としても利用できる³⁾。

このように従属栄養細菌の量に着目した水質指標性については、従来から一定の意義付けがされているが、質的な面に関しては情報が極めて乏しい。従属栄養細菌の中には日和見感染菌が含まれることが示唆されている⁴⁾が、従属栄養細菌のヒトへの健康影響を評価するためには、病原性状だけでなく、菌種名の同定が必要である。米国、ヨーロッパ、南アフリカ等では従属栄養細菌の病原性に関する調査が数多く行われており、溶血性、細胞毒性、細胞凝集性、細胞侵襲性を持つ細菌の分離が報

告されている⁵⁻¹⁰⁾。これらの研究においては、病原因子を持つ菌の同定に種々の表現性状試験が用いられたが、種まで分類できない菌が多く報告されている⁶⁻⁸⁾。また、わが国では水道水中の従属栄養細菌に関する研究はきわめて少ないことから、Hirata ら¹¹⁾は水道水中の従属栄養細菌を調査し、それらの分離株を表現性状試験に基づいて属までの分類を試みた。その結果、一部の菌株において日和見感染菌を含む属が同定されたが、大部分の株が同定不能であったため、従属栄養細菌を分類する試験法の必要性を指摘した。

従属栄養細菌は低温、低栄養条件下で生育する菌が多く、表現性状を用いた市販同定キットによる正確な同定が困難であるものが多い。これは、同定に用いた表現性状試験の多くが病原細菌検出用に開発されたものであり、環境由来の非病原性細菌や日和見感染菌のデータベースが不十分であるためと考えられる。細菌の厳密な同定には、DNA-DNA 相同性、DNA の GC %、細胞壁のペプチドグリカン組成、菌体脂肪酸組成等を調べる必要がある。しかし、分離した菌株すべてについてこれらのデータを得るには、煩雑な作業と膨大な時間が必要となり、実用的でない。一方、近年細菌の 16S rDNA 塩基配列を利用した分類や同定手法が適用され始めており、特

* 東京都健康安全研究センター 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

に変異の高い領域である上流側 500 塩基対を対象とした塩基配列解析が数多く行われている¹²⁻¹⁶⁾。

そこで、本研究では浄水場の浄水及び給水栓水から分離した従属栄養細菌について、病原因子の指標として 37℃での生育能及び溶血性の有無を検査し、これらの因子保有状況を調査した。また、溶血性を示した菌の簡便な同定法として、市販キットを用いた 16S rDNA 塩基配列解析法と表現性状試験とを比較、検討した。さらに、同定された菌種について、ヒトへの健康影響等を考察した。

2. 方 法

2.1 試料採取

平成 18 年 5～6 月に都内小規模浄水場の浄水 28 検体、給水栓水 9 検体を採取し、調査に用いた。採水時に現場で残留塩素濃度（遊離又は結合）を測定した。

2.2 細菌試験

1) 一般細菌：標準寒天培地（栄研化学）を用いて上水試験方法¹⁷⁾に従って試験した。

2) 従属栄養細菌：R2A 寒天培地（MERCK）を平板固化し十分に乾燥させた後、検水 1 ml を塗布し、25℃で 7 日間培養¹⁸⁾後、形成された集落数を計数した。

2.3 病原因子調査

1) 体温下、高温下増殖能：従属栄養細菌の集落を目視による色・大きさで分類・計数し、各分類群から 1 集落を釣菌して再度 R2A 培地に画線し、37℃（体温下）及び 44.5℃（高温下）で 24 時間培養し、増殖能の有無を調べた。

2) 溶血性試験：37℃で増殖した菌を羊血液寒天培地（栄研化学）に穿刺し、37℃で 24 時間培養後、溶血性（ α 、 β ）の有無を判定した。

2.4 細菌の同定

溶血性を示した菌株について、下記の 2 方法により同定を試みた。

1) 16S rDNA 塩基配列解析：Jiwa らの報告¹⁹⁾に準拠したアルカリ溶解法で菌体から DNA を抽出した。16S rDNA の上流側 500 塩基対を対象とする MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit（Applied Biosystems）を用いて反応液を調整後、DNA サーマルサイクラー（GeneAmp 9600: Perkin-Elmer）を用いて PCR を行った。PCR 産物の精製は Montage PCR Centrifugal Filter（Millipore）を用いた限外ろ過により行った。精製した PCR 産物を MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いてシーケンス反応を行った後 ABI PRISM 3130（Applied Biosystems）を用いて塩基配列の決定を行った。決定した塩基配列について Genbank を利用した BLAST（basic local alignment

search tool）解析を行い、最も高い一致率を示したものを種として決定した。

2) 表現性状試験：生化学的性状試験には、Biolog システム（Biolog Inc）を用い、マニュアルにしたがって試験した。羊血を加えた Biolog Universal Growth Agar で 37℃、24 時間前培養した後、菌体を所定の濃度に懸濁し、グラム陰性菌は GN2 プレート、グラム陽性菌は GP2 プレートに接種した。24 時間後の測定で種または属を決定した。

3) 16S rDNA 塩基配列解析と表現性状試験結果の比較：2 種類の同定法で菌種名が異なった場合には、表現性状試験結果により同定された菌種の 16S rDNA 塩基配列を GenBank から取得し、MEGA3²⁰⁾を用いた多重アライメントを行い、16S rDNA の塩基配列解析により得られた塩基配列と比較した。

3. 結果と考察

3.1 従属栄養細菌と一般細菌の検出状況

水道水中の従属栄養細菌の実態については、日本水道協会水質試験方法等調査専門委員会微生物・生物部会による全国規模の調査報告がある²¹⁾。この報告によると、一般細菌の検出率は浄水で 4%、給水栓水で 2%であった。従属栄養細菌の検出率は浄水で 46%、給水栓水で 64%であり、その菌数は浄水で 0～89 cfu・ml⁻¹、給水栓水で 0～600 cfu・ml⁻¹であった。

本研究では、一般細菌は浄水 28 検体中 1 検体（検出率 3.6%）から 1 cfu・ml⁻¹検出され、給水栓水 9 検体からは全て不検出であり、上記の調査報告と同様の結果であった。

従属栄養細菌の検出率は Table 1 に示すように、浄水で 89%、給水栓水で 100%と上記の報告値よりも高い値であった。検出された細菌数は、浄水で 0～180 cfu・ml⁻¹、給水栓水で 2～42 cfu・ml⁻¹であり、上記の報告値

Fig. 1 Number of heterotrophic bacteria in finished and tap water.

Table 1 Distribution of heterotrophic bacteria isolated from finished and tap water and the free or combined residual chlorine concentration of the water samples.

Type of water	No. of sample examined	Positive sample No.	Heterotrophic bacteria count range (average)	Residual chlorine concentration (mg・l ⁻¹)						
				Free						Combined
				0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.5<	
Finished water	28	25 (89.3)	0 - 180 (27.9)	0	8	5	8	2	1	1
Tap water	9	9 (100)	2 - 42 (11.1)	2	2	3	0	1	1	0
Total	37	34 (91.9)	0 - 180 (23.8)	2	10	8	8	3	2	1

と同様であった。したがって、浄水・給水栓水の従属栄養細菌数は $10^0 \sim 10^2$ オーダーと考えられる。また、本研究では Fig. 1 に示すように、浄水・給水栓水とも $1 \sim 9$ cfu/ml⁻¹ の試料が最も多く、既報の研究結果^{21, 22}と同様であった。

従属栄養細菌が検出された浄水・給水栓水は全て残留塩素が存在していた (Table 1) ことから、これらの従属栄養細菌は塩素耐性を持つと考えられる。本研究結果及び既報の研究結果²¹)により、浄水よりも給水栓水での従属栄養細菌検出率が高いことから、塩素耐性を持つ細菌が給配水施設内で生物膜を形成し給水栓から流出していることが推察される。

3.2 従属栄養細菌における病原因子保有状況

本研究では、従属栄養細菌の病原因子として、1) 体温下 (37 °C) での増殖能 (体内での増殖可能性)、2) 高温下 (44.5 °C) での増殖能 (腸管内での増殖可能性)、3) 溶血性 (赤血球の溶解)、についてそれぞれの保有状況を調査した。

調査した 120 株中 91 株 (75.8%) が 37 °C で増殖可能であり、低温で生育するといわれる従属栄養細菌の多くが体温下で増殖可能であることがわかった。体温下増殖株のうち、39 株 (42.9%) に溶血性が見られ、そのほとんど (36 株) が α 溶血性を示した。全菌株に占める溶血菌株の割合 (32.5%) は既報値 (36%¹⁰) と同程度であった。細胞毒性菌株の分離報告値は 0.2%⁵), 0.8%⁶), 1%¹⁰) と比べて低いことから、溶血性試験は細胞毒性試験に比べて高感度かつ簡便であり、病原因子を持つ菌のスクリーニングに有効な方法と考えられる。

一方、体温下増殖株のうち 15 株 (16.5%) が 44.5 °C の高温下で増殖したが、この中で溶血性を持つものは 4 株だけであった。この結果から、腸管内温度で増殖できる従属栄養細菌は全体の 12.5% と少なく、溶血性を合わせ持つものはわずか 3.3% に過ぎないことがわかった。従属栄養細菌は、低温度下での培養においても標準寒天培地より低栄養の培地で多く分離される細菌群集であること¹⁸) から、温度耐性及び至適栄養濃度において腸内細菌とは異なると考えられる。

3.3 菌同定における DNA 塩基配列解析法と表現性状試験との比較

溶血性を示した菌株のうち、11 株について DNA 塩基配列解析及び表現性状試験を行った。供試菌株のグラム染色性、細胞の形状、溶血性の種類 (α , β), 16S rDNA 塩基配列解析及び表現性状試験の結果を、水源の種類及び浄水処理方法とともに Table 2 に示した。

従属栄養細菌のヒトへの健康影響を評価するためには、その病原性状だけでなく、正確な菌種名を同定することが必要である。病原因子を持つ従属栄養細菌の同定には、これまで様々な表現性状試験が試みられた。具体的には、Bergey's manual of systematic bacteriology^{6, 7)}, API^{5, 10)}, Biolog⁸⁾, VITEK⁹⁾, Crystal⁹⁾ 等であるが、これらの表現性状試験では種の同定に至らず、属レベルの同定や同定できなかった菌株が多く報告されている。これらは病原細菌検出用に開発されたものであり、環境由来細菌のデータベースが不十分であるために同定できなかったと考えられる。市販キットのデータベースを比較すると、Biolog がグラム陰性菌 501 種、グラム陽性菌

318 種と、VITEK (グラム陰性菌 104 種、グラム陽性菌 49 種), API (グラム陰性菌 180 種、グラム陽性菌 106 種), Crystal (グラム陰性菌 105 種、グラム陽性菌 140 種) に比較して最も多くの種を含んでいる。このため本研究では市販の表現性状試験キットの中から Biolog を選択し、従属栄養細菌の同定を試みたが、11 株中 4 株しか同定できなかった (Table 2)。Biolog で菌科用給水装置の生物膜構成細菌の同定を試みた Singh らも 55 株中 14 株しか同定できなかったことを報告している¹⁶)。しかし、腸内細菌科を含むグラム陰性菌を Biolog で同定した研究では 266 株中 75.6%²³)、再生水中のグラム陰性菌を対象とした研究では 45 株中 93%²⁴) が同定可能であった。この違いは、Biolog のデータベースが腸内細菌等のグラム陰性菌については充実しており、同定精度が高いためと考えられる。また、Biolog のプロトコールでは、前培養 24 時間以内の菌を懸濁して検査することになっているが、従属栄養細菌の中には発育の遅い菌が含まれるという問題もある。Table 2 に示した No.33 の *Mycobacterium* は 24 時間の培養では検査に必要な菌量が得られず、数日間培養後に検査せざるを得なかった。このため、メーカーのプロトコール通りに検査できず、正しい同定ができなかったと考えられる。

一方、近年の分子生物学的手法の進展により、細菌の 16S rDNA を対象とした DNA 塩基配列解析法による同定や分類も行われるようになってきた¹²⁻¹⁶)。16S rDNA 塩基配列解析法は、表現性状試験に比べて客観性や再現性に優れており、公共データベースに登録されているデータ数も充実していることから、菌種の分類、同定にきわめて有効な方法と考えられる。本研究においても、Table 2 に示すように、11 株全てを属レベルまで、うち 8 株を種レベルまで同定することができた。Biolog による同定結果が 16S rDNA 塩基配列解析法と一致しなかった 4 株について、Biolog により同定された菌種名で登録されている 16S rDNA 塩基配列を、分離された菌株の塩基配列と比較した結果、両者の塩基配列は明らかに異なっており、Biolog による同定結果が誤りである可能性が示された。Biolog により同定された 4 株のうち、正しく同定されたものはわずか 1 株であり、Probability が 97% 以上の 2 株 (No.4, 28) でさえも誤同定であったことから、Biolog は従属栄養細菌の同定には適さないと考えられる。

しかし 16S rDNA 塩基配列解析法による従属栄養細菌の同定方法にも、いくつかの問題点が存在する。今回使用した市販の塩基配列解析キット (Microseq 500) は、16S rDNA の中で最も変異の高い部位である上流側 500 塩基対を対象としているが、この塩基配列では種まで特定できない菌株 (No.3, 6, 33) が存在した。同じキットを用いて水道水中の黄色色素産生菌の同定を行った Furuhashi ら¹²) の研究でも 2 種の菌名が併記された菌株が多数報告されている。このような短所はあるものの、Microseq 500 は試薬がプレミックスされており、簡便かつ迅速に 16S rDNA 塩基配列解析が行える利点があるため、多数の検体を分析する実態調査等に適している。Microseq 500 で同定できなかった場合には、対象とする 16S rDNA 塩基配列をより長くしたり、別の遺伝子 (*hsp* 65 等) や進化速度の速い DNA gyrase B を対象とした塩

Table 2 Identification of hemolytic heterotrophic bacteria isolated in this study with 16S rDNA sequencing analysis and phenotypic test.

Strain No.	Water resource	Water treatment	Gram stain	Cell form	Type of Hemolysis	Results of identification			
						16S rDNA sequence (Accession No.)	Identity (%)	Biolog (24hr)	Probability (%)
3	Shallow well	R.O. ¹⁾	P ⁷⁾	Cocci	β	<i>Staphylococcus pasteurii</i> CV5 (AJ717376)	100	<i>Staphylococcus</i> spp.	---
						<i>S. warneri</i> PB1 (AY186059)	100		
4	Surface water	S.S.F. ²⁾	P ⁷⁾	Rod	β	<i>Bacillus cereus</i> G8639 (AY138271)	99	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	97
6	Spring water	R.S.F. ³⁾	P ⁷⁾	Rod	α	<i>Bacillus simplex</i> M3-4 (EF690433)	96	Not identified	---
						<i>B. macroides</i> HAMB12406 (AF501367)	96		
18	Deep well	C. ⁴⁾	P ⁷⁾	Cocci	α	<i>Staphylococcus cohnii</i> ATCC49330T (AB009936)	99	<i>S. arlettae</i>	76
20	Deep well	C. ⁴⁾	P ⁷⁾	Cocci	α	<i>Micrococcus luteus</i> HAMB12408 (AF501366)	99	<i>M. luteus</i>	100
24	Surface water	U.F. ⁵⁾	P ⁷⁾	Cocci	α	<i>Staphylococcus warneri</i> ES1 (AY126244)	100	Not identified	---
25	Surface water	S.S.F. ²⁾	P ⁷⁾	Cocci	α	<i>Staphylococcus hominis</i> CV21 (AJ717375)	99	Not identified	---
28	Shallow well	N.F. ⁶⁾	N ⁸⁾	Rod	α	<i>Cupriavidus metallidurans</i> ⁹⁾ AU4057 (AY860234)	98	<i>Ralstonia paucula</i>	98
29	Shallow well	C. ⁴⁾	P ⁷⁾	Cocci	α	<i>Micrococcus luteus</i> dtb113 (AJ309917)	99	Not identified	---
30	Shallow well	C. ⁴⁾	P ⁷⁾	Cocci	α	<i>Micrococcus luteus</i> AUH1 (EF187229)	99	Not identified	---
33	Surface water	R.S.F. ³⁾	P ⁷⁾	Rod	α	<i>Mycobacterium porcinum</i> W6236 (AY012581)	99	<i>Rhodococcus</i> spp.	---
						<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> ATCC49404 (AY457068)	99		

¹⁾ : Reverse osmosis²⁾ : Slow sand filtration³⁾ : Rapid sand filtration⁴⁾ : Chlorination only⁵⁾ : Ultrafiltration⁶⁾ : Nano-filtration⁷⁾ : Positive⁸⁾ : Negative⁹⁾ : Synonym for *Ralstonia metallidurans*

基配列解析を行う等によって、同定を試みる必要があろう。

また、今回は決定した塩基配列について、Genbank を利用した BLAST 解析を行い、最も高い一致率を示したものを種としたが、従属栄養細菌についてはこのデータベースにおける ATCC 株等の標準菌株の塩基配列データが不十分であるという問題もある。病原細菌では標準菌株のデータが上位を占めるため、最も一致率の高い菌名が容易に得られるが、従属栄養細菌では最も一致率の高い菌として、Uncultured bacterium clone, Unidentified bacterium, Swine manure pit bacterium, Soil bacterium 等が上位を占め、種名の明らかな菌との一致率が低くなる場合もあるなど、16S rDNA 塩基配列のデータベースにも表現性状試験と同様の問題が存在している。

さらに、遺伝子解析の進展により細菌の分類が変化しているが、一度 Genbank に登録された菌種名と塩基配列はそのまま存在しているため、異なる菌種名で同じ塩基配列が登録されている例も見られた。たとえば、本研究で分離された No. 6 株は *B. simplex* 及び *B. macroides* との塩基配列一致率が最も高かった。Heyrman ら²⁹⁾ は *B.*

macroides と同定された多数の菌株を遺伝子解析した結果、*B. simplex* と同一の遺伝子を持つ菌株が複数存在することを発見し、これらの菌株を *B. simplex* に移すよう提案しており、No. 6 株がこの 2 種の塩基配列と高い一致率となったのは、このような状況があるためと考えられた。また、No. 33 株は *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* 及び *M. porcinum* との塩基配列一致率が最も高かった。*M. porcinum* はブタのリンパ節炎の原因菌として新種記載された³⁰⁾ が、表現性状や各種遺伝子の塩基配列が *M. fortuitum* の ATCC49404 株とほぼ完全に一致することから、この 2 種を同一とする研究者²⁷⁾ もいる。両者の 16S rDNA の最初の 500 塩基配列は全く同一であることが報告されている²⁷⁾。したがって No. 34 株が *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* (ATCC49404) 及び *M. porcinum* の塩基配列に対して同じ一致率を示したのは、当然の結果と考えられた。

今後、16S rDNA 塩基配列解析法の有効性をさらに高めるためには、標準菌株のデータを充実させるとともに、多くの研究者が環境由来細菌のデータを調査、登録していく必要がある。

3.4 同定された従属栄養細菌のヒトへの健康影響

本研究で同定された従属栄養細菌について、ヒトへの健康影響を考察する。

Staphylococcus 属が 4 株と最も多く分離され、*S. pasteurii*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. hominis* が同定された。これら 4 種は全てコアグラゼ陰性ブドウ球菌群であり、ヒトの皮膚に常在し、ときに尿路感染症、感染性心内膜炎、カテーテル菌血症、日和見感染症の原因となる²⁸⁾。コアグラゼ陰性ブドウ球菌群には β 溶血を示す菌株が存在し²⁸⁾、またウシ乳房炎から分離された *Staphylococcus* 属 12 種の 272 株すべてが α 溶血を示した²⁹⁾ 報告例もある。水道水からの *Staphylococcus* 属の分離報告例は多く^{6-8, 11, 16, 22)}、水道水中に広く生息する菌である。

次いで、*Micrococcus luteus* が 3 株分離された。*Micrococcus* 属は自然界に広く生息し、病原的意義は低いが免疫不全患者への感染例の報告もある²⁹⁾。本研究の 3 株は全て地下水（深井戸 1、浅井戸 2）を塩素処理しただけの水道水から分離された。Mir ら³⁰⁾ は浄水場の塩素処理水（遊離残留塩素濃度 $2.00\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ）から分離した *M. luteus* を用いて、塩素による不活化試験を行った。その結果、塩素濃度 $0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で 60 分間接触後でも 0.79 log の不活化に留まり、*M. luteus* が高い塩素耐性を持つことが示された。したがって、今回の検出は原水中に存在していた菌が塩素処理後も生残した可能性が高いと考えられる。*M. luteus* 及び *Micrococcus* 属も水道水からの検出例が多い^{6-8, 11, 13, 16, 22)}。

Bacillus 属は *B. cereus* と *B. simplex*（又は *B. macroides*）の 2 株が分離された。*B. cereus* は土壌、空中など自然界に広く分布し、食中毒の原因菌として知られており²⁸⁾、 β 溶血性を示す³¹⁾。*B. simplex* は *B. cereus* と同様の加熱に強い毒素を産生し、食中毒の原因となることが報告されている³²⁾。*B. cereus* 及び *Bacillus* 属の水道水からの検出例は数多く報告されている^{6-9, 11, 15, 16, 22)}。

非結核性抗酸菌 (NTM) の *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum*（又は *M. porcinum*）が 1 株検出された。NTM は塩素抵抗性が高く、水道管内表面に生物膜を形成して水道水中に広く存在することが知られている³³⁾。*M. fortuitum* は迅速発育群に属し²⁸⁾、創傷感染、カテーテル菌血症、肺炎等の感染を起こす²⁷⁾。汚染された浴槽水からのエアロゾル暴露による難治性肺炎の原因となることも報告されている³⁴⁾。Wallace Jr. ら²⁷⁾ は給水栓水から *M. porcinum* を検出し、本種がカテーテル菌血症の原因となるのは、カテーテルが水道水に暴露されるためではないかと推定している。また、Grabow ら³⁵⁾ は *M. fortuitum* を用いて塩素抵抗試験を行い、遊離残留塩素濃度 $0.4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で 15 分間接触後の菌数は初期濃度 ($10^3\text{ cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$) とほとんど変わらないことを報告した。このように NTM は塩素抵抗性が高いことから、多くの研究者^{12, 14, 15, 33)} が水道水から検出している。

グラム陰性菌では *Cupriavidus metallidurans* (Synonym *Ralstonia metallidurans*) が分離された。本種は重金属耐性の強い細菌である³⁶⁾ が、嚢胞性線維症患者の肺炎原因菌としての分離報告例³⁶⁾ もある。Schmeisser ら³⁸⁾ は配水施設内の生物膜から本種の DNA 検出を報告しており、水道施設内での存在が示唆されている。

このように本研究で分離した菌株は、全て人への感染

例があり、病原性を持つ種であることがわかった。残留塩素が十分確保されている水道水であれば、従属栄養細菌数は非常に少なく制御されていることから、これらの菌の存在が直ちにヒトへの危険性を意味するわけではない。しかし、これらの菌の多くが高い塩素抵抗性を持ち、生物膜を形成することから、残留塩素の低下や消失により繁殖する可能性がある。実際に、Hirata ら¹¹⁾ は残留塩素濃度の低い早朝の給水栓初流水において、2~5 分流水後の水よりも $10^1\sim10^2$ 多い従属栄養細菌を検出したことを報告している。また、適正に管理された給水栓水の従属栄養細菌数は $10^2\text{ cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 程度であるが、汚れた受水槽から採種した水では $10^5\text{ cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ を越える菌数となった例もある¹⁹⁾。したがって、これまで無害と考えられていた従属栄養細菌にこのような日和見感染菌等が存在することを前提として、水道水の水質管理を実施していく必要があると考えられる。

4. ま と め

浄水場浄水及び給水栓水から分離した従属栄養細菌について、ヒトへの病原因子の指標として 37°C での生育能及び溶血性を調査した。溶血性を示した菌の簡便な同定法として、市販キットを用いた 16S rDNA 塩基配列解析法と表現性状試験とを比較した。さらに同定された菌のヒトへの健康影響について考察を行った。本研究から得られた主な結論を以下に示す。

1) 37 検体全てにおいて残留塩素が検出され、一般細菌は 1 検体で $1\text{ cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 検出された以外は不検出であった。従属栄養細菌は 34 検体 (92%) から検出された。

2) 溶血性を持つ従属栄養細菌 11 株を市販キットによる 16S rDNA 塩基配列解析法と表現性状試験により同定した。両検査法の結果が一致したのは 1 株のみであった。表現性状試験で同定された菌種名で登録されている 16S rDNA 塩基配列を分離された菌株の塩基配列と比較した結果、両者の塩基配列は異なっていたことから、表現性状試験による従属栄養細菌の同定は困難であり、塩基配列解析法による同定が有効であることが示された。

3) 16S rDNA 塩基配列解析法により同定された 11 株は、いずれも食中毒原因菌あるいは日和見感染菌であった。従属栄養細菌の中にこのような日和見感染菌等が存在することを前提として、水道水の水質管理を実施していく必要があると考えられる。

(原稿受付 2008 年 3 月 6 日)

(原稿受理 2008 年 8 月 11 日)

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省 (2007) 水質基準に関する省令の一部改正等について (施行通知), 健水発第 1115003 号。
- 2) 厚生労働省 (2007) 水質基準に関する省令の一部改正等における留意事項について, 健水発第 1115002 号。
- 3) 日本水道協会 (2001) 従属栄養細菌, 「上水試験方法 解説編」, p.827。
- 4) Burke, V., Robinson, J., Gracey, M., Peterson, D. and Partridge, K. (1984) Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates, *Appl. Env. Micro.*, 48, 361-366。

- 5) Lye, D.J. and Dufour, A. P. (1994) A membrane filter procedure for assaying cytotoxic activity in heterotrophic bacteria isolated from drinking water, *J. Appl. Bact.*, **70**, 89-94.
- 6) Payment, P., Coffin, E. and Paquette, G. (1994) Blood agar to detect virulence factors in tap water heterotrophic bacteria, *Appl. Env. Micro.*, **60**(4), 1179-1183.
- 7) Edberg, S. C., Kops, S., Kontnick, C. and Escarzaga, M. (1997) Analysis of cytotoxicity and invasiveness of heterotrophic plate count bacteria (HPC) isolated from drinking water on blood media, *J. Appl. Micro.*, **82**, 455-461.
- 8) Pavlov, D., de Wet, C. M. E., Grabow, W. O. K. and Ehlers, M. M. (2002) Determination of cytotoxicity and invasiveness of heterotrophic plate count bacteria isolated from drinking water, *Water Supply*, **2**(3), 115-122.
- 9) Stelma Jr., G. N., Lye, D. J., Smith, B. G., Messer, J. W. and Payment, P. (2004) Rare occurrence of heterotrophic bacteria with pathogenic potential in potable water, *Int. J. Food Micro.*, **92**(3), 249-254.
- 10) Lye, D. J. and Dufour, A. P. (2006) Virulence characteristics of heterotrophic bacteria commonly isolated from potable water, *Env. Tox. Wat. Qual.*, **8**(1), 13-23.
- 11) Hirata T., Tosa K., Kawamura K., Nakajima J., Kaneko M. and Taguchi K. (1993) Heterotrophic bacteria in chlorinated drinking water distribution: detection and identification, *Wat. Sci. Tech.*, **27**(3-4), 155-158.
- 12) Furuhashi, K., Kato, Y., Goto, K., Saitou, K., Sugiyama, J., Hara, M. and Fukuyama, M. (2007) Identification of yellow-pigmented bacteria isolated from hospital tap water in Japan and their chlorine resistance, *Biocontrol Science*, **12**(2), 39-46.
- 13) Ultee, A., Souvatzi, N., Maniadi, K. and Konig, H. (2004) Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany, *J. Appl. Micro.*, **96**, 560-568.
- 14) Williams, M. M., Domingo, J. W. S., Meckes, M. C., Kelty, C. A. and Rochon, H. S. (2004) Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator, *J. Appl. Micro.*, **96**, 954-964.
- 15) Tokajian, S. T., Hashwa, F. A., Hancock, I. C. and Zalloua, P. A. (2005) Phylogenetic assessment of heterotrophic bacteria from a water distribution system using 16S rDNA sequencing, *Can. J. Micro.*, **51**, 325-335.
- 16) Singh, R., Stine, O. C., Smith, D. L., Spitznagel Jr., J. K., Labib, M. E. and Williams H. N. (2003) Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems, *Appl. Env. Micro.*, **69**, 3412-3420.
- 17) 日本水道協会 (2001) 「上水試験方法」, 827pp.
- 18) 保坂三穂, 眞木俊夫 (2001) 水の従属栄養細菌試験における培地並びに培養条件の検討, 東京都立衛生研究所研究年報, **52**, 24-249
- 19) Jiwa, N. M., Van, Gemert, G. W., Raap, A. K., Van de Rijke, F. M., Mulder, A., Lens, P. F., Salimans, M. M., Zwaan, F. E., Van Dorp, W. and Van der Ploeg, M. (1989) Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction, *Transplantation*, **48**, 72-76.
- 20) Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment, *Brief. Bioinform.*, **5**(2), 150-163.
- 21) 日本水道協会水質試験方法等調査専門委員会微生物・生物部会 (2006) 平成17年度夏季の従属栄養細菌の実態調査結果, 水道協会雑誌, **75**, 139-141.
- 22) 古畑勝則, 福山正文 (2006) 病院内水道水からの従属栄養細菌の分離状況, 防菌防黴誌, **34**, 323-328.
- 23) Miller, J. M. and Rhoden D. L. (1991) Preliminary evaluation of Biolog, a carbon source utilization method for bacterial identification, *J. Clin. Micro.*, **29**, 1143-1147.
- 24) Klingler J. M., Stowe R. P., Obenhauer D. C., Groves T. O., Mishra S. K. and Pierson D. L. (1992) Evaluation of the Biolog automated microbial identification system, *Appl. Env. Micro.*, **58**, 2089-2092.
- 25) Heyrman, J., Logan, N. A., Rodriguez-Diaz, M., Scheldeman, P., Lebbe, L., Swings, J., Heyndrickx, M. and De Vos, P. (2005) Study of mural painting isolates, leading to the transfer of '*Bacillus macrococcus*' and '*Bacillus carotarius*' to *Bacillus simplex*, emended description of *Bacillus simplex*, reexamination of the strains previously attributed to '*Bacillus macroides*' and description of *Bacillus muralis* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Micro.*, **55**, 119-131.
- 26) Tsukamura, M., Nemoto, H. and Yugi, H. (1983) *Mycobacterium porcinum* sp. nov., a porcine pathogen, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**, 162-165.
- 27) Wallace Jr., R. J., Brown-Elliott, B. A., Wilson, R. W., Mann, L., Hall, L., Zhang, Y., Jost Jr., K. C., Brown, J. M., Kabani, A., Schinsky, M. F., Steigerwalt, A. G., Crist, C. J., Roberts, G. D., Blacklock, Z., Tsukamura, M., Silcox, V. and Turenne, C. (2004) Clinical and laboratory features of *Mycobacterium porcinum*, *J. Clin. Micro.*, **42**(12), 5689-5697.
- 28) 岡田淳, 設楽政次, 伊藤武, 長沢光章, 渡邊邦友, 中村良子, 宮治誠, 山根誠久, 奥脇義行 (2006), 「臨床検査学講座 微生物学/臨床微生物学」, 466pp.
- 29) Boerlin, P., Kuhnert, P., Hussy, D. and Schaellibaum, M. (2003) Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis, *J. Clin. Micro.*, **41**(2), 767-771.
- 30) Mir, J., Morato, J. and Ribas, F. (1997) Resistance to chlorine of freshwater bacterial strains, *J. Appl. Micro.*, **82**, 7-18.
- 31) American society for microbiology. Blood agar plates and hemolysis: *Bacillus* species, www.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=2040
- 32) Taylor, J. M., Sutherland, A. D., Aidoo, K. E. and Logan, N. A. (2005) Heat-stable toxin production by strains *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*, *FEMS Micro. lett.*, **242**(2), 313-317.
- 33) September, S. M., Brozel, V. S. and Venter, S. N. (2004) Diversity of nontuberculous *Mycobacterium* species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems, *Appl. Env. Micro.*, **70**, 7571-7573.
- 34) Mangione, E. J., Huit, G., Lenaway, D., Beebe, J., Bailey, A., Figoski, M., Rau, M. P., Albrecht, K. D. and Yakus, M. A. (2001) Nontuberculous mycobacterial disease following hot tub exposure, *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 1039-1042.
- 35) Grabow, W. O. K., Gauss-Muller, V., Prozesky, O. W. and Deinhart, F. (1983) Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals, *Appl. Env. Micro.*, **46**, 619-624.
- 36) Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Brim, H., Diels, L., Mergeay, M., Kersters, K. and Vandamme, P. (2001) Classification of metalresistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basiliensis* Steinle et al. 1998 emend., *Int. J. Syst. Evol. Micro.*, **51**, 1773-1782.
- 37) Coenye, T., Spilker, T., Reik, R., Vandamme, P. and LiPuma, J. J. (2005) Use of PCR analyses to define the distribution of *Ralstonia* species recovered from patients with cystic fibrosis, *J. Clin. Micro.*, **43**, 3463-3466.
- 38) Schmeisser, C., Stockigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K. N., Wenderoth, D. F., Flemming, H.-C., Liesegang, H., Schmitz, R. A., Jaeger, K.-E. and Streit, W. R. (2003) Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks, *Appl. Env. Micro.*, **69**, 7298-7309.