研究科分　麻布大学雑誌　第15・16巻・2007年

病院内水道水における貧栄養細菌の生息状況

Isolation of Oligotrophic Bacteria from Hospital Tap Water

古畑勝則，福山正文，大仲賢二

麻布大学大学院環境保健学研究科

Katsunori Furuhata, Masahumi Fukuyama, Kenji Oonaka

School of Environmental Health, Azabu University

Abstract. To investigate the distribution of oligotrophic bacteria inhabiting hospital tap water, tap water samples were subjected to pour culture at 25°C for 7 days using R2A agar medium. Bacteria were detected in 222 of 271 samples (81.9 %) collected nationwide, mainly in the Kanto district, revealing that oligotrophic bacteria are present at a very high frequency in hospital tap water. The distribution was investigated in relation to the geography or hospital management form, but no marked tendency was noted. The number of isolated oligotrophic bacteria varied from 1.0×10^0 CFU/ml to 2.8×10^4 CFU/ml among the samples, but the number was less than 1.0×10^1 CFU/ml in 54 samples accounting for the highest ratio (24.3 %). Of 538 oligotrophic isolates, 457 isolates (84.9 %) were gram-negative rods, and 108 isolates (23.6 %) were *Methylobacterium*, ranked the highest, followed by 71 isolates of *Pseudomonas* (15.5 %). However, identification of 274 isolates (60.0 %) was not possible. Gram-positive rods, *Bacillus* and *Corynebacterium*, and cocci, *Micrococcus* and *Staphylococcus*, were also isolated, although the frequencies were low. Based on these findings, the presence of oligotrophic bacteria which may cause opportunistic infections in tap water should be noted, when patients use tap water in hospitals, being susceptible to the infection.

序　文

日本の水道水では塩素消毒が義務付けられていることから消化器系病原微生物などは殺菌されている。しかしながら，建築物において受水槽等の給水施設を経由した後に配水される水道水中には残留塩素に抵抗性を示す様々な貧栄養細菌が広く生息していることはすでに報告したとおりである[1]。こうした細菌は36℃，24時間の培養条件で試験される水道法の水質基準項目である一般細菌としては検出されないため，その生息が十分に認識されているとは言い難く，病院内の水道水における貧栄養細菌の生息状況は明らかにされていない。これら貧栄養細菌のなかでも *Methylobacterium* 属菌は日和見感染原因菌として臨床材料からの分離報告が散見される[2-4]。本菌感染症の場合はその感染源が水道水の可能性もあることから，易感染者が病院内の水道水を直接利用することなどにより *Methylobacterium* 属感染症の拡大が危惧される。そこで著者らは上述のことを加味し，微生物生態学的視点から病院内水道水における貧栄養細菌の生息実態を調査した。

材料および方法

1．供試試料

2006年4月から10月の間に，東北から沖縄にある大学附属，国公立，私立等の病院内水道水（主にトイレや洗面所などの末端）を十分に放流後，滅菌容器（100 ml容）に採取し，合計271試料を調査対象

とした。また，試料採取時に試験紙（アクアチェックLC，日産化学工業）により遊離残留塩素の測定を行った。

2. 貧栄養細菌の分離同定

供試試料を1 mlずつ2枚のシャーレに分注し，1枚は一般細菌を測定するために標準寒天培地（日水製薬）で混釈後，37 ℃で24時間培養した。また，1枚は貧栄養細菌測定用としてR2A寒天培地（和光純薬工業）を用いて混釈し，25 ℃で7日間培養後，出現した集落を計数した。なお，残留塩素が検出されなかった試料は1,000倍まで希釈してから混釈した。

集落計数後，形態の異なる集落を1試料当たり最大数個釣菌して再分離し，純培養株を得た。これらの菌株について色素産生性，グラム染色，OF試験，オキシダーゼテスト（栄研化学）などを行い，成書[5]に準拠して属レベルで菌種の同定を行った。なお，OF試験ではPYP基礎培地（日水製薬）にグルコース（和光純薬工業）を1％加えて調製し，25 ℃，7日間培養した。また，一部の分離株については，ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌同定用キット，ノンファグラムS-1（和光純薬工業）を用いた。

成　績

1. 病院内水道水からの一般細菌の分離状況

一般細菌が分離された水道水は271試料中3試料（1.1％）と低率であった。なお，これらは大学附属病院が2試料（2.8％），都府県立病院が1試料（3.6％）であった。これら試料の残留塩素をみると，いずれも0.1 mg/l未満であった。また，それぞれの菌数は大学附属病院では7.5 × 10^2CFU/mlおよび6.4 × 10^3CFU/ml，都府県立病院では4.0 × 10^3CFU/mlであり，水道法水質基準（1.0 × 10^2CFU/ml以下）を大きく上回った。

2. 病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況

病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況は，全体では271試料中222試料（81.9％）から分離され，貧栄養細菌は非常に高率に生息していることが明らかになった。これを調査地域別にみると，北関東，北陸および中国地方においては，試料数は少ないものの，採取したすべての試料から分離された。次に，東北および九州・沖縄地方での分離率が90％を超えて高く，前者では93.3％（15試料中14試料），後者では92.9％（14試料中13試料）であった。また，甲信越地方では86.7％（15試料中13試料），東海および近畿地方ではそれぞれ83.3％（6試料中5試料），南関東では79.7％（202試料中161試料）といずれも高率に分離された。ところが，四国地方では試料数が3試料と少なかったが，このうち分離された試料はわずか1試料（33.3％）のみであった。

Table 1には貧栄養細菌の分離状況を病院の規模を考慮した経営形態と遊離残留塩素濃度別に示した。貧栄養細菌は市立病院から96.4％（28試料中27試料）と最も高率に分離され，次に大学附属病院が83.3％（72試料中60試料），都府県立病院が82.1％（28試料中23試料），その他の病院が79.5％（112試料中89試料）および独立行政法人（国立）病院が74.2％（28試料中23試料）であった。

また，病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況を遊離残留塩素濃度別にみると，未測定の77試料を除き，0.1～0.2 mg/lから52試料（23.4％）と最も多

Table 1. Distribution of oligotrophic bacteria isolated from hospital tap water and the free residual chlorine concentration of the water samples.

Management form	No. of samples examined	No. of positive samples (%)	Free residual chlorine (mg/l)					
			0	0.1-0.2	0.3-0.4	0.5-0.6	0.7-0.8	NT*
University attachment	72	60 (83.3)	8	20	5	4	1	22
National	31	23 (74.2)	8	2	6	1	0	6
Prefecture	28	23 (82.1)	4	4	3	1	0	11
City	28	27 (96.4)	3	10	2	1	0	11
Others	112	89 (79.5)	2	16	29	10	5	27
Total	271	222 (81.9)	25(11.3)	52(23.4)	45(20.3)	17(7.7)	6(2.7)	77(34.7)

*： Not tested

く分離され，次に0.3～0.4 mg/lから45試料（20.3％）分離された。遊離残留塩素が0.5～0.6 mg/lになると分離された試料は17試料（7.7％）と少なくなり，さらに高濃度の0.7～0.8 mg/lではわずか6試料（2.7％）から分離されたに過ぎなかった。このように，貧栄養細菌の分離状況は残留塩素濃度が高くなるとともに分離率が低くなる傾向が認められた。また，水道法で定められた0.1 mg/lを維持しておらず貧栄養細菌が分離されたのは，222試料中25試料（11.3％）であった。分離率が最も高かった遊離残留塩素濃度0.1～0.2 mg/lにおける病院別の分離率を比較すると，市立病院が35.7％と最も高く，次に大学附属病院が27.8％であった。都府県立病院とその他の病院ではそれぞれ14.3％，国立病院が6.5％であった。

病院内水道水中に生息する貧栄養細菌数をFig. 1に示した。全体では1.0×10^0CFU/ml～9.0×10^0CFU/mlが96試料（43.2％）と最も多く，次に1.0×10^1CFU/ml～9.0×10^1CFU/mlが54試料（24.3％），1.0×10^2CFU/ml～9.9×10^2CFU/mlが38試料（17.1％），1.0×10^3CFU/ml～9.9×10^3CFU/mlが30試料（13.5％）であった。さらに，1.0×10^4CFU/ml以上の試料が4試料（1.8％）あった。このように，菌数が多くなると分離試料数は少なくなった。また，分離試料数が最も多かった1.0×10^0CFU/ml～9.0×10^0CFU/mlについて病院別に比較すると，その他の病院が51試料（53.1％）と最も多く，次に大学附属病院が20試料（20.8％），市立病院が11試料（11.5％），都府県立病院が8試料（8.3％），国立病院が6試料（6.3％）であった。

3．病院内水道水から分離された貧栄養細菌

222試料の病院内水道水から分離された貧栄養細菌を同定したところ，538株中457株（84.9％）がグラム陰性桿菌であり，4属に同定され，その内訳は*Methylobacterium*が108株（23.6％）と最も多く，次に*Pseudomonas*が71株（15.5％），*Agrobacterium*と*Alteromonas*が各2株（0.4％）であった。しかし，グラム陰性桿菌のうち274株（60.0％）は同定不能であった。また，グラム陽性菌では桿菌が46株（8.6％），および球菌が35株（6.5％）であり，それぞれ*Bacillus*が12株（26.1％）と*Corynebacterium*が5株（10.9％），*Micrococcus*が4株（11.4％）と*Staphylococcus*が2株（5.7％）の各2属に同定された。

考　察

これまでの水道水における細菌学的調査では，血液寒天培地やハートインフュージョン寒天培地などの富栄養培地を用いて37℃，24～48時間の培養条件が採用されている[6)]。調査対象が病原細菌のみの場合はこうした検査で十分であろうが，バイオバーデン，すなわちそこに存在し，生育しうるすべての貧栄養細菌を対象とする場合には，こうした培地および培養条件では検出されにくいことがすでに知られている[7)]。新谷の解説[8)]では，透析液中の貧栄養細菌の調査においてSCDA培地を用いて37℃で48時間培養した場合とSMA培地やR2A培地のような貧栄養培地で比較的低温（23℃）で長時間（7日間）培養した場合では，検出菌数に10,000倍もの差が生じたことが示されている。また，歯科用水の調査においても同様な結果が示されており，このような貧栄養細菌は富栄養培地では発育しにくいこと，さら

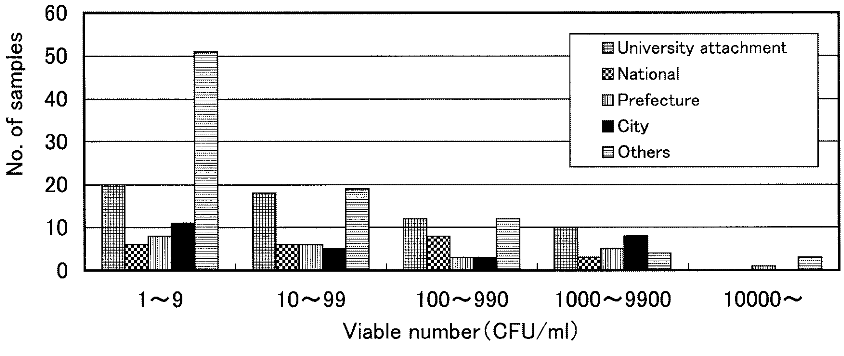

Fig.1. Viable number of oligotrophic bacteria in hospital tap water.

にこれらの生息環境を考慮すると，貧栄養で比較的低温条件の方が培養には適していることが示唆されている[8]。

今回の調査においても同様な結果が示された。すなわち，標準寒天培地を用いて36℃で24時間培養する「一般細菌」の分離率は，わずか1.1％（271試料中3試料）と非常に低率であった。ところが，同一試料をR2A培地により25℃で7日間培養すると81.9％（271試料中222試料）と高率に「貧栄養細菌」が分離された。このように，培養条件を替えることによって細菌の分離率に大差が認められた。以上のように，通常の病院内水道水から水道法に定められた「一般細菌」が分離されることは非常に希であるが，「貧栄養細菌」は広く生息していることが明らかになった。

これら貧栄養細菌の生息状況を地理的にみると，試料数が少なかった四国を除き，全国的には80～90％の高い分離率であり，顕著な差異は認められなかった。また，病院の規模を考慮して経営形態別に貧栄養細菌の分離率をまとめてみたが，独立行政法人（国立）で74.2％とわずかに低かったものの，その他は80～90％と大差はなかった。

さらに，遊離残留塩素濃度別の分離状況では，0.1～0.2 mg/l で23.4％と最も高く，次に0.3～0.4 mg/l で20.3％であった。遊離残留塩素が0.5～0.6 mg/l，0.7～0.8 mg/l と高濃度になるとそれぞれ7.7％，2.7％と分離率は次第に低下した。また，貧栄養細菌が分離された水道水のうち，水道法に定められた遊離残留塩素0.1 mg/l を維持していなかったものは11.3％であり，予想外に低かった。このように，遊離残留塩素が存在する病院内水道水においても塩素抵抗性の貧栄養細菌が生残していることが明らかになった。一方，事務所ビル等の建築物における現状はすでに報告したとおりであり[1]，実験的にも分離株の塩素抵抗性が確認されている[9,10]。

病院内水道水中の貧栄養細菌数は，1.0×10^0CFU/ml～2.8×10^4CFU/ml と試料によってかなりの差がみられた。これをオーダーごとにみると，1桁台が96試料（43.2％）と最も多く，次に2桁台が54試料（24.3％），3桁台が38試料（17.1％），4桁台が30試料（13.5％）と菌数の増加に伴って漸次試料数は減少した。また，5桁台の試料が4試料（1.8％）もあった。現在のところ，これら貧栄養細菌数に関する規制基準はまったくない。先の水道法水質基準改定において，試験項目を「一般細菌」から「従属栄養細菌（貧栄養細菌）」へ移行することの是非について種々議論されたが，結局結論は先送りとなった[11]。今後の検討が待たれるところである。

分離された貧栄養細菌を同定した結果，84.9％がグラム陰性桿菌であり，大半を占めた。中でも *Methylobacterium* や *Pseudomonas* が優占種であったが，グラム陰性桿菌のうち60％は同定できなかった。このことは水道水中の貧栄養細菌に関する情報量が少ないことや分離株の生化学的活性が低いことによるものと考えられた。以前，著者らが行った調査では病院内水道水の74％から *Methylobacterium* が分離されており[12]，今回の調査結果同様，水道水中の優占種であった。Gallegoらの報告[13]でも，水道水から *Methylobacterium* を分離しており，新菌種の提案を行っている。また，O'Brienは塩素消毒された水道水中の *Pseudomonas* について報告している[14]。現在，水道水中に生息する *Methylobacterium* 属菌については19菌種が報告されているが[15]，性状試験だけでは種レベルでの同定はかなり困難である。著者らは16S rDNAの部分塩基配列の解析によってわが国の病院内水道水では *M.aquaticum* と *M.fujisawaense* が優占種であったことを別に報告した[16]。こうした *Methylobacterium* は *Pseudomonas*[17] 同様，日和見感染の原因菌として報告されており[2-4]，感染の可能性を有すると判断された。

厚生労働省は2005年2月1日付けで医療法施行規則の一部を改正する省令において，第20条第3号のなかで「滅菌手洗い」を「清潔な手洗い」に改訂した[18]。これまで，手術時の手洗い水については種々検討され，滅菌水と水道水において手洗いの効果に有意差がないとの報告[6,19,20]から，日本の病院においても感染対策に必要な経費削減のため，滅菌手洗い装置を廃止して水道水への切り替えが可能になった。こうした状況を否定するものではないが，塩素消毒された水道水中にも貧栄養細菌が広く生息していることを念頭に置く必要があると考えられた。

結　語

以上のように，残留塩素が検出される病院内水道

水中にも貧栄養細菌が広く生息していることが判明した。全体的に菌数は少ないものの，日和見感染原因菌として注目される *Methylobacterium* や *Pseudomonas* が分離されていることから，水道水の衛生的維持管理状況によっては菌数の増加に伴う水質の劣化も予想され，易感染者が直接水道水を利用する場合にはこうした現状を十分に考慮する必要がある。

文　献

1）古畑勝則，小池和子，松本淳彦：日本微生物生態学会報，4, 35-47, 1989.
2）Hornei, B., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, 37, 248-250, 1999.
3）Lee, C.H., Tang, Y.F., and Liu, J.W.: *J. Med. Microbiol.*, 53, 755-759, 2004.
4）石黒俊哉，ほか：日本透析医学会雑誌, 36 増刊 1, 962, 2005.
5）小迫芳正：バイオバーデン試験法及び環境微生物試験法，(財)日本規格協会，東京，pp.100-111, 2006.
6）高尾佳保里，ほか：環境感染, 18, 430-434, 2003.
7）古畑勝則，小池和子：環境感染, 5, 11-16, 1990.
8）新谷英晴：防菌防黴, 30, 95-103, 2002 .
9）古畑勝則：食品のストレス環境と微生物—その挙動・制御と検出—，(株)サイエンスフォーラム，東京, pp.210-218, 2004 .
10）Hiraishi, A., *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2099-2107, 1995.
11）松田和久：空気調和・衛生工学, 77, 809-814, 2003 .
12）古畑勝則，小池和子：環境感染, 5, 47-51, 1990.
13）Gallego, V., Garica, M.T., and Ventosa, A.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 281-287, 2005.
14）O'Brien, J.R.: *Microbios*, 69, 215-221, 1992.
15）Euzeby, J.P.: http://www.bacterio.cict.fr/m/methylobacterium.html, 2005.
16）Furuhata,K., *et al.*: *Microbiol. Immunol.*, 50, 11-17, 2006.
17）Holmes, B., *et al.*: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27, 133-146, 1977.
18）厚生労働省：厚生労働省令第12号．官報第4024号，2005年2月1日.
19）藤井　昭，ほか：手術医学, 23, 2-9, 2002.
20）白石　正，仲川義人，長岡榮子：日病薬誌, 40, 1133-1135, 2004.