

10.3 水環境中における病原微生物の対策技術の構築に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 27

担当チーム：材料資源研究グループ（リサイクル）

研究担当者：内田勉、諏訪守、桜井健介

【要旨】

病原微生物の検出技術の高度化により、下水や環境水での汚染実態が徐々に明らかになりつつあるが、それらに起因する集団感染発生の恐れが危惧されている。現行指標である大腸菌群では汚染の実態を十分に把握できないこともあり、公共用水域への各種汚染源の解明や汚染レベルの違いによる対策手法の構築が望まれている。

本研究では、利用形態に応じた公共用水域の安全性を確保するため、その基本となるリスク評価に資するべく、測定法等の開発を通じた下水や環境水における新興・再興感染症としての病原微生物である原虫類、ウイルス、薬剤耐性菌の汚染実態を解明する。さらに、対策技術として今まで明らかとなっていない生物学的高度処理法等による病原微生物の除去要因の解明を行う。その結果を基に汚濁負荷の観点から適切な水環境保全システムとしての対策技術を構築するものである。

本研究は、平成 23～27 年度にかけ、①下水や環境水における新興・再興感染症としての病原微生物である原虫類、ウイルス、薬剤耐性菌の実態解明、②リスク評価のための極低濃度試料に対応した濃縮・定量技術の開発、③生物学的高度処理法による除去率向上要因の解明と消毒法による効果の検討、④適正な流域管理のための非点源負荷と対策技術の構築、⑤水環境保全システムとしての適切な対策技術の構築、の各項目を達成目標に掲げ実施するものである。

23年度は、上記①に関して、下水道へ排出される病院排水を対象に薬剤耐性菌の実態調査、および浄化槽排水負荷源を流域に持つ河川を対象にウイルス、原虫類の実態調査を行った。

その結果、下水道へ排出される病院排水を対象とした薬剤耐性菌の実態調査では、アンピシリンに耐性を示す多剤耐性大腸菌株が多く検出されたが、カルボペネム系のイミペネムに耐性を示した大腸菌株は、現段階において不検出であった。このため、スーパー耐性菌と称される細菌の存在レベルは未だ低いと推定された。また、浄化槽排水の影響を受ける河川水の調査では、公共用水域に対するノロウイルスの負荷源の 1 つとして、さらに、原虫類に関しても検出割合・濃度は低い負荷源の 1 つとして浄化槽排水の存在が明らかとなった。

上記③に関して、東日本大震災により壊滅的な被害を受けた下水処理場を対象に、段階的な対策技術による放流水質の改善効果を評価した。今回の震災により壊滅的な被災を受けた下水処理場では、完全な水処理の復旧には長期間を要することから、段階的な対策の実施により公共用水域に対する衛生学的安全性を担保しなければならない。しかし、段階的な対策技術ごとに病原微生物の除去効果が異なると考えられるため、それら対策技術の除去効果を明らかにすることを目的に、被災した処理場を対象に重点的に調査を実施した。

段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価では、その初期対応での簡易沈殿処理法は、沈殿汚泥からの還元性物質による消毒剤の消費が消毒効果に影響するため、汚泥の引き抜き管理の重要性が明らかとなった。次いで、簡易曝気や汚泥の返送系の復旧は、塩素消毒による大腸菌群の不活化効果やノロウイルス濃度の減少効果の向上に寄与していた。また、生物学的な処理法の復旧により、有機物濃度が減少することで次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を低減でき、より消毒効果が向上するものと考えられた。

キーワード：抗生物質耐性大腸菌、原虫類、ウイルス、浄化槽排水、段階的対策技術

1. はじめに

分子生物学的手法による微生物の同定・検出技術の進展により、感染症の原因究明が比較的容易となり病原微生物に関する知見が集積されてきている。殊に分離・培養が容易ではない細菌やウイルスなどの存在実態が徐々に明らかになるにつれ、これまで衛生学的な指標とされてきた大腸菌群に比較して、その存在実態や消毒耐性等に

関し乖離した状況が課題となっている。また、原虫類や一部のウイルスに関しては、近年になっての集団感染発生や、分子生物学的手法による検出技術の進展により、比較的近年に存在実態が明らかとなったことから新興感染症としての位置づけがなされている。一方、薬剤耐性菌などは抗生物質の利用の増加に伴い耐性能力を拡大する細菌が徐々に蔓延してきている状況から、多剤耐性菌

の存在が再興感染症の一原因であるとして大きな社会問題となっている。

これら新興・再興感染症の原因となる病原微生物に関しては、水環境に及ぼす衛生学的な観点から環境水を含め下水処理場等において、その実態把握のため調査・研究は徐々に行われているが、他にも汚染源と推定されるポイント、ノンポイント負荷源は存在しており、実態把握の遅れから対策技術の構築には繋がっておらず、公共用水域に対する汚染の原因ともなっている。このため、公共用水域の衛生学的な安全性を担保する上で、汚染源の実態把握やその汚染源に対する対策技術の構築は重要である。

本研究では上記の要請を踏まえ、利用形態に応じた公共用水域の安全性を確保するため、その基本となるリスク評価に資するべく、下水や水環境中における新興・再興感染症としての病原微生物である原虫類、ウイルス、薬剤耐性菌の汚染実態を解明する。汚染実態の解明とともに、対策技術として今まで明らかとなっていない生物学的高度処理法等によるこれらの病原微生物の除去要因の解明を行う。その結果を基に汚濁負荷の観点から適切な水環境保全システムとしての対策技術を構築するものである。

特に薬剤耐性菌に関しては、スーパー耐性菌と称される細菌の存在が大きな社会問題となっていることから、存在実態の把握とともに、その存在状況によっては、下水処理場を含めた排水処理施設での適切な対策の構築を早急に実施する必要がある。

本研究で対象としている病原微生物は抗生物質耐性大腸菌、クリプトスポリジウム、ジアルジア、ノロウイルス(NV)とした。23年度は本研究課題の初年度にあたるため、実態把握を主に実施したが、下記2)に関わる項目として、東日本大震災により壊滅的な被害を受けた下水処理場を対象に、段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価を重点的に実施した。

- 1) 下水や環境水における新興・再興感染症としての病原微生物である原虫類、ウイルス、薬剤耐性菌の実態解明
- 2) 生物学的高度処理法による除去率向上要因の解明と消毒法による効果の検討

2. 研究目的および方法

2.1 下水や環境水における新興・再興感染症としての病原微生物である原虫類、ウイルス、薬剤耐性菌の実態解明

2.1.1 抗生物質耐性大腸菌の実態

抗生物質の利用増加や開発が繰り返され、複数の抗生物質に対して耐性を有する多剤耐性菌の存在が社会的に大きな問題となっている。殊に、複数の抗生物質に耐性を有する多剤耐性菌の1つであるスーパー耐性菌と称される細菌は、切り札と称される抗生物質に耐性を有することから、臨床分野等においても大きな脅威となっている。

一方、微生物混在系としての下水処理場においても耐性菌の実態調査は行われており、多剤耐性株の存在¹⁾や耐性遺伝子の検出報告例²⁾がある。特に、下水処理場へスーパー耐性菌の流入がある場合には、微生物混在系としての活性汚泥中において、ニューデリー・メタロ-β-ラクタマーゼ1(NDM-1:カルバペネムを含む広域β-ラクタム薬を分解する酵素)に代表される耐性遺伝子の伝播により他の細菌に対し多剤耐性能力を付与することが危惧される。海外においてNDM-1の遺伝子を保持した細菌の実態について、水道を含む環境水での検出事例³⁾もあり、抗生物質の消費大国である我が国においても、その実態解明を早急に実施する必要があると考えられる。

本研究課題では、まず、スーパー耐性菌を含めた多剤耐性菌の実態把握を目的に、下水道へ排出される病院排水を対象に、その存在状況について評価を行った。病院排水は、関東圏内にある比較的大規模なF病院を対象とし、排水中に含まれる大腸菌の抗生物質感受性試験により評価を行った。大腸菌の検出はクロモカルト培地による平板培養法とし、検出された各々の大腸菌の典型コロニーを釣菌、その培養液を平板に固めた寒天培地上に塗布し、平板上に抗生物質の含有されたディスクを置いた。この平板を35℃で16~18時間培養の後、平板上に形成された阻止円の直径を測定し耐性、感受性の判定を行った。対象抗生物質はカルバペネム系の代表的な抗生物質であるイミペネム(IPM)以外に、アンピシリン(ABPC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム(ST)、セフジニル(CFDN)、テトラサイクリン(TC)、レボフロキサシン(LVFX)の8種類とした。抗生物質含有ディスクはKBディスク(栄研化学)を利用し、感受性試験の判定基準などはKBディスクの手引きを参照した⁴⁾。

2.1.2 浄化槽排水負荷の影響を受ける河川調査

公共用水域に対する病原微生物の負荷源はポイント、ノンポイント負荷として様々なものが存在する。本研究においては、これら負荷源の病原微生物の実態を明らかにするとともに、その対策手法の構築、評価を行うもの

である。その中でも汚水処理人口に占める浄化槽の処理人口は比較的多いため、浄化槽排水が公共用水域に及ぼす影響評価が必要であると考えられるが、その実態については未解明である。

このため、浄化槽排水の影響を受ける河川を対象とした病原微生物の実態把握を目的に、NV、原虫類の存在実態を評価した。

調査対象河川はB県内にあるC、D、Eの3河川とした。これらの3河川の流域は、下水道整備未普及地域であるものの一部の排水を単独・合併浄化槽により処理している地域が含まれる。調査対象とした河川の流域における浄化槽設置数等を表-1に示す。住戸数の約30%が浄化槽を設置しており、設置数と戸数平均人数から推定される浄化槽人口は約110~220人である。また、当該流域内における浄化槽設置施設は小学校等があり、D、E、C河川流域の順で人口負荷が多い。調査は感染性胃腸炎の流行期である1~2月下旬の間に、これらの浄化槽排水の影響を受ける3河川を対象に4時間間隔で24時間採水を2回実施した。

表-1 影響戸数と浄化槽設置数

	住戸数	浄化槽設置数	浄化槽推定人口(人)	その他流域内浄化槽設置施設(人)	浄化槽推定人口計(人)
C河川	約 210戸	約 60戸	約220	-	約220
D河川	約 120戸	約 30戸	約110	小学校等(約330人)	約440
E河川	約 240戸	約 60戸	約220	保育園(約60人)	約280

原虫類の測定は、試料をポリカーボネート製メンブランフィルターによるろ過濃縮後、超音波処理によりフィルターからオーシスト(シスト)を剥離させ免疫磁気ビーズ法で回収し、蛍光抗体染色を行った。免疫磁気ビーズはダイナル社製のダイナビーズ GC-コンボキット、蛍光抗体染色にはイーグステインを用い、染色したプレパラートを落射蛍光微分干涉顕微鏡にて観察・定量を行った。なお、原虫類の測定試料は4時間毎の24時間採水の6試料を混合したものである。

NVの測定は、安定した定量値を得るため試料の濃縮はポリエチレングリコール(PEG)沈殿法とした。PEG沈殿法では、試料中にPEG#6000(終濃度8%)およびNaCl(終濃度0.4M)を添加・攪拌し完全に溶解させ、4℃で1夜静置の後、10,000×Gで30分間遠心分離し沈渣を回収した。この沈渣をRNase-free水(遺伝子分解酵素を除去した水)に再浮遊させてウイルス濃縮液とし、濃縮液中のウイルスは、リアルタイムPCR法により定量⁵⁾を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液からQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN社)の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出したRNAに

微量に含まれているDNAを除去するためDNaseI処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit(QIAGEN社)でウイルスRNAを精製した。上記で抽出したウイルスRNA試料0.5µgをランダムプライマー、Omniscript RT Kit(QIAGEN社)を用い全量20µLの系で逆転写反応を行いcDNAを作製し2µLをリアルタイムPCRに供した。NVの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」⁶⁾に準じた。リアルタイムPCR反応のための試薬はQuantiTect Probe PCR Kit(QIAGEN社)を用い、リアルタイムPCR装置はLightCycler(ロシュ・ダイアグノスティクス社)を使用した。逆転写反応に使用する抽出RNA量はSpectrophotometer(NanoDrop社製)により定量した。なお、ウイルス遺伝子抽出カラムへのウイルス濃縮液の通水量は、検出濃度にバラツキが生じないように抽出カラム1本あたり0.05mg-SSとなるように統一した⁵⁾。

2.2 生物学的高度処理法による除去率向上要因の解明と消毒法による効果の検討

2.2.1 段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価

東日本大震災による津波により、沿岸部に位置する下水処理場は壊滅的な被災を受け処理機能が停止した。また、下水管渠にも広範囲な被害を及ぼしたことから、流下機能の阻害により、マンホール等からの溢水によっても公共用水域を含めた市街地等の衛生学的なリスク上昇要因にもなった。水道を含めた他のインフラ復旧により下水は継続的に流入するため、下水処理場は応急復旧対策により速やかに下水の排除・水質浄化を行う必要がある。壊滅的な被災のため、完全な水処理の実施には長期間を要することから、段階的な対策の実施により公共用水域に対する衛生学的安全性を担保しなければならないが、段階的な対策技術ごとに病原微生物の除去効果が異なると考えられる。

本評価では、下水処理場の水処理機能が被災により停止した場合、病原微生物の除去のために必要な要件を明らかにすることを目的に実施するものである。また、段階的復旧において生じた課題を明確にして、解決策を提案することで、本研究の達成目標の1つである「水環境保全システムとしての適切な対策技術の構築」に繋がると考えられる。

本評価では、壊滅的な被災により水処理機能が停止したA下水処理場を対象に実態調査を実施した。段階的な対策技術として①簡易沈殿処理、②簡易沈殿処理+簡易曝気処理、③簡易沈殿処理+簡易曝気処理+汚泥返送系

の仮復旧の各段階における大腸菌群、NV の除去特性と課題を明らかにすることを目的に、現地調査・実験を実施した。併せて原虫類の流入実態についても把握した。

現地調査・実験方法では、上記の評価項目に加え塩素消毒実験等を行い、大腸菌群等の不活化・除去効果について検討を行った。

各病原微生物の測定法は、大腸菌群数では、デソキシコール酸培地による平板培養法とした。

原虫類、NV の測定法は、上記 2.1.2 に示した手法と同様である。

その他の水質測定項目は、水温、pH、DO、ORP、濁度は多項目水質計により、SS は下水試験方法を準拠、残留塩素は DPD 法により測定した。

3. 研究結果および考察

3.1 下水や環境水における新興・再興感染症としての病原微生物である原虫類、ウイルス、薬剤耐性菌の実態解明

3.1.1 抗生物質耐性大腸菌の実態

入院患者に対する抗生物質の投与により病院排水中には多剤耐性菌の存在割合が高いと推定されるため、下水や環境水の実態把握に先立ち下水道へ排出される病院排水を対象に、抗生物質耐性大腸菌の存在状況を調査した。調査対象とした病院排水は、関東圏内にある比較的大規模な F 病院である。ここからの排水を複数回採水し、その試料中の大腸菌コロニーについて抗生物質感受性試験を行った。

試験結果を図-1、2に示す。供試株数は333株であり、その内、8剤の抗生物質に対して耐性が無いと評価された株は44株であった。1剤のみに耐性を示した株は115株であるが、その内 ABPC に耐性のあるものは62株であった。2剤以上の抗生物質に対し耐性を示した多剤耐性株は174株であり、供試株数の約50%であった。174株の内169株が ABPC に耐性を示しており、多剤耐性株の97%を占めていたことから、多剤耐性株の多くは ABPC に耐性を有することが明らかとなった。また、2株が最大7剤に対し耐性を示した。図-2は各抗生物質に対する耐性株の割合を示したものであり、ABPC に耐性を示す株は約70%と最も高く、次いで、TC が約40%を占めていた。ABPC は1963年、TC は1954年に発売され長期間使用されており⁷⁾、時間の経過が耐性株の増加に繋がったと考えられる。現状において比較的販売量が多いとされる LVFX に関しては⁸⁾、上記2つの抗生物質に比較して耐性株の割合は高くないため、抗生物質販売量と耐性株の存在実態との関係はないようである。

一方、カルバペネム系の代表的な抗生物質の1つである IPM に対しては、耐性を示した大腸菌株は検出されなかった。大腸菌などの腸内細菌科でカルバペネム剤に耐性を示す株が分離された場合には、NDM-1 産生の可能性を考慮する必要があるとされているが⁹⁾、今回の実態調査では検出されなかったため、現状においてはスーパー耐性菌と称される細菌の存在レベルは未だ低いと推定された。今後、下水や環境水などを含め調査対象を挙げ実態把握を行う。

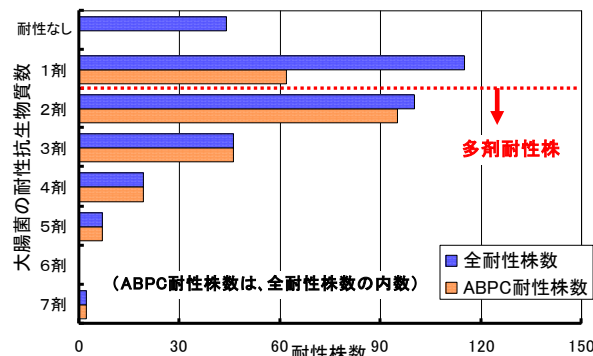


図-1 大腸菌の耐性抗生物質数ごとの検出株数

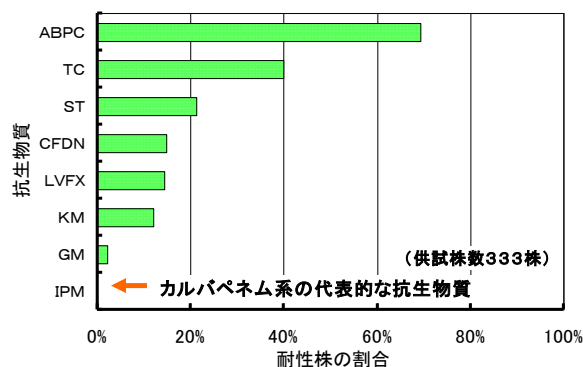


図-2 各抗生物質に対する耐性株の割合

3.1.2 浄化槽排水負荷の影響を受ける河川調査の結果

1月下旬から2月下旬に行った調査結果を図-3~6に示す。C 河川における NVG2 濃度は概ね1月下旬では $10^4 \sim 10^5$ copies/L、2月下旬では $10^4 \sim 10^5$ copies/L、E 河川では同様に1月は $10^5 \sim 10^6$ copies/L、2月は $10^4 \sim 10^5$ copies/L、D 河川は $10^4 \sim 10^5$ copies/L レベルの範囲内で推移しており、2月に比較して1月では1オーダー程度高いことから、胃腸炎感染症の流行状況の影響を受けているものと推定された。NVG1 濃度については、NVG2 濃度に比較して全体的に1オーダー程度低い状況にあった。また、各河川の流量状況を図-5、6に示したが、C 河川の流量は他の河川と比較して多いことから、河川水による希釈効果が NV の検出濃度に反映されているものと考えられた。

ここで、河川水量に占める浄化槽排水の割合から排水

中の NV 濃度の推定を行った。水使用量を 1 人にあたり 230L と仮定¹⁰⁾ し、浄化槽利用推定人口を乗じて排水量を求め、河川流量に占める浄化槽排水量の割合から排水の NV 濃度を試算した。試算に利用した NV データは検

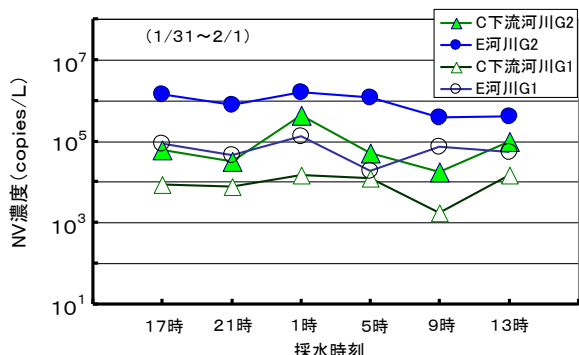


図-3 浄化槽排水の影響を受ける河川水のNV濃度の推移

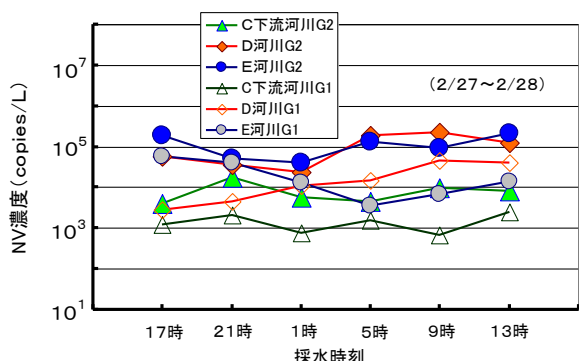


図-4 浄化槽排水の影響を受ける河川水のNV濃度の推移

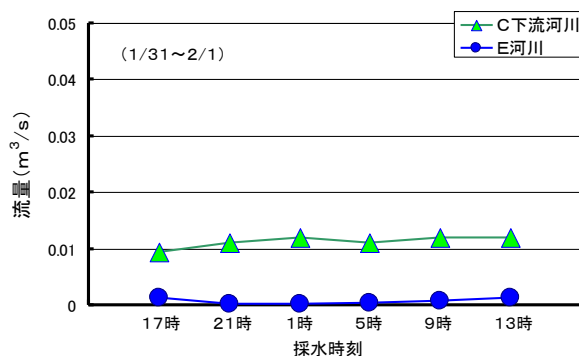


図-5 各河川の流量の推移

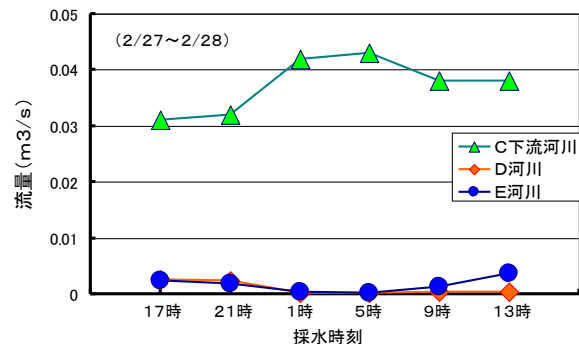


図-6 各河川の流量の推移

表-2 浄化槽排水量の試算と推定ノロウイルス濃度

1/31~2/1	河川流量 (m ³ /日)	浄化槽排水量 (m ³ /日)※	河川流量に占める排水量の割合	割合から推定したNVG2平均濃度 (copies/L)	昼間人口を加え推定したNVG2平均濃度 (copies/L)
C下河川	968	51	0.053	2.3E+06	—
E河川	57	51~55※※	0.89~0.96	1.1E+06	1.0E+06

表-3 浄化槽排水量の試算と推定ノロウイルス濃度

2/27~2/28	河川流量 (m ³ /日)	浄化槽排水量 (m ³ /日)※	河川流量に占める排水量の割合	割合から推定したNVG2平均濃度 (copies/L)	昼間人口を加え推定したNVG2平均濃度 (copies/L)
C下河川	3,223	51	0.016	5.1E+05	—
D河川	86	25~52※※	0.29~0.60	3.8E+05	1.8E+05
E河川	137	51~55※※	0.37~0.40	3.2E+05	3.0E+05

※ 1人230L/日と仮定¹⁰⁾
 ※※ 小学校等の昼間人口として1人230L/日の35%量と仮定¹⁰⁾

出濃度の高い状況にあった G2 とした。試算結果を表-2、3 に示す。浄化槽排水の NVG2 濃度は $10^5 \sim 10^6$ copies/L レベルと試算されたが、既往の調査研究による 1~2 月の下水処理水の NVG2 平均濃度は、通常の活性汚泥法であれば 10^5 copies/L レベル、窒素・りんの高度処理法では 10^4 copies/L レベルであり¹¹⁾、それらと比較して浄化槽排水の NV 濃度はやや高い状況にあった。なお、河川水量に占める浄化槽排水の割合が高い D、E 河川を含め全ての河川水試料において残留塩素は検出されなかった (表-4)。

河川水の SS 濃度と NV 濃度の関係を図-7、8 に示す。河川水の NV 濃度に対する SS 濃度の寄与率は高く、各河川の上流域では浄化槽排水以外に負荷が存在しないことから、浄化槽による SS 除去性能の変動が放流先河川水の NV 濃度に影響を及ぼしているものと考えられた。

次いで、原虫類の調査結果を表-4 に示す。24 時間採水により得られた試料を混合し分析を行ったことから、その水量は 5~30L 程度となった。クリプトスポリジウムについては全ての試料で不検出 (検出限界値 0.03~0.2 oocyst/L; 存在していたとしてもこれらの濃度以下) であるが、1 試料においてジアルジアの検出濃度は 0.54cyst/L であった。

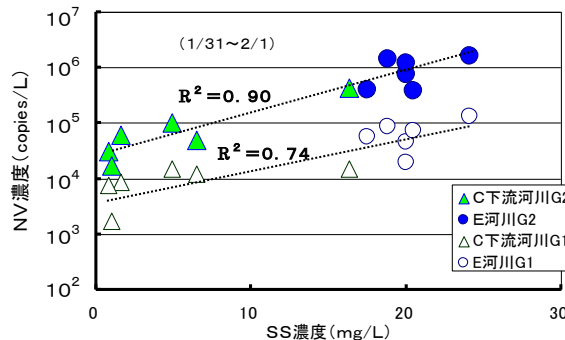


図-7 河川水のSS濃度とNV濃度の関係

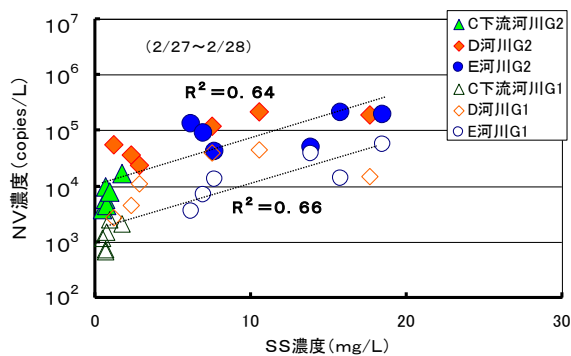


図-8 河川水のSS濃度とNV濃度の関係

表-4 原虫類等の調査結果

対象河川	河川流量に占める 排水量の推定割合	クリプトスポリジウム (oocyst/L)	ジアルジア (cyst/L)	検出限界値 (oocyst/L)	残留塩素濃 度(mg/L)
1月 下旬	C河川	5.3%	N.D.	N.D.	0.06
	E河川	89%	N.D.	N.D.	0.03
2月 下旬	C河川	1.6%	N.D.	N.D.	0.2
	D河川	29%	N.D.	N.D.	0.05
	E河川	37%	N.D.	0.54	0.05

これらの結果から公共用水域における NV、原虫類の排出負荷源は下水処理場に加え浄化槽排水の存在が明らかとなったが、その排水の NV 濃度は下水処理水と比較して高濃度であった。

よって、公共用水域における衛生学的な安全性を担保するには、下水道のみならず他の施策における対応の構築が急務であると考えられた。

3.2 生物学的高度処理法による除去率向上要因の解明と消毒法による効果の検討

3.2.1 段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価

震災により水処理機能が停止した A 下水処理場では、被災直後の簡易沈殿処理による対応から翌年の 2 月の時点では、簡易曝気と返送汚泥系の仮復旧により、堆積汚泥の腐敗防止や酸化促進による有機物等の溶出抑制に努めた段階的な水処理を実施している。本評価では、段階的な対策技術に応じて放流水質が大きく変動すると考えられたため、その病原微生物濃度や消毒効果への影響を明らかにした。

まず、A 下水処理場における原虫類の調査結果を図-9、10 に示す。初沈流出水の 5 試料の内、1 試料からクリプトスポリジウムが、2 試料からジアルジアが検出され、検出濃度は各々 1.5oocyst/L、0.5~1.4cyst/L であった。塩素混和池あるいは終沈流出水からは 3 試料の内、1 試料においてジアルジアが検出され、その濃度は 0.45cyst/L (検出限界値：0.25~0.67 oocyst(cyst)/L) であった。クリプトスポリジウムによる集団感染症発生時には感染者から多量のオーシストが排出されるため、流入下水

の検出濃度・割合が高まると報告¹²⁾ されているが、今回の結果では検出濃度・割合とも低いことから、これらの原虫類が原因となる感染症は発生していないものと考えられた。

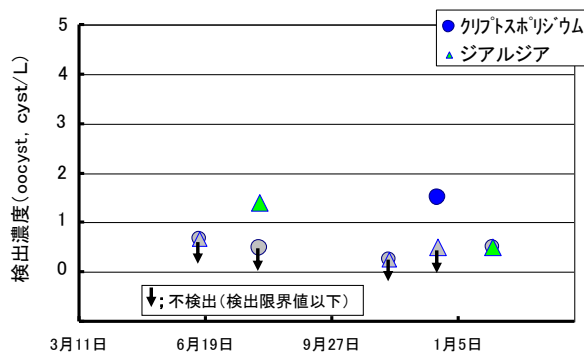


図-9 初沈流出水の原虫類の検出状況

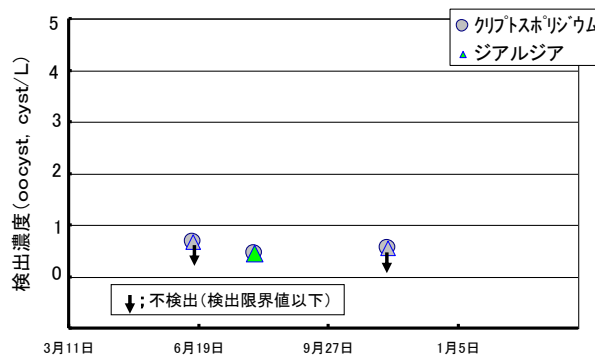


図-10 塩混池 or 終沈流出水の原虫類の検出状況

次いで、段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価結果について図-11~13 に示す。

6 月において簡易沈殿処理を経た塩素混和池での大腸菌群の不活化効果は確認できなかった。次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度は 15mgCl/L であったが、残留塩素は検出されなかった。この調査時に並行して行った消毒実験の結果を図-14 に示す。消毒効果の向上を目的に PAC の添加効果の評価したが、PAC を無添加とした 10mgCl/L のケースにおいて先の実態調査とは異なり、次亜塩素酸ナトリウム 10mgCl/L の添加でも消毒効果が得られた。消毒実験に供した試料は簡易沈殿処理を行って間もない新通水系列の処理水であったが、塩素混和池の試料は新通水系列と震災直後から簡易沈殿処理を行っている系列の混合水であった。各々の最終沈殿池の水質状況を表-5 に示すが、ORP と濁度について大きな違いが見られ、震災直後から簡易沈殿処理を行っている系列では下層の濁度が高いことから下層に汚泥が堆積し、沈殿汚泥の存在により生成された還元性物質が消毒剤を消費したと考えられた。このため、簡易沈殿処理時に

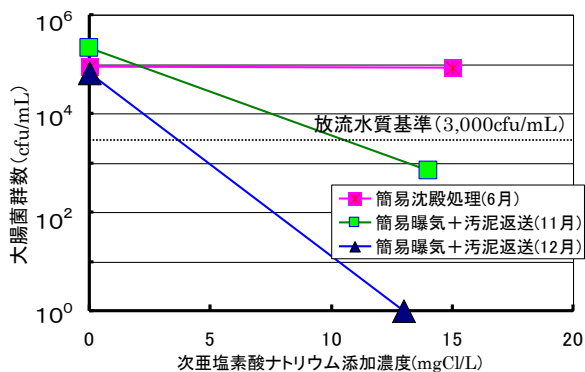


図-11 塩素混和池における大腸菌群の不活化効果

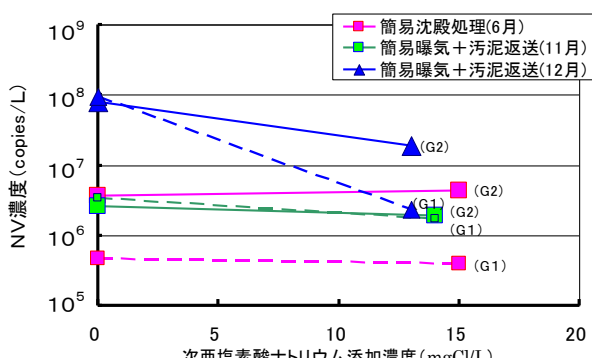


図-12 塩素混和池におけるNV濃度の減少効果

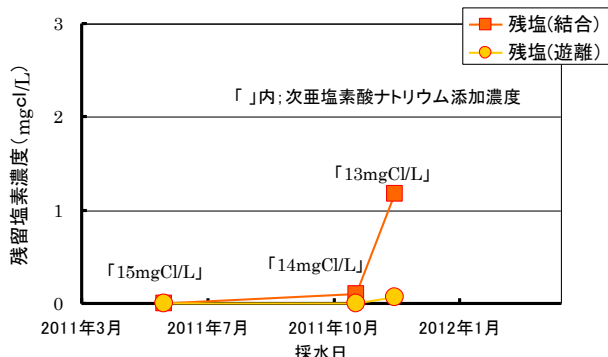


図-13 塩素混和池の残留塩素濃度の推移

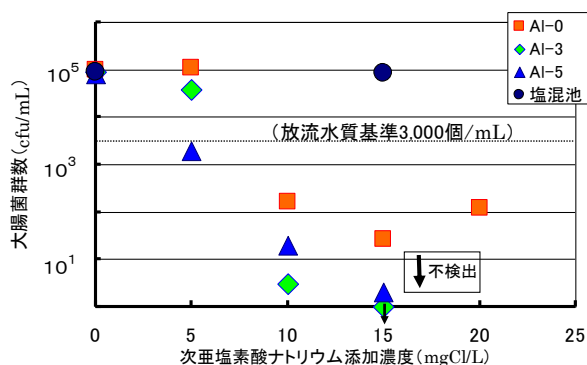


図-14 凝集剤添加濃度条件ごとの次亜塩素酸ナトリウム添加濃度と大腸菌群数の関係(6月)

表-5 各最終沈殿池の水質状況(6月)

試料	項目	DO(mg/L)	ORP(mV)	濁度
新通水系列(表層)		1.0	-129	60
新通水系列(下層)		0.1	-134	65
汚泥堆積系列(表層)		1.2	-203	66
汚泥堆積系列(下層)		0.4	-183	990以上

では、堆積汚泥の引き抜き管理の有無が消毒効果に及ぼす重要な因子であることが明らかとなった。

PACの添加効果の評価では、図-14からわかるように、その添加濃度を高めることで塩素消毒の効果が向上し、5mgAl/L、5mgCl/Lの条件下において大腸菌群数は放流水質基準値以下となった。また、NVに対する評価結果を図-15、16に示すが、PACの添加濃度を高めることで、凝集沈殿によるNVの除去が向上するとともに、次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を高めることで、遺伝子濃度の減少効果が向上した。放流先下流域に利水施設等が存在し、感染リスクの上昇が危惧される場合には、リスク低減手法の1つとしてPACの添加による対応が考えられる。

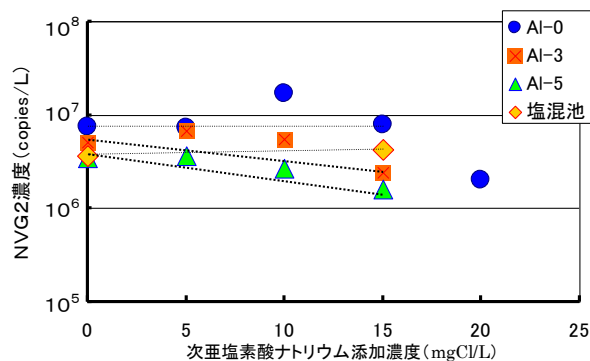


図-15 凝集剤添加濃度条件ごとの次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNVG2濃度の関係(6月)

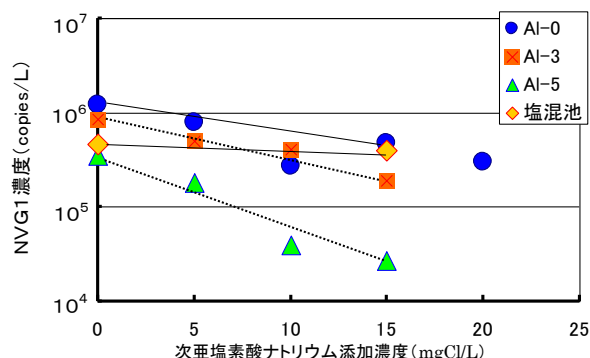


図-16 凝集剤添加濃度条件ごとの次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNVG1濃度の関係(6月)

8月からは簡易曝気処理が開始され、11月からはそれに加え、最終沈殿池の堆積汚泥の腐敗防止や酸化促進による有機物等の溶出抑制を目的に汚泥返送系の仮復旧が行われた。

8月の簡易曝気処理時の塩素消毒実験の結果について図-17に示す。次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を10mgCl/Lとすることで、曝気槽混合水、終沈越流水で放流水質基準以下となり、沈殿処理のみの場合よりも消毒効果が向上した。また、NV濃度による評価結果を図-18、19に示す。消毒前のNV濃度はG2が 10^6 copies/Lレベル、G1が $10^5 \sim 10^6$ copies/Lレベルであった。対象水毎で関係直線の傾きが異なり、曝気処理を行うことでNV遺伝子残存率の最大値が得られているため、NV遺伝子に及ぼす塩素消毒の影響が強く反映されるものと考えられた。図-20には塩素消毒実験時における処理段階ごとのORPと残留塩素濃度の関係を示した。曝気による還元状態の改善はORPの向上とともに塩素の残留性向上に寄与しており、上記の消毒実験の結果を裏付けていた。

さらに、11月以降においては簡易曝気に加え汚泥返送系の仮復旧により、次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を減少させても塩素混和池において残留塩素濃度が上昇し(図-13)、併せて大腸菌群の不活化効果やNV遺伝子の減少効果が向上した(図-11、12)。

段階的な対策技術により、塩素消毒による大腸菌群の不活化効果やNV濃度の減少効果は向上したが、NVについては培養系が確立されておらず不活化割合を評価で

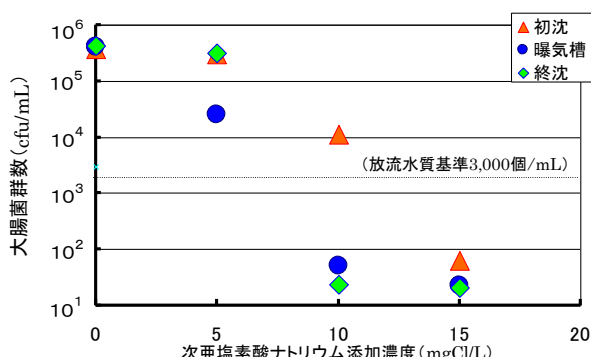


図-17 処理段階ごとの次亜塩素酸ナトリウム添加濃度と大腸菌群数の関係(8月)

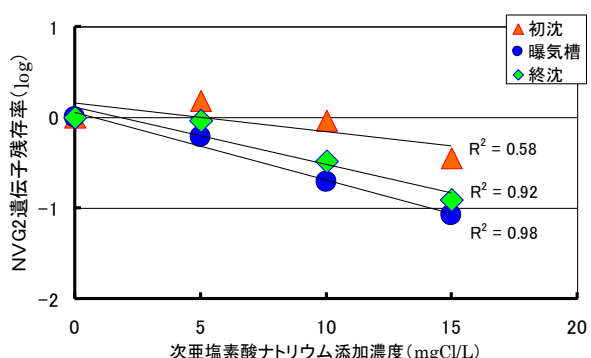


図-18 処理段階ごとの次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNVG2遺伝子残存率の関係(8月)

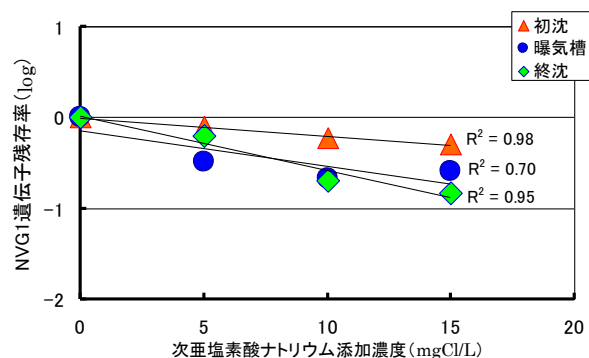


図-19 処理段階ごとの次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNVG1遺伝子残存率の関係(8月)

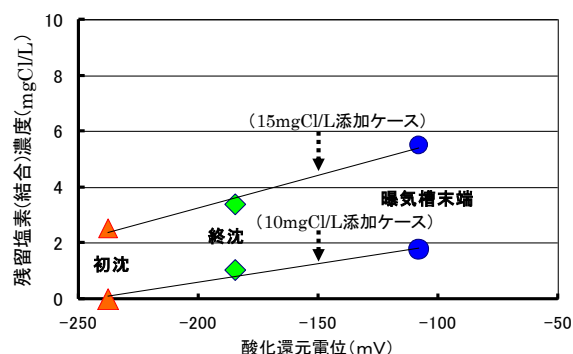


図-20 処理段階ごとの酸化還元電位と残留塩素(結合)濃度の関係

きない課題がある。このため、NV代替指標としてネコカリシウイルス(FCV)の適用に関しての提案¹³⁾があることから平成22年度に、塩素消毒によるFCVの遺伝子減少量と生残率を明らかにすることで、NVの不活化効果を推定した²⁾。その結果、-1 log程度の遺伝子残存率となれば生残率は5~7 log程度低下することが明らかとなっている(図-21)。11~12月におけるNV遺伝子濃度についても0.5~1.5 log程度の減少効果が確認(図-12)されていることから、2~5 log程度の不活化効果が得られているものと考えられた。

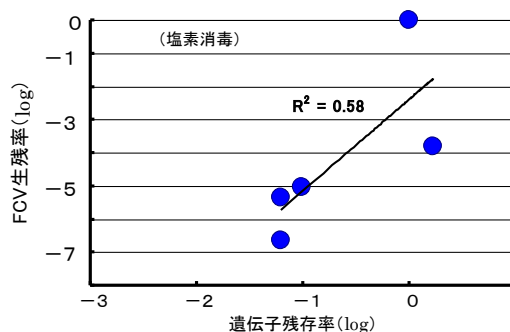


図-21 FCVの遺伝子残存率と生残率の関係²⁾

簡易曝気処理および汚泥の返送系の復旧に至ることができれば、適切な余剰汚泥の引き抜きと曝気風量の管理

により、生物学的な高度処理が可能となる。

ここでは生物学的な高度処理に至る段階として、活性汚泥の生成途上を想定し、処理水質の向上効果が消毒効果に与える影響を回分実験により評価した。生物学的な窒素・りん除去の高度処理を行っている処理場の活性汚泥をMLSS濃度が500mg/L (MLVSS ; 400mg/L) となるよう初沈越流水4Lと活性汚泥1Lを混合した後、曝気混合時間を1~4時間とし、1時間静置沈殿させ、その上澄液に次亜塩素酸ナトリウムを0.6~6mgCl/Lの範囲で添加し大腸菌群数の測定を行った。

実験結果を図-22に示す。有機物濃度の減少効果により次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を3mgCl/Lとしても大腸菌群数は放流水質基準値以下となり、同日に実施した図-17で得られた結果よりも消毒効果が向上した。活性汚泥処理により還元性物質(硫化物や有機物)が分解あるいは吸着されることで、消毒剤の消費が抑制されたものと考えられた。また、次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度とNV遺伝子残存率の関係を図-23、24に示す。同日に実施した図-18、19の実験結果と比較すれば、次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度が低いため、遺伝子残存率の顕著な変化は少なく若干のバラツキがあるが、曝気混合時間毎で減少直線の傾きが異なっている。曝気混合時間が長時間となることで、次亜塩素酸ナトリウムが遺伝子の残存率に及ぼす影響が大きくなる傾向が示された。

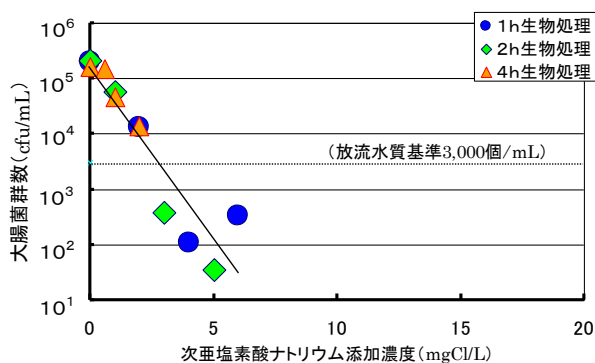


図-22 次亜塩素酸ナトリウム添加濃度と大腸菌群数の関係

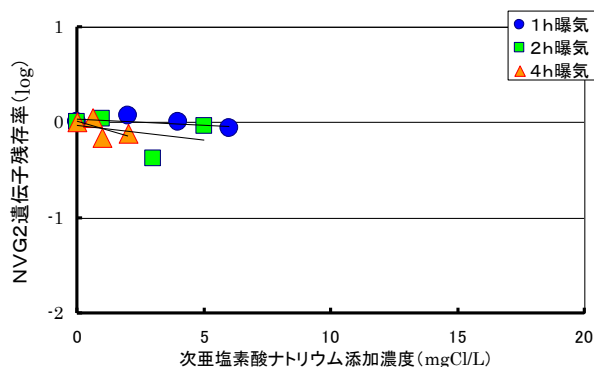


図-23 次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNVG2遺伝子残存率の関係

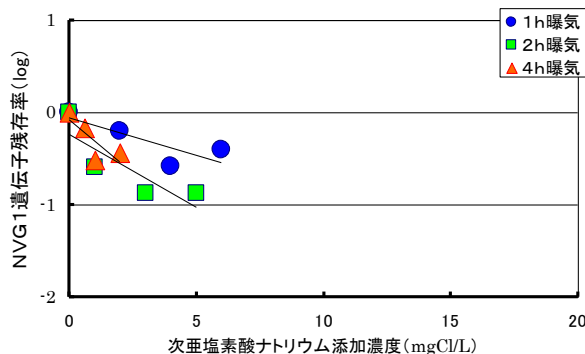


図-24 次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNVG1遺伝子残存率の関係

以上の調査、実験により得られた段階的な対策技術の評価結果を表-6に示す。簡易沈殿処理では沈殿池に堆積した汚泥の引き抜き管理が消毒効果に及ぼす重要な因子であり、また、簡易曝気や汚泥の返送の実施により消毒効果は向上するが、活性汚泥の生成を目的とした運転条件とすることで、より消毒効果が向上するとともに消毒剤の低減が図られることを明らかにした。

表-6 段階的な対策技術の評価結果

簡易沈殿処理	堆積汚泥の引き抜き管理が重要
簡易沈殿処理+簡易曝気	簡易沈殿処理よりも消毒効果が向上
簡易沈殿処理+簡易曝気+汚泥返送※	汚泥返送系の回復により、さらに消毒効果が向上
簡易沈殿処理+曝気+汚泥返送※※	有機物濃度の減少および消毒剤添加濃度の低減

※ 堆積汚泥の腐敗防止等を目的

※※ 活性汚泥の生成を目的

4. まとめ

23年度は、下水道へ排出される病院排水を主に薬剤耐性菌の実態把握および浄化槽排水負荷源を流域に持つ河川を対象にウイルス、原虫類の実態を把握した。また、東日本大震災により壊滅的な被害を受けた下水処理場を対象に、段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価を重点的に実施した。以下に得られた結果を示す。

「抗生物質耐性大腸菌の実態」

- 1) 多剤耐性大腸菌株の多くはABPCに耐性を有することが明らかとなった。
- 2) 現状における抗生物質販売量と耐性大腸菌株の存在実態との関係は見られなかった。
- 3) カルバペネム系の代表的な抗生物質の1つであるIPMに対して耐性を示した大腸菌株は検出されなかった。

「浄化槽排水負荷の影響を受ける河川調査の結果」

- 4) 公共用水域におけるノロウイルス、原虫類の排出負荷源として、下水処理場に加え浄化槽排水の存在が明らかとなった。
- 5) 浄化槽によるSS除去性能の変動が放流先河川水のノロウイルス濃度に影響を及ぼしているものと考えられ

た。

6) 浄化槽排水の割合が高い河川水でも残留塩素濃度は検出されなかった。

「段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価結果」

7) 簡易沈殿処理時においては、堆積汚泥の引き抜き管理が消毒効果を発揮させるために重要な因子であることが明らかとなった。

8) 簡易沈殿処理水を対象とした PAC の添加効果の評価では、その添加濃度を高めることで塩素消毒による大腸菌群の不活化効果やノロウイルス遺伝子量の低減効果が向上した。

9) 簡易沈殿処理に加え簡易曝気や汚泥の返送の実施により消毒効果は向上するが、活性汚泥の生成を目的とした運転条件とすることで、より消毒効果が向上するとともに消毒剤の低減が図られることを明らかにした。

10) 今回、調査対象とした河川水や下水試料からの原虫類の検出濃度・割合は低いことから、これらの原虫類が原因となる感染症は発生していないものと考えられた。

謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、A 下水処理場、B 県および B 県内の各下水道管理者には特段のご配慮・ご協力を頂いた。また、F 病院排水の採水に協力して頂いた、多くの関係各位に謝意を表します。

参考文献

- 1) M.Suwa, M.Ozaki, (2007), Study of the actual condition of antibiotic resistant bacteria in water environments and wastewater, 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Proceedings, pp.354-355.
- 2) 岡本誠一郎、諏訪守、桜井健介 (2011)、水環境中における病原微生物の消長に関する研究、平成 22 年度下水道関係調査研究年次報告書集。
- 3) T.R.Walsh, J.Weeks, D.M. Livermore and M.A. Toleman (2011) Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study, Lancet Infect Dis., 11, 355-362.
- 4) 細菌感受性試験用、KB ディスク栄研手引き。
- 5) 諏訪守、岡本誠一郎、尾崎正明、陶山明子 (2009) 、下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響、下水道協会誌論文集、46(561)、91-101。

6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2007)、ノロウイルスの検出法について。

7) 橋本一、井上松久 (1993) 病原菌の薬剤耐性機構の解明とその対策一、学会出版センター。

8) 八十島誠、山下尚之、中田典秀、小森行也、鈴木穰、田中宏明 (2004) 下水処理水中に含まれるレボフロキサシン、クラリスロマイシンの分析と藻類生長への影響、水環境学会誌、27(11)、707-714。

9) 日本感染症学会、多剤耐性菌情報-NDM-1 および NDM-1 産生菌の特徴、<http://www.kansensho.or.jp/mrsa/100908ndm-2.html>。

10) (社)日本下水道協会(2008) 流域別下水道整備総合計画調査指針と解説。

11) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介 (2010)、ノロウイルスの除去率に及ぼす下水処理法の影響因子、下水道協会誌論文集、47(571)、103-111。

12) 諏訪守、鈴木穰、尾崎正明(2007) 、クリプトスポリジウム集団感染発生地域の下水処理場におけるオーシストの実態、下水道協会誌論文集、44(538)、151-160。

13) Antimicrobials Division U.S.EPA, CONFIRMATORY VIRUCIDAL EFFECTIVENESS TEST, Using Feline Calicivirus As Surrogate for Norovirus.

STUDY FOR THE DEVELOPMENT OF COUNTERMEASURES AGAINST PATHOGENIC MICROORGANISMS IN WATER ENVIRONMENTS

Budget: Grants for operating expenses

Research Period: FY2011-2015

Research Team: Materials and Resources Research Group (Recycling Team)

Authors: UCHIDA Tsutomu, SUWA Mamoru, SAKURAI Kensuke

Abstract: In recent years, outbreaks of water-borne diseases have become a public health problem in Japan. The actual situation of the pathogenic microorganisms in water have been clarified by using new measurement techniques employing gene technology, but much remains to be done to prevent the occurrence of water-borne infectious disease. In particular, it is necessary to identify the pollution sources of pathogenic microorganisms in public water bodies and to develop countermeasures.

The aim of this study was to clarify the situation of pathogenic microorganisms related to emerging and re-emerging infectious diseases which threaten the safety of public water bodies, and to develop technologies to counter the pathogenic microorganisms.

The results were as follows: Large quantities of *E. coli* possessing multi-drug resistance including ampicillin resistance were detected in hospital wastewater before being discharged to sewerage. However, *E. coli* having resistance to imipenem was not detected.

The treated effluent of the septic tank was confirmed as the source of norovirus and protozoa to the public water body. Stepwise restoration of the wastewater treatment plant damaged by the Great East Japan Earthquake was evaluated in terms of the effluent water quality. The effect of chlorine disinfection and removal of the pathogenic microorganisms differed according to the restoration level of the countermeasures technologies.