

## 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。

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を明らかにするとともに、浄化槽排水負荷源を流域に持つ河川を対象にウイルス、原虫類の実態を明らかにした。

また、ノロウイルスの検出感度の向上を目的に、測定試料の水質性状や試料希釈がノロウイルスの定量値に及ぼす影響を評価した。

さらに、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、段階的な復旧対策技術による病原微生物の除去効果や塩素消毒による不活化効果の改善を評価した。

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、実態把握のため調査・研究が行われているが、他の汚染源と推定されるポイント、ノンポイント負荷源について実態把握が遅れており、全体的な対策技術の構築には繋がっていない。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。

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。24年度は23年度に引き続き下記1)～3)の項目を実施したが、3)では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、段階的な復旧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) 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

### 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<sup>1)</sup>や耐性遺伝子の検出報告例<sup>2)</sup>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が付与され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<sup>3)</sup>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、耐性菌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A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°C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<sup>4)</sup>。

### 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、これら負荷源における病原微生物の実態を

明らかにするとともに、対策手法の構築、評価を行うものである。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、浄化槽排水の影響を受ける河川における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 (D、Eは水路) とした。これらの3河川の流域には、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4~6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水路	約120戸	約30戸	約110	小学校等(約330人)	約440
E水路	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ジーステインを用い、染色したプレパラートを落射蛍光微分干渉顕微鏡にて観察・定量を行った。なお、原虫類の測定試料は4~6時間毎の24時間採水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°C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<sup>5)</sup>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 0.5 $\mu$ g をランダムプライマー、Omniscrypt RT Kit (QIAGEN 社) を用い全量 20 $\mu$ L の系で逆転写反応を行い cDNA を作製し 2 $\mu$ L 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」<sup>6)</sup> 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・ダイアグノスティックス社) 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<sup>5)</sup>。

## 2.2 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

分子生物学的手法の進展により従来、培養が困難であった細菌やウイルスなどの定量が可能となってきている。特に、細胞培養法による評価が困難である腸管系ウイルスの定量には、リアルタイム RT-PCR 法が主に用いられている。試料の濃縮、遺伝子抽出・精製、逆転写、PCR 反応とした定量工程では最終的には  $\mu$ L 系の試験操作となるため、濃縮精製試料の極一部量の評価となる。評価対象とするウイルスが試料中に高濃度に存在すれば、安定した PCR 値が得られるが、環境水や高度に処理されたウイルス低濃度試料を対象とした場合、定量値のバラツキが大きくなる可能性がある<sup>7)</sup>。また、遺伝子抽出カラムへの濃縮試料の SS 負荷量等の適正化を図る必要性があり、測定対象試料の水質性状の違いによって定量値に影響を及ぼす可能性が指摘されている<sup>5)</sup>。下水処理水の再生水利用や放流先水域における衛生学的安全性のリスク評価にあたっては、極低濃度のウイルス試料を対象とすることから、安定した定量値を得るための手法を開発する必要がある。

このため、極低濃度試料に対応した濃縮・定量技術の開発を目指し、24 年度には水質性状が異なる試料を用いノロウイルスの定量値に及ぼす影響を把握することで定量値向上のための方策を評価した。

評価対象試料には、低濃度試料として各種高度処理水を、また、比較対象に流入下水を利用したが、水質性状の違いをより明確にするため、各々の試料をミリ Q 水で希釈した。基本的な定量法は 2.1.2 と同様であるが、逆転写反応に利用する RNA 量を変動させ、さらに、試料を

希釈することで RNA 抽出カラムに対する SS 負荷量は 0.05mg-SS/カラム以下となった。

## 2.3 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

### 2.3.1 段階的な復旧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が及び、流下機能の阻害によりマンホール等からの溢水が発生したことから、公共用水域を含めた市街地等の衛生学的なリスクが上昇した。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、段階的な復旧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。

本研究は、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した。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。

本研究では、壊滅的な被災により水処理機能が停止した F 下水処理場を対象に、段階的な復旧対策技術として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、④活性汚泥生成の各段階における大腸菌群、NV の除去・塩素消毒特性と課題を明らかにすることを目的に、23~24 年度にかけ現地調査・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。

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A病院である。ここからの排水を23~24年度にかけ複数回採水し、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。

耐性大腸菌の検出結果を図-1に示す。供試株数は722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202株であった。1剤のみに耐性を示した株は216株であるが、その内ABPCに耐性のあるものは126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304株であり、供試株数の約40%であった。304株の内292株がABPCに耐性を示しており、多剤耐性株の96%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、3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60%と最も高く、次いで、TCが約30%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<sup>8)</sup>、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<sup>9)</sup>、上記2つの抗生物質に比較して耐性株の割合は約15%と高くはないため、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<sup>10)</sup>、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拡げ実態把握を行う。

### 3.1.2 浄化槽排水負荷の影響を受ける河川調査の結果

23~24年度にかけ1月下旬から2月下旬に行った調査結果を表-2~4に示す。表-2は河川流量に占める浄化槽排水量の推定割合を示したものであり、水使用量を1人あたり230Lと仮定<sup>11)</sup>し、浄化槽利用推定人口(表-1)を乗じて排水量を算出した。調査対象河川の中で比較的河川流量の多いC河川では、河川流量に占める浄化槽排水量の推定割合は数%程度、D、E水路では流量状況により概ね20~90%で推移していた。

表-3は各河川水のNV濃度の測定結果を基に、推定浄化槽排水量から試算した浄化槽排水のNV濃度を示した。概ね $10^4 \sim 10^6$ copies/Lの範囲内で推移していたが、23年度はNVG2はNVG1と比較して検出濃度が高いのに対し、24年度は異なった傾向であることから、調査対象地域の流れ状況の影響を受けているものと推定された。一方、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・りん的高度処理法では $10^4$ copies/Lレベル<sup>12)</sup>であり、それらと比較して浄化槽排

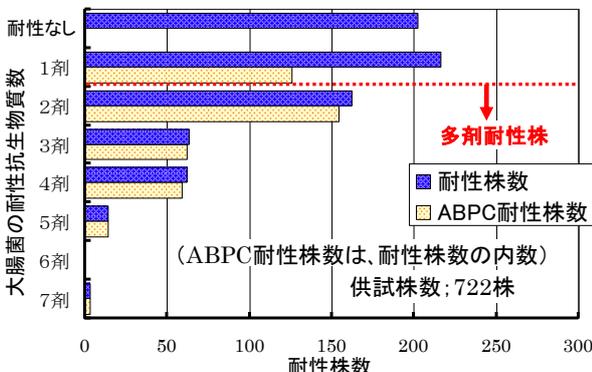


図-1 大腸菌の耐性抗生物質数ごとの検出株数

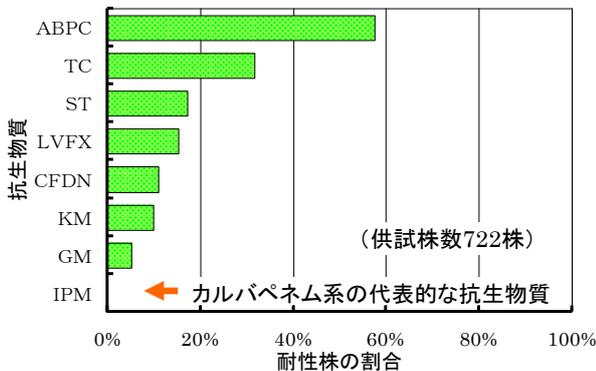


図-2 各抗生物質に対する耐性株の割合

表-2 河川流量に占める浄化槽排水量の推定割合

調査時期と対象河川	河川流量 (m <sup>3</sup> /日)	浄化槽排水量 (m <sup>3</sup> /日)※	河川流量に占める排水量の推定割合
平成24年 1月下旬	C河川	968	5.3%
	E水路	57	51~55 ※※
平成24年 2月下旬	C河川	3,223	1.6%
	D水路	86	25~52 ※※
平成25年 1月下旬	E水路	137	37~40%
	C河川	1,757	2.9%
平成25年 2月下旬	D水路	156	16~33%
	E水路	101	50~54%
平成25年 2月下旬	C河川	7,322	0.7%
	E水路	69	51~55 ※※

※ 1人230L/日と仮定<sup>11)</sup>

※※ 小学校等の昼間人口として1人230L/日の35%量と仮定<sup>11)</sup>

表-3 推定浄化槽排水量から試算した浄化槽排水のノロウイルス濃度

調査時期と対象河川		NVG2平均濃度 (copies/L)	NVG1平均濃度 (copies/L)	屋間人口を加えたG2平均濃度 (copies/L)	屋間人口を加えたG1平均濃度 (copies/L)
平成24年 1月下旬	C河川	2.3E+06	1.9E+05	—	—
	E水路	1.1E+06	7.6E+04	1.0E+06	7.0E+04
平成24年 2月下旬	C河川	5.1E+05	9.4E+04	—	—
	D水路	3.8E+05	6.9E+04	1.8E+05	3.3E+04
	E水路	3.2E+05	5.9E+04	3.0E+05	5.5E+04
平成25年 1月下旬	C河川	5.2E+03	3.2E+04	—	—
	D水路	3.4E+04	2.7E+05	1.6E+04	1.3E+05
	E水路	4.0E+04	7.0E+04	3.7E+04	6.5E+04
平成25年 2月下旬	C河川	2.4E+05	1.3E+06	—	—
	E水路	1.9E+04	2.4E+04	1.8E+04	2.2E+04

水の NV 濃度レベルは同じか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 水路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。

河川水の SS 濃度と NV 濃度の関係を図-3、4に示す。河川水の NV 濃度は SS 濃度の上昇とともに増加する傾向があり各河川の上流域では浄化槽排水以外に負荷源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3~30L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 0.03~0.2ococyst/L；存在していたとしてもこれらの濃度以下）であるが、ジアルジアの検出濃度は1試料において0.54cyst/Lであった。

表-4 推定浄化槽排水量から試算した浄化槽排水の原虫類濃度

調査時期と対象河川		クリプトスポリジウム (ococyst/L)	ジアルジア (cyst/L)	検出限界値 (ococyst/L)	残留塩素濃度 (mg/L)
平成24年 1月下旬	C河川	N.D.	N.D.	0.06	0
	E水路	N.D.	N.D.	0.03	0
平成24年 2月下旬	C河川	N.D.	N.D.	0.20	0
	D水路	N.D.	N.D.	0.05	0
	E水路	N.D.	0.54	0.05	0
平成25年 1月下旬	C河川	N.D.	N.D.	0.31	0
	D水路	N.D.	N.D.	0.07	0
	E水路	N.D.	N.D.	0.05	0
平成25年 2月下旬	C河川	N.D.	N.D.	0.22	0
	E水路	N.D.	N.D.	0.10	0

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同レベルか高濃度であった。

よって、公共用水域における衛生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 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

NV の検出感度の向上を目的に、測定試料の水質性状が NV の定量値に及ぼす影響を評価した。評価結果を図-5、6に示す。水質性状の違いをより明確にするための希釈倍率は、処理水系試料で1~10,000倍、また、比較対象とした流入下水系では1~20,000倍とし、希釈水にはミリQを用いた。さらに、20μL系での逆転写 (RT) に利用する RNA 量を0.1~1.0μgとした影響評価も加えた。処理水系の試料としては、二次処理水、生物学的高度処理水、膜・オゾン処理水、流入下水系では流入下水、ろ過下水 (GF/Bろ過) を用いた。

処理水系試料の多くは希釈倍率の高まりとともに NV の換算検出濃度（希釈倍率考慮）が上昇傾向を示した。検出濃度が 10<sup>3</sup>copies/L レベルである無希釈試料では、希釈することで換算検出濃度は2~4オーダー程度上昇し 10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup>copies/L となった。また、RNA の逆転写量を0.1~1.0μgとした影響評価でも、同様な傾向が示されるとともに、20μL系において逆転写に利用する RNA 量を0.1μgとすることで他のケースよりも検出濃度が高くなる傾向が示された。

比較対象として流入下水系試料を利用した評価においても処理水系と同様な傾向が示された。検出濃度が 10<sup>6</sup>copies/L レベルである無希釈試料では、希釈により 10<sup>9</sup>

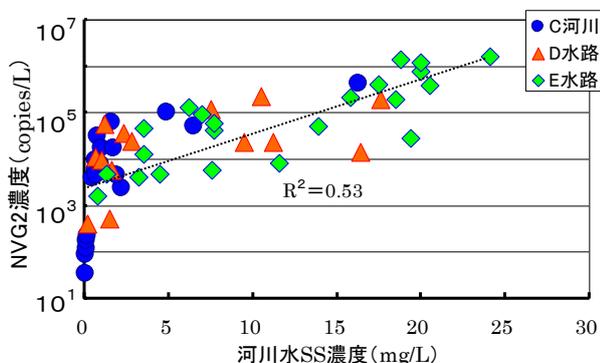


図-3 河川水のSS濃度とNV濃度の関係

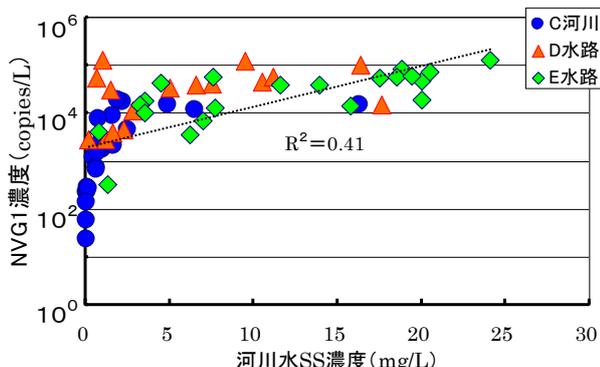


図-4 河川水のSS濃度とNV濃度の関係

copies/L となり、換算検出濃度は 3 オーダー程度上昇した。RNA の逆転写量の影響評価では、希釈倍率が低い場合には 0.5 μg において、希釈倍率が高まることで 0.1 μg とした検出濃度に上昇傾向が見られた。

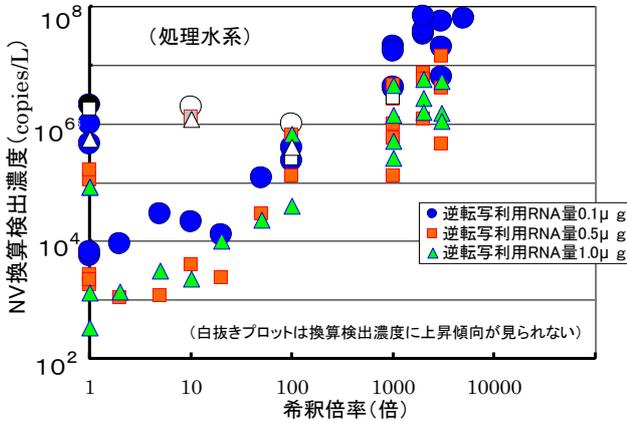


図-5 試料の希釈倍率とNV換算検出濃度

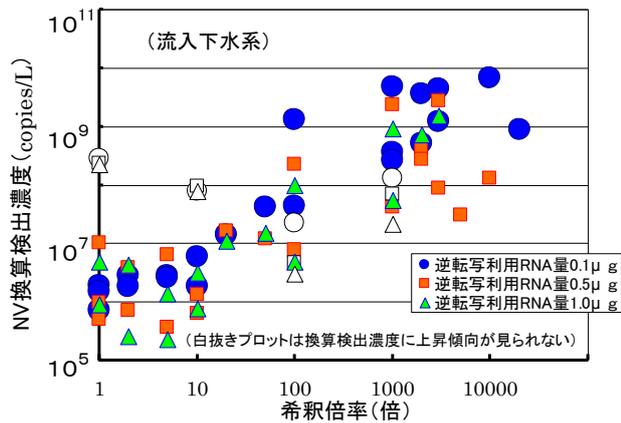


図-6 試料の希釈倍率とNV換算検出濃度

測定試料の希釈による換算検出濃度の上昇要因を推定することを目的に、各試料・希釈倍率毎の RNA の抽出量を評価した。評価結果を図-7 に示すが、試料によっては希釈することで若干の RNA 抽出量の減少が見られたが、希釈倍率に応じた減少量とはなっておらず、希釈倍率が高くても抽出 RNA 量に大きな変化が無いことが確認された。従来、RNA 抽出カラムに対する濃縮試料の SS 負荷量が NV の検出濃度に影響を及ぼすことが確認されている<sup>5)</sup>。今回の評価実験では、試料の希釈によって抽出カラムへの SS 負荷量は極低レベルに抑えられており、それが 1 つの要因となり RNA の抽出阻害が回避されているものと推定される。また、ろ過下水や膜処理水の評価結果においても、希釈倍率に応じて換算検出濃度が上昇していることから、RNA 抽出カラムに対する SS 負荷以外にも溶存物質の影響があるものと推定される。しかし、流入下水系、処理水系ともに 1,000~10,000 倍

程度の希釈によって換算検出濃度の最大値が得られていることから、溶存物質のみが影響を及ぼしているとも考えにくい。

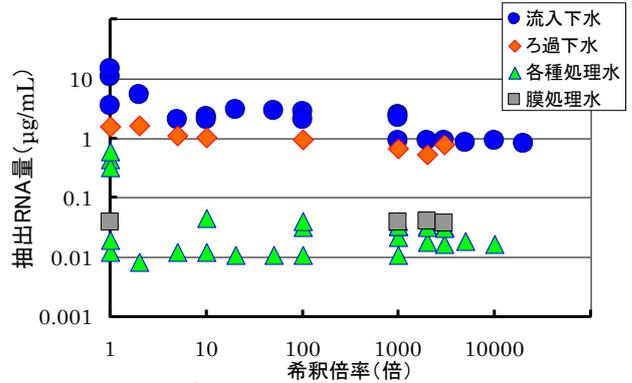


図-7 希釈倍率と試料1mLあたりの抽出RNA量

一部のケースでは希釈により換算検出濃度の大幅な上昇傾向が見られなかったデータもあることから、今後、データの蓄積を図るとともに、濃縮・PCR 反応効率など、他の要因を含めた評価が必要であると考えられた。

### 3.3 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

#### 3.3.1 段階的な復旧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 F 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、簡易曝気、簡易曝気+汚泥返送系の仮復旧、一部分の生物処理復旧を経て、現状では、生物処理法の復旧により、段階的な対策技術としては最終段階に至った。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。24 年度は 23 年度に引き続き F 下水処理場において継続調査を行うことで、簡易沈殿処理から活性汚泥処理に至る段階的な復旧対策技術の評価を実施した。

まず、F 下水処理場における原虫類の調査結果を図-8 に示す。震災後から約 1 年半の間に初沈流出水の 8 試料を測定し 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 1.5 oocyst/L、0.5~1.4 cyst/L (検出限界値: 0.17~0.67 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<sup>13)</sup>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、F 下水処理場の処理区域内において、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。

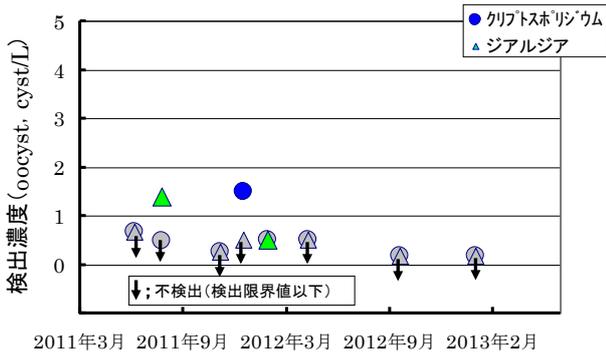


図-8 初沈流出水の原虫類の検出状況

23年度に行った段階的な復旧対策技術による放流水質の改善効果の評価結果では、その初期対応での簡易沈殿処理法については、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、簡易曝気や汚泥返送系の復旧は、塩素消毒による TC の不活化効果や NV 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。

24年度では、簡易曝気+汚泥返送系の復旧に加え、一部の生物処理復旧を経て最終段階である生物処理法の復旧に至っており、それらの評価を主に実施した。

活性汚泥の生成系と簡易曝気+汚泥返送系における処理水質の比較結果を表-5、図-9に示す。活性汚泥生成系と簡易曝気+汚泥返送系の処理水質には違いが見られ、活性汚泥生成系では活性汚泥濃度の上昇と処理に見合う酸素供給により、処理水質が良好であった。

また、各系の処理水質が消毒効果に与える影響評価結果について図-10、11に示す。各系の最終沈殿池の上澄液を用いて評価を行ったが、活性汚泥生成系では簡易曝気+汚泥返送系に比較して、処理水中の TC 濃度が低下するとともに、塩素の消毒効果がより向上しており、1~2mgCl/L 程度とした通常の添加濃度において放流水質基準値以下となった。さらに、NV に関しても活性汚泥生成系では塩素消毒による NV 濃度の減少効果がより向上しており、活性汚泥生成にともなう水質の改善効果は、TC の不活化効果や NV 遺伝子に及ぼす塩素消毒の影響に強く反映するものと考えられた。

表-5 活性汚泥濃度と処理水質

□	活性汚泥濃度	処理水質 (mg/L)	
	MLSS (mg/L)	T-CODcr	SS
活性汚泥生成	1,500	61	8
簡易曝気+汚泥返送	160	301	66

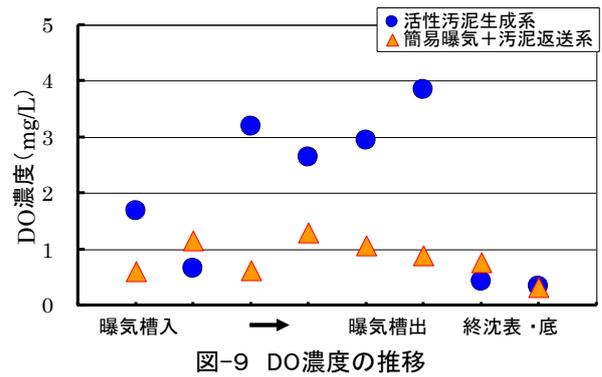


図-9 DO濃度の推移

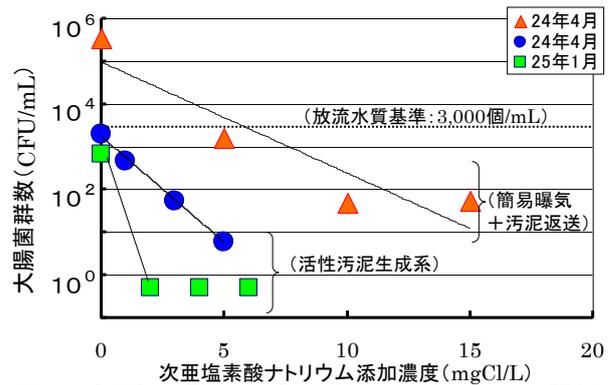


図-10 次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とTC濃度の関係

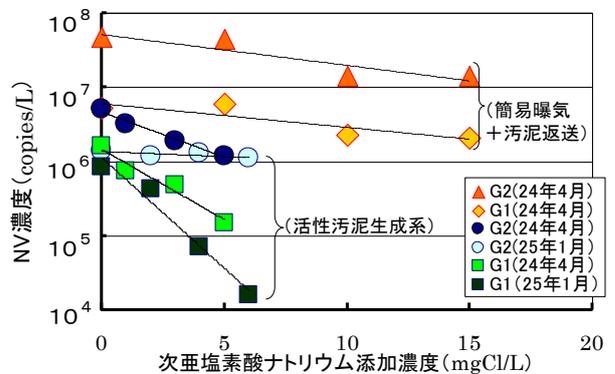


図-11 次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNV濃度の関係

次いで、段階的な対策技術による消毒効果の改善効果の評価として、塩素混和池における次亜塩素酸ナトリウム添加濃度に対する残留塩素濃度の割合とその濃度に対する大腸菌群の不活化率を、23年度の調査結果を含め図-12、13に整理した。震災直後の簡易沈殿処理では、沈殿池下層に堆積した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ことで残留塩素濃度が検出されなかった。その後、震災直後から簡易沈殿処理を行っていた沈殿池の通水を止め、異なる系列の沈殿池利用や、最終沈殿池の堆積汚泥の腐敗防止・酸化促進による有機物等の溶出抑制を目的とした簡易曝気+汚泥返送系の仮復旧が行われたことで、残留塩素濃度の割合は上昇し

た。さらに、活性汚泥生成による処理機能の回復にとともに添加塩素濃度に対して残留する塩素濃度の割合が高まるとともに、残留塩素濃度が上昇することで TC の不活化率が向上した。

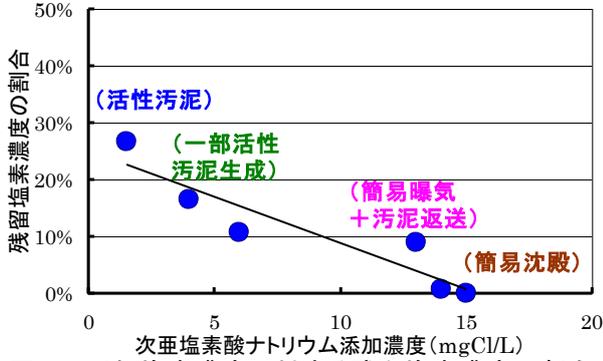


図-12 添加塩素濃度に対する残留塩素濃度の割合

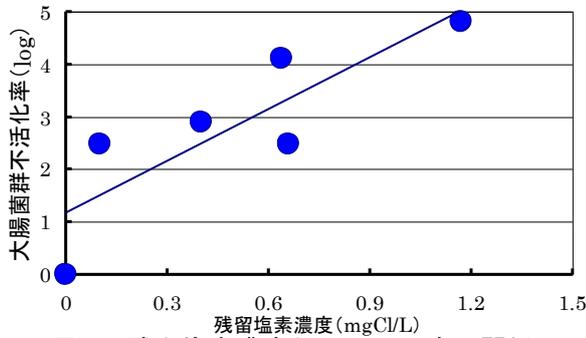


図-13 残留塩素濃度とTC不活化率の関係

生物処理法の復旧により段階的な対策技術としては最終段階に至っており、活性汚泥処理への移行当初における活性汚泥生物相と NV 除去率の関係を評価した。図-14 には活性汚泥生物相に占める活性性生物の割合と NV 除去率の関係を示した。比較のため他の処理場の測定結果を含めてグラフ上にプロットした。ここで、活性性生物とは活性汚泥に出現する微生物の分類<sup>14)</sup>の中で *Aspidisca* や *Vorticella* などの原生動物などを示し、そ

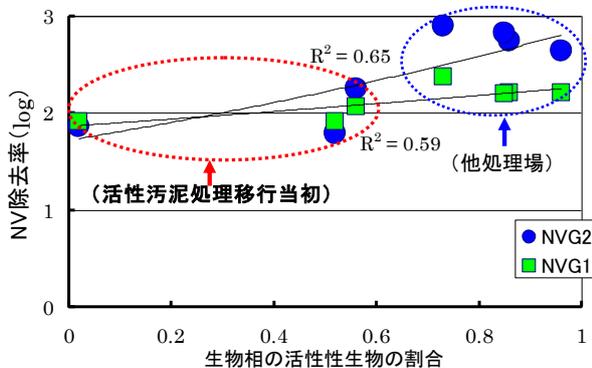


図-14 活性汚泥生物相に占める活性性生物の割合とNV除去率の関係

他の中間汚泥生物や非活性汚泥生物を含めた全体数を計数し、活性性生物の割合を求めた。他の下水処理場における活性汚泥生物相に占める活性性生物の割合は、70%程度~90%以上であるのに対し、F 下水処理場では数%~50%程度と低く、活性汚泥処理による NV 除去率は、活性性生物割合の影響を受けていると考えられることから、活性汚泥処理への移行当初には、NV 除去率が劣ることに留意が必要であると考えられた。

23~24 年度にわたる調査、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。さらに、最終段階としての活性汚泥処理では有機物濃度が減少し、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が、活性汚泥処理への移行当初は生物相が生成途上であることから、NV 除去率が劣ることに留意が必要であ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

段階的な対策技術	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	沈殿処理よりも消毒効果が向上
簡易沈殿処理 + 簡易曝気 + 汚泥の返送 ※	汚泥返送系の仮復旧により、さらに消毒効果が向上
簡易沈殿処理 + 曝気 + 汚泥の返送 ※※	有機物濃度の減少および消毒剤添加濃度の低減
活性汚泥生成による生物処理	活性汚泥処理移行当初は、生物相が生成途上のため安定化を要する

※ 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

24 年度は、23 年度に引き続き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を行うとともに、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、段階的な復旧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。

リスク評価のための極低濃度試料に対応した濃縮・定量技術の開発では、水質性状が異なる試料を用いノロウイルスの定量値に及ぼす影響を把握することで定量値向上のための方策を評価した。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アンピシリン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つであるイミペネム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。

#### 「水質性状がNVの定量値に及ぼす影響を評価」

7) 測定試料の希釈倍率に応じて、ノロウイルスの換算検出濃度が上昇する傾向が見られた。

8) 希釈によって抽出カラムへのSSや溶存物質負荷量は極低レベルに抑えられており、それが1つの要因となりRNAの抽出阻害が回避されているものと推定された。

#### 「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」

9) 段階的な対策技術による処理機能の回復にともない、添加塩素濃度に対して残留する塩素濃度の割合が高まる。

10) 活性汚泥生成にともなう水質の改善効果は、大腸菌群の不活化効果やノロウイルス遺伝子に及ぼす塩素消毒の影響に強く反映するものと考えられた。

11) 活性汚泥処理によるノロウイルス除去率は、活性生物割合の影響を受けていると考えられ、活性汚泥処理への移行当初には、除去率が劣ることに留意が必要であると考えられた。

12) 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、F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、A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) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介(2009) 各種下水処理法によるノロウイルス除去率の評価と測定技術の課題、第12回日本水環境学会シンポジウム講演集、239-240。

8) 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—、学会出版センター。

9) 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。

10) 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>。

11) (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。

12) 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。

13) 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。

14) (社)日本下水道協会(1997) 下水試験方法 (上巻)。

## STUDY FOR DEVELOPMENT OF COUNTERMEASURES TECHNIQUE OF PATHOGENIC MICROORGANISMS IN WATER ENVIRONMENTS

**Budget:** Grants for operating expenses

**Research Period:** FY2011–2015

**Research Team:** Materials and Resources

Research Group

(Recycling Team)

**Authors:** Tsutomu UCHIDA

Mamoru SUWA

Kensuke SAKURAI

**Abstract:** In recent years, outbreaks of water-borne diseases have become a public health problem in Japan. The actual situations of the pathogenic microorganisms in water have been clarified by using new measurement techniques employing gene technology, but still many have to be done to prevent the occurrence of water-borne infectious disease. Most of them, the clarification of the pollution source of the pathogenic microorganisms to the public water body and the development of countermeasures are necessary.

The aim of this study is to clarify the actual situation of the pathogenic microorganisms related to the emerging and re-emerging infectious disease because it threaten the safety of public water body, and the countermeasures technology to cope with the pathogenic microorganisms.

The results are as follows; A lot of *E.coli* possessing multi-drug resistance including ampicillin resistance were detected in hospital wastewater before discharged to sewerage. However, *E.coli* that had the resistance ability to imipenem was not detected.

The treated effluent of the septic tank was clarified as the source of norovirus and protozoa to the public water body.

Stepwise restoration of the damaged wastewater treatment plant by the Tohoku-pacific ocean earthquake was evaluated in terms of the effluent water quality. The effect of chlorine disinfection and biological removal of the pathogenic microorganisms recovered according to the restoration level of the treatment process.

In the evaluation of the determination technology of the norovirus it was presumed that the detection concentration improved when the samples was diluted.