

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：津森ジュン、諏訪守、安井宣仁

【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。しかし現行の水質指標である大腸菌群では、新たな病原微生物の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、汚染レベルや汚染源の特徴に応じた対策手法の構築が望まれている。

25年度は、下水、河川水の大腸菌を対象に、抗生物質の感受性を明らかにするとともに、対策技術の構築の一環として塩素、紫外線による消毒実験を行い抗生物質耐性大腸菌の消毒感受性を評価した。

また、ノロウイルスの検出精度・検出限界の向上を目的に、測定試料の前処理条件などがノロウイルスの定量値に及ぼす影響を評価するとともに、公共用水域への汚濁負荷源の1つと考えられる合流式下水道越流水を対象としたノロウイルスの実態調査から放流先水域への影響を把握した。

キーワード：抗生物質耐性大腸菌、ウイルス、消毒、検出感度向上、合流式下水道

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、これまで衛生学的水質指標とされてきた大腸菌群では、新たな病原微生物の存在実態や消毒耐性等に関し評価が困難であるという課題が明らかになっている。また、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、新興感染症の病原微生物として原虫類や一部のウイルスが位置づけられてきている。さらに、抗生物質の利用の増加に伴い耐性を有する薬剤耐性菌が徐々に蔓延してきている状況から、特に多剤耐性菌が近年の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、水環境に及ぼす衛生学的な観点から河川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、他の汚染源やノンポイント負荷源について実態把握が遅れており、総合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、汚染源の実態把握と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、汚濁負荷削減の観点から適切な水環境保全システム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）としている。25年度は下記の1)～4)の項目について実施した。

- 1) 下水、河川水の大腸菌の抗生物質感受性評価
- 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) 非点源負荷としての合流式下水道越流水が放流先水域へ及ぼす影響把握
- 4) 塩素、紫外線消毒による抗生物質耐性大腸菌の不活化評価

2. 研究目的および方法

2.1 下水、河川水の大腸菌の抗生物質感受性評価

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、切り札とされる抗生物質に耐性を有することから、臨床分野を含め社会的にも重要な課題として対策の構築の必要性が提起されている。

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、多剤耐性菌の存在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性があると考えられる。

本研究課題では、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、23~24 年度にかけ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。

25 年度は評価対象を拡げ下水、河川水について実態調査を行った。下水試料は、関東圏内にある 2 箇所の下水処理場、河川水試料は関東地方と関東以西の 8 河川を対象とし、各試料中に存在する大腸菌の抗生物質の感受性を評価した。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)、スルフアマトキサゾール・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⁾。

2.2 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 μL 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⁵⁾。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⁶⁾。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、25 年度にはノロウイルス濃度が異なる試料を用い、表-1 に示す抽出 RNA の前処理条件による検出精度・限界値の向上評価を行った。

表-1 抽出RNAの前処理条件

図中標記	RNA精製工程;C (回)	逆転写反応;R (回)	キャリアRNA添加量(μg)
従来法	1	1	5.6
C1R1	1	1	4.2
?	?	?	?
C3R2	3	2	4.2

評価対象試料には、低濃度試料として河川水を、また、比較対象に活性汚泥処理水を利用した。ノロウイルスの測定は、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⁶⁾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 100μL の系で逆転写反応を行い cDNA を作製し 10μL をリアルタイム PCR に供した。ノロウイルス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」⁷⁾ 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⁶⁾。

2.3 合流式下水道越流水の影響を受ける河川調査

下水道の普及に早くから取り組んできた一部の自治体においては、下水と雨水の排除を同一の管渠とした合流式下水道を採用している。合流式下水道では降雨時において、雨水量が増加し下水処理場において処理対応が困難になる場合には、未処理下水が公共用水域へ放流されることから、衛生学的な安全性を担保するため合流式下水道越流水の対策技術の構築が必要となる。

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が、本研究においては合流式下水道越流水をノンポイント負荷としてとらえ、これら負荷源における病原微生物としてウイルス汚染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。25年度は対策技術の構築に先立ち、ノロウイルスを対象に胃腸炎感染症の流行期において、降雨時における越流水が河川水へ及ぼす影響を把握した。

2.4 塩素、紫外線消毒による抗生物質耐性大腸菌の不活化評価

現在、多くの下水処理場では放流水質基準値の達成のため、次亜塩素酸ナトリウムなどの薬剤によって大腸菌群を不活化している。消毒による細菌類の不活化では、塩素などの薬剤が細胞膜を通じ細胞に作用するが、紫外線照射では直接的に細胞に作用する違いがある。抗生物質に対する細菌の耐性機構は多岐にわたるが⁸⁾、細胞内への薬剤浸透阻止や浸透した薬剤の排出能力を有した抗生物質耐性菌は、塩素に対しても同様な耐性機能を発現する可能性が推定される。

このため、病原微生物リスク対策技術の構築の一環として、抗生物質耐性大腸菌に対し有効な消毒法の評価を目的に塩素、紫外線消毒による不活化効果を把握した。塩素消毒実験では、A 下水処理場の二次処理水に次亜塩素酸ナトリウムを 0～4mgCl/L の範囲で添加、接触時間を 15 分間とし、チオ硫酸ナトリウムで中和を行った。紫外線消毒は、B 下水処理場の紫外線消毒施設における消毒前後水を採水した。紫外線装置は中圧タイプのもので接触時間は数秒であった。各消毒条件によって得られた試料の大腸菌の抗生物質感受性評価は、上記 2.1 と同一である。

3. 研究結果および考察

3.1 下水、河川水の大腸菌の抗生物質感受性評価

抗生物質耐性大腸菌の検出結果を図-1、2に示す。供試株数は下水試料で 588 株、河川水試料で 1,228 株とした。その内、下水試料では評価対象とした 8 剤の抗生物質に対し耐性が無いと評価された大腸菌株は 332 株であった。1 剤のみに耐性を示した株は 154 株であるが、その内 ABPC に耐性のあるものは 81 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大腸菌株は 102 株であり、供試株数の約 20% を占めていた。102 株の内 89 株が ABPC に耐性を示しており、多剤耐性大腸菌株の約 90% を占めていた。また、5 株が最大 5 剤に対し耐性を示した。河川水試料では、耐性が無いと評価された株は 554 株、1 剤のみに耐性を示した株は 363 株であるが、その内 ABPC に耐性のあるものは 183 株であった。多剤耐性大腸菌株は 311 株であり、供試株数の 25% を占め、311 株の内 271 株が ABPC に耐性を示しており、多剤耐性大腸菌株の約 90% を占めていたことから、下水試料と同様に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。さらに、4 株が最大 6 剤に対し耐性を示した。

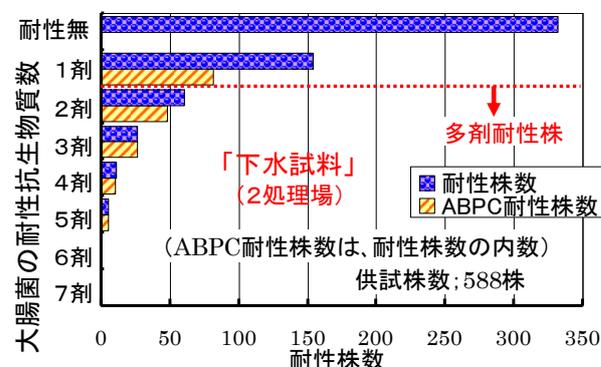


図-1 大腸菌の耐性抗生物質数ごとの検出株数

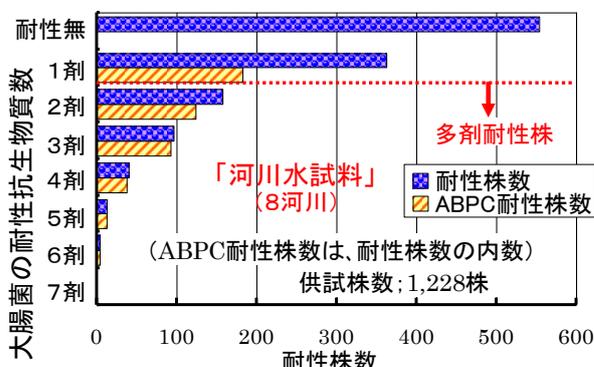


図-2 大腸菌の耐性抗生物質数ごとの検出株数

23~24 年度に実施した病院排水の評価結果と比較したものを表-2 に示す。8 剤の抗生物質に対し耐性を有しない大腸菌株の割合は病院排水で約 30%、下水、河川水では約 50%であり、また、多剤耐性大腸菌株の割合は下水、河川水に比較して病院排水では約 2 倍高いことから、病院排水の管理は重要な課題であると考えられた。一方、多剤耐性大腸菌株の内 ABPC に耐性を有する株の割合は各試料間で 87~96%を占めており、大差が見られなかった。このことは、ABPC に耐性を有する大腸菌株の検出によって、多剤耐性大腸菌株の存在を把握できる可能性が高いことを示唆するものである。

表-2 各試料中の抗生物質耐性大腸菌の実態

試料	項目	供試株数	耐性無割合(%)	多剤耐性割合(%)	ABPCを含む多剤割合(%)
病院排水		722	28.0	42.1	96.1
下水試料		588	56.5	17.3	87.3
河川試料		1,228	45.1	25.3	87.1

さらに、河川水に大きな影響を及ぼすと考えられる放流水の影響有無を評価するため、同一河川の上下流ごとに耐性大腸菌株の割合を整理した。対象は8河川の内C、Dの2河川であったが、放流水の影響が無い上流試料では耐性大腸菌株の割合が約30~39%であるのに対し、下流試料は44~56%に上昇した。また、多剤耐性大腸菌株では同様に約4~11%に対し21~26%と大きく上昇しており、河川水に対して下水処理場の放流水の影響が考えられたが、特に多剤耐性大腸菌株の割合の上昇が顕著であった(図-3)。現在の下水処理場の放流水質基準は大腸菌群数 3,000 CFU/mL 以下であることから、今後、多剤耐性大腸菌の汚染防止のためには基準値の見直しを考慮する必要がある。

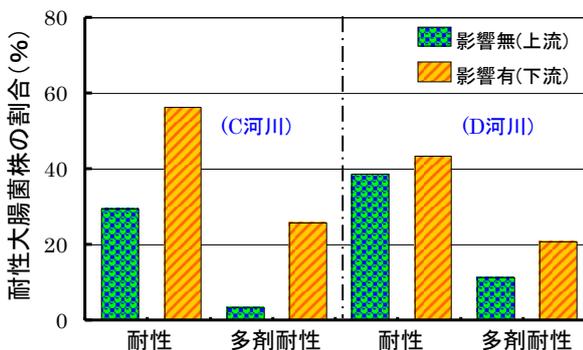


図-3 放流水の影響有無による耐性菌株の割合

図-4、5 は下水、河川水の各抗生物質に対する耐性大腸菌株の検出割合を示したものであり、下水、河川水とも ABPC に耐性を示す株が最も高く約 30~40%を占め、

次いで、TC であった。23~24 年度に実施した病院排水調査でも ABPC に耐性を示した株の検出割合が最も高く、各抗生物質に対する耐性株の検出傾向は同様であった。ABPC は 1963 年、TC は 1954 年に発売され長期間使用されており⁸⁾、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⁹⁾、上記 2 つの抗生物質に比較して耐性株の割合は 5~6%と高くないため、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¹⁰⁾、今回の下水、河川水の実態調査や 23~24 年度に実施した病院排水調査でも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。

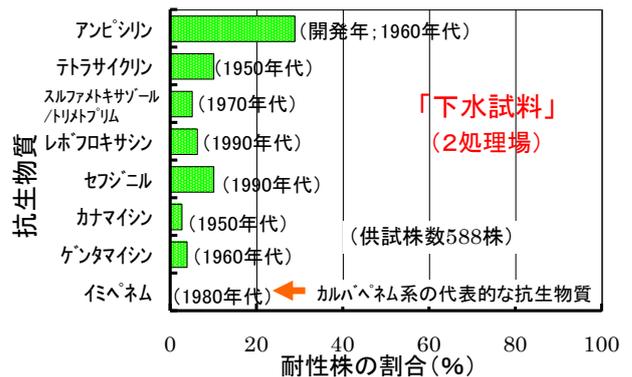


図-4 各抗生物質に対する耐性株の割合

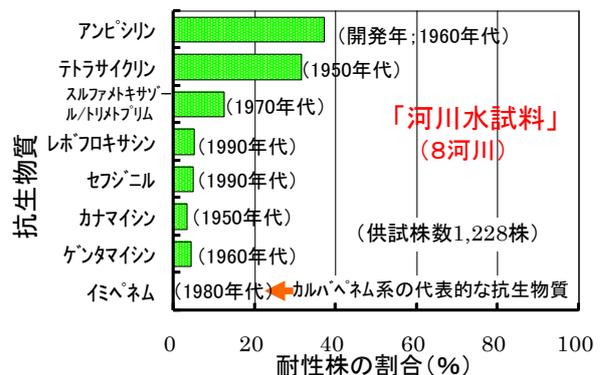


図-5 各抗生物質に対する耐性株の割合

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

ノロウイルスの検出精度・検出限界の向上を目的に、河

川水、二次処理水を用い、抽出 RNA の前処理条件の違いがノロウイルス検出濃度に及ぼす影響評価を行った。23～24 年度に実施した評価では、測定試料の洗浄（希釈）や逆転写（Reverse Transcription:RT）RNA 量を変動させることによって検出濃度の向上効果が見られた。この要因としてはウイルス RNA の抽出・逆転写効率の向上によるものと推定されたことから、25 年度はより詳細に抽出 RNA の前処理条件を考慮し検出濃度に及ぼす影響を評価した。

評価結果を図-6、7 に示す。RNA 抽出時に添加するキャリア RNA 量を 5.6 から 4.2 μ g、逆転写（Reverse Transcription:RT）RNA 量を 0.5 から 0.1 μ g とした条件を含め各前処理条件の適用によって、従来法で検出限界値以下（ 10^3 copies/L レベル）であった河川水で定量性の向上が見込まれた。また、逆転写工程を 2 回とした条件では、検出時の定量値が若干高くなる傾向が見られた。さらに、逆転写（RT）RNA 量を 0.1 から 1.0 μ g とすることで 0.1 μ g に比較して検出濃度の低下が見られたが、RT 量を 10 倍としかつ定量値が得られていることから、検出限界値を 10 倍向上させる定量性の向上が見込まれた。一方、比較対象として二次処理水を利用した評価で

は、各前処理条件の適用によって、従来法よりも若干の検出濃度の向上が見られたが、河川水と比較して検出濃度の向上効果に違いが見られた。

検出濃度に及ぼす影響要因としては、RNA 抽出カラムに対する濃縮試料の SS 負荷量⁶⁾、希釈した溶解性試料の評価結果から溶存物質などが推定されが、今回の評価結果では抽出・精製・逆転写工程が検出濃度に及ぼす影響因子であることが改めて確認された。低濃度の河川水では抽出 RNA の前処理条件を変更することで、定量評価の可能性は向上したが、測定試料のノロウイルス濃度や水質性状が異なることで、検出濃度の向上効果に違いが見られたため、最適手法を定める上でデータの蓄積と解析が必要である。

3.3 合流式下水道越流水の影響を受ける河川調査

降雨時における合流式下水道越流水の調査結果を図-8、9 に示す。図-8 は調査日における時間降雨量の推移を示したもので、時間降雨量の最大値は 6mm/h であり、河川への越流水の放流は降雨量が増加した期間の 3 時間程度であった。越流水が河川へ及ぼす影響評価結果を図-9 に示す。採水試料は流入下水、越流水、越流水放流先の河川水としたが、各試料の採水は越流水の越流開始から多少時間が経過した段階となった。採水当初のノロウイルス濃度は流入下水と越流水がほぼ同程度であり、最大濃度の 10^7 copies/L レベルは冬季の感染性胃腸炎流行期における流入下水のノロウイルス濃度と同レベルであったが、時間の経過とともに雨水による希釈によって濃度の低下があるものと考えられた。一方、河川水では越流水の越流開始から多少時間が経過した段階となったが、採水開始当初の 10^5 copies/L レベルから、最大濃度は 10^6 copies/L レベルにまで上昇しており、合流式下水道の越流水は公共用水域へのノロウイルス汚濁負荷源として考慮する必要があると考えられた。今後、越流水の放流前後のデータを取得することで越流水の詳細な影響評価を行う必要があるが、今回の評価結果では流入下水と河

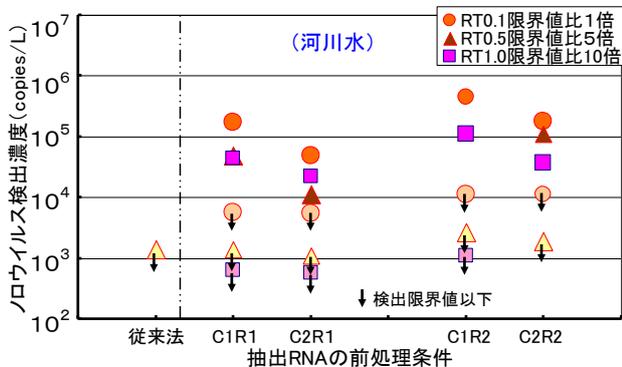


図-6 抽出RNAの前処理条件の違いによるノロウイルス検出濃度

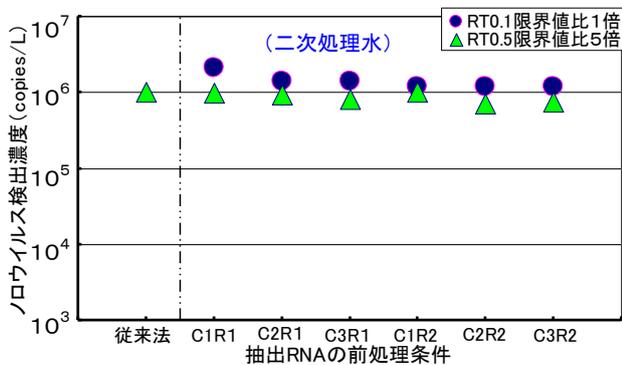


図-7 抽出RNAの前処理条件の違いによるノロウイルス検出濃度

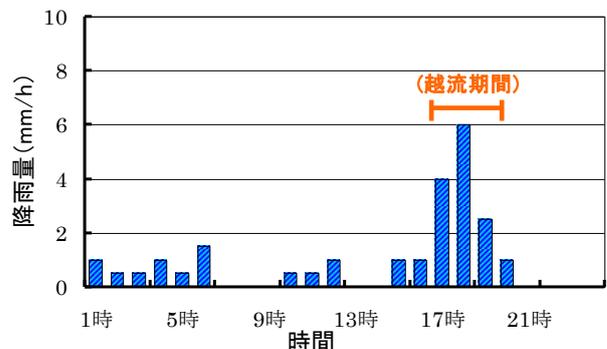


図-8 調査対象流域の降雨状況

川水のノロウイルス最大濃度は、1 オーダー程度の違いしかないため、河川において極めて高濃度となることが明らかとなった。

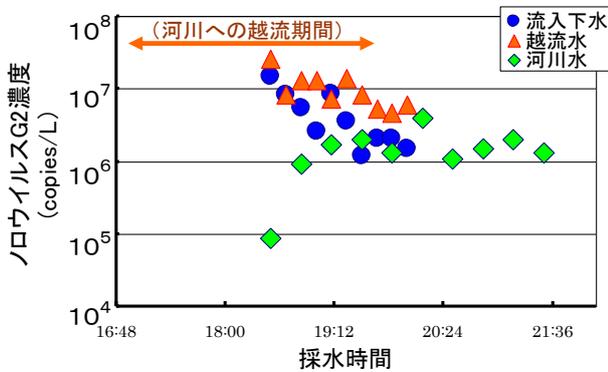


図-9 合流式下水道越流水の影響評価

次いで、各試料のノロウイルス濃度と他の水質項目としてSS、濁度との関連性について評価を行った。濁度は現地にて簡易かつ速やかに測定できることから、越流水の汚濁指標の1つとして、SSは濁度と密接に関連した項目であることから、得られたデータを基に評価を行った。評価結果を図-10、11に示す。SS、濁度とノロウイルス濃度には相関関係が見られ、対策を行う上ではSS、濁度の測定によりノロウイルスの削減効果を推測できる可能性があるものと考えられた。また、高SS・濁度試料はノロウイルス濃度が高い傾向が見られたため、降雨時初期における高SS・濁度水への適切な対応として雨水滞水池の活用や水処理技術としての3Q処理により、放流先河川水への影響を低減できると考えられた。今後、これらの合流下水道の越流水対策手法による削減効果の評価を実施する予定である。

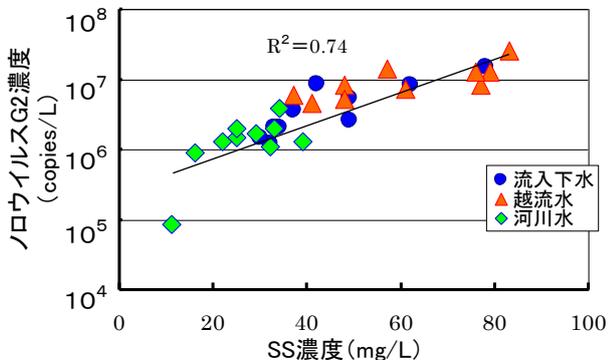


図-10 SSとノロウイルス濃度の関係

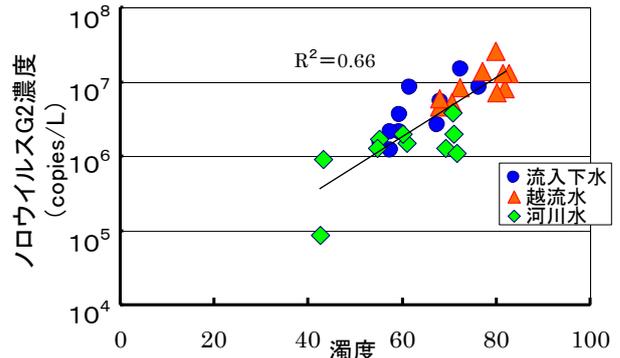


図-11 濁度とノロウイルス濃度の関係

3.4 塩素、紫外線消毒による抗生物質耐性大腸菌の不活化評価

抗生物質耐性大腸菌が抗生物質と同様に消毒剤に対し耐性機構を発現することが懸念されることから、塩素消毒に対する耐性評価とともに、薬剤を利用しない紫外線による不活化効果を評価した。塩素消毒による不活化評価結果を図-12に示す。抗生物質耐性大腸菌割合として、8剤の抗生物質に対し耐性を有しない0剤耐性大腸菌は塩素消毒前で約70%を占めていたが、塩素消毒後には約50%に低下した。1剤あるいは2剤以上の抗生物質に耐性を有する多剤耐性大腸菌の割合は、塩素消毒後の全てのケースにおいて上昇しており、これらの抗生物質耐性大腸菌の多くは、0剤耐性大腸菌に比較して塩素消毒耐性が高いものと考えられた。

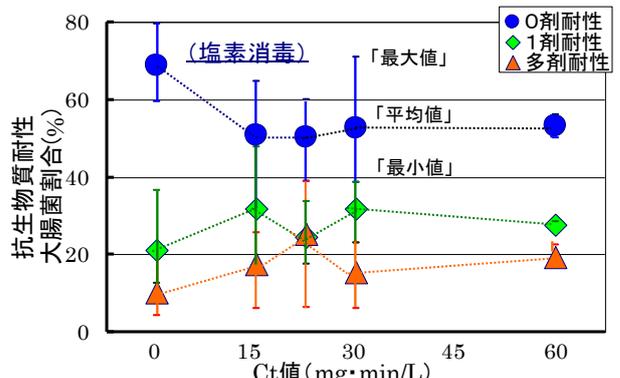


図-12 Ct値と抗生物質耐性大腸菌割合

紫外線消毒による不活化評価結果を図-13に示す。実消毒施設での正確な紫外線照射量が把握できなかったため、大腸菌の不活化率とその抗生物質耐性割合の関係を整理した。8剤の抗生物質に対し耐性を有しない0剤耐性大腸菌は紫外線消毒前で約40%を占めていたが、紫外線照射による不活化率の高まりとともに最終的には約80%にまで上昇した。1剤あるいは2剤以上の抗生物質に耐性

を有する多剤耐性大腸菌の割合は、不活化率の高まりとともに減少していることから、抗生物質耐性大腸菌は消毒法の違いによって感受性が異なる可能性が示唆された。

抗生物質耐性大腸菌が抗生物質と同様に次亜塩素酸ナトリウムに対し耐性機構を発現している可能性が示された。下水道統計¹¹⁾によれば、次亜塩素酸ナトリウムによる消毒を実施している下水処理場は約 900 ヲ所あり、平均添加濃度は 2mgCl/L、平均接触時間は約 20 分間であることから Ct 値を 40mg・min/L と仮定すると、放流水質基準の達成は見込めるが、その放流水に含まれる抗生物質耐性大腸菌の割合を高めている可能性があるものと考えられた。

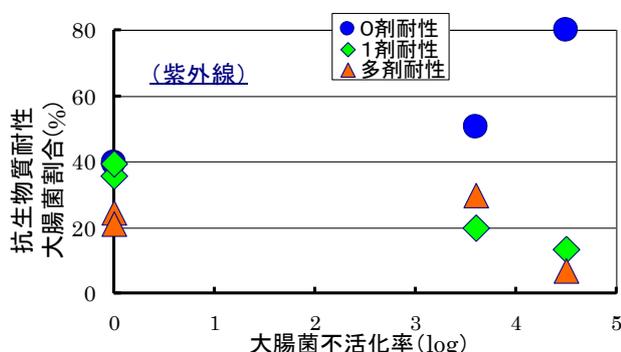


図-13 紫外線による大腸菌不活化率とその抗生物質耐性割合

4. まとめ

25年度は、下水、河川水の大腸菌の抗生物質感受性評価を行うとともに、ノロウイルスを対象に極低濃度試料に対応した濃縮・定量技術の開発のため、抽出 RNA の前処理条件による検出精度・限界値の向上評価を行った。また、合流式下水道越流水による放流先水域への影響を調査した。さらに、抗生物質耐性大腸菌に対し有効な消毒法の評価を目的に塩素、紫外線消毒による不活化効果を把握した。

以下に得られた結果を示す。

「下水、河川水の大腸菌の抗生物質感受性評価」

- 1) 下水、河川水の多剤耐性大腸菌株はアンピシリンに耐性を有し、その割合は 90%程度を占めていた。
- 2) 現状における抗生物質販売量と抗生物質耐性大腸菌の存在実態との関係は見られなかった。
- 3) 放流水の影響を受ける河川水では、多剤耐性大腸菌の割合が上昇した。
- 4) 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は検出されなかつ

た。

「極低濃度試料に対応した濃縮・定量技術の開発」

5) ウイルス RNA の抽出条件や精製・逆転写工程の変更によって、従来法で検出限界値以下であった河川水で定量評価の可能性が向上した。

6) 逆転写反応に利用する RNA を 10 倍量としても定量値が得られたことから、検出限界値を 10 倍向上させた定量評価の可能性を高められた。

「合流式下水道越流水の影響を受ける河川調査」

7) 合流式下水道の越流水は公共用水域へのノロウイルス汚濁負荷源となる可能性が高いと考えられた。

8) SS、濁度とノロウイルス濃度には相関関係が見られ、ノロウイルス濃度の推移を把握する上で、活用できる可能性がある。

「塩素、紫外線消毒による抗生物質耐性大腸菌の不活化評価」

9) 塩素消毒では Ct 値を高めることで抗生物質耐性大腸菌の割合が上昇した。

10) 紫外線消毒では不活化率の高まりとともに、抗生物質耐性大腸菌の割合が減少した。

謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、A、B 下水処理場の各下水道管理者には特段のご配慮・ご協力を頂いた。ここに記し謝意を表します。

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、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.

- 6) 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.
- 7) 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.
- 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) (公社)日本下水道協会(2013) 平成 23 年度版下水道統計.

STUDY ON 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: Jun TSUMORI

Mamoru SUWA

Nobuhito YASUI

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 of this study conducted in 2013 are as follows; A lot of *E.coli* possessing multi-drug resistance including ampicillin resistance were detected in wastewater and river water. However, *E.coli* that had the resistance ability to imipenem was not detected.

In the evaluation of the determination technology of the *Norovirus* it was presumed that the detection concentration and detection limit improved when the extracted ribonucleic acid sample was each modification condition of the extraction, purification and reverse transcription.

The combined sewer overflow was clarified as the source of *Norovirus* to the public water body. And, suggests that the variation of the *Norovirus* concentration could be inferred from the transition of the SS concentration or turbidity in the samples.

It was suggested that the inactivation of tested Multi-antibiotic resistant *E.coli* is different between receptivity to chlorination and that to ultraviolet disinfection.