

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】

検出技術の高度化により、下水や環境水でのウイルス、原虫類などの病原微生物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。

26 年度は、紫外線、塩素消毒による抗生物質耐性大腸菌の不活化評価を行うとともに、逆転写や PCR 条件などが NV 定量値へ及ぼす影響を明らかにすることで、検出感度向上のための改善方策を評価した。また、合流式下水道越流水が放流先水域へ及ぼす影響と対策手法として雨天時活性汚泥処理法による NV の削減効果を把握した。

その結果、二次処理水中に添加した 0 剤、5 剤耐性大腸菌の消毒による不活化効果は、紫外線照射線量を $10\text{mJ}/\text{cm}^2$ 以上とすることで $4\sim 5\log$ 程度、塩素の添加濃度を $4\text{mgCl}/\text{L}$ 、接触時間を 15 分間とした条件においては $3\sim 5\log$ 程度であった。逆転写 RNA 量・回数および PCR 反応容量に対する供試水量をコントロールすることで、ノロウイルスの検出感度が向上することを明らかにした。雨天時の越流水は公共用水域に対する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、降雨時の雨天時活性汚泥処理時におけるノロウイルスの流入負荷量を 1 とし、流入負荷量に対する処理水の負荷量比を求めたところ概ね 0.1 と整理された。

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能力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。26 年度は下記の 1) ～3) の項目について実施した。

- 1) 紫外線、塩素消毒による抗生物質耐性大腸菌の不活化評価
- 2) 逆転写、PCR 条件が NV 定量値に及ぼす影響評価
- 3) 合流式下水道越流水が放流先水域へ及ぼす影響と対策手法による削減効果の把握

2. 研究目的および方法

2.1 紫外線、塩素消毒による抗生物質耐性大腸菌の不活化評価

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が行われており、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、下水、環境水試料を対象に耐性菌の存在状況を明らかにするとともに、対策手法の構築の一環として消毒耐性を評価するものである。

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⁴⁾、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。

26 年度は、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。評価対象とした大腸菌は、A 下水処理場の二次処理水から釣菌したもので、イミペネム(IPM)、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 種類の抗生物質に対して耐性を有しない 0 剤耐性大腸菌、8 種類の内 ABPC、LVFX、TC、GM、ST の 5 剤に耐性を示した 5 剤耐性大腸菌とした。これらの大腸菌をミューラーヒントン培地で増殖させ、培地成分の影響を回避させるため培養液を遠心分離し上澄液を除

去した後、沈渣を滅菌ミリ Q 水で洗浄し再度遠心分離を行い菌体として沈渣を回収した。回収した沈渣を公称孔径 0.2μm のメンブランフィルターでろ過した A 下水処理場の二次処理水に各々添加し消毒実験に供した。塩素消毒実験では、調整した二次処理水 1L に次亜塩素酸ナトリウム濃度が 0~4mgCl/L になるよう添加、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、シャーレに 200mL の二次処理水を分注し低圧紫外線ランプにより 0~20mJ/cm²を照射した。消毒前後の大腸菌の定量はクロモカルト寒天培地による平板培養法とした。なお、大腸菌の抗生物質感受性評価では、抗生物質含有の KB ディスク(栄研化学)を利用した。

2.2 逆転写、PCR 条件が NV 定量値に及ぼす影響評価

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検出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 (Reverse Transcription:RT)、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、26 年度には逆転写や PCR 条件などが NV 定量値へ及ぼす影響を明らかにすることで、検出感度向上のための改善方策を評価した。

評価対象試料は A、B 下水処理場の二次処理水(一部 GF/B ろ過水を利用)と C 河川水とした。これらの試料をポリエチレングリコール沈殿法(PEG 沈殿法)や陰電荷膜法により濃縮した。PEG 沈殿法は、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、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た。

陰電荷膜法⁷⁾による濃縮は、試料 100mL あたり 2.5M

の $MgCl_2$ を 1mL 添加攪拌し、HA 膜(公称孔径 0.45 μ m、90mm)で試料をろ過した。ろ過後 0.5mM の H_2SO_4 200mL で酸洗浄し、1.0mM の NaOH 10mL をろ過してウイルスを誘出回収した。誘出液を 50 \times TE バッファー 200 μ L と 100mM の H_2SO_4 50 μ L を入れた試験管に回収・中和し、誘出液を CentriprepYM-50(ミリポア社製)に入れ 2,500rpm・10 分間 4 $^{\circ}$ C で遠心処理を行いウイルス濃縮液を作成した。なお、陰電荷膜への SS 負荷量の違いは検出濃度に影響を及ぼすことから⁶⁾、膜への試料通水量は全てのケースで 1mg-SS/膜に統一した。

各ウイルス濃縮液からの RNA の抽出は、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。ウイルス遺伝子抽出カラムへの PEG 沈殿法による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⁾。また、陰電荷膜法では公称孔径 0.45 μ m の膜に試料を通水させ濃縮を行い、その誘出液が濃縮試料となるため、遺伝子抽出カラムへの濃縮試料の SS 負荷量はゼロとして考えた。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。

抽出・精製したウイルス RNA 試料は、ランダムプライマー、Omniscrypt RT Kit(QIAGEN 社)を用い全量 20 μ L の系で逆転写を行い cDNA を作製した後にリアルタイム PCR により定量した。

本評価における逆転写・PCR 条件を整理したものを表-1 に示す。逆転写反応条件は、逆転写回数を 1~3 回、逆転写 RNA 量を 0.1~1.0 μ g、また、逆転写反应用的の試薬量を通常の 3 倍量で逆転写回数を 1 回とした。また、リアルタイム PCR の反応条件やプローブ、プライマーは「ノロウイルスの検出について」⁸⁾ を参照したが、本評価では 100 μ L の PCR 反応系における cDNA の供試水量を 10 μ L(従来の割合として 0.1)を基準に段階的に減少させ最小量を 1 μ L(割合を 0.01)とした。精製 RNA 量は Spectrophotometer(NanoDrop 社製)により定量、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)を利用した。

表-1 逆転写・PCR反応条件

	逆転写RNA量	逆転写回数	逆転写試薬量	PCR反応容量に対する供試水量割合
評価条件	0.1~1.0 μ g	1~3	1~3倍量	0.01~0.1

2.3 合流式下水道越流水が放流先水域へ及ぼす影響と対策手法による削減効果の把握

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 NV 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。26 年度は胃腸炎感染症の流行期において、NV を対象に降雨時における越流水が河川水へ及ぼす影響把握と、対策技術として雨天時活性汚泥法による負荷の削減効果を評価した。

3. 研究結果および考察

3.1 紫外線、塩素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。紫外線消毒による不活化評価結果を図-1 に示す。0 剤、5 剤耐性大腸菌ともに紫外線照射線量が 10mJ/cm² 以上で 4~5log 程度の不活化効果が得られているが、明らかに不活化率に違いが生じており、5 剤耐性大腸菌は 0 剤耐性大腸菌に比較して紫外線消毒耐性が高い結果が得られた。

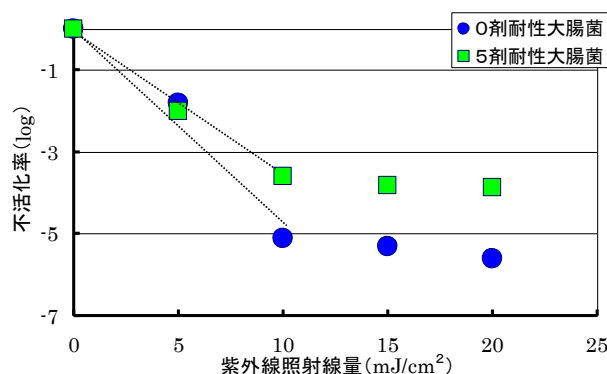


図-1 紫外線照射による耐性菌の不活化評価

一方、25 年度に行なった実下水処理場での中圧紫外線ランプによる不活化効果の評価では、紫外線照射により

不活化率が高まることで処理水中の 0 剤耐性大腸菌の存在割合が上昇し、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が減少する結果が得られた。調査年度により紫外線の感受性に違いが生じた要因としては、紫外線ランプが低圧と中圧の違いにより出力波長が異なることや、25 年度では試料中に存在する複数の大腸菌が対象であることに對し、本評価では 0 剤、5 剤耐性大腸菌とも単一株であることが一因とも推定される。これらの要因解明のため、今後、調査・実験を継続しデータを蓄積する予定である。

次いで、塩素消毒による不活化評価結果を図-2 に示す。8 剤の抗生物質に對し耐性を有しない 0 剤耐性大腸菌は Ct 値が 60mg・min/L (本評価では添加濃度と接触時間の積とした) で 3.3log、5 剤耐性大腸菌では 4.7log となり、5 剤耐性大腸菌に比較して 0 剤耐性大腸菌は塩素消毒耐性が高い結果が得られた。25 年度に行った塩素消毒実験では、消毒後において 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が 0 剤耐性大腸菌に比較して上昇していたことから、26 年度は塩素に対する感受性が異なる傾向が見られたこととなる。紫外線消毒による評価結果と同様に、試料中に存在する複数の大腸菌あるいは単一株である評価に起因するものなのか、今後、調査・実験を継続しデータを蓄積する必要があると考えられた。

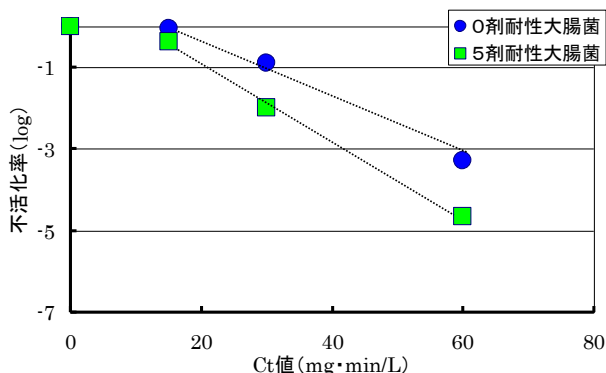


図-2 塩素消毒による耐性菌の不活化評価

3.2 逆転写、PCR 条件が NV 定量値に及ぼす影響評価

過年度に実施した評価では、測定試料の洗浄（希釈）や逆転写 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、26 年度はより詳細に抽出 RNA の逆転写、PCR 条件を考慮し検出濃度に及ぼす影響を明らかにすることで、検出感度向上のための改善方を評価した。逆転写 RNA 量と逆転写回数の違いによる NV 定量値の比較結果につ

いて図-3 に示す。評価対象試料は PEG 沈殿法で作成したウイルス濃縮液とした。なお、処理水と河川水の NV 定量値が逆転しているが、採水時期が異なることや処理水はろ過試料を測定したことによる影響と考えられた。逆転写 RNA 量が 0.1~1.0 μ g の範囲で評価を行ったが、RNA 量を 0.1 μ g とすることで最大値が得られた。また、逆転写回数を 1 回から 3 回と複数回とした場合でも 1 回と比較して NV の定量値が向上した。逆転写 RNA 量に応じて定量値が変動することから、RNA とともに持ち込まれた溶存物質など何らかの阻害物質の影響が推定されたが、逆転写 RNA 量を 0.1 μ g とし逆転写回数を 3 回とした条件において全体的に定量値が高まることとなった。

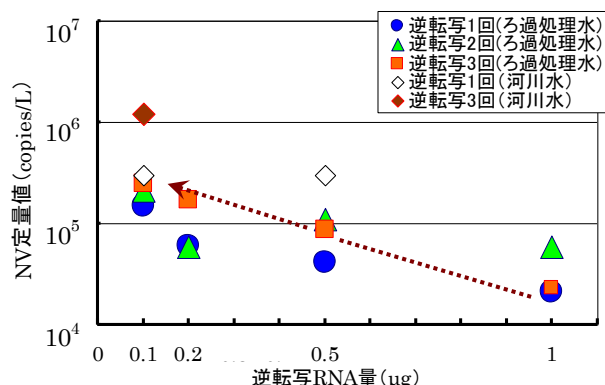


図-3 逆転写 RNA 量・回数の違いによる NV の定量値

次いで、リアルタイム PCR 反応条件が定量値に与える影響評価として、PCR 反応容量に對する供試水量の割合と NV 定量値との関係を図-4 に示す。100 μ L の反応容量に對し供試水量が 1~10 μ L (割合が 0.01~0.1) の範囲で評価を行った。NV 定量値は全てのケースにおいて 0.01 とした割合で最大値が得られ、逆転写回数を 3 回・RNA 量を 1.0 μ g とした条件においては、PCR 反応容量に對する供試水量の割合を 0.1 から 0.01 とすることで、定量値は 3 倍程度向上(1.4 × 10⁶ → 4.7 × 10⁶ copies/L)した。また、

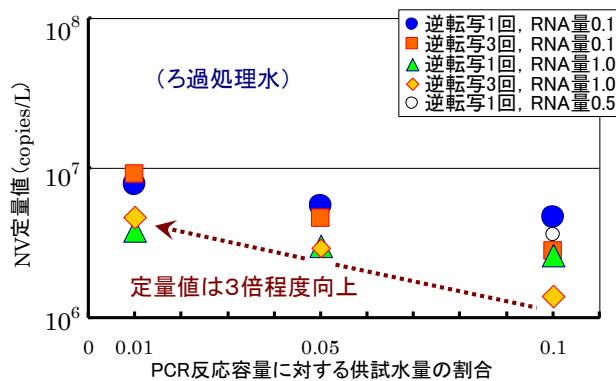


図-4 PCR 反応容量に對する供試水量の割合と NV の定量値

逆転写回数を3回、RNA量を0.1 μ g、供試水量の割合を0.1とした条件(2.8 $\times 10^6$ copies/L)と比較して定量値が高まっていることから、従来、定量値が得られなかった低濃度試料に対しては、供試水量の割合を考慮することで検出感度を高められる可能性があると考えられた。

PCRの反応容量に対する供試水量や逆転写RNA量はNVの定量値に影響を及ぼした。その要因としてはPCR、逆転写反応に対する阻害物質などの影響やPCR反応のための試薬量が推定された。

一方、逆転写回数を3回とした場合には試験操作が増えるため、その改善策として逆転写回数を1回としつつ、逆転写反応に利用する試薬量を3倍として定量値に及ぼす影響を評価した。試薬量を3倍としても通常の定量値と比較して大差が無く(図-5)、図-4に示した逆転写回数を3回とした定量値よりも低いことから、試薬量を3倍としても改善効果は見込めないものと考えられた。

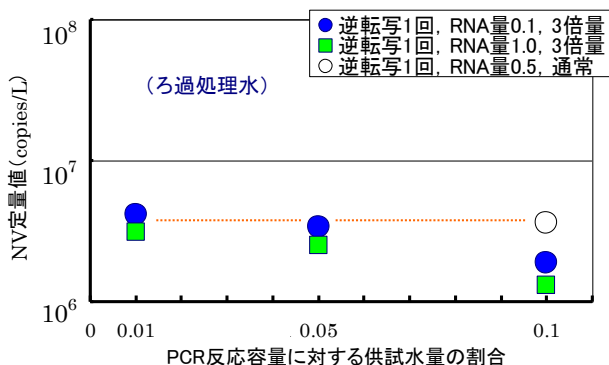


図-5 逆転写試薬量の違いによるNVの定量値

上記の評価結果から得られた逆転写、PCR条件を基に、濃縮方法が異なる試料に対する影響評価として、同一試料をPEG沈殿法と陰電荷膜法により濃縮しNVの定量を行った。評価結果を図-6に示す。濃縮方法が異なっても逆転写回数を3回、RNA量を0.1 μ g、PCR反応における供試水量の割合を0.01とした条件とすることで、二次処理水、河川水とも最大値が得られた。濃縮方法が異

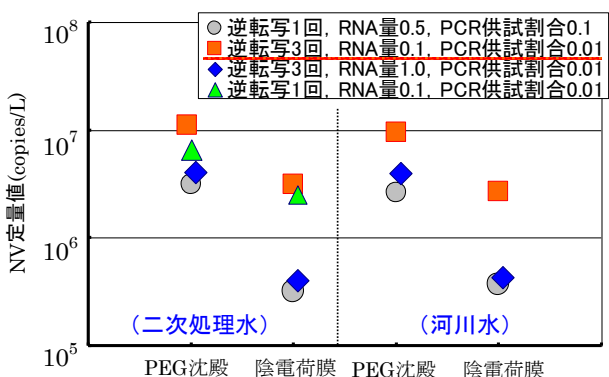


図-6 濃縮方法が異なる試料に対する影響

なっても同様な傾向を示したことから、測定試料中の何らかの阻害物質や試薬量が逆転写、PCR反応に対し影響を及ぼすと推定された。

本評価結果により、逆転写RNA量や逆転写回数および、PCR反応容量に対する供試水量の割合を各々考慮することで、NVの定量値を向上させられることが明らかとなった。濃縮方法が異なる試料でも同様な傾向を示したことから、試料中の阻害物質や試薬反応量の影響が推定されたため、その物質の特定や影響回避のための前処理法を構築する必要がある。現状では、逆転写RNA量・回数およびPCR反応容量に対する供試水量をコントロールすることで、NVの定量値が向上することから、これらの手法が簡易かつ有効な検出感度向上方策の1つであると考えられた。

3.3 合流式下水道越流水が放流先水域へ及ぼす影響と対策手法による削減効果の把握

降雨時における合流式下水道越流水が放流先水域へ及ぼす影響調査結果を図-7、8に示す。平成27年1月に行った調査日の降雨状況は、時間最大降雨量が8.5mm、累積雨量が29mm、3月では同様に10.5mm、31.5mmであった。採水試料は流入下水、越流水、越流水放流先のC河川水(越流水放流口から約400m下流)としたが、比較対象として1、2月には晴天時の試料を加えた。降雨直前の採水当初のNV濃度は流入下水が $10^8 \sim 10^9$ copies/Lレベルと高濃度であり、冬季の感染性胃腸炎の流行状況を反映したものと考えられたが、時間経過とともに雨水による希釈によって流入下水と越流水のNV濃度に低下傾向が見られた。一方、河川水では晴天時試料を含め越流水の越流開始前から当初にかけ $10^5 \sim 10^6$ copies/Lレベルで推移していたが、越流水の影響を受けることで最大検出濃度は 10^7 copies/Lレベルにまで上昇しており、雨天時の越流水は公共用水域に対するNV汚濁負荷源として考慮する必要があると考えられた。しか

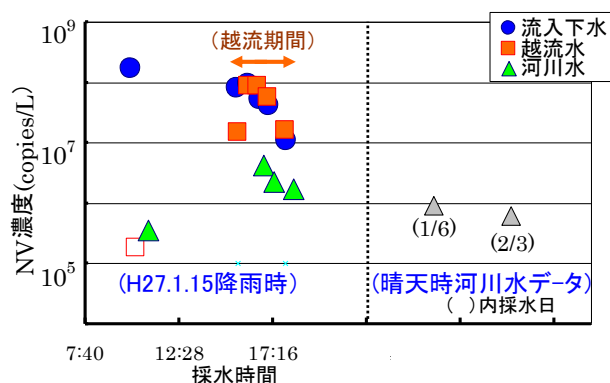


図-7 合流式下水道越流水の影響評価

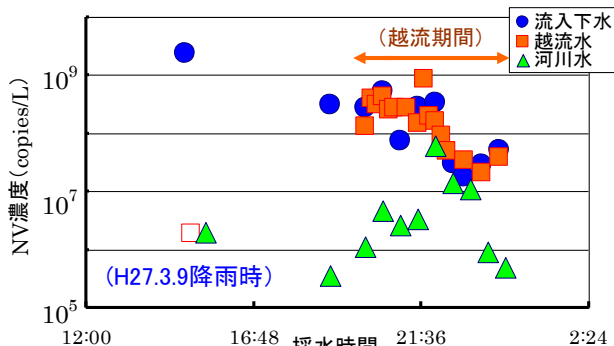


図-8 合流式下水道越流水の影響評価

し、時間経過とともに雨水による希釈効果がより高まり流入下水と越流水の NV 濃度が低下することで、河川水の NV 濃度も降雨前の状況へ近づいていることから、越流水の放流初期段階における適切な対策が講じられれば放流先河川水への影響を低減できると考えられた。

次いで、越流水対策技術の 1 つである雨天時活性汚泥法による NV 負荷の削減効果を評価した。評価対象とした D 下水処理場では嫌気好気法による処理を実施しているが、雨天時には越流水対策として雨天時活性汚泥法を導入している。処理フローの概略を図-9 に示す。晴天時の受け入れ可能な流入水量である 1Q に対し、雨天時には最大の受け入れ流入水量を 3Q とし、2Q 分の流入水を反応タンクの後段にバイパス流入させ処理を行っている。

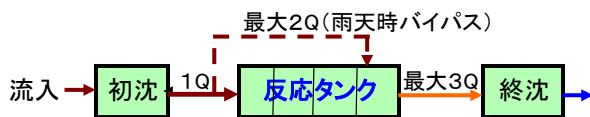


図-9 雨天時活性汚泥処理時の処理フロー

結果を図-10 に示す。感染性胃腸炎の流行時期である平成 27 年 1~2 月の雨天時に調査を行った。1 月に行った調査日の降雨状況は、時間最大降雨量が 5.5mm、累積雨量は 25mm、2 月では同様に 2mm、12.5mm であった。

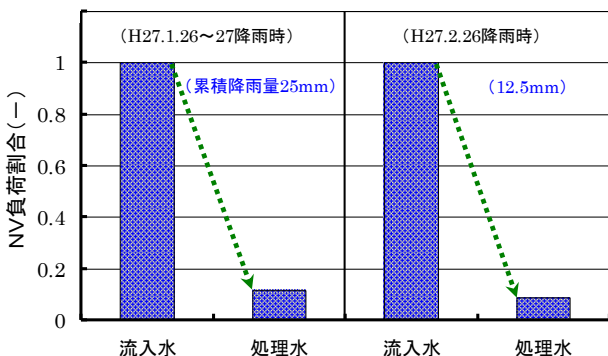


図-10 雨天時活性汚泥処理によるNV負荷の削減効果

降雨時の雨天時活性汚泥処理時における NV の流入負荷量を 1 とし、流入負荷量に対する処理水の負荷量比を求めたところ 0.09~0.12 であった。雨天時活性汚泥処理を実施しなければ、晴天時の受け入れ可能な流入水量である 1Q 分を超過した NV の負荷が公共用水域へ放流されることから、放流先河川水への影響を低減しているものと考えられた。

4. まとめ

26 年度は、紫外線、塩素消毒による抗生物質耐性大腸菌の不活化評価を行うとともに、逆転写や PCR 条件などが NV 定量値へ及ぼす影響を明らかにすることで、検出感度向上のための改善方策を評価した。また、合流式下水道越流水が放流先水域へ及ぼす影響と対策手法として雨天時活性汚泥処理法による NV の削減効果を把握した。

以下に得られた結果を示す。

「紫外線、塩素消毒による抗生物質耐性大腸菌の不活化評価」

- 1) 二次処理水中に添加した 0 剤、5 剤耐性大腸菌ともに紫外線照射線量が 10mJ/cm² 以上で 4~5log 程度の不活化効果が得られた。
- 2) 塩素の添加濃度を 4mgCl/L、接触時間を 15 分間とした条件において、二次処理水中に添加した 0 剤、5 剤耐性大腸菌の不活化効果は 3~5log 程度であった。

「逆転写、PCR 条件が NV 定量値に及ぼす影響評価」

- 3) 逆転写 RNA 量・回数および PCR 反応容量に対する供試水量をコントロールすることで、NV の定量値が向上することを明らかにした。

「合流式下水道越流水が放流先水域へ及ぼす影響と対策手法による削減効果の把握」

- 4) 雨天時の越流水は公共用水域に対する NV 汚濁負荷源として考慮する必要があると考えられた。
- 5) 越流水対策技術として雨天時活性汚泥法による負荷の削減効果を評価し、NV の流入負荷量を 1 とすると処理水の流出割合は概ね 0.1 と整理された。

謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、A、B、D 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) 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。
- 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) H.Katayama, et al., (2008) One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plant in Japan, Water Research, 42, 1441-1448.
- 8) 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。

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 2014 are as follows; the inactivation ratio about 4-5log was obtained by the ultraviolet disinfection more than 10mJ/cm² irradiated with both the *E.coli* and multi-antibiotic resistant *E.coli* added to the secondary effluent. And for chlorination, the inactivation ratio about 3-5log was obtained by the under the condition of the chlorine concentration of 4mgCl/l and contact time 15 minutes.

In the evaluation of the determination technology of the *Norovirus* it was presumed that the detection concentration improved when the extracted ribonucleic acid sample was each modification condition of the reverse transcription and polymerase chain reaction.

For the investigation of the combined sewer system, the combined sewer overflow was clarified as the source of norovirus to the public water body. And the *Norovirus* concentration in the water body can increase during a rainfall. Additionally, the *Norovirus* removal efficiency by the wet weather activated sludge process of CSO control technology was investigated. Under wet weather activated sludge process condition, the *Norovirus* removal efficiency was about 90%.