

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（資源循環担当）

研究担当者：南山瑞彦、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した。

その結果、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では、公共用水域に対するノロウイルス（NV）、原虫類の負荷源の 1 つとして、浄化槽排水の存在を明らかにした。下水、河川水、下水道へ排出される病院排水での抗生物質耐性大腸菌に関しては、カルバペネム系のイミペネムに耐性を示した大腸菌は、現在のところ不検出であることを明らかにした。リアルタイム RT-PCR 法による NV の定量にあたり、試料中の阻害物質や試薬反応量の影響を明らかにした。それらの影響回避として、抽出 RNA の逆転写工程および PCR 反応容量に対する供試水量をコントロールする手法の改良により、NV 検出濃度の向上方を提案した。生物学的高度処理法による除去率向上要因の解明では、活性汚泥生物相などと NV 除去率の関係を把握し、被災下水処理場の復旧において、活性汚泥処理の初期水質管理の重要性を提案した。また、被災下水処理場の段階的な対策技術の導入にあたり、継続した実態調査により放流水の病原微生物の適切な水質管理手法を示せた。さらに、NV 除去と活性汚泥のタンパク質量との関係を把握し、標準活性汚泥法と生物学的高度処理法である A²/O 法の活性汚泥において 10KDa 以下のペプチド量に大きな違いが見られ、NV の除去能に関与している可能性が考えられた。適正な流域管理のための非点源負荷と対策技術の構築では、合流式下水道の越流水が公共用水域への NV 汚濁負荷源となる可能性が高いことを明らかにした。合流式下水道の雨天時越流水対策技術として、遮集倍率向上による放流先河川への NV 負荷の低減効果や、雨天時活性汚泥処理による NV 負荷の削減効果の評価し、効果的な負荷削減方を提案した。水環境保全システムとしての適切な対策技術の構築として、抗生物質耐性大腸菌を用いて塩素、紫外線による不活化特性を解明した。塩素消毒では Ct 値（添加塩素量）を高めることで、抗生物質耐性大腸菌の割合が上昇し、耐性を有さない菌の割合は減少した。紫外線消毒においては抗生物質耐性大腸菌の不活化のための適切な消毒条件を提案した。抗生物質耐性大腸菌の耐性遺伝子は垂直伝播していると考えられたことから、下水処理場などにおいて適切な消毒管理の必要性を明らかにした。

キーワード：病原微生物、浄化槽排水、段階的対策技術、検出感度向上、合流式下水道、消毒

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、これまで衛生的な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。27 年度は本研究課題の最終年度にあたるため、以下に達成目標ごとに得られた成果を取りまとめた。

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世界的に大きな問題となっており、主要国首脳会議（伊勢志摩サミット）においても、薬剤耐性感染症が重要課題として位置づけられている¹⁾。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おり、米国では、耐性菌による感染者が年間 200 万人以上、死亡者は 2.3 万人に及んでいる²⁾。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³⁾や耐性遺伝子の検

出報告例⁴⁾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 (New Delhi metallo-β-lactamase : 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⁵⁾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、河川水、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。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、病院排水は関東圏内にある比較的大規模な病院を対象とし、試料中に含まれる大腸菌の抗生物質の感受性を測定した。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鉤菌、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 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の実施基準を基にした KB ディスクの手引きを参照した。

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(水路)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4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グーステインを用い、染色したプレパ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時間ごとに24時間採水を行い得られた6試料を混合したものとした。

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RT-PCR法により定量を行った。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、Omniscrypt 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⁷⁾。

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⁸⁾。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、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、F下水処理場の二次処理水(一部GF/Bろ過水を利用)とG河川水とした。これらの試料をPEG沈殿法や陰電荷膜法により濃縮した。

陰電荷膜法⁹⁾による濃縮は、試料100mLあたり2.5MのMgCl₂を1mL添加攪拌し、HA膜(公称孔径0.45µm、90mm)で試料をろ過した。ろ過後0.5mMのH₂SO₄200mLで酸洗浄し、1.0mMのNaOH10mLをろ過してウイルスを誘出回収した。誘出液を50×TEバッファー200µLと100mMのH₂SO₄50µL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℃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⁷⁾、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 の抽出や精製方法は、上記 2.1.2 と同様である。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。

本評価における逆転写、PCR 条件を整理したものを表-2 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、逆転写反應用の試薬量を通常の 3 倍 (3 倍時には逆転写回数を 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」⁶⁾ 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。

表-2 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	0.01~0.1

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水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。本評価は、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・消毒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、段階的な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。実態調査は、壊滅的な被災により水処理機能が停止した H 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ために実施した。

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として、MLSS は下水試験方法を準拠、活性汚泥性生物等はノマルスキー型微分干渉顕微鏡を用い計数した。

2.3.2 活性汚泥のタンパク質量と NV 除去能の関係

下水に存在するウイルスは活性汚泥により吸着除去されていると考えられるが、処理プロセス等の違いによって、その除去効果に差が生じている¹⁰⁾。本評価では、吸着効果に関与が推定される活性汚泥中のタンパク質量とウイルス除去能との関係把握を目的に、標準活性汚泥法と A²O 法の活性汚泥を利用した回分実験を行い、その上澄液の NV 濃度と活性汚泥のタンパク質量を測定した。回分実験では、A 下水処理場の標準活性汚泥法と A²O 法の活性汚泥を利用し、MLSS 濃度を 500、1,000、2,000mg/L 程度に調整の後、流入下水を添加、1、7、24 時間の曝気混合を行った。上澄液の NV の測定法は、上記 2.1.2 に示した手法と同様である。活性汚泥中のタンパク質量は、Bicinchoninic Acid (BCA) 法¹¹⁾ により測定した。ビウレット反応を利用したローリー法タンパク質量をフェノール・キレート剤・還元剤による影響が小さくなるよう改変した方法であり、汚泥中のタンパク質測定に利用されている。なお、タンパク質は透析膜により 3KDa 以下、3-10 KDa、10 KDa 以上に分子量分画し定量した。

2.4 適正な流域管理のための非点源負荷と対策技術の構築

2.4.1 合流式下水道越流水が放流先水域へ及ぼす影響

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ものである。実態調査は感染性胃腸炎の流行期において、NVを対象に降雨時の遮集倍率向上にともなう越流水の有無が河川水へ及ぼす影響を把握した。

2.4.2 合流式下水道越流水の対策技術によるNV負荷の削減効果

降雨時における越流水対策技術の1つである雨天時活性汚泥法によるNVの負荷削減効果を明らかにするため、L市M下水処理場（嫌気好気法を導入：処理フローの概略は図-1）において実態調査を行った。晴天時の受け入れ可能な流入水量である1Qに対し、降雨時には最大の受け入れ流入水量を3Qとし、2Q分の流入下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。本調査では、降雨時の雨天時活性汚泥法の運転直後から終了時まで、流入下水、初沈流出水、二次処理水を採水しNV濃度を測定することで、その削減効果を明らかにした。なお、この調査は、26～27年度にかけ感染性胃腸炎の流行期にあたる12～3月の間に実施した。

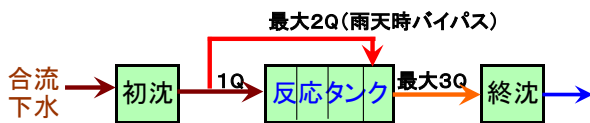


図-1 雨天時活性汚泥法の概略図

2.5 水環境保全システムとしての適切な対策技術の構築

2.5.1 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^{12) 13)}、細胞内への薬剤浸透阻止や浸透した薬剤の排出能力など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。紫外線消毒実験は、実態調査から得た0、6剤耐性大腸菌を

培養増殖させ、0.22μmのフィルターにてろ過した二次処理水に添加、滅菌シャーレに分注し紫外線を照射した。

2.5.2 二次処理水中における抗生物質耐性大腸菌の消長

消毒後に残存した抗生物質耐性大腸菌を想定し、その消長把握を目的に、二次処理水中に添加した抗生物質耐性大腸菌の増殖特性や抗生物質感受性の推移を測定した。抗生物質耐性能力の異なる大腸菌を0.22μmのフィルターにてろ過した二次処理水に各々添加し、20℃の恒温にて最大7日間放置した。放置期間中に適宜採水し、大腸菌濃度、抗生物質感受性を測定した。二次処理水に添加した大腸菌は、8剤の抗生物質に対し耐性を示さなかった0剤耐性大腸菌、4剤耐性（ABPC、TC、CFDN、LVFX）、7剤耐性（ABPC、TC、CFDN、LVFX、KM、ST、GM）、比較対象として大腸菌のATCC 25922株、ATCC 35218株とした。大腸菌の定量はクロモカルト培地による平板培養法とし、抗生物質の感受性評価手法は、上記2.1.1と同様である。

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

各試料中の抗生物質耐性大腸菌の検出結果を表-3および図-2～4に示す。供試大腸菌数は計約3,100株であり、内訳は下水試料1,208株、河川水試料1,228株、病院排水試料の722株を得た。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の割合は45.4%（549株）であった。1剤のみに耐性を示した大腸菌は26.2%（316株）であるが、その内ABPCに耐性のあるものは38.9%（123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は343株であり、供試株の28.4%を占めていた。343株の内272株がABPCに耐性を示しており、多剤耐性大腸菌の79.3%を占めていた。また、2株が7剤の抗生物質に対し耐性を示した。

河川水試料では、耐性無しと評価された大腸菌の割合は45.1%（554株）、1剤耐性は29.6%（363株）であるが、その内ABPCに耐性のあるものは50.4%（183株）であった。多剤耐性大腸菌は311株であり、供試株数の25.3%を占め、311株の内271株がABPCに耐性を示しており、その割合は87.1%であった。さらに、4株が6剤の抗生物質に対し耐性を示した。

病院排水試料では、耐性無しと評価された大腸菌の割合は28.0%（202株）、1剤耐性が29.9%（216株）であ

るが、その内 ABPC 耐性が 58.3% (126 株) であった。耐性無、1 剤耐性以外の多剤耐性大腸菌は 304 株であり、供試株数の 42.1% を占め、304 株の内 292 株が ABPC 耐性であり、その割合は 96.1% を占めていた。さらに、3 株が 7 剤の抗生物質に対し耐性を示した。

評価対象とした 8 剤の抗生物質に対し ABPC に耐性を示した大腸菌が多く検出され、さらに、多剤耐性大腸菌の大部分が ABPC に耐性を有していることが明らかとなった。このことは、下水処理場における消毒効果を含めた消長等を把握する上で、ABPC に耐性を有する大腸菌を指標とすることで、多剤耐性菌の効率的な管理に資することができるものと考えられた。

表-3 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	0 剤耐性割合 (%)	1 剤耐性割合 (%)	1 剤耐性の内 ABPC に耐性 (%)	多剤耐性割合 (%)	多剤耐性の内 ABPC に耐性 (%)
下水試料		1,208	45.4	26.2	38.9	28.4	79.3
河川試料		1,228	45.1	29.6	50.4	25.3	87.1
病院排水		722	28.0	29.9	58.3	42.1	96.1

次いで、各抗生物質に対する耐性大腸菌の検出割合を図-2~4 に示す。各試料とも ABPC に耐性を示した大腸菌の検出割合が最も高く、下水、河川水では約 30~40%、病院排水では約 60% を占めていた。そして、TC、ST 合剤の順で耐性大腸菌の検出割合が高く、試料の違いによる検出傾向の差異は見られなかった。ABPC は 1963 年、TC は 1954 年に発売され¹²⁾、長期間にわたる利用が耐性菌の増加に繋がったと推定される。一方、KM、GM も ABPC や TC とほぼ同時期に開発されているが、耐性大腸菌の検出割合は高くなかった。1980 年代以降にはセフェム系、キノロン系の抗生物質への転換により、アミノグリコシド系の抗生物質は臨床現場での利用が減少しているとされており¹²⁾、これらの要因によるものと推定される。

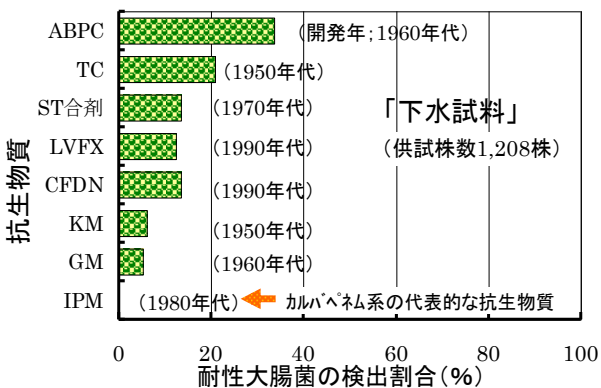


図-2 耐性大腸菌の検出割合と抗生物質の関係

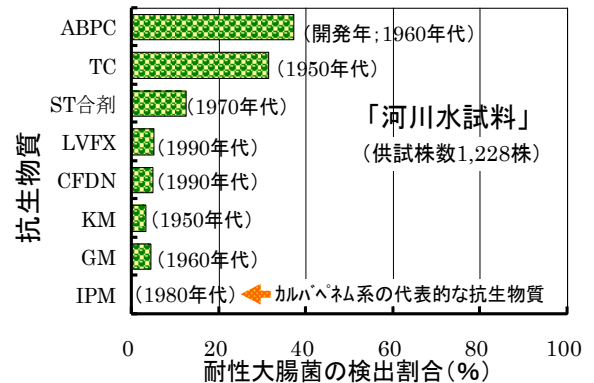


図-3 耐性大腸菌の検出割合と抗生物質の関係

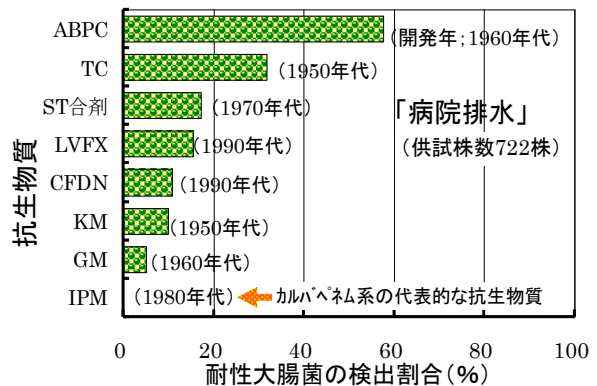


図-4 耐性大腸菌の検出割合と抗生物質の関係

一方、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¹⁴⁾。今回の評価では、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は検出されなかったため、現状においてカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (Carbapenem-resistant enterobacteriaceae : CRE) の存在状況は低いと推定された。

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抗生物質耐性大腸菌の検出割合を整理した。対象は 8 河川の内 J、K の 2 河川とした。J 河川では調査対象とした上下流約 7.4km 間に 2 つの下水処理場があり、上流側に位置する処理場の放流口の直上流と上流側約 0.9km 地点で採水を行い影響無し試料とした。影響有り試料としては、上流側の放流口から約 6.5km (下流側の放流口から約 1.9km) 地点で採水を行った。K 河川では調査対象とした上下流約 2.8km 間に 1 つの下水処理場があり、放流口から上流側 0.5km の地点で採水を行い影響無し試料とした。影響有り試料は放流口の直下流と 2.3km 地点の試料を採水した。この時の大腸菌濃度は J 河川の影響無

し試料で 0.2~0.75 cfu/mL、影響有り試料で 5.3~12cfu/mL、同様に K 河川では 1.2cfu/mL、0.3~0.6cfu/mL であった。2 つの下水処理場の影響を受けた J 河川の影響有り試料は、他の試料と比較して大腸菌濃度がやや高めであった。J、K 河川において下水処理場の影響有無による大腸菌の検出濃度に高低の違いが見られたが、放流水の影響が無い上流試料では抗生物質耐性大腸菌 (1 剤の抗生物質耐性) の割合が約 30~39% であるのに対し、影響有りの下流試料は約 44~56% に上昇した。また、多剤耐性大腸菌 (2 剤以上の抗生物質耐性) では同様に約 4~11% に対し約 21~26% に上昇した (図-5)。下水処理場での消毒により大腸菌濃度は大幅に低減するが、放流水の影響を受ける河川水中での大腸菌の存在割合で見ると、多剤耐性大腸菌の割合は上昇していた。近年では通常の生活の中で発生する市中感染症が大きな問題となっているとされており、公共用水域における衛生学的安全性を考慮する上で、継続したモニタリングの実施が必要であると考えられた。

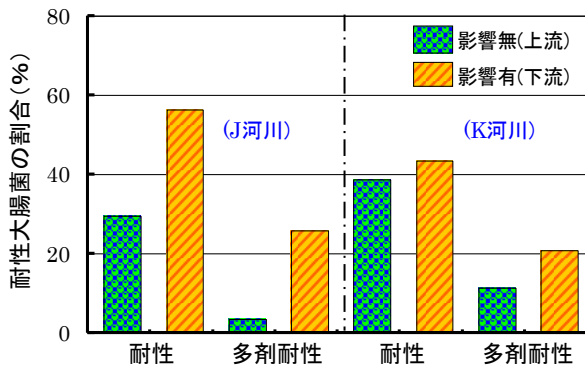


図-5 放流水の影響有無による耐性大腸菌の割合

3.1.2 浄化槽排水負荷の影響を受ける河川調査

1 月下旬から 2 月下旬に行った調査結果を表-4~6 および図-6 に示す。ここでは、河川水量に占める浄化槽排水の割合から排水中の NV 濃度を推定した。水使用量を 1 人にあたり 230L と仮定¹⁵⁾ 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。浄化槽排水の NVG2 濃度は最大 10⁶copies/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 10⁵copies/L レベル、窒素・りんの高度処理法では 10⁴copies/L レベルであり¹⁰⁾、それらと比較して浄化槽排水の NV の最大検出濃度はやや高い状況にあった。

表-4 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 ³ /日)	浄化槽排水量 (m ³ /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	51	5.3%
	E水路	57	51~55 ※※	89~96%
平成24年 2月下旬	C河川	3,223	51	1.6%
	D水路	86	25~52 ※※	29~60%
	E水路	137	51~55 ※※	37~40%
平成25年 1月下旬	C河川	1,757	51	2.9%
	D水路	156	25~52 ※※	16~33%
	E水路	101	51~55 ※※	50~54%
平成25年 2月下旬	C河川	7,322	51	0.7%
	E水路	69	51~55 ※※	74~80%

※ 1人230L/日と仮定¹⁵⁾
 ※※ 小学校等の昼間人口として1人230L/日の35%量と仮定¹⁵⁾

表-5 推定浄化槽排水量から試算した浄化槽排水のNV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)	昼間人口を加えたG2平均濃度 (copies/L)	昼間人口を加えた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

河川水の SS 濃度と NV 濃度の関係を図-6 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。

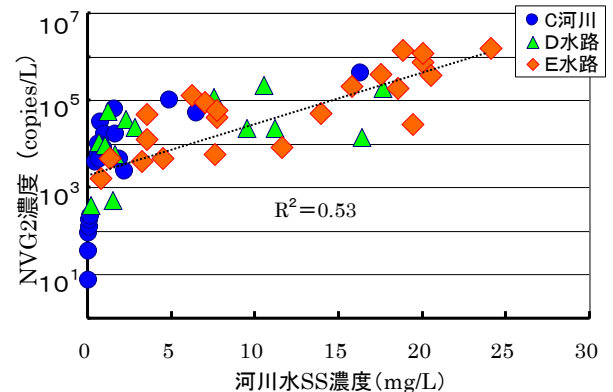


図-6 河川水のSS濃度とNV濃度の関係

次いで、原虫類の調査結果を表-6 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。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。

表-6 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 (oocyst/L)	ジアルジア (cyst/L)	検出限界値 (oocyst/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
	E水路	N.D.	N.D.	0.03
平成24年2月下旬	C河川	N.D.	N.D.	0.20
	D水路	N.D.	N.D.	0.05
	E水路	N.D.	0.54	0.05
	C河川	N.D.	N.D.	0.31
平成25年1月下旬	D水路	N.D.	N.D.	0.07
	E水路	N.D.	N.D.	0.05
平成25年2月下旬	C河川	N.D.	N.D.	0.22
	E水路	N.D.	N.D.	0.10

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となるケースも見られた。

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 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

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、NV の検出濃度の向上効果が見られたことから、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策を評価した。その結果、逆転写回数を 3 回、逆転写試薬量を 1 倍、逆転写 RNA 量を 0.1 μ g、PCR 反応容量に対する供試水量割合を 0.01 とした条件によって NV の検出濃度を高められる可能性があると考えられた。この結果を基にして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-7 に示す。濃縮方法が異なっても上記の逆転写・PCR 条件等とすることで、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などが逆転写、PCR 反応に対し影響を及ぼすと推定された。

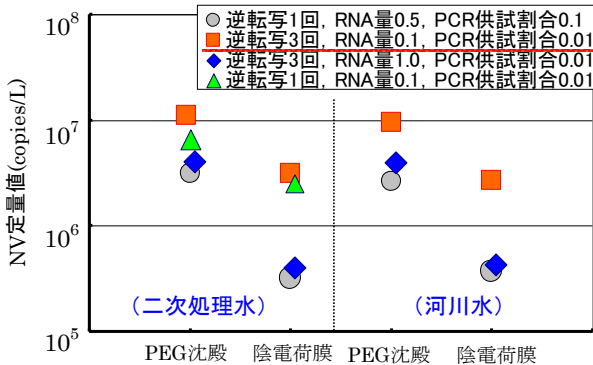


図-7 濃縮方法が異なる試料に対する影響

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 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

H 下水処理場における段階的な対策の進捗に応じた塩素混和池での大腸菌群の不活化効果について図-8 に示す。震災直後の簡易沈殿処理では、次亜塩素酸ナトリウムが 15mgCl/L の添加濃度によっても消毒効果が得られない状況であった。これは、沈殿池に堆積した汚泥から還元性物質（硫化物や有機物）の溶出による消毒剤の消費が、消毒効果に影響を与えていることが考えられたことから、簡易沈殿処理では沈降汚泥の引き抜き管理が重要であることが明らかとなった。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、消毒効果が向上した。また、活性汚泥生成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とともに、残留塩素濃度が上昇することで大腸菌群の不活化率が向上した。

さらに、次亜塩素酸ナトリウム添加濃度と NV 濃度の関係を図-9 に示す。活性汚泥生成系では NV 濃度が簡易

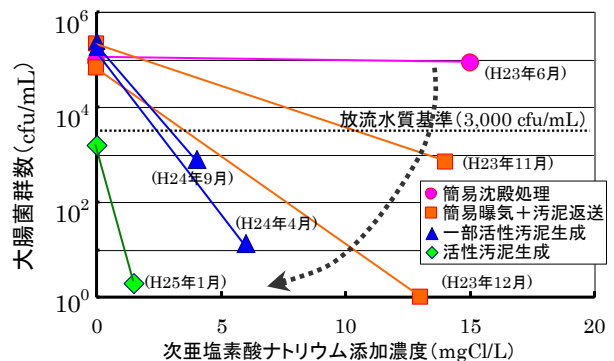


図-8 塩素混和池における大腸菌群の不活化効果

曝気+汚泥返送系の処理水と比較して低く、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、大腸菌群の不活化効果や 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。

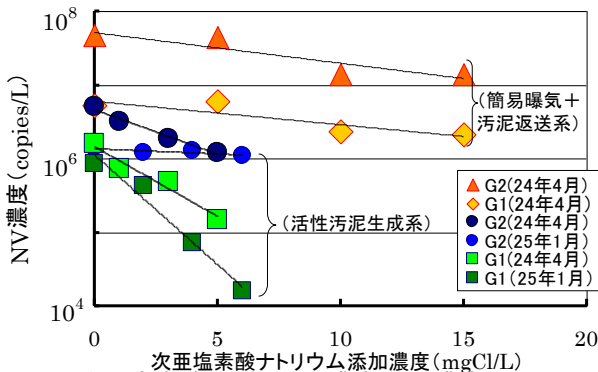


図-9 次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNV濃度の関係

復旧対策技術としては活性汚泥生成による生物処理法への移行により最終段階に至るが、活性汚泥処理への移行当初は活性汚泥生物相が生成途上であると考えられるため、その生物相の状況と NV 除去率の関係を評価した。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¹⁶⁾の中で *Aspidisca* や *Vorticella* などの原生動物などを指し、指標としては、その他の中間汚泥生物や非活性汚泥生物を含めた全体数に対する割合を求めた。MLSS 濃度は 2,000~2,300mg/L に対し、活性汚泥生物数に占める活性汚泥性生物数の割合は 10~40%程度、活性性、中間、非活性を合せた生物数は 2,400~5,700 個/mL 程度であり、通常の活性汚泥と比較すれば少ない。活性汚泥性生物等の割合と NV 除去率の関係では、活性汚泥性生物の割合が約 44%、中間活性汚泥生物の割合が 54%であった 3 系の NV 除去率は比較的高い傾向が見られた (表-7)。これより活性汚泥性生物の割合が低く中間活性汚泥生物の割合が高い系 (1, 4 系) では、NV の除去率が低く、活性汚泥生物相の影響を受けている可能性がある。3

表-7 曝気槽内水質測定結果

測定項目	曝気槽	1系	3系	4系
MLSS (mg/L)		2,000	2,300	2,300
活性汚泥性生物 (個/mL)		730	1,054	888
活性汚泥性生物の割合 (%)		12.8	43.9	36.5
中間活性汚泥生物 (個/mL)		4,984	1,297	1,526
中間活性汚泥生物の割合 (%)		87.2	54.0	62.7
非活性汚泥生物 (個/mL)		0	50	20
非活性汚泥生物の割合 (%)		0	2.1	0.8
ロウリスG1除去率 (log)		1.9	2.1	1.9
ロウリスG2除去率 (log)		1.9	2.3	1.8

系に比べて 1, 4 系は活性汚泥処理への移行が遅かったことから、活性汚泥処理への移行当初には、活性汚泥性生物の割合が低く、NV 除去率が劣る可能性があることに留意が必要であると考えられた。

原虫類に関して、H 下水処理場処理区内における水系感染症の状況把握のため、震災後から約 1 年半の間に初沈流出水を対象に測定を行った (図-10)。初沈流出水の 9 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 1.50ocyst/L、0.5~1.4cyst/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¹⁷⁾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かったものと考えられた。

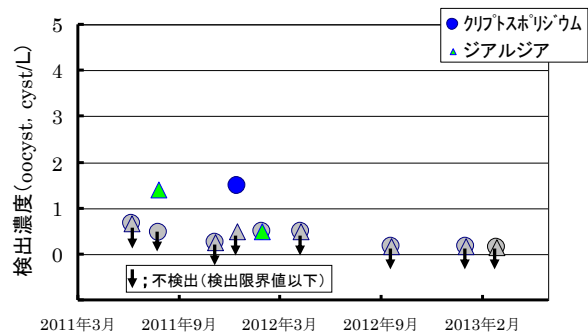


図-10 初沈流出水の原虫類の検出状況

約 1 年半にわたる現地調査や消毒実験により得られた段階的な復旧対策技術の評価結果を表-8 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。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-8 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

3.3.2 活性汚泥のタンパク質量と NV 除去能の関係

回分実験における混合液 20L 中のタンパク質（分子量分画 10KDa 以下はペプチド）量と、その上澄液中の NV 濃度の関係を図-11~13 に示す。曝気混合時間を 1、7、24 時間として実験を行ったが、グラフ上のデータは 7 時間のものである。設定 MLSS を A²O 法と標準活性汚泥法でともに 500、1,000、2,000mg/L となるよう調整を行ったが、A²O 法は 7 時間の曝気混合後において 700、730、2,030mg/L、標準活性汚泥法は 440、840、1,630 mg/L となった。MLSS が高濃度となることでタンパク質（ペプチド）量が多くなる傾向が見られ、それに比例して上澄液の NV 濃度が低減した。特に A²O 法と標準活性汚泥法の活性汚泥で 10KDa 以下のペプチド量に大きな違いが見られたことから、タンパク質などの生成に関与する細菌相等が異なっているものと推定された。

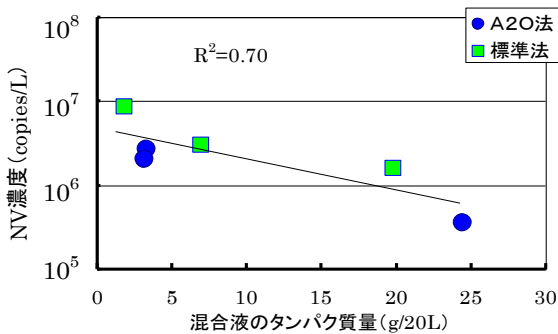


図-11 タンパク質量とNV濃度の関係

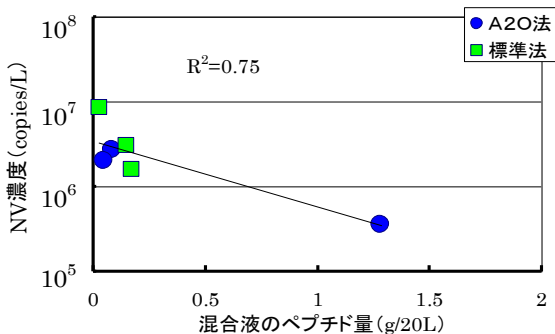


図-12 3-10KDa以下のペプチド量とNV濃度の関係

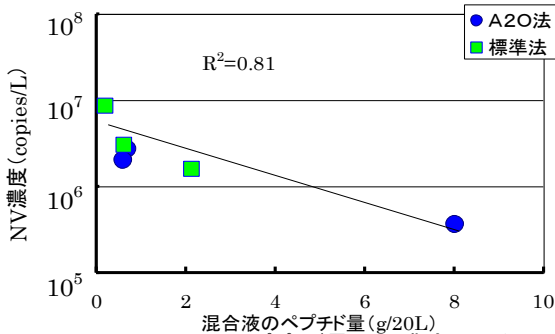


図-13 3KDa以下のペプチド量とNV濃度の関係

上記 3.3.1、3.3.2 の結果から、活性汚泥中に出現する微生物の原生動物や活性汚泥中のタンパク質（ペプチド）量の違いが、NV の除去能に影響を及ぼす要因の 1 つと考えられた。今後、これらの発現を確認するためのデータを蓄積し、ウイルス除去能向上に適した活性汚泥法の管理手法の評価が必要である。

3.4 適正な流域管理のための非点源負荷と対策技術の構築

3.4.1 合流式下水道越流水が放流先水域へ及ぼす影響

本評価では、NV を指標として降雨時の遮集倍率向上にともなう越流水の有無が放流先へ及ぼす影響を明らかにした。併せて、対策技術として雨天時活性汚泥法による NV 負荷の削減効果を評価した。越流水の影響を受けた場合の調査結果を図-14 に示す。この時の時間最大降雨量は約 11mm、累積降雨量は 32mm であった。採水試料は処理場あるいは滞水池へ流入する下水、越流水、越流水放流先の G 河川水（越流水放流口から約 400m 下流）とした。比較対象として晴天時（1、2 月）の G 河川水の値を示す。降雨直前の流入下水の NV 濃度は 10^9 copies/L レベルであり、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。流入下水の NV 濃度は越流直前にはやや低下していた。越流後は、時間経過にともない、雨水による希釈によって流入下水、越流水ともに NV 濃度の低下傾向が見られた。一方、G 河川水の NV 濃度は、1、2 月の晴天時試料を含め、越流開始前には $10^5 \sim 10^6$ copies/L 程度で推移していたが、越流後は一時的に最大検出濃度で 10^7 copies/L レベルに上昇しており、合流式下水道の越流水は公共用水域への NV 汚濁負荷源となる可能性が高いと考えられた。

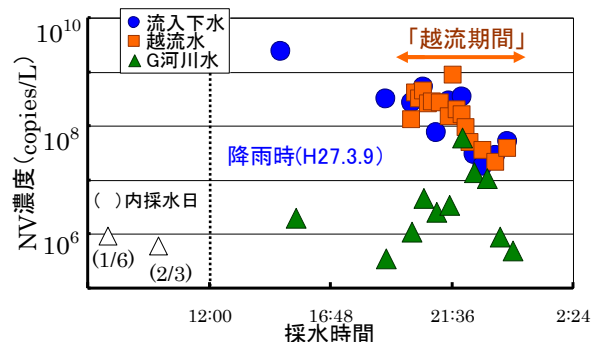


図-14 越流水の放流先への影響評価

下水処理場の施設拡張によって処理能力が増強されたことで、降雨時の遮集倍率向上にともなう越流水の影響が無い状況における調査結果を図-15 に示す。時間最大降雨量は 5.0mm、累積降雨量が 22.5mm における降雨当初の流入下水の NV 濃度は 10^8 copies/L 程度であったが、

時間の経過とともに雨水による希釈により濃度低下が見られた。越流水の影響が無いG河川水のNV濃度は降雨初期において 10^4 copies/L レベルであったが、その後多くの試料が検出限界値以下で推移しており、処理能力を増強し、越流状況を改善することにより放流先河川への影響が小さくなることが明らかとなった。

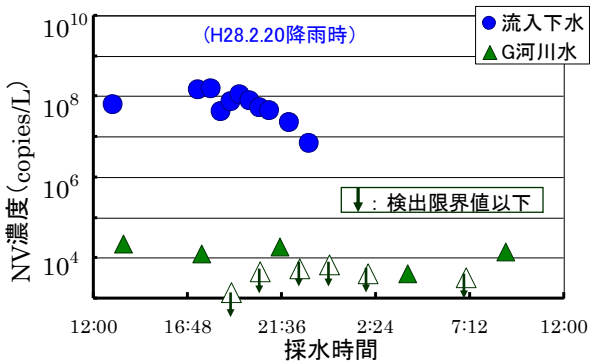


図-15 越流水の放流先への影響評価(遮集倍率向上)

3.4.2 合流式下水道越流水の対策技術によるNV負荷の削減効果

降雨時に越流水対策として雨天時活性汚泥法(嫌気好気法)を導入しているL市M下水処理場におけるNV負荷の削減効果の調査結果を図-16に示す。26年度調査での降雨状況は、時間最大降雨量が5.5mm、2mm、累積降雨量は25mm、12.5mm、27年度では時間最大降雨量が18.5mm、6mm、累積降雨量は54mm、17.5mmであった。本調査時の雨天時バイパス流入量は最大で1Q分であった。雨天時活性汚泥処理時におけるNV負荷の削減効果は、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26年度では0.09~0.12、27年度は0.02~0.06であった。27年度はNV負荷の削減効果がより高まっているが、この要因としては反応タンク内のMLSS濃度の違いによるものと推定され、MLSSを若干高めることでNV負荷の削減効果が高まる可能性が明らかとなった。

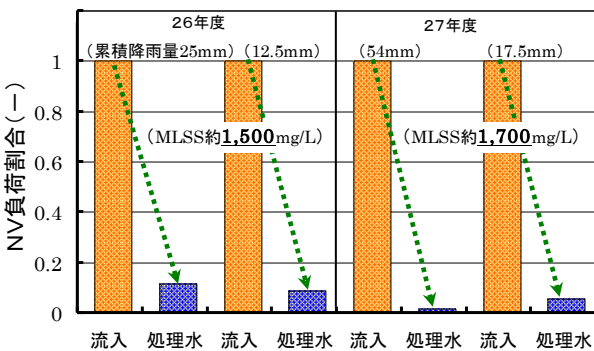


図-16 雨天時活性汚泥処理によるNV負荷の削減効果

雨天時活性汚泥処理を実施しなかったとすると、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直接放流されることとなることから、雨天時活性汚泥処理により放流先河川水への負荷が低減しているものと考えられた。

また、SS、濁度とNV濃度の関係を整理し、その1例として濁度の結果を図-17に示す。NV濃度と濁度との間に高い相関関係(SS含む)が見られることから、濁度、SSなどを指標とすることでウイルス濃度の把握が簡易に行えるものと考えられた。

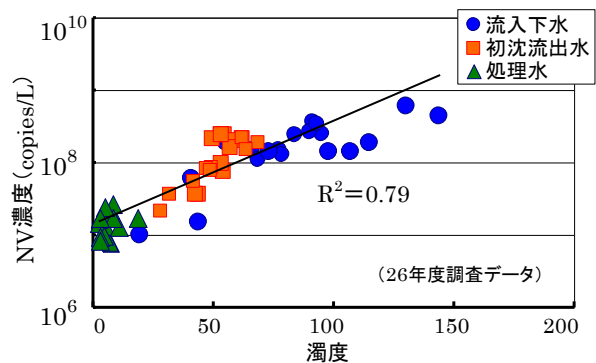


図-17 濁度とNV濃度の関係

3.5 水環境保全システムとしての適切な対策技術の構築

3.5.1 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-18、19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

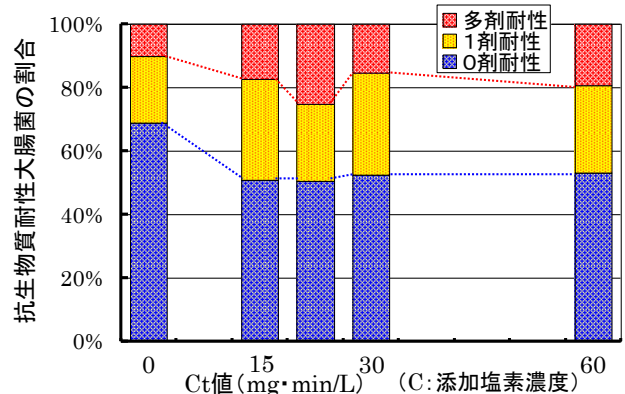


図-18 Ct値と抗生物質耐性大腸菌の割合

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。

また、この時の大腸菌の不活化率を図-19 に示すが、Ct 値を 30~60mgCl/L と高めても不活化率は 2.5~3 log 程度に留まった。

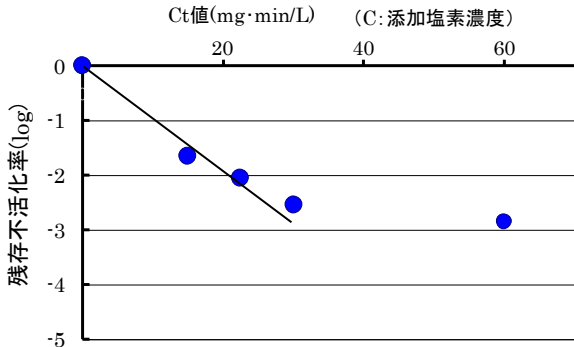


図-19 Ct値と大腸菌の残存不活化率

紫外線消毒による不活化評価結果を図-20 に示す。6 剤耐性大腸菌は 0 剤耐性大腸菌に比較して、紫外線に耐性を有している傾向が見られたが、照射線量を 10mJ/cm² とした比較的低線量において 5log 程度の不活化効果が得られていた。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を発現、また、紫外線消毒にも耐性を示す可能性が考えられた。

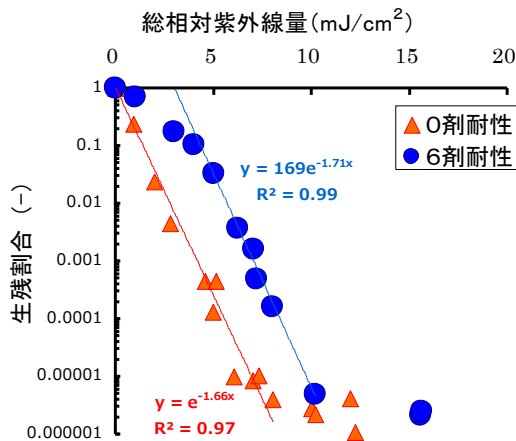


図-20 紫外線消毒による抗生物質耐性大腸菌の不活化特性

下水道統計¹⁸⁾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 カ所あり、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。しかし、紫外線消毒では比較的低線量において多剤耐性大腸菌に対し高い不活化効果が得られる可能

性があることから、抗生物質耐性菌への有効な対策手法の1つとして考えられる。

3.5.2 二次処理水中における抗生物質耐性大腸菌の消長

消毒後に残存した抗生物質耐性大腸菌を想定した消長把握の実験結果を図-21、表-9 に示す。二次処理水への添加にあたり、トリプトソイブイオン培地で培養した後に感受性評価を行ったところ、7 剤耐性が 6 剤耐性となった以外に他の大腸菌に変化はなかった。処理水への添加当初の濃度を基準とし経過日数ごとの濃度比を図-21 に整理したが、最終的に 0 剤耐性と 25922 株では 3 倍程度、4 剤耐性と 35218 株は 2 倍程度上昇し、当初 7 剤耐性であった 6 剤耐性には大きな変化がなく、耐性の度合いと増殖能力に違いのあることが明らかとなった。

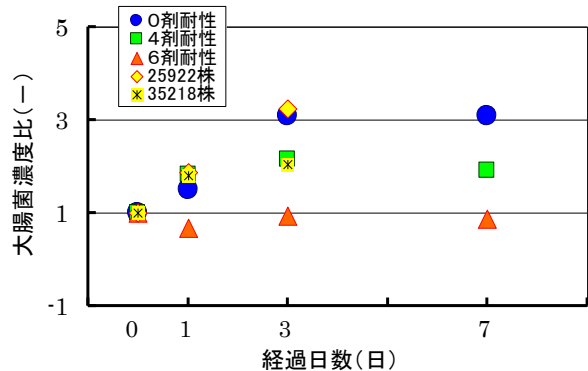


図-21 経過日数と大腸菌の濃度比

二次処理水中における抗生物質耐性大腸菌の増殖に伴う感受性の変化について表-9 に示す。各試料を経過日数ごとに採取し定量培養したコロニーの抗生物質感受性は、0 剤耐性で添加後から一部のコロニーに変化が見られ、7 日後までに採取した 120 コロニーの内 18 コロニーが、25922 株では 5 コロニー、35218 株は 4 コロニーで一部の抗生物質に耐性を示し、4 剤耐性では 1 コロニーのみ 1 剤耐性へと変化した。また、培養後に 6 剤耐性となった大腸菌は 120 のコロニーの内、108 のコロニーが 6 剤耐性を維持、12 のコロニーが当初の 7 剤耐性へと変化した。処理水へ添加後に増殖した多くの大腸菌が当初の耐性能

表-9 二次処理水中における抗生物質耐性

大腸菌の感受性の変化

感受性試験結果(当初)	培養後	添加後	1日後	3日後	7日後	計
0剤耐性大腸菌	0剤	8/30	6/30	1/30	3/30	18/120
4剤耐性大腸菌 (ABPC, TC, CFDN, LVFX)	4剤	0/30	0/30	0/30	1/30	1/120
7剤耐性大腸菌(ABPC, TC, CFDN, LVFX, KM, ST, GM)	6剤	4/30	3/30	4/30	1/30	12/120
ATCC 25922株	0剤	2/30	3/30	-	-	5/60
ATCC 35218株	1剤	1/30	3/30	-	-	4/60

上段: 変異コロニー数 / 下段: 供試コロニー数

力を維持していることから、今回の培養条件では、耐性遺伝子が垂直伝播し受け継がれているものと考えられた。

放流先の環境条件（有機物、水温）などや、抗生物質への感受性の違いにより増殖する可能性があるため、放流先の水利用の状況に応じて極力、下水処理場にて低濃度化を図る必要があるものと考えられた。

一方、0 剤耐性と 25922 株の大腸菌については、トリプトソイブイオン培地による培養直後には感受性に变化が無かったが、処理水への添加実験の当初から一部の大腸菌で耐性を有する傾向が見られた。耐性遺伝子の保有状況を調査した既報¹⁹⁾では、今回の評価と同様の 8 種類の抗生物質に対して、耐性を持たない大腸菌からもプラスミド性あるいは染色体上の耐性遺伝子が検出されていることから、環境条件が変化することで耐性能力を発現する可能性が推定された。

4. まとめ

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した。以下に得られた結果を示す。

「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の実態解明」

- 1) 評価対象とした 8 剤の抗生物質に対し ABPC に耐性を有する大腸菌が下水、河川水、病院排水でともに多く検出され、さらに、多剤耐性大腸菌の大部分が ABPC に耐性を有していることが明らかとなった。
- 2) 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は検出されなかったため、現状において CRE の存在状況は低いと推定された。
- 3) 放流水の影響を受ける河川水中での大腸菌の存在割合で見ると、多剤耐性大腸菌の割合が上昇していた。
- 4) 公共用水域における NV、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 NV 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は検出されなかった。

「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」

- 7) 逆転写回数を 3 回、逆転写 RNA 量を 0.1 μ g、PCR 反応容量に対する供試水量割合を 0.01 とした条件によって NV の検出濃度を高められる可能性があると考えられた。
- 8) 濃縮方法が異なっても上記の条件とすることで、二次処理水、河川水とも最大値が得られた。

「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」

- 9) 被災下水処理場の段階的復旧技術における簡易沈殿処理時には、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。
- 10) 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。
- 11) 初沈流出水からの原虫類の検出濃度・割合は低いことから、調査対象とした被災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。
- 12) 段階的な復旧対策技術を経て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。
- 13) A₂/O 法と標準活性汚泥法の活性汚泥では、10KDa 以下のペプチド量に大きな違いが見られ、NV の除去能に影響を及ぼす要因の 1 つと考えられた。

「適正な流域管理のための非点源負荷と対策技術の構築」

- 14) 合流式下水道の越流水は公共用水域への NV 汚濁負荷源となる可能性が高いと考えられた。
- 15) 降雨時の遮集倍率を向上させ越流状況を改善することにより、放流先河川への影響が小さくなることが明らかとなった。
- 16) 雨天時活性汚泥処理時における NV 負荷の削減効果は、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 0.02～0.12 であった。
- 17) 雨天時活性汚泥法において、反応タンク内の MLSS 濃度を若干高めることで NV 負荷の削減効果が高まる可能性が明らかとなった。

「水環境保全システムとしての適切な対策技術の構築」

- 18) 塩素消毒により抗生物質耐性大腸菌の残存割合が高まる傾向が見られた。
- 19) 紫外線消毒では、比較的低線量においても多剤耐性大腸菌に対し高い不活化効果が得られる可能性があつ

た。

- 20) 二次処理水へ添加した抗生物質耐性大腸菌は、抗生物質への耐性の度合いが異なることで増殖能力に違いのあることが明らかとなった。
- 21) 二次処理水へ添加後に増殖した多くの大腸菌が当初の抗生物質耐性能力を維持していることから、耐性遺伝子が垂直伝播し受け継がれているものと考えられた。

謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、調査対象とした各下水道管理者には特段のご配慮・ご協力を頂いた。また、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) G7 伊勢志摩首脳宣言、平成 28 年 5 月 27 日。
- 2) ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States,2013: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
- 3) 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.
- 4) 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。
- 5) 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.
- 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、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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.

- 11) Instruction of Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)
- 12) 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。
- 13) 平松啓一 編、改訂 2 版、耐性菌感染症の理論と実践、医薬ジャーナル社
- 14) 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>.
- 15) (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。
- 16) (社)日本下水道協会(1997)下水試験方法 (上巻) .
- 17) 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.
- 18) (公社)日本下水道協会(2013) 平成 23 年度版下水道統計。
- 19) 尾崎正明、諏訪守、陶山明子 (2007) 水環境中における病原微生物の消長に関する研究、平成 18 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料第 4080 号、104-111.

STUDY ON DEVELOPMENT OF COUNTERMEASURES TECHNIQUE OF PATHOGENIC MICROORGANISMS IN WATER ENVIRONMENTS

Budget: Grants for operating expenses

Research Period: FY2011–2015

Research Group : Materials and Resources
Research Group

Authors: Mizuhiko MINAMIYAMA
Mamoru SUWA
Nobuhito YASUI

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 still many have to be done to prevent the occurrence of water-borne infectious disease. To do so, 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 the 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 confirmed 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 removal of the pathogenic microorganisms was different according to the restoration level of the countermeasures technology.

In the evaluation of the determination technology of the norovirus it was presumed that the detection concentration improved when ribonucleic acid samples were extracted under each modification condition by the reverse transcription and polymerase chain reaction.

For the investigation of the combined sewer system, the combined sewer overflow (CSO) 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 90 to 98%.

About 5 log as the inactivation ratio of both the *E.coli* and multi-drug resistant *E.coli* added to the secondary effluent was obtained by the ultraviolet disinfection more than 10mJ/cm² irradiated.