演題　排水処理と病原微生物
講師　（独）土木研究所　材料地盤研究グループ　リサイクルチーム　尾崎正明 上席研究員

排水処理と病原微生物

(独)土木研究所 材料地盤研究グループ リサイクルチーム
尾崎 正明、諏訪 守、陶山 明子

１　はじめに

下水処理水が関与した病原微生物による集団感染の未然防止、また、下水処理水や汚泥の再利用にあたり、下水処理水や下水汚泥に含まれる病原微生物に関する安全性の確保が求められている。このため、極微量の病原微生物を検出する方法の開発や、下水処理過程や環境水中での病原微生物の挙動把握が重要となっている。平成 8 年に、河川水中に存在したクリプトスポリジウムが水道水に混入して配水されたため、9,000 人近い集団下痢の被害が発生した。この集団感染においては、感染者から排出された多数の原虫が排水処理施設で十分に除去されなかったことが感染拡大の一要因であると考えられており、下水道としての対応が求められている。また、これまで対象とされなかったウイルスについても、下水中での存在量や消毒耐性が細菌類と異なることから、安全性に関する検討が必要となっている。

２　下水処理水の再利用水質基準

クリプトスポリジウム等の病原微生物による健康被害が社会問題となり、水の安全性への関心が高まっている。また、建築物衛生法関連政省令が改正され、雑用水利用の給水設備を対象として新たな基準が設定され、平成 15 年 4 月より施行されている。このような状況を踏まえ、再生水利用における衛生学的安全性確保、美観･快適性確保、施設機能障害防止の観点を踏まえた下水処理水再利用に関する技術上の基準について検討が行われ、「下水処理水の再利用水質基準等マニュアル」(平成 17 年 4 月)が作成された。

衛生学的安全性確保の観点からは、腸管系の病原微生物である細菌類、原虫類、ウイルス類が問題となる可能性がある。細菌類については、現在再生水の消毒方法として広く採用されている塩素消毒が有効であり、原虫類については塩素耐性があることから、区別して検討が行われた。なお、ウイルス類については、再生水利用における衛生学的安全性確保に万全を期するためにも、今後も引き続き検討を行い、安全性を確認していくことが必要とされた。

細菌類の基準では、水道水質基準の変更や建築物衛生法施行規則の改正において雑用水の水質基準が大腸菌群から大腸菌へ変更されたこと等を踏まえ、従来の大腸菌群に代え大腸菌が新たに基準項目として設定された。また、基準値についても、水道水質基準や建築物衛生法施行規則における基準(検水量 100mL 当たり不検出)を参考に規定された。さらに、再生水の供給過程における再増殖の可能性への対策として、残留効果の高い塩素消毒を行うこととし、残留塩素が管理目標値として設定された。管理目標値については、実態調査の結果、供給先における残留塩素が建築物衛生法施行規則における基準値を満たしている場合には細菌類の再増殖がほとんど見られなかったことから、同法施行規則における残留塩素基準値(結合残留塩素濃度 0.4mg/L 以上)を参考に規定された。

原虫類の基準では、再生水の供給過程における閉塞防止の観点から、砂ろ過施設または同等以上の機能を有する施設が施設基準として規定された。また、施設が適切に機能していることを担保する運転管理指標として、濁度が管理目標値として設定された。管理目標値については、「下水道施設計画･設計指針と解説」における急速ろ過法の処理成績例が濁度 2.3 度(平均値)となっていること、また、実態調査

において施設が適切に機能していることが確認されているろ過施設からの処理水の濁度が2度を超えることがほとんどなかったことを踏まえ、2度以下と設定された。

3　検出方法の開発

下水処理水や汚泥の再利用におけるクリプトスポリジウムやウイルスに関する安全性確保を目的として、これら病原性微生物を迅速・簡便・安全に検出できる方法の開発や、下水処理過程や環境水中での挙動解明について研究を行っている。培養法や検鏡法に比べて簡便性などの面で優位であると考えられることから、分子生物学的手法を用いた検出手法（特にPCR (Polymerase Chain Reaction) 法）の適用・開発を主眼に置いている。

リアルタイムPCR法は、PCRにより増幅されたDNAを蛍光シグナルによりリアルタイムで検出するものであり、初期DNA濃度とある蛍光強度に増幅されるまでのサイクル数の関係を求めておくことによって、未知試料中のDNA濃度を定量するものである。これまでに、高感度検出が可能と考えられるクリプトスポリジウムの18Sリボソーム RNA遺伝子を標的として検出感度を向上させた結果、クリプトスポリジウムオーシストが約1個という少ない個数から検出できることが明らかになった。また、濃縮・分離操作および下水性状の違いが検出感度に及ぼす影響について検討を行った結果、オーシストの測定では試料中の有機物濃度の違いによる影響や濃縮・分離操作により回収効率の損失があるため、改善策を講ずる必要があることが明らかとなった。

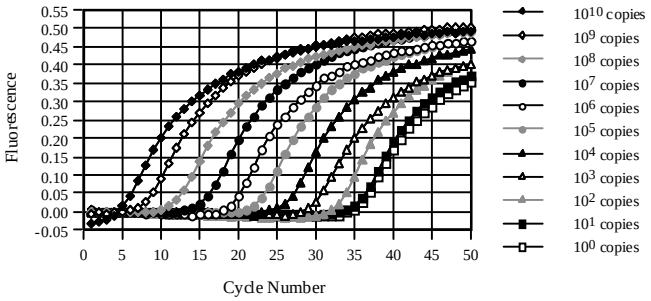
ウイルスの検出では、モデルウィルスとしてQβファージを使用して、下水試料に適した濃縮法について検討を行った。**表－1**にPEG(ポリエチレングリコール)沈殿法、超遠心法、陰電荷膜法、陽電荷膜法、セルロース吸着･凝集法によるファージ回収率を示す。最も高い回収率を示したのはPEG沈殿法であった。一方、陽電荷膜法および陰電荷膜法による回収率は0.6％－13％と低かった。データは示していないが、これらの膜へのファージ吸着率は95％以上であったため、誘出操作を改善することで回収率の向上が期待される。セルロース吸着・凝集法による回収率は10%前後と低かった。その原因として、ファージQβ量(10^6 PFU)に対してセルロース担体量が少なかったためであると考え、セルロース担体量は一定のまま、ファージQβ添加量を10^4 PFUに減少すると、回収率は56％－98％に改善された。また、10^{11} PFUに増加すると、回収率は5％前後に低下した。

リアルタイムPCR法によるウイルスの定量感度を把握するため、ノロウイルス(Ｇ1、Ｇ2)型、エンテロウイルスおよびQβファージについて検出感度の検討を行った。ノロウイルスＧ2型の結果のみ示すが、**図－1**は各希釈系

表－1　各種濃縮法によるファージQβ回収率

濃縮法	回収率(%)		
	流入下水	二次処理水	高度処理水
PEG沈殿法	60	67	84
超遠心法	59	30	20
陰電荷膜法	5.5	1.7	0.6
陽電荷膜法	0.68	2.3	13
ｾﾙﾛｰｽ吸着・凝集法	—	16	8.7

ファージQβ初期添加量：10^6 PFU



図－1　PCRリサイクル数に対する蛍光強度

図－2　各希釈系列とPCRサイクル数の関係

列についてPCRサイクル数に対する蛍光強度、**図－2**は各希釈系列について蛍光強度が指数的に増加し始めるサイクル数と希釈濃度の対数値に対してプロットし得た検量線を表している。各試料ともに５～10^{10}コピーの間で蛍光強度と相関性があり、この範囲で定量測定が可能であると推定された。

４　下水処理場での病原微生物除去特性

モンスーン･アジア都市部においても都市化の進展、人口の集中などに伴いヒトからの排泄物により、病原微生物の汚染による水環境の悪化が懸念されている。これら病原微生物に起因する水系感染症の拡大を防止するためにも、下水を含めた水環境中の実態解明や効果的な対策を講ずることが必要である。本研究では、沖縄県におけるラグーン実験施設およびタイ国で採用されているラグーンを対象として、下水中の病原微生物の実態やラグーンでの除去特性の解明を目的に実態調査を行った。

4.1　沖縄県での調査事例

ラグーンにおける降雨、流出 SS、日間変動などが病原微生物の消長に及ぼす影響やまた、ラグーン処理水の処理レベルの高度化を図るため、植生浄化法による病原微生物の除去特性を把握した。ラグーンによる病原微生物の除去特性調査は、沖縄県A浄化センター内に設置してあるラグーン実験施設において実施した。ラグーンの容量は $100m^3$、水深は２m であり、ラグーン実験施設の後段には処理水の高度処理を目的とした施設面積約 $0.09m^2$、水深 30cm のアシを植生した浄化施設を有する。

各指標微生物の、濃度と除去率について整理したものを**表－２**に示す。ラグーンによる大腸菌群数の除去率は 80%程度であり、降雨時、晴天時でもラグーン処理水の濃度に大きな違いはなく日間変動も小さかった。大腸菌ファージ除去率は、降雨時および晴天時とも日間平均値で 70%程度であった。しかし、降雨時においてラグーン処理水の濃度はほぼ一定であるが、晴天時の調査では、夜中から朝方にかけ若干の濃度上昇が見られた。ウイルスの除去率は、降雨時および晴天時とも日間平均値で 90%程度であった。原虫類のジアルジアでは、降雨時と晴天時の流入下水の濃度で大きな違いがあり、降雨時と晴天時において若干除去率に差があるものの、ラグーン処理水の平均濃度はほぼ同じであった。クリプトスポリジウムは、流入下水で 1～4 個/L の範囲で検出される場合もあったが、ラグーン処理水からは検出されていない。

一方、降雨に伴うラグーン施設からの流出流量は設定流量に対し 10%程度の増加が見られたことから、流出汚濁負荷量は若干上昇するものと考えられた。植生浄化法では、大腸菌群数、ジアルジアは 1 ケタ程度濃度レベルが減少したが、ファージについては、大きな濃度レベルの減少は見られなかった。ラグーンでの SS 除去率は低く、また植生浄化法でも 30%程度であるため、ラグーンでの固液分離を良好に行えれば、さらに各指標微生物の除去率を向上させられるものと推定される。

表－2　各指標微生物の濃度と除去率

		大腸菌群数 (個/mL)	ウイルス (上澄液) (copies/100ml)	ファージ (Pfu/mL)	ジアルジア (個/L)	SS (mg/L)
降雨時 ()内:除去率%	流入下水	4.9E+5	1.8E+2	5.8E+3	1.0E+2	73
	ラグーン処理水	1.0E+5 (79%)	1.9E+1 (90%)	1.9E+3 (68%)	2.0E+1 (80%)	67 (8%)
	植生浄化処理水	3.6E+4 (93%)	(←)	1.5E+3 (74%)	1.0E+0 (99%)	52 (29%)
晴天時 ()内:除去率%	流入下水	4.6E+5	6.1E+1	4.1E+3	5.6E+2	98
	ラグーン処理水	1.1E+5 (77%)	6.3E+0 (90%)	1.2E+3 (71%)	2.4E+1 (96%)	108 (－)
	植生浄化処理水	2.1E+4 (95%)	(←)	1.0E+3 (76%)	1.5E+0 (98%)	63 (36%)

（滞留時間:ラグーン10日間･植生浄化12時間）

4-2　タイ国での調査事例

タイでの調査は、コンケンおよびバンコクのアジア工科大学（AIT）に隣接するラグーンを対象とした。コンケンは個々の家庭でセプティプタンクあるいは浸透式トイレ形式と推定され、その流出水がラグーンに流入するものと考えられる。AIT では水洗トイレにより下水はラグーンに排出される。各々のラグーン施設の概要を**図－3、4** に示す。コンケンは 3 池のラグーンから構成されており、第 2 池で間欠曝気を行い、総容量は 46,000m^3、平均水深は 2 m である。AIT は 2 池のラグーンから構成されており、容量は 2,125m^3、3,360m^3、水深は 1.7m、0.7mである。AIT では流入下水、第 1、2 池流出水、コンケンでは流入下水、第 2、3 池流出水の各々3 試料について採水を行った。

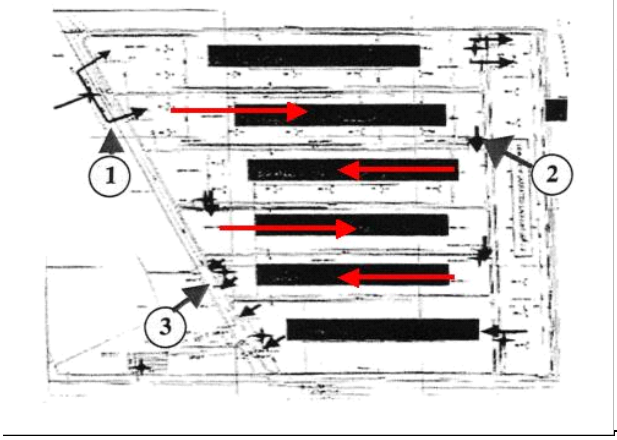


図-3　コンケンのラグーン施設
(1:流入下水，2:第 2 池流出水，3:第 3 池流出水)

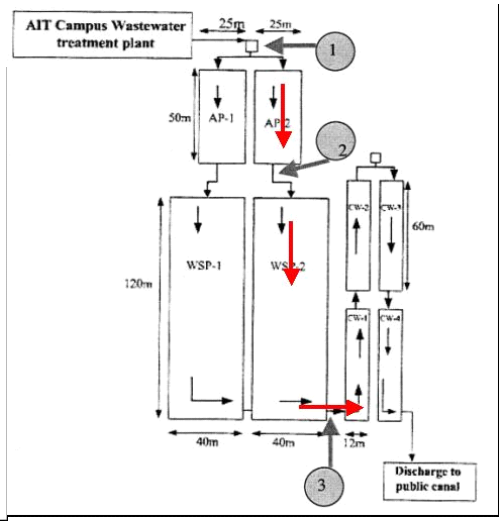


図-4　AIT のラグーン施設
(1:流入下水，2:第 1 池流出水，3:第 2 池流出水)

調査結果を**表－3** および**図－5～8** に示す。コンケンと AIT において各々病原微生物の濃度に大きな違いが見られた。特に AIT の流入下水ではジアルジアのシスト濃度の最大検出濃度は 1.8×10^4（cysts／L)、ノロウイルス（G1 型）濃度は 3.5×10^6（copies／L）となっており、沖縄県でのラグーンの調査結果と比較すると、流入下水の濃度は 2～3 オーダー高い。大腸菌群の濃度レベルは同程度であった。

表－3　　各病原微生物の検出濃度範囲と除去率

地点＼微生物		大腸菌群 (cfu or MPN/ml)	ノロウイルスG1 (copies/L)	ノロウイルスG2 (copies/L)	ジアルジア (cysts/L)	クリプトスポリジウム (oocysts/L)
記載データ		H16.6月～H17.2,3月	H16.6～12月.H17.1月		H16.6月～H17.1月	
コンケン	流入下水	4.4E+2～2.3E+5	1.1E+4～9.7E+5	4.1E+2～1.6E+5	ND～1.5E+2 〔7/8〕	ND 〔0/8〕
	第2池流出水	4.0E+1～3.0E+4	ND～1.0E+3	ND～1.7E+4	ND～2.2E+1 〔2/8〕	ND 〔0/8〕
	第3池流出水	3.8E+1～2.2E+4	ND～2.9E+2	ND～1.0E+4	ND～1.0E+0 〔1/8〕	ND 〔0/8〕
	除去率の範囲(%)	0～99.6	82.3～100	0～100	99.3～100	—
	平均除去率(%)	83.2	94.2	85.0	99.9	—
AIT	流入下水	2.1E+4～9.0E+6	4.5E+4～3.5E+6	1.7E+4～2.0E+6	2.6E+2～1.8E+4 〔9/9〕	ND～1.6E+1 〔5/9〕
	第1池流出水	4.6E+3～1.6E+6	1.0E+5～2.2E+6	1.3E+4～1.3E+6	1.1E+1～4.1E+2 〔9/9〕	ND～2.0E+0 〔2/9〕
	第2池流出水	7.0E+1～5.0E+3	3.6E+1～4.2E+5	ND～6.0E+4	3.0E+0～2.8E+1 〔9/9〕	ND 〔0/9〕
	除去率の範囲(%)	98.1～99.99	0～99.97	56.8～100	94.6～100	100
	平均除去率(%)	99.6	65.7	92.3	99.2	100

原虫類の欄〔 〕内：下段分析検体数，上段検出検体数，検出限界値範囲 1～4 oocysts/L
検出限界値以下の場合には除去率を 100%として計算した

クリプトスポリジウムの検出割合は比較的高いが、検出濃度はジアルジアに比較して低濃度であった。一方、コンケンの流入下水の病原微生物濃度は AIT と比較してそれ程高濃度ではないが、沖縄県でのラグーンの流入下水のノロウイルス濃度と比較すると、最大検出濃度は 2 オーダー高い。クリプトスポリジウムは全ての試料で不検出であった（検出限界値 1～4oocysts／L)。コンケンと AIT における流入下水の病原微生物濃度の違いは、先にも述べたが下水の排除方式の差によるものと推定されるが、今後、詳細な現地調査を行いこれらの違いについて解明する必要があろう。

環境水に大きな影響を及ぼすと考えられるラグーン処理水の病原微生物濃度は各々低レベルとなっている。ラグーンによって各病原微生物とも 1log 程度から 3log 以上の平均除去率が得られており、ラグーンの滞留時間が 10 日間での沖縄県で行った調査結果と比較すると大腸菌群、ジアルジアの除去率は高い。除去率が高い要因はラグーンの配置が多段であることや、推定ではあるが滞留時間が異なることに起因するものと考えられる。しかし、ノロウイルスの除去率の推移に関して**図－5～8** に示したが、比較的大きな変動を示した。ラグーン内の溶存酸素濃度とコリファージの藻類等の浮遊状粒子への吸脱着現象についての報告があることから、ウイルス除去率と溶存酸素濃度との関係を整理したが、有意な相関関係は見られなかった。また、他の水質項目との関連も特に見られなかった。

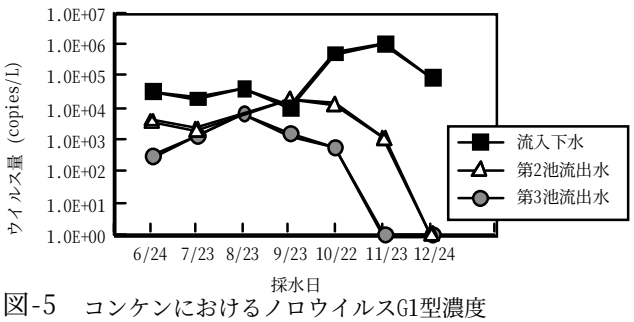


図-5　コンケンにおけるノロウイルスG1型濃度

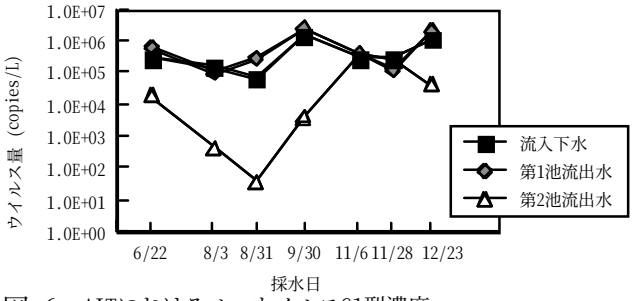


図-6　AITにおけるノロウイルスG1型濃度

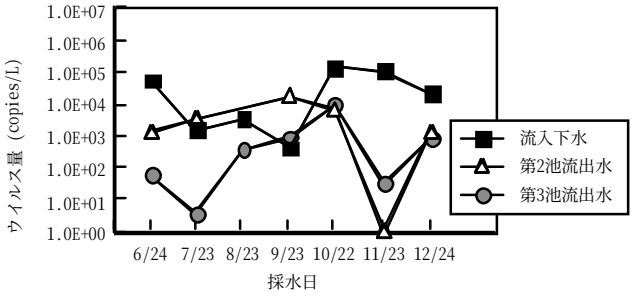


図-7　コンケンにおけるノロウイルスG2型濃度

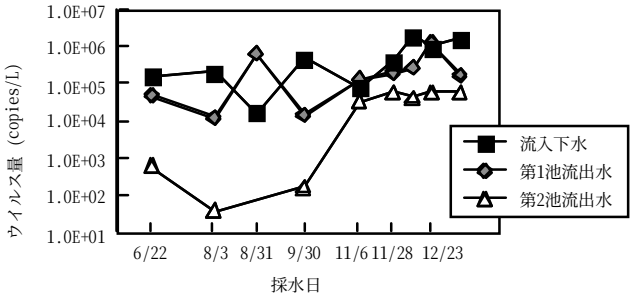


図-8　AITにおけるノロウイルスG2型濃度

5　おわりに

わが国においても腸管系ウイルスによる感染事例や水系での存在状況、消毒耐性に関する報告がみられる。培養細胞を使用したウイルス分離試験によると、感染力を保持したウイルスの存在が確認できる。その結果では、下水からは高い確率で腸管系ウイルスが検出され、下水処理過程で相当量が除去あるいは不活化されると考えられるものの、放流水からも検出されることが報告されている。

ノロウイルスは食中毒患者の糞便を電子顕微鏡で観察し発見されたウイルス様粒子である。このウイルスは培養細胞を用いて分離することはできないため、下水および河川水からの検出は PCR 法による遺伝子検査が主流である。PCR 法を用いた検出方法の開発については上述したが、ウイルス粒子を構成する遺伝子の一部を検出するため、ウイルスの生死が判定できない問題がある。

一方、消毒耐性については「ウイルスの安全性からみた下水処理水の再生処理法検討マニュアル(案)」

において、ポリオウイルスを用いた結果が報告されている。ポリオウイルスは培養法で濃度の測定ができ、ワクチン株なので安全性が高く多くの消毒実験に用いられている。　以上、ウイルス類に関する現状を述べた。今後とも、検出方法の開発、消毒耐性を含めた下水処理過程での挙動などについて検討を進め、下水処理水や下水汚泥に含まれる病原微生物に関する安全性の確保を図っていきたい。

謝辞

「４　下水処理場での病原微生物除去特性」に係る調査は、文部科学省予算「アジア・モンスーン地域における水資源の安全性に関わるリスクマネジメントシステムの構築」の研究助成を受けて実施したものである。なお、タイ国での調査は、アジア工科大学のシピン博士、コンケン大学のパイラヤ博士と共同で実施した。

参考文献

1) 国土交通省都市･地域整備局下水道部、国土技術政策総合研究所(2005)、下水処理水の再利用水質基準等マニュアル
2) 諏訪ら(2004)、ラグーンによる病原微生物の除去特性、第 41 回下水道研究発表会講演集、p942-944
3) 陶山ら(2005)、日本およびタイにおける下水中の腸管系ウイルスの実態と下水処理施設における消長、第 42 回下水道研究発表会講演集、(投稿中)
4) 矢野(2003)、SRSV(小型球形ウイルス：Small Round Structured Virus)による水系感染、水環境学会誌、Vol.26、NO.1、p8-13
5) 高度処理会議(2001)、ウイルスの安全性からみた下水処理水の再生処理法検討マニュアル(案)

【質疑応答】

Q：講演の始めに紹介されました今回の雑用水としての再利用水質基準は大腸菌として 100mL 中検出されないなど、従来のものよりかなり厳しいものとなっているようです。この理由と、一方では放流水の 1mL 当たり大腸菌群数として 3000 個という技術上の基準と随分オーダーが違ってきていますが、これについてのコメントをお願いします。

A：再利用水の基準には残留塩素の項がありますが、塩素処理をきちんと行えば、雑用水の基準と同程度の大腸菌のレベルは確保できるという考えであったと思います。放流水の基準の話ですが、大腸菌群数を大腸菌に替えるという指標の問題を始めとしていろいろ議論されていくと思います。

（尾崎講師）