

下水道未整備区域を対象とした 都市排水中の病原微生物による河川の汚染実態調査

諏訪 守・桜井健介・津森ジュン

1. はじめに

病原微生物の検出技術の高度化により、下水や公共用水域での汚染実態が徐々に明らかになる中で、それらに起因する集団感染発生が危惧されている。現行の水質指標である大腸菌群数では、新たな病原微生物の汚染実態を十分に把握できないこともあり、公共用水域に対する各種汚染源の解明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。

このため土木研究所リサイクルチームでは、研究課題「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」(H23～27)を実施している。

本報では、その研究成果の一部として病原微生物の負荷源を明らかにすることを目的に、下水道未整備区域であり主として浄化槽排水が負荷源として考えられる流域を有する河川を対象に、冬季における感染性胃腸炎の原因ウイルスの1つであるノロウイルスや、耐塩素性原虫類の存在実態を評価した。

2. 調査目的および方法

2.1 処理施設別汚水処理人口の普及状況

公共用水域に対する病原微生物の負荷源として、下水処理場の放流水などの点源負荷や、道路、宅地、農地の流出水である非点源負荷が様々に想定され、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、対策手法の構築や評価が重要である。国土交通省資料によれば、平成25年度末の汚水処理人口普及率は88.9%に達している。図-1に示す処理施設別普及状況によれば、下水道が86.6%を占め、次いで浄化槽の割合が10%、農業集落排水処理施設が3.2%の順となっており、汚水処理人口に占める浄化槽の処理人口は比較的多く点源負荷として着目する必要がある。下水や下水処理水中における病原微生物の実態については、「下水道におけるクリプトスポリジウム検討委員会」(2000)や「下水道におけるウイルス対策に関する

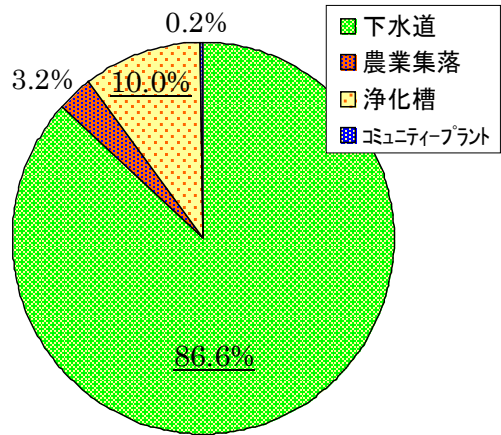


図-1 平成 25 年度末の処理施設別汚水処理人口普及状況

調査委員会」(2010)での調査結果等があり、原虫類、ノロウイルスの実態の解明は徐々に進みつつある。しかし、下水道に次いで汚水処理人口が多い浄化槽については、個別住宅などに設置されており調査が難しいことなどから、実態調査例は極めて少ない状況である。

本報では、公共用水域へ排出される都市排水の一部として浄化槽排水中の病原微生物による汚染実態を把握することを目的に、下水道が未整備で浄化槽整備集落が流域に存在する河川を対象に、ノロウイルスや原虫類の調査を行った。

2.2 調査対象河川

調査対象河川はA県内にあるB河川、C、Dの2水路とした。これらの3河川等の流域には、下水道未整備区域であり単独・合併浄化槽により生活排水を処理している地域が含まれる。調査対象河川等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、C、D、Bの順で人口負荷が多い。調査は平成23、24年度において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河川等を対象として4～6時

Investigation of pathogenic microorganisms in river water affected by domestic wastewater discharged from the areas without sewerage system.

間隔で24時間採水を計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)
B河川	約 210戸	約 60戸	約220	—	約220
C水路	約 120戸	約 30戸	約110	小学校等(約330)	約440
D水路	約 240戸	約 60戸	約220	保育園(約60)	約280

2.3 各病原微生物の測定方法

ノロウイルスの測定法の概略を以下に示す。

・試料の濃縮：測定にはまず試料中のウイルスを濃縮する必要がある。濃縮は遠心沈殿により、ウイルスを沈殿しやすくするためにポリエチレングリコールと塩化ナトリウムを添加し10,000×G、30分間の遠心沈殿を行い、沈殿物を回収し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。

・ウイルスRNAの抽出・精製：ウイルス遺伝子(RNA；リボ核酸、ribonucleic acid)は、**グアニジン法**^{*}によりウイルスたんぱく質を溶解させ、抽出カラムを用いRNAを抽出した。下水試料には様々なDNA(デオキシリボ核酸、Deoxyribonucleic acid)が含まれており、後述するPCR(Polymerase chain reaction)や逆転写反応(Reverse Transcription)の阻害を回避させるためDNAを処理するとともにClean up KitでウイルスRNAを精製した。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¹⁾。

・ウイルスRNAの逆転写反応：RNAではPCR反応させられないため、DNAに変換し、逆転写反応キットを利用し、上述のRNAをcDNA(Complementary DNA)に変換した。

・リアルタイムPCRによるcDNAの定量：リアルタイムPCR法により、特定の遺伝子をリアルタイムPCR装置で複製させ、cDNAの定量を行い、試料1リットル当たりのノロウイルス濃度(単位：コピー/L)を算出した。PCR反応条件などは「ノロウイルスの検出法について」²⁾に準じた。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。

原虫類^{*}(クリプトスポリジウムとジアルジア)

の測定法の概略を以下に示す。

・試料の濃縮：ウイルスと同様にまず濃縮が必要であり、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原虫を剥離させ、1,050×G、10分間の遠心沈殿を行い濃縮試料を作成した。

・原虫の分離・染色・定量：免疫磁気ビーズ法により濃縮試料から原虫を分離し、蛍光抗体染色を行い、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し定量を行った。

なお、原虫類の測定試料は4～6時間毎に採水を行った24時間採水試料を混合したものとした。

その他の水質測定項目：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. 浄化槽排水負荷の影響を受ける河川等調査の結果

調査結果を表-2、3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³⁾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B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%程度であった。C、D水路では流量状況により概ね20～90%で推移しており、水量の多くが浄化槽排水で

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 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	B河川	968	51	5.3%
	D水路	57	51～55 ^{**}	89～96%
平成24年2月下旬	B河川	3,223	51	1.6%
	C水路	86	25～52 ^{**}	29～60%
	D水路	137	51～55 ^{**}	37～40%
平成25年1月下旬	B河川	1,757	51	2.9%
	C水路	156	25～52 ^{**}	16～33%
	D水路	101	51～55 ^{**}	50～54%
平成25年2月下旬	B河川	7,322	51	0.7%
	D水路	69	51～55 ^{**}	74～80%

^{*} 1人230L/日と仮定³⁾

^{**} 小学校等の**昼間人口**として1人230L/日の35%量と仮定³⁾

^{*}土木用語解説：グアニジン法、原虫類(クリプトスポリジウム、ジアルジア)

あると推定された。

表-3は各採水試料中のノロウイルスG1、G2濃度（G1、G2の遺伝子型がヒトに感染するものとして分類され、集団感染発生の報告数ではG2が多い）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ノロウイルス濃度を示した。概ね1リットル当たり $10^4 \sim 10^6$ コピーの範囲内で推移していたが、23年度はノロウイルスG2はノロウイルスG1と比較して検出濃度が高いのに対し、24年度は全ての試料でG1の検出濃度が高い状況であった。調査時期の違いにより遺伝子型の検出状況が異なっていることから、調査対象地域の流行状況の影響を受けているものと推定された。

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		ノロウイルスG2 平均濃度 (コピー/L)	ノロウイルスG1 平均濃度 (コピー/L)	昼間人口を加え たG2平均濃度 (コピー/L)	昼間人口を加え たG1平均濃度 (コピー/L)
平成24年 1月下旬	B河川	2.3E+06	1.9E+05	—	—
	D水路	1.1E+06	7.6E+04	1.0E+06	7.0E+04
平成24年 2月下旬	B河川	5.1E+05	9.4E+04	—	—
	C水路	3.8E+05	6.9E+04	1.8E+05	3.3E+04
	D水路	3.2E+05	5.9E+04	3.0E+05	5.5E+04
平成25年 1月下旬	B河川	5.2E+03	3.2E+04	—	—
	C水路	3.4E+04	2.7E+05	1.6E+04	1.3E+05
	D水路	4.0E+04	7.0E+04	3.7E+04	6.5E+04
平成25年 2月下旬	B河川	2.4E+05	1.3E+06	—	—
	D水路	1.9E+04	2.4E+04	1.8E+04	2.2E+04

一方、既往の調査研究による1～2月の下水処理水のノロウイルスG2平均濃度は、通常の活性汚泥法処理水であれば 10^5 コピー/Lレベル、窒素・りんを除去する高度処理法処理水では 10^4 コピー/Lレベル⁴⁾であり、それらと比較して浄化槽排水のノロウイルス濃度レベルは同じかやや高い状況にあった。また、河川水量に占める浄化槽排水の割合が最大で90%程度を占めていたD水路からの採水試料において残留塩素が検出されなかった（表-4）。浄化槽の多くは固形塩素により消毒を行っており、適正な管理がなされていれば、少なくともD水路の試料から残留塩素が検出されると推定されたが、全ての採水試料において残留塩素が検出されなかった。このことから、消毒効果は低いと推定され、浄化槽での消毒管理の適正化が必要と考えられた。

他の水質指標との関連として採水試料中のSS濃度とノロウイルス濃度の関係を図-2、3に整理した。SS濃度とノロウイルス濃度には相関関係が見られ、SS濃度の上昇とともにノロウイルス濃度が高まる傾向を示した。各採水地点の上流域では浄化槽排水以外に生活排水由来の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。

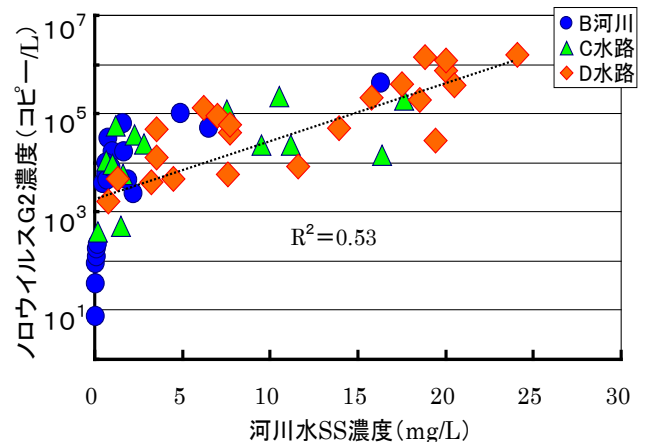


図-2 河川水のSS濃度とノロウイルス濃度の関係

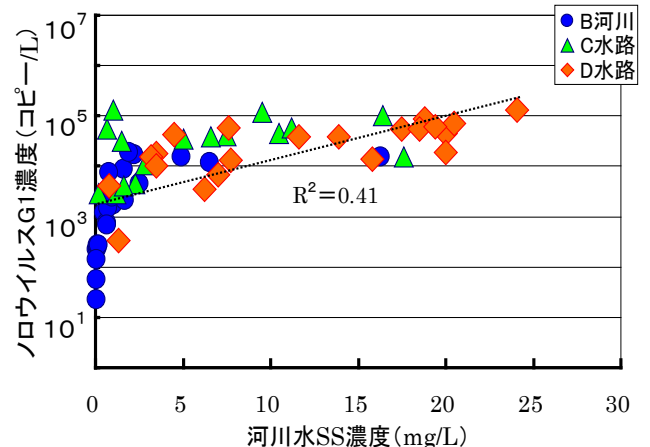


図-3 河川水のSS濃度とノロウイルス濃度の関係

次いで、原虫類の調査結果を表-4に示す。4～6時間おきに24時間採水し得られた試料を混合し分析を行ったことから、その測定水量は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0.03～0.2 個/L）であるが、ジアルジアの検出濃度は1試料において0.54 個/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 (個/L)	ジアルジア (個/L)	検出限界値 (個/L)	残留塩素濃度 (mg/L)	
平成24年 1月下旬	B河川	N.D.	N.D.	0.06	0
	D水路	N.D.	N.D.	0.03	0
平成24年 2月下旬	B河川	N.D.	N.D.	0.20	0
	C水路	N.D.	N.D.	0.05	0
	D水路	N.D.	0.54	0.05	0
平成25年 1月下旬	B河川	N.D.	N.D.	0.31	0
	C水路	N.D.	N.D.	0.07	0
	D水路	N.D.	N.D.	0.05	0
平成25年 2月下旬	B河川	N.D.	N.D.	0.22	0
	D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ノロウイルス、原虫類の排出負荷源として浄化槽排水の存在が明らかとなったが、その排水のノロウイルス濃度は既往調査の下水処理水中濃度と比較して同レベルか高濃度であると推定された。特に、河川水量に占める浄化槽排水の割合が高いD、C水路では、ノロウイルスやSSが高濃度であるため、浄化槽の適切な維持管理を通じて排出負荷の削減を図る必要があるものと考えられた。

従って、公共用水域における衛生学的な安全性を担保するためには、下水道のみならず他の汚水処理施設においても適切な対応の構築が急務である。

4. おわりに

本報では、病原微生物の負荷源を明らかにする一環として、下水道未整備区域であり主として浄化槽排水が負荷源として考えられる流域を有する河川等を対象に、冬季における感染性胃腸炎の原

因ウイルスの1つであるノロウイルスや、耐塩素性原虫類の存在実態を評価し、以下のことが明らかになった。

- 1) 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、浄化槽排水に着目すべきことが明らかとなった。
- 2) 下水処理水と比較して、浄化槽排水のノロウイルス濃度レベルは同じかやや高い状況にあると推定された。
- 3) 浄化槽によるSS除去性能の変動が放流先水域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。
- 4) 調査対象地域の浄化槽では、消毒管理の適正化が必要と考えられた。

謝 辞

本調査を実施するにあたり、A県の下水道管理者関係各位には、浄化槽設置戸数データの提供や採水地点の選定に際し多くの協力を得た。ここに記し謝意を表する。

参考文献

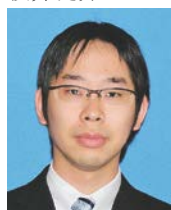
- 1) 諏訪守、岡本誠一郎、尾崎正明、陶山明子、下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響、下水道協会誌論文集、46(561)、pp.91~101、2009
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課、ノロウイルスの検出法について、2007
- 3) (社)日本下水道協会：流域別下水道整備総合計画調査指針と解説、2008
- 4) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介：ノロウイルスの除去率に及ぼす下水処理法の影響因子、下水道協会誌論文集、47(571)、pp.103~111、2010

諏訪 守



(独)土木研究所つくば中央研究所
材料資源研究グループリサイクル
チーム 主任研究員、博士 (工学)
Dr. Mamoru SUWA

桜井健介



(独)土木研究所つくば中央研究所
材料資源研究グループリサイクル
チーム 研究員
Kensuke SAKURAI

津森ジュン



(独)土木研究所つくば中央研究所
材料資源研究グループリサイクル
チーム 上席研究員
Jun TSUMORI