

課題名	5ZC-1201 水系感染微生物による水環境汚染への指標生物管理の有効性と消毒技術の検討
課題代表者名	田中宏明（京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター 環境質予見分野・教授）
研究実施期間	平成24～25年度
累計予算額	101,790千円（うち25年度50,895千円） 予算額は、間接経費を含む。
本研究のキーワード	病原ウイルス、消毒技術、生態毒性、次世代シーケンサー、衛生学的水質指標、下水処理場、東日本大震災

## 研究体制

- (1) 廃水中の衛生微生物の消毒技術と水生生物影響（京都大学）
- (2) 水中のウイルスモニタリングとその不活化効果の評価（東京大学）
- (3) 海域での病原微生物汚染の把握と影響（東北大学）

## 研究協力機関

独立行政法人土木研究所、東京都健康安全研究センター、北海道大学、宮城県保健環境センター

## 研究概要

### 1. はじめに(研究背景等)

東日本大震災の発生により、仙台市や宮城県の下水道施設は、津波で土木構造物、機械・電気設備などが被災した。震災直後、下水沈殿処理等の簡易処理の後、消毒がなされて水域へ放流され、その後の復旧段階では、沈殿後に簡易曝気処理や接触酸化処理などの簡易処理と塩素消毒が行われた。処理機能が不十分な状況で、病原微生物を平常時よりも高濃度で海域に放流しており、放流先水域で復興しつつある水産業などへの障害となることが懸念される。このため、①被災した水域における衛生指標およびウイルスの水環境中での挙動を明らかにすること、②生物処理を経ていない下水の衛生学的な安全を補うために高濃度の塩素を注入された下水が、放流先水域の水生生物に対して与える毒性影響を明らかにすること、③塩素消毒とともにそれに代わる各種消毒技術の消毒効果を検討すること、が求められている。

一方、我が国の河川の環境基準で大腸菌群数は達成率が低い、土壌細菌などが検出されているため衛生指標として適当ではないと理解され、水環境での病原微生物管理が遅れた状態が続いている。このため、環境省は環境基準の衛生指標の見直しを検討中で、新しい衛生指標として、大腸菌とすることが検討されている。欧米では、水浴について最近の疫学調査や定量的病原微生物リスク評価(QMRA)に基づいた設定や検討が行われている。また、消毒などによる水生生物への影響を回避するための残留塩素基準や総排水毒性試験(WET)が排出源で行われ、リクレーション利用と水生生物保護との両立を目指した水質管理がなされている。しかし、我が国では、新たな衛生指標(大腸菌)の実態について、浄水過程を前提とした河川水質や水浴などのリクレーションの視点からの水域水質の知見は不十分である。

### 2. 研究開発目的

上記の点を鑑み、本研究では、宮城県内の海域や下水道施設を対象として、①水域における衛生指標およびウイルスの水環境中での挙動を明らかにすること、②生物処理を経ていない下水の衛生学的な安全を補うために高濃度の塩素を注入された下水が、放流先水域の水生生物に対して与える毒性影響を明らかにすること、③塩素消毒とともにそれに代わる各種消毒技術の消毒効果を検討すること、を目的とした。以上の目的を達成することで、同時に、我が国の水域の衛生学的安全性を確保するための水質管理構築に向けて、新しい衛生指標による環境基準値の検討に資するため、水質管理計画策定に必要な水域での指標微生物やウイルスなどの挙動を把握し、排水規制値を達成するための消毒方法と水生生物保全を両立する技術を検討することが可能となる。具体的には、(1)廃水中の衛生微生物の消毒技術と水生生物影響、(2)水中のウイルスモニタリングと不活化効果の評価、(3)海域での病原微生物汚染の把握と影響、という3つのサブテーマの研究を実施する。

### 3. 研究開発の方法

#### (1) 廃水中の衛生微生物の消毒技術と水生生物影響

##### 1) 各種消毒技術に関する消毒効果の評価

東日本大震災に伴う津波により被害を受けた宮城県の4つの浄化センター(県南浄化センター、仙塩浄化センター、南蒲生浄化センター、石巻東部浄化センター)において、復旧段階にある平成24年9月から25年12月まで試料を採水し、塩素消毒、紫外線消毒およびオゾン消毒の室内実験を行った。

塩素消毒実験では、下水試料に次亜塩素酸ナトリウムを注入した後、経時的に試料を採取し、大腸菌、大腸菌群、腸球菌、大腸菌ファージの濃度を培養法により測定した。注入された塩素は、添加後に直ちに消費され、この全残留塩素の濃度と塩素注入量の差は塩素消費量とした。紫外線消毒実験は、反応槽に入れた下水試料に低圧水銀ランプで紫外線を照射し回分式実験を行った。経時的に試料を採取し、大腸菌、大腸菌群、腸球菌、大腸菌ファージの濃度を測定した。オゾン消毒実験も同様に反応槽に入れた下水試料にオゾンガスを注入して半回分式実験を行った。経時的に試料を採取し、大腸菌、大腸菌群、腸球菌、大腸菌ファージの濃度を培養法により測定した。注入オゾンガス濃度と排オゾンガス濃度の差からオゾン消費量を求めた。

大腸菌群、大腸菌および腸球菌は下水中に元々存在しているものを対象として測定した。大腸菌ファージについては、下水中に存在している量が少ないため、室内で培養した大腸菌ファージMS2添加した。大腸菌群と大腸菌、腸球菌の検出は平板培養法で行った。大腸菌ファージの測定は、重層寒天培地法により行った

##### 2) 各種消毒技術による水生生物への毒性影響

消毒実験の方法については上記「各種消毒技術に関する消毒効果の評価」の研究開発方法と同じである。塩素消毒に関しては、下水処理場の接触時間を考慮して塩素消毒時間15分の試料を生態毒性試験に用いた。生態毒性試験としては、水域生態系において1次生産者となる藻類への影響を評価する藻類生長阻害試験、および分解者としての役割を担っている細菌に対する毒性評価Microtox®試験を行った。藻類生長阻害試験では、供試生物として*Pseudokirchneriella subcapitata*を用いた。藻類生長阻害試験は、マイクロプレートを用いた試験を行い、曝露期間は96hとして、24°C、4000lux、120rpmで振とう培養を行い、マイクロプレートリーダーを用いて経時的に波長450nmで吸光度を測定して藻類の増殖をモニタリングした。Microtox®試験は、海洋性発光細菌*Vibrio fischeri*を供試生物として、試水の毒性評価を行う試験である。試験は20°Cに保たれた恒温室内で、繰り返し連数を2連として試験を行った。Microtox®測定装置にはAZUR Environmental、Microtox® M500 Analyzerを用いて、15分後の発光量から発光阻害率を出した。

##### 3) 次世代シーケンサーを用いたバクテリア群集構造の解析

次世代シーケンサーを用いた16S rRNA配列に基づくバクテリアの群集解析の系を被災した下水処理場およびその放流先海域のサンプルに適用し、バクテリア群集構造が海域でどのように変化するか把握することを目的とした。さらに、下水の混入を示すマーカーとして利用可能な医薬品クロタミン等の濃度を測定し比較することで、バクテリア群集構造の変化とクロタミン濃度の変化との相関を調べた。16S rRNA配列に基づくバクテリアの群集解析では、以下の流れに沿って解析を進めた。①水試料からのバクテリアの分離、②バクテリアからのゲノムDNAの抽出、③次世代シーケンサー解析のためのライブラリーの調整、④illumina社製の次世代シーケンサーMiSeqのラン、⑤フリーの解析サーバーMetagenomics RAST(MG-RAST)(<http://metagenomics.anl.gov/>)による得られたデータの解析。

#### (2) 水中のウイルスモニタリングとその不活化効果の評価

##### 1) 下水処理水放流先水域における指標細菌と病原ウイルスの挙動の比較

2012年9月から被災した宮城県内の4浄化センター(石巻東部浄化センター、南蒲生浄化センター、県南浄化センター、仙塩浄化センター)の処理後放流水の放流先水域および周辺水域において、それぞれ5-6地点で試料採取を行った。また、南蒲生浄化センター周辺水域では、放流口から流軸に沿った試料も採取した。採取試料は、指標細菌である大腸菌群・大腸菌、ウイルス指標候補であるF特異ファージ(F-phage)・体表面吸着ファージ(Somatic)、および代表的なヒト腸管系ウイルスであるアイチウイルス(AiV)、エンテロウイルス(EntV)、GI、GIIノロウイルス(GI、GII NoV)、アデノウイルス(AdV)を対象に検出定量を行った。

##### 2) 被災処理場の段階的復旧に伴う処理効率および処理水質の改善状況

2012年9月から被災した宮城県内の4浄化センター(石巻東部浄化センター、南蒲生浄化センター、県南浄化センター、仙塩浄化センター)内の各処理段階で採取した試料について、指標細菌である大腸菌群・大腸菌、ウイルス指標候補であるF特異ファージ・体表面吸着ファージ、および代表的なヒト腸管系ウイルスであるAiV、EntV、GI、GII NoV、AdVを対象に検出定量を行った。試料の採取は、東北大学に依頼した。また、測定結果の復旧過程における水質処理効率の改善、指標性の評価は東北大学グループにより解析された。

##### 3) 水質基準項目に対する新規細菌指標および検査方法の検討

都内下水処理場放流水、河川水、河川水浴場、海水浴場を対象に水試料の採取を行った。下水処理場放

流水は多摩川中流に位置する流域下水処理場において、塩素処理後の放流水を2012年8月から2013年3月までの期間に1ヶ月に1回、合計8回、東京都下水道局が採取した試料について分与を受けた。また、河川水は上記下水処理場放流水が排出されている水路が多摩川に合流する地点で、2012年8月から2013年12月までの期間に1ヶ月に1回、合計17回試料採取を行った。更に、河川水浴場試料は、都内水浴場の4地点(秋川の落合橋右岸、沢戸橋右岸、多摩川の氷川キャンプ場右岸、川井キャンプ場右岸)において2013年6、7、8月に1ヶ月に1回、合計3回採取した。海水浴場試料は、島しょ地域において2013年5月に37地点から採取した。採取した試料は、コロニー計数法、またはMPN法を用いて糞便汚染指標細菌である大腸菌群、大腸菌、糞便性大腸菌群、腸球菌、糞便性連鎖球菌を対象に測定した。

### (3) 海域での病原微生物汚染の把握と影響

#### 1) 被災下水処理場の段階的復旧に伴う処理効率および処理水質の改善状況

調査開始時に、各浄化センターの復旧状況および復旧予定について関係機関に聞き取り調査を行い、調査時期および試料採取地点を決定した。試料採取地点設定にあたり、複数の二次処理(例えば活性汚泥処理と簡易曝気)を併用している浄化センターでは各系列の処理効率を評価できるように処理系列ごとに試料を採取した。採取した試料を用いて、病原ウイルスを含む38の項目を測定した。測定結果は全グループで共有し、放流先水域での微生物濃度の時空間的解析(東京大学グループ)等各グループが行う解析に用いた。サブテーマ3では、下水処理の復旧に伴う下水処理効率の改善状況および指標微生物の病原微生物に対する指標性の評価について解析した。

#### 2) 遺伝子マーカーを用いた水域糞便汚染源評価

宮城県内の下水処理場からの下水処理水を受容する海域4地点において試料水(1地点あたり10L)を計4回採取し、*Bacteroides*菌体を回収・濃縮した。得られた菌体懸濁液2.5 mLに対しPMA処理を行い、定量PCRにより遺伝子マーカー濃度を測定した。遺伝子マーカーとしてはTotal *Bacteroides*及びHuman-specific *Bacteroides* 16s rRNA遺伝子由来するマーカーを用いた。PMA未処理サンプルについては、プロセスコントロール( $\Delta$ lac::kan *E. coli*)由来遺伝子量も同時に定量し、その回収率を算出した。

#### 3) 遺伝子解析による大腸菌群の指標性の評価

2012、2013年の4月(河川水)または5月(下水、下水処理水)に、広瀬川の最上流および下流の河川水と、流域にある広瀬川浄化センターの流入下水および処理水(処理水は2013年のみ)を採取した。各試料水より大腸菌以外の大腸菌群を計227株単離した。単離株の塩基配列を解析し、BLASTn検索結果を基にしたクラスター分析により株のグループ化を行い、試料採取地点と照合することで、各地点に存在する大腸菌以外の大腸菌群の種構成を比較した。

#### 4) 太陽光による微生物不活化の評価

大腸菌、大腸菌群、腸球菌、バクテリオファージMS2をそれぞれ添加した48ウェルプレートをややかき攪拌しながらLEDソーラーシミュレーター(WSLED 100SC、ワコム電創)を用いて可視光の照射を行った。照射開始後0、1、2、4、6時間後の試料を回収し、各微生物濃度を測定した。各実験条件で3つの試料を用い、測定値の幾何平均値を測定結果とした。

## 4. 結果及び考察

### (1) 廃水中の衛生微生物の消毒技術と水生生物影響

#### 1) 各種消毒技術に関する消毒効果の評価

塩素消毒については、①塩素消費量は、簡易曝気処理を行った試料では塩素消費量は減少すること、接触酸化処理を行った試料や生物処理が復旧した試料では、塩素消費量が大幅に減少することが確認された。②99%の不活化に必要なCT値の解析結果からは、簡易曝気処理や接触酸化処理による消毒効果の改善は目立っては見られなかった。しかし、簡易曝気や接触酸化で指標細菌の除去が若干ではあるが見られるため、消毒に必要なCT値を削減する効果もある。また生物処理が復旧した下水処理場では指標細菌の消毒効果についてはCT値の減少がみられた。指標ウイルスについての塩素消毒効果は、99%の不活化に必要なCT値から判断すると、いずれの下水試料でもほとんど消毒効果が見られず、クロラミン消毒の限界を示していると考えられた。このため、生物処理など消毒前でのウイルス除去が重要と考えられる。

紫外線消毒については、初沈越流水や流入下水を直接紫外線消毒する場合、紫外線照射量(時間)に応じて、指標細菌、指標ウイルスともに同じ程度の不活化効果がみられる。99%の不活化に必要な紫外線照射量から判断すると、接触酸化処理を行った試料では不活化効果が改善する傾向がみられたが、簡易曝気処理を行った試料では紫外線の消毒効果の改善は見られなかった。また、生物処理が復旧した試料では不活化効果は大幅に改善した。

オゾン消毒については、初沈越流水や流入下水を直接オゾン消毒する場合、オゾン消費量に応じて、指標ウ

ウイルスは不活化がみられるが、指標細菌は不活化効果が小さかった。99%不活化に必要なオゾン消費量から判断すると、接触酸化処理を行った下水では不活化効果は改善すること、生物処理が復旧した試料では、オゾン消毒の効果は大幅に改善したが、簡易曝気処理を行った試料ではオゾン消毒効果の改善は見られなかった。

## 2) 各種消毒技術による水生生物への毒性影響

塩素消毒においては、藻類生長阻害試験およびMicrotox®試験ともに、塩素注入率が増加するとともに阻害率が上昇し、塩素注入率が5mg-Cl/L以上になると非常に高い毒性が示された。生物処理後の二次処理水においては、塩素注入率1mg-Cl/L程度でも高い阻害率が示された。このことから、初沈越流水の試料と比較して、二次処理水の方が、塩素が残留する傾向が見られ、過剰な塩素注入に注意が必要であると考えられた。残留塩素が残っている試料に対して、チオ硫酸ナトリウムを用いて脱塩素を行うことにより、藻類および細菌への阻害影響が低減され、塩素由来の毒性を緩和することが出来た。そのため、過剰な塩素注入率を加えざるを得ない被災処理場での消毒後は、チオ硫酸ナトリウムなどの還元剤によって脱塩素することで、放流先水域の水生生物に対する毒性影響を緩和できると推定される。

紫外線消毒について、初沈越流水、生物処理水のどちらについても、紫外線照射時間を長くした場合でも、藻類、細菌ともに毒性の増減は確認されなかった。このことから、生態毒性影響の視点から考えた場合、紫外線消毒は有利な消毒技術であると考えられる。

オゾン消毒については、オゾン処理を行うことにより、藻類、細菌ともに毒性影響を低減することが観察された。ただし、塩分濃度の高かった二次処理水では、オゾン消費量の増加に伴い毒性が増加する場合が見られた。試料中の塩分とオゾンが反応することで、次亜塩素酸ナトリウムが生じたため毒性が増加したものと推察された。このことから、海水の混入などで下水の塩分濃度が高い場合は、オゾン消毒によって毒性影響が増加しうる場合があるため、オゾン消毒を行う際は塩分濃度の把握が必要になると考えられる。

## 3) 次世代シーケンサーを用いたバクテリア群集構造の解析

被災した下水処理場の放流先海域でのバクテリア群集構造を解析し、バクテリア種の海域での残存割合をクロタミンの残存割合と比較した。その結果、腸内細菌科、シュードモナス科、バクテロイデス科、プレボテラ科等のDNAの減衰がクロタミン濃度の減衰に比べて大きいことが明らかとなった。希釈と希釈以外の効果も加わって海域において減衰していると推測される。例えば、「ゲノムDNAの海域における分解」や、「バクテリア菌体そのものあるいは濁質表面に付着したバクテリア菌体の沈降による除去」等が考えられる。

バクテリアDNAの海域での減衰傾向を、東大GによってqPCR(定量PCR)法で測定されたアイチウイルス、アデノウイルスのゲノムの減衰傾向と比較した。興味深いことに、次世代シーケンサーで得られた腸内細菌科やバクテロイデス科のDNAの海域での減衰傾向はqPCRで得られたウイルスの減衰傾向と一致していた。この結果は、少なくともゲノム量のレベルでは、これらの腸内細菌由来バクテリアの海域での挙動がウイルスの挙動と一致することを示している。ヒト病原ウイルスのゲノムの存在量の指標として、これらのバクテリアDNA量が利用できる可能性を示唆している。

## (2) 水中のウイルスモニタリングとその不活化効果の評価

### 1) 下水処理水放流先水域における指標細菌と病原ウイルスの挙動の比較

全ての水域において、大腸菌群、大腸菌が冬期にかけて減少していき、夏期にむけて増加する傾向をした。この傾向は、調査水域の水温に依存するものと考えられ、大腸菌群および大腸菌が環境水中で増殖している可能性が示唆された。腸球菌の濃度は大腸菌群や大腸菌に比べ低く、変動の幅は小さいものの同様の傾向が確認された。一方でファージは、それぞれの水域における共通した傾向は確認されなかった。ウイルスでは、AiVが全ての水域で他の調査時期に比べ、冬期に濃度が高い可能性がみられた。ウイルス同士の比較では、AdVの検出頻度がAiVよりも高かった。しかし、AiV、AdV共にそれぞれの水域において濃度変動に共通した傾向は確認されなかった。

復旧された3浄化センターの放流先水域において、大腸菌群、大腸菌、腸球菌の濃度は処理復旧後に減少する傾向が確認された地点があるものの、それらは復旧に伴う変化ではなく、塩素流入率等が影響していると考えられる。実際、復旧後の試料において、細菌の濃度増加が確認されている。F-phageは全ての水域で、検出頻度が低く復旧前後の濃度変化を確認することが困難であったが、Somaticは水域によって差はあるものの復旧後に減少する傾向が確認された。一方、ウイルスは、AiVおよびAdV共に、復旧前後に共通した変化は確認されなかった。ウイルスの定量方法は、遺伝子検出法であり濃度変化は下水流入水に存在するウイルス量に依存するものと考えられる。ファージの測定方法は培養法であり、復旧に伴う消毒効果の改善・変化により検出傾向が変化すると考えられる。ファージは、放流先水域により差はあるものの処理復旧後に濃度が減少する共通の傾向が確認され、下水処理効果改善に伴い濃度が低下したのと考えられる。

放流口からの距離と微生物濃度の関係を比較した結果、全ての水域で大腸菌群、大腸菌、腸球菌が、放流口からの距離に依存せず一定の濃度で存在している事が明らかになった。一方で、ファージとウイルスは距離に

依存した濃度減少が見られ、希釈による影響を受けていると考えられた。また、ファージの方が減少の傾きが大きく、希釈と共に不活化の影響が考えられた。SomaticはF-phageに比べ高頻度に検出され、比較的遠方の地点でも検出された。しかし、F-phageは水域での検出頻度が低く、比較的放流口に近い調査地点でも検出下限以下である事が多かった。この事から、F-phageはSomaticに比べ水域における耐性が低く、不活化されやすい可能性が考えられた。一方でウイルスは、Somaticに比べAiV、AdV共に微小な低減傾向が確認された。ファージは宿主を用いた感染性があるものを測定しているのに対して、ウイルスは遺伝子を対象とした定量を行っているため、低減傾向に差が生じたものと考えられる。しかし、感染性のあるファージが検出されていることから、検出されたウイルスも感染性を有している可能性が示唆された。また、処理場内および放流先水域の検出傾向からウイルスに対しての指標性はF-phageよりもSomaticの方が高い可能性が示唆された。

2013年6月に石巻および南蒲生で採取した大容量ウイルス濃縮試料におけるウイルス検出の結果、小容量ウイルス濃縮試料で陽性結果であった試料は、大容量試料でも全て陽性結果が得られた。石巻の試料は小容量ウイルス濃縮では全ての測定したウイルスが陰性であったが、大容量ウイルス濃縮試料では4試料が陽性であった。南蒲生の大容量ウイルス試料においてAiV陽性であった全ての試料からGI、およびGII NoVが検出された。即ち、AiVは小容量ウイルス濃縮試料において陽性であった場合、その試料がNoV陽性であることを示していた。故に、AiVはNoVを含めた他の腸管系ウイルスの存在を示すのに有効である可能性が示唆された。

## 2) 被災処理場の段階的復旧に伴う処理効率および処理水質の改善状況

4浄化センターで採取した試料から得られた細菌、ファージ、ウイルスの検出・定量結果は共有し、下水処理の復旧に伴う下水処理効率の改善状況、および指標微生物の病原微生物に対する指標性の評価について、サブグループ(3)の東北大学により解析された。

## 3) 水質基準項目に対する新規細菌指標および検査方法の検討

都内下水処理場で採取した処理後の下水放流水において、現行の水質基準項目である大腸菌群の測定の際に用いられているデゾ法に比べ、クロモアガー法とコリラート法を用いたほうがより多くの大腸菌群が検出された。河川水における各手法による大腸菌群の検出結果は、濃度が減少傾向にある試料において、デゾ法に比べクロモアガー法とコリラート法を用いたほうがより高濃度で検出され、下水放流水と同様の傾向が確認された。一方で、濃度が上昇傾向にある試料において、全ての測定方法の値に大きな違いはなかった。この傾向は、季節変動による可能性が高く、特に水温上昇に伴い生じている可能性が示唆された。また、このような季節変動に伴い、試料中にデゾ法で検出されない大腸菌群の菌叢が増加している可能性があり、デゾ法での測定が過小評価になっている可能性が考えられ、デゾ法では検出されていない大腸菌群が存在している可能性が考えられた。河川水浴場においても河川水、下水放流水と同様の結果が得られた。また、大腸菌群の検出結果から調査4地点の全ての試料において水浴基準は満たしているものの、環境基準は満たしていない事が確認された。海水浴場の試料において塩分影響を低減することを目的に試料を10倍希釈し検出を行った結果、糞便性連鎖球菌数が比較的高濃度かつ高頻度で検出されたことから、糞便性連鎖球菌が海域での指標として、検出感度の観点からは有効である可能性が示唆された。

## (3) 海域での病原微生物汚染の把握と影響

### 1) 被災下水処理場の段階的復旧に伴う処理効率および処理水質の改善状況

#### a. 被災浄化センターの放流水質

物理化学的水質項目については、下水処理の復旧にともない処理水中の濃度が改善された。塩素濃度は処理復旧にともない低下した。これは、下水処理の復旧にともない二次処理水の水質が改善し、塩素添加量を削減できたためと考えられる。指標細菌濃度の処理前後の変化には一貫した傾向が見られなかった。F特異ファージと体表面ファージの濃度は処理復旧にともない低下したが、アイチウイルスとアデノウイルスの濃度には一貫した傾向が見られなかった。微生物濃度の幾何平均値(全試料)を比較すると、細菌では大腸菌群、大腸菌、腸球菌の順で濃度が高く、ファージおよびウイルスではアデノウイルス、F特異RNAファージ、体表面ファージ、アイチウイルスの順であった。

#### b. 下水処理の復旧に伴う下水処理効率の改善状況

復旧後に行われていた処理法(嫌気好気法、純酸素曝気法)と比較して、復旧段階で行われていた簡易曝気および接触酸化法の除去率が低かった。物理化学指標と比較して微生物指標の処理効率低下が著しく、復旧前後の処理効率には指標細菌で平均約80倍、ファージやウイルスで平均約8倍の差がみられた。

復旧前後の塩素処理効率を比較すると、指標細菌の不活化率は復旧前の方がそれぞれ54倍、77倍、46倍高かった。二次処理効率の低下を補うため塩素処理を強化していたことが見て取れる。しかし、ファージの不活化率はF特異ファージで1.2倍、体表面ファージで5.1倍にしかならず、指標細菌と比較して塩素処理強化の影響は軽微であった。ウイルスは定量PCR法で測定しているため活性は評価できないが、検出される遺伝子濃度から算出した処理効率はファージと同程度(アイチウイルス:0.47倍、アデノウイルス:6.6倍)であった。

### c. 指標微生物の病原微生物に対する指標性の評価

同じグループ(指標細菌、ファージ、ヒトウイルス)内の相関係数は異なるグループに属する微生物間の相関係数よりも高かった。類似した微生物は似た挙動をとっているためと考えられる。ヒトウイルスと微生物指標との相関係数を比較すると、全試料を用いた場合と放流先水域試料のみを用いた場合において指標細菌よりもファージとの相関係数の方が高かったが、浄化センター内のデータのみを用いた場合、ファージの指標微生物としての優位性は認められなかった。

#### 2) 遺伝子マーカーを用いた水域糞便汚染源評価

南蒲生浄化センター周辺4カ所において糞便汚染遺伝子マーカーである*Bacteroides*由来遺伝子を定量したところ、今回定量した2種類の遺伝子マーカー(全ての*Bacteroides*を対象としたTotal Bac及びヒト由来*Bacteroides*を対象としたHuman Bac)濃度には明確な差が認められなかったことから、現地における糞便汚染はヒトに由来する割合が高いことが明らかである。また、PMA処理によりHuman Bac濃度が著しく低下したことから、海水中のHuman Bacは安定度が低いと言える。Human Bacは、今回の調査対象地域におけるごく最近の糞便汚染を示すマーカーとして活用可能であると言える。

#### 3) 遺伝子解析による大腸菌群の指標性の評価

単離した大腸菌群株の16S遺伝子の塩基配列に対してクラスター分析を行った結果、下水および下水処理水由来の株が属するクラスターが2つ、広瀬川上流部由来の株が属するクラスターが1つ形成され、広瀬川下流部では双方が混在していた。したがって、糞便由来の大腸菌群と非糞便由来の大腸菌群は種構成が全く異なっていることが示された。上流部で得た単離株が属するクラスターには魚類やネズミといった野生動物にみられる種に加え、ヒト病原細菌を含む*Yersinia*属や*Serratia*属がヒットしたが、下水に見られたヒト糞便由来の細菌がほとんど存在しなかったことから、これらの株は野生動物由来であると考えられる。

本調査により、ヒト糞便に由来する大腸菌群と非糞便由来の大腸菌群は種構成が全く異なることが明らかとなった。これにより、特に糞便汚染がないと考えられる河川上流部等では、糞便に由来しない腸内細菌科の細菌が大腸菌群として多く検出されるため、糞便汚染指標としての大腸菌群の指標性が低下することが示唆された。

#### 4) 太陽光による微生物不活化の評価

PBS中では大腸菌と大腸菌群が顕著な不活化傾向を示したのに対して、MS2は6時間後でもほとんど不活化しなかった。人工海水中では、腸球菌以外はPBSと比較してより速く濃度が減少した。大腸菌群と大腸菌は太陽光による不活化について、ほぼ同じ傾向を示すことが確認された。腸球菌は大腸菌や大腸菌群と比べ太陽光や塩分に対する耐性が高いことが示された。MS2においては上記の3種の細菌は全く違う挙動を示した。このことから、太陽光による不活化を考慮する必要がある環境では、ウイルスの指標として細菌を使用することは難しいと考えられる。可視光照射による不活化機構として、細胞内のポルフィリンが細胞内で光増感剤として作用し、光励起によるエネルギー移動によって一重項酸素が発生し、細菌が不活化すると考えられている。ウイルスは粒子中にポルフィリンを持たないため、MS2はほぼ不活化しなかったと考えられる。

今回得られた不活化速度が正しいとすると、河川流下に伴い指標微生物濃度は減少することになる。しかし、一般に河川流下に伴い指標微生物濃度が上昇することが知られており、今回の実験結果と矛盾する。この原因として、天候の変化や川底の石・水深等により太陽光が遮蔽されていること、太陽光による指標微生物の不活化速度よりも環境水中での増殖速度や光回復速度の方が大きいことなどが考えられる。

## 5. 本研究により得られた主な成果

### (1) 科学的意義

東日本大震災の被災下水処理場で採取した試料を用いて、生物処理が不十分な下水について各種消毒技術の検討を行い、消毒効果と生態毒性影響の両方の側面から評価を行った。塩素消毒については、指標細菌には消毒効果が見られるが、簡易曝気や接触酸化処理では塩素消費量を下げる効果はあるが、CT値をもとにした消毒効果の改善が見られないこと、指標ウイルスについてはほとんど消毒効果がないこと、また生態毒性影響については塩素消毒による生態影響が見られるが、脱塩素によって毒性は低減できることが明らかとなった。また、紫外線消毒では指標ウイルスおよび指標細菌に対する消毒効果が高く、生態毒性の上昇も観察されないこと、さらにオゾン消毒では指標ウイルスに対する消毒効果は高いが、指標細菌に対しては消毒効果が低いこと、また試料中に塩分が混入した場合には次亜塩素酸が生成して生態毒性が高くなる場合があることが明らかとなった。これらの成果は、消毒効果と生態影響のトレードオフを議論する貴重な研究成果となり、震災などの廃水処理設備の緊急対策に貢献することはもちろん、日常的に類似の事態が発生している可能性がある合流式下水道の越流水対策や生物処理レベルが十分でない畜産排水対策などでの今後の消毒技術を考える上で科学的な意義を持つ成果となる。

震災後の段階的復旧において用いられた様々な下水処理方法(暫定的な二次処理や強化された塩素処理

等)による衛生学的水質項目の処理効率や放流水質を詳細に解明し、被災した下水処理場において、中級処理の段階で塩素消毒により水質基準項目の大腸菌群は十分に処理されていることが確認されたが、ファージやウイルスに対しての消毒効果は低く、生物処理が再開されるまでは、放流先海水域に通常よりも高濃度でウイルスが排出されている可能性が確認され、微生物学的安全性の観点での危険性が示された。また、SomaticとF-phageの検出頻度、減少傾向から、ウイルスの感染性に対する指標としてSomaticが有効である可能性が示された。さらに、次世代シーケンサーによる下水、下水処理水、環境水でのバクテリア群集解析手法は、環境での病原微生物の拡散、消長を把握する有効な手法となる可能性があり、化学マーカーや他の微生物定量手法と組み合わせることで、水域での病原微生物や指標微生物の動態把握に有効なツールとなると期待される。

## (2)環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

本研究の成果は、環境省で現在、水質環境基準の生活環境基準項目の変更を検討している大腸菌の指標検討を行うための平成24年度生活環境項目新規基準等検討会の衛生指標WGおよび平成25年度大腸菌環境基準検討会において、これまでの大腸菌群や腸球菌、ファージ、ウイルスなどの水域の存在実態や動態、下水処理過程や消毒過程での動態の相違を示し、リクレーション利用、水産用水、水道原水の視点からの水質環境基準の検討の基礎的知見の一部を提供している。

また、下水道行政を所管する国土交通省とは、国土交通省からの日本水環境学会受託事業、続いて実施した本研究課題についての情報交換を行ってきた。この成果の一部は、すでに下水道施設の災害時の緊急対応をまとめた「災害時における下水の排除・処理に関する考え(案)」の中で平成24年9月に国土交通省国土技術政策総合研究所から公開されている。また下水道の放流水質の今後の在り方を検討している「下水道における水系水質リスク検討会」においても平成24年度に下水放流水質のうち、大腸菌群が大腸菌に変更となることが予想されるため、下水道法での放流水質基準での衛生指標の基準値設定に関して、本研究課題の知見の一部を提供した。

さらに、調査対象の下水処理場の実施主体の公共団体である宮城県および仙台市とは、「東日本大震災による下水処理施設の被害からの復旧・復興に向けた取り組み(2013年3月27日、仙台市)」および「震災からの復旧に取り組む下水道と放流先の水質状況(2014年3月20日、仙台市)」を共同開催し、本研究成果を還元することで、現場の下水処理場の管理者の緊急対応や水質管理に活用されたと考えている。

### <行政が活用することが見込まれる成果>

現在、東日本大震災で被害を受けた水産産業の復旧が急速に進んだ。しかし、懸念される事項として、下水処理場の機能が依然不十分な下水処理場もあり、下水処理水には有機物、浮遊物質とアンモニアが高濃度に残留する中で塩素消毒が行われている。本研究で示されたようにクロラミン消毒では、指標細菌には消毒効果が期待できるが、ウイルスへの不活化効果が極めて低い。このため、放流先でのリクレーションや水産養殖などの水利用に与える衛生学的安全性への監視が必要である。また同時に、クロラミンの水環境での残留性が高いために、ノリ養殖等の水生生物影響も懸念されるが、海域での残留塩素の測定結果や希釈容量を考えるとその影響は広範囲には及んでいないことが示唆された。

今後、発生が懸念されている南海トラフ巨大地震や首都直下地震などの大規模な地震によって、被災する廃水処理設備の緊急対策に貢献することが行政的に期待できる。その際、被害の発生が予見される水環境の監視、また被害発生に備えた代替消毒方法の検討について、本研究成果は有用な知見を提供できる。このため、環境省水環境課はもちろん、国土交通省下水道部などの水質と廃水管理に関わる部局への知見の提供と意見交換が是非今後とも期待される。

また、日常的に震災時の下水機能の喪失と類似の事態が発生している恐れがあるのは、合流式下水道の越流水対策や生物処理レベルが十分でない畜産排水対策などである。今後のこれらの衛生学的水質管理に対しても本研究成果は行政的な意義を持つと考えている。

本研究では、環境省で検討されている新しい衛生指標である大腸菌と、大腸菌群や腸球菌、ファージ、ウイルスなどを水域の存在実態や動態、下水処理過程や消毒過程での動態の相違を示し、環境基準での衛生指標の選定、基準値設定に役立つ知見を提供できる。また、環境基準の改定後に、排水規制の見直しが見込まれるが、その際の規制を達成するのに必要な技術的検討に本研究は役立てられる。また、公共用水域の測定結果と環境基準の判定が行われる際に、達成が見込めない場合、水質管理計画の立案が必要となると想定される。そのために必要な、水環境での衛生指標や病原微生物の動態の理解に本研究は知見を与える。その際、環境での微生物動態は発生源からの排出実態の把握と合わせて重要になる。次世代シーケンサーによる下水、下水処理水、環境水でのバクテリア群集解析手法は、環境での病原微生物の拡散、消長を把握する有効な手法である可能性があり、化学マーカーや他の微生物同定定量手法と組み合わせることで、水域での病原微生物や

指標微生物の動態把握に有効なツールとなると期待される。

さらに、今後の導入の検討がなされている全排水毒性試験(WET)と、衛生指標の排水基準の達成のために生じるトレードオフが懸念される消毒について、消毒効果が認められかつ、水生生物影響を軽減する消毒方法の選択に対しても、本研究は知見を提供できる。

## 6. 研究成果の主な発表状況

### (1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) 端昭彦、稲葉愛美、片山浩之、古米弘明：土木学会論文集G(環境), 68(7), III.285-III.29 (2012)「震災後の石巻沿岸域における腸管系ウイルス及び指標微生物の検出と検出阻害評価」

### (2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 朴仁久、朴耿洙、山下尚之、田中宏明：第49回下水道研究発表会(2012)「下水簡易処理水の消毒による水生生物への影響評価」
- 2) Kyoungsoo Park, Inkoo Park, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka: 34th The Association of Environmental & Sanitary Engineering Research symposium, Kyoto, Japan, 2012 “Assessments on disinfection processes for sewage effluent during disaster restoration”
- 3) 朴耿洙、朴仁久、山下尚之、田中宏明：第15回水環境学会シンポジウム(2012)「震災復旧中の下水処理場での消毒方法の評価」
- 4) 朴仁久、朴耿洙、山下尚之、田中宏明：第15回水環境学会シンポジウム(2012)「下水簡易処理水の消毒と水生生物への影響」
- 5) Kyoungsoo Park, Inkoo Park, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka: 4th IWA Young Water Professional Conference 2012, Tokyo, Japan, 2012, “Evaluation on suitable disinfection processes for sewage effluent during disaster restoration”
- 6) Masaru Ihara, Tomonari Matsuda, Suntae Lee, Hiroaki Tanaka: 4th IWA Young Water Professional Conference 2012, Tokyo, Japan, 2012, “Basic consideration of detection of pathogens using next generation sequencer”
- 7) 朴耿洙、朴仁久、山下尚之、田中宏明：第47回水環境学会年会(2013)「震災復旧時の下水処理場の簡易ばっき処理による消毒効果改善の評価」
- 8) 田中宏明：土木学会環境工学委員会・下水道関連震災調査小委員会シンポジウム(2013)「緊急事態と水質保全—震災時の下水処理場緊急対応の検討」
- 9) 田中宏明：日本水環境学会水中健康微生物研究員会「東日本大震災による下水処理施設の被害からの復旧・復興に向けた取り組み」(2013)「被災時の暫定的下水処理における代替消毒技術の検討」
- 10) Kyoungsoo Park, Inkoo Park, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka: 22th KKN symposium, Seoul, Korea, 2013, “Health related microbial risk for emergency sewage treatment after Great East Japan Earthquake”
- 11) 朴耿洙、朴仁久、山下尚之、田中宏明：第22回年次オゾン協会(2013)「震災復旧中の下水処理場でのオゾン消毒工程の評価」
- 12) Kyoungsoo Park, Inkoo Park, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka: 17th IWA International Health Related Water Microbiology, Florianopolis, Brazil (2013) “Evaluation of disinfection processes for emergency sewage treatment after Great East Japan Earthquake”
- 13) Masaru Ihara, Suntae Lee, Yohei Katakawa, Naoyuki Yamashita, Tomonari Matsuda, Hiroaki Tanaka: 第3回NGS現場の会(2013)「下水中の微生物のメタゲノム解析および薬剤耐性遺伝子の検出」
- 14) Ihara M, Lee S, Katakawa Y, Yamashita N, Matsuda T, Tanaka H: Analysis of microbial community in wastewater treatment plant by next generation sequencing: 17th IWA International Health Related Water Microbiology, Florianopolis, Brazil (2013) “Analysis of microbial community in wastewater treatment plant by next generation sequencing”
- 15) 井原賢、李善太、堅川陽平、花本征也、佐久間亮輔、松田知成、山下尚之、田中宏明：CREST横断ミーティング「病原微生物と持続可能な水利用」(2013)「次世代シーケンサーによる微生物群集構造解析」
- 16) 井原賢、堅川陽平、李善太、松田知成、山下尚之、田中宏明：第16回日本水環境学会シンポジウム(2013)「次世代シーケンサーを用いた、下水処理場における薬剤耐性遺伝子の網羅的検出」
- 17) 朴耿洙、朴仁久、山下尚之、田中宏明：第16回日本水環境学会シンポジウム(2013)「被害下水処理場での健康関連微生物の塩素消毒による不活化率の推定と代替方法による効果の評価」
- 18) 小熊久美子、Sangsanont Jatuwat、稲葉愛美、片山浩之：第47回日本水環境学会年会(2013)「災害時利

## 用を想定した簡易下水消毒方法の検討」

- 19) 稲葉愛美、片山浩之、端 昭彦、古米弘明：第47回日本水環境学会年会(2013)「被災後石巻港沿岸環境における衛生微生物の分布調査」
- 20) 端 昭彦・稲葉愛美・片山浩之・古米弘明：第16回日本水環境学会シンポジウム(2013)「東京都奥多摩地方の河川水浴場における腸管系ウイルス及び指標微生物の存在実態」
- 21) 佐竹明日香、真砂佳史、大村達夫：平成24年度土木学会東北支部技術研究発表会(2013)「可視光照射による糞便汚染指標細菌の不活化」
- 22) 真砂佳史、稲葉愛美：日本水環境学会水中健康微生物研究員会「東日本大震災による下水処理施設の被害からの復旧・復興に向けた取り組み」(2013)「衛生学的観点からの復旧期の下水処理効率の評価」
- 23) 真砂佳史、稲葉愛美、風間しのぶ、片山浩之、大村達夫：第16回水環境学会シンポジウム(2013)「東日本大震災後の段階的復旧にともなう下水処理効率の回復状況」
- 24) H. Tanaka: Tsinghua University The Fourth Environment Safety High-end Forum Pre-announcement Renovation and Challenges for Wastewater Reclamation Treatment Technologies -Inspiration from the hundred years development of activated sludge- (2014) "Evaluation on suitability to manage pathogen pollution in water environment and disinfection processes of indicator microorganisms"
- 25) 端 昭彦、稲葉愛美、片山浩之、古米弘明：第48回日本水環境学会年会(2014)「東京都奥多摩の河川水浴場における腸管系ウイルスの分子疫学調査」
- 26) 真砂佳史、久保田健吾、勝又雅博、佐竹明日香、佐藤紀子、島田祐輔、袖野太士、原田秀樹、大村達夫：第48回水環境学会年会(2014)「人為汚染の有無が大腸菌群の種構成に与える影響」
- 27) 山下尚之、田中宏明、井原賢、朴耿洙、朴仁久：震災からの復旧に取り組む下水道と放流先の水質状況(2014)「被災時の暫定的下水処理における各種消毒技術の消毒効果と水生生物影響」
- 28) 真砂佳史、稲葉愛美：震災からの復旧に取り組む下水道と放流先の水質状況(2014)「被災浄化センターの復旧に伴う処理効率および放流水質の改善状況」

## 7. 研究者略歴

課題代表者：田中 宏明

京都大学大学院工学研究科修了、独立行政法人土木研究所水質チーム上席研究員、博士(工学)、現在、京都大学大学院工学研究科教授

研究分担者

- 1) 田中 宏明(同上)
- 2) 片山 浩之

東京大学大学院工学系研究科修了、東京大学大学院新領域創成科学研究科講師  
博士(工学)、現在、東京大学大学院工学系研究科准教授

- 2) 大村 達夫

東北大学工学部卒業、東北大学大学院工学研究科修了、  
工学博士、現在、東北大学未来科学技術共同研究センター教授

## 5ZC-1201 水系感染微生物による水環境汚染への指標生物管理の有効性と消毒技術の検討 (1) 廃水中の衛生微生物の消毒技術と水生生物影響

京都大学工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター ＜研究分担者＞	田中宏明
京都大学工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター	山下尚之
京都大学工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター	中田典秀
京都大学工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター ＜研究協力者＞	井原 賢
独立行政法人土木研究所材料資源研究グループ	安井宣仁

平成24～25年度累計予算額：34,419 千円

(うち、平成25年度予算額：17,274 千円)

予算額は、間接経費を含む。

### [要旨]

東日本大震災によって、東北地方の下水処理場は大きな被害を受けたため、震災直後下水は沈殿処理等の簡易処理の後、消毒がなされて水域へ放流され、その後の復旧段階では、沈殿後に簡易曝気処理や接触酸化処理など簡易処理と塩素消毒が行われた。本研究では、活性汚泥等による生物処理を行っていない下水や簡易処理しか行われていない下水を対象として、塩素消毒、紫外線消毒、オゾン消毒といった各種消毒技術の消毒効果を評価し、活性汚泥法など生物処理が復旧した処理水の消毒効果と比較した。一方で、生物処理を経っていない下水の衛生学的な安全を補うため、高い注入率の塩素等での消毒プロセスを経た下水は、放流先水域の水生生物に対して毒性影響を与える可能性があることから、塩素消毒とともにそれに代わる各種消毒技術の消毒効果を検討するとともに水生生物への影響について検討を加えた。また、次世代DNAシーケンサーを用いた16SrRNA配列に基づく細菌群集解析の系の適用を試み、被災した下水処理場およびその放流先海域で細菌群集構造が海域でどのように変化するかを調べた。

生物処理が十分ではない下水を対象とした塩素消毒については、大腸菌群や大腸菌、腸球菌といった指標細菌は塩素注入率の増加に伴い、消毒効果が認められるが、指標ウイルスである大腸菌ファージMS2については消毒効果が低いことが分かった。一方、水生生物への毒性影響については、発光細菌への毒性や緑藻の成長阻害への毒性の増加が塩素注入率の増加とともに認められたが、チオ硫酸ナトリウムの添加によって脱塩素することで毒性の増加は低減された。このことから、高濃度の塩素剤が添加される場合には、還元剤による脱塩素が、環境での希釈拡散とともに影響低減に有効であると考えられた。また、紫外線消毒については、指標細菌および指標ウイルスとともに不活化効果が照射時間の増加とともに見られ、生態毒性の面からも、水生生物への毒性の明確な増加は認められなかった。一方、オゾン消毒については、指標ウイルスへは消費オゾン量の増加とともに消毒効果が見られたが、指標細菌についてはオゾン消費量が増加しても十分な消毒効果が見られなかった。またオゾン消毒は、生態毒性の面から見ると消費オゾン量の増加とともに水生生物への毒性影響が低減される傾向が見られたが、下水の塩分濃度が高くなると毒

性が増加する場合は見られた。

また、次世代シーケンサーによる細菌群集解析を行った結果、細菌DNAの海域での減衰傾向は、アイチウイルス、アデノウイルス等のウイルスの減衰傾向と一致おり、ヒト病原ウイルスのゲノム存在量の指標として、細菌DNA量が利用できる可能性が示唆された。

#### [キーワード]

病原微生物、消毒技術、生態毒性、東日本大震災、次世代シーケンサー

### 1. はじめに

東日本大震災によって、東北地方の下水処理場は大きな被害を受けたため、震災直後、下水は沈澱処理等の簡易処理の後、消毒がなされて水域へ放流されていた。下水処理水の放流先水域は、魚介類の豊富な地域も多く、またカキやノリの養殖もなされている海域もあることから、不十分な対策のまま下水中の病原微生物が水域に放流された場合には、病原微生物のヒトへの感染リスクが高まる懸念がある。したがって、下水中に存在する病原微生物に対する対策として、下水の消毒プロセスは非常に重要となる。その一方で、塩素消毒等の消毒プロセスを経た下水は、放流先水域の水生生物に対して毒性影響を与える可能性があり、放流先水域の水生生物影響を考慮した消毒技術の適用が求められる。これらのことから、震災時における下水処理場が機能不全に陥った場合にも適用可能な消毒技術の検討とともに、水生生物影響を軽減する消毒方法の選択に対しても考慮する必要がある。

### 2. 研究開発目的

上記の背景を鑑みて、本研究では、活性汚泥法等による生物処理を行っていない下水や接触酸化処理や簡易曝気処理などの簡易処理を行っている下水を対象として、塩素消毒、紫外線消毒、オゾン消毒といった各種消毒技術の消毒効果について評価を行った。また、塩素消毒プロセスを経た下水は、放流先水域の水生生物に対して影響を与える可能性があることから、消毒効果とトレードオフの関係となる生態毒性についても評価を行うとともに、水生生物影響を軽減する消毒方法の選択に対しても考察を加えた。また、次世代シーケンサーを用いた16SrRNA配列に基づく細菌群集解析を被災した下水処理場およびその放流先海域のサンプルに適用し、細菌群集構造が海域でどのように変化するか把握した。さらに、下水の混入を示すマーカーとして利用可能な医薬品類の濃度と比較することで、細菌群集構造の変化とクロタミトン濃度の変化との相関を調べた。

### 3. 研究開発方法

#### (1) 各種消毒技術に関する消毒効果の評価

##### 1) 試料の採水時期、採水地点

本研究では地震及び津波などによって下水処理場が被災した場合に、生物処理が不十分で病原微生物を高濃度を含むと思われる下水を環境に放流することになる。このような生物処理が十分ではない下水に対して消毒を行うための基礎情報を得るため、塩素、紫外線、オゾンの消毒効果と生態毒性を把握することを目的とした。東日本大震災に伴う津波により被害を受けた宮城県内

の4つの浄化センター(県南浄化センター、仙塩浄化センター、南蒲生浄化センター、石巻東部浄化センター)において、復旧段階にある平成24年9月から25年12月まで試料を採水し、塩素消毒、紫外線消毒およびオゾン消毒の室内実験を行った。試料の採水時期および地点は表(1)-1に示す。

表(1)-1 被災した4浄化センターにおける下水の採水時期、地点

採水時期	処理場	試料名	採取地点	採水時期	処理場	試料名	採取地点		
H24年9月	県南	初沈越流水	塩素添加前①	H25年8月	南蒲生	流入下水	流入下水		
		簡易曝気処理水	塩素添加前②			接触酸化処理水	塩素添加前		
	仙塩	初沈越流水	最初沈殿池後1系			H25年10月	石巻	初沈越流水	最初沈殿池後
		簡易曝気処理水	塩素添加前1系					生物処理水	塩素添加前
H25年1月	南蒲生	流入下水	流入下水	県南	初沈越流水		塩素添加前①		
		接触酸化処理水	塩素添加前		生物処理水		塩素添加前②		
	石巻	初沈越流水	最初沈殿池後	仙塩	初沈越流水	最初沈殿池後1系			
		生物処理水	塩素添加前		生物処理水	塩素添加前1系			
	県南	初沈越流水	塩素添加前①	H25年12月	南蒲生	流入下水	流入下水		
		生物処理水	塩素添加前②			接触酸化処理水	塩素添加前		
仙塩	初沈越流水	最初沈殿池後1系	石巻			初沈越流水	最初沈殿池後		
	生物処理水	塩素添加前1系				生物処理水	塩素添加前		
H25年6月	石巻	初沈越流水	最初沈殿池後	県南	初沈越流水	塩素添加前①			
		生物処理水	塩素添加前		生物処理水	塩素添加前②			
	仙塩	初沈越流水	最初沈殿池後1系	仙塩	初沈越流水	最初沈殿池後1系			
		生物処理水	塩素添加前1系		生物処理水	塩素添加前1系			

各処理場における具体的な採水地点は図(3)-1, (3)-3, (3)-5, (3)-7を参照。(県南：県南浄化センター、仙塩：仙塩浄化センター、石巻：石巻東部浄化センター、南蒲生：南蒲生浄化センター)

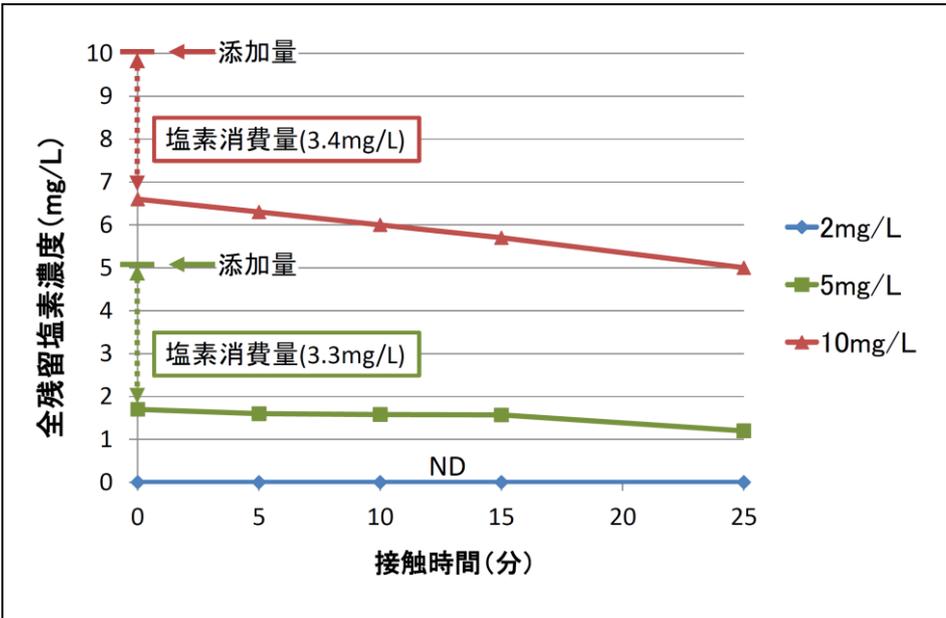
## 2) 塩素消毒実験

ビーカーに下水試料を1L入れ、次亜塩素酸ナトリウム(和光純薬：有効塩素12%)が塩素注入濃度で、2、5、10mg/Lとなるよう希釈して注入した後、シェーカーで攪拌を行った。各塩素濃度条件において0、5、10、15、25分と経時的に試料を採取し、大腸菌、大腸菌群、腸球菌、大腸菌フェージの濃度を培養法により測定した。試料採取に当たっての具体的な手順は以下のとおりである。残留塩素による微生物濃度の減衰を防ぐため、試料でのチオ硫酸ナトリウムが2.5mg/Lとなるよう10%のチオ硫酸ナトリウム溶液を適量、採水後直ちに添加して脱塩素した。大腸菌、大腸菌群、腸球菌、大腸菌フェージの測定方法については(1)-5「糞便性汚染指標の測定項目および測定方法」を参照。微生物濃度を測定する試料とは別に、残留塩素濃度を測定するための試料も採取し、試料採取後直ちに全残留塩素および遊離残留塩素の濃度を測定した。

残留塩素はHACH社の残留塩素計(ClorimeterTM2)を用いて測定した。具体的には、遊離残留塩

素と全残留塩素をそれぞれ発色試薬HACH0578、HACH 0582を用いて測定した。また、全残留塩素と遊離残留塩素の濃度の差をとることにより結合塩素濃度を求めた。

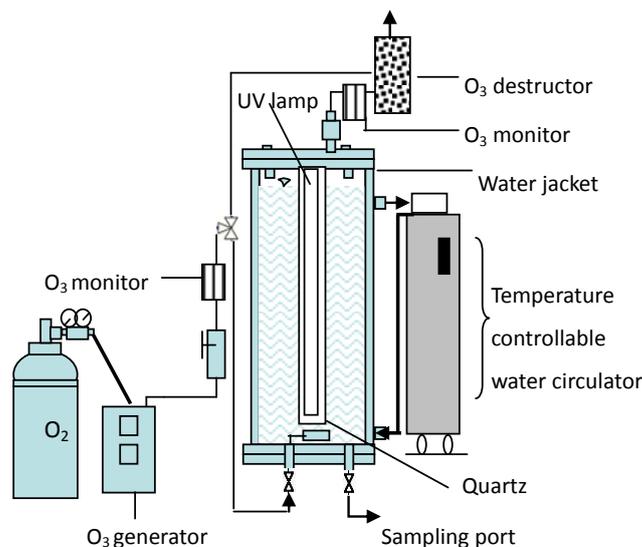
注入した塩素は下水中のアンモニアなどと直ちに反応し、遊離残留塩素濃度は不検出(ND)になったため、大半が結合塩素の形で存在したため、結合塩素濃度‘C(mg/L)’と接触時間‘T(分)’の積(CT値)に対して消毒効率を評価した。図(1)-1に接触時間に伴う全残留塩素濃度の変化を示す。T=0分の時点で採水した試料の塩素注入量と全残留塩素の濃度の間に差が見られることがわかる。前述のように、この濃度差は塩素添加後に直ちに試料中のアンモニアなどと反応して消費された量を反映していると考えられる。本研究では、この全残留塩素の濃度と塩素注入量の差が‘塩素消費量’である。



図(1)-1 塩素注入量と接触時間に伴う下水中の全残留塩素の濃度  
南蒲生浄化センター流入下水における測定結果。

### 3) 紫外線消毒実験

紫外線消毒は図(1)-2に示す実験装置を用いて行った。反応槽に下水試料を22L入れ、254nmを波長とした出力0.384mW/cm<sup>2</sup>の低圧水銀ランプで照射し、攪拌しながら回分式実験を行った。照射時間0、3、5、10、15、30分毎に試料を採取して、大腸菌、大腸菌群、腸球菌、大腸菌ファージの濃度を測定した。微生物の測定については(1)-5「糞便性汚染指標の測定項目および測定方法」を参照。



図(1)-2 オゾンおよび紫外線消毒実験装置の模式図

#### 4) オゾン消毒実験

オゾン消毒も紫外線実験と同様に図(1)-2に示す実験装置を用いて行った。反応槽に下水試料を22L入れ、1.14mg/L/minのオゾンガスをオゾン発生器で発生させ反応器下部より注入して半回分式実験を行った。接触時間0、10、15、30、45、60分毎に試料を採取し、大腸菌、大腸菌群、腸球菌、大腸菌ファージの濃度を培養法により測定した。試料採取後直ちに溶存オゾンによる微生物の減衰を防ぐため、チオ硫酸ナトリウム溶液を適量添加して脱オゾンし、微生物濃度を測定した。微生物の測定については(1)-5「糞便性汚染指標の測定項目および測定方法」を参照。微生物濃度を測定する試料とは別に、溶存オゾン濃度を測定するための試料も採取し、試料中の溶存オゾン濃度をインジゴカルミンによる吸光光度法<sup>1)</sup>を用いて測定した。オゾン反応装置の注入オゾンガス濃度と排オゾンガス濃度についてはオゾン測定機でモニタリングし、その差から溶存オゾン濃度を計算してオゾン消費量を求めた。

#### 5) 指標微生物の測定方法

本研究では糞便汚染の指標微生物として大腸菌群、大腸菌、腸球菌、大腸菌ファージを選定し、消毒による不活化を評価した。大腸菌群、大腸菌および腸球菌は下水中に元々存在しているものを対象として測定した。大腸菌ファージについては、下水中に元々存在している量が少ないため、室内で培養した大腸菌ファージ、MS2(ATCC 15597)を $10^5 \sim 10^6$ PFU/mLになるように添加した。

大腸菌群と大腸菌数の測定は、XM-G 寒天培地「日水」(日本製薬)を用いた平板培養法で行った。試料1mLと混合した培地を37℃で18～24 時間培養したのち、直径0.5 mm 以上の深紅～紫色の円形状または米粒状のコロニーを大腸菌群数として計数した。また、緑～青色に発色したコロニーを大腸菌数として計数した。腸球菌の検出にはKF STREPTOCOCCUS agar (Merck)を用いた平板培養法で行った。試料1mLと混合した培地を37℃で46～48時間培養したのち、直径0.5mm以上の深紅～紅色の円形状または米粒状のコロニーを腸球菌数として計数した。

大腸菌ファージの測定は、重層寒天培地法により行った。この方法では、宿主菌(大腸菌、K12)

を添加した寒天平板上で試料1mLを重層し培養することで、生育増殖した宿主菌がファージにより溶菌して形成された透明な円形状のプラークを計数し、ファージ濃度を算出した。

## (2) 各種消毒技術による水生生物への毒性影響

消毒実験の方法については上記(1)の研究開発方法と同じである。また、塩素消毒に関しては、通常の塩素混和池の滞留時間を考慮して、接触時間15分の試料を生態毒性試験に用いた。生態毒性試験としては、水域生態系において1次生産者として重要な役割を担っていると考えられる藻類への影響を評価する藻類生長阻害試験、および分解者としての役割を担っている細菌に対する毒性評価をMicrotox®試験を行った。

### 1) 藻類生長阻害試験

供試生物として、*Pseudokirchneriella subcapitata*(旧名 *Selenastrum capricornutum*)を用いた。*P. subcapitata*は、日本に生息する代表的な種ではないが、単細胞であり、細胞を計測する上で適当なサイズであり、一般に感受性が高いとされている。また、OECDテストガイドライン(TG201)においても、緑藻類の生長阻害試験の中で推奨種となっている。本研究では、独立行政法人国立環境研究所微生物系統保存施設から分譲された株(NIES-35)を用いた。

藻類生長阻害試験は、一般的に三角フラスコを用いて行われるが、三角フラスコの代わりに96穴マイクロプレートを用いる方法も提案されている。マイクロプレートを用いる試験方法では、三角フラスコを用いる試験方法よりも試験用量を減らすことができ、一斉に多数の消毒方法や消毒の濃度などに変えて試験を行うことができる利点がある。そこで、本研究では、このマイクロプレートを用いた試験を行った。

1サンプルにつき1枚のマイクロプレート(IWAKI、ポリスチレン製、96well細胞培養用マイクロプレート平底低蒸発タイプ・蓋付)を用いた。試験開始時の藻類初期細胞濃度を $1.0 \times 10^4$  cells/mLとし、1~512倍までの2の乗数ごとに10段階の希釈系列を作り、10×6の60ウェルを使用した。また、培地にはAAP培地を用いた。

コントロールは試験ごとにマイクロプレート1枚分設けた。曝露期間は96時間とし、マイクロプレートリーダー(TECAN、infinite F200)を用いて試験開始後0、24、48、72、96時間に波長450nmで吸光度を測定した。ここで、クロロフィルは450nm付近に吸収帯があること、及び450nmの吸光度と細胞濃度には高い相関関係があることから、450nmの波長で測定した。藻類増殖量をモニタリングした。試験時は液体蒸発を防止するために側面をパラフィンフィルム(PARAFILM、American National Can)で覆い、24℃、4000lux、120rpmで振とう培養した。

### 2) Microtox®試験

この試験は、海洋性発光細菌*Vibrio fischeri*(旧名 *Photobacterium phosphoreum*)を供試生物として、試水の毒性評価を行う試験である。本研究では分解者である細菌に対する毒性試験として行うが、この試験は曝露時間が短くスクリーニング試験としての位置付けとしての性格が強い。しかし、迅速かつ簡単で、再現性のよい試験法であり、毒性値の比較検討も行きやすいことから、この試験法を用いることにした。

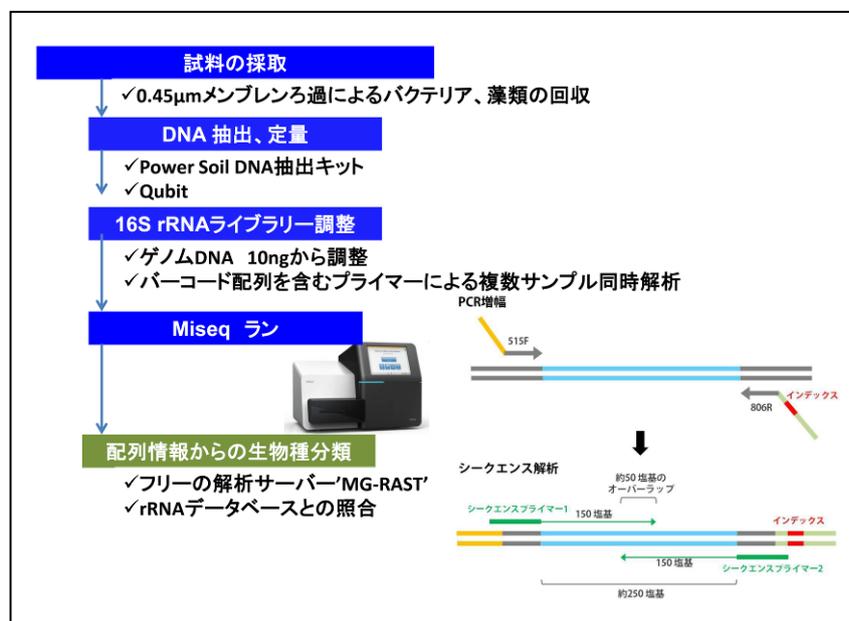
試験は20℃に保たれた恒温室内で行った。また、繰り返し連数を2連とし、対照区を1区、濃度

区を4区つくる試験法で行った。ここで濃度区は最高濃度から公比2の希釈段階をつくりスクリーニングを行った。ここで、サンプルを入れたキュベットは、測定装置の所定の場所におくことにより、測定中 $15\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に保った。

また、Microtox®測定装置にはAZUR Environmental、Microtox® M500 Analyzerを用いて、付属のマニュアルの手順に従って試験した。希釈水にはMicrotox® Diluent(Strategic Diagnostics)を用いた。基本的にサンプルを曝露してから、15分後の発光量から発光阻害率を出した。

### (3) 次世代シーケンサーを用いた細菌群集構造の解析

解析の流れを図(1)-3に示す。水試料からの細菌の分離、細菌からのゲノムDNAの抽出、次世代シーケンサー解析のためのライブラリーの調整、シーケンサーのラン、得られたデータのデータ解析を行った。



図(1)-3 次世代シーケンサーによる解析の流れ

#### 1) 採水

2013年8月および10月に南蒲生浄化センターにて塩素消毒水(放流水)、放流先の海域9地点で採水した。南蒲生浄化センターは未だに復旧途上であり、下水処理が不十分なまま海域に放流されている。放流先の海域で細菌やウイルスが比較的高い濃度で検出されると想定されるため、採水を行った。

#### 2) 細菌DNAの回収

各試料100~500mLを混合セルロース膜(Millipore、直径47mm、孔径 $0.45\mu\text{m}$ )を用いたろ過により細菌を膜面上に捕捉したのち、滅菌したフットボール型攪拌子を用いてセルロース膜から剥がし、エッペンチューブに回収した。回収した細菌から、PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO製)を用いてDNAを回収した。PowerSoil® DNA Isolation Kitは底質等に存在する細菌から

のDNA回収に定評のあるキットである。具体的な操作手順はキットに添付のマニュアルに従った。

### 3) DNA濃度の測定

DNA濃度を正確に測定することは以降のPCR反応やライブラリーの出来を大きく左右するので、吸光度による測定では不十分である。よって、DNA濃度の測定はQubit®2.0 Fluorometer (Life Technologies)を用いておこなった。なお、測定時の試料の量は1 µLとした。Qubit®2.0 Fluorometer はDNAに特異的に吸着する蛍光試薬を用いて濃度を高精度、高感度に測定する事が可能である。Qubit®2.0 Fluorometer による定量結果に基づいて、DNA濃度を1 ng/µLに調整した。回収されたDNA量がこれに満たないサンプルについては0.5 ng/µLに調整し、PCRに供した。

### 4) PCRによる16S rRNA V4領域の増幅

16S rRNA遺伝子V4領域をPCRにより増幅した。プライマーは515番目～806番目の塩基配列を挟むように設定した。プライマーにはバーコード配列が付加してあり、サンプル毎に異なるバーコード配列を使い分けることで最大96サンプルまで同時解析が可能である。PCR試薬はQuanti Fast SYBR Green PCR kit (QIAGEN社製)を用いた。PCR反応液の組成、反応条件をそれぞれ図(1)-4、図(1)-5に示す。

	DNA (1ng/µL or 0.5ng/µL)	4.5 µL	(最終量 2.25 ng or 4.5 ng)
	2× SYBR Green premix	7.5	
	Primer F	1.5	
	Primer R	1.5	
		total 15 µL	

図(1)-4 16S rRNA PCR反応液組成

94 3 min	
94 45 sec	
50 60 sec	
72 90 sec	
72 10min	

図(1)-5 16S rRNA PCR反応条件

### 5) 次世代シーケンサー用のライブラリーの調整

PCR産物はQIA quick® PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製した後、ライブラリー調整へ供した。各サンプルの16S rRNA PCR産物を当量ずつ混合し、「16S rRNA PCRライブラリー」を作成した。リアルタイムPCRによる濃度確認を経て次世代シーケンサーへ供した。

### 6) MiSeqでの遺伝子配列解析

2 nMに調整したライブラリーをさらに10pMに希釈して、illumina社製の次世代シーケンサーMiSeqへ供した。MiSeqは、京都大学流域圏総合環境質研究センター所有の機器を使用した。MiSeqランの試薬はMiSeq Reagent Kit、300 Cycles (illumina)を用いた。このキットは、PCR産物の両端から150bpずつ、合計300bpの配列が可能である。

### 7) データ解析

16S rRNAのアノテーション付は、フリーの解析サーバー Metagenomics RAST (MG-RAST) (<http://metagenomics.anl.gov/>)によって実施した。MG-RASTはBlast like Alignment Tool (BLAT) アルゴリズムを採用しており、ある閾値以上で類似性のある配列を検索してくれる。本研究では、閾

値は塩基配列の相同性(Min. % Identity Cutoff)を95%、最小の長さ(Min. Alignment Length Cutoff)を50base、e-valueの最大値を1e-30にセットして解析を行った。バクテリアの分類結果はFamily(科)レベルの分類で表示した。これは、16S rRNA V4領域だけでは属(genus)や種(species)レベルまでの分類は困難(配列の差がごくわずか)であり、学術誌でもFamilyレベルでの分類が一般的であることに倣った。サンプルごとにどのバクテリア種がどのくらいの割合を占めているのかを算出し、サンプル間でバクテリアの群集構造を比較した。なお、ある種の藻類は葉緑体のような色素体を持つ。色素体DNAに含まれる16S rRNAの配列から藻類についても分類を行った。

## 8) クロタミトン濃度の測定

放流先海域でのクロタミトンの濃度を液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC/MS/MS)によって測定した。クロタミトンは痒みどめの薬である。光分解に対して安定で、懸濁物質への吸着も少ないので、下水混入のマーカースとして使用可能である。試料500mLを固相抽出によって濃縮し、LC/MS/MSによって濃度を測定した。固相濃縮の方法は以下のとおりである。分析対象は溶存態とし、ガラス繊維ろ紙(孔径1.0 $\mu$ m, GF/B, Whatman)でろ過後、吸着剤が充填されたカートリッジ(Oasis HLB, Waters)を用いた固相抽出により濃縮を行い、LC/MS/MS {UPLC (AQUITY, Waters)、MS/MS (Quattro micro API, Waters)}を用いて測定を行った。定量は代替サロゲート法により行った。

## 4. 結果及び考察

### (1) 各種消毒技術に関する消毒効果の評価

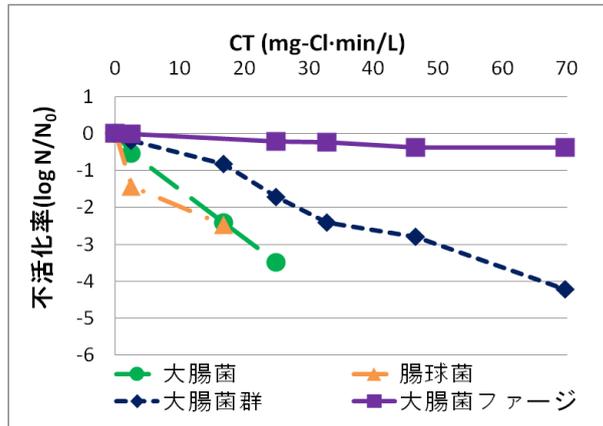
#### 1) 生物処理が不十分な下水における消毒処理による指標微生物の不活化

塩素、紫外線およびオゾン消毒に伴う指標微生物の不活化の結果をそれぞれ説明する。同じ消毒方法では、流入下水や初沈越流水、簡易曝気処理水および接触酸化処理水に対する消毒効果ついて、異なる処理場でも同様な結果が見られた。本章では南蒲生浄化センターのH25年1月分の流入下水および接触酸化処理水における消毒結果について説明する。

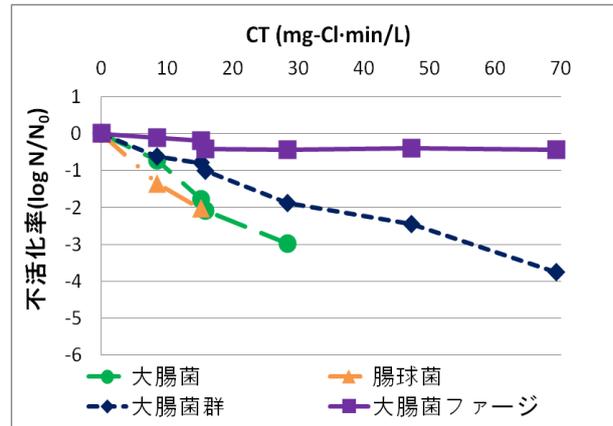
#### a. 塩素消毒実験

塩素消毒による指標微生物(大腸菌群、大腸菌、腸球菌および大腸菌ファージ、以下同じ)の不活化の結果を図(1)-6に示す。グラフの横軸はCT値(mg-Cl $\cdot$ min/L)、縦軸は指標微生物の不活化率の対数値である。大腸菌群、大腸菌、腸球菌および大腸菌ファージの結果をそれぞれ示す。流入下水と接触酸化処理水いずれについても、指標細菌(大腸菌群、大腸菌および腸球菌、以下同)については、CT値の増加とともに不活化率が増加したが、大腸菌ファージについては、不活化率はほとんど増加しなかった。指標細菌について、接触酸化処理水の不活化率の傾きは流入下水のそれより大きくなっていない。このことから、接触酸化処理によって塩素消毒による不活化率の改善が見られないことが分かった。

流入下水



接触酸化処理水



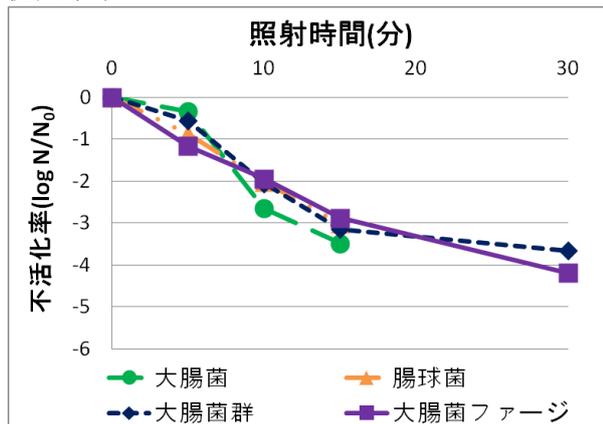
図(1)-6 塩素消毒に伴う指標微生物の不活化

南蒲生の流入下水および接触酸化処理水に対する結果。

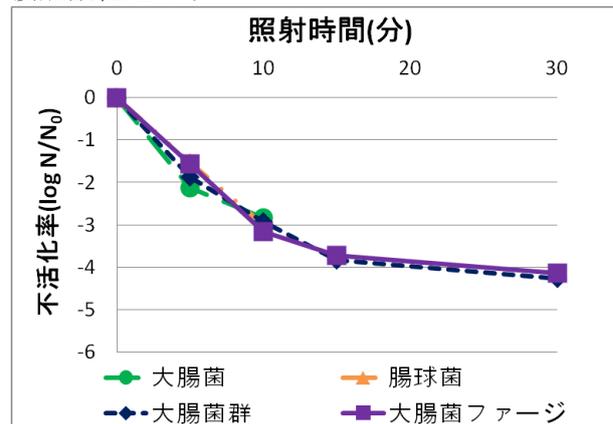
## b.紫外線消毒実験

紫外線消毒による指標微生物の不活化を図(1)-7に示す。下水中に存在する濁度等の吸光物質により紫外線照射強度が変化してしまうため、照射強度が正確に推定できなかった。そこで、ここでは紫外線の照射時間と指標微生物の不活化率の関係を図(1)-7に示した。グラフの横軸は照射時間(分)、縦軸は指標微生物の不活化率の対数値である。流入下水と接触酸化処理水いずれについても、指標細菌および大腸菌ファージのどちらに対しても照射時間の増加にともなう不活化率の増加が見られた。全ての指標微生物について、接触酸化処理水の不活化率の傾きは流入下水のそれよりも大きくなっていた。このことから、接触酸化処理によって紫外線消毒による不活化率の改善が見られることが分かった。

流入下水



接触酸化処理水



図(1)-7 紫外線消毒に伴う指標微生物の不活化

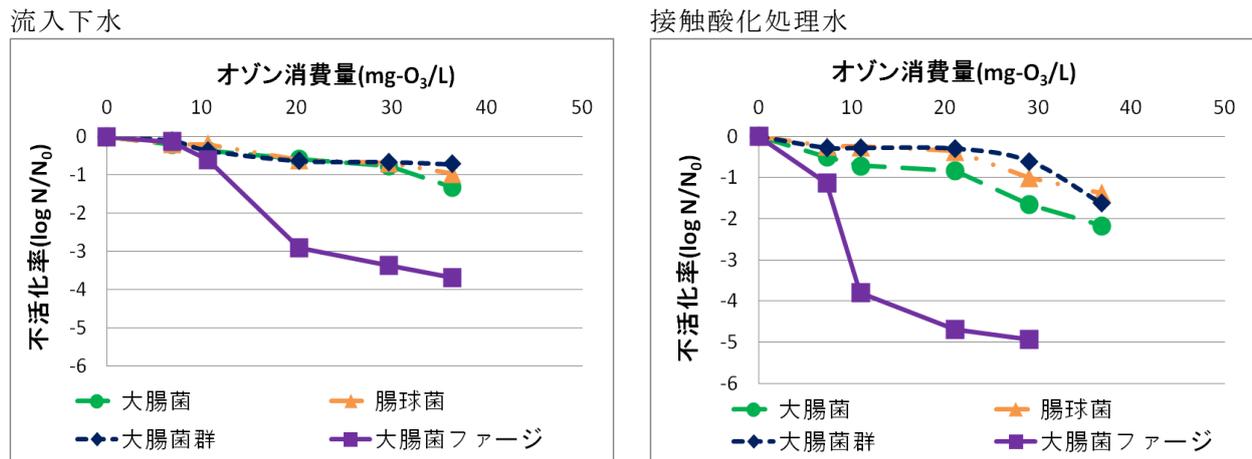
南蒲生の流入下水および接触酸化処理水に対する結果。

## c.オゾン消毒実験

オゾン消毒による指標微生物の不活化を図(1)-8に示す。下水中の溶存物質のために溶存オゾンは消費され、溶存オゾン濃度は一定に保たれない。そのため、オゾン消費量(mg/L)を算出し、オ

ゾン消費量と不活化率の関係を図示した。グラフの横軸はオゾン消費量(mg/L)、縦軸は指標微生物の不活化率の対数値を示す。流入下水と接触酸化処理水いずれについても、大腸菌ファージはオゾン消費量の増加に伴い不活化率が増加したが、指標細菌の不活化率は大腸菌ファージと比較して低かった。

全ての指標微生物について、接触酸化処理水の不活化率の傾きは流入下水のそれよりも大きくなっていった。このことから、接触酸化処理によってオゾン消毒による不活化率の改善が見られることが分かった。



図(1)-8 オゾン消毒に伴う指標微生物の不活化  
南蒲生の流入下水および接触酸化処理水に対する結果。

#### d.まとめ

本研究での宮城県内の4つの浄化センターから採水した下水を用いた消毒実験の結果からは、塩素消毒については、指標細菌の不活化には効果的であったが、ウイルスの指標と考えられるMS2大腸菌ファージにはほとんど不活化効果がなかった。これは注入された塩素が下水ではほとんど結合塩素となり、結合塩素のウイルスに対する不活化効果が低いためと考えられた<sup>2)</sup>。紫外線消毒については、全ての指標微生物の不活化には効果があった。オゾン消毒については、大腸菌ファージの不活化には効果的であるが、指標細菌の不活化効果は低かった。

また、接触酸化処理の消毒改善効果について、塩素消毒では、接触酸化処理水での指標細菌の不活化率の傾きが流入下水のそれより大きくなっていない。このことから、接触酸化処理によって不活化率の改善が見られないことが分かった。紫外線消毒およびオゾン消毒では、全ての指標微生物について、接触酸化処理水の不活化率の傾きは流入下水のそれよりも大きくなっていった。このことから、接触酸化処理によって不活化率の改善が見られることが分かった。

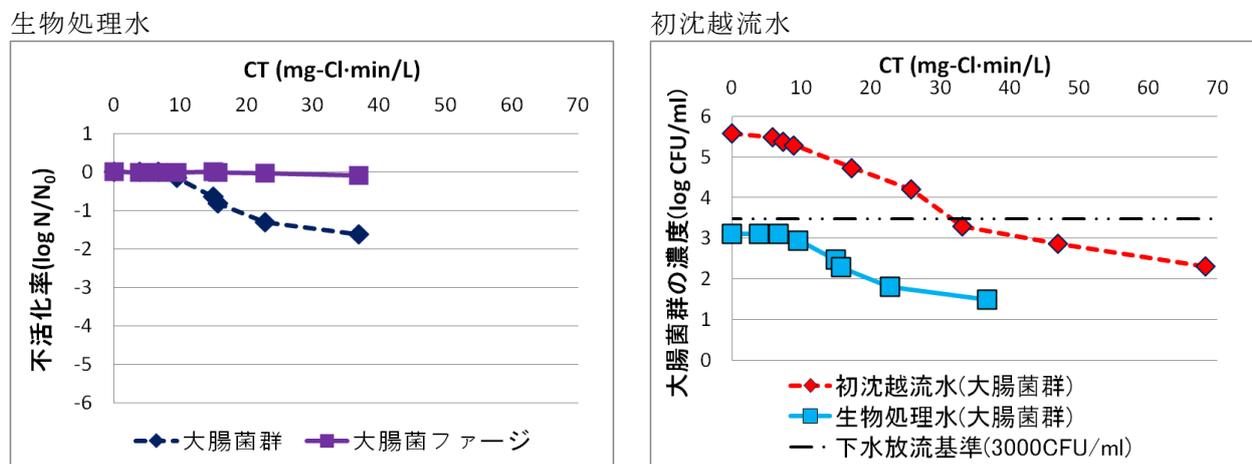
#### 2) 生物処理が復旧した浄化センターの生物処理水における消毒処理による指標微生物の不活化

生物処理が復旧した浄化センターの生物処理水における各種消毒実験の結果について説明する。代表例として仙塩浄化センターのH25年1月分の生物処理水における消毒結果について説明する。

### a. 塩素消毒実験

塩素消毒による指標微生物の不活化の効率を図(1)-9に示す。グラフの横軸はCT値(mg-Cl・min/L)、縦軸は指標微生物の不活化率の対数値である。CT値の増加に伴う不活化率の変化を示す。なお、大腸菌および腸球菌については生物処理水中の濃度が $10^1 \sim 10^3$ CFU/mLしかなく、僅かなCT値で検出下限値を下回ったため表示していない。大腸菌群および大腸菌ファージの結果のみ示す。また、比較対象として、生物処理が復旧していない時期の仙塩浄化センターの初沈越流水の消毒結果を示す(右)。なお、初沈越流水の塩素消毒結果については、縦軸は不活化率ではなく大腸菌群濃度の対数値(log[CFU/mL])で表示している。大腸菌群については、CT値の増加とともに不活化率が増加した(左)。

生物処理水については、塩素消毒実験を行う前から下水放流水基準を達成できていた(9右、青プロット及び青線、および黒点線)。初沈越流水での大腸菌群数(右、赤プロットおよび赤線)よりも濃度が明らかに低いのが、これは生物処理による不活化の結果と考えられる。



図(1)-9 生物処理水における塩素消毒に伴う指標微生物の不活化

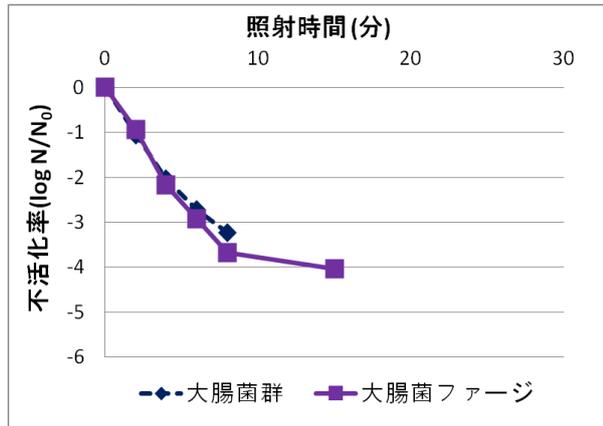
生物処理復旧後の仙塩浄化センターの生物処理水に対する塩素消毒実験の結果(左)。復旧前の初沈越流水に対する塩素消毒結果(右)。

### b. 紫外線消毒実験

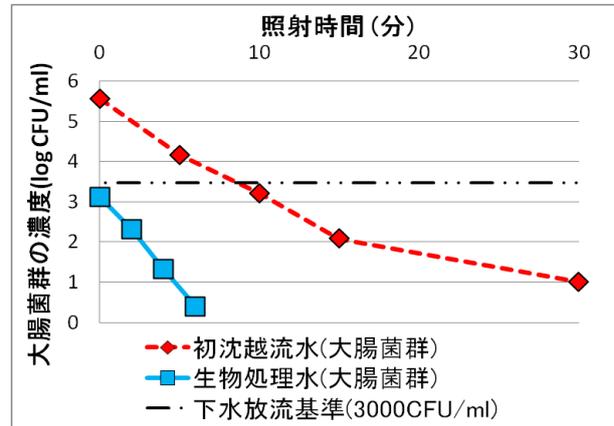
紫外線消毒による指標微生物の不活化の効率を図(1)-10に示す。グラフの横軸は照射時間(分)、縦軸は指標微生物の不活化率の対数値である。照射時間に伴う指標微生物の不活化率の変化を示す。また、比較対象として、生物処理が復旧していない時期の仙塩浄化センターの初沈越流水の消毒結果を示す(右)。なお、初沈越流水の塩素消毒結果については、縦軸は不活化率ではなく大腸菌群濃度の対数値(log[CFU/mL])で表示している。

生物処理水については、照射時間10分程で大腸菌群および大腸菌ファージが3~4log不活化する結果が得られた(左)。また、大腸菌群について、生物処理水における濃度減少の方が接触酸化処理水における濃度減少に比べて大きい結果が得られた(右、青線および赤線)。この結果は生物処理によって復旧前に比べて紫外線消毒の効果が改善したことを意味している。

生物処理水



初沈越流水



図(1)-10 生物処理水における紫外線消毒に伴う指標微生物の不活化

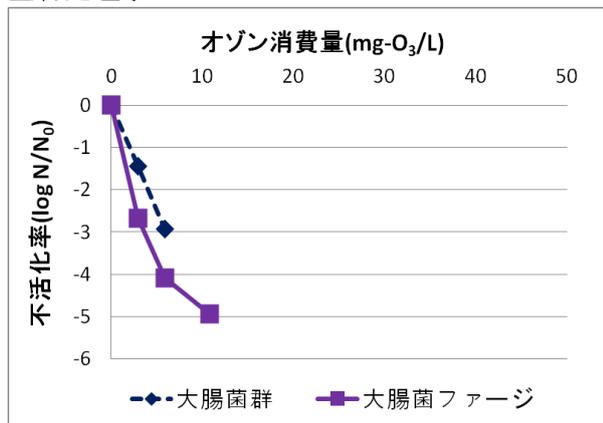
生物処理復旧後の仙塩浄化センターの生物処理水に対する紫外線消毒実験の結果(左)。復旧前の初沈越流水に対する紫外線消毒結果(右)。

### c. オゾン消毒実験

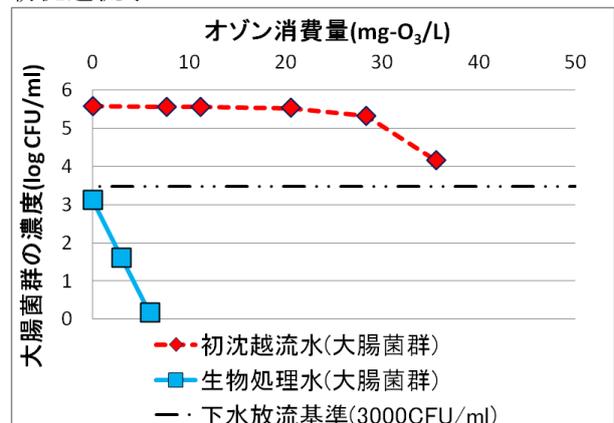
オゾン消毒による指標微生物の不活化の効率を図(1)-11に示す。グラフの横軸はオゾン消費量、縦軸は指標微生物(大腸菌群および大腸菌ファージ)の不活化率の対数値を示す。オゾン消費量(mg/L)の増加に伴う指標微生物の不活化率を示す。また、比較対象として、生物処理が復旧していない時期の仙塩浄化センターの接触酸化処理水の消毒結果を示す(右)。なお、初沈越流水の塩素消毒結果については、縦軸は不活化率ではなく大腸菌群濃度の対数値(log[CFU/mL])で表示している。

生物処理水については、オゾン消費量10mg-O<sub>3</sub>/L程で大腸菌群および大腸菌ファージが3~5log不活化する結果が得られた(左)。また、大腸菌群について、生物処理水における濃度減少の方が初沈越流水における濃度減少に比べて大きい結果が得られた(右、青線および赤線)。この結果は生物処理によって復旧前に比べてオゾン消毒の効果が改善したことを意味している。

生物処理水



初沈越流水



図(1)-11 生物処理水におけるオゾン消毒に伴う指標微生物の不活化

生物処理復旧後の仙塩浄化センターの生物処理水に対するオゾン消毒実験の結果(左)。復旧前の初沈越流水に対するオゾン消毒結果(右)。

#### 4) 段階的復旧に伴う各種消毒処理の効率の改善傾向の定量的解析

1)では復旧段階にある処理場における流入下水、簡易処理水に対して各種の消毒実験を行い、微生物の不活化率を把握した結果について説明した。南蒲生浄化センターで採水した試料での結果を代表例として示した。また2)では生物処理が復旧した後の生物処理水に対して各種の消毒実験を行い、微生物の不活化率を把握した結果について説明した。仙塩浄化センターで採水した試料での結果を代表例として示した。1)、2)ではCT値やオゾン消費量と微生物の不活化率のグラフの形状から定性的に議論したが、本章では復旧段階の簡易処理や復旧後の生物処理の消毒への効果について定量的に解析し、議論する。具体的には、復旧段階における簡易処理および復旧後の生物処理水について、99% (2log)の微生物不活化に必要なCT値(塩素消毒)、紫外線照射時間(紫外線消毒)、またはオゾン消費量(オゾン消毒)を算出して、その値の大小から復旧に伴う消毒効率の改善の有無を解析した。データは、流入下水と初沈越流水、簡易曝気処理水、接触酸化処理水、および生物処理水のそれぞれの試料毎に、4つの浄化センターのデータの平均値を求めて解析を行った。

被災した宮城県内の4カ所の下水処理場のそれぞれにおける復旧段階の簡易処理方法の概要は次のとおりである。復旧段階の初期には、簡易処理として沈殿のみを行っていた。復旧の速度は処理場の被害状況により異なるが、段階的に簡易生物処理（簡易曝気処理）、部分的生物処理、生物処理の順に移行した。南蒲生浄化センターは処理施設を新たに建設する予定であり、建設中は中級処理である接触酸化法を用いていた。石巻浄化センターでは、生物処理槽が一部復旧した時点で簡易生物処理（簡易曝気処理）を終了し、すべての生物処理槽が復旧するまでの間は過負荷の（HRTが短い）状態で生物処理を行っていた。詳しい説明はサブテーマ(3)『海域での病原微生物汚染の把握と影響』の項を参照。

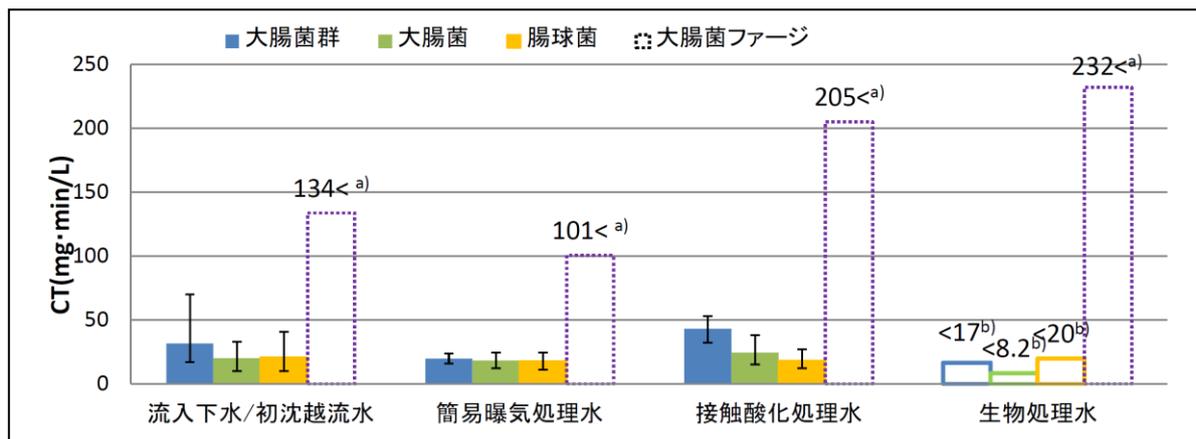
大腸菌群と大腸菌および腸球菌については99%の不活化に必要なCT値(塩素消毒)、紫外線照射時間(紫外線消毒)、またはオゾン消費量(オゾン消毒)を算出した。CT値は消毒結果のグラフ(例図(1)-6)から、99%の不活化に必要なCT値の概算値を求めた。紫外線照射時間、またはオゾン消費量についても消毒結果のグラフ(図(1)-7または図(1)-8)から概算値を求めた。

##### a. 復旧段階での塩素消毒の効率

塩素による消毒処理の効率について、99%の不活化に必要なCT値を図(1)-12に示した。グラフの横軸は復旧段階での各処理方法を示す。生物処理水については、全9試料中、2試料のみで指標微生物の濃度が100 (cfu or pfu/mL)を超えており、99%不活化の実験が成立した。よって2試料についての結果を示す。

指標細菌については、流入下水や初沈越流水における塩素による消毒効率と比較して、簡易曝気処理による明確な消毒効果の改善は見られなかった。また、接触酸化処理水でも消毒効率の改善は見られなかった。生物処理水については、99%不活化に必要なCT値が本実験での塩素消毒実験における最小のCT値以下の値となった。塩素消毒効果の改善を示していると考えられる。

大腸菌フェージについては図(1)-9で説明したように、塩素消毒での不活化は見られなかった。本実験条件下でのCT値では、99%不活化に十分ではなかった。



図(1)-12 復旧段階における塩素消毒処理の効率の比較-99%不活化に必要なCT値

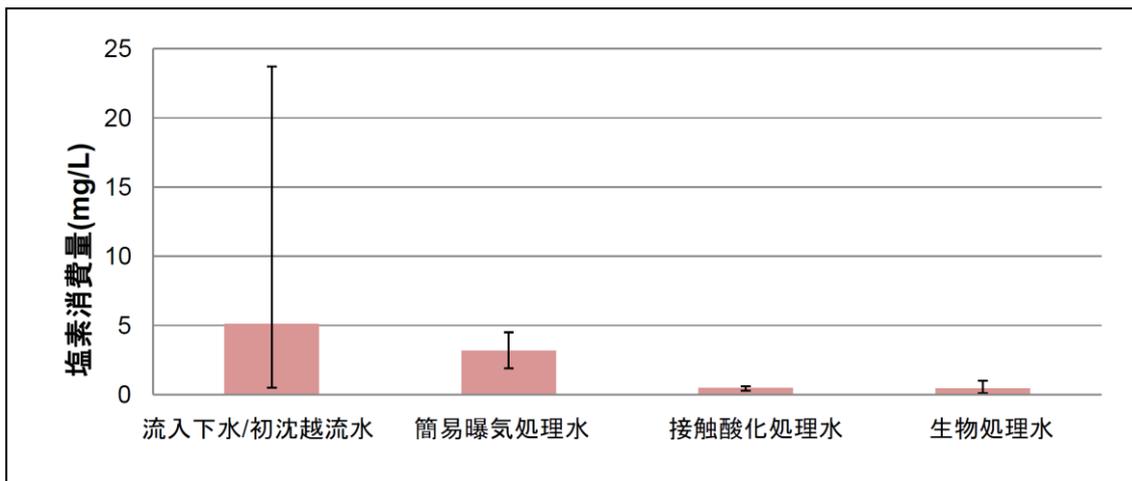
縦軸：99%の不活化に必要なCT値。平均値と最大値、最小値で示す。

a)：本実験での塩素消毒実験における最大のCT値を示す。これらファージについては、最大CT値でも99%の不活化が見られなかった。実際に99%不活化に必要なCT値はこれらの値より大きいと考えられる。

b)：本実験での塩素消毒実験における最小のCT値を示す。生物処理水では、最小のCT値(接触時間5分)でNDになった。この場合、実際に99%不活化に必要なCT値はこれらの値より小さいと考えられる。

例数：流入下水/初沈越流水(14)、簡易曝気処理水(2)、接触酸化処理水(3)、生物処理水(2、\*全9試料中2試料のみで消毒前に100個/mL以上の微生物検出)。

復旧段階における塩素消費量の変化を図(1)-13に示す。塩素消費量は有効な残留塩素を残すために必要な塩素の注入濃度の指標となる。簡易曝気処理、接触酸化処理、生物処理と復旧するに伴い、塩素消費量が少なくなる改善が見られた。簡易曝気処理は、下水あるいは初沈越流水よりも塩素消費量を低減できており、接触酸化処理は生物処理と同等に少ない塩素消費量であった。簡易曝気処理および接触酸化処理は、99%の不活化に必要なCT値の面から流入下水/初沈越流水と比較して明確な改善は見られなかったが(図(1)-12)、塩素の消費量を減らす効果は期待できることが分かった。つまり、特に指標細菌の消毒効果を確保するために要する塩素注入率は、塩素注入後の塩素消費量を低減できることから、節約できることから、簡曝気処理、接触酸化処理は効果的であったと思われる。しかしながら指標ウイルスの消毒効果はほとんど期待できないため、その視点からは簡易曝気処理や接触酸化処理の効果は見られない。



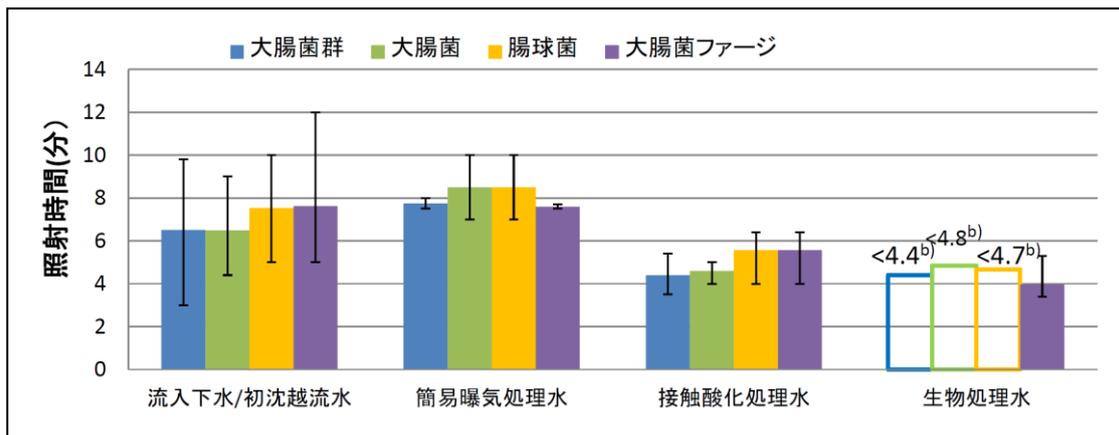
図(1)-13 復旧段階における塩素消費量の比較

塩素消費量の平均値と最大値、最小値。例数：流入下水/初沈越流水(14)、簡易曝気処理水(2)、接触酸化処理水(3)、生物処理水(9)。

#### b. 復旧段階での紫外線消毒の効率

紫外線による消毒処理の効率について、99%の不活化に必要な紫外線照射時間を図(1)-14に示した。グラフの横軸は各消毒の前処理方法、縦軸は指標微生物の不活化率を達成するために必要な照射時間(分)を示す。塩素消毒の結果(図(1)-12)と同様、生物処理水については、全9試料中、2試料のみで指標微生物の濃度が100 (cfu or pfu/mL)を超えており、99%不活化の実験が推定できた。よって2試料についての結果を示す。

流入下水や初沈越流水の消毒効率と比較して、簡易曝気処理による紫外線消毒効率の明確な改善は見られなかった。接触酸化処理では、全ての指標微生物の不活化に必要な紫外線消毒の照射時間(分)が減少しており、消毒効率の改善の傾向が見られた。生物処理についても、99%不活化に必要な紫外線照射時間が本実験での紫外線消毒実験における最小の測定時間5分を下回る値となり、消毒効率の改善を示していると考えられる。



図(1)-14 復旧段階における紫外線消毒処理の効率の比較-99%不活化に必要な紫外線照射時間  
縦軸：99%の不活化に必要な照射時間（分）。平均値と最大値、最小値で示す。

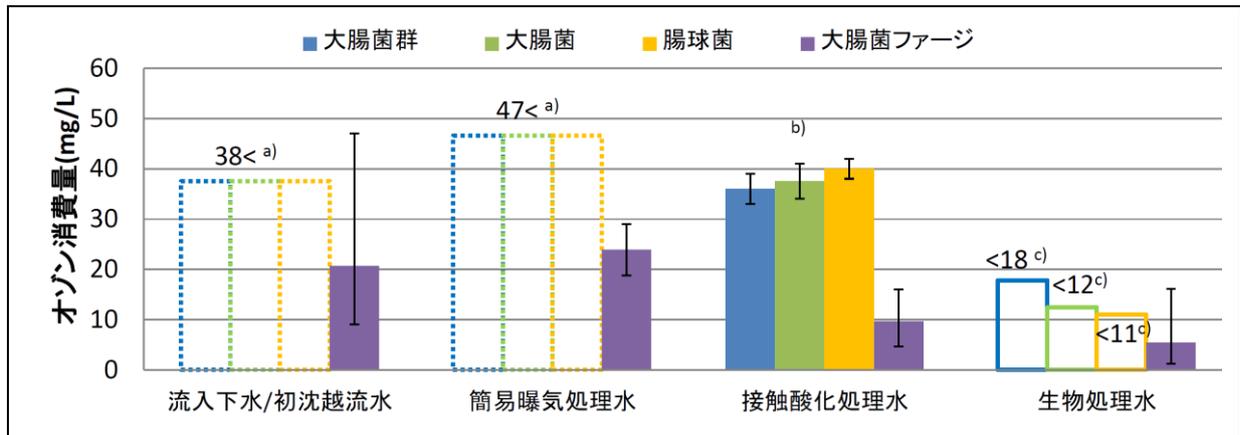
b): 本実験での紫外線消毒実験における最小の紫外線照射時間を示す。生物処理水では、最小の紫外線照射時間(3分)でNDになった。この場合、実際に99%不活化に必要な照射時間はこれらの値より小さいと考えられる。

例数：流入下水/初沈越流水(14)、簡易曝気処理水(2)、接触酸化処理水(3)、生物処理水(2、\*全9試料中2試料のみで消毒前に100個/mL以上の微生物検出)。

### c. 復旧段階でのオゾン消毒の効率

オゾンによる消毒処理の効率について、99%の不活化に必要なオゾン消費量(mg/L)を図(1)-15に示した。グラフの横軸は各消毒の前処理方法、縦軸は指標微生物の不活化率を達成するために必要なオゾン消費量(mg/L)を示す。塩素消毒、紫外線消毒と同様に、生物処理水については、全9試料中、2試料のみで指標微生物の濃度が100 (cfu or pfu/mL)を超えており、99%不活化の実験が推定できた。よって2試料についての結果を示す。接触酸化処理水については、全3試料のうち1試料については、最大のオゾン消費量でも99%の不活化が見られなかった。グラフは他の2回の平均値を示す。

流入下水や初沈越流水の消毒効率と比較して、簡易曝気処理によっても、指標細菌の消毒効率はほとんど改善できず、大腸菌ファージの99%の不活化に必要なオゾン消費量もほとんど変化しなかった。一方、接触酸化処理では、全ての指標微生物の99%の不活化に必要なオゾン消費量(mg/L)が大きく減少して、消毒効率の改善が有意に見られた。生物処理については、大腸菌群、大腸菌、腸球菌の不活化に必要なオゾン消費量が大きく減少して、消毒効率の改善が見られた。



図(1)-15 復旧段階におけるオゾン消毒処理の効率の比較-99%不活化に必要なオゾン消費量  
縦軸：99%の不活化に必要なCT値。平均値と最大値、最小値で示す。

a)：本実験でのオゾン消毒実験における最大のオゾン消費量を示す。最大オゾン消費量でも99%の不活化が見られなかった。実際に99%不活化に必要なオゾン消費量はこれらの値より大きいと考えられる。

b)：全3試料のうち1試料については、最大のオゾン消費量でも99%の不活化が見られなかった。グラフは他の2回の平均値を示す。

c)：本実験でのオゾン消毒実験における最小のオゾン消費量を示す。生物処理水では、最小のオゾン消費量(接触時間10分)でNDになった。この場合、実際に99%不活化に必要なオゾン消費量はこれらの値より小さいと考えられる。

例数：流入下水/初沈越流水(14)、簡易曝気処理水(2)、接触酸化処理水(2 (全3試料のうち1試料については、最大のオゾン消費量でも99%の不活化が見られなかった) )、生物処理水(2、\*全9試料中2試料のみで消毒前に100個/mL以上の微生物検出)。

#### 4) 消毒処理の効率と水質因子の関係

消毒実験による消毒効率と試料の水質項目(表(3)-2記載の基礎項目および化学指標)の測定値の相関関係を単回帰分析によって評価した。具体的には、指標微生物を99%または90%不活化するために必要な、塩素のCT値(mg・min/L)、紫外線照射時間(分)およびオゾン消費量(mg/L)と水質項目(塩分、電気伝導度、溶存酸素濃度(DO)、pH、酸化還元電位(ORP)、濁度、SS、BOD、E260、TOC、DOC、T-N(全窒素)、T-P(全リン)、NH<sub>4</sub>-N(アンモニア性窒素)、PO<sub>4</sub>-P(リン酸態リン))の単回帰分析を行った。同様に、塩素消費量と水質項目の相関についても解析を行った。99%と90%の結果について同様な傾向が見られたため、99%の場合のみを示す。なお、図(1)-12、(1)-14、(1)-15で示したように、大腸菌群、大腸菌および腸球菌の不活化に要求されるCT値、紫外線照射時間、オゾン消費量は互いに同様な傾向を示したため、大腸菌群についての解析結果を代表として表(1)-2に示す。単回帰分析の結果得られたR<sup>2</sup>値の大きさに応じて(-)から(+), (++)、(+++)の4段階で示している。また、相関係数の値が正(正の相関)であった場合には赤色、負(負の相関)であった場合には青色で示している。

表(1)-2 99%の不活化に必要なCT値、紫外線照射時間、オゾン消費量と水質項目の相関

	塩素消毒CT値		塩素消費量	UV照射時間		オゾン消費量		記号	R <sup>2</sup> 値
	大腸菌群	大腸菌フェージ		大腸菌群	大腸菌フェージ	大腸菌群	大腸菌フェージ		
塩分	-		-	-	-			(-)	~0.09
EC	-		-	-	-			(+)	0.1~0.49
DO	-		-	-	+			(++)	0.5~0.79
pH	-		-	-	-			(+++)	0.8~
ORP	+		+	+	++				
濁度	+		+	+	++				
SS	+		-	+	+				
BOD	-	不活化効果 ほとんどなし	+	+	++		不活化効果 ほとんどなし		
E260	+		+	+	++				
TOC	-		+	+	-				
DOC	-		-	-	-				
T-N	-		+	-	+				
NH4-N	+		+	-	-				
T-P	-		-	-	+				
PO4-P	-		+	-	+				

赤記号：相関係数の値が正。青記号：相関係数の値が負。

塩素消毒については、大腸菌フェージの不活化効果がほとんどなかったため、示していない。オゾン消毒については、指標細菌の不活化効果が少なかったため、示していない。

以下に、消毒方法毎に考察する。

#### a. 塩素消毒の効率

不活化効果に必要なCT値については、一つの水質因子で説明できる明確な相関は見られなかったが、ORPの還元物質に正の、濁度、SSの濁質成分、E260の有機物成分、アンモニア性窒素成分については負の弱い相関がみられた。塩素消費量についても、一つの水質因子で説明できる明確な相関は見られなかったが、BODやE260、TOC等の有機物指標とアンモニア性窒素と弱い相関が認められた。塩素消費量を抑え、十分なCT値を確保する上ではこれらの指標を下げる前処理を塩素消毒前に行うことが望ましい。また、接触酸化は、指標細菌を若干ではあるが低減させる効果も見られるため(図(3)-14参照)、同じ指標細菌レベルを達するために必要な不活化レベルを低下させる効果もある。

#### b. 紫外線消毒の効率

大腸菌フェージについて、不活化に必要な照射時間は、濁度、SS、BOD、E260との間に比較的強い正の相関が見られた。紫外線消毒については、紫外線の透過の妨害になる粒子や有機物の指標を下げる前処理が望ましい。特に、E260の値については、接触酸化処理の前後で値が0.35から0.25(n=3の平均、除去率としては30%)へと低減していた。これに対して、簡易曝気処理の前後での値の変化は0.47から0.51(n=2の平均)であり、低減が見られなかった。接触酸化処理の方が簡易曝気処理よりも紫外線の消毒の効果が高かった(図(1)-14)原因の一つとして、接触酸化処理によるE260を指標とする有機物の低減が考えられる。

#### c. オゾン消毒の効率

大腸菌フェージについて、不活化に必要なオゾン消費量は、濁度、SS、BOD、E260、T-N、T-P、PO<sub>4</sub>-P等との間に正の相関が見られた。したがってオゾン消毒については、オゾンを消費する粒子や有機物の指標を下げる前処理が望ましい。特に、E260の値については、接触酸化処理の前後で

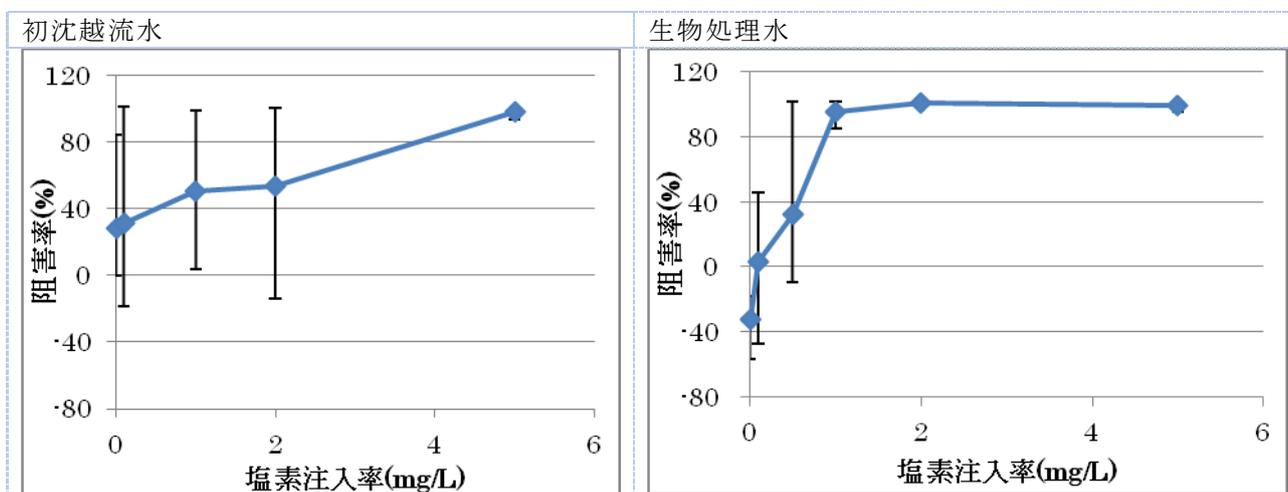
値が0.35から0.25(n=3の平均、除去率としては30%)へと低減していた。これに対して、簡易曝気処理の前後での値の変化は0.47から0.51(n=2の平均)であり、低減が見られなかった。接触酸化処理の方が簡易曝気処理よりもオゾン消毒の効果が高かった(図(1)-14)原因の一つとして、接触酸化処理によるE260を指標とする有機物の低減が考えられる。

## (2) 各種消毒技術による水生生物への毒性影響

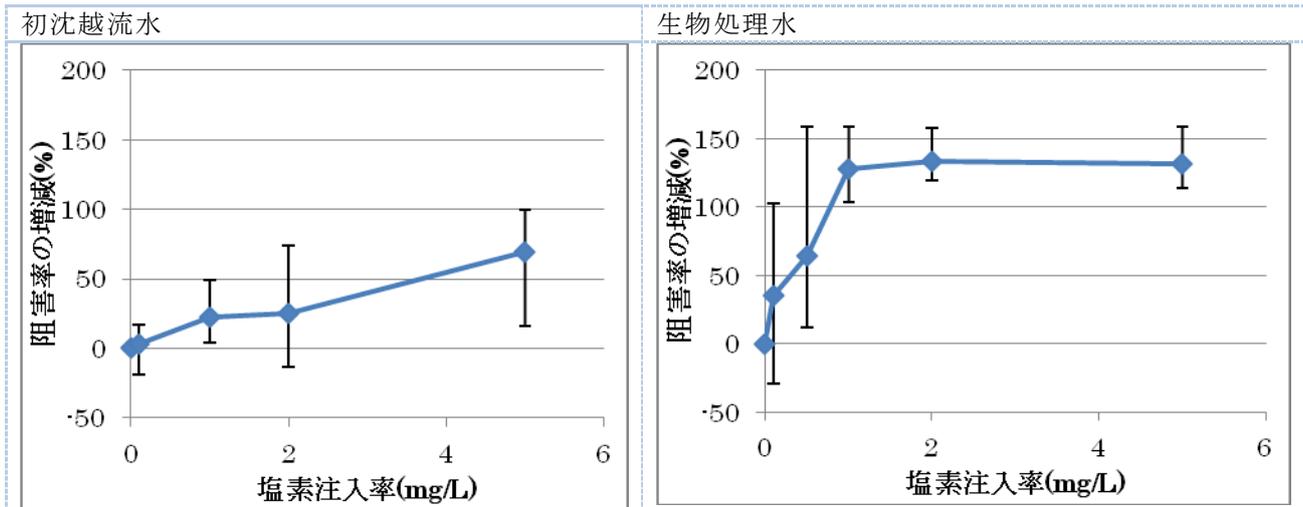
### 1) 塩素消毒

各種消毒技術による水生生物への毒性影響について評価するために、各種消毒技術による消毒実験後の試料について、藻類生長阻害試験およびMicrotox®試験を実施した。はじめに、塩素消毒実験による藻類生長阻害試験の結果を図(1)-16～(1)-17に示す。図(1)-16は数回行った塩素消毒実験による毒性試験の平均値をとったものである。また、図(1)-17は、初沈越流水自体が藻類に高い毒性を示すことがあることから、消毒の効果のみを抽出することを目的として、塩素消毒前の阻害率をゼロとしたときの、塩素消毒による毒性の増減をグラフにしたものである。

図(1)-16から、初沈越流水自体が藻類に高い毒性を示すことがあり、塩素消毒を行う前の試料についても30%程度の阻害率が見られた。塩素消毒においては、塩素注入率が増加するとともに藻類生長への阻害率が上昇し、塩素注入率が5mg-Cl/L以上になると非常に高い毒性が示された。生物処理後の二次処理水においては、塩素注入率1mg-Cl/L程度で高い阻害率を示した。このことから、初沈越流水の試料と比較して、二次処理水の方が塩素処理によって毒性が増加しやすいことがわかった。これは、生物処理によって、塩素を消費する物質が取り除かれたことによって、毒性の強いクロラミンの生成量が大きくなったためであると思われる。

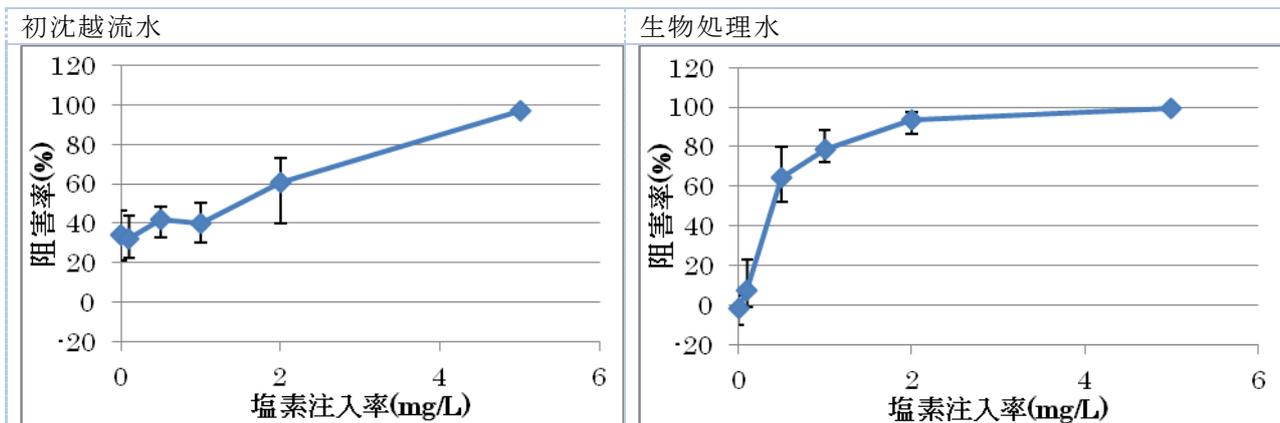


図(1)-16 塩素消毒による藻類への毒性影響

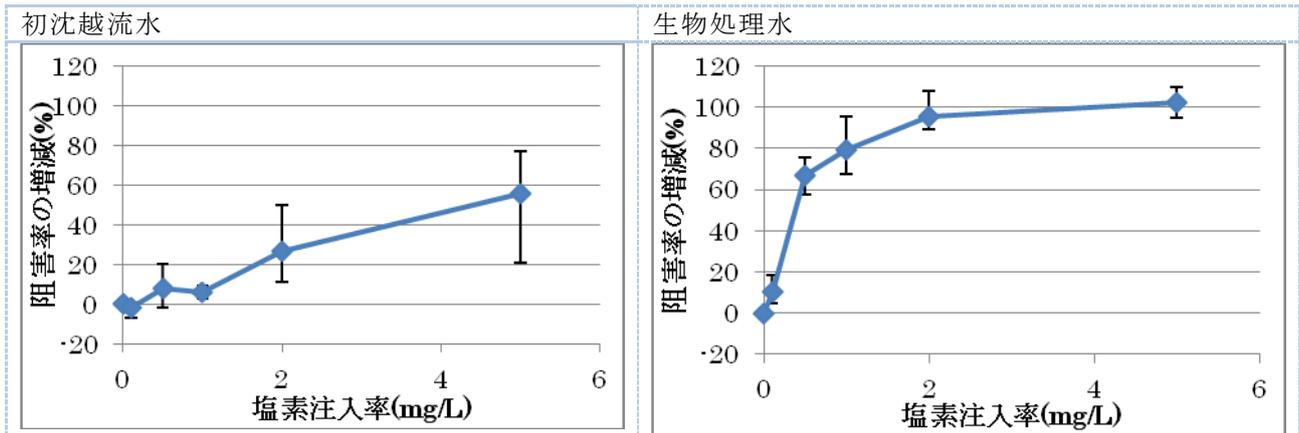


図(1)-17 塩素消毒による藻類への毒性影響の増減

次に、塩素消毒実験によるMicrotox®試験の結果を図(1)-18～(1)-19に示す。図(1)-18は数回行った塩素消毒実験によるMicrotox®試験の平均値をとったものである。また、図(1)-19は、藻類の場合と同様に初沈越流水自体が高い毒性を示すことがあることから、消毒の効果のみを抽出することを目的として、塩素消毒前の阻害率をゼロとしたときの、塩素消毒による毒性の増減をグラフにしたものである。図(1)-18から、初沈越流水自体が指標細菌に毒性を示すことがあり、塩素消毒を行う前の試料についても平均で約30%程度の阻害率が見られた。塩素注入率が増加するとともに指標細菌への毒性影響は上昇し、塩素注入率が5mg-Cl/L以上になると非常に高い毒性が示された。生物処理後の二次処理水においては、塩素注入率1mg-Cl/L程度で高い阻害率を示した。このことから、藻類生長阻害試験の場合と同様に、Microtox®試験においても、初沈越流水と比較して、二次処理水の方が塩素処理によって毒性が増加しやすいことがわかった。これは、生物処理によって、塩素を消費する物質が取り除かれたことによって、毒性の強いクロラミンの生成量が大きくなったためであると推察される。

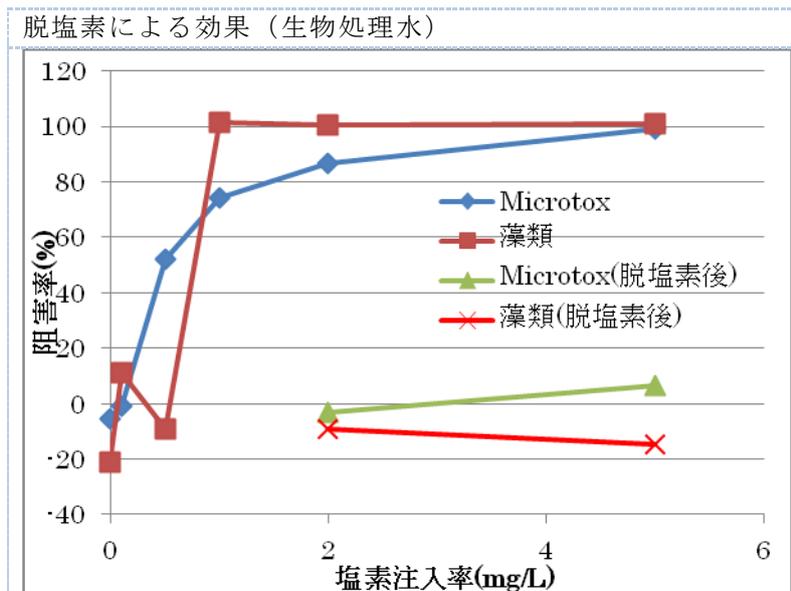


図(1)-18 塩素消毒による指標細菌への毒性影響



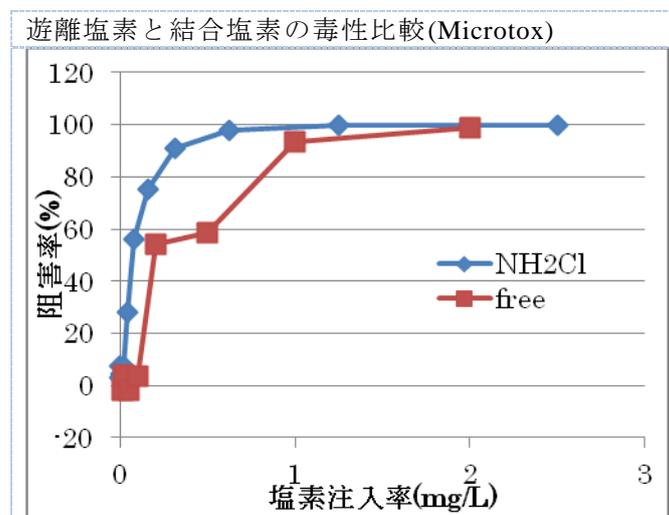
図(1)-19 塩素消毒による指標細菌への毒性影響の増減

藻類および指標細菌ともに、塩素注入率が増加するとともに、阻害率が上昇し生物への毒性影響が観察されたが、その毒性緩和技術について探るために、還元剤であるチオ硫酸ナトリウムを添加し、消毒後の試料について脱塩素を行ったときの毒性緩和効果について検討した。その結果を図(1)-20に示す。図(1)-20より、塩素による消毒後の残留塩素が残っている試料に対して、チオ硫酸ナトリウムを用いて脱塩素を行うことにより、藻類および指標細菌への阻害影響が観察されなくなり、塩素由来の毒性を緩和することが出来た。そのため、塩素消毒後はチオ硫酸ナトリウムなどの還元剤によって脱塩素することで、放流先水域の水生生物に対する毒性影響を緩和することができるかと推定される。下水道放流基準の大腸菌群数3,000個/mL以下となる塩素注入率およびCT値においては、どの試料においても藻類、指標細菌ともに高い阻害率を示す結果となったため、放流先の水生生物の保護を考えると、脱塩素によって水生生物への影響を緩和する処理を行うことが必要となってくると考えられる。

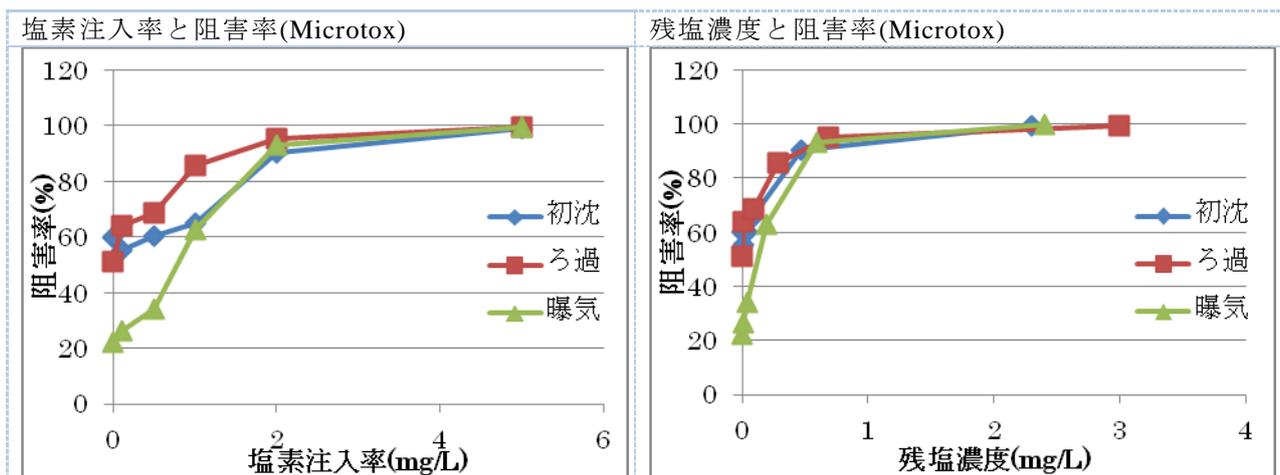


図(1)-20 塩素消毒時の脱塩素による毒性の緩和効果

一方、消毒のために添加される塩素は、水中にアンモニアが存在すればそのアンモニアと反応してクロラミンなどの結合塩素となる。そこで、結合していない遊離塩素とクロラミンなどの結合塩素について、それぞれの水生生物への毒性影響に差があるかどうかについて調べた。その結果を図(1)-21に示す。その結果、塩素消毒による水生生物への毒性影響は遊離塩素よりも結合塩素の方が毒性は高いことが示された(図(1)-21)。また、今回、消毒実験の対象とした試料は、生物処理を行っていない未処理下水であることから、消毒の前の前処理プロセスとして、ろ過、簡易曝気処理といった前処理を行った後、試料に塩素消毒を行った。その結果を図(1)-22に示す。図(1)-22の結果から、曝気によって下水そのものの毒性の低下が見られたが、塩素注入率が2mg-Cl/L以上とした場合には、前処理の違いによる生態毒性の値に差は見られず、残留塩素濃度の増加につれて、毒性が増加することが確認された。



図(1)-21 遊離塩素と結合塩素の毒性比較 (Microtox試験)



図(1)-22 前処理と塩素消毒

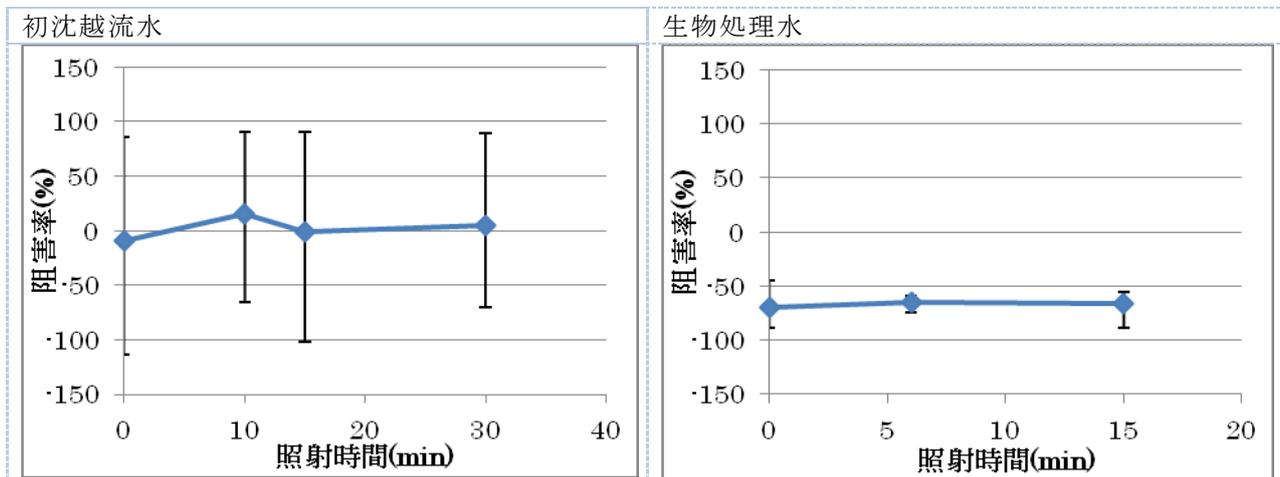
以上のことから、塩素消毒においては、放流基準を達成する塩素注入率を確保するとき、放流先の水生生物の保護を考えると、チオ硫酸ナトリウム等の還元剤によって脱塩素することが望ま

しく、またその際、遊離塩素よりも結合塩素の方が藻類・指標細菌にとっては毒性影響が高かったことから、塩素消毒後は結合塩素の動態把握がより必要になってくるものと考えられる。

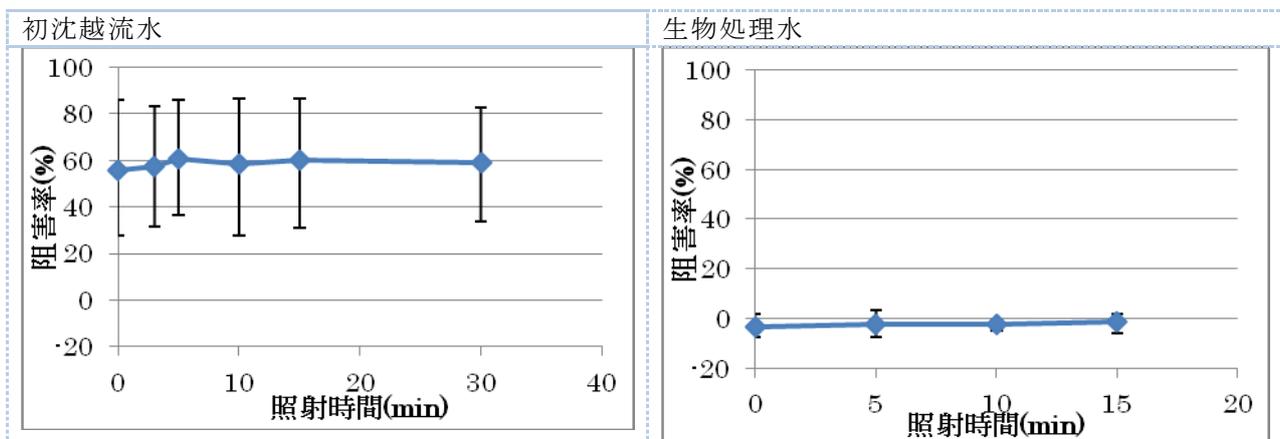
## 2) 紫外線消毒

紫外線消毒による生態毒性試験の結果を図(1)-23～25に示す。図(1)-23および図(1)-24は、塩素消毒の場合と同様に、藻類生長阻害試験およびMicrotox®試験に対して、数回の実験結果の平均値をとったものである。また、図(1)-25は、初沈越流水自体が藻類および指標細菌に対して高い毒性を示す場合があることから、消毒の効果のみを抽出することを目的として、消毒前の阻害率をゼロとしたときの、紫外線消毒による毒性の増減をグラフにしたものである。

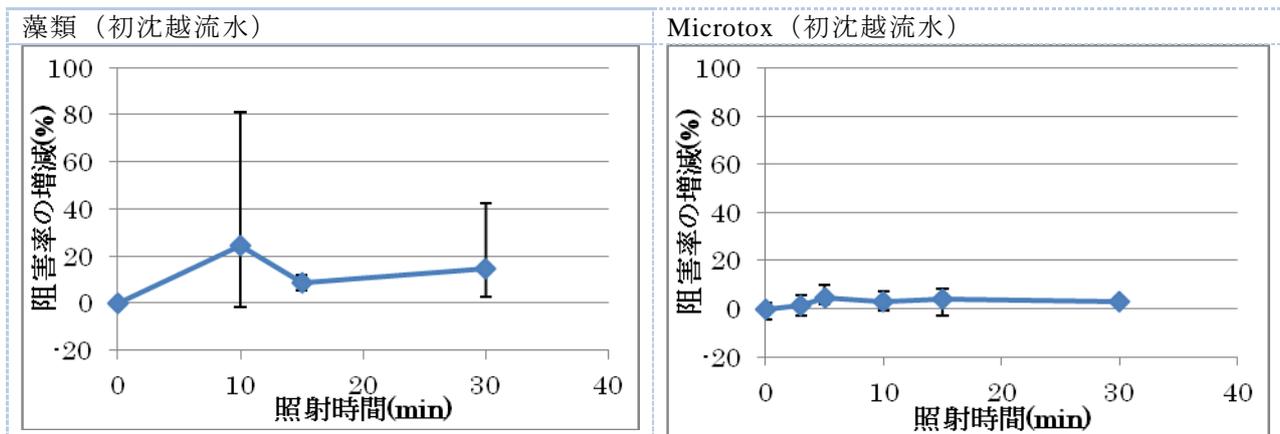
これらの結果から、紫外線消毒においては、初沈越流水、生物処理水のどちらにおいても、紫外線照射時間を長くした場合でも、藻類、指標細菌ともに毒性の増減は確認できなかった。以上のことから、生態毒性影響の視点から考えた場合、紫外線消毒は有利な消毒技術であると考えられる。



図(1)-23 紫外線消毒による藻類への毒性影響



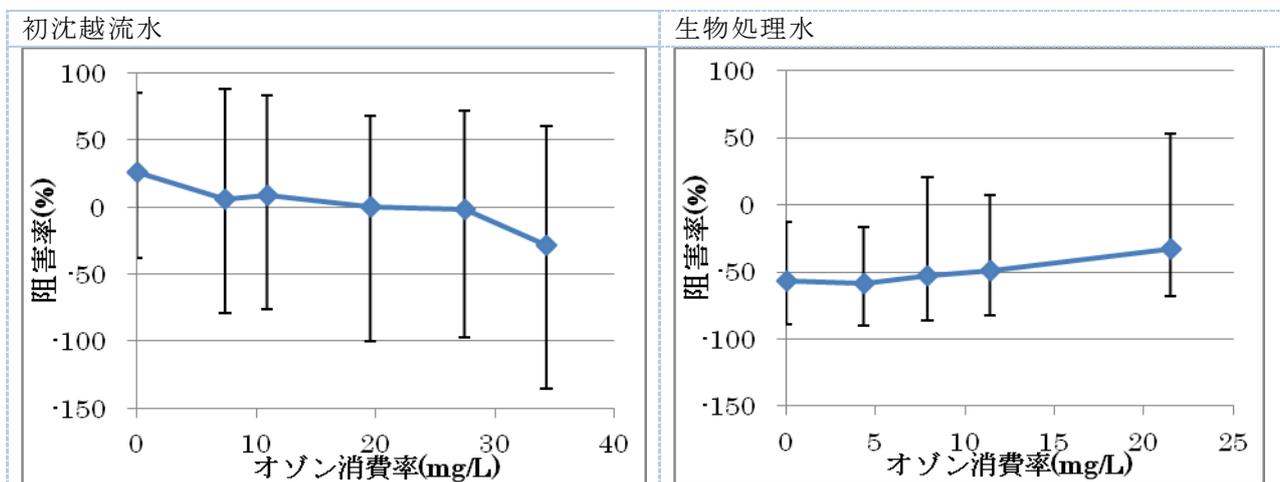
図(1)-24 紫外線消毒による指標細菌への毒性影響



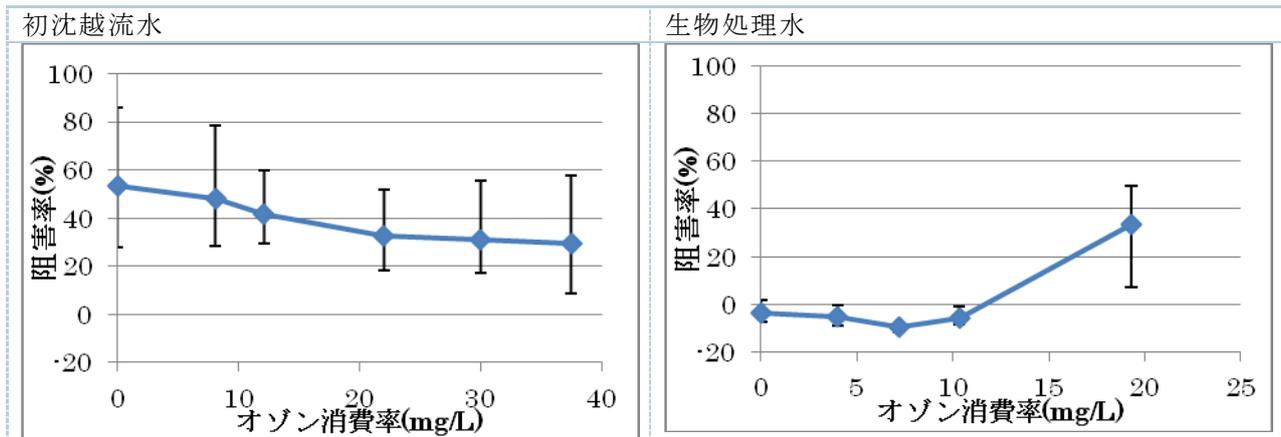
図(1)-25 塩素消毒による藻類および指標細菌への毒性影響の増減

### 3) オゾン消毒

オゾン消毒による生態毒性試験の結果を図(1)-26および27に示す。初沈越流水では、いままで記述したように、藻類および指標細菌に対して毒性影響を持つ場合が見られ、オゾン消毒を実施する前の試料について阻害率が観察された。しかし、オゾン消毒を行うことで、藻類、指標細菌ともに毒性影響を低減することが観察された。下水中には、人間の日常生活に由来する種々の化学物質が含有されることが明らかになっているが、オゾンはそれら化学物質に対する分解する作用があることが報告されており、その結果として、水生生物への毒性影響が低減されたものと推察される。



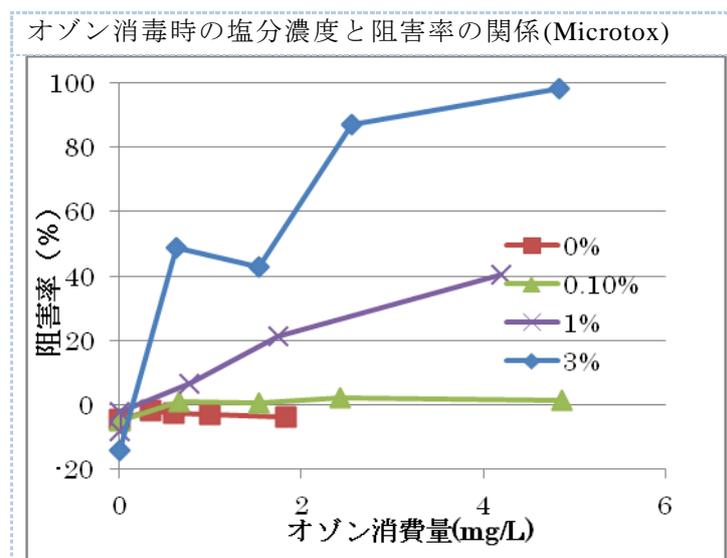
図(1)-26 オゾン消毒による藻類への毒性影響



図(1)-27 オゾン消毒による指標細菌への毒性影響

ただし、生物処理水後の試料について、オゾン消費量の増加に伴って毒性が増加する場合が見られた。この現象は、塩分濃度の高かった二次処理水をオゾン消毒した試料でみられ、試料中の塩分とオゾンが反応することで、次亜塩素酸ナトリウムが生じたため、それにともない毒性が増加したものと推察された。

オゾン消毒を行う場合、塩分濃度とオゾン消毒による毒性上昇の把握が必要になってくると思われる。そこで、塩分濃度を0~3%に調整した純水を準備し、その試料をオゾン処理した場合における塩分濃度と阻害率の関係を図(1)-28に示す。ここでは、毒性影響としては、Microtox®試験を行って評価している。その結果、水の塩分濃度が高くなるにつれ、オゾン消毒によって毒性が上昇する結果が得られた。特に、塩分濃度が3%のときには、非常に高い阻害率が示され、オゾン消費量が5mg/Lとなった場合には、阻害率がほぼ100%となった。また、このとき、塩素濃度を測定したところ、オゾン消毒後の試料から残留塩素が検出され、塩分とオゾンの反応によって次亜塩素酸ナトリウムが生成し、その結果として水生生物への毒性が上昇したものと推察された。



図(1)-28 オゾン消毒時の塩分濃度と阻害率

以上の結果から、オゾン消毒は毒性影響の視点から考えると、下水中に含有されている水生生物に毒性影響を示す化学物質が除去されることで、毒性影響が低下することが期待される。しかし、特に震災時など、海水の混入などで下水の塩分濃度が高い場合は、オゾン消毒によって毒性影響が増加しうる場合があるため、塩分濃度の把握が必要になってくると考えられる。

#### 4) 各種消毒技術に関する消毒効果と生態毒性の評価

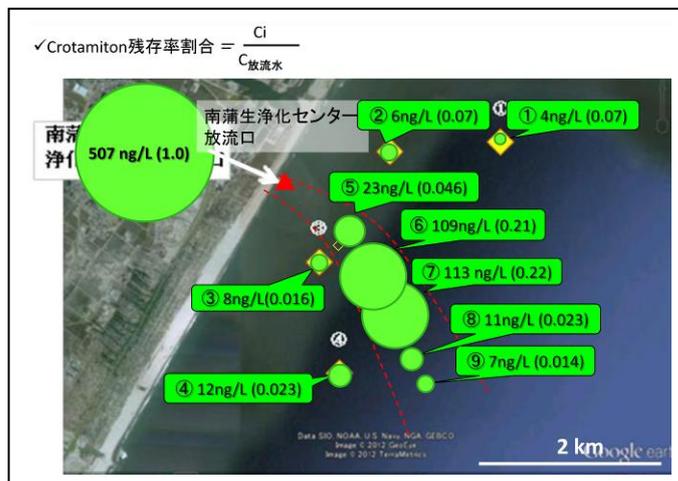
今まで得られた塩素消毒、紫外線消毒およびオゾン消毒という3種類の消毒技術について、初沈越流水を試料水として検討を行った消毒効果および生態毒性の観点からまとめた結果を表(1)-3に示す。表(1)-3の結果より、塩素消毒については、大腸菌群や腸球菌といった指標細菌については消毒効果が認められるが、ウイルスについては消毒効果が低いことが分かる。一方、放流先水域の水生生物への毒性影響については、放流水の水生生物への毒性影響を考慮する必要がある。すなわち、チオ硫酸ナトリウムなどに代表される還元剤によって塩素を脱塩素する、環境水によって十分な希釈を行うなどの対策を行う必要がある。また、紫外線消毒については、大腸菌群や腸球菌といった指標細菌だけでなくウイルスに対する消毒効果が認められるとともに、生態毒性の面から見ても、放流先水域の水生生物への毒性影響はないと考えられ、有効な消毒技術であると考えられる。ただ、初沈越流水のように水中の懸濁物質のために紫外線が十分に透過しない場合には、消毒効果が低下する場合もあるために、その適用性の限界について注意する必要がある。さらに、本研究では紫外線の消毒効果を、実験装置の紫外線照射時間に対する微生物の不活化の程度で評価しているが、照射強度の評価も重要である。一方、オゾン消毒については、ウイルスに対する消毒効果は2log以上と十分な消毒効果が得られているが、大腸菌群および腸球菌といった指標細菌については消毒効果が不十分である。オゾン消毒は、下水中の化学物質の分解には有効であることから、生態毒性の面から見ると水生生物への毒性影響が低減されるという効果がある。

表(1)-3 各消毒技術における消毒効果および生態毒性に対する評価

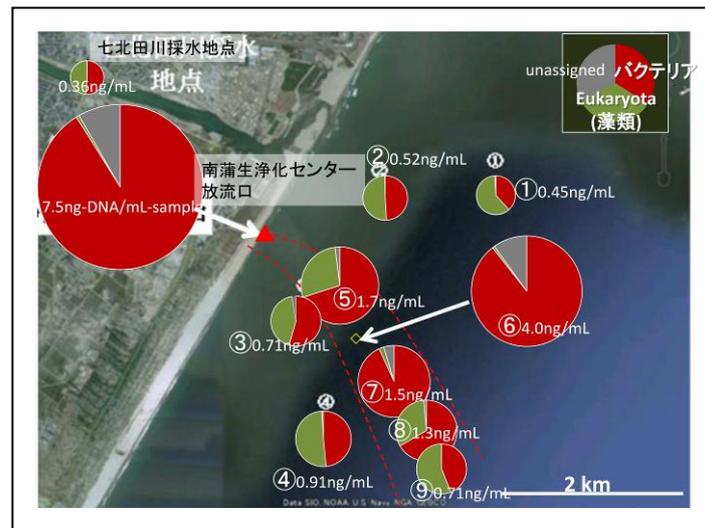
	消毒効果			生態毒性		備考
	大腸菌群	腸球菌	ウイルス	藻類	Microtox	
塩素消毒	○	○	×	×	×	脱塩素前
				○	○	脱塩素後
紫外線消毒	○	○	○	○	○	
オゾン消毒	×	×	○	△	△	塩分影響

### (3) 次世代シーケンサーを用いた細菌群集構造の解析

2013年8月の南蒲生浄化センター放流水および放流先海域でのクロタミトン濃度を図(1)-29に示す。放流水中のクロタミトン濃度は507 ng/Lであった。放流先で濃度が減少していることがわかる。海域⑥、⑦においては周囲の海域に比べてクロタミトン濃度が高く、放流水の水塊を採水によって捉えていると考えられる。各水域で回収されたDNA濃度と、細菌由来、藻類由来のDNAの割合を図(1)-30に示す。放流水中のDNA濃度は7.5ng/mLであった。またそのほとんどは細菌由来のDNAであった。クロタミトンと同じく、放流先海域でDNA濃度が減少していることがわかる。また、放流先では細菌由来のDNA量が減少し、藻類由来のDNAが増加していることもわかる。ただし、海域⑥、⑦においては周囲の海域に比べてDNA濃度が高く、さらに細菌由来DNAの割合も高かった。この結果は、クロタミトン濃度が海域⑥、⑦において濃度が高かった結果と一致する。放流水の水塊が海域⑥、⑦において捉えられていたことを示していると考えられる。



図(1)-29 南蒲生浄化センター放流先海域でのクロタミトン濃度および放流水に対するその割合  
2013年8月の調査結果。クロタミトン濃度(放流水濃度に対する割合)。

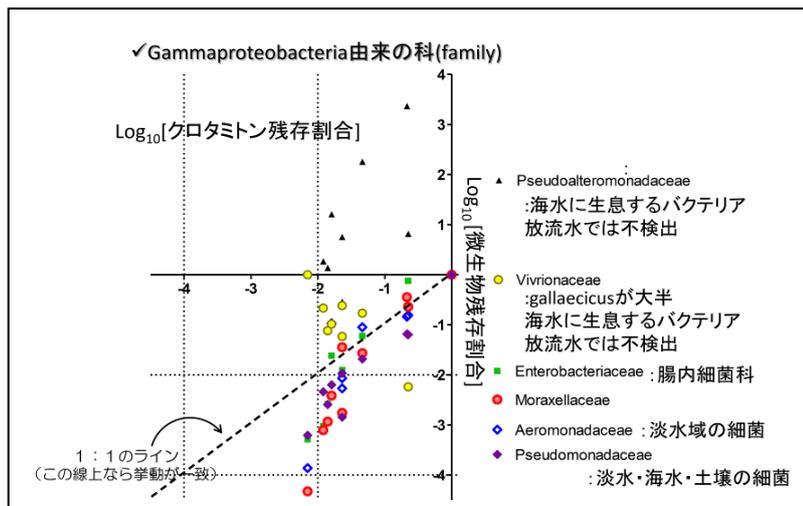


図(1)-30 南蒲生浄化センター放流先海域でのDNA濃度、細菌DNAと藻類DNAの割合  
2013年8月の調査結果。赤色：細菌由来DNA濃度の割合。緑色：藻類由来DNA濃度の割合。

16S rRNA配列に基づいて放流先海域における細菌をclass(綱)レベルで分類した。その結果、下水混入率が減少するに従って、*Clostridia*および*Bacteroidia*の割合が大きく減少していることが確認できた。*Clostridia*および*Bacteroidia*は共に腸内細菌の優占種として知られている。このことから、下水由来の細菌DNAが海域において、おそらく希釈効果によって減少していると考えられた。

16S rRNA配列に基づいて細菌をより詳細に分類しその海域での残存割合をクロタミトンの残存割合と比較した結果を図(1)-31に示す。海域での細菌DNAの残存割合は「海域での細菌DNA濃度の放流水における濃度に対する比」で表している。1:1の直線状にプロットが並ぶ場合、海域での細菌DNAの挙動がクロタミトンのそれと一致することを意味する。すなわち、海域において希釈によって減衰していることを示す。腸内細菌科(*Enterobacteriaceae*)、シュードモナス科(*Pseudomonadaceae*)、モラクセラ科(*Moraxellaceae*)、エロモナス科(*Aeromonadaceae*) (以上図(1)-31)、バクテロイデス科(*Bacteroidaceae*)、プレボテラ科(*Prevotellaceae*)、ユーバクテリア科(*Eubacteriaceae*)、クロストリディア科(*Clostridiaceae*)、ルミノコッカス科(*Ruminococcaceae*)、コマモナス科(*Comamonadaceae*)のDNAが海域において減衰していることがわかる。これらのDNAの減衰はクロタミトン濃度の減衰に比べて大きい(1:1の直線から下に振れている)ことから、希釈以外の効果も加わって海域において減衰していると推測される。例えば、「ゲノムDNAの海域における分解」や、「細菌菌体そのものあるいは濁質表面に付着した細菌菌体の沈降による除去」等が考えられる。

一方、シュードアルテロモナス科(*Pseudoalteromonadaceae*)やビブリオ科(*Vibrionaceae*)、ロドバクター科(*Rhodobacteraceae*)は海域での減衰が見られず、クロタミトン濃度の減衰とも相関がない。これらは海域に生息する細菌であり、クロタミトン濃度の減衰に代表される下水の希釈と相関が無いのは理にかなった結果である。



図(1)-31 Gammaproteobacteria由来のバクテリア科DNAの残存割合とクロタミトン残存割合の比較

また、藻類由来のDNAの減衰も、当然のことながらクロタミトン濃度の減衰との正の相関は見られないことも確認している。

以上の結果から、腸内細菌科、シュードモナス科、モラクセラ科、エロモナス科、バクテロイデス科、プレボテラ科、ユーバクテリア科、クロストリディア科、ルミノコッカス科、コマモナス科のDNAが海域において希釈および希釈以外の効果も加わって減衰していると推測された。つまり下水処理場放流水に含まれるバクテリアが、少なくともゲノムレベルでは、海域において希釈+αの効果によって減衰している様子を捉えることができた。

バクテリアDNAの海域での減衰傾向を、東大GによってqPCR(定量PCR)法で測定されたアイチウイルス、アデノウイルスのゲノムの減衰傾向と比較した。興味深いことに、次世代シーケンサーで得られた腸内細菌科やバクテロイデス科のDNAの海域での減衰傾向はqPCRで得られたウイルスの減衰傾向と一致していた。この結果は、少なくともゲノム量のレベルでは、これらの腸内細菌由来バクテリアの海域での挙動がウイルスの挙動と一致することを示している。ヒト病原ウイルスのゲノムの存在量の指標として、これらのバクテリアDNA量が利用できる可能性を示唆している。また、ウイルスゲノム量も、バクテリアDNA量と同様に、クロタミトンよりも海域での減衰が大きい(1:1の直線より下に振れている)。希釈以外の効果も加わって海域において減衰していると推測される。例えば、「ゲノムDNAの海域における分解」や、「濁質表面に付着したウイルス粒子の沈降による除去」等が考えられる。

2013年10月に南蒲生、県南、仙塩、石巻東部の各下水処理場の放流先海域で採水したサンプルについても同様に次世代シーケンサーによるバクテリア群集構造の解析を行ったが、いずれのサンプルも海域での希釈率が高く、群集構造の明確な変化を捉えることができなかった。放流水の水塊をうまく採水できなかったことが原因と考えられる。海域での下水由来微生物の減衰を把握するためには、より放流口に近い海域での採水が重要であることが分かった。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

東日本大震災の被災下水処理場で採取した試料を用いて、生物処理が不十分な下水について各種消毒技術の検討を実験的に行い、指標細菌と指標ウイルスについての消毒効果と生態毒性影響の両方の側面から評価を行った。

- (1) 塩素消毒については、初沈越流水や下水を直接塩素消毒する場合、塩素注入直後に消費される塩素消費量およびその後生成する残留塩素量Cと接触時間Tとの積であるCT値が指標微生物の不活化に与える影響を評価した。この結果以下の成果が得られた。塩素消費量は、下水の性状に影響を受け、簡易曝気や接触酸化処理を行った試料や生物処理が復旧した試料では、塩素消費量が減少することが確認できた。指標細菌の消毒効果についてはCT値の増加につれて不活化する傾向が見られた。99%の不活化に必要なCT値の解析結果からは、簡易曝気処理や接触酸化処理による消毒効果の改善は目立っては見られなかったが、接触酸化でわずかながら指標細菌の除去が見られるため、消毒に必要なCT値を削減する効果がある。また生物処理が復旧した下水処理場では指標細菌の消毒効果についてはCT値の減少が見られた。指標ウイルスについての塩素消毒効果は、99%の不活化に必要なCT値から判断すると、流入下水、簡易曝気処理水、接触酸化処理水、生物処理水の間にはほとんど差が見られず、クロラミン消毒の限界を示していると考えられた。このため、生物処理など消毒前でのウイルスの除去が重要と考えられる。
- (2) 塩素消毒についての生態毒性については塩素注入率の増加とともに藻類成長阻害や発光細菌への毒性が見られるが、亜硫酸ナトリムによる脱塩素操作によって毒性は低減できることが明らかとなった。また、塩素注入量を軽減するための簡易曝気処理や接触酸化処理などの前処理も結果的に毒性低減に効果をもつと期待できる。
- (3) 紫外線消毒については、初沈越流水や流入下水を直接紫外線消毒する場合、紫外線照射量(時間)に応じて、指標細菌、指標ウイルスとも同じ程度の不活化効果がみられる。99%の不活化に必要な紫外線照射量から判断すると、接触酸化処理を行った試料では不活化効果が改善する傾向がみられたが、簡易曝気処理を行った試料では紫外線の消毒効果の改善は見られなかった。また、生物処理が復旧した試料では不活化効果は大幅に改善した。
- (4) 紫外線消毒についての生態毒性については照射線量(時間)が増加しても藻類成長阻害や発光細菌への毒性の変化は見られなかった。
- (5) オゾン消毒については、初沈越流水や流入下水を直接オゾン消毒する場合、オゾン消費量に応じて、指標ウイルスは不活化がみられるが、指標細菌は不活化効果が小さかった。99%の不活化に必要なオゾン消費量から判断すると、接触酸化処理を行った下水では不活化効果は改善すること、生物処理が復旧した試料では、オゾン消毒の効果は大幅に改善したが、簡易曝気処理を行った試料ではオゾンの消毒効果の改善は見られない。
- (6) オゾン消毒についての生態毒性についてはオゾン消費量が増加するにつれて藻類成長阻害や発光細菌への毒性の低下が見られた。しかし、下水に比較的高い塩分が含まれる場合、特に発光細菌類に毒性の上昇がみられ、次亜塩素酸の生成が考えられた。
- (7) 環境水、下水、下水処理水に含まれる細菌のDNAを回収し、次世代シーケンサーを用いて同定する方法を開発した。この結果、16SrRNA配列を用いた群集構造解析の手法が

海域におけるバクテリアゲノムの減衰の推定に有効であることが示された。また、少なくともゲノム量のレベルでは、腸内細菌由来バクテリアの海域での挙動がウイルスの挙動と一致する結果が得られた。ヒト病原ウイルスのゲノムの存在量の指標として、これらのバクテリアDNA量が利用できる可能性を示唆している。

- (8) これらの成果は、消毒効果と生態影響のトレードオフを議論する貴重な研究成果となり、震災などの廃水処理設備の緊急対策に貢献することはもちろん、日常的に類似の事態が発生している可能性がある合流式下水道の越流水対策や生物処理レベルが十分でない畜産排水対策などでの今後の消毒技術を考える上で科学的な意義を持つ成果となる。また、次世代シーケンサーによる下水、下水処理水、環境水でのバクテリア群集解析手法は、環境での病原微生物の拡散、消長を把握する有効な手法である可能性があり、化学マーカーや他の微生物同定定量手法と組み合わせることで、水域での病原微生物や指標微生物の動態把握に有効なツールとなると期待される。

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

本研究の成果は、環境省で現在、水質環境基準の生活環境基準項目の変更を検討している大腸菌の指標検討を行うための平成24年度生活環境項目新規基準等検討会の衛生指標WGおよび平成25年度大腸菌数環境基準検討会において、これまでの大腸菌群や腸球菌、ファージ、ウイルスなどの水域の存在実態や動態、下水処理過程や消毒過程での動態の相違を示し、リクレーション利用、水産用水、水道原水の視点からの水質環境基準の検討の基礎的知見を一部提供している。

また、下水道行政を所管する国土交通省とは、国土交通省からの日本水環境学会受託事業、さらに続いて実施した本研究課題についての情報交換を行ってきた。この成果の一部は、すでに下水道施設の災害時の緊急対応をまとめた「災害時における下水の排除・処理に関する考え(案)」の中で平成24年9月に国土交通省国土技術政策総合研究所から公開されている。また下水道の放流水質の今後の在り方を検討している「下水道における水系水質リスク検討会」においても平成24年度に下水放流水質のうち、大腸菌群が大腸菌に変更となることが予想されるため、排水基準での衛生指標の基準値設定に関して、本研究課題の知見の一部を提供した。

さらに調査対象の下水処理場の実施主体の公共団体である宮城県および仙台市とは、「東日本大震災による下水処理施設の被害からの復旧・復興に向けた取り組み(2013年3月27日, 仙台市)」および「震災からの復旧に取り組む下水道と放流先の水質状況(2014年3月20日, 仙台市)」を共同開催し、本研究成果をOutreachすることで、現場の下水処理場の管理者の緊急対応や水質管理に活用されたと考えている。

### <行政が活用することが見込まれる成果>

現在、東日本大震災で被害を受けた水産産業の復旧が急速に進んだ。しかし、懸念される事項として、下水処理場の機能が不十分な下水処理場もあり、処理水には有機物、浮遊物質とアンモニアが高濃度で残留する中でのウイルスへの塩素消毒があり、クロラミン消毒では、指標細菌にはある程度消毒効果が期待できるが、ウイルスへの不活化効果が極めて低い。このため、放流先でのリクレーションや水道、さらに水産養殖などの水利用に与える衛生学的安全性への検討が必要である。また同時に、クロラミンの水環境での残留性が高いために、ノリ養殖等の水生生物影

響も懸念されるが、海域での希釈容量を考えるとその影響は広範囲には及んでいないことが示唆された。このため、被害の発生が予見される水環境の監視、また被害発生に備えた代替消毒方法の検討について、本研究は活用できる有用な知見を提供することができる。

今後、発生が懸念されている南海トラフ巨大地震や首都直下地震などの大規模な地震の発生が懸念され、被災する廃水処理設備の緊急対策に貢献することが行政的に期待できる。このため、環境省水環境課はもちろん、国土交通省下水道部などの水質と廃水管理に関わる部局への知見の提供と意見お交換が是非とも期待される。

また日常的に震災時の下水機能の喪失と類似の事態が発生している恐れがあるのは、合流式下水道の越流水対策や生物処理レベルが十分でない畜産排水対策などである。今後のこれらの衛生的水質管理に対しても行政的な意義を持つと考えている。

本研究では、環境省で検討されている大腸菌と、大腸菌群や腸球菌、ファージ、ウイルスなどを比べ、検討されている新しい衛生指標での水域の存在実態や動態、下水処理過程や消毒過程での動態の相違を示し、環境基準での衛生指標の選定、基準値設定に必要な知見を提供できる。また、環境基準の改定後に、排水規制の見直しが想定されるが、その際の規制を達成するのに必要な技術的検討に本研究は役立てられる。さらに、公共用水域の測定結果と環境基準の判定が行われる際に、達成が見込めない場合、水質管理計画の立案が必要となると想定される。そのために必要な、水環境での衛生指標や病原微生物の動態の理解に本研究は知見を与える。その際、環境での微生物動態は発生源からの排出実態の把握と合わせて重要になる。次世代シーケンサーによる下水、下水処理水、環境水でのバクテリア群集解析手法は、環境での病原微生物の拡散、消長を把握する有効な手法である可能性があり、化学マーカーや他の微生物同定定量手法と組み合わせることで、水域での病原微生物や指標微生物の動態把握に有効なツールとなると期待される。

さらに、今後の導入の検討がなされている全排水毒性試験(WET)と、衛生指標の排水基準の達成のために生じるトレードオフが懸念される消毒について、消毒効果が認められかつ、水生生物影響を軽減する消毒方法の選択に対しても、本研究は知見を提供できる。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない。

#### <その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 田中宏明、片山浩之、山下尚之：環境技術、8号(2012)「東日本大震災後の下水中病原微生物管理に向けた取り組み」【招待原稿】
- 2) 田中宏明：タクマ技報、22, 1(2014)「幅のある下水処理システム」(印刷中)【招待原稿】

### (2) 口頭発表(学会等)

- 1) 朴仁久、朴耿洙、山下尚之、田中宏明：第49回下水道研究発表会（2012）「下水簡易処理水の消毒による水生生物への影響評価」
- 2) Kyoungsoo Park, Inkoo Park, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka：34th The Association of Environmental & Sanitary Engineering Research symposium, Kyoto, Japan, 2012 “Assessments on disinfection processes for sewage effluent during disaster restoration”
- 3) 朴耿洙、朴仁久、山下尚之、田中宏明：第15回水環境学会シンポジウム（2012）「震災復旧中の下水処理場での消毒方法の評価」
- 4) 朴仁久、朴耿洙、山下尚之、田中宏明：第15回水環境学会シンポジウム（2012）「下水簡易処理水の消毒と水生生物への影響」
- 5) Kyoungsoo Park, Inkoo Park, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka：4th IWA Young Water Professional Conference 2012, Tokyo, Japan, 2012, “Evaluation on suitable disinfection processes for sewage effluent during disaster restoration”
- 6) Masaru Ihara, Tomonari Matsuda, Suntae Lee, Hiroaki Tnaka：4th IWA Young Water Professional Conference 2012, Tokyo, Japan, 2012, “Basic consideration of detection of pathogens using next generation sequencer”
- 7) 朴耿洙、朴仁久、山下尚之、田中宏明：第47回水環境学会年会（2013）「震災復旧時の下水処理場の簡易ばっき処理による消毒効果改善の評価」
- 8) 田中宏明：土木学会環境工学委員会・下水道関連震災調査小委員会シンポジウム（2013）「緊急事態と水質保全—震災時の下水処理場緊急対応の検討」
- 9) 田中宏明：日本水環境学会水中健康微生物研究員会「東日本大震災による下水処理施設の被害からの復旧・復興に向けた取り組み」（2013）「被災時の暫定的下水処理における代替消毒技術の検討」
- 10) Kyoungsoo Park, Inkoo Park, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka: 22th KKN symposium, Seoul, Korea, 2013, “Health related microbial risk for emergency sewage treatment after Great East Japan Earthquake”
- 11) 朴耿洙、朴仁久、山下尚之、田中宏明：第22回年次オゾン協会（2013）「震災復旧中の下水処理場でのオゾン消毒工程の評価」
- 12) Kyoungsoo Park, Inkoo Park, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka: 17th IWA International Health Related Water Microbiology, Florianopolis, Brazil (2013) “Evaluation of disinfection processes for emergency sewage treatment after Great East Japan Earthquake”
- 13) Masaru Ihara, Suntae Lee, Yohei Katakawa, Naoyuki Yamashita, Tomonari Matsuda, Hiroaki Tanaka: 第3回NGS現場の会（2013）「下水中の微生物のメタゲノム解析および薬剤耐性遺伝子の検出」
- 14) Ihara M, Lee S, Katakawa Y, Yamashita N, Matsuda T, Tanaka H: Analysis of microbial community in wastewater treatment plant by next generation sequencing: 17th IWA International Health Related Water Microbiology, Florianopolis, Brazil (2013) “Analysis of microbial community in wastewater treatment plant by next generation sequencing”
- 15) 井原賢、李善太、堅川陽平、花本征也、佐久間亮輔、松田知成、山下尚之、田中宏明：CREST 横断ミーティング「病原微生物と持続可能な水利用」（2013）「次世代シーケンサーによる微生物

#### 群集構造解析」

16) 井原賢、堅川陽平、李善太、松田知成、山下尚之、田中宏明：第16回日本水環境学会シンポジウム（2013）「次世代シーケンサーを用いた、下水処理場における薬剤耐性遺伝子の網羅的検出」

17) 朴耿洙、朴仁久、山下尚之、田中宏明：第16回日本水環境学会シンポジウム（2013）「被害下水処理場での健康関連微生物の塩素消毒による不活化率の推定と代替方法による効果の評価」

18) H. Tanaka (2014) Tsinghua University The Fourth Environment Safety High-end Forum Pre-announcement Renovation and Challenges for Wastewater Reclamation Treatment Technologies—Inspiration from the hundred years development of activated sludge—: Evaluation on suitability to manage pathogen pollution in water environment and disinfection processes of indicator microorganisms

19) 山下尚之、田中宏明、井原賢、朴耿洙、朴仁久：震災からの復旧に取り組む下水道と放流先の水質状況（2014）「被災時の暫定的下水処理における各種消毒技術の消毒効果と水生生物影響」

### （3）出願特許

特に記載すべき事項はない。

### （4）シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

1) 片山浩之、田中宏明：日本水環境学会 第21回市民セミナー 大震災後の水環境 — 何が起こったのか、どう備えるか（2012）

2) 田中宏明：水中の健康関連微生物研究発表会ならびに微生物指標に関する討論会、第15回日本水環境学会シンポジウム（2012）

3) 田中宏明、大村達夫：東日本大震災による下水処理施設の被害からの復旧・復興に向けた取り組み（2013）、宮城県自治会館、仙台

4) 田中宏明、大村達夫：震災からの復旧に取り組む下水道と放流先の水質状況（2014）、宮城県庁、仙台

### （5）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

### （6）その他

特に記載すべき事項はない。

## 8. 引用文献

1) Ronald Gehr et al : Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. Water Res. 37, 4573-4586, 2003.

2) John & Blanken : Comparative Disinfection of Treated Sewage with Chlorine and Ozone. Water Res. 19, 1129-1140, 1985.

## (2) 水中のウイルスモニタリングとその不活化効果の評価

### <研究分担者>

東京大学大学院工学研究科都市工学専攻

片山浩之

東京大学大学院工学研究科都市工学専攻

小熊久美子

### <研究協力者>

東京大学大学院新領域創成科学研究科

佐藤弘泰

東京大学大学院工学研究科都市工学専攻

稲葉愛美

東京大学大学院工学研究科都市工学専攻

中川博之

東京大学大学院工学研究科都市工学専攻

唐澤祥嗣

東京大学大学院工学研究科都市工学専攻

端昭彦

東京大学大学院工学研究科都市工学専攻

柴田智世

東京都健康安全研究センター

猪俣明子

東京都健康安全研究センター

保坂三継

東京都健康安全研究センター

田部井由紀子

東京都健康安全研究センター

生嶋清美

平成24～25年度累計予算額：33,605千円

(うち、平成25年度予算額：16,722千円)

予算額は、間接経費を含む。

### [要旨]

東日本大震災による津波被害により処理機能を損失した浄化センターの段階復旧期における放流先周辺水域を対象に、衛生微生物および病原ウイルスの調査を行い、時空間的に挙動の解析を行った。さらに、さまざまな水域における適正な衛生指標の選定、検出方法の検討を行うことを目的に、都内の下水処理場放流水、下水放流水の影響を受けた河川水、河川水浴場、海水浴場における細菌指標および指標候補の検出を行った。浄化センター周辺水域において、細菌指標である大腸菌群および、大腸菌、腸球菌は季節変動が確認されたが、流下方向、放流口からの距離に対して変動はなく、一定の濃度で存在していることが確認された。一方で、ファージ、ウイルスは季節変動に共通した傾向は見られなかったが、流下方向、距離に対して減少する傾向が確認された。ファージの流下方向、距離に対する減少幅は、ウイルスよりも大きく、培養法と遺伝子検出法による違いと考えられた。ファージは海域において希釈と不活化による影響を受けていることが示唆された。また、検出頻度および減少速度から、体表面吸着ファージがウイルスの感染性に対する指標として有効である可能性が示唆された。また、海域における指標の選定において、大腸菌以外の細菌指標の候補として糞便性連鎖球菌が有効である可能性が示された。さらに、河川水に使用されている現行の水質基準であるデソ法を用いた大腸菌群の測定方法に対して、コリラート法およびクロモアガー法により検出された大腸菌群数が高濃度であったことから、デソ法では検出されない大腸菌群が存在する可能性があり、デソ法では糞便汚染レベルが過小評価されている可能性が示唆された。また、下水による汚染の少ない水域と比較した結果、検出法により結果に差が生じる原因として下水が影響している可能性が示唆された。

## [キーワード]

病原性ウイルス、下水放流水、細菌指標、検出法

### 1. はじめに

東日本大震災に伴う津波被害により沿岸に位置する浄化センターが甚大な被害を受けた。処理機能を損失した浄化センターは、段階的復旧により機能回復を図った。稼働停止から復旧過程において、浄化センターからは処理が不十分な下水が周辺環境に排出され、排水先の衛生環境の悪化、および水産養殖業に与える影響が懸念された。そこで、宮城県下で被災した4浄化センターおよび放流先周辺水域を対象に、復旧過程から復旧に至るまでの期間の衛生微生物および特に腸管系ウイルスを対象とした病原微生物の濃度変化を調査した。

現行で使用されている大腸菌群は簡便な方法で検査できることから重用されてきた。しかし、環境中での増殖の可能性があることなどから、糞便汚染の正確な評価の面で指標として不十分であるとの指摘がある。さらに、原虫やウイルスの存在・挙動に対する適切な指標の選定が課題になっている。そこで、現在、水質基準項目の見直しが検討されている。本課題において、放流先周辺水域における衛生微生物および病原微生物の存在状況に与える季節変動、流下方向、希釈などの時空間的要因について指標微生物と病原ウイルスの挙動の比較を行い、糞便汚染指標として提案されている水質指標（細菌、ファージ）を測定し、病原ウイルスを含むヒトウイルスに対する指標性を評価した。

また、さまざまな水域において、それぞれの環境および利用目的に合わせた水質基準値の制定、基準項目にふさわしい検査方法の提案が必要とされている。そこで、下水放流水、下水の影響を受けた河川水、河川水浴場、海水浴場の試料における腸菌群、糞便性大腸菌群、大腸菌、糞便性連鎖球菌、腸球菌の検出を行い、現行の基準項目の菌数と、その他の糞便汚染指標細菌数との挙動を調べた。

### 2. 研究開発目的

#### (1) 下水処理水放流先水域における指標細菌と病原ウイルスの挙動の比較

東日本大震災に伴う津波被害により処理機能が停止した浄化センターから処理が不十分な下水が周辺水域に放流されていた。それにより、周辺環境や水産・養殖環境の衛生状況の悪化が懸念された。暫定処理および復旧に伴う周辺水域における衛生微生物の存在を調査し、ヒト腸管系ウイルスなどの病原微生物と指標微生物の汚染実態を把握することを目的とする。また、放流先水域における衛生微生物の挙動を把握することを目的とし、時系列、距離、季節変動の時空間的影響を解析する。さらに、現在衛生学的水質基準の見直しが進められていることを鑑み、現行の水質指標である大腸菌群をはじめ糞便汚染指標として提案されている水質指標（細菌、ファージ）を測定し、病原ウイルスを含むヒトウイルスに対する指標性を評価することを目的とする。

#### (2) 被災処理場の段階的復旧に伴う処理効率および処理水質の改善状況

東日本大震災に伴う津波被害により処理機能を損失した宮城県内の4浄化センターにおいて、段階的応急復旧に伴う水質改善状況を評価する事を目的とし、衛生微生物である指標細菌(大腸菌群、

大腸菌)、ヒト腸管系ウイルスの検出・定量を行った。また、糞便汚染指標および腸管系ウイルスに対する指標として提案されているファージ・ウイルスの検出・定量を同時に行い、下水処理場の処理過程におけるウイルスを含めた病原微生物の挙動を比較し、指標性について評価することを目的とする。

### (3) 水質基準項目に対する新規細菌指標および検査方法の検討

現行の水質基準項目は、水利用目的に合わせた類型において大腸菌群数が定められているが、人為汚染がないと考えられる水域においても環境基準を満たさないことがあることなどから、大腸菌群数は糞便汚染指標としての有効性に限界があると考えられる。また、原虫やウイルスと挙動が一致しないなど指標として不十分であることが示唆されている。さまざまな水域において衛生微生物の挙動を把握し、それぞれの環境に適した衛生指標を選定し、また、環境基準値の設定に有用な知見を蓄積する必要がある。現在、新基準の選定が進んでいる状況に鑑み、基準項目にふさわしい指標細菌および検査法の検討を行う。下水放流水、および下水の放流水の影響を受けている東京の河川、河川水浴場、海水浴場において、大腸菌群、糞便性大腸菌群、大腸菌、糞便性連鎖球菌、腸球菌の検出を行い、現行の基準項目の菌数と、その他の糞便汚染指標細菌数との挙動を調べ、細菌指標の有効性を評価することを目的とする。

## 3. 研究開発方法

### (1) 下水処理水放流先水域における指標細菌と病原ウイルスの挙動の比較

2012年9月から被災した宮城県内の4浄化センター(石巻東部浄化センター、南蒲生浄化センター、県南浄化センター、仙塩浄化センター)の処理後放流水の放流先水域および周辺水域において、それぞれ5-6地点で試料採取を行った。また、南蒲生浄化センター周辺水域では、放流口から流軸に沿った試料も採取した。試料採取は東北大学グループ(サブテーマ(3))に依頼し、必要量の試料の送付を受けた。試料採取時期、および採取地点はサブテーマ(3)の表(3)-1および図(3)-2から図(3)-8に示す。採取試料は、指標細菌である大腸菌群・大腸菌、ウイルス指標候補であるF特異ファージ(F-phage)・体表面吸着ファージ(Somatic)、および代表的なヒト腸管系ウイルスであるアイチウイルス(AiV)、エンテロウイルス(EntV)、GI、GII ノロウイルス(GI、GII NoV)、アデノウイルス(AdV)を対象に検出定量を行った。

#### 1) 大腸菌群および大腸菌の測定

シリンジに添加した採取試料1~50 mlを滅菌フィルター(Analysis Monitor, EDM Millipore)でろ過し、フィルター上に細菌を補足後、m-ColiBlue24® Broth (EDM Millipore)を添加・ろ過した。37℃、24時間培養後、紺青色から紫色のコロニー数を大腸菌、赤色と紺青色から紫色のコロニー数の合計を大腸菌群として計数した。

#### 2) 体表面吸着ファージ(Somatic)およびF特異ファージ(F-phage)の測定

Somaticの測定には、modified Scholten's培地で培養した*Escherichia coli* WG5を、F-phageはtryptone-yeast extract-glucose培地で培養した*Saimonella trphimurium* WG49を宿主として用いた。試料中の測定対象ファージが低濃度である事が予想されたため、Grabow and

Coubrough(1986)<sup>1)</sup>の方法にならい、100 ml試料からの測定を行った。また、培地は標準法<sup>2)、3)</sup>の組成に対し2倍量で調整したものをを用いた。滅菌容器に添加した採取試料100 mlを37 °Cで加温後、宿主を添加した等量の培地を添加・混和した。Somaticは、Scholten' s modified semi-solid agarを下層として用意したシャーレに重層培地法で、F-phageは単層培地法でシャーレに均等に分注し、37 °C、24時間培養した。

### 3) 小容量試料(≤2000 ml)からのウイルス一次濃縮法

小容量の採取試料からのウイルス濃縮は、片山ら(2002)<sup>4)</sup>の方法に従って行った。2012年9月～2013年2月に採取した試料は1000 ml(2012年11月仙塩浄化センター・仙流橋は500 ml)を、2013年6月～12月に採取した試料は2000 ml(2013年6月仙塩浄化センター・仙流橋、貞山橋は1500 ml、南蒲生浄化センター・流軸方向①は600 ml、2013年10月県南浄化センター・地点③は1500 ml)をウイルス濃縮に供した。前処理として塩濃度が1.2 %以下の試料に対し、2.5 M MgCl<sub>2</sub>を添加した(終濃度 25 mM)。直径90 mm、孔径0.45 μmのHA膜(EDM Millipore)で試料をろ過しウイルスを吸着させた。200 mlの0.5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 3.0)で膜を洗浄後、10 mlの1 mM NaOH(pH10.5～10.8)で膜に吸着したウイルスを誘出し、50 μlの100 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(pH 3.0)および100 μlの100x Tris-EDTA buffer(pH 8.0)を添加した滅菌容器に回収・中和した。

### 4) 小容量試料ウイルス一次濃縮液からのウイルス二次濃縮法

ウイルス一次濃縮液は、Centriprep YM-50 (EDM Millipore)に添加し2500 rpm、10分で遠心分離後、上清を除去し、再度2500 rpm、5分で遠心分離を行った。1試料あたり約650 μl得られたウイルス二次濃縮液は、核酸抽出を行うまで-80 °Cで保存した。

### 5) 大容量試料(≤10 L)からのウイルス一次濃縮法

大容量試料からのウイルス濃縮は、端ら(2011)<sup>5)</sup>の方法に従って行った。カートリッジ型陰電荷膜のOpticap XLカプセルフィルター(EDM Millipore)をアスピレーターに接続し、放流先水域試料を現場ろ過した。試料の塩濃度が1.2 %以下であった場合は、点滴用輸液チューブを用い4M MgCl<sub>2</sub>を滴下した。必要量の試料をろ過、もしくは目詰まりにより流量が著しく低下した場合、ろ過を停止し、室内でのウイルス誘出作業までの輸送の間、氷上で保存した。100 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(pH 3.0)2000 mlで膜表面を洗浄後、MilliQ水で再度膜表面を洗浄し、200 mlの1 mM NaOH(pH10.5～10.8)で膜に吸着したウイルスを誘出した。誘出したウイルス濃縮液を100 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、500 μlを添加した滅菌容器に回収・中和した。

### 6) 大容量試料ウイルス一次濃縮液からのウイルス二次濃縮法

大容量試料ウイルス一次濃縮液に対する二次濃縮にはCentricon plus-70(EDM Millipore)を用い、60 mlの一次濃縮試料から約250 μlのウイルス二次濃縮液が得られた。得られた二次濃縮液は、核酸抽出を行うまで-80 °Cで保存した。

### 7) ウイルス二次濃縮液からのRNA抽出と逆転写反応

ウイルス二次濃縮液からのRNAには、QIAamp Viral RNA minikit (QIAGEN)を用い、ウイルス二

次濃縮試料140  $\mu$  lから60  $\mu$  lのRNA抽出物を得た。得られたRNA抽出物は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies)を用いて逆転写反応を行った。反応液に10  $\mu$  lのRNA抽出物を添加し、25  $^{\circ}$ C・10分、37  $^{\circ}$ C・120分、85  $^{\circ}$ C・5分の反応条件でcDNAを合成した。合成したcDNAは定量PCRによるウイルスの定量に供した。

## 8) 定量PCRによるウイルスゲノムの定量

cDNAおよびDNAはABI PRISM 7500 sequence detection system (Life Technologies)を用いた定量PCRにより、AiV、EntV、GI、GII NoVを既報<sup>4)</sup>、<sup>6)</sup>、<sup>7)</sup>に従い定量した。

### (2) 被災処理場の段階的復旧に伴う処理効率および処理水質の改善状況

2012年9月から被災した宮城県内の4浄化センター(石巻東部浄化センター、南蒲生浄化センター、県南浄化センター、仙塩浄化センター)内の各処理段階で採取した試料について、指標細菌である大腸菌群・大腸菌、ウイルス指標候補であるF特異ファージ・体表面吸着ファージ、および代表的なヒト腸管系ウイルスであるAiV、EntV、GI、GII NoV、AdVを対象に検出定量を行った。試料の採取は、東北大学に依頼した。調査時期、および試料採取地点の情報は、サブグループ(3)の表(3)-1、図(3)-1~8に示す。また、測定結果の復旧過程における水質処理効率の改善、指標性の評価は東北大学グループにより解析された。

#### 1) 大腸菌群および大腸菌の測定

大腸菌群と大腸菌の測定は、クロモカルトコリフォーム寒天(MERCK)を用いた単層寒天培地法で、37  $^{\circ}$ C、24時間培養し、紺青色から紫色のコロニー数を大腸菌、赤色と紺青色から紫色のコロニー数の合計を大腸菌群として計数した。

#### 2) SomaticおよびF-phageの測定

SomaticおよびF-phageの測定は、3-(1)-2)で示した宿主を用い行った。また、培地は標準法<sup>2)</sup>、<sup>3)</sup>の組成に従い、Somaticは、Scholten's modified semi-solid agarを下層とした重層培地法で、F-phageは単層培地法で37  $^{\circ}$ C、24時間培養した。

#### 3) ウイルス一次濃縮法

浄化センター採取試料のウイルス濃縮は、3-(1)-3)と同様に行った。採取試料100 mlをウイルス濃縮に供した(2013年10月石巻東部浄化センター・流入下水、初沈後水は50 ml)。

#### 4) ウイルス二次濃縮法~定量PCR

得られたウイルス一次濃縮液に対する以降の処理は、3-(1)-4)、7)、8)と同様に行った。

#### 5) データ解析

4浄化センター、および放流先周辺水域において採取した試料から得られた、細菌、ファージ、ウイルスの測定結果は、他の2グループと共有した。「(2) 被災処理場の段階的復旧に伴う処理効率および処理水質の改善状況」については、サブグループ(3)が行う解析に用いた。

放流先周辺水域において微生物の濃度、不活化に影響すると考えられる、処理法、距離、流下方向、季節変動などを考慮し時空間的解析を行った。

### (3) 水質基準項目に対する新規細菌指標および検査方法の検討

都内下水処理場放流水、河川水、河川水浴場、海水浴場を対象に水試料の採取を行った。

下水処理場放流水は多摩川中流に位置する流域下水処理場において、塩素処理後の放流水を2012年8月から2013年3月までの期間に1ヶ月に1回、合計8回、東京都下水道局が採取した試料について分与を受けた。また、河川水は上記下水処理場放流水が排出されている水路が多摩川に合流する地点で、2012年8月から2013年12月までの期間に1ヶ月に1回、合計17回試料採取を行った。更に、河川水浴場試料は、都内水浴場の4地点(秋川の落合橋右岸、沢戸橋右岸、多摩川の氷川キャンプ場右岸、川井キャンプ場右岸)において2013年6、7、8月に1ヶ月に1回、合計3回採取した。海水浴場試料は、島しょ地域において2013年5月に37地点から採取した。採取した試料は、コロニー計数法、またはMPN法を用いて糞便汚染指標細菌である大腸菌群、大腸菌、糞便性大腸菌群、腸球菌、糞便性連鎖球菌を対象に測定した。

「下水の水質の検定方法に関する省令」に示されたデオキシコレート寒天培地法(デソ法)により、放流水、河川水、河川水浴場試料中の大腸菌群を測定した<sup>8)</sup>。試料を原液～100倍に希釈後、それぞれ1 mLをデオキシコレート寒天培地約15 mLでシャーレ上で混和・凝固させた。さらにその上に同培地を重層し36±1℃で18～20時間培養後、直径0.5mm以上の赤～深紅色の定型的コロニーを計数した。

また、全試料中の大腸菌群および大腸菌、糞便性大腸菌群、糞便性連鎖球菌、腸球菌は、下記の方法に従って行った。大腸菌群および大腸菌は、ONPG-MUG法(コリラート法)およびクロモアガー法で測定した。コリラート法はコリラート18QTトレイ(IDEXX社製)を用い、10～1000倍に希釈した試料100 mLを滅菌容器に培地と共に加えて混和後、QTトレイに注ぎ密封した。36±1℃で24時間培養後、大腸菌群は比色標準液よりも濃く黄変したウェルを計数、大腸菌は波長366nmの紫外線照射下で、比色標準液よりも強い蛍光を発するウェルを計数し、MPN表により100mL中の数を算出した。

クロモアガー法は、クロモアガーECC(クロモアガー社)を使用し、試料を10倍～1000倍に希釈後、それぞれ100 mLを濾過した疎水性格子付メンブランフィルター(HGMF)を、シャーレ上のクロモアガー寒天培地に貼り付け、36±1℃で24時間培養した。青色(大腸菌)及び赤色(大腸菌以外の大腸菌群)の集落を計数し、MPN表により100mL中の大腸菌群・大腸菌数を算出した。

また、糞便性大腸菌群は、「水浴場水質判定基準」に示されたm-FC法に従った<sup>9)</sup>。試料を原液～100倍に希釈し、それぞれ100 mLを濾過したHGMFをシャーレ上のm-FC寒天培地に貼り付けた。ビニール袋で密封したシャーレを44.5±0.2℃の恒温水槽中で24±1時間培養後、青色で光沢を持つ集落を計数し、MPN表により100mL中の糞便性大腸菌群数を算出した。

糞便性連鎖球菌は、下水試験方法の平板培養法(M-エンテロコッカス寒天培地)に従った<sup>10)</sup>。試料を原液～100倍希釈後、それぞれ100mLを濾過したHGMFをシャーレ上のM-エンテロコッカス寒天培地に貼り付けた。36±1℃で48時間培養後に集落数を計数し、MPN表により100mL中の菌数を算出した。

腸球菌は、エンテロラートQTトレイ(IDEXX社製)を用いた。試料を原液～100倍希釈し、それぞれ100 mLを滅菌容器内で培地と混和後、QTトレイに注ぎ密封し、41±0.5℃で24時間培養した。

波長366nmの紫外線を照射し、比色標準液よりも強い蛍光を発するウェルを計数し、MPN表により100mL中の腸球菌数を算出した。

#### 4. 結果及び考察

各水域の全ての調査地点において測定対象のウイルスであるEntV、GI、GII NoVの検出頻度は非常に低く、ほとんどの試料で定量下限値(1000 ml濃縮時、 $< 111.4$  copies/L、2000 ml濃縮時、 $< 130$  copies/L)を下回るか、検出限界以下であったため、解析には使用しなかった。

また、各測定項目が陰性結果であった場合、それぞれの検出・定量下限値の1/10の数値を仮の値として当てはめ解析を行った。

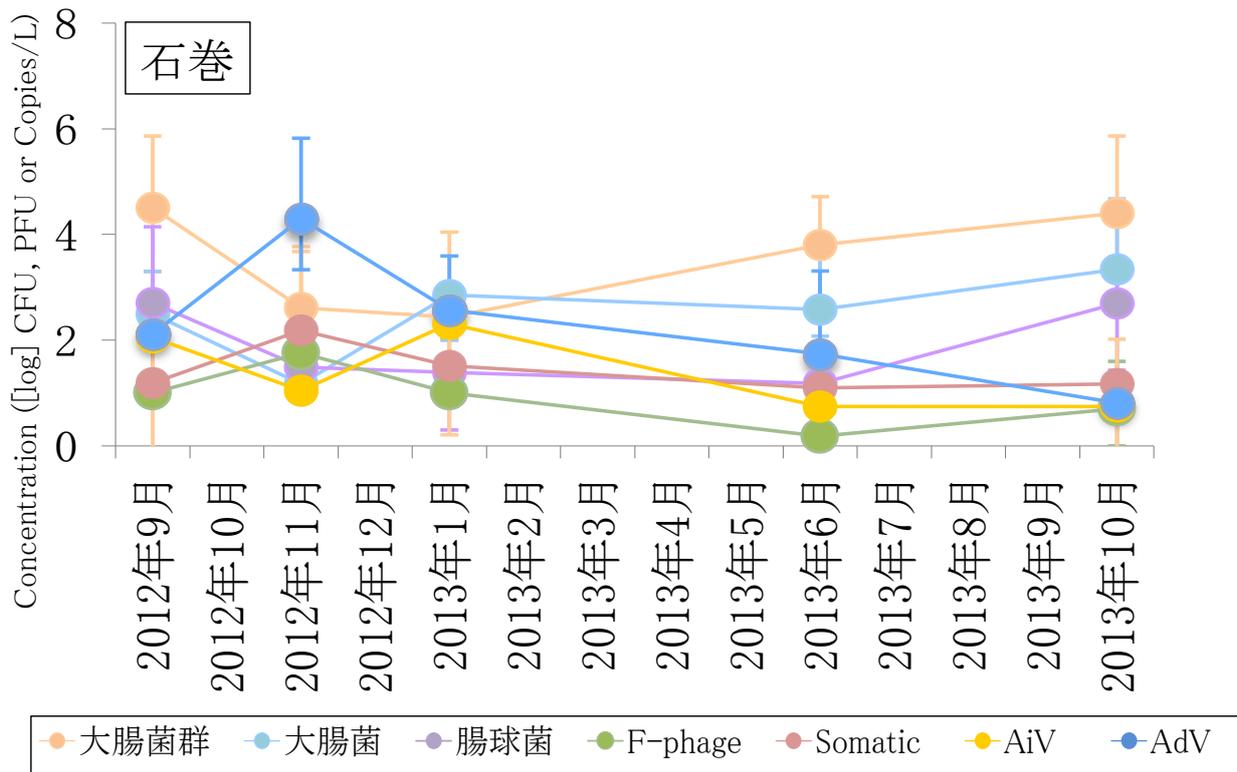
##### (1) 下水処理水放流先水域における指標細菌と病原ウイルスの挙動の比較

各浄化センターの放流先周辺水域において採取された試料の大腸菌群、大腸菌、Somatic、F-phage、および小容量ウイルス濃縮によるAiV、AdVの結果を時系列でまとめた結果を図(2)-1(石巻)、(2)-2(南蒲生)、(2)-3(県南)、(2)-4(仙塩)に示す。それぞれのシンボルは同時期に採取した各採取地点で検出・定量された測定結果の対数幾何平均値を、エラーバーは対数最大値と対数最小値を示す。

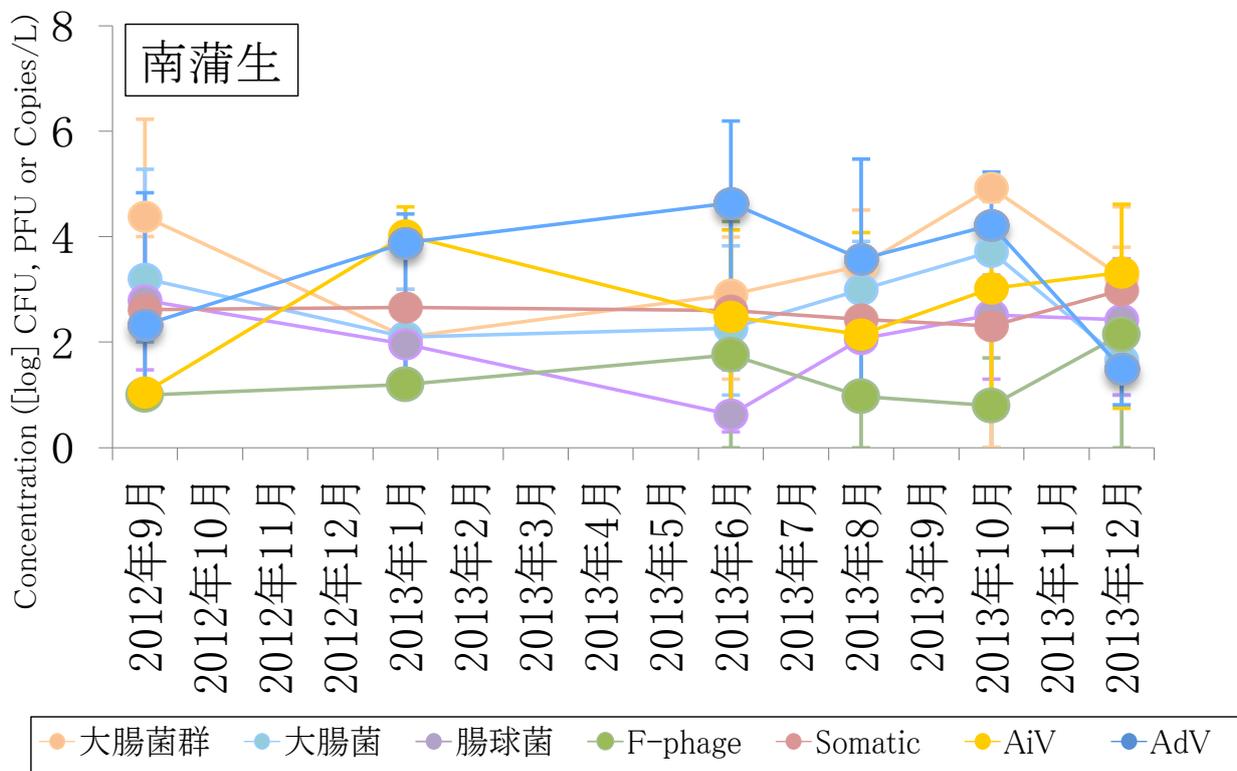
全ての水域において、大腸菌群、大腸菌が2012年9月から2013年1月にかけて減少していき、2013年6月の試料では増加に転じ、以降更に増加する傾向をした(県南・大腸菌、および石巻・2013年1月大腸菌を除く)。2012年9月～2013年2月の仙塩、および2013年6月～12月の南蒲生における調査期間の短い水域の結果において、この季節変動は顕著に確認できる。この傾向は、調査水域の水温や、施設の復旧に伴う処理方式の変更や塩素注入率に依存するものと考えられる。腸球菌の濃度は大腸菌群や大腸菌に比べ低く、変動の幅は小さいものの同様の傾向が確認された。F-phageは全ての水域において検出頻度が低く、多くの試料で検出下限値を下回っていたため、季節変動を捉える事は出来なかった。一方、SomaticはF-phageに比べ検出頻度は高く、多くの試料から検出された。しかし、それぞれの水域における共通した傾向は確認されなかった。ウイルスでは、AiVが全ての水域で他の調査時期に比べ2013年1月に高濃度に検出される傾向が確認され、冬期に濃度が高い可能性がみられた。ウイルス同士の比較では、AdVの検出頻度がAiVよりも高かった。しかし、AiV、AdV共にそれぞれの水域において濃度変動に共通した傾向は確認されなかった。

試料を採取時の各浄化センターの復旧状況段階で分類し、処理復旧に伴う放流先周辺水域の微生物濃度を比較した。各浄化センターの復旧状況の詳細は、サブグループ(3)に記載されている。南蒲生浄化センターは、現在も復旧過程にあり調査期間を通じて処理法に変化がないため解析していない。石巻、県南、仙塩の各放流先周辺水域における復旧前後における変化をまとめた結果を、それぞれ図(2)-5、図(2)-6、図(2)-7に示す。横軸に示した各採取地点は処理水放流口からの距離に並べて示した。

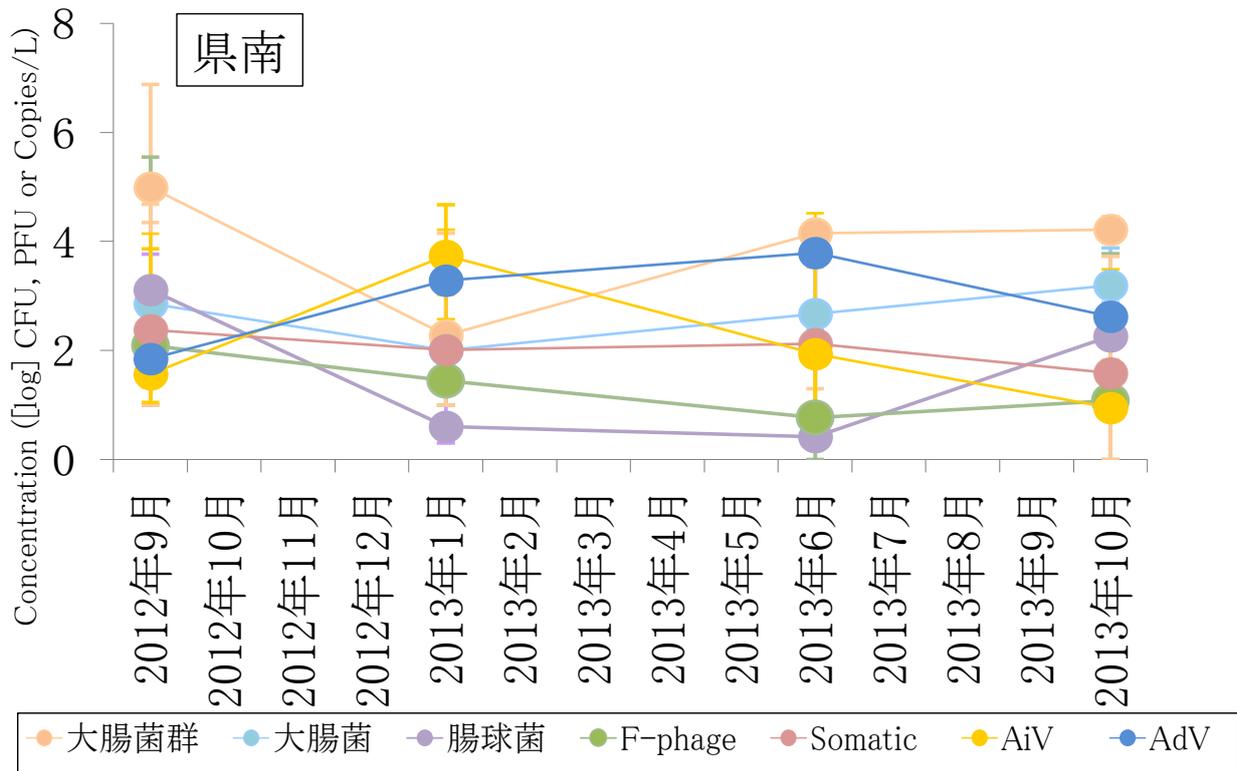
石巻東部浄化センターでは、処理復旧後に消毒効果が改善され処理後放流水中の大腸菌群、大



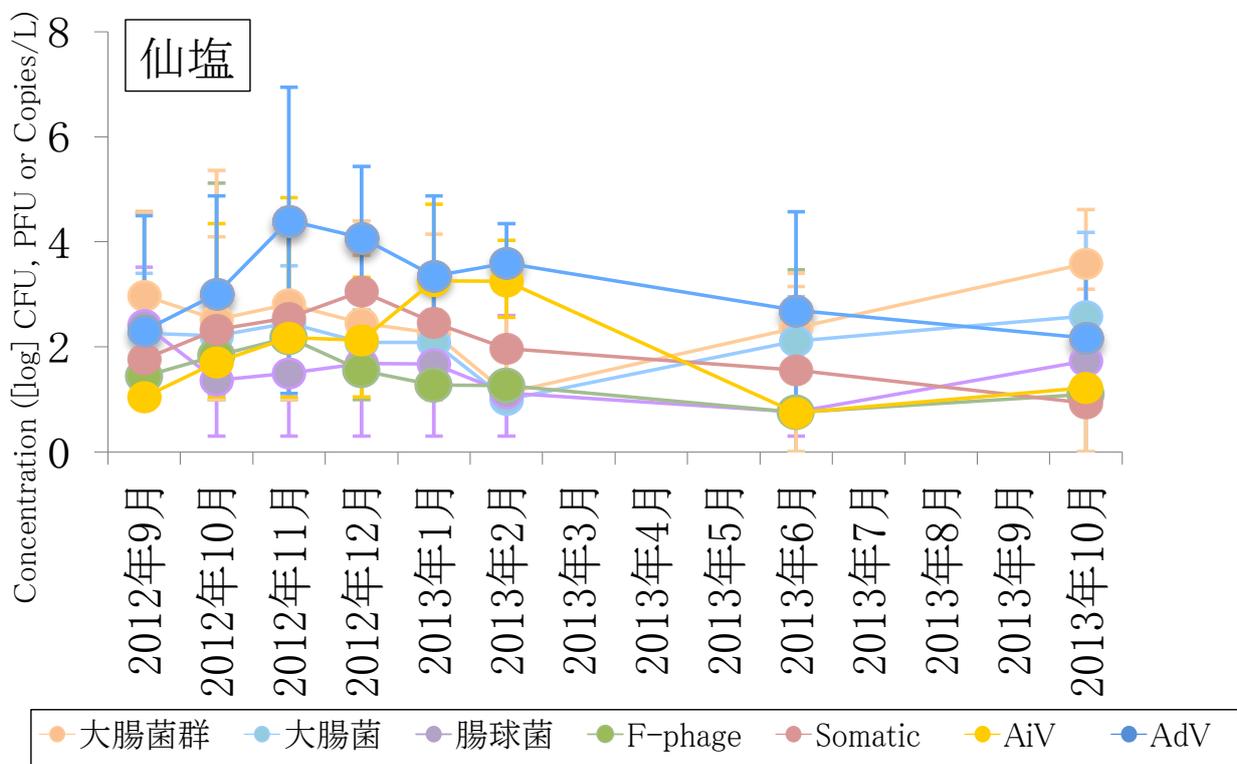
図(2)-1 石巻東部浄化センター放流先周辺水域における微生物濃度の時系列的変化



図(2)-2 南蒲生浄化センター放流先周辺水域における微生物濃度の時系列的変化



図(2)-3 県南浄化センター放流先周辺水域における微生物濃度の時系列的変化



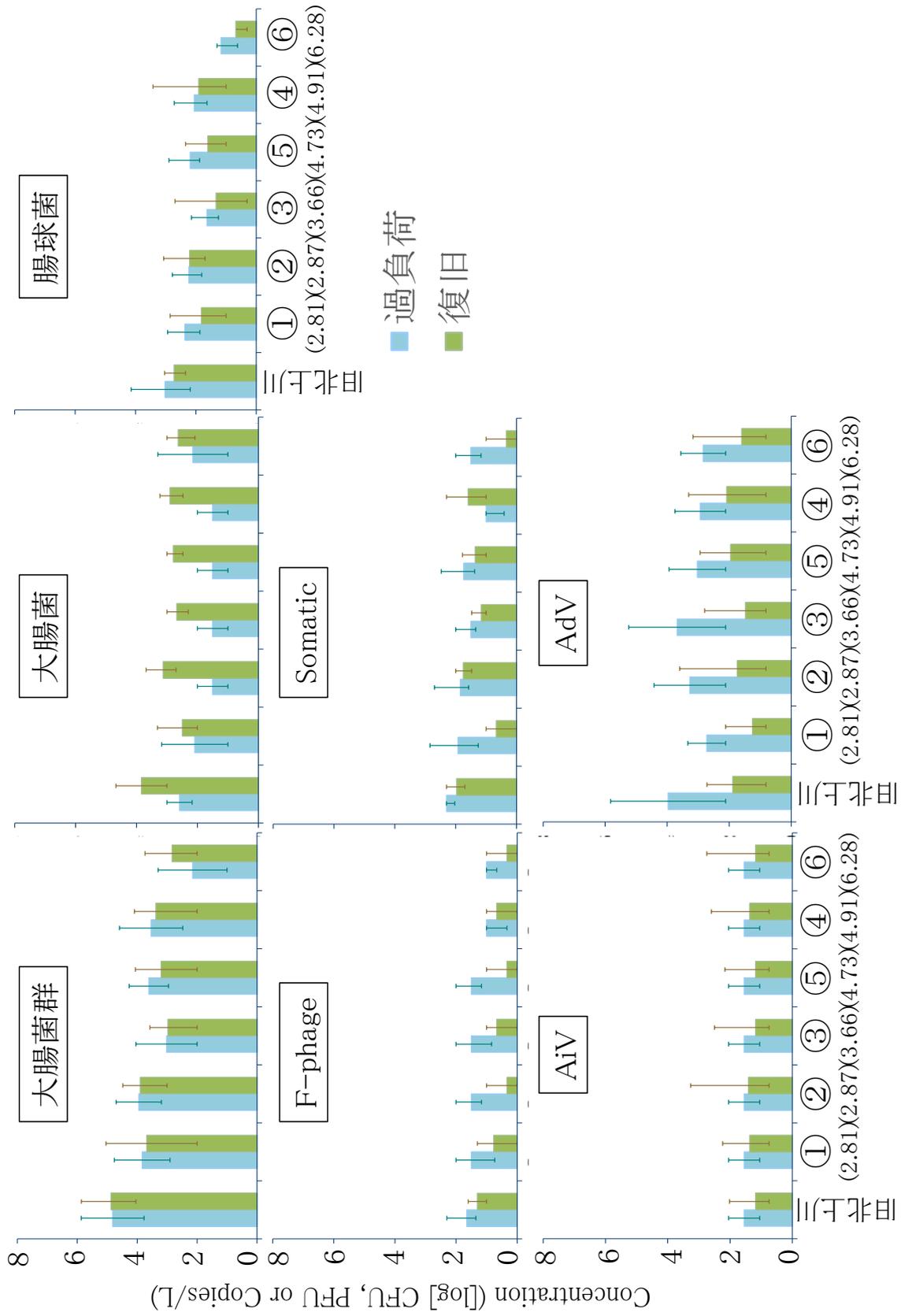
図(2)-4 仙塩浄化センター放流先周辺水域における微生物濃度の時系列的変化

腸菌の濃度が低下していたことが確認された。しかし、放流先水域において、復旧前後で大腸菌群、大腸菌の濃度に変化は確認されなかった。特に大腸菌に関しては、復旧後の濃度が高くなっていた。この増加は、復旧後の試料が季節変動により増加傾向にあるものが含まれているためだと考えられる。また、腸球菌の復旧後の試料における減少も、全ての地点で0.5 log/L以下でありほとんど変化していなかった。F-phageは、検出頻度が低く、ほとんどの試料で検出下限以下であったため、復旧前後の濃度変化は把握できなかった。Somaticは復旧後に0.5 log/L程度の減少が確認された。AiVは、F-phageと同様に検出頻度が低く、復旧前後での濃度変化を判断することは出来なかった。一方で、AdVは復旧後に1.0~2.0 log/Lの減少が確認された。

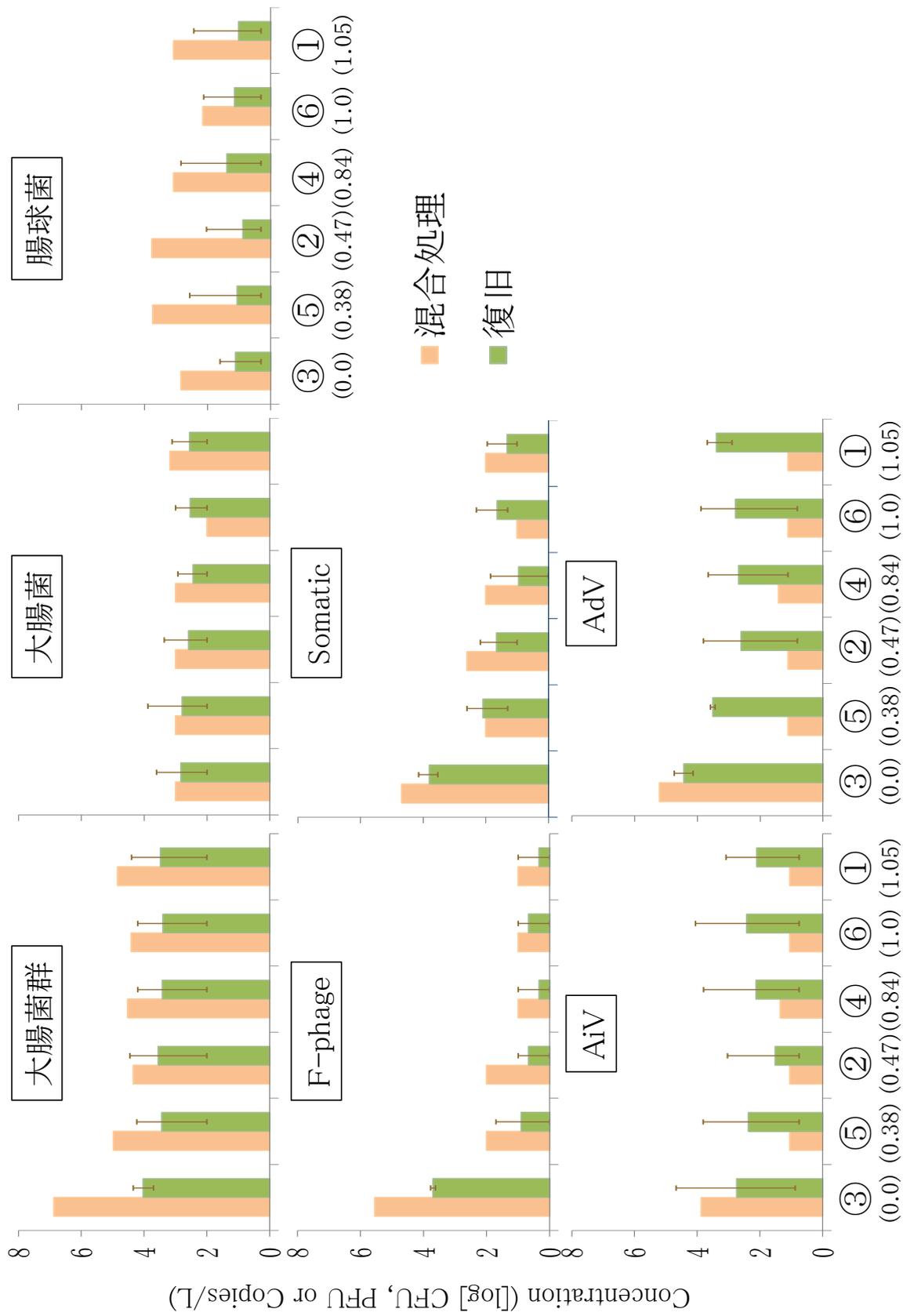
県南浄化センターでは処理復旧に伴い、大腸菌群、大腸菌、腸球菌の処理効率が改善されていることが確認された。放流先水域では、大腸菌群と腸球菌で復旧後に、それぞれ2.5~1.0 log/Lと3.0~1.0 log/Lの減少が確認された。しかし、大腸菌は放流先水域において復旧前後で濃度の変化はなかった。県南浄化センター放流先水域における細菌の経時変化の結果において、大腸菌群および腸球菌は、季節変動の傾向が確認されたが、大腸菌では確認されなかった。このことから、大腸菌群および腸球菌の復旧前後の変化は、季節変動に伴うものであり、季節変動が確認されなかった大腸菌では復旧前後の変化が生じなかったものと考えられる。F-phageは放流口直近で2.0 log/L程度の減少が確認された。また、Somaticも放流口直近での減少が確認された。また、経時変化の結果において、復旧前後で僅かな減少が確認された。一方で、ウイルスは、放流口直近を除いて復旧後の濃度が高かった。さらに、経時変化での減少も確認されなかった。

仙塩浄化センター周辺水域では大腸菌群、大腸菌、腸球菌は、運河に位置する採取地点(仙流橋、貞山橋)において、復旧後に最大で2.0 log/L程度の減少が確認された。しかし、それ以外の地点では復旧前後に変化は確認されなかった。F-phageとSomaticは、復旧後に、それぞれ最大で2.0 log/Lと1.0 log/L程度の減少が確認された。ウイルスはAiV、AdV共に放流口直近地点において、最大で1.0 log/L程度の減少が確認されたが、他の地点では復旧後の濃度が高かった。仙塩浄化センター周辺水域における微生物濃度の経時変化において、細菌は2012年12月に復旧されるまで季節変動による増加傾向を示している。また、復旧後の2013年6月以降にも同様の増加傾向を示していることから、2012年12月から2013年2月の試料における減少傾向は、復旧による変化ではないと考えられる。また、一方で、ファージは、F-phageおよびSomaticは、復旧後に減少する傾向を示すが、ウイルスにおいて同様変化は確認されなかった。

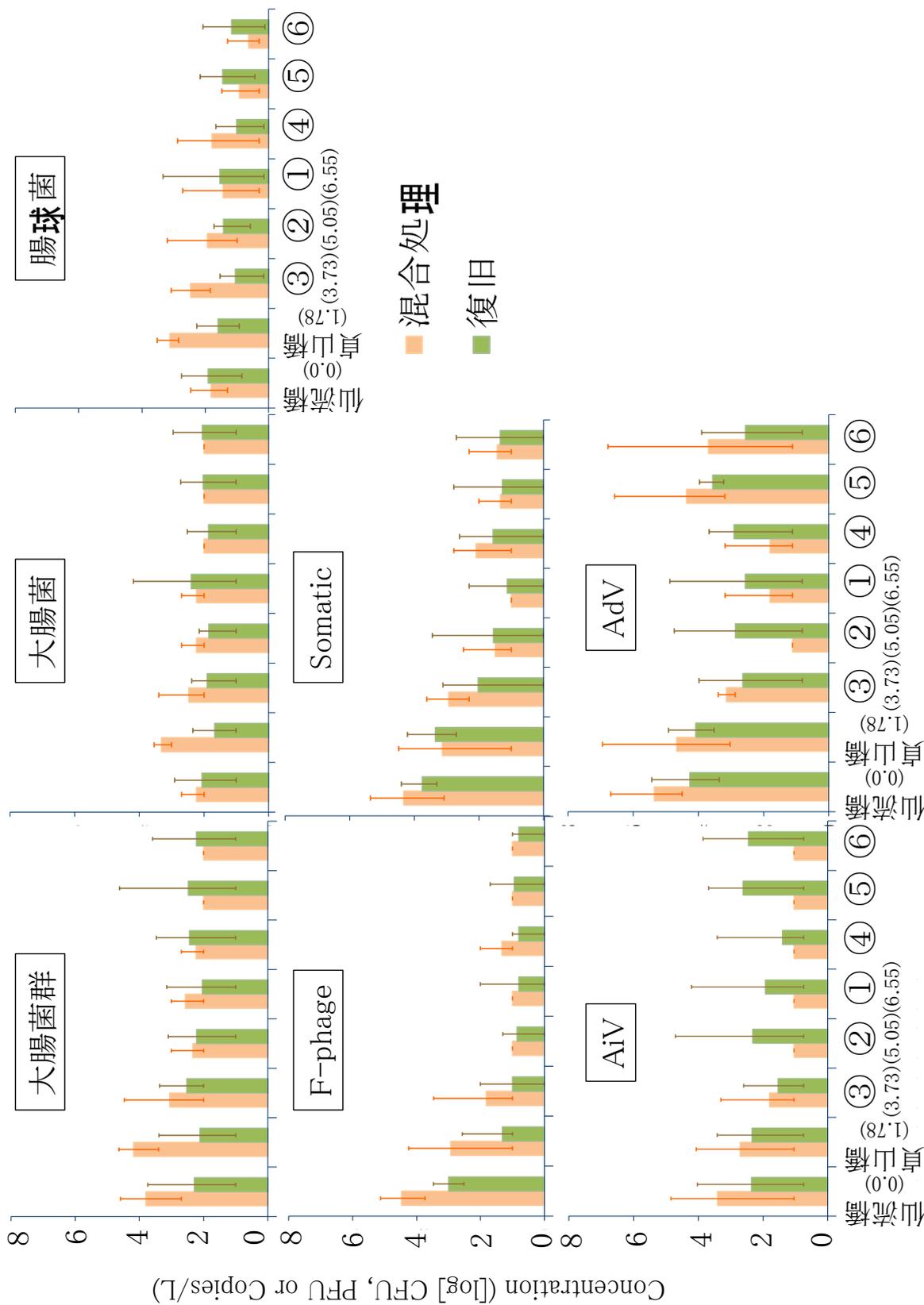
3浄化センターの放流先水域において、大腸菌群、大腸菌、腸球菌の濃度は処理復旧後に減少する傾向が確認された地点があるものの、復旧後の試料において、水温が高い時期に細菌の濃度増加が確認されていることもあり、季節変動による変化や塩素注入率が影響していると考えられる。F-phageは全ての水域で、検出頻度が低く復旧前後の濃度変化を確認すること困難であったが、Somaticは水域によって差はあるものの復旧後に減少する傾向が確認された。一方、ウイルスは、AiVおよびAdV共に、復旧前後に共通した変化は確認されなかった。ウイルスの定量方法は、遺伝子検出法であり濃度変化は下水流入水に存在するウイルス量に依存するものと考えられる。また、復旧に伴う感染性の不活化を評価することはできていない。一方、ファージの測定方法は培養法であり、復旧に伴う消毒効果の改善・変化により検出傾向が変化すると考えられる。ファージは、放流先水域により差はあるものの処理復旧後に濃度が減少する共通の傾向が確認され、下水処理効果改善に伴い濃度が低下したのと考えられる。



図(2)-5 石巻東部浄化センター放流先周辺水域における処理復旧に伴う微生物



図(2)-6 県南浄化センター放流先周辺水域における処理復旧における微生物濃度の変化



図(2)-7 仙塩浄化センター放流先周辺水域における処理復旧に伴う微生物濃度の変化

□

放流先水域採取地点を放流口からの距離に伴う微生物濃度の変化を図(2)-8(石巻)、図(2)-9(南蒲生)、図(2)-10(南蒲生・流軸試料)、図(2)-11(県南)、図(2)-12(仙塩・北部採取地点)に示す。

石巻東部浄化センターの放流先周辺水域において、大腸菌群は放流口の濃度に比べ最遠方地点において最大で2.0 log/L程度の減少を示し検出下限以下になったが、それ以外では僅かな減少傾向(1.0 log/L)であった。しかし、大腸菌、腸球菌では最遠方地点に向けての減少は確認されなかった。F-phageは放流口直近の試料で検出された以外はほとんどの試料で検出限界以下であった。一方、SomaticはF-phageに比べ検出頻度が高く最遠方地点以外で検出されたが、検出された地点においては距離による濃度の変化は見られなかった。AiVはF-phageと同様に検出頻度が低く距離による濃度変化を確認する事はできなかった。AdVは最遠方地点に向けて僅かな減少傾向(約0.5 log/L)を示した。

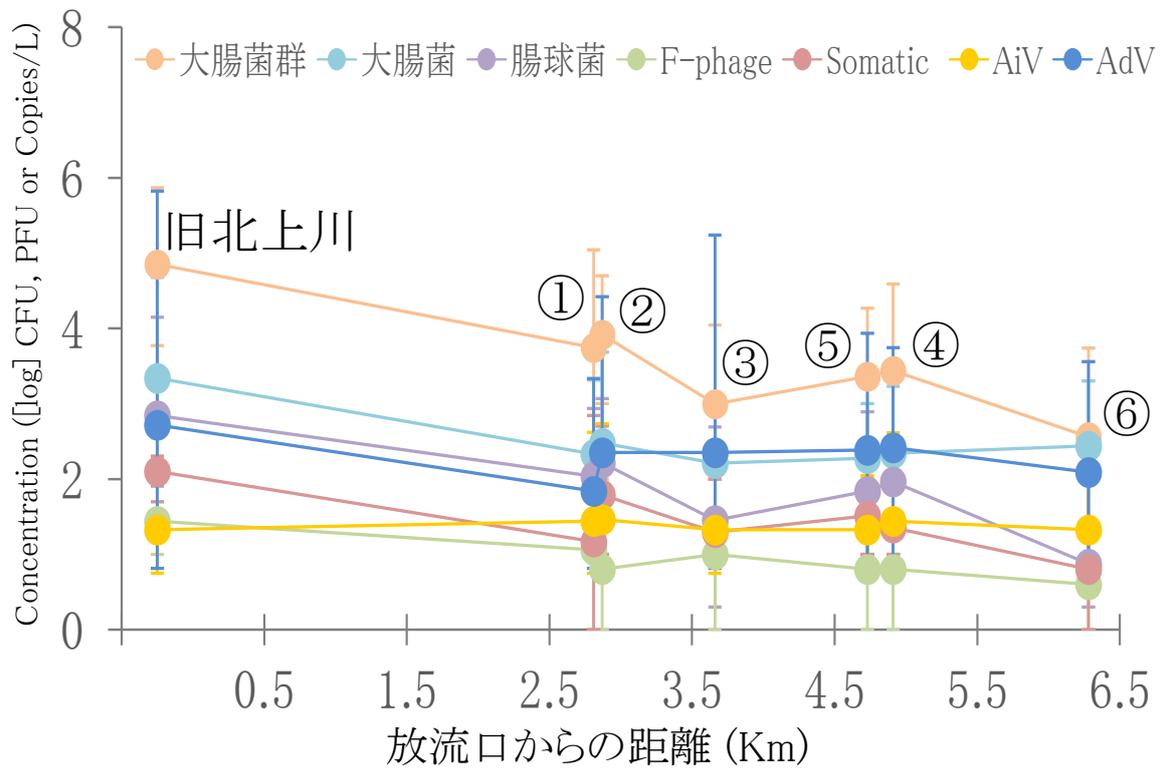
南蒲生浄化センターの放流先周辺水域では、定点調査地点および放流口からの流下方向に沿った地点(流軸試料)の調査を行った。大腸菌群、大腸菌、腸球菌は、定点調査地点、流軸試料共に放流口からの距離による濃度変化は最大で0.5~1.0 log/L以下であり、距離による濃度違いは見られなかった。

定点調査地点におけるファージの減少傾向は、SomaticとF-phage共に確認された。また、他の水域とは異なりF-phageが比較的高頻度で検出され、Somaticよりも距離、流下方向に対して減少する傾向が確認された。さらに、南蒲生周辺水域ではAiV、AdV共に検出頻度が高く、他の水域よりも陽性検体数が多かったため、それぞれの減少傾向が確認された。AiVはAdVに比べ、微小な減少を示した。これによりファージ、ウイルス共に細菌とは異なり流下方向に対して減少して行く事が明らかになった。また、他の水域に比べ、ファージ、ウイルスの検出頻度が高かったのは南蒲生浄化センターの下水処理量が他の浄化センターに比べ多いためだと考えられ、周辺水域中のファージ、ウイルスの存在量は浄化センターの放流水中に含まれる量に依存する事が示唆された。

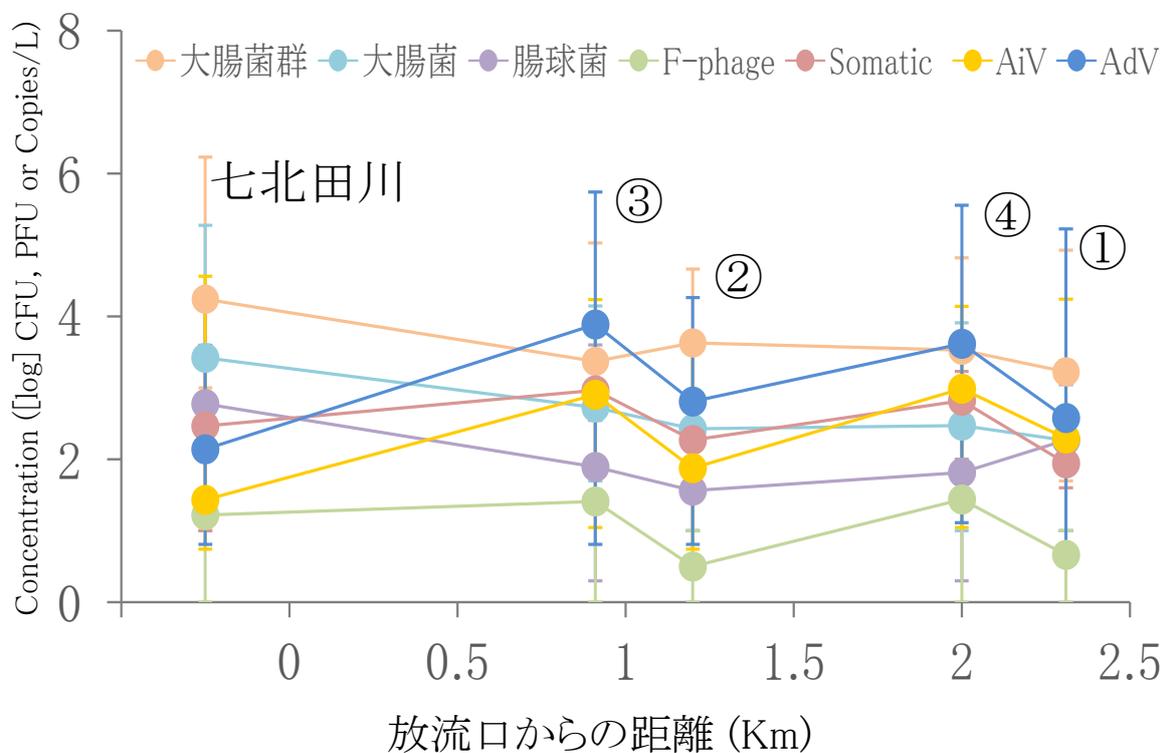
県南浄化センターの放流先水域において、放流口直近の地点ではすべての測定対象が高濃度で検出される傾向が確認された。大腸菌群、大腸菌、腸球菌は放流口からの距離に依存した現象は確認されなかった。一方、ファージとウイルスは距離に依存した現象が確認された。ファージは共に約2.0 log/L減少し、F-phageがより速く短距離で減少していき検出下限以下になった。AdVはAiVに比べ距離に依存した減少が確認された。ファージはウイルスよりも濃度減少の幅が大きかった。また、県南浄化センター放流先水域の全ての調査地点は放流口から1.1 Km以内に位置し、他の水域に比べ放流口から近い範囲で調査している。ファージは放流口から近い範囲内で濃度が著しく減少している事が明らかになった。

仙塩浄化センターの放流先海域での空間的解析には運河調査地点と北部調査地点の結果を解析に使用した。南部調査地点は堤防などの人工物が建築、設置されており距離や流下方向による濃度変動を解析するのに向いていない。

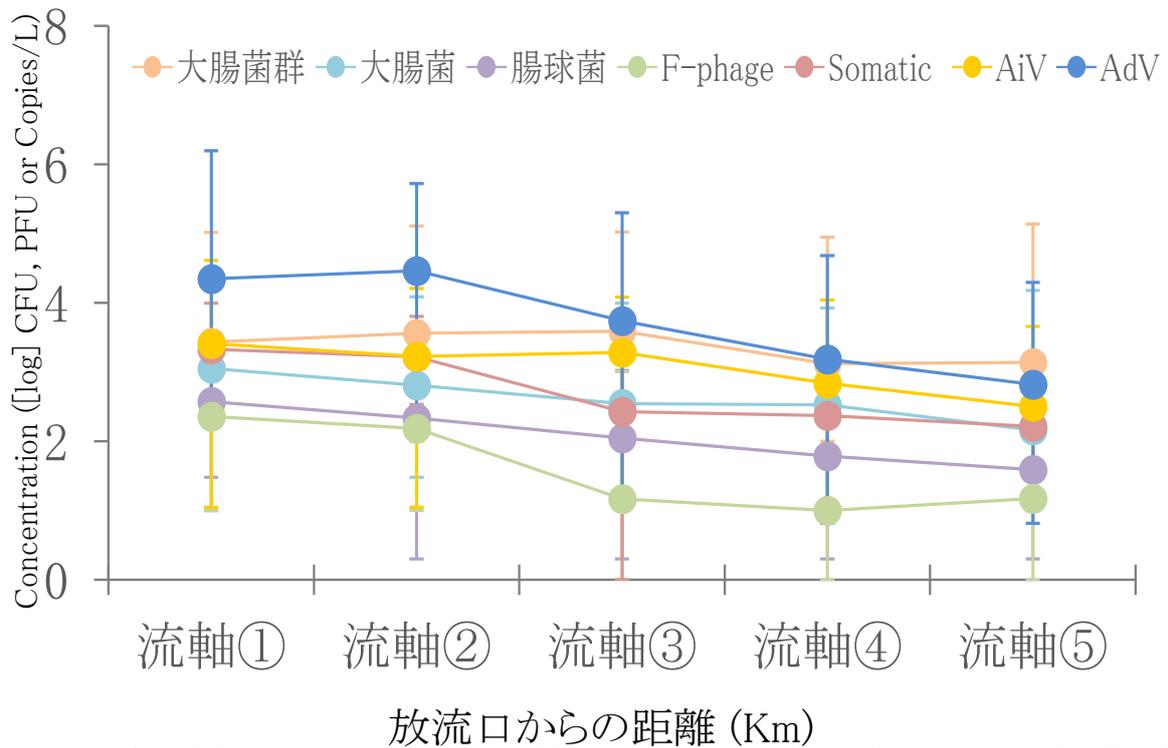
運河調査地点において、AdVとAiVは殆ど減少していなかった。一方でファージ、特にF-phageは運河内でも距離に依存して減少していた。運河を抜けた沿岸域調査地点では、ウイルス、ファージ共に距離に依存して減少して行く傾向が確認された。ウイルスとファージの減少幅はファージの方が大きかった。しかし、大腸菌群、大腸菌、腸球菌は運河を含めた全ての調査地点で濃度



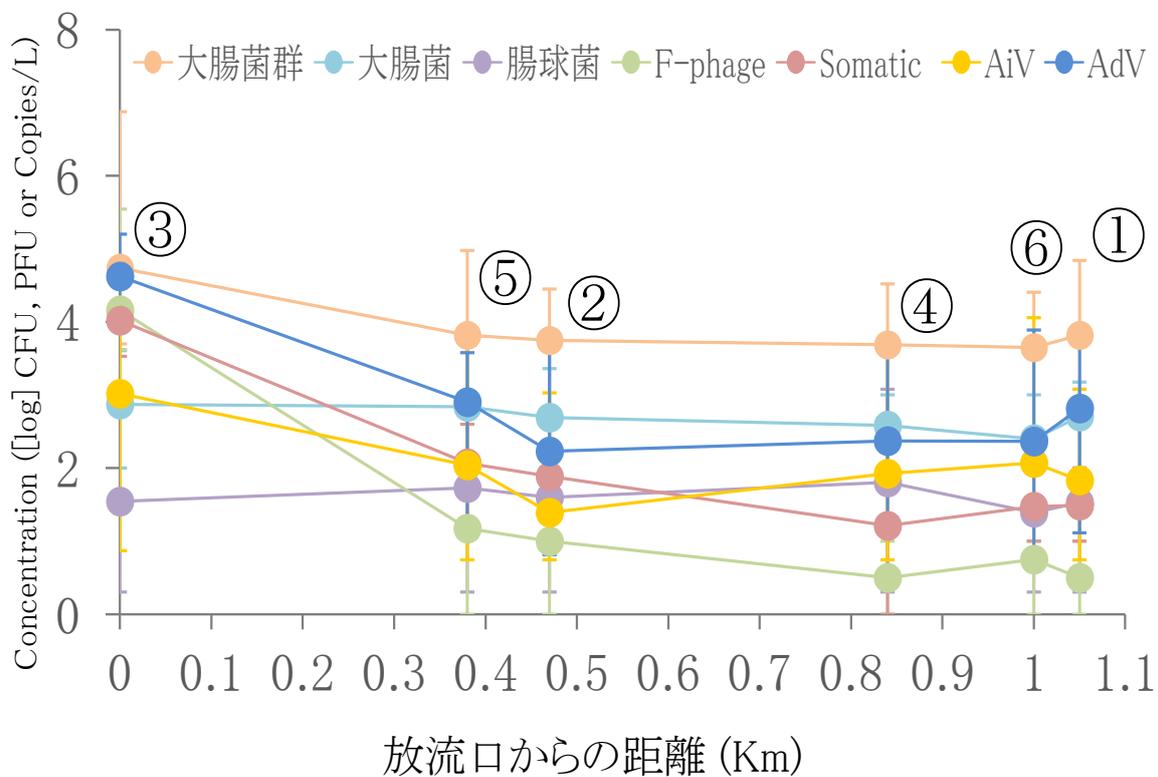
図(2)-8 石巻東部浄化センター放流先周辺水域における放流口からの距離と微生物濃度の変化



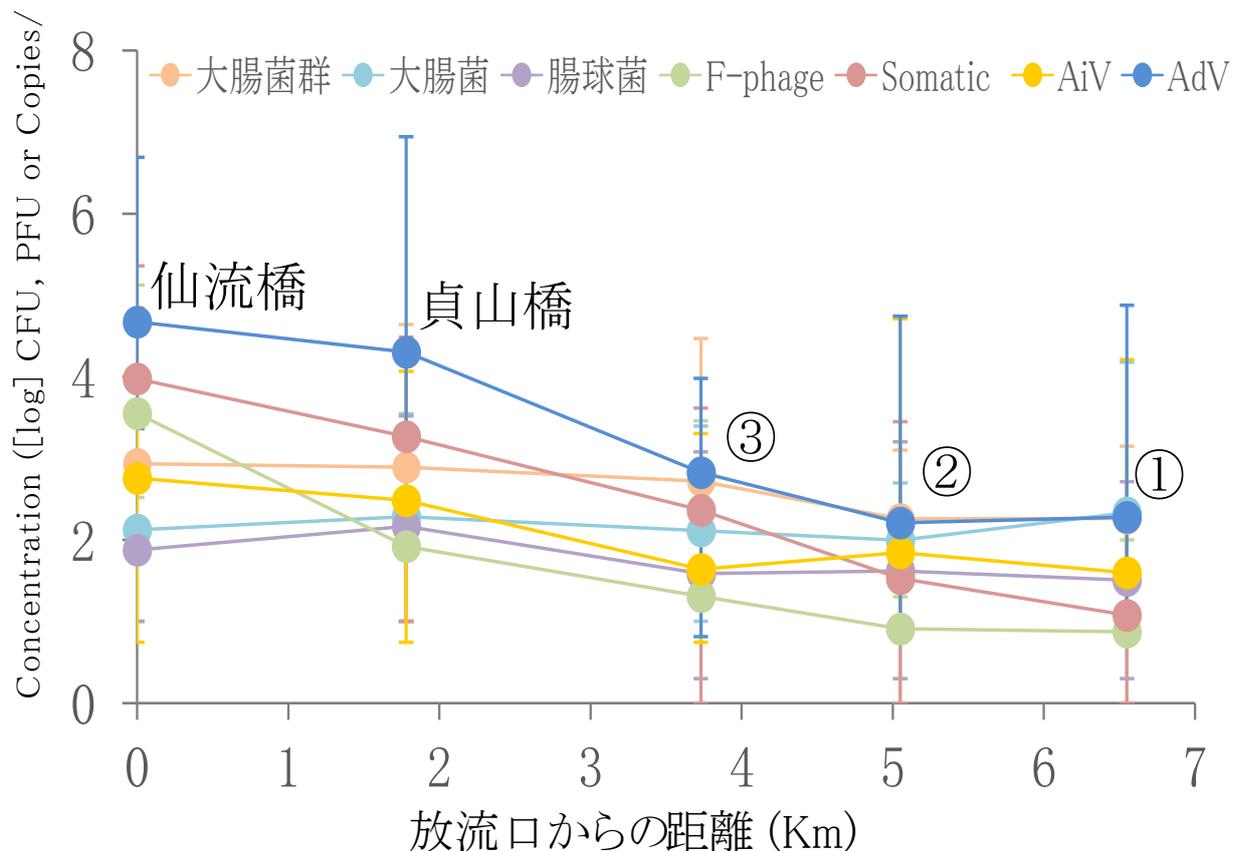
図(2)-9 南蒲生浄化センター放流先周辺水域における放流口からの距離と微生物濃度の変化



図(2)-10 南蒲生浄化センター放流先周辺水域(流軸試料)における放流口からの距離と微生物



図(2)-11 県南浄化センター放流先周辺水域(流軸試料)における放流口からの距離と微生物濃



図(2)-12 仙塩浄化センター放流先周辺水域(流軸試料)における放流口からの距離と微生物濃度の変化

に変化はなく距離による濃度の違いは見られなかった。

放流口からの距離と微生物濃度の関係を比較した結果、全ての水域で大腸菌群、大腸菌、腸球菌が、放流口からの距離に依存せず一定の濃度で存在している事が明らかになった。一方で、ファージとウイルスはこの距離に依存した濃度減少が見られ、希釈による影響を受けていると考えられた。また、ファージの方が減少の傾きが大きく、希釈と共に不活化の影響が考えられた。SomaticはF-phageに比べ高頻度に検出され、比較的遠方の地点でも検出された。しかし、F-phageは水域での検出頻度が低く、比較的放流口に近い調査地点でも検出下限以下である事が多かった。この事から、F-phageはSomaticに比べ水域における環境ストレスへの耐性が低く、不活化されやすい可能性が考えられた。

生物処理が再開された3浄化センターにおいて、水質は生物処理が再開されて以降向上する傾向が確認された。復旧前の段階で大腸菌群、大腸菌、腸球菌に対する消毒を塩素注入量のコントロールにより強化していた場合、大腸菌群、大腸菌、腸球菌の濃度に生物処理が再開による著しい減少は確認されていない。これは、生物処理の再開により塩素注入量を減少させたため、見た目の消毒効果に変化がなかったためだと考えられる。

ファージは、F-phageに比べSomaticが検出頻度が高い傾向が確認された。また、Somaticは距離

に依存した減少傾向が確認された。Somatic処理場内でF-phageに比べ不活化されにくい傾向が確認されている。一方でウイルスは、Somaticに比べAiV、AdV共に微小な低減傾向が確認された。ファージは宿主を用いた感染性があるものを測定しているのに対して、ウイルスは遺伝子を対象とした定量を行っているため、低減傾向に差が生じたものと考えられる。しかし、感染性のあるファージが検出されていることから、検出されたウイルスも感染性を有している可能性が示唆された。また、処理場内および放流先水域の検出傾向からウイルスに対しての指標性はF-phageよりもSomaticの方が高い可能性が示唆された。

2013年6月に石巻および南蒲生で採取した大容量ウイルス濃縮試料におけるウイルス検出結果を小容量ウイルス濃縮試料の検出結果と比較したものを表(2)-1に示す。表内で赤く示された結果が、小容量ウイルス濃縮試料では陰性だったが、大容量ウイルス濃縮試料では陽性だった物を示す。小容量ウイルス濃縮試料で陽性結果であった試料は、大容量試料でも全て陽性結果が得られた。石巻の試料は小容量ウイルス濃縮では全ての測定したウイルスが陰性であったが、大容量ウイルス濃縮試料では4試料が陽性であった。南蒲生の小容量ウイルス濃縮試料では7/9がAiV陽性であった。しかし、他の測定した腸管系ウイルスであるEntV、GI、GII NoVは全ての試料で陰性であった(0/9)。一方で、大容量ウイルス試料のAiV陽性(8/9)であった全ての試料からGI、およびGII NoVが検出された。即ち、AiVは小容量ウイルス濃縮試料において陽性であった場合、その試料がNoV陽性であることを示していた。故に、AiVはNoVを含めた他の腸管系ウイルスの存在を示すのに有効である可能性が示唆された。



## (2) 被災処理場の段階的復旧に伴う処理効率および処理水質の改善状況

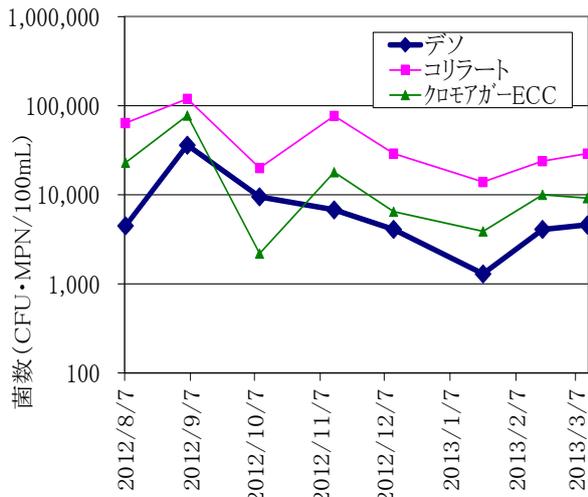
4 浄化センターで採取した試料から得られた細菌、ファージ、ウイルスの検出・定量結果は共有し、下水処理の復旧に伴う下水処理効率の改善状況、および指標微生物の病原微生物に対する指標性の評価について、サブグループ(3)の東北大学により解析された。結果および考察は、サブグループ(3)の報告部に記載されている。

## (3) 水質基準項目に対する新規細菌指標および検査方法の検討

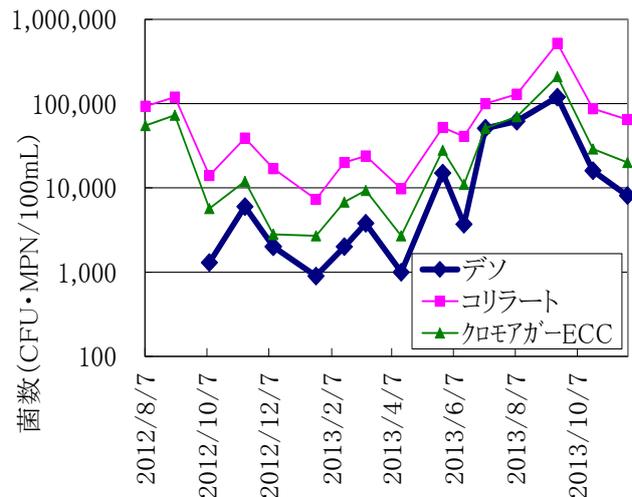
都内下水処理場で採取した処理後の下水法流水中の大腸菌群、大腸菌、腸球菌、糞便性大腸菌群、糞便性連鎖球菌を各手法により測定した。測定結果を図(2)-13、図(2)-14、図(2)-15に示す。調査期間を通して現行の水質基準項目である大腸菌群の測定の際に用いられているデソ法に比べ、クロモアガー法とコリラート法を用いたほうがより多くの大腸菌群が検出され、特にコリラート法はデソ法よりも1.0 log程度高い傾向が確認された(2012年10年、クロモアガー法を除く)(図(2)-13)。また、各手法で測定された大腸菌(クロモアガー法、コリラート法)、糞便性大腸菌群(m-FC法)をデソ法による大腸菌群数の結果と比較したところ、クロモアガー法で検出された大腸菌数が少なく検出されたものの、デソ法で検出された大腸菌群数に対して他の手法で検出された大腸菌数および糞便性大腸菌群数が同等の値で検出された。しかし、10月の試料においてクロモアガー法による大腸菌、およびm-FC法による糞便性大腸菌群の測定値が他の手法に比べ著しく低下していた。一方で、デソ法による大腸菌群数およびコリラート法による大腸菌の測定値は著しい減少は見られなかった(図(2)-14)。同様に、デソ法による大腸菌群の測定結果と腸球菌数(エンテロラート法)、および糞便性連鎖球菌数(m-エンテロコッカス法)の測定結果を比較したところ、糞便性連鎖球菌の測定値は1.0 log程度、腸球菌はさらに少なかった(図(2)-15)。

河川水における同様の結果を図(2)-16、(2)-17、(2)-18に示す。河川水における各手法による大腸菌群の検出結果は、濃度が減少傾向にある2012年10月以降の試料において、デソ法に比べクロモアガー法とコリラート法を用いた方がより高濃度で検出され、コリラート法では1.0 log程度高いという下水放流水と同様の傾向が確認された(図(2)-16)。一方で、濃度が上昇傾向にある2013年5月から9月の試料において、全ての測定方法の値に大きな違いはなかった。この傾向は、季節変動による可能性が高く、特に水温上昇に伴い生じている可能性が示唆された。また、このような季節変動に伴い、試料中にデソ法で検出されない大腸菌群の菌叢が増加している可能性があり、デソ法での測定が過小評価になっている可能性が考えられた。大腸菌数(クロモアガー法、コリラート法)、および糞便性大腸菌群数(m-FC法)との比較において、デソ法による大腸菌群数の濃度は高く検出された。特にクロモアガー法の値に比べ0.5~1.0 log高い傾向にあった。濃度の差は増加傾向にある時期に小さくなる傾向も確認された(図(2)-17)。この結果から、濃度が減少傾向にある試料において、デソ法では大腸菌群数の検出が過小評価している可能性が考えられ、デソ法では検出されていない大腸菌群が存在している可能性が考えられた。また、糞便性連鎖球菌および腸球菌は大腸菌群(デソ法)より1.0 log程度少ないという下水試料と同様の傾向が確認された(図(2)-18)。

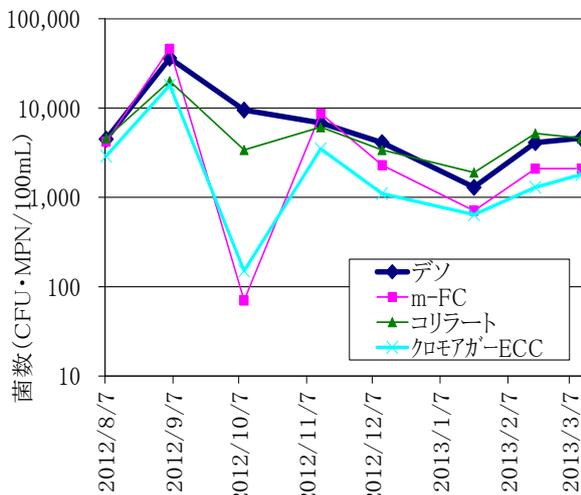
以上の結果から、デソ法による大腸菌群の測定値と比較した結果、m-FC法による糞便性大腸菌群、コリラート法による大腸菌、およびクロモアガー法による大腸菌の測定値は、同等か1.0~



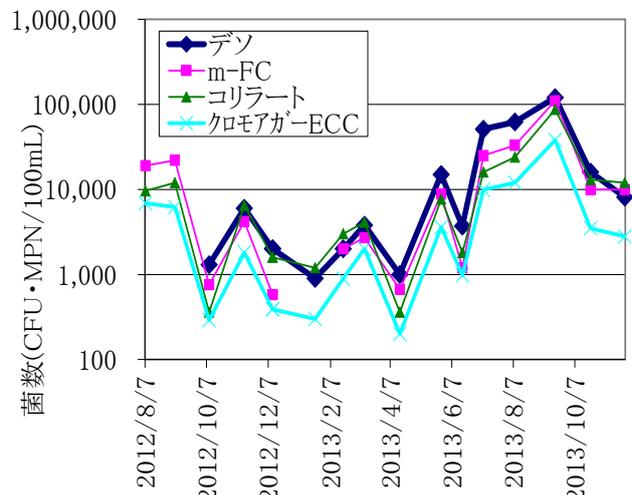
図(2)-13 下水放流水の大腸菌群数



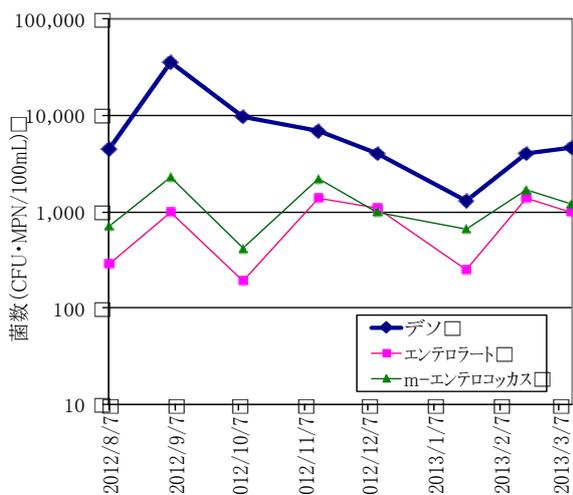
図(2)-16 河川水の大腸菌群数



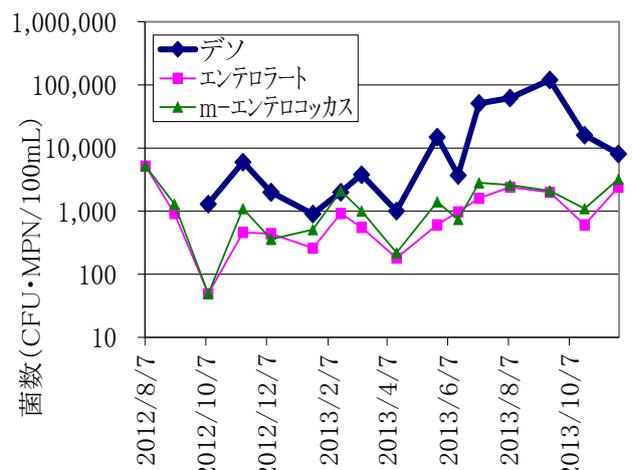
図(2)-14 下水放流水の大腸菌群、糞便性大腸菌群数、および大腸菌数



図(2)-17 河川水の大腸菌群数(デソ)と糞便性大腸菌群数、大腸菌数



図(2)-15 下水放流水の大腸菌群、腸球菌、および糞便性連鎖球菌数



図(2)-18 河川水の大腸菌群数(デソ)と腸球菌数、糞便性連鎖球菌数

0.5 log程度少ない結果を示した。一方、m-エンテロコッカス法による糞便性連鎖球菌、およびエンテロラート法による腸球菌の測定値は、1.0 -2.0log程度少ないという傾向を示した。

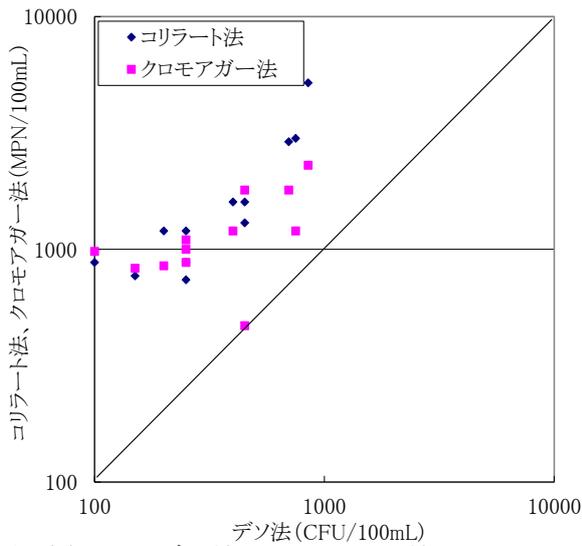
河川水浴場における同様の調査を図(2)-19、(2)-20、(2)-21に示す。各測定法による大腸菌群数の測定結果は、河川水、下水放流水の測定結果と同様にデソ法に比べ、0.5 log程度コリラート法、クロモアガー法が高く検出された(図(2)-19)。コリラート法とクロモアガー法による大腸菌数と糞便性大腸菌群数(m-FC法)を比較した結果を図(2)-20に示す。糞便性大腸菌群数に対しコリラート法による大腸菌数は同程度の検出であったのに対し、クロモアガー法による大腸菌数はやや少ない傾向であった。糞便性大腸菌群と腸球菌および糞便性連鎖球菌を比較したところ、それぞれの濃度に強い相関性は見られなかった(図(2)-21)。また、糞便性大腸菌群数とデソ法、クロモアガー法、コリラート法による大腸菌群数の比較を図(2)-22に示す。大腸菌群の検出結果から調査4地点の全ての試料において水浴基準は満たしているものの、環境基準は満たしていない事が確認された。

海水浴場の試料において同様の比較を行ったところ、希釈なしの海水試料では糞便性大腸菌群数は非常に低く、大腸菌群数に対して低い傾向が確認された(図(2)-23)。一方、塩分影響を低減することを目的に試料を10倍希釈し検出を行った結果、陽性検出数は少ないものの、糞便性大腸菌群に対し、クロモアガー法による大腸菌数は同等程度で検出されたが、コリラート法では濃度が高く検出されるものの検出頻度は低く、糞便性大腸菌群数、クロモアガー法の結果に対し相関は見られなかった(図(2)-24)。また、糞便性大腸菌群の結果と糞便性連鎖球菌数と腸球菌数の結果を比較した結果、10倍希釈試料で糞便性連鎖球菌数が比較的高濃度で、検出頻度も高かった(図(2)-25)。以上の結果から、海水では糞便性連鎖球菌が検出されやすさの面では指標として有効である可能性が示唆された。

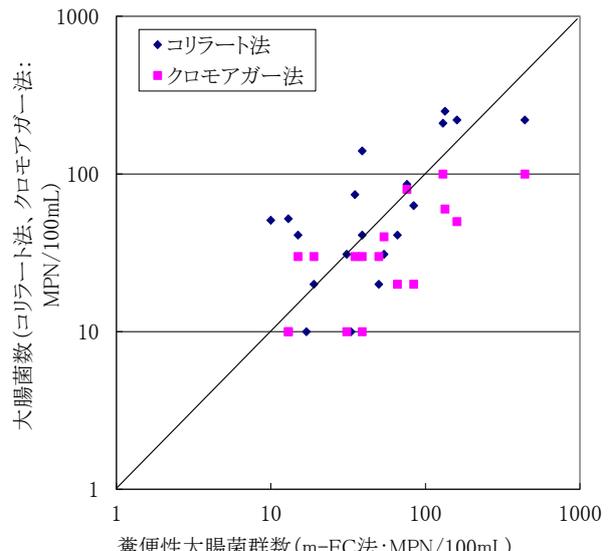
河川・水浴場の試料においてデソ法による大腸菌群の測定値と比較した結果、m-FC法による糞便性大腸菌群、コリラート法による大腸菌、およびクロモアガー法による大腸菌の測定値は、同等か1.0~0.5 log程度少ない結果を示した。一方、m-エンテロコッカス法による糞便性連鎖球菌、およびエンテロラート法による腸球菌の測定値は、1.0~2.0 log程度少ないという傾向を示した。

以上の結果から、河川水に使用されている現行の水質基準であるデソ法を用いた大腸菌群の測定に対して、m-FC法を用いた糞便性大腸菌群、コリラート法、およびクロモアガー法を用いた大腸菌群測定結果が、同等から0.5 log高い値で検出されることが確認された。また、デソ法では検出されない大腸菌群が存在する可能性が示唆され、過小評価になっている可能性が考えられた。また、水浴場における水質基準であるm-FC法を用いた糞便性大腸菌群の測定に対して、クロモアガー法を用いた大腸菌測定結果が同等または0.5 log低い値で検出された。

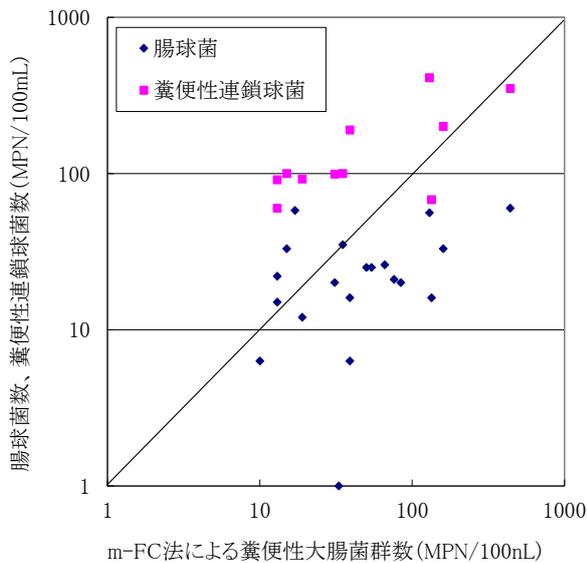
しかし、既存のデータにおいて、多摩川上流水浴場では検査法によるバラつきが少ないことが報告されている。このことから、本研究より、下水による影響が検出法の精度に影響をあたえる可能性があることが示唆された。



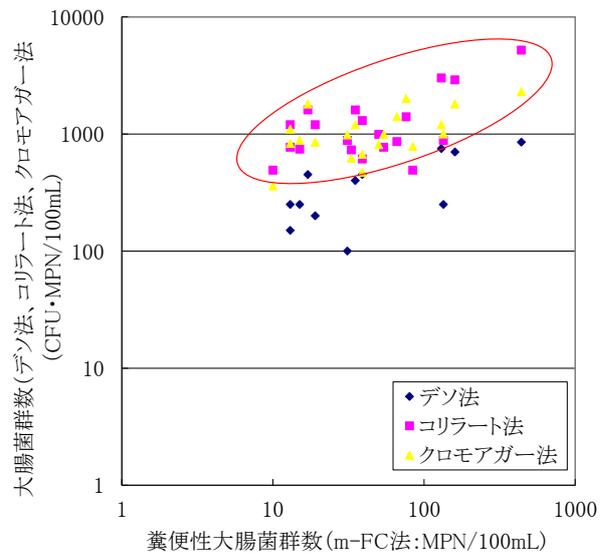
図(2)-19 デソ法、コロレート法、クロモアガー方による大腸菌群数



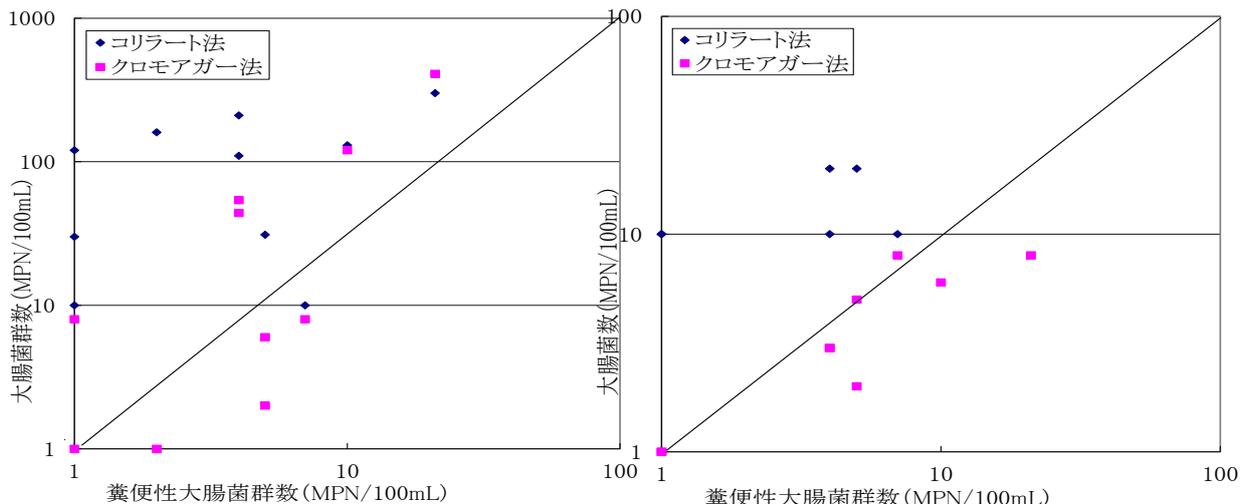
図(2)-20 糞便性大腸菌群数とコロレート法、クロモアガー方による大腸菌数



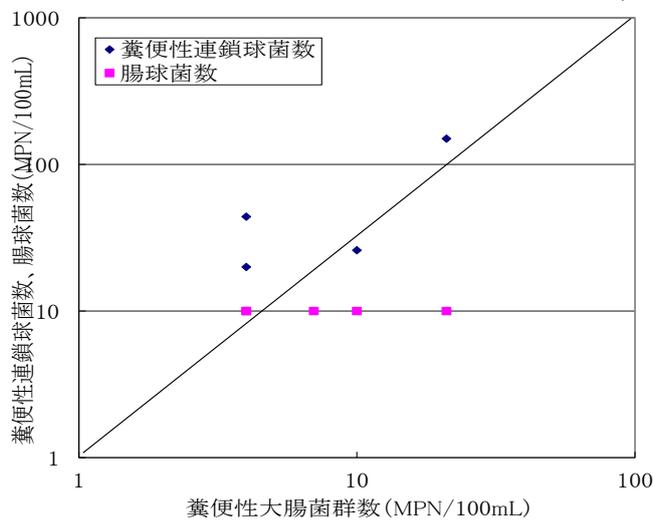
図(2)-21 糞便性大腸菌群数と腸球菌数、糞便性連鎖球菌数



図(2)-22 糞便性大腸菌群数とデソ法、クロモアガー法、コロレート法による大腸菌群数



図(2)-23 糞便性大腸菌群数とコリラート法、図(2)-24 糞便性大腸菌群数とコリラート法、クロモアガー法による大腸菌群数



図(2)-25 糞便性大腸菌群数と腸球菌数、糞便性連鎖球菌数

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

被災した4下水処理場の放流先周辺水域における時空間的解析により、細菌、ファージ、ウイルスで季節変動、流下方向、希釈に対する挙動が解明することが出来た。大腸菌群、大腸菌、腸球菌の海域における季節変動、希釈、流下方向による挙動の比較、さらに、さまざまな水域における現行の基準項目の菌数と、その他の糞便汚染指標細菌数、および検査方法の比較から、海域における細菌指標として糞便性連鎖球菌が適している可能性を示すことができた。海域における時空間的解析により、ファージおよびウイルスは希釈による濃度の減少が確認された。減少傾向の差は培養法と遺伝子検出法によるものと示唆され、培養法によるファージの検出は希釈および不活化による減少を示している可能性が評価された。また、SomaticとF-phageの検出頻度、減少傾向から、ウイルスの感染性に対する指標としてSomaticが有効である可能性が示された。

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

環境省の大腸菌環境基準検討会において、本研究成果である指標細菌の測定結果を提示し、あらたな衛生指標の策定に係る審議に貢献した。なお、本件は平成26年度においても継続審議中である。

### <行政が活用することが見込まれる成果>

放流先水域において、淡水・海水による細菌性指標として有効な候補を示すことが出来た。このことは、環境水の性質・水利用状況に合わせた指標を策定する必要性に重要な情報である。また、ウイルスの感染性に対する指標として期待されているフェージの中で有効性の高い種を把握した。さらに、現行で用いられている測定方法による差異が詳細に示せたことは、これまでにさまざまな条件で蓄積されたデータを整理する上で重要な知見であり、基準改定において貢献できる成果である。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文(査読あり)>

- 1) 端昭彦、稲葉愛美、片山浩之、古米弘明：土木学会論文集G(環境)，68(7)，Ⅲ.285-Ⅲ.29(2012)  
「震災後の石巻沿岸域における腸管系ウイルス及び指標微生物の検出と検出阻害評価」

### (2) 口頭発表(学会等)

- 1) 小熊久美子、Sangsanont Jatuwat、稲葉愛美、片山浩之：第47回日本水環境学会年会 (2013)  
「災害時利用を想定した簡易下水消毒方法の検討」
- 2) 稲葉愛美、片山浩之、端 昭彦、古米弘明：第47回日本水環境学会年会 (2013)  
「被災後石巻港沿岸環境における衛生微生物の分布調査」
- 3) 端 昭彦・稲葉愛美・片山浩之・古米弘明：第16回日本水環境学会シンポジウム(2013)  
「東京都奥多摩地方の河川水浴場における腸管系ウイルス及び指標微生物の存在実態」
- 4) 端 昭彦・稲葉愛美・片山浩之・古米弘明：第48回日本水環境学会年会 (2014)  
「東京都奥多摩の河川水浴場における腸管系ウイルスの分子疫学調査」

### (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

### (4) シンポジウム、セミナー等の開催(主催のもの)

- 1) 片山浩之：日本水環境学会 第21回市民セミナー 大震災後の水環境 - 何が起こったの

か、どう備えるか (2012) 「下水処理とリスク管理」

2) 片山浩之: Global Leadership Initiative Special Workshop on Water Virology (2012年1月19日、Parkside hotel Ueno、約25名)

#### (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

#### (6) その他

1) 第49回環境工学研究フォーラム・論文奨励賞 (2012)

端 昭彦 稲葉愛美・片山浩之・古米弘明

「震災後の石巻沿岸域における腸管系ウイルス及び指標微生物の検出と検出阻害評価」

### 8. 引用文献

- 1) W. O. K. Grabow and P. Coubrough: Applied and Environmental Microbiology, 52(3), 430-433 (1986)  
 “Practical Direct Plaque Assay for Coliphages in 100-ml Samples of Drinking Water.”
- 2) Anonymous: Water quality, International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland, ISO 10705-1 (1997)  
 “Detection and enumeration of bacteriophages, part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages.”
- 3) Anonymous: Water quality, International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland, ISO/DIS 10705-2.2 (1998)  
 “Detection and enumeration of bacteriophages, part 2: Enumeration of somatic coliphages.”
- 4) H. Katayama, A. Shimasaki and S. Ohgaki: Applied and Environmental Microbiology, 68(3), 1033-1039 (2002)  
 “Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater.”
- 5) A. Hata, H. Katayama, A. Kitajima, C. Visvanathan, C. Nol, and H. Hurumai: Applied and Environmental Microbiology, 77, 4336-4343 (2011)  
 “Validation of Internal Controls for Extraction and Amplification of Nucleic Acids from Enteric Viruses in Water Samples.”
- 6) T. Kageyama, S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda and K. Katayama: Journal of Clinical Microbiology, 41(4), 1548-1558 (2003)  
 “Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR.”
- 7) A Heim, C. Ebnet, G. Harste and P. Pring-Akerblom: Journal of Medical Virology, 70(2), 228~239 (2003)  
 “Rapid and quantitative detection of Human Adenovirus DNA by real-time PCR.”

- 8) 厚生省・建設省令第一号，1962年12月17日，国土交通省・環境省令第二号，最終改正，2012年5月23日  
“下水の水質の検定方法に関する省令”
- 9) 平成26年度水浴に供される公共用水域の水質調査結果の報告方法等について：環境省水・大気環境局水環境課調査係事務連絡の別紙の別添1，2014年3月25日  
“水浴場水質判定基準”
- 10) ふん便性連鎖球菌及び腸球菌の平板培養法：下水試験方法2012年版  
“下水試験方法の平板培養法”

### (3) 海域での病原微生物汚染の把握と影響

<研究分担者>

東北大学未来科学技術共同研究センター

大村達夫

東北大学未来科学技術共同研究センター

真砂佳史

<研究協力者>

北海道大学大学院工学研究院

佐野大輔

宮城県保健環境センター

植木洋

平成24～25年度累計予算額：33,765千円（うち、平成25年度予算額：16,899千円）

予算額は、間接経費を含む。

#### [要旨]

東日本大震災により深刻な被害を受けた宮城県内の浄化センター4箇所を対象に、下水処理復旧にともなう処理効率および放流水質の改善状況を評価した。BODや濁度等の基礎的水質項目については、二次処理の復旧にともない処理水中の濃度も低下した。一方微生物学的水質項目は必ずしも復旧後の処理水中の濃度は低下しなかった。この要因は測定項目により異なるが、二次処理効率が低下していた時期には、それを補うために塩素処理を強化することで十分な処理効率を確保していたことがその一つとして考えられる。このことは、塩素に耐性があるウイルス等については、処理復旧期（塩素処理強化期）の放流水中の濃度が高くなることを示唆している。また、大腸菌群をはじめとする微生物指標とヒトウイルス（アデノウイルス、アイチウイルス）濃度の相関分析により、指標細菌（大腸菌群、大腸菌、腸球菌）よりバクテリオファージの方が放流先水域（主に海域）での病原ウイルス濃度との相関が高く、ウイルスの指標として適していることが示唆された。これについては、処理水中の指標細菌の濃度が十分に低く、処理水拡散による希釈効果が認められなかったことや、今回ラボ内試験で検討した太陽光による不活化のように細菌とウイルスではその消長が大きく異なることが要因として考えられる。さらに、新たな糞便汚染指標として提案されているバクテロイデス属の遺伝子マーカーについても現地調査の際測定を行い、放流先水域での濃度や水環境中の安定性などを考慮すると、全バクテロイデス濃度（Total Bac）が糞便汚染指標としての性質を有していることが示された。

#### [キーワード]

衛生学的水質指標、病原ウイルス、東日本大震災、下水処理場

#### 1. はじめに

東日本大震災およびそれにともなう津波により、東北地方の太平洋沿岸に位置する下水処理場は甚大な被害を受け、長期にわたり機能不全に陥った。各下水処理場では被害状況に応じて段階的な処理の復旧あるいは全面的な処理場の再建を進めてきたが、一部の下水処理場は現在でも暫定的な処理を行っている状態である。このような状況において、復旧および再建の過程で様々な暫定的な下水処理方法が用いられた。その多くは通常の処理方法と比較して処理効率が低く、処

理水質の低下ならびに放流先水域（主に海域）の水質悪化が懸念された。そこで、宮城県内で津波により被災した浄化センターを対象に、処理復旧過程における下水処理効率および放流水質の改善状況について実態調査を行った。本課題の研究期間である平成24-25年度は処理場復旧の中期から後期にあたり、多くの処理場では研究期間中に処理が完全復旧した。そのため、処理復旧期と処理復旧後の下水処理効率および処理水質の変化を評価することに主眼を置いた。

また、現在水質汚濁に係る環境基準のうち衛生学的水質指標の見直しが進められているところであり、現行の基準で用いられている大腸菌群数の糞便汚染指標としての妥当性について評価することが求められている。大腸菌群数は長年にわたり糞便汚染指標として用いられてきたが、大腸菌群の一部は貧栄養下でも生存や増殖が可能である、大腸菌群の中には糞便に由来しない細菌が含まれる、などの問題が指摘されている<sup>1)</sup>。また、近年水系感染症の中でも病原ウイルスによる感染症抑制が重要視されているが、大腸菌群数は病原ウイルスに対する指標性が低いことも指摘されている。そこで、上記調査で得られる試料を用いて、現在糞便汚染指標として提案されている様々な微生物（細菌、ファージ）の分析を行い、病原ウイルスを含むヒトウイルス濃度との相関を分析することで、これら指標の妥当性について評価した。さらに、新しい糞便汚染評価技術として開発が進められている遺伝子マーカーを用いた水質評価手法について、その適用可能性の評価を行った。

## 2. 研究開発目的

### （1）被災下水処理場の段階的復旧に伴う処理効率および処理水質の改善状況

東日本大震災に伴う津波により被災した宮城県内の浄化センター4カ所（県南浄化センター、仙塩浄化センター、南蒲生浄化センター、石巻東部浄化センター）の処理場内および放流先水域において定期的に水試料を採取し、各種水質項目の分析を行った。得られた測定結果より、処理復旧に伴う処理水質の改善状況、各種下水処理（処理全体、二次処理、塩素処理）の効率を評価した。また、現在衛生学的水質基準の見直しが進められていることを鑑み、現行の水質指標である大腸菌群をはじめ糞便汚染指標として提案されている水質指標（細菌、ファージ）を測定し、病原ウイルスを含むヒトウイルスに対する指標性を評価した。

### （2）遺伝子マーカーを用いた水域糞便汚染源評価

現行の環境基準項目において用いられてきた大腸菌群数は、分析の簡便さと微生物汚染の代表性から、我が国の公衆衛生環境の向上に大きく貢献してきたと言える。しかしながら、水環境中における糞便に由来しない大腸菌群の存在など糞便汚染指標としての問題点が数多く指摘されてきている。ヒト病原ウイルスによる感染性胃腸炎など、比較的近年になって顕在化した感染症の制御をも念頭に置き、新規かつ合理的な糞便性汚染指標の確立による水域の微生物学的水質管理手法の確立が急務となっている。*Bacteroides*属に属する細菌は、腸内蛋白質分解細菌の最優占種であり、また株レベルで宿主特異性があるため、宿主を特定しうる糞便汚染指標として期待されている。そこで、環境水中の宿主特異的遺伝子マーカーである*Bacteroides*由来の16s rRNA遺伝子濃度を測定することで、水域の糞便汚染レベルを定量的に評価することが可能であるか検証するための実験を行った。

### (3) 遺伝子解析による大腸菌群の指標性の評価

上記の通り日本で水質に係る環境基準のうち糞便汚染の指標として用いられている大腸菌群数には様々な問題点が指摘されているが、それらが水域における大腸菌群数の測定結果にどのような影響を及ぼすかは明らかになっていない。特に糞便汚染が想定されない山間部の河川等において基準値を大きく上回る大腸菌群数が検出される<sup>2)</sup>問題について、その要因が特定されていない。そこで、ヒト糞便汚染がないと考えられる最上流部の河川水、下水および下水処理水、下流部の河川水を採取し、それぞれに存在する大腸菌以外の大腸菌群を16S rRNA遺伝子の配列を基に属レベルで分類・比較することで、それぞれの環境に存在する大腸菌群の種構成を比較した。

### (4) 太陽光による微生物不活化の評価

大腸菌群に代わる新たな糞便汚染の指標として、環境水中での生存期間が短いなどの点からより指標性の高い大腸菌や腸球菌が提案されている。より指標性の高い指標微生物を定めるためには、指標となる微生物の環境水中での挙動を把握することが必要である。温度、塩分などの環境要因による指標微生物の増減に関しては、下水処理水放流先や河川などにおいて検討されてきた。しかし、可視光のほぼ全域を含む太陽光による微生物の不活化についての実用的な知見は少ない。環境水中での指標微生物の挙動を正確に把握するためには、太陽光による病原微生物の不活化を検討することが重要であると考えられる。そこで、現在水質指標として用いられている大腸菌群、新たな水質指標として検討されている大腸菌および腸球菌、さらにウイルスの代替としてバクテリオファージMS2の4種の微生物を用いて、LEDソーラーシミュレーターを使用して擬似太陽光による微生物不活化速度を評価し、水質指標としての有用性について検討した。

## 3. 研究開発方法

### (1) 被災下水処理場の段階的復旧に伴う処理効率および処理水質の改善状況

#### 1) 浄化センターおよび放流先水域での試料採取

調査開始時に、各浄化センターの復旧状況および復旧予定について関係機関に聞き取り調査を行った。その結果をもとに決定した調査時期を表(3)-1、試料採取地点を図(3)-1から図(3)-8に示す。試料採取地点設定にあたり、複数の二次処理（例えば活性汚泥処理と簡易曝気）を併用している浄化センターでは各系列の処理効率を評価できるよう処理系列ごとに試料を採取した。

#### 2) 試料の分析および測定結果の共有

1) で採取した試料に対し、表(3)-2に示す水質項目を測定した。分析の一部（大腸菌群、大腸菌、F特異ファージ、体表面ファージ、アイチウイルス、エンテロウイルス、ノロウイルスGIおよびGII群、アデノウイルス）は東京大学グループが担当したため、試料の一部を送付した。また、南蒲生浄化センターで採取した試料の一部を京都大学グループに送付し、医薬品の分析や消毒実験等に供した。東北大学グループが担当した項目は以下の方法で分析した。

表(3)-1 各浄化センターの二次処理復旧状況と現地調査時期

年	2011												2012											
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
石巻東部	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	●	■	■	■	■			
仙塩	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	●	●	●	●			
南蒲生	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
県南	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			

年	2013											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
石巻東部	●	■	■	■	■	●	■	■	■	●	■	■
仙塩	●	●	■	■	■	●	■	■	■	●	■	■
南蒲生	●	■	■	■	■	●	■	●	■	●	■	●
県南	●	■	■	■	■	●	■	■	■	●	■	■

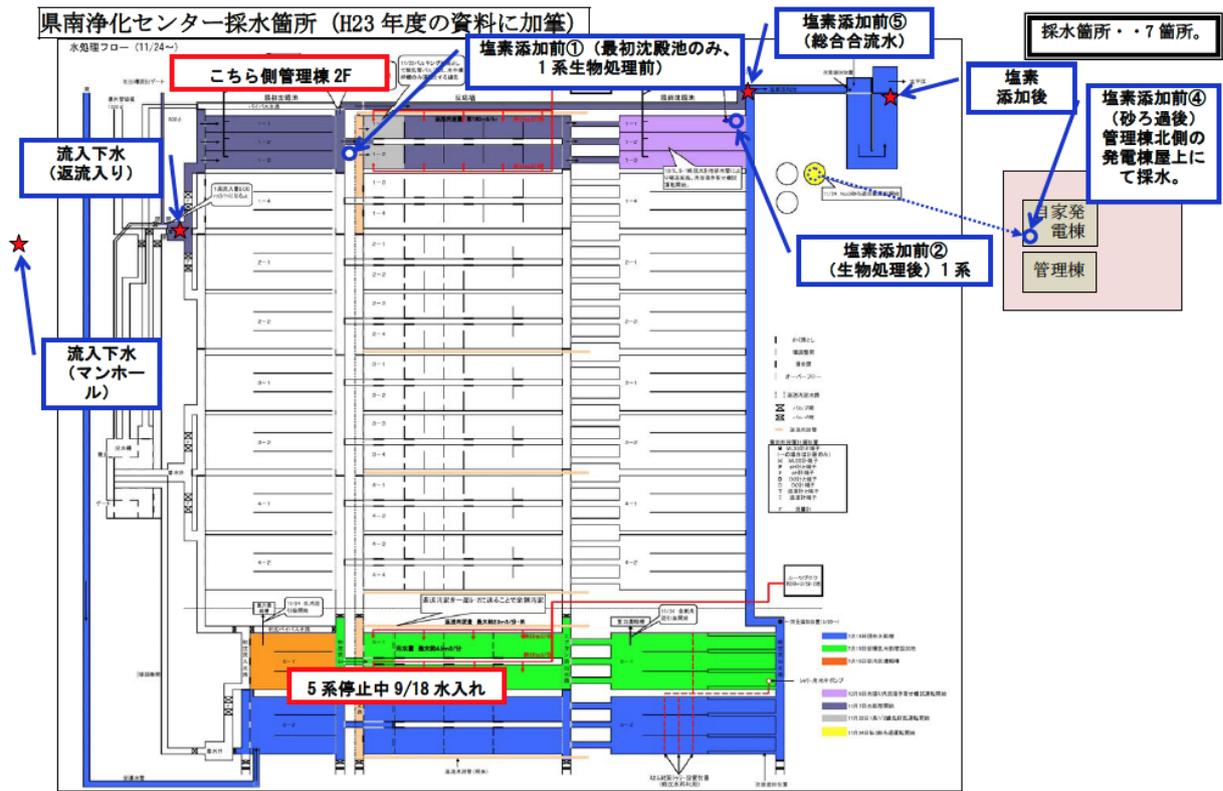
■：沈殿のみ、■：簡易生物処理、■：生物処理と簡易生物処理の混合、■：中級処理、■：復旧

表(3)-2 測定した項目

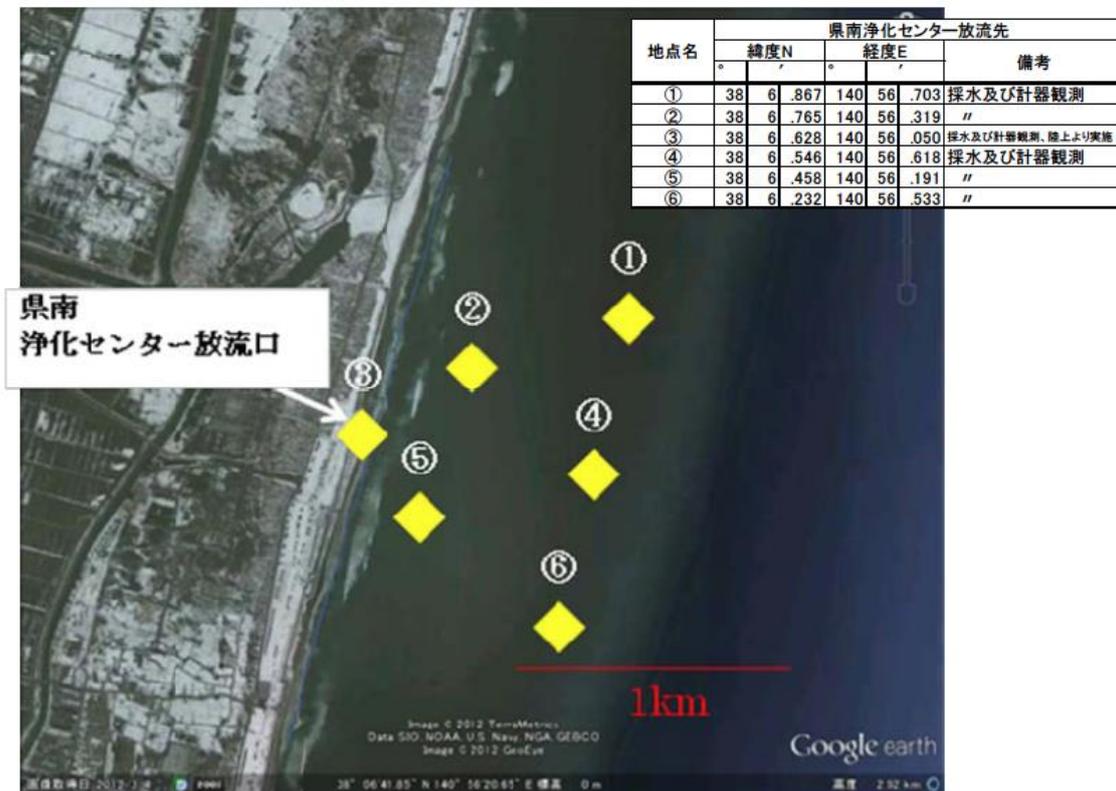
分類	測定項目
基礎項目	水深、水温、外観、臭気、色、透明度、透視度、塩分、電気伝導度、溶存酸素濃度、pH、酸化還元電位、全塩素、遊離塩素、結合塩素、濁度、SS
化学指標	BOD、COD、E <sub>260</sub> 、TOC、DOC、T-N、NO <sub>2</sub> -N、NO <sub>3</sub> -N、NH <sub>4</sub> -N、T-P、PO <sub>4</sub> -P
細菌、ファージ（培養法）	大腸菌群*、大腸菌*、腸球菌、F特異ファージ*、体表面ファージ*
ヒトウイルス（定量PCR法）	アイチウイルス*、エンテロウイルス*、ノロウイルスGIおよびGII群*、アデノウイルス*

\*：東京大学グループが分析を担当した項目

- 水温：携帯型水質計（WM-32EP、東亜DKK）にて試料採取時に測定した。
- pH：携帯型水質計（WM-32EP、東亜DKK）にて試料採取時に測定した。
- 電気伝導度：携帯型水質計（WM-32EP、東亜DKK）にて試料採取時に測定した。
- 塩分：携帯型水質計（WM-32EP、東亜DKK）にて試料採取時に測定した。
- DO：携帯型水質計（pro20、YSI）にて試料採取時に測定した。
- 酸化還元電位（ORP）：携帯型水質計（HM31P、東亜DKK）にて試料採取時に測定した。
- 遊離塩素：携帯型水質計（C201またはC301、Eutech）にて試料採取時に測定した。
- 全塩素：携帯型水質計（C201またはC301、Eutech）にて試料採取時に測定した。
- 生物化学的酸素要求量（BOD）：JIS K 0102 (2013) 21に従って測定した。
- 化学的酸素要求量（COD<sub>Mn</sub>）：JIS K 0102 (2013) 17に従って測定した。
- 懸濁物質（SS）：昭和46年環境庁告示第59号付表9（ガラス繊維ろ過法）に従って測定した。
- 濁度：JIS K 0101 (1998) 9.4（積分球式電光度法）に従って測定した。
- E<sub>254</sub>：上水試験方法 2011 II-3 21.2（吸光光度法）に従って測定した。



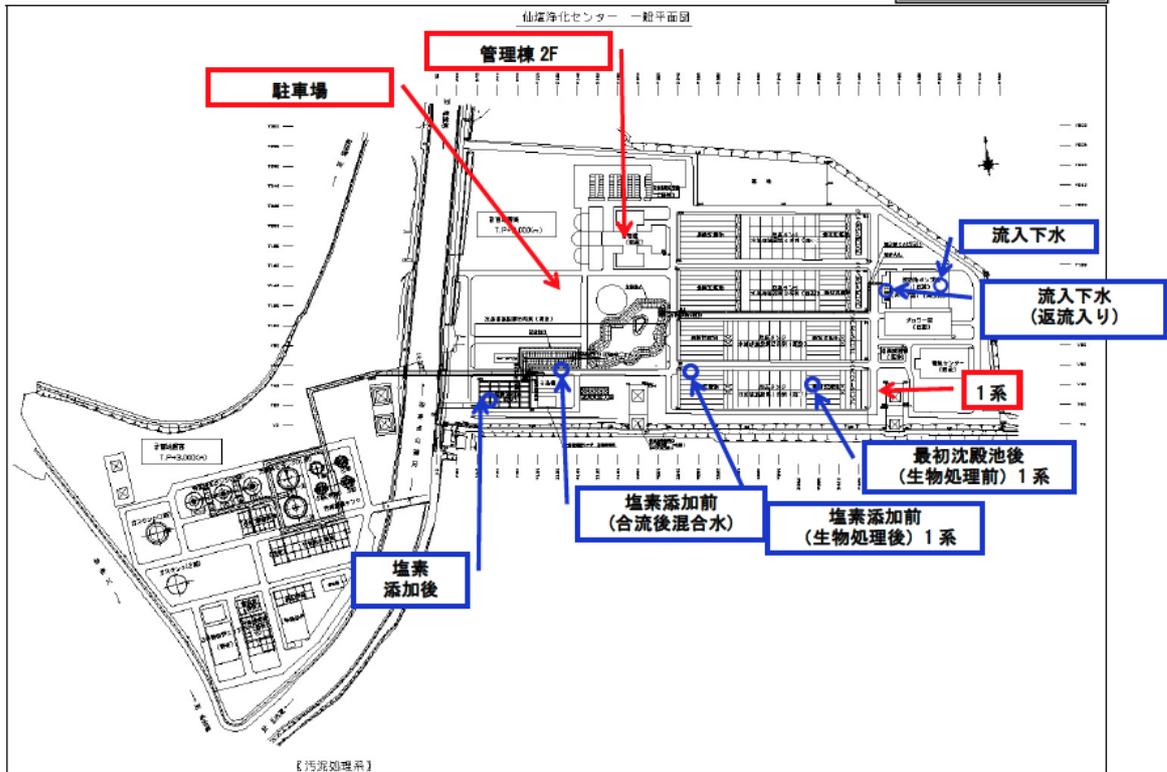
図(3)-1 県南浄化センター内採水地点



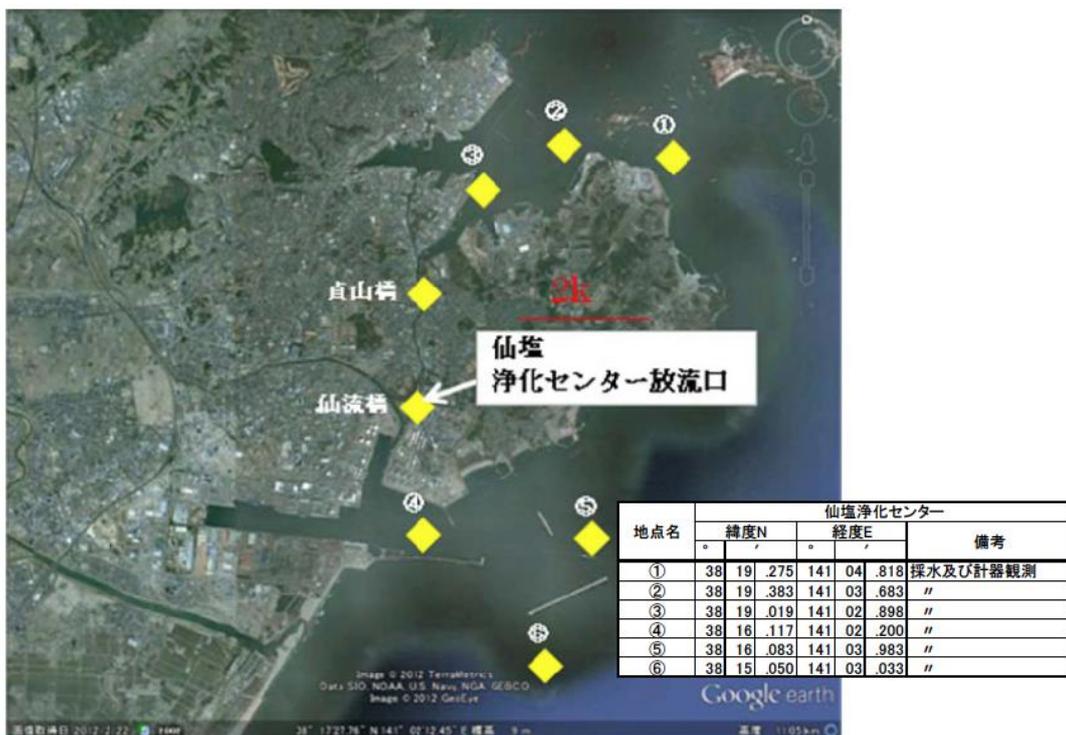
図(3)-2 県南浄化センター放流先採水地点

仙塩浄化センター採水箇所 (H23年度の資料に加筆)

採水箇所・・6箇所。



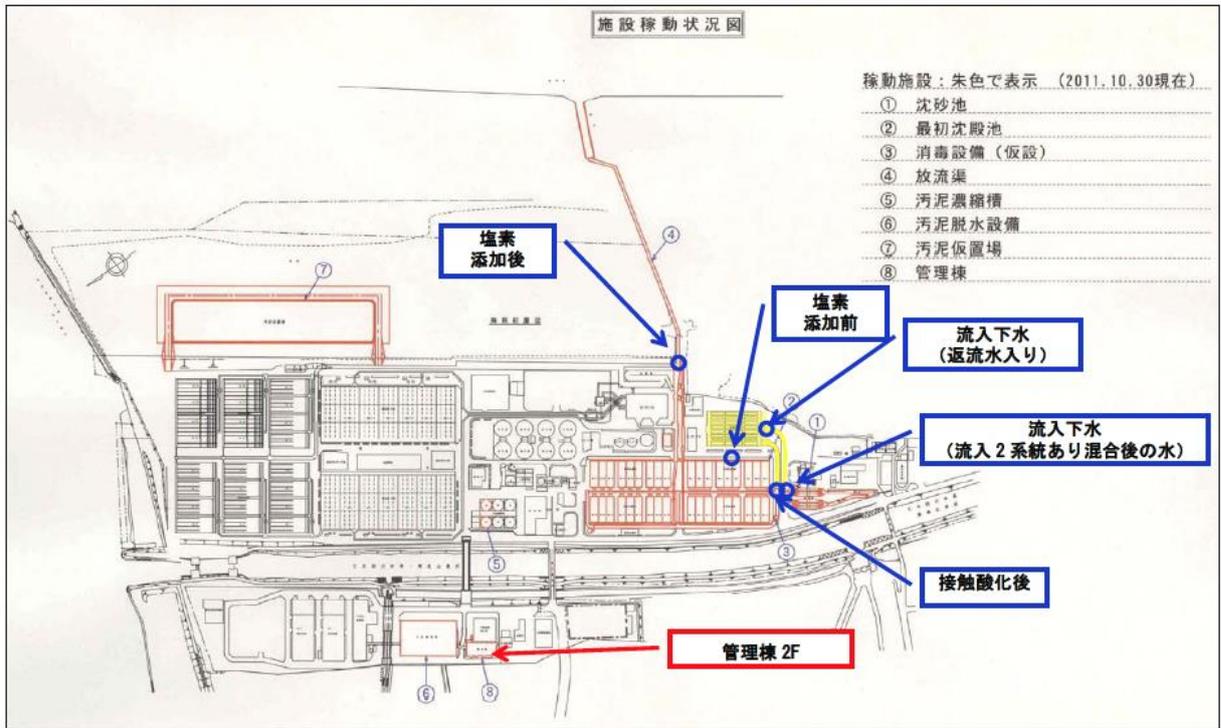
図(3)-3 仙塩浄化センター内採水地点



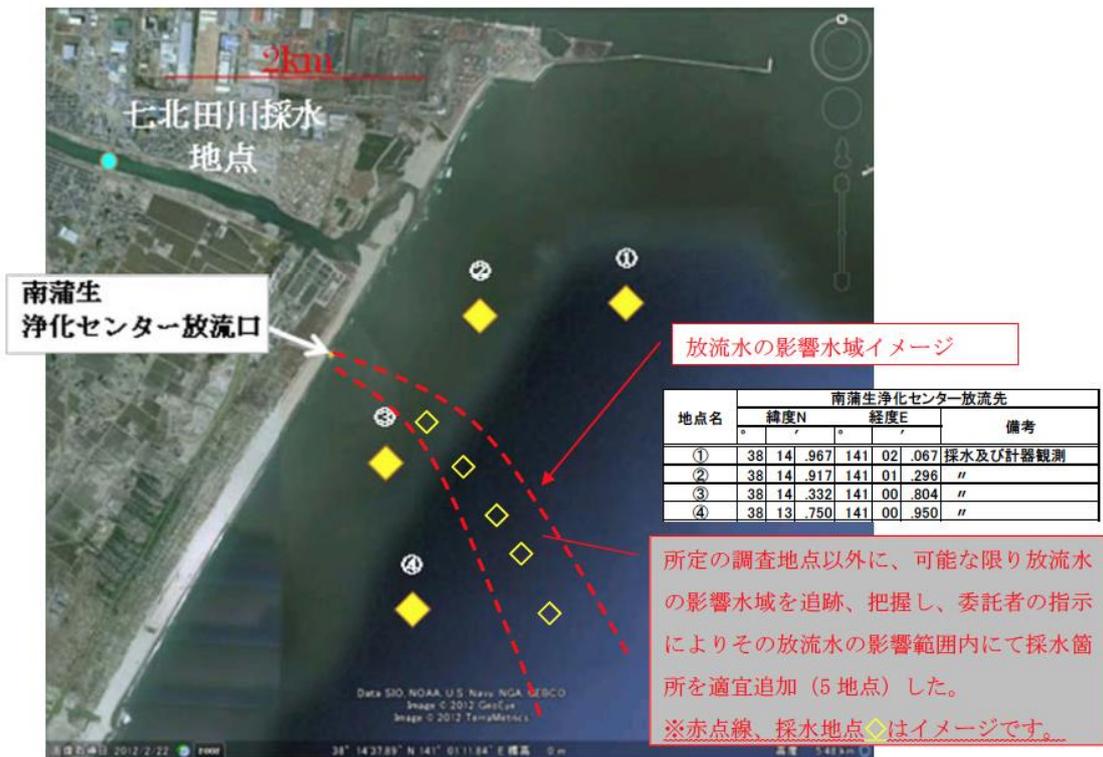
図(3)-4 仙塩浄化センター放流先採水地点

南蒲生浄化センター採水箇所 (H23年度の資料に加筆)

採水箇所・5箇所。



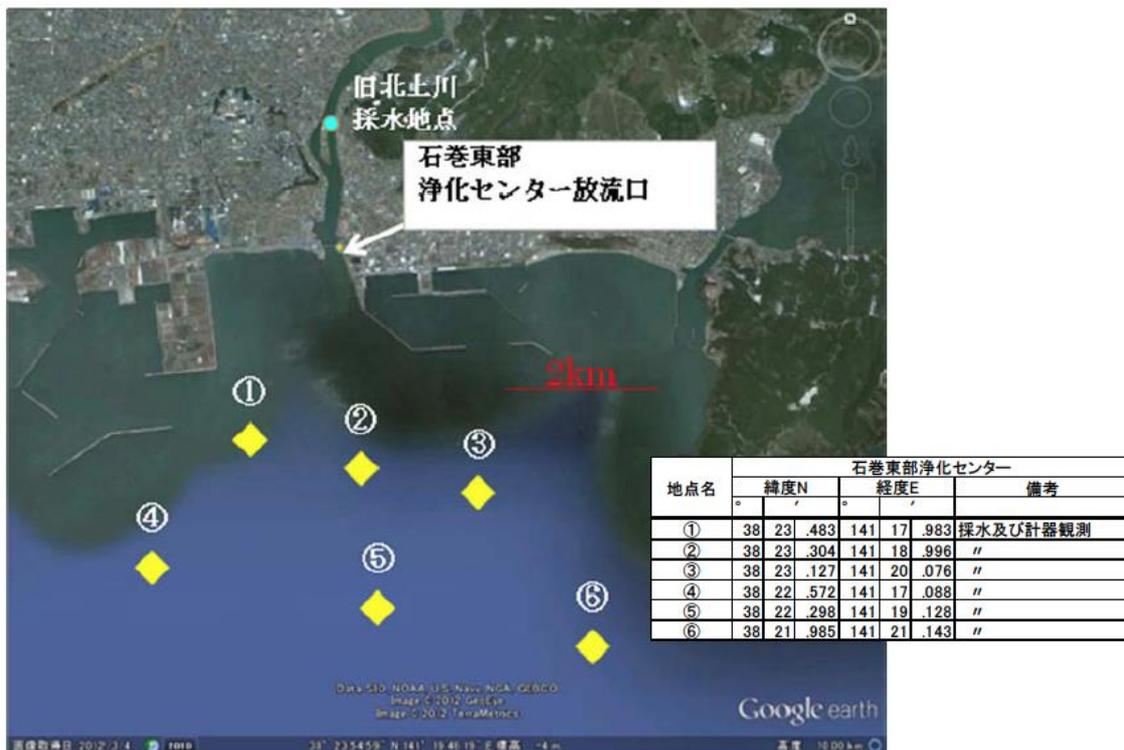
図(3)-5 南蒲生浄化センター内採水地点



図(3)-6 南蒲生浄化センター放流先採水地点



図(3)-7 石巻東部浄化センター内の採水地点



図(3)-8 石巻東部浄化センター放流先採水地点

- 全有機炭素（TOC）：TOC-L（島津製作所）を用いて測定した。
- 溶存態有機炭素（DOC）：ガラス繊維ろ紙で試料を濾過したのちTOC-L（島津製作所）を用いて測定した。
- 全窒素（T-N）：TRAACS800（テクニコン）を用いて測定した。
- 硝酸態窒素（NO<sub>3</sub>-N）：QuAAtro 2-HR（ビーエルテック）を用いて測定した。
- 亜硝酸態窒素（NO<sub>2</sub>-N）：QuAAtro 2-HR（ビーエルテック）を用いて測定した。
- アンモニア態窒素（NH<sub>4</sub>-N）QuAAtro 2-HR（ビーエルテック）を用いて測定した。
- 全リン（T-P）：TRAACS800（テクニコン）を用いて測定した。
- リン酸態リン（PO<sub>4</sub>-P）：QuAAtro 2-HR（ビーエルテック）を用いて測定した。
- 腸球菌：M-エンテロコッカス寒天培地（BD）を用いたメンブレンフィルター法で測定した。

### 3) データ解析

測定結果は全グループで共有し、放流先水域での微生物濃度の時空間的解析（サブテーマ2）等各グループが行う解析に用いた。サブテーマ3では下記の解析を行った。

#### a. 下水処理の復旧に伴う下水処理効率の改善状況

下水処理の復旧過程では様々な処理方法が用いられてきた。また二次処理が不十分であった時期には、衛生的な水質を担保するため塩素消毒の強化が行われた。これらの影響を評価するため、処理方法ごとに水質項目の除去率を算出し、処理復旧に伴う処理効率の改善状況を評価した。特に、下水処理による病原微生物や指標微生物の活性への影響を評価するため、塩素処理の効果について別個に評価した。

#### b. 指標微生物の病原微生物に対する指標性の評価

指標微生物（大腸菌群、大腸菌、腸球菌、体表面ファージ、F特異ファージ）の病原ウイルスに対する指標性を評価するため、得られた測定結果を用いて相関分析を行った。分析に際し、処理場内試料の測定値と放流先水域試料の測定値をわけることで、下水処理効率についての指標性と環境水（主に海水）中の消長に対する指標性を個別に評価した。

### （2）遺伝子マーカーを用いた水域糞便汚染源評価

宮城県内の下水処理場からの下水処理水を受容する海域4地点において試料水（1地点あたり10L）を計4回採取し、冷蔵で北海道大学まで郵送した。試料水中からの*Bacteroides*菌体回収・濃縮操作はKobayashi *et al.*<sup>3)</sup>に従った。試料水5Lにプロセスコントロール（ $\Delta$ lac::kan *E. coli*）懸濁液を添加し（残りの試料水5Lは4°Cで保存）、口径0.22 $\mu$ mのpolyethersulfone（PES）膜（Millipore）でろ過を行った。膜をPBS+0.1%ゼラチンバッファー30mL中に浸し、ボルテックスによって膜表面の沈積物をバッファー中に懸濁させた。その後、懸濁液に対し10,000xg、15分間の遠心分離を行って上清を廃棄し、沈殿物をMilliQ water 5mL中に懸濁させた。以上の操作により試料水中の*Bacteroides*菌体を回収・濃縮した。

得られた菌体懸濁液2.5 mLに対しPMA処理を行った<sup>3)</sup>。最終濃度が100 $\mu$ MとなるようにPMAを懸

濁液に添加し、5分間暗所で静置後、氷上でハロゲンランプ照射を10分間行った。PMA処理前後の懸濁液について、PowerSoil DNA Isolation Kit (MOBIO) を用いてTotal DNAを抽出し、定量PCRにより遺伝子マーカー濃度を測定した。遺伝子マーカーとしてはTotal *Bacteroides* 及び Human-specific *Bacteroides* 16s rRNA遺伝子に由来するマーカーを用いた。定量PCRは1サンプル当たり2ウェルで行った。PMA未処理サンプルについては、プロセスコントロール ( $\Delta lac::kan$  *E. coli*) 由来遺伝子量も同時に定量し、その回収率を算出した。

### (3) 遺伝子解析による大腸菌群の指標性の評価

2012、2013年の4月(河川水)または5月(下水、下水処理水)に、宮城県を流れる広瀬川の最上流(St. 1)および下流(St. 2)の河川水と、流域にある広瀬川浄化センターの流入下水および処理水(処理水は2013年のみ)を採取した。各試料水より、クロモカルトコリフォームES寒天培地(Merck-Millipore)を用いたメンブレンフィルター法により生成した大腸菌以外の大腸菌群(赤色のコロニー)を計227株単離した。単離株よりDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子のV4領域を対象としたPCR(519F-907R)に供した。得たPCR産物の塩基配列を解析し、BLASTn検索結果を基にしたクラスター分析により株のグループ化を行い、試料採取地点と照合することで、各地点に存在する大腸菌以外の大腸菌群の種構成を比較した。

なお、広瀬川浄化センターの試料はヒト糞便由来の大腸菌群の種構成を評価するために用いており、同センターからの処理水放流による広瀬川の微生物学的水質への影響はないことを確認している。

### (4) 太陽光による微生物不活化の評価

実験に使用する細菌およびバクテリオファージとして、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターより分与された *Escherichia coli*(NBRC No. 102203)、*Enterococcus faecalis* (NBRC No. 100480)、*Escherichia coli* phage MS2 (NBRC No. 102169) の3種を用いた。大腸菌群は仙塩浄化センターで採取した塩素添加前の二次処理水中の大腸菌群をクロモカルトコリフォームES寒天培地(Merck-Millipore)で培養して用いた。

微生物を添加した48ウェルプレートを緩やかに攪拌しながらLEDソーラーシュミレーター(WSLED 100SC、ワコム電創)を用いて可視光の照射を行った。照射した波長域は350~1100nmで、照射強度は太陽光と同じ波長スペクトルになるように設定した。実験中の溶液温度は23°Cで一定となるようにした。

照射開始後0、1、2、4、6時間後の試料を回収し、各微生物濃度を測定した。*Escherichia coli* と下水由来の大腸菌群はクロモカルトコリフォーム寒天培地(Merck-Millipore)、*Enterococcus faecalis* はM-エンテロコッカス寒天培地(BD)を用いたメンブレンフィルター法で濃度を測定した。MS2はBacto Tryptic Soy Agar(BD)を用いた二重寒天培地法で測定した。各実験条件で3つの試料を用い、測定値の幾何平均値を測定結果とした。

## 4. 結果及び考察

### (1) 被災下水処理場の段階的復旧に伴う処理効率および処理水質の改善状況

震災後の各浄化センターの二次処理復旧状況および調査を行った時期は表(3)-1に示した通りで

ある。震災直後は全ての浄化センターで簡易処理として沈殿のみを行っていた。復旧の速度は処理場の被害状況により異なるが、段階的に簡易生物処理（簡易曝気）、部分的生物処理、生物処理の順に移行した。南蒲生浄化センターは処理施設を新たに建設する予定であり、建設中は中級処理である接触酸化法を用いていた。石巻東部浄化センターでは、生物処理槽が一部復旧した時点で簡易生物処理（簡易曝気）を終了し、すべての生物処理槽が復旧するまでの間は過負荷の（HRTが短い）状態で生物処理を行っていた。

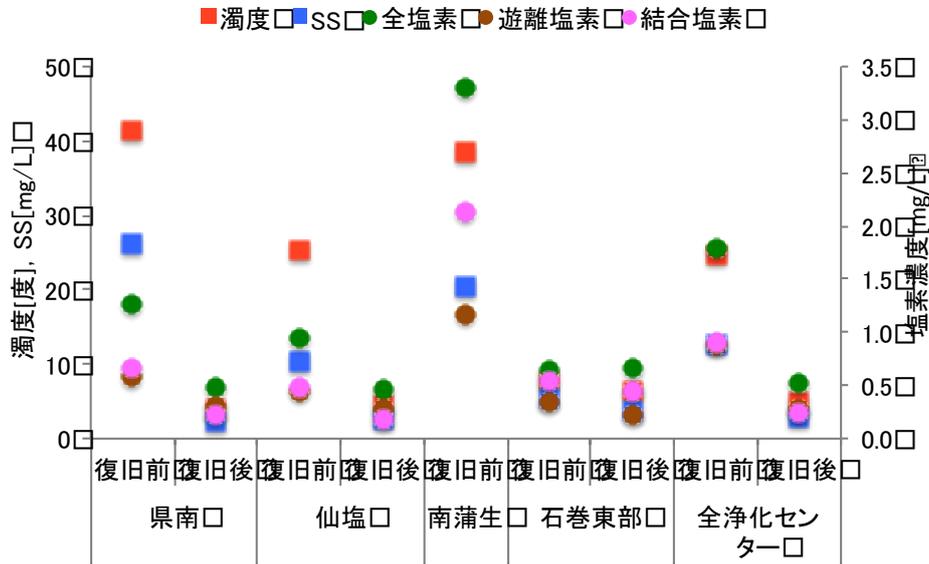
本課題で調査を行ったのは平成24年9月から平成25年12月までであった。調査開始時は石巻東部浄化センターでは過負荷の生物処理、仙塩浄化センターと県南浄化センターでは生物処理と簡易生物処理の混合、南蒲生浄化センターでは接触酸化法により下水を処理していたが、平成24年末までに南蒲生浄化センターを除き震災前の処理（生物処理）に復旧した。

### 1) 被災浄化センターの放流水質

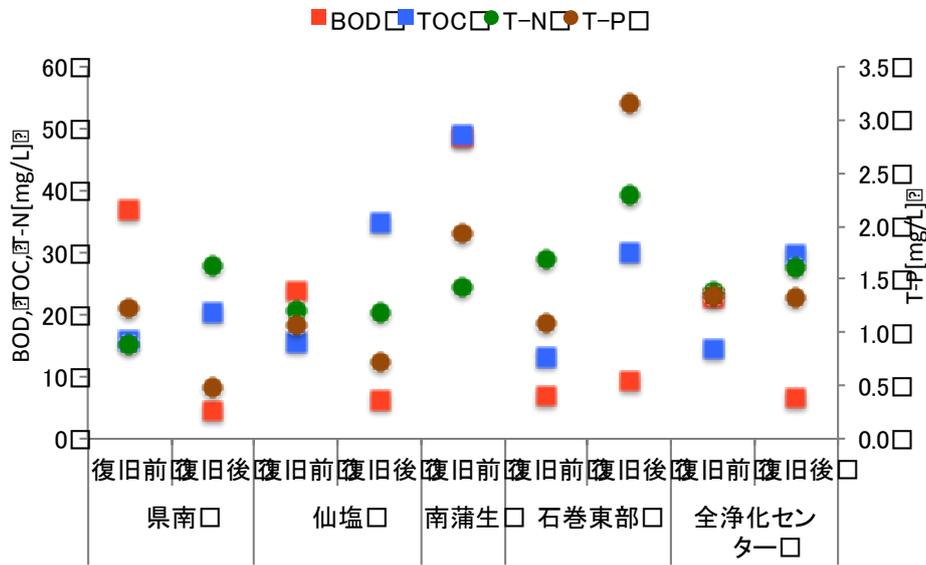
各浄化センターの放流水の濁度、SS、塩素（全塩素、遊離塩素、結合塩素）濃度（算術平均値）を図(3)-9に示す。県南浄化センターと仙塩浄化センターでは、2012年末の処理復旧後これら5項目の濃度が低下した。濁度およびSS濃度の低下は復旧にともない処理効率が向上したことを示している。塩素濃度が低下したのは、下水処理の復旧にともない二次処理水の水質が改善し、塩素添加量を削減できたためと考えられる。石巻東部浄化センターでは復旧前の2012年9月および11月には過負荷での生物処理を行っていたが、復旧前後で処理水質が大きく変化せず調査期間を通して良好（県南浄化センター、仙塩浄化センターの復旧後の濃度と同程度）であったことより、同浄化センターで行われていた過負荷の活性汚泥処理の処理効率が良好であったことがわかる。また塩素濃度も同様に濃度の変化は見られなかった。南蒲生浄化センターについては、期間を通して接触酸化法を用いていたこともあり、処理水の濁度やSS、および処理水中の塩素濃度ともに高い状態であった。

各浄化センターの放流水のBOD、TOC、全窒素（T-N）、全リン（T-P）濃度（算術平均値）を図(3)-10に示す。BODについては、濁度やSSと同様に県南浄化センターおよび仙塩浄化センターでは処理復旧と共に濃度が低下し、石巻東部浄化センターでは期間を通して良好な水質であった。南蒲生浄化センターの平均BOD濃度は目標水質である60mg/Lを下回った。TOC濃度はBODと異なり、3浄化センターとも処理復旧後の濃度が復旧前を上回った。この要因については今回の調査ではわからなかったが、測定値のばらつきが非常に大きく、下水処理水の水質管理には不向きな指標である可能性がある。県南浄化センターと仙塩浄化センターでは復旧に伴い全リン濃度が低下したが、石巻東部浄化センターでは濃度の変化はなかった。これは、前者が嫌気好気法によりリンの除去を促進しているのに対し、後者で採用されている純酸素曝気活性汚泥法はリンの除去効率が低いことによると考えられる。全窒素濃度は全ての浄化センターで復旧前後の変化は見られなかった。

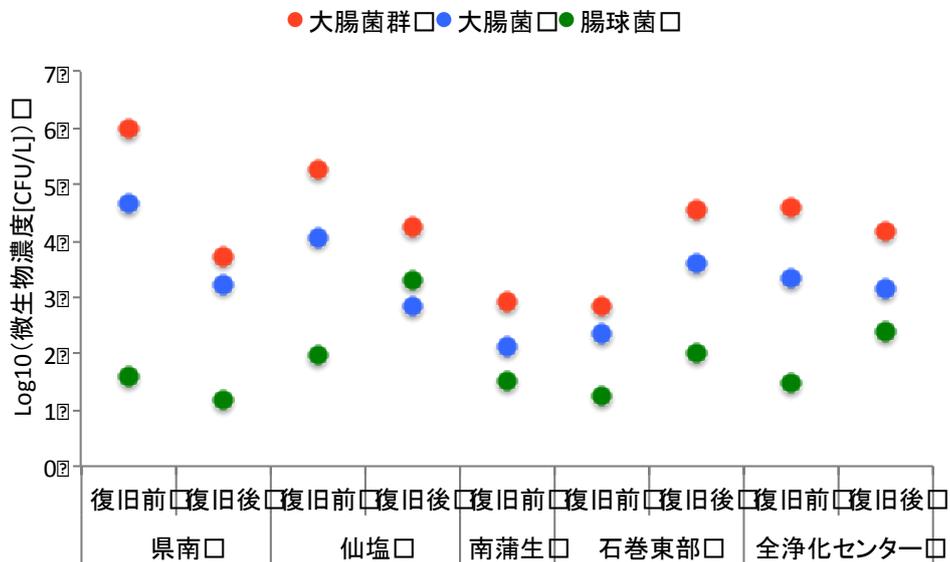
各浄化センターの放流水の指標細菌（大腸菌群、大腸菌、腸球菌）濃度を図(3)-11に示す。指標細菌濃度の処理前後の変化には一貫した傾向が見られなかった。県南浄化センターでは復旧後の濃度の方が低かったが、石巻東部浄化センターでは復旧後の方が高く、また仙塩浄化センターでは指標により傾向が異なった。処理水中の指標細菌濃度は、二次処理効率に加えて塩素処理による不活化効果が大きい。例えば南蒲生浄化センターでは、中級処理（接触酸化法）の効率は低



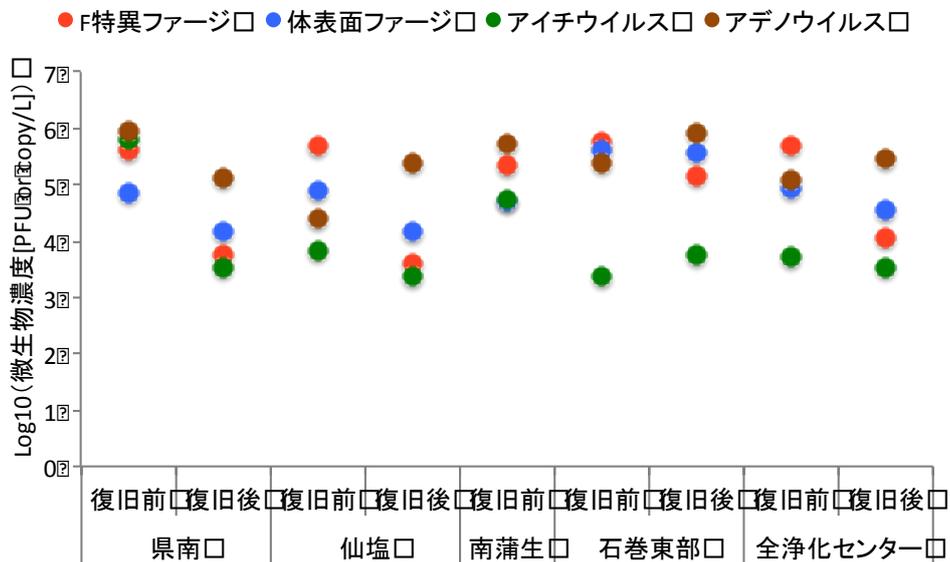
図(3)-9 放流水中の濁度、SS、塩素濃度



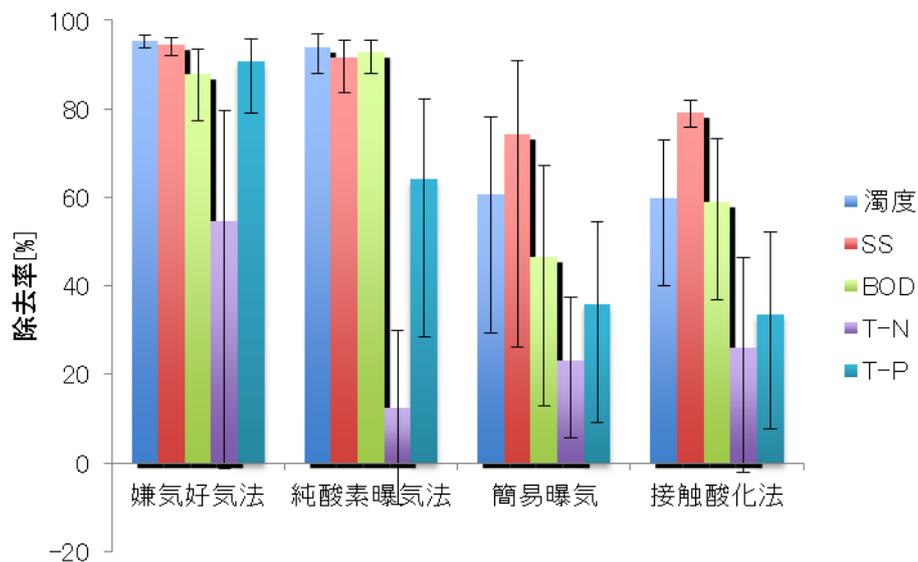
図(3)-10 放流水中の炭素、窒素、リン濃度



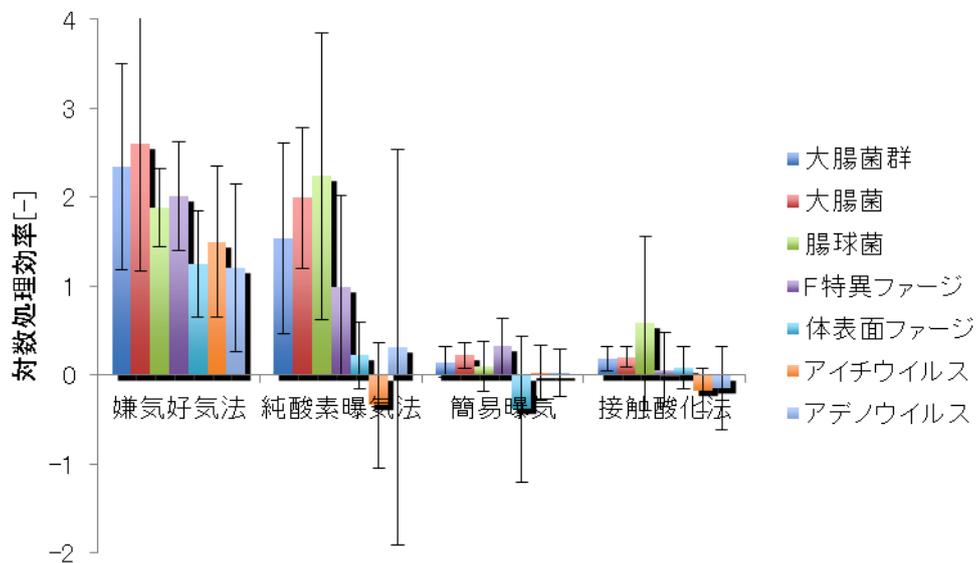
図(3)-11 放流水中の細菌濃度



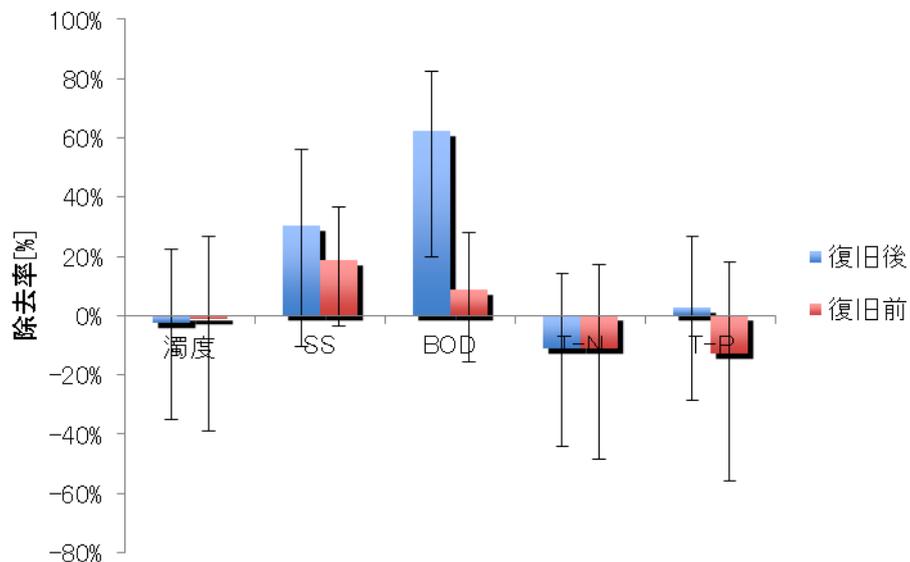
図(3)-12 放流水中のファージ、ウイルス濃度



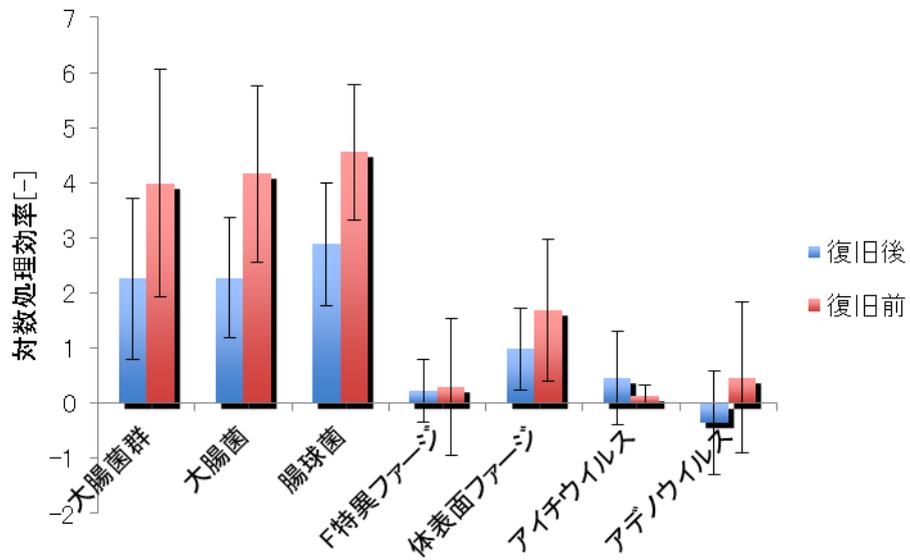
図(3)-13 二次処理による物理化学指標の除去率（エラーバーは対数標準偏差を示す）



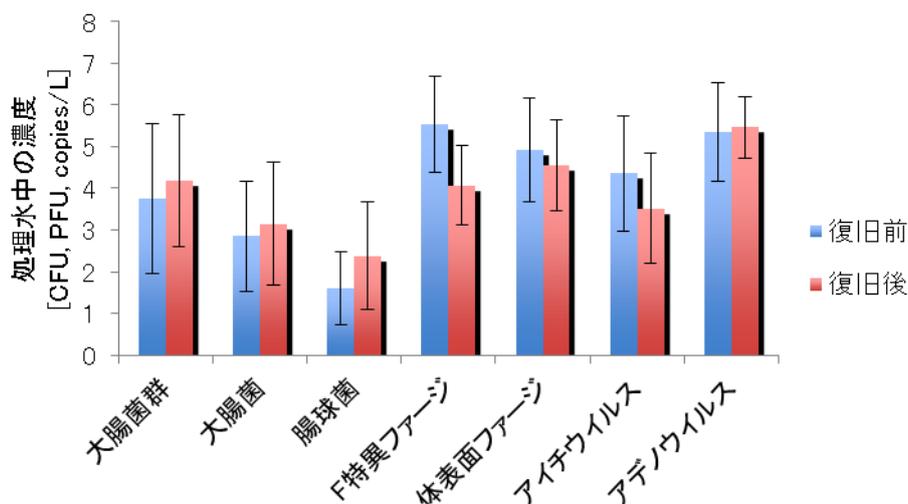
図(3)-14 二次処理による微生物指標の除去率（エラーバーは対数標準偏差を示す）



図(3)-15 塩素処理による物理化学指標の除去率（エラーバーは対数標準偏差を示す）



図(3)-16 塩素処理による微生物指標の処理効率（エラーバーは対数標準偏差を示す）



図(3)-17 下水処理水中の微生物濃度（エラーバーは対数標準偏差を示す）

いと考えられるが、処理水中の塩素濃度は他の3浄化センターの復旧前の濃度よりも高く、それにより処理水中の指標細菌濃度は復旧前の濃度としては最も低かった。

各浄化センターの放流水の大腸菌ファージ（F特異ファージ、体表面ファージ）およびヒトウイルス（アイチウイルス、アデノウイルス）の濃度を図(3)-12に示す。F特異ファージと体表面ファージの濃度は処理復旧にともない低下したが、アイチウイルスとアデノウイルスの濃度には一貫した傾向が見られなかった。微生物濃度の幾何平均値（全試料）を比較すると、細菌では大腸菌群、大腸菌、腸球菌の順で濃度が高く、ファージおよびウイルスではアデノウイルス、F特異RNAファージ、体表面ファージ、アイチウイルスの順であった。

## 2) 下水処理の復旧に伴う下水処理効率の改善状況

各種二次処理による水質項目の除去率を図(3)-13および図(3)-14に示す。復旧後に行われていた処理法（嫌気好気法、純酸素曝気法）と比較して、復旧段階で行われていた簡易曝気および接触酸化法の除去率が低かった。物理化学指標と比較して微生物指標の処理効率低下が著しく、復旧前後の処理効率には指標細菌で平均約80倍、ファージやウイルスで平均約8倍の差がみられた。

復旧前後における塩素処理による各水質項目の除去率を図(3)-15および図(3)-16に示す。仙塩浄化センターおよび県南浄化センターでは復旧段階で複数の生物処理を併用しており（表(3)-1の黄色部分）、それぞれの処理水を混合してから塩素処理を行っていたため、二次処理の種類による塩素処理効率の分類は行えなかった。その代わりに、全ての浄化センターのデータを復旧前（表(3)-1の黄色部分）と復旧後（表(3)-1の水色部分）に分類して処理効率を算出した。復旧前の石巻東部浄化センター（表(3)-1の黄色部分）と南蒲生浄化センター（同緑色部分）については、それぞれの二次処理効率を考慮し、石巻東部浄化センターのデータは復旧後、南蒲生浄化センターのデータは復旧前に含めた。復旧前後の塩素処理効率を比較すると、指標細菌（大腸菌群、大腸菌、腸球菌）の不活化率は復旧前の方がそれぞれ54倍、77倍、46倍高かった。二次処理効率の低下を補うため塩素処理を強化していたことが見て取れる。しかし、ファージの不活化率はF特異ファージで1.2倍、体表面ファージで5.1倍にしかならず、指標細菌と比較して塩素処理強化の影響は

軽微であった。ウイルスは定量PCR法で測定しているため活性は評価できないが、検出される遺伝子濃度から算出した処理効率はファージと同程度（アイチウイルス：0.47倍、アデノウイルス：6.6倍）であった。

復旧前後の下水処理水中の各種微生物濃度を図(3)-17に示す。上で述べたように、指標細菌は二次処理効率の低下を補うため塩素処理を強化した結果、復旧前の処理水中の濃度は復旧後よりも低くなっていた。しかし、ファージは塩素処理強化の効果が低く、復旧前の処理水中の濃度はF特異ファージで28倍、体表面ファージで2.3倍となっていた。F特異ファージの方が復旧前後の差が大きかったのは、図(3)-16に示すように体表面ファージと比較してF特異ファージの塩素に対する耐性が高く、塩素処理強化の効果がなかった影響がより大きく出たためと考えられる。

### 3) 指標微生物の病原微生物に対する指標性の評価

表(3)-3に測定した微生物濃度間（全試料）のSpearmanの順位相関係数を示す。セルの色の濃さは相関係数の高さを示している（色が濃いほど相関係数が高い）。同じグループ（指標細菌（大腸菌群、大腸菌、腸球菌）、ファージ（F特異ファージ、体表面ファージ）、ヒトウイルス（アイチウイルス、アデノウイルス））内の相関係数は異なるグループに属する微生物間の相関係数よりも高かった。類似した微生物は似た挙動をとっているためと考えられる。ヒトウイルスと微生物指標との相関係数を比較すると、指標細菌よりもファージとの相関係数の方が高かった。したがって、今回調査した全試料（流入下水から放流先水域まで）を対象とした場合、指標細菌よりもファージの方がヒトウイルスの指標として適していることが示された。

次に浄化センター内（流入下水から下水処理水まで）のデータのみを用いて算出したSpearmanの順位相関係数を表(3)-4に示す。グループ内の相関が高いのは全試料を対象とした場合と同様であったが、異なるグループ間の相関係数を見た場合、指標細菌とファージの相関は比較的高かったが、ヒトウイルスと指標細菌やファージとの相関係数は低く、先に見られたファージの指標微生物としての優位性は認められなかった。これは、指標細菌とファージは培養法で測定したのに対し、ヒトウイルスは定量PCR法で測定しており、塩素処理による不活化率を考慮していないためと考えられる。すなわち、指標細菌とファージは下水処理による物理的除去と塩素による不活化の双方を評価しているのに対し、ヒトウイルスは物理的除去のみを評価しているため、ヒトウイルスと他の指標との相関係数が低くなったと考えられる。これは（特にヒトウイルスの）分析法に由来するものであり、今回の結果からヒトウイルスの指標についての議論はできないといえる。

最後に、放流先水域のデータのみを用いて算出したSpearmanの順位相関係数を表(3)-5に示す。グループ内の相関が高いのは全試料を対象とした場合と同様であった。異なるグループ間の相関係数を見た場合、浄化センター内のデータを用いた場合と異なり指標細菌とファージやヒトウイルスとの間の相関は非常に低く、ファージとヒトウイルスとの間の相関係数が比較的高かった。この要因として、下水処理水中の指標細菌の濃度が低く、放流先水域では濃度がほぼ一定であったのに対し、ファージやヒトウイルスは放流口から離れるにつれて濃度が低下する傾向があったことが挙げられる。ファージやヒトウイルスは宿主である大腸菌やヒト細胞を多く含む下水が主な起源であるのに対し、指標細菌はヒト以外の動物の糞便や、糞便に由来しないものも含まれるため、ヒトウイルスとは全く異なる挙動をとっていると考えられる。

表(3)-3 微生物濃度間のSpearmanの順位相関係数（全データ）  
 （太枠内は同じグループ（指標細菌、ファージ、ウイルス）内の相関を示す。）

	大腸菌群	大腸菌	腸球菌	F特異 ファージ	体表面 ファージ	アイチ ウイルス	アデノ ウイルス
大腸菌群		0.920	0.826	0.682	0.721	0.394	0.508
大腸菌			0.808	0.647	0.703	0.418	0.513
腸球菌				0.711	0.730	0.517	0.494
F特異ファージ					0.889	0.646	0.713
体表面ファージ						0.659	0.728
アイチウイルス							0.660
陽性率	0.81	0.67	0.89	0.61	0.84	0.60	0.78

表(3)-4 微生物濃度間のSpearmanの順位相関係数（処理場内データ）  
 （太枠内は同じグループ（指標細菌、ファージ、ウイルス）内の相関を示す。）

	大腸菌群	大腸菌	腸球菌	F特異 ファージ	体表面 ファージ	アイチ ウイルス	アデノ ウイルス
大腸菌群		0.893	0.710	0.624	0.743	0.018	0.218
大腸菌			0.750	0.627	0.777	0.114	0.268
腸球菌				0.522	0.680	0.301	0.238
F特異ファージ					0.666	0.142	0.296
体表面ファージ						0.016	0.174
アイチウイルス							0.365
陽性率	0.95	0.87	0.97	0.95	0.98	0.79	0.95

表(3)-5 微生物濃度間のSpearmanの順位相関係数（放流先データ）  
 （太枠内は同じグループ（指標細菌、ファージ、ウイルス）内の相関を示す。）

	大腸菌群	大腸菌	腸球菌	F特異 ファージ	体表面 ファージ	アイチ ウイルス	アデノ ウイルス
大腸菌群		0.748	0.505	-0.048	0.045	-0.239	-0.123
大腸菌			0.389	-0.166	-0.029	-0.233	-0.124
腸球菌				0.218	0.164	0.037	-0.138
F特異ファージ					0.561	0.318	0.281
体表面ファージ						0.441	0.483
アイチウイルス							0.491
陽性率	0.70	0.52	0.83	0.36	0.74	0.46	0.66

## (2) 遺伝子マーカーを用いた水域糞便汚染源評価

### 1) サンプルプロセスコントロールの回収率

PMA処理を行わなかった場合におけるサンプルプロセスコントロールの回収率を表(3)-6に示した。PMA処理を行っていない場合、特にSt.1のサンプルにおいて回収率が大きく変動した。10%以下の著しく低い回収率が得られた場合には、菌体の回収・濃縮、遺伝子抽出及び遺伝子定量のプロセスで何らかの障害が生じていたと判断できる。St.1の始めの2回の調査（2013年6月10日と8月7日）に得られた遺伝子マーカー定量値の値に関しては、正確性に欠ける可能性があることに留意する必要がある。その他のサンプルに関しては、サンプルプロセスコントロール回収率が16.9%から111.3%の間に分散しているものの、障害が生じていない通常操作時に得られるレベルの回収率であり、大きな障害等は生じていなかったと言える。

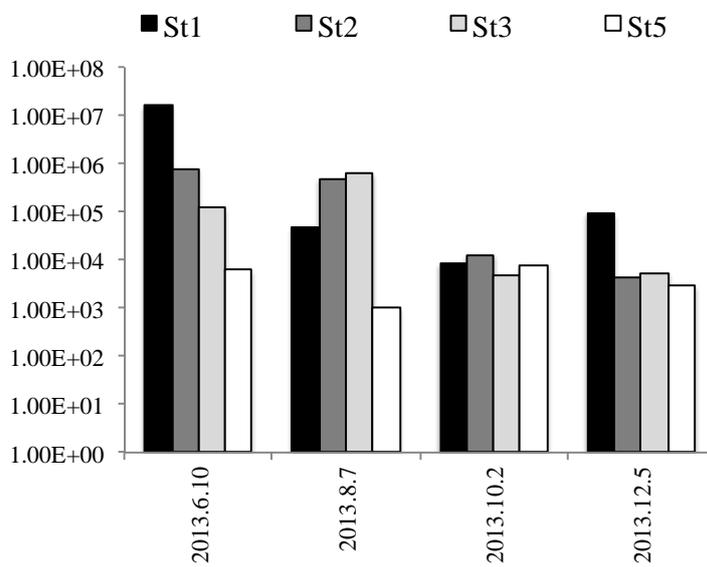
表(3)-7にPMA処理を行った場合のサンプルプロセスコントロール回収率を示した。2回目の調査（2013年8月7日）において、全てのサンプルに関して10%以下の低い回収率を得た。同じサンプルをPMA処理しなかった場合には、St. 2、3及び5において障害が見られなかったことから（表(3)-6）、PMA処理時の回収率低下はPMA処理操作による影響と考えられる。2回目の調査におけるPMA処理時の遺伝子マーカー定量値に関しては、正確性に欠ける可能性があることに留意する必要がある。1回目の調査におけるSt. 1、3及び5も同様である。

表(3)-6プロセスコントロール株回収率（PMA処理無し）

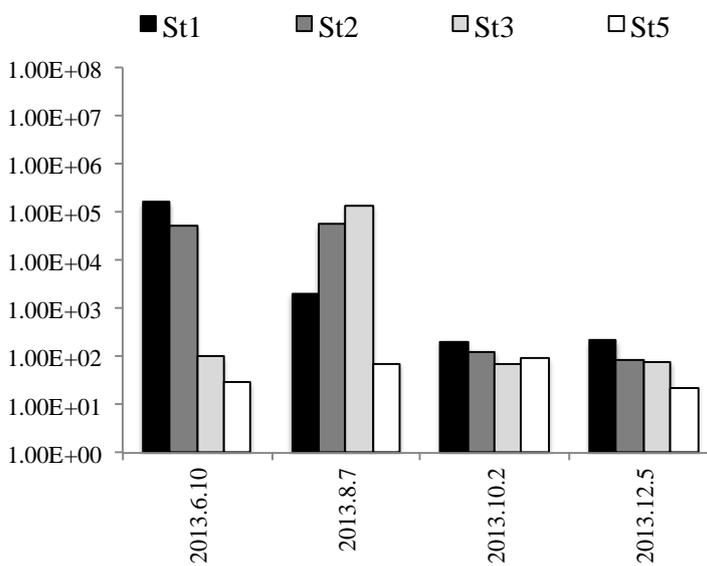
	2013.6.10	2013.8.7	2013.10.2	2013.12.5	Average <sup>a</sup>	SD
St1	3.7	4.9	76.1	— <sup>a</sup>	28.2	41.5
St2	36.2	43.2	96.6	—	58.7	33.0
St3	24.5	42.6	82.0	—	49.7	29.4
St5	16.9	28.9	111.3	—	52.3	51.4
a, プロセスコントロール添加せず					47.2	35.9

表(3)-7プロセスコントロール株回収率（PMA処理有り）

	2013.6.10	2013.8.7	2013.10.2	2013.12.5	Average <sup>a</sup>	SD
St1	1.7	0.8	66.3	— <sup>a</sup>	22.9	37.6
St2	13.7	1.2	84.3	—	33.1	44.8
St3	6.8	1.4	79.7	—	29.3	43.7
St5	6.3	0.7	83.6	—	30.2	46.4
a, プロセスコントロール添加せず					28.0	37.1

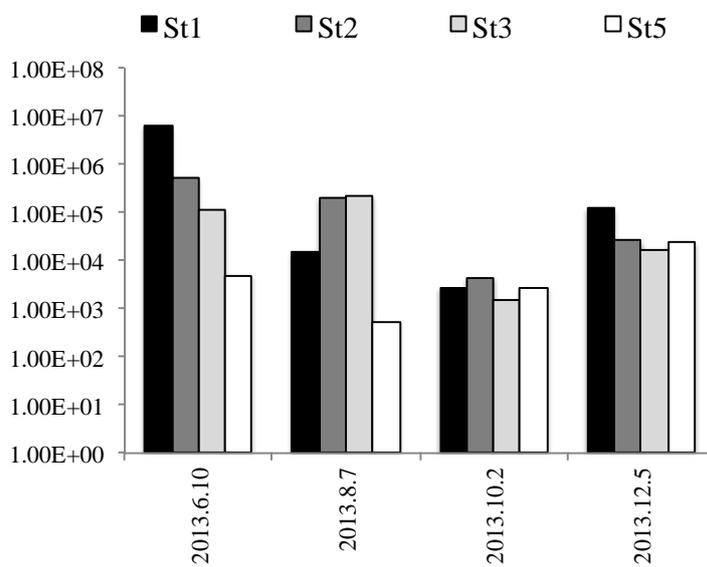


(a)

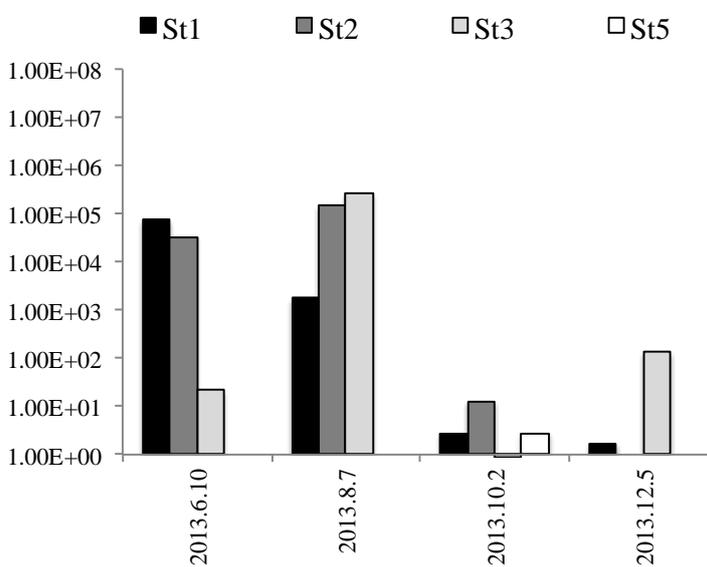


(b)

図(3)-18 Total Bac定量結果。(a) PMA処理なし、(b) PMA処理有り。

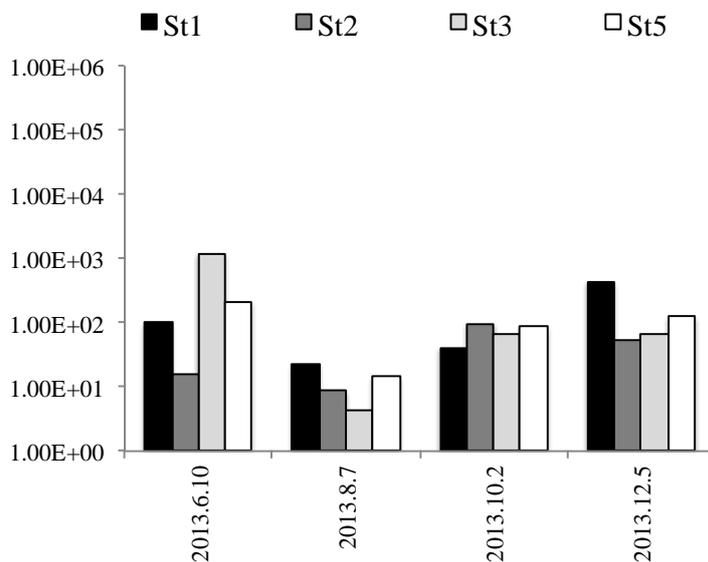


(a)

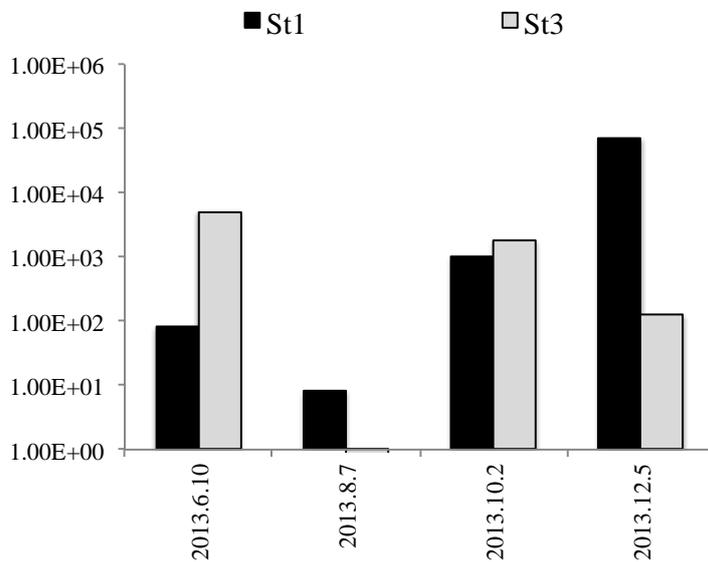


(b)

図(3)-19 Human Bac定量結果。A) PMA処理なし、B) PMA処理あり。



(a)



(b)

図(3)-20 PMA処理無し定量値に対するPMA処理有り定量値の比。

A) Total Bac、B) Human Bac。

## 2) Total Bac定量結果

PMA処理を行わなかった場合(a)及び行った場合(b)のTotal Bac定量結果を図(3)-18に示した。4回の調査を通じて定量下限値以下となることはなく、また放流口に近いサンプリング地点ほど比較的高い濃度が得られた。放流口から離れるほどTotal Bac定量値が低下する傾向は、第1回目のサンプリング日(2013年6月10日)において最も明瞭であった。糞便汚染に関連し、かつ高濃度で存在しているTotal Bacは、糞便汚染指標としての必要条件を有していると言える。

## 3) Human Bac定量結果

図(3)-19には、PMA処理を行わなかった場合及び行った場合のHuman Bac定量結果を示した。PMA処理を行わなかった場合においては、全ての分析で定量値が得られたが、PMA処理を行うことで定量値が減少し、St. 5では4回の分析中3回で陰性となった。PMA処理による遺伝子定量値の低下はTotal Bacと比較してHuman Bacの方が顕著であったことから、相対的にHuman Bacの方がTotal Bacよりも調査対象水域における安定性が低いと言える。

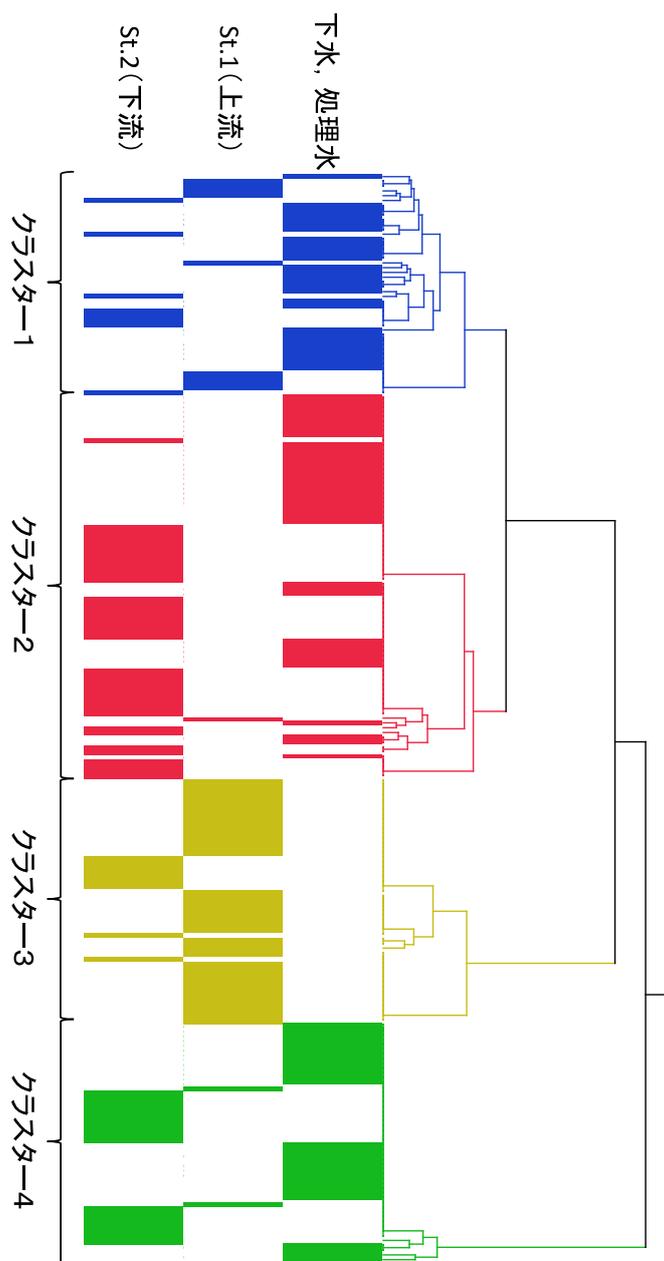
## 4) PMA処理無し定量値に対するPMA処理有り定量値の比

図(3)-20にはPMA処理無し定量値に対するPMA処理有り定量値の比を示した。Total Bacの場合、比の平均値は2.00、標準偏差は0.63であった。Human Bacの場合、St. 2とSt. 5においてPMA処理有り非検出サンプルが存在したため、比はSt. 1及びSt. 5のみ算出した。その結果、比の平均値が2.46、標準偏差は1.57であり、Total Bacと比べてHuman Bacの方が平均値は高く、値のばらつきが大きかった。比の平均値の違いから、Human Bacの方がTotal Bacと比べて調査対象水域における安定性が低いと言える。従って、PMA処理有りHuman Bacの定量値は比較的最近の糞便汚染を表す指標として利用可能である可能性があるが、実際に適用する場合には定量値のばらつきがどのような状況で生じるのかについて明らかにしておく必要があると言える。

### (3) 遺伝子解析による大腸菌群の指標性の評価

単離した大腸菌群株の16S遺伝子の塩基配列に対してBLASTn検索を行ったところ、全ての株が腸内細菌科に属した。しかしほとんどの株において複数の属の配列が同じスコアでヒットしたため、各株を属レベルで同定することはできなかった。クラスター分析の結果(図(3)-21)、下水および下水処理水由来の株が属するクラスターが2つ(クラスター2および4)、広瀬川上流部由来の株が属するクラスターが1つ(クラスター3)形成され、広瀬川下流部では双方が混在していた。したがって、糞便由来の大腸菌群と非糞便由来の大腸菌群は種構成が全く異なっていることが示された。上流部で得た単離株が属するクラスターには魚類やネズミといった野生動物にみられる種に加え、ヒト病原細菌を含む*Yersinia*属や*Serratia*属がヒットした(表(3)-8)が、下水に見られたヒト糞便由来の細菌がほとんど存在しなかったことから、これらの株は野生動物由来であると考えられる。

本調査により、ヒト糞便に由来する大腸菌群と非糞便由来の大腸菌群は種構成が全く異なることが明らかとなった。これにより、特に糞便汚染がないと考えられる河川上流部等では、糞便に由来しない腸内細菌科の細菌が大腸菌群として多く検出されるため、糞便汚染指標としての大腸菌群の指標性が低下することが示唆された。



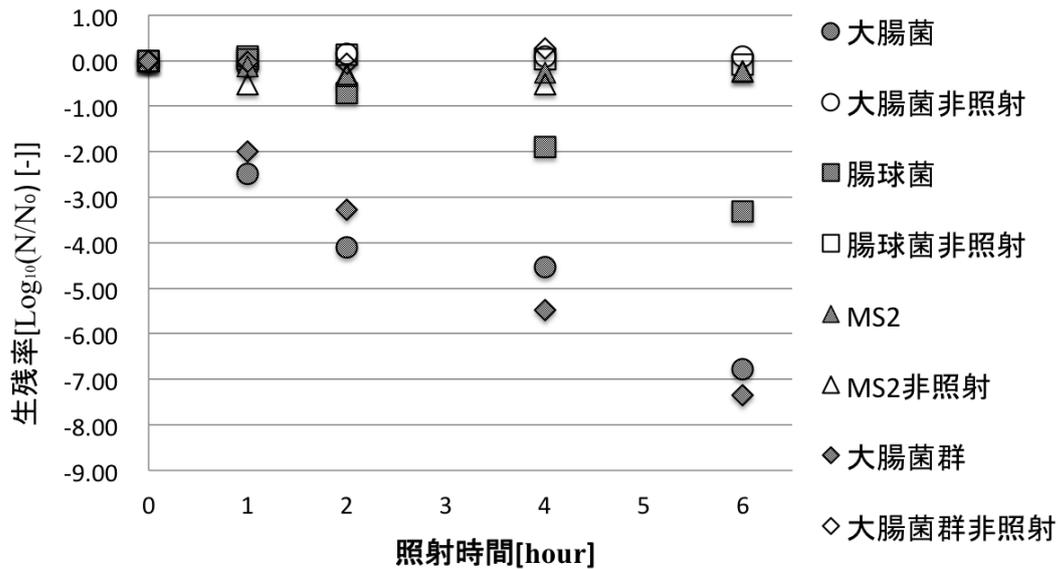
図(3)-21 BLASTn検索結果を基にしたクラスター分析の結果

表(3)-8 各クラスターに属した株に特徴的な属名

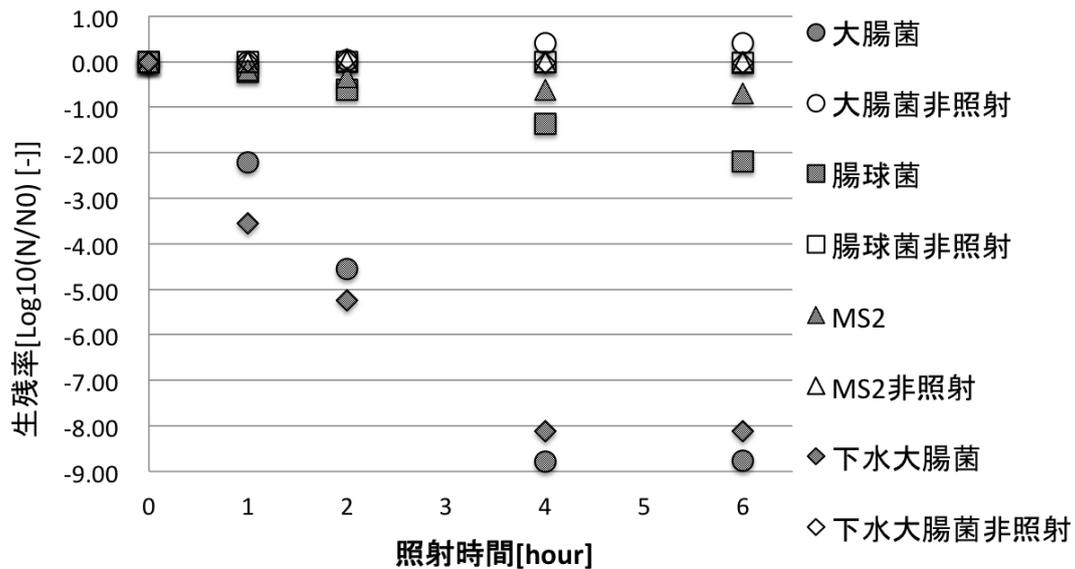
番号	特徴的な属名
1	なし
2	<i>Klebsiella</i> , <i>Raoultella</i>
3	<i>Yersinia</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Serratia</i>
4	<i>Pantoea</i> , <i>Leclercia</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Rhizobium</i>

#### (4) 太陽光による微生物不活化の評価

PBS 中では大腸菌と大腸菌群が顕著な不活化傾向を示したのに対して MS2 は 6 時間後でもほとんど不活化しなかった (図(3)-22)。人工海水中では、腸球菌以外は PBS と比較してより早く濃度が減少した (図(3)-23)。微生物の擬似太陽光照射による不活化速度を表(3)-9 にまとめた。大腸菌群と大腸菌は太陽光による不活化について、ほぼ同じ傾向を示すことが確認された。腸球菌



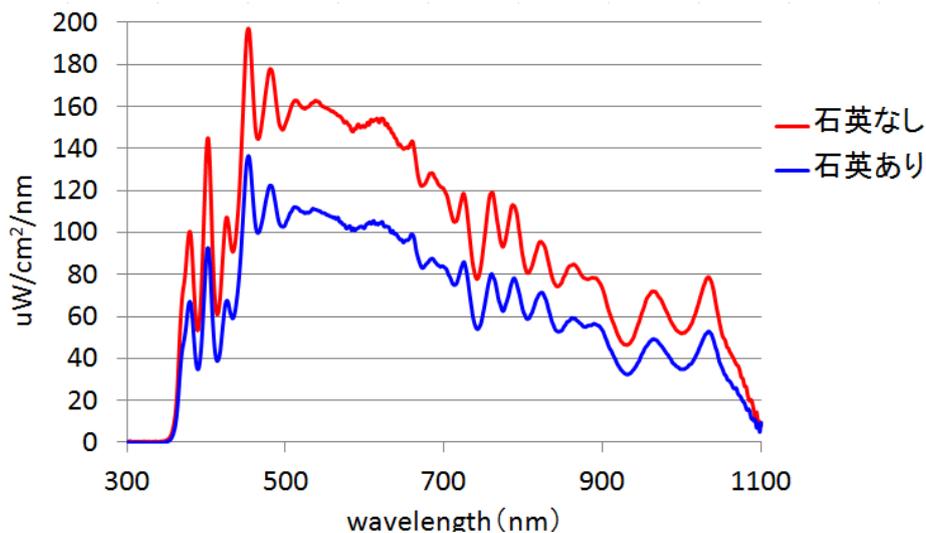
図(3)-22 可視光照射後の生残率 (PBS)



図(3)-23 可視光照射後の生残率 (人工海水)

表(3)-9 PBSおよび人工海水中の微生物の不活化速度

	不活化速度 [Log <sub>10</sub> hour <sup>-1</sup> ]	
	PBS	人工海水
大腸菌	0.99	2.2
腸球菌	0.58	0.37
MS2	0.03	0.12
大腸菌群	1.18	1.9



図(3)-23 光強度と石英ガラス板の蓋の関係

は大腸菌や大腸菌群と比べ太陽光や塩分に対しての耐性が高いことが示された。MS2 においては上記の3種の細菌は全く違う挙動を示した。このことから、太陽光による不活化を考慮する必要がある環境では、ウイルスの指標として細菌を使用することは難しいと考えられる。可視光照射による不活化機構として、細胞内のポルフィリンが細胞内で光増感剤として作用し、光励起によるエネルギー移動によって一重項酸素が発生し、細菌が不活化すると考えられている<sup>4)</sup>。ウイルスは粒子中にポルフィリンを持たないため、MS2 はほぼ不活化しなかったと考えられる。

照射光強度について、今回の実験ではウェルプレートに蒸発防止のため石英ガラスの蓋をした。これにより、380nm~430nmの光強度は4.6 mW/cm<sup>2</sup>から3.0 mW/cm<sup>2</sup>に約35%低下した(図(3)-24)。Macleanら<sup>5)</sup>は、照射波長域380nm~430nm程度のLED光源(光強度10mW/cm<sup>2</sup>)を用いて不活化実験を行い、その時の不活化速度は大腸菌が0.62 Log<sub>10</sub> / hour、腸球菌が0.44 Log<sub>10</sub> / hourであった。不活化傾向は類似した傾向をとっているがその不活化速度を比較すると今回の実験で得た値はMacleanらの不活化速度の大腸菌は約1.6倍、腸球菌は1.3倍であった。これは、ポルフィリンが波長500 nm~700 nmにも吸収帯を持つことが原因であると考えられる。ポルフィリンはソーレー帯と呼ばれる400 nm~500 nm付近の鋭い吸収帯と、Q帯と呼ばれる500 nm~700 nm付近の吸収帯を持つ。今回の実験ではQ帯の光によっても不活化がおきたため、Macleanらの結果より不活化速度が速くなったと考えられる。

今回得られた不活化速度が正しいとすると、河川流下に伴い指標微生物濃度は減少することになる。しかし、一般に河川流下に伴い指標微生物濃度が上昇することが知られており、今回の実験結果と矛盾する。この原因として、天候の変化や川底の石・水深等により太陽光が遮蔽されていること、太陽光による指標微生物の不活化速度よりも環境水中での増殖速度や光回復速度の方が大きいことなどが考えられる。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

震災後の段階的復旧において用いられた様々な下水処理方法（暫定的な二次処理や強化された塩素処理等）による衛生学的水質項目の処理効率や放流水質を詳細に解明することができた。衛生学的指標として現在用いられている大腸菌群だけでなく、病原微生物の指標として提案されている様々な微生物（大腸菌、腸球菌、ファージ、ヒトウイルス）を同じ試料から検出することにより、各種糞便汚染指標の病原ウイルスに対する指標性について評価することができた。また、汚染の起源を特定できる糞便汚染指標として開発が進められているバクテロイデスマーカーを下水処理水放流先海域での調査に適用することで、このマーカーが海域において糞便汚染指標としての特徴を有していることが示唆された。さらに、可視光による不活化速度が微生物の種類により大きく異なることから、処理水放流先海域での微生物指標およびウイルスの消長について重要なファクターになる可能性が示された。

### (2) 環境政策への貢献

#### <行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

#### <行政が活用することが見込まれる成果>

東日本大震災のような下水処理場に大きな被害を与える災害後の下水処理復旧期において、処理水の衛生学的水質は現在大腸菌群数を基準値以下にすることで担保している。しかし、現在注視されている病原微生物であるウイルスや原虫は塩素に対する耐性が高く、大腸菌群数低減のため用いられた塩素処理の強化によって制御することは困難であることから、放流先水域においてこれら病原微生物の濃度が上昇することが懸念される。

塩素処理の強化により、下水処理復旧期においても放流水の指標細菌濃度は放流先水域と同程度に低くなっていた。また細菌はウイルスと比較して太陽光による不活化速度が速く、放流先水域での挙動は大きく異なると予想される。これらの結果より、指標細菌を用いて放流先水域の病原微生物、特にウイルスや原虫の消長を把握するのは困難である。指標細菌に代わる新たな指標としては、今回測定したバクテロイデスの遺伝子マーカーのように、処理水中に比較的高い濃度で存在し、放流先水域で容易に減衰しない特徴を持つ項目を用いるのが望ましい。

これらの成果は、今後水環境学会での発表や委員会等での政策決定者との意見交換を通じ広報・普及に努める

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない。

#### <その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

### (2) 口頭発表（学会等）

- 1) 佐竹明日香, 真砂佳史, 大村達夫:平成24年度土木学会東北支部技術研究発表会(2013)「可視光照射による糞便汚染指標細菌の不活化」
- 2) 真砂佳史, 稲葉愛美:日本水環境学会水中健康微生物研究員会「東日本大震災による下水処理施設の被害からの復旧・復興に向けた取り組み」(2013)「衛生学的観点からの復旧期の下水処理効率の評価」
- 3) 真砂佳史, 稲葉愛美, 風間しのぶ, 片山浩之, 大村達夫:第16回水環境学会シンポジウム(2013)「東日本大震災後の段階的復旧にともなう下水処理効率の回復状況」
- 4) 真砂佳史, 久保田健吾, 勝又雅博, 佐竹明日香, 佐藤紀子, 島田祐輔, 袖野太士, 原田秀樹, 大村達夫:第48回水環境学会年会(2014)「人為汚染の有無が大腸菌群の種構成に与える影響」
- 5) 真砂佳史, 稲葉愛美:震災からの復旧に取り組む下水道と放流先の水質状況(2014)「被災浄化センターの復旧に伴う処理効率および放流水質の改善状況」

### (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

### (4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

### (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

### (6) その他

特に記載すべき事項はない。

## 8. 引用文献

- 1) Stevens *et al.*, (2003) Review of coliforms as microbial indicators of drinking water quality. National Health and Medical Research Council, ISBN: 1864961651
- 2) 厚生労働省, 微生物に係る基準の考え方, 2002.
- 3) Kobayashi, A., Sano, D., Taniuchi, A., Ishii, S. and Okabe, S. (2013) Use of a genetically-engineered *Escherichia coli* strain as a sample process control for quantification of the host-specific bacterial genetic markers. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **97**(20), 9165-9173.
- 4) Maclean, M., MacGregor, S. J., Anderson, J. G. and Woolsey, G. (2008) High-intensity narrow-spectrum light inactivation and wavelength sensitivity of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **285**(2), 227-232.
- 5) Maclean, M., MacGregor, S. J., Anderson, J. G. and Woolsey, G. (2009) Inactivation of bacterial pathogens following exposure to light from a 405-nanometer light-emitting diode array. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**(7), 1932-1937.

## **Effectiveness of Indicator Microorganisms for Water Pollution Caused by Waterborne Pathogens and Evaluation of Disinfection Technology**

Principal Investigator: Hiroaki TANAKA

Institution: Kyoto University  
1-2 Yumihama, Otsu, Shiga, 520-0811, JAPAN  
Tel: +81-77-527-6222 / Fax: +81-77-524-9869  
E-mail: htanaka@biwa.eqc.kyoto-u.ac.jp

Cooperated by: The University of Tokyo, Tohoku University

[Abstract]

**Key Words:** The Great East Japan Earthquake, Pathogenic virus, Disinfection process, Ecological toxicity, Next generation sequencer, Fecal indicator bacteria, Wastewater treatment plant

The Great East Japan Earthquake followed by the massive tsunami devastated municipal wastewater treatment plants (WWTPs) located along the seashore of the Pacific Ocean. Since then, in the coastal waters, it is thought that higher concentrations of bacteria and viruses were discharged from the damaged WWTPs until their recovery from malfunction. In this study, we investigated 1) the wastewater treatment efficiency and the quality of treated wastewater at four damaged WWTPs in Miyagi prefecture during and after their recovery from the damage; 2) the fate of fecal indicator bacteria and viruses in near-shore seawater receiving discharges from the WWTPs; 3) ecological toxicity of discharged wastewater which was disinfected with higher dose of chlorine; and 4) disinfection efficiency of chlorine and alternative disinfection processes such as UV and ozonation.

We found that bacterial indicators were relatively low and complied with discharge regulation in terms of 3000 cfu/ml of total coliforms. However, higher concentrations of viruses had been discharged from the WWTPs during their recovery period than those after restart of biological treatment, whereas the levels of fecal indicator bacteria were relatively constant. One of the reasons is that during the recovery period chlorination was enhanced to inactivate total coliforms to observe the discharge regulation, which resulted in lower bacterial indicators in the discharge even though reduction in tentative treatment before chlorination was lower in the damaged WWTP. On the contrary, viruses that are resistant to combined chlorine were less effectively removed in the tentative treatment, could survive the enhanced chlorination processes and remained high concentration in the discharge. We also found that the genomes of fecal bacteria and viruses discharged from the WWTPs decreased in the coastal receiving waters along distance from the WWTP

outlets due to dilution. Correlation analysis showed that bacteriophages better described the fate of human viruses in the coastal waters receiving the WWTP discharge than indicator bacteria.

We also studied characteristics of chlorination, UV irradiation, and ozonation of effluent from insufficient wastewater treatment from the viewpoints of disinfection effects of fecal indicator organisms and ecological toxicities. Chlorination showed efficient disinfection effects on bacterial indicators but little on viral indicators, and high ecological toxicity though dechlorination was able to mitigate the toxicities. UV disinfection was able to reduce both bacterial and viral indicators with increasing UV dose and no significant toxicities were increased. Ozone disinfection showed effective to the viral indicator but less to the bacterial indicators. Aeration and aerobic contact process before disinfection could reduce chlorine and ozone consumption though disinfection efficiency was not improved in terms of CT values of chlorination and ozone consumption. Coagulation and aerobic contact processes can improve UV disinfection effect.