

1. はじめに

1. 1 目的

本プロジェクトの目的は、下水処理水の衛生学的安全性について、技術的知見に基づき定量的検討を行うとともに、望ましい基準及びそれを実行するために必要な制度等を提言することである。

1. 2 背景

下水道の普及拡大に伴い、水循環の適正化及び清らかな水環境の確保における下水処理水の重要性が増大している。その一方で、原虫類クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium Parvum*) による集団感染や毎年起きているノロウイルスによる食中毒等、腸管系の病原微生物による被害が発生しており、国民の間に健康リスクへの懸念が広まっている。

こうした腸管系の病原微生物は、下水道へ排出されて下水処理水中にも存在する可能性があることから、下水道においても病原微生物の実態を明らかにし、必要に応じて対策を取ることが重要である。

クリプトスポリジウムは耐塩素性の原虫類の病原微生物であり、1996年に埼玉県越生(おごせ)町において水道水を原因とした9,000人近い集団感染が発生し、また、米国ミルウォーキー市で40万人が感染するなど、国際的にも多数の感染事例が報告されており、水管理において大きな注意が払われている。

水道におけるクリプトスポリジウム対策としては、厚生労働省により「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」及び「水道施設の技術的基準を定める省令」が策定されている。また、水質基準の見直し等の諮問に対する厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会の報告案「水質基準の見直し等について(案)」(平成15年3月パブリックコメント)では、クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物について水道法22条(衛生上の措置)で対策を義務づけるべきと提言されている。

一方、下水道におけるクリプトスポリジウム対策としては、日本下水道協会より「下水道におけるクリプトスポリジウム検討委員会最終報告」(平成12年3月)が出されており、平常時及び異常時における対策の考え方が示されている。ここで、下水道管理者の迅速かつ適切な対策行動を一層促進するためには、具体的な管理基準値及びそれに対応した行動指針が必要であると考えられるため、国土技術政策総合研究所が主宰する下水道技術会議「処理水、再生水の衛生学的水質検討プロジェクト」において、下水道のクリプトスポリジウム対策について調査・検討を行い、望ましい基準及びそれを実施するために必要な対策等を提言することとした。

また、クリプトスポリジウム以外にも、腸管出血性大腸菌 O-157 等の細菌類やノロウイルス等の腸管系ウイルスによる人間への健康被害が近年大きな社会問題となり、水の安全性への関心が高まってきていることから、本プロジェクトでは、細菌類や腸管系ウイルスについても、技術的知見に基づき定量的検討を行うこととした。

2. 実態の調査

2. 1 調査内容

調査は、平成13年10月から平成16年6月の2年9ヶ月の期間に、8下水処理場の流入下水、二次処理水、高度処理水を対象に行った。

試料は各処理場の調査担当者によって行われ、冷蔵状態にて分析機関に届けられた。分析は、国土技術政策総合研究所（以下、国総研）、東京大学（以下、東大）及び財団法人北里環境科学センター（以下、北里）により実施され、国総研がクリプトスポリジウム及び指標細菌類の分析を、東大がウイルス類の分析を、北里が病原細菌類の分析を実施した。

2. 2 調査項目

水系感染性の病原微生物は、原虫類、ウイルス類、細菌類に分類される。

人に健康被害を与える主な原虫類については、ジアルジア及びクリプトスポリジウムが挙げられるが、前者については、日本では集団感染発生事例が報告されていないのに対し、後者は集団感染発生事例の報告があり、消毒耐性も前者より後者の方がはるかに大きいことから、クリプトスポリジウムを調査項目とすることとした。

また、病原細菌類については、日本における食中毒の主要な原因であるサルモネラ属菌及びカンピロバクター、集団感染により大きな社会問題となった病原性大腸菌 O-157、再生水利用を行う際に、再生水の供給過程で再増殖の可能性があるレジオネラ属菌を調査項目とすることとした。

また、腸管系ウイルスについては、RNA ウイルスとして、日本における急性胃腸炎の主要な原因であり近年大きな社会問題となっているノロウイルス及び夏風邪等の主要な原因とされるエンテロウイルス、DNA ウイルスとして、プール熱の主要な原因とされるアデノウイルスを調査項目とすることとした。

調査項目及び調査期間は表2-1に示す通りである。

表 2 - 1 調査項目及び調査期間

調査項目		調査期間
原虫類	クリプトスポリジウム (<i>Cryptosporidium Parvum</i>)	平成 13 年 10 月～平成 14 年 9 月
ウイルス類	エンテロウイルス	平成 15 年 7 月～平成 16 年 6 月
	ノロウイルス(G1、G2)	
	アデノウイルス	
細菌類	大腸菌群	平成 15 年 11 月～平成 16 年 6 月
	大腸菌	平成 15 年 11 月～平成 16 年 3 月
	糞便性大腸菌群	
	糞便性連鎖球菌	
	嫌気性芽胞	平成 16 年 1 月～平成 16 年 3 月
	腸球菌	
	病原性大腸菌(O157)	平成 15 年 4 月～平成 16 年 3 月
	カンピロバクター	
	サルモネラ (シゲラ)	
レジオネラ		

2. 3 調査対象処理場

調査対象とした 8 下水処理場の下水処理方式については、生物処理のみの処理場が 5 箇所、高度処理として急速砂ろ過のみを追加している処理場が 2 箇所、凝集剤添加・急速砂ろ過を行っている処理場が 1 箇所であった。また、再生水利用目的で、オゾン処理を行っている処理場が 2 箇所あった。各処理場の下水処理の概要及び採水箇所は表 2-2 に示す通りである。

表 2-2 調査対象処理場の概要及び採水箇所

処理場名	処理方式	採水箇所
A	生物処理＋急速砂ろ過＋塩素消毒	①流入下水 ②最終沈殿池越流水 ③放流水
B	生物処理＋急速砂ろ過＋塩素消毒	①流入下水 ②急速ろ過後 ③放流水
C	生物処理＋塩素消毒	①流入下水 ②最終沈殿池越流水 ③放流水
D	凝集剤添加生物処理＋塩素消毒＋急速砂ろ過	①流入下水 ②最終沈殿池越流水 ③放流水
E	生物処理＋塩素消毒 ※再生水は、生物処理＋凝集剤添加＋塩素消毒＋急速砂ろ過＋オゾン	①流入下水 ②最終沈殿池越流水 ③放流水 ④再生水
F	生物処理＋塩素消毒	①流入下水 ②最終沈殿池越流水 ③放流水
G	生物処理＋塩素消毒	①流入下水 ②最終沈殿池越流水 ③放流水
H	生物処理＋塩素消毒 ※再生水は、生物処理＋急速砂ろ過＋オゾン	①流入下水 ②最終沈殿池越流水 ③放流水 ④再生水

2. 4 調査方法

(1) 試料の採取方法

(a) クリプトスポリジウム

試料の採取方法は、24 時間流量比コンポジット採水（1 時間又は 2 時間おきに 24 時間かけて採水した下水試料 24 本又は 12 本を、時間毎の流量に比例する分量で混合）を基本としたが、採水装置の制約によりスポット試料（1 回の採水による試料）の場合もあった。各処理場ごとに流入下水、放流水及び再生水（一部の処理場のみ）を採取し、冷蔵状態で国総研に送付して分析に供した。

(b) ウイルス類

試料の採取方法は、スポット採水（1 回の採水による試料）で行った。各処理場ごとに流入下水、最終沈殿池越流水（一部の処理場では砂ろ過水）、放流水及び再生水（一部の処理場のみ）を採取し、塩素消毒後の試料については、チオ硫酸ナトリウムによる中和を行った後、冷蔵状態で東大に送付して分析に供した。

(c) 細菌類

試料は、ウイルス測定用試料と共通とし、冷蔵状態で国総研及び北里に送付して分析に供した。

(2) 測定方法

(a) クリプトスポリジウム

参考文献1)を踏まえ、具体的な検出手順を以下に示すとおりとした。また、クリプトスポリジウムの検出手順の概略を図2-1に示す。

濃縮・分離

クリプトスポリジウムの検出に供した下水試料の量は、流入下水 200mL、放流水 20L とした。試料を 22 μ m ふるいでろ過し、孔径 2.0 μ m のポリカーボネートろ紙で吸引ろ過した後、ろ紙を溶出液に浸し、超音波処理によりろ紙上の固形物を溶出させることにより、ろ過濃縮を行った。その後、溶出液を 1050G にて 10 分間遠心分離し、上澄液を吸引除去することにより遠心分離濃縮を行った後、磁気免疫ビーズ (Dynabeads 社 GC Combo kit) により、クリプトスポリジウムのオーシストを分離した。

染色

蒸留水に浸漬した検鏡用ろ紙上に試料を滴下して吸引ろ過した後、直接蛍光抗体染色試薬 (Bio Technology Frontier 社 C&G FITC) による染色及び DAPI 染色液による染色を行った。

検鏡・計数

蛍光装置と微分干渉装置を備えた落斜蛍光微分干渉顕微鏡 (Olympus 社 BX60) により検鏡を行った。

プレパラートの全視野について、蛍光装置でB励起下での蛍光観察を行い、FITCの特異蛍光(緑色)を呈する長径4.5マイクロメートルないし5.4マイクロメートル、短径4.2マイクロメートルないし5.0マイクロメートルの類円形の粒子状物質を選定し、これについて、紫外線励起下での内部のスプロゾイト核の観察(DAPIの蛍光観察)を行った。また、微分干渉装置で内部構造を観察し、*Cryptosporidium Parvum*であることを確認した。

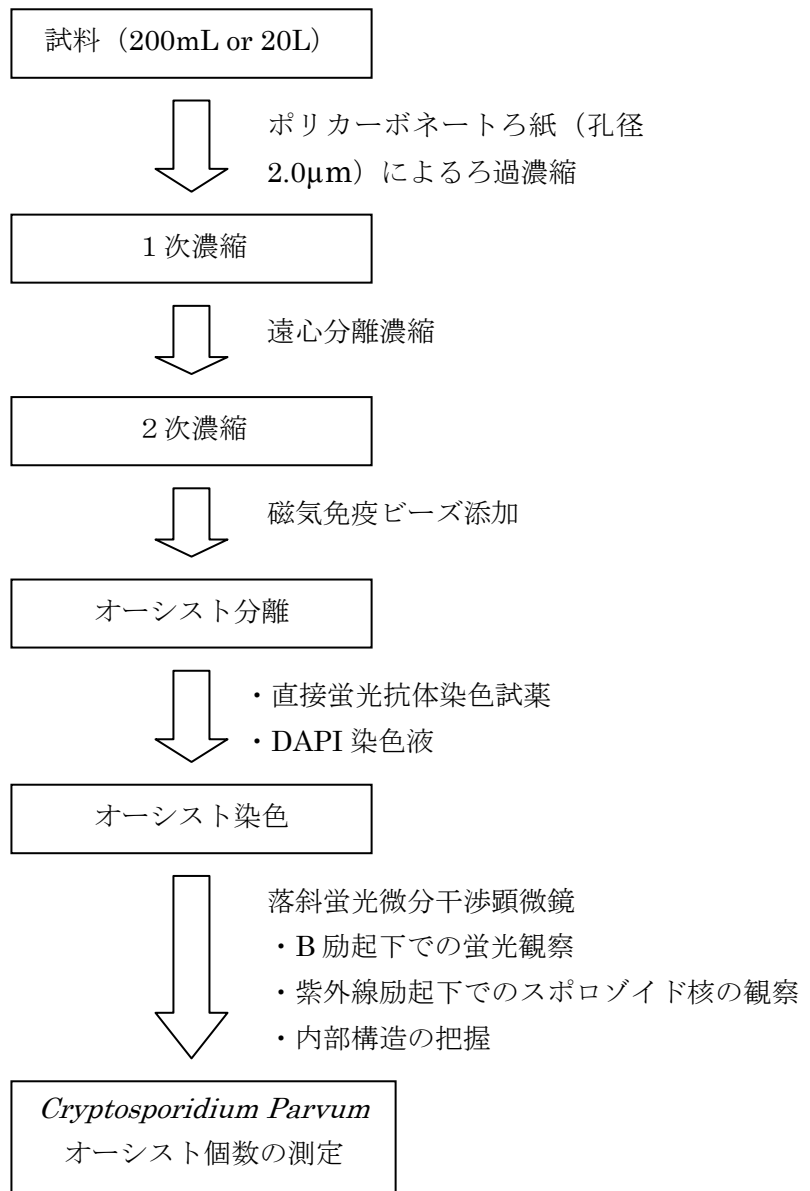


図 2-1 クリプトスポリジウム検出手順の概略

(b) ウイルス類

ウイルス検出手法としては、従来の培養法と PCR (Polymerase Chain Reaction) 法があるが、PCR 法の利点として、①実験操作が感染危険性からみて安全であること、②実験操作が簡単であること、③実験結果が短時間で得られること、④検出感度がよいこと、⑤細胞培養法で検出ができないウイルスも検出が可能であること 等が挙げられ、PCR 法による検出方法が主流となりつつある。

以上を踏まえ、本プロジェクトでは PCR 法により分析を行うこととし、具体的な検出方法は以下の通りとした。

陽イオン吸着・酸洗浄・アルカリ誘出法による濃縮²⁾

ウイルスの検出に供した下水試料の量は、流入下水は 100mL、最終沈殿池越流水（一部処理場では砂ろ過水）、放流水および再生水（一部の処理場のみ）は 1,000mL とした。

下水試料に $MgCl_2$ を添加して十分に攪拌した後、孔径 $0.45\mu m$ の HA 膜（混合セルロース膜）で全量ろ過することにより、試料中のウイルスを膜に吸着させた。続いて H_2SO_4 により酸洗浄操作を行い、ウイルスの誘出を阻害する Mg^{2+} を膜から流出させ、その後 $NaOH$ をろ過して、ウイルスを膜から誘出させ、5~10mL のウイルス濃縮液を得た。

遠心式濃縮ユニットによる再濃縮

遠心式濃縮フィルターユニット (Centriprep YM-50) で全量を遠心濃縮 (2,500rpm, 10 分間) し、約 700 μ L の濃縮液を得た。濃縮液は $-20^{\circ}C$ 以下で凍結保存した。

RNA ウイルスの検出

濃縮液 (約 700 μ L) から 140 μ L を分取し、QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) を用いた RNA 抽出に供することにより、RNA 60 μ L を得た。RNA から 40 μ L を分取してランダムプライマーを用いた逆転写反応に供し、cDNA 80 μ L を生成した。cDNA から 5 μ L を分取して PCR 反応液 45 μ L と混合し、ABI 7000 (Applied Biosystems) を用いてノロウイルス及びエンテロウイルスの検出を行った。

なお、1 種類のウイルスに対し 3 ウェルを使用した。また、cDNA を MilliQ 水で希釈して 10 倍段階希釈列を作成し、無希釈の場合と同様に 3 ウェルずつ使用してノロウイルス及びエンテロウイルスの検出を試みた。

DNA ウイルスの検出

濃縮液 (約 700 μ L) から 200 μ L を分取して QIAamp DNA mini kit (Qiagen) を用いた DNA 抽出に供し、DNA 200 μ L を得た。DNA から 5 μ L を分取して PCR 反応液 45 μ L と混合し、ABI 7000 (Applied Biosystems) を用いてアデノウイルスの検出に供した。

なお、1種類のウイルスに対し3ウェルを使用した。また、RNAウイルスと同様に MilliQ 水を用いた DNA の希釈操作を行うことにより、DNA の 10 倍段階希釈液からのアデノウイルスの検出を試みた。

プライマー及びプローブ

用いたプライマー等については、表 2-3 に示すとおりである。

ノロウイルスの検出には、G1 型及び G2 型のそれぞれの遺伝子型について幅広い検出能力を示すとされているプライマーと TaqMan プローブの組み合わせを使用した。

エンテロウイルスの検出に用いたプライマーは、エンテロウイルスの 5'末端付近に広く共通する部位を用いて設計されたものである。このプライマーの増幅領域から設計した複数の TaqMan プローブの中で最も検出感度の高かったものをプローブとして使用した。

アデノウイルスの検出には、ヒトアデノウイルスの 51 種類の血清型の全てを検出することが可能とされているプライマーと TaqMan プローブを使用した。

表 2-3 ウイルス検出に用いたプライマー及びプローブ

ウイルス	プライマー/プローブ	塩基配列 (5'-3')	鎖長	出典
NV-G1	+鎖プライマー	CGYTGGAATGCGNTTYCATGA	85 bp	3)
	-鎖プライマー	CTTAGACGCCATCATCATTYAC		3)
	TaqMan プローブ	FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA		3)
NV-G2	+鎖プライマー	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	98 bp	3)
	-鎖プライマー	TCGACGCCATCTTCATTCACA		3)
	TaqMan プローブ	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA		3)
EV	+鎖プライマー	CCTCCGGCCCCTGAATG	197 bp	4)
	-鎖プライマー	ACCGGATGGCCAATCCAA		4)
	TaqMan プローブ	FAM-CCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-TAMRA		2)
AdV	+鎖プライマー	GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC	132 bp	5)
	-鎖プライマー	GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT		5)
	TaqMan プローブ	FAM-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-TAMRA		5)

NV-G1 : ノロウイルス G1 型、NV-G2 : ノロウイルス G2 型、EV : エンテロウイルス、AdV : アデノウイルス

下水試料中のウイルス濃度の算出は MPN 法により行うこととした。また、濃度算出に当たり、上述の濃縮及び核酸抽出工程における回収率は考慮しないこととした。

なお、ウイルスの検出手順の概略は図 2-2 に示す通りである。

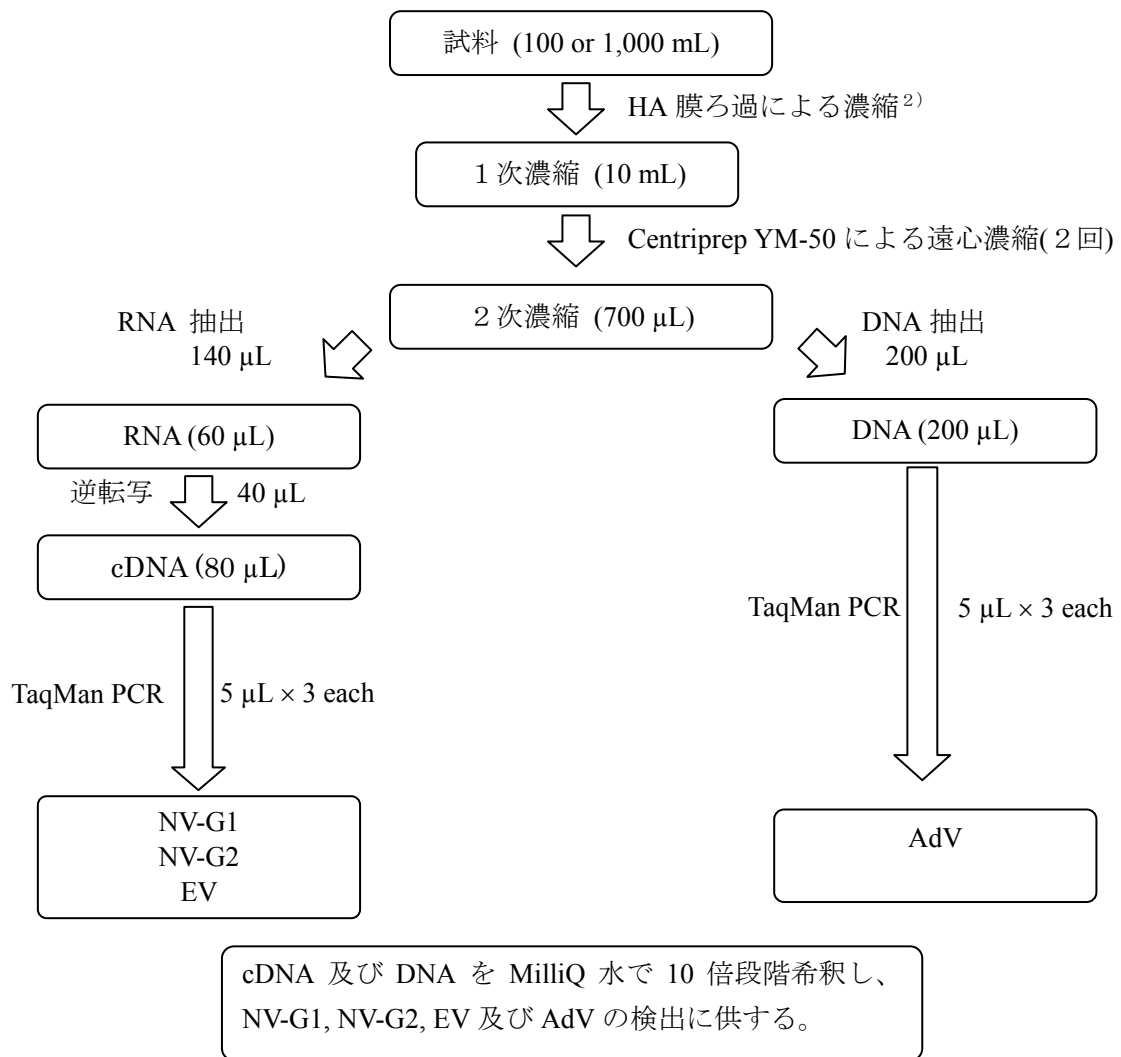


図 2-2 ウイルス検出手順の概略

(c) 細菌類

指標細菌

大腸菌群

下水試験方法（デソキシコール酸塩培地法）に基づき分析を実施した。

糞便性大腸菌群

下水試験方法（デソキシコール酸塩寒天培地による高温平板培養法）に基づき分析を実施した。

大腸菌

大腸菌・大腸菌群用クロモカルト寒天培地(Merck 社)を用い、培養後、発育し青色集落数を算定した。

糞便性連鎖球菌

下水試験方法における平板培養法（M-エンテロコッカス寒天培地）により行った。

腸球菌

下水試験方法における平板培養法（KF 寒天培地）により行った。

嫌気性芽胞（ウェルシュ菌芽胞）

上水試験方法におけるパウチ法（ハンドフォード改良寒天培地）により行った。

病原細菌

病原性大腸菌(0-157)

下水試験方法、Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater（以下 SMEWW と略す）9260F ならびに微生物検査必携 D-30 を参考にした。

具体的には、試料水 100mL をろ過し、SIB 寒天培地を用いて分離培養し、鑑別試験に CLIG 寒天培地を用いた。最終判定は血清型別を用い判定した。

カンピロバクター

食品衛生検査指針に基づき行った。

具体的には、試料水 100mL をろ過し、プレストン培地で増菌培養し、スキロー一培地で分離培養し、鑑別試験にミューラーヒントン培地を用いた。

サルモネラ(シゲラ)

SMEWW9260D 等に基づき行った。

具体的には、Tetrathionate(TT)ブロス培地で増菌培養し、XLD 寒天培地で分離培養し、鑑別試験に TSI 寒天培地及びリジン-鉄寒天培地を用いた。試料水は 10 倍段階希釈し、MPN 表を用いて菌数を算定した。

レジオネラ

レジオネラ症防止指針におけるろ過濃縮法を参照して行った。

具体的には、試料水 100mL をろ過し、酸処理を行った後、GVPC α 寒天培地を用いて分離培養し、血清型別試験を行った。

3. 調査結果

3. 1 クリプトスポリジウム

流入下水及び放流水中のクリプトスポリジウムの測定結果を表3-1に示す。

下水処理場で適用されている塩素消毒のレベルでは、クリプトスポリジウムを不活化するのは困難であると考えられることから、塩素消毒前後のクリプトスポリジウム濃度は変化しないと仮定すると、算術平均値ベースで算出される生物処理工程における除去率は1.5Log (97%)となる。

表3-1 クリプトスポリジウムの測定結果 (平成13年10月～平成14年9月)

	流入下水 (個/200mL)	放流水 (個/20L)	
		生物処理のみ	生物処理+砂ろ過
試料数	95	59	24
算術平均	2.74	9.5	1.5
分散	38.92	309.7	4.3
標準偏差	6.24	17.6	2.1
最大値	40 (1件)	117 (1件)	9 (1件)
最小値	0 (43件)	0 (11件)	0 (9件)

※放流水の一部のデータについては、試料水量が20Lではなく、15～19.5Lであったが、ここでは全て20Lとして概算している。

また、流入下水及び放流水(生物処理のみ、生物処理+砂ろ過)中のクリプトスポリジウム測定結果の経年変化を図3-1～図3-3に示す。これらの結果より、処理場毎にクリプトスポリジウムの存在量にかなり差があることが分かる。これは、各処理場に流入する処理区域の特性(クリプトスポリジウムの発生源等)が異なることによるものと考えられる。

なお、表3-1及び図3-1～3-3における測定結果は回収率を考慮していない値である。

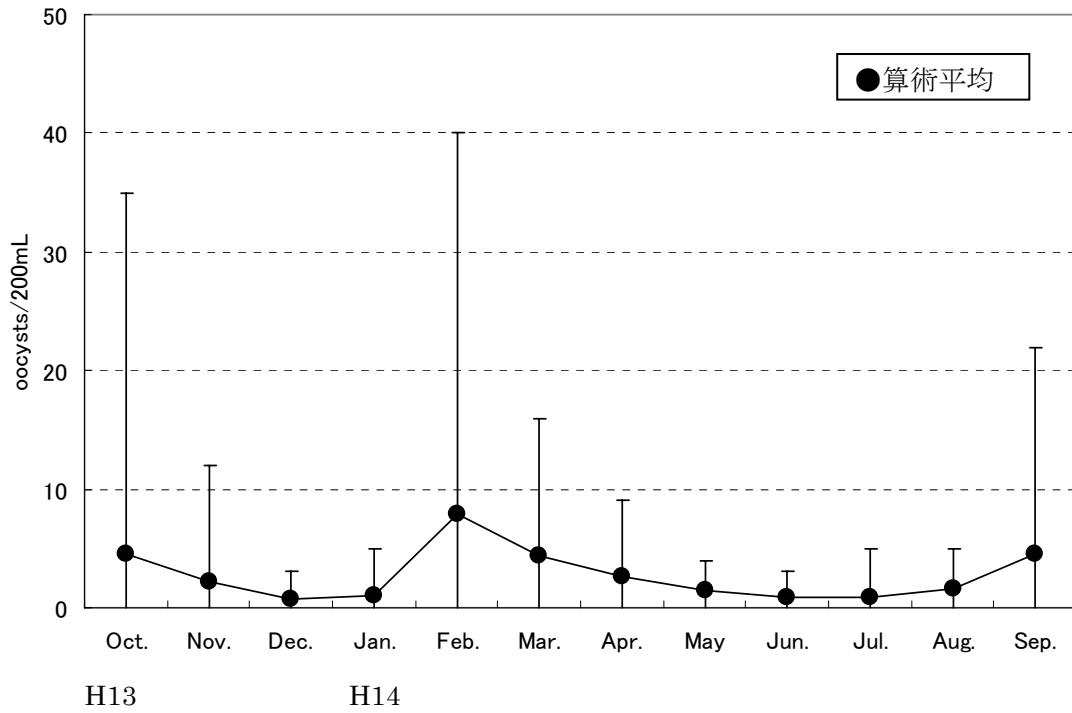


図3-1 流入下水中のクリプトスポリジウム測定結果

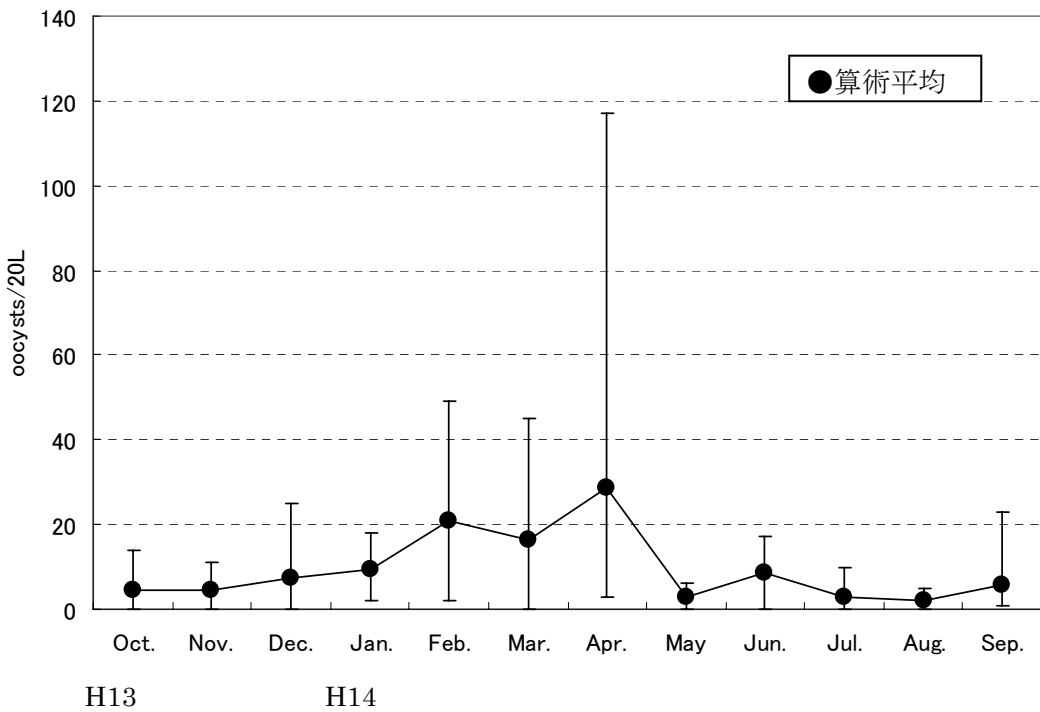


図3-2 放流水（生物処理のみ）中のクリプトスポリジウム測定結果

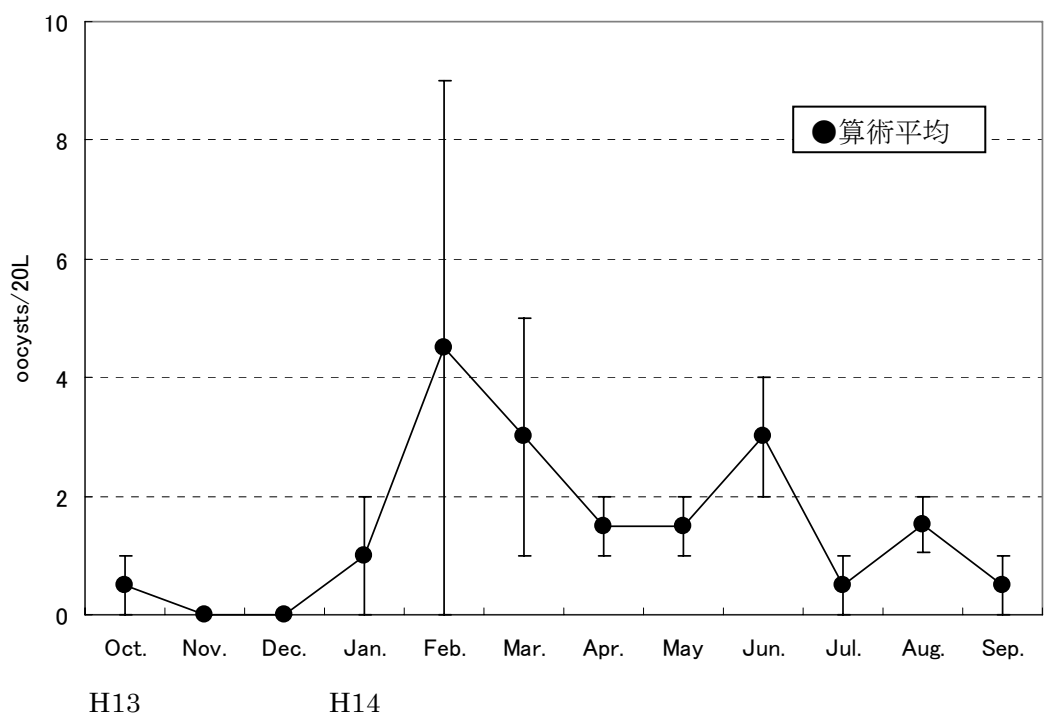


図 3 - 3 放流水（生物処理+砂ろ過）中のクリプトスポリジウム測定結果

3. 2 ウイルス類

流入下水及び放流水中のノロウイルス（G1型、G2型）、エンテロウイルス及びアデノウイルス濃度の経年変化を図3-4～図3-7に示す。

殆どの流入下水中にはこれらのウイルスのRNA及びDNAが存在し、放流水においてもウイルスのRNA及びDNAが検出されることが多い可能性が示唆された。

また、図3-4及び3-5より分かるように、冬期に流入下水中のノロウイルス濃度が上昇し、国内でのノロウイルス感染者の発生動向と類似した傾向が見られた。また、流入下水と同様、放流水中のノロウイルス濃度も冬期に上昇する傾向が見られた。

一方、エンテロウイルス及びアデノウイルスについては、ノロウイルスのような明確な季節変動は見られなかった（図3-6、図3-7）。

しかし、図3-4～図3-7は、検出されたRNA及びDNAの定量結果であり、感染性を有するウイルス濃度を表しているとは限らないため、特に消毒後の試料についてはウイルス濃度を過大に評価している可能性がある。そのため、これらの結果を基に、下水処理・消毒工程におけるウイルス除去・不活化率の評価や安全性の評価を行うのは困難であることに留意する必要がある。

なお、2.4(2)(b)で述べたように、図3-4～3-7における濃度は試料の濃縮工程や核酸抽出工程における回収率を考慮していない値である。

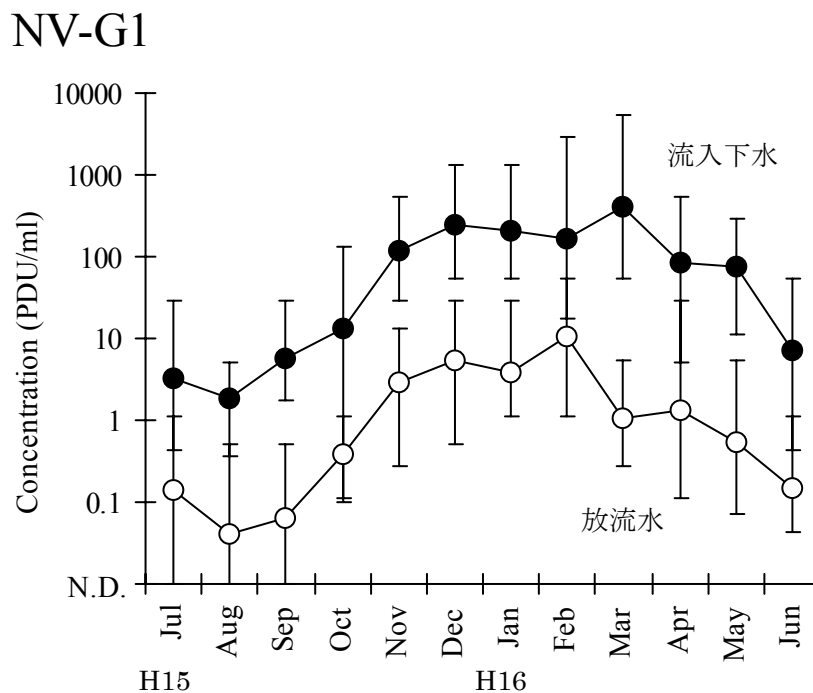


図3-4 流入下水及び放流水中のノロウイルス（G1型）濃度
（●及び○は幾何平均値）

NV-G2

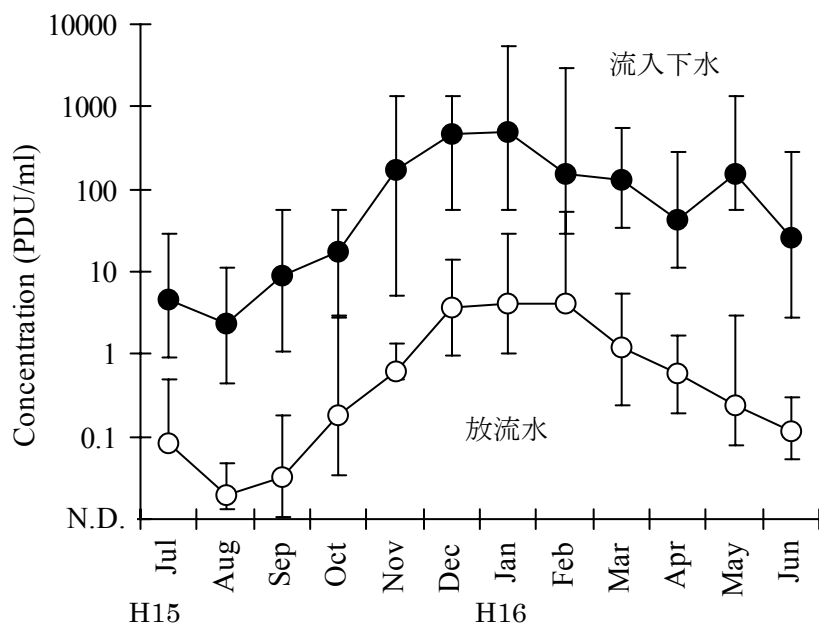


図3-5 流入下水及び放流水中のノロウイルス（GII型）濃度
（●及び○は幾何平均値）

EV

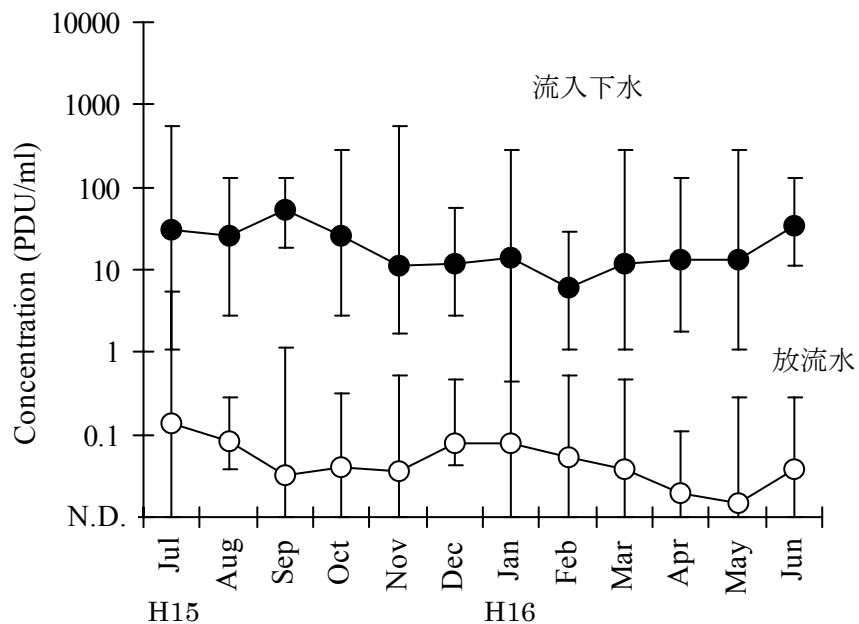


図3-6 流入下水及び放流水中のエンテロウイルス濃度
（●及び○は幾何平均値）

AdV

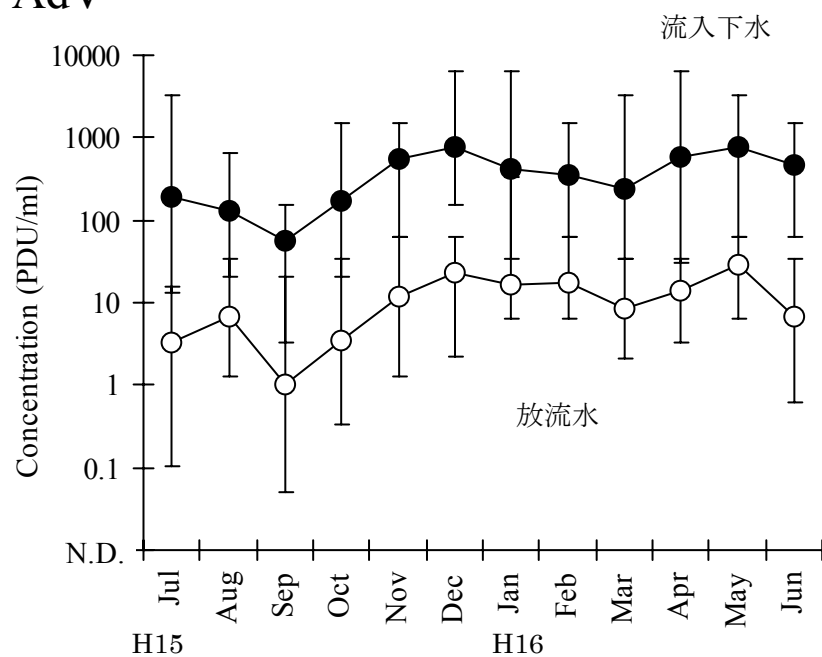


図3-7 流入下水及び放流水中のアデノウイルス濃度
(●及び○は幾何平均値)

3. 3 細菌類

病原細菌（病原性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラ、レジオネラ）は、流入下水を含め、全ての試料において検出されなかった。

流入下水、消毒前試料及び放流水中の大腸菌群、糞便性大腸菌群、大腸菌、糞便性連鎖球菌、腸球菌、嫌気性芽胞の濃度は図3-8に示す通りである。消毒前試料の大腸菌群数の最大値は $2.5 \times 10^3 \text{CFU/mL}$ となっており、全ての試料において、消毒前の段階で放流水質基準（大腸菌群数 $3,000 \text{CFU/mL}$ 以下）を満足していた。

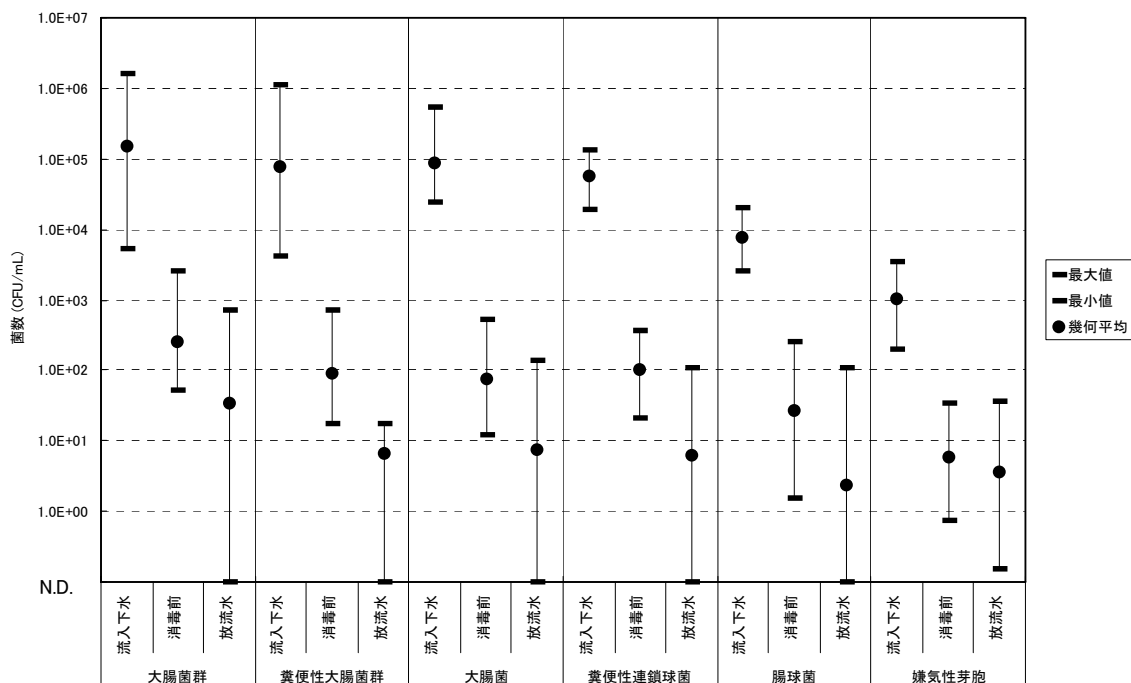


図3-8 流入水、消毒前及び放流水中の指標細菌濃度

また、流入下水から消毒前までの除去率及び消毒工程における除去率を算出した結果を表3-2に示す。指標細菌は消毒前までの処理工程において、幾何平均値では概ね $2.5 \sim 3 \text{Log}$ 程度除去され、消毒工程では、消毒耐性が高いとされている嫌気性芽胞を除き、幾何平均値では概ね 1Log 程度除去されていることが分かった。また、消毒工程における除去率は、消毒前までの処理工程での除去率に比べらつきが大きいことが分かった。これは処理場により消毒強度等の条件が異なることによるものと考えられる。

表 3 - 2 下水処理工程における指標細菌の除去率 (単位 : Log)

	流入下水→消毒前	消毒前→放流水
大腸菌群	2.78±0.45	0.88±0.81
糞便性大腸菌群	2.92±0.47	1.15±0.91
大腸菌	3.06±0.31	1.01±0.90
糞便性連鎖球菌	2.74±0.29	1.22±0.94
腸球菌	2.46±0.66	1.06±0.71
嫌気性芽胞	2.26±0.50	0.20±0.42

4. クリプトスポリジウムのリスク評価

3. に示すように、クリプトスポリジウム、ウイルス類及び細菌類の実態調査を行ったが、本プロジェクトでは、以下に示す理由により、クリプトスポリジウムのみについてリスク評価を行うこととした。

ウイルス類

- ①分離・培養法が確立している腸管系ウイルスの種類は極めて限られており、その実態は不明な点が多いこと
- ②本プロジェクトで用いた PCR 法による分析では感染性の有無等の判断ができないこと
- ③培養法が確立していないため、用量反応モデルが提案されていないウイルス種（ノロウイルス等）があること
- ④培養法が確立していないウイルス種については、感染性の有無を評価することができないため、消毒による不活化効果が不明であること
- ⑤下水試料に適したウイルス濃縮方法が確立しておらず、濃縮工程における回収率も明らかではないこと

等の課題があるため、現時点ではウイルスのリスク評価は困難である。

細菌類

本プロジェクトにおける実態調査の結果、流入下水を含め、全ての試料において病原細菌が検出されなかったこと、現在放流水の消毒方法として広く用いられている塩素消毒及び放流水質基準として定められている大腸菌群数により病原細菌の制御は可能であると考えられることから、現在の下水道システムにおける細菌類によるリスクは非常に小さく、細菌類のリスク評価及びリスク管理手法の検討を行う必要はないものと考えられる。

4. 1 分布計算方法

試料中のクリプトスポリジウム濃度の確率分布については、尤度比を用いた適合度の検討により推定した。検討の対象とした分布は、ポアソン分布、負の2項分布及びポアソン対数正規分布である。ここで、負の2項分布、ポアソン対数正規分布はそれぞれ、平均濃度がガンマ分布又は対数正規分布する試料からサンプリングを行った場合に、ポアソン分布として測定値（個数）が求められた結果としての混合分布と考えられる。

4. 2 リスク計算方法

下水処理水の放流及び再利用におけるヒト健康リスク評価については、モンテカルロシミュレーションにより年間感染リスクを定量的に評価した。

リスク評価の対象とする下水処理水（生物処理のみ）の放流及び下水処理水（生物処理＋砂ろ過）の再利用について、仮定した曝露シナリオ、摂取水量及び頻度は、水道水摂取量を 1L/日に変更⁶⁾した以外は、既存の報告⁷⁾の数値を用い、表 4-1 に示すとおりとした。なお、下水処理水の放流後の河川での希釈率は 10 倍、水道浄水施設での除去率は 99%と設定⁷⁾した。

表 4-1 下水処理水の放流及び再利用における曝露頻度および摂取量^{6) 7)}

接触形態	被曝者	曝露形態	曝露頻度	1 回当たり摂取水量
水浴	水浴者	水浴中の誤飲	40 日/年	100mL/日
水道利用	水道利用者	水道中の飲用利用	365 日/年	1L/日
親水用水（公園）	公園利用者	水遊び	100 日/年	10mL/日
修景用水（公園）	公園利用者	魚釣り	2 日/週	1mL/日
水洗用水（office）	勤労者	飛沫による接触	5 日/週	0.1mL/日
散水用水（公園）	公園利用者	芝生等での接触	60 日/年	1mL/日

クリプトスポリジウムの用量反応モデルとしては、式-1 に示す Haas らの指数型モデルを用いた。

$$P = 1 - \exp(-D/k) \quad \dots \dots \dots \text{(式-1)}$$

ここで、P：1 回の曝露における感染確率

D：1 回当たり曝露量（クリプトスポリジウムの個数）

k：指数型モデルのパラメータ（238.6）

リスク計算はモンテカルロシミュレーションにより各 500 回試行で行い、計算には Crystal Ball 2000™ を用いた。なお、放流水中のクリプトスポリジウムの回収率は 0.351 と仮定して⁸⁾ リスク計算を行った。

計算により求められた年間感染リスクは、平均値及び 95%信頼区間の下限値・上限値のリスク分布として把握した。

4. 3 分布の推定

下水中のクリプトスポリジウム測定データの確率分布への当てはめについて尤

度比を用いて適合度検定を行った結果を表4-2に示す。流入下水及び放流水（生物処理のみ、生物処理+砂ろ過）のいずれについても、ポアソン対数正規分布が負の2項分布よりもわずかながら適合度が高かった。ここで、負の2項分布、ポアソン対数正規分布はそれぞれ、平均濃度がガンマ分布又は対数正規分布する試料からサンプリングを行った場合に、ポアソン分布として測定値（個数）が求められた結果としての混合分布と考えられる。

これらの結果より、今回の調査結果からは、クリプトスポリジウムの濃度分布について対数正規分布の方が適していると考えられた。しかしながらその差は僅かであるため、リスク計算は両方の分布を用いて実施することとした。

表4-2 クリプトスポリジウム濃度の確率分布の適合度

		ポアソン分布		負の2項分布		ポアソン対数正規分布	
		$-2\ln(\Lambda)$		$-2\ln(\Lambda)$		$-2\ln(\Lambda)$	
流入下水		$-2\ln(\Lambda)$	484.7	$-2\ln(\Lambda)$	38.2	$-2\ln(\Lambda)$	33.0
		$\mu =$	49.8	$\mu =$	49.8	$\xi =$	2.6
				$k =$	0.3	$s =$	1.7
放流水	生物処理	$-2\ln(\Lambda)$	912.4	$-2\ln(\Lambda)$	77.1	$-2\ln(\Lambda)$	76.8
		$\mu =$	1.4	$\mu =$	1.4	$\xi =$	-0.7
			$k =$	0.5	$s =$	1.5	
	生物処理+砂ろ過	$-2\ln(\Lambda)$	24.9	$-2\ln(\Lambda)$	12.6	$-2\ln(\Lambda)$	12.0
		$\mu =$	0.2	$\mu =$	0.2	$\xi =$	-2.0
				$k =$	1.0	$s =$	0.9

Λ は尤度比を表し、 $-2\ln(\Lambda)$ が小さいほど分布の当てはまりがよい

4. 4 リスク評価

4. 3において推定した濃度分布に基づく下水処理水（生物処理のみ）の放流及び下水処理水（生物処理+砂ろ過）の再利用による年間感染リスク計算の結果について、500回計算の平均値及び95%信頼区間の上限値及び下限値（97.5%値及び2.5%値）を図4-1に示す。

下水処理水（生物処理のみ）放流後の河川での希釈率を10倍、水道浄水施設での除去率を99%と設定した場合の水浴及び水道利用のリスクは 10^{-3} ~ 10^{-2} の範囲にあり、下水処理水（生物処理+砂ろ過）の再利用によるリスクは 10^{-3} ~ 10^{-5} の範囲にあると推定された。また、安全側のリスク評価として97.5%値を用いると、対数正規分布の方がより高めのリスク推定値を与えることになる。従って、リスク管理において、より安全側の対策とするためには、クリプトスポリジウムの濃度分布として対数正規分布を用いることが適切と考えられた。

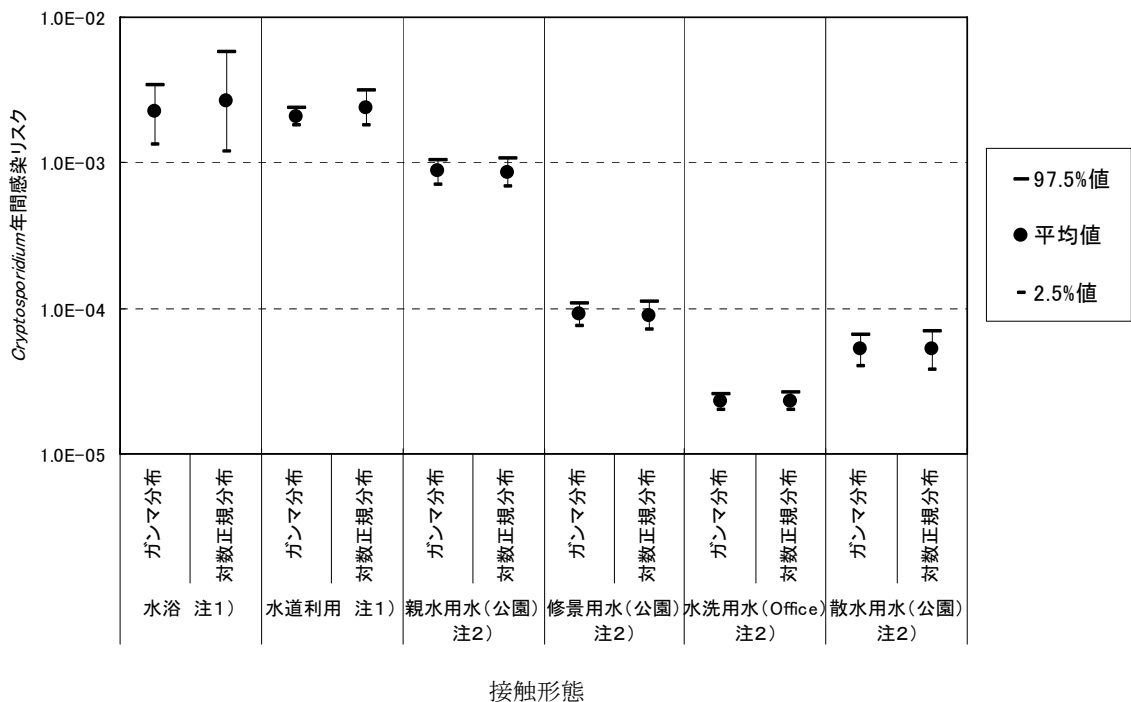


図4-1 下水処理水のクリプトスポリジウム年間感染リスク

注1) 水浴及び水道利用については、下水処理水（生物処理のみ）放流後の河川での希釈率10倍、水道浄水施設での除去率99%を仮定

注2) 親水用水、修景用水、水洗用水、散水用水については、下水処理水（生物処理+砂ろ過）の再利用を仮定

5. クリプトスポリジウムのリスク管理手法の検討

4. におけるクリプトスポリジウムのリスク評価結果を踏まえ、下水処理水の放流先下流において、水道水源としての利用や水浴等の水利用が行われている場合のリスク管理手法について検討を行うこととした。

5. 1 目標リスクの設定

米国環境保護庁(USEPA)では、病原微生物による年間感染リスクの目標値を 10^{-4} 以下とすることを提案している。

しかしながら、4. 4で示したように、日本における下水処理水の放流によるクリプトスポリジウム年間感染リスクの現状が 10^{-3} から 10^{-2} の範囲であること、 10^{-4} までリスクを低減させることに関する定量的な費用便益分析がなされておらず、そのための社会的投資に関する社会的合意がまだ存在しないこと等を踏まえ、最低限の対策として合意が得られるであろう 10^{-2} を暫定的な目標とすることとする。

なお、金子⁶⁾ や平田⁹⁾ が提示したリスク管理目標案も同レベルのものとなっている。

5. 2 リスク管理体制

下水処理水の病原微生物のリスクに関する対策としては、以下の二通りの異なる現象に対して検討する必要がある。

第一に、確率論的現象への対策としての年間感染リスク対策である。これは通常時に下水道へ流入する病原微生物濃度は、患者の散発的な発生等に由来してランダムに変動するため、そのリスク対策としては、年間の平均状態についての恒久的対応を実施することが適切であると考えられるためである。

第二に、決定論的現象への対策としての集団感染リスク対策である。これは、ひとたび集団感染が発生すれば、一定期間は高濃度の病原微生物が下水道へ流入する状態が続くため、そのリスク対策としては、下水道から排出される病原微生物濃度を低減させるための緊急対応（凝集剤添加等）を実施することが必要となる場合があると考えられるためである。

以上を踏まえ、年間感染リスク対策及び集団感染リスク対策のための対応の枠組みをそれぞれ検討することとした。

5. 3 年間感染リスク対策

年間感染リスク対策のための対応の枠組みは、図5-1に示すとおりとした。

ここでは、年間を通じた測定値の平均値（例えば年12回の測定値の平均値）が年間許容リスクを満たさなければ、より高度な除去施設（例えば紫外線、オゾン等）の導入を図る必要があるとするものである。なお、年間許容リスクとしては、既に述べたとおり、暫定的に一人の年間感染リスクが 10^{-2} を超過しないこととしている。

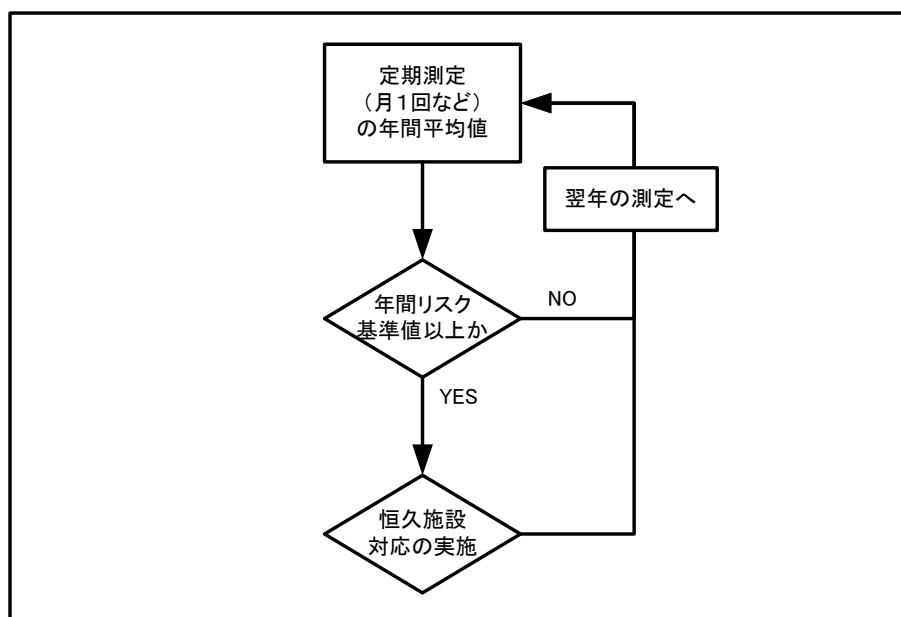


図5-1 年間感染リスク対策の枠組み

5. 4 集団感染リスク対策

5. 4. 1 集団感染リスク対策の事例検討

集団感染時のリスク管理を適切に行うためには、集団感染の規模（人数、期間等）及び下水道への病原微生物の最大流入濃度を想定し、必要な対策技術及びリスク管理体制等についてあらかじめ検討しておく必要がある。

ここでは、日本国内におけるクリプトスポリジウム症の最大規模の集団感染事例を基に、下水道へのクリプトスポリジウム最大流入濃度を想定し、必要な対策技術及びリスク管理体制等について事例検討を行うこととする。

近年の日本国内において、排水が関与したと考えられる水系病原微生物の最大規

模の集団感染は1997年の埼玉県越生町のクリプトスポリジウム症集団発生事例である。本事例では、水道水中にクリプトスポリジウムが混入したことにより、町民約13,800人（アンケート回答者は12,345人）のうち、約7割にあたる8,812人が下痢等の症状を起こし、学校や仕事を休んだ住民は2,878人で発症者の約33%、医療機関受診者は2,856人で発症者の約32%であり、入院者は24人であった。初期の感染者より排出されたクリプトスポリジウムが農業集落排水処理施設を經由して河川に放流され、それを下流で浄水場が再び取り込んで上水道に混入して町民に曝露させるという増幅サイクルが形成されたことにより、集団感染が拡大したと考えられている。

この事例における発生患者数の推移の実績データを基に、各患者が2週間の間 10^9 個のクリプトスポリジウムを排出し、一人一日あたりの下水量が 0.5m^3 であると仮定した場合の発生患者数及びクリプトスポリジウム排出者数の経日変化を図5-2に示し、全区域が一つの下水道処理区域として整備された仮想的な都市にあてはめて試算した場合の流入下水中のクリプトスポリジウム濃度の経日変化を図5-3に示す。

本試算では、最大の同時排出者数は5,760人となり、全感染者8,812人より排出時期不明者518人を除いた8,294人に対する比率は0.694であった。この比率は全感染者に対して一定と仮定すると、真の最大同時排出者数は約6,120人（8,812人 \times 0.694）となり、アンケート回答者12,345人に対する比率は0.496であった。

従って、全住民の約7割が感染し、そのうち約7割が同時期に排出者となった結果として、最大で全住民の約5割が同時排出者となったことが分かる。住民の半数が 10^9 個のクリプトスポリジウムを排出し、一人一日あたりの下水量が 0.5m^3 であると仮定した場合、

$$0.5 \times 10^9 / (0.5 \times 10^3) = 10^6 \text{ (個/L)}$$

となる。これが日本の流入下水の仮想的な既往最高濃度と考えられる。

以上を踏まえ、下水道におけるクリプトスポリジウム対策において、想定される最高濃度を 10^6 （個/L）と仮定した場合、本プロジェクト調査結果に基づき、生物処理+砂ろ過により約2.3Log除去され、参考文献7)に基づき砂ろ過前の凝集剤添加により約2Log除去率が向上するとして、最大で $10^{1.7}$ （約50）個/L程度のクリプトスポリジウムが処理水中に残存することになる。

この濃度で問題となるリスクが発生する放流先を有する場合には、紫外線やオゾン等による高度な消毒・不活化処理等を行うか、あるいは、定期的な測定により集団感染による高濃度流入を監視し、必要に応じて、凝集剤の添加・追加、対応不可能な場合の情報提供等の対応を講じることによる対策が考えられる。

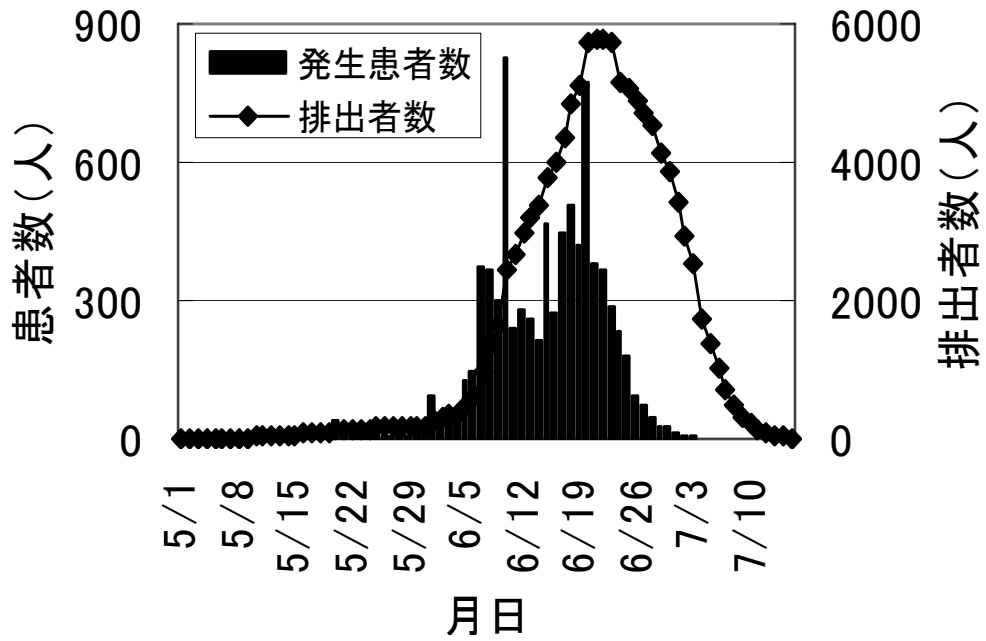


図5-2 発生患者数とクリプトスポリジウム排出数の推移

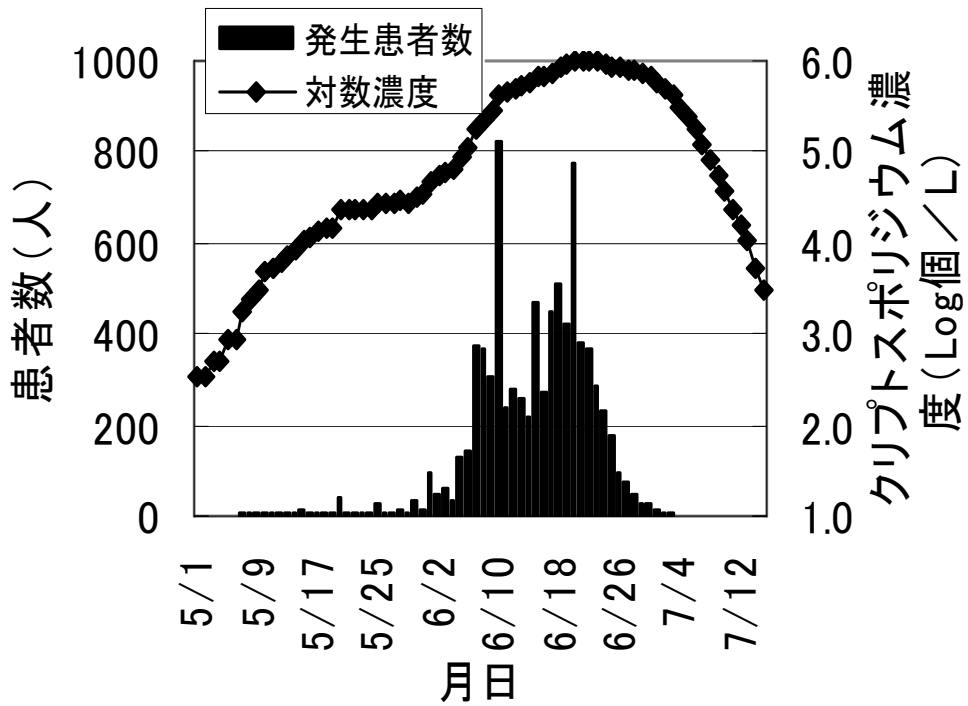


図5-3 発生患者数と流入下水中クリプトスポリジウム濃度の推移

5. 4. 2 集団感染リスク対策の枠組み検討

集団感染リスク対策のための対応の枠組みは、図5-4に示すとおりとした。

集団感染リスク対策のための基準値 L1 及び L2 は、放流水についての実測データから推定される対数正規分布について、その分布より大きく逸脱する測定値が得られた場合には、集団感染の発生という通常の状態とは異なる状態になっている可能性が高いため、監視強化及び緊急対応を行う必要がある場合の基準値として定められるものである。

具体的には、通常状態の分布より3個の試料を取った場合（3回の測定に相当）に、試料の幾何平均値が示す分布の信頼区間 95%上限値を超える濃度として監視強化基準値 L1 を設定し、通常状態の分布より2個の試料を取った場合（2回の測定に相当）に、試料の幾何平均値が示す分布の信頼区間 95%上限値を超える濃度として緊急対応基準値 L2 を設定し、それぞれの基準値を超過した場合に必要な対応を実施するものである。

なお、測定値の基準への適合の判断にあたっては、本来は測定値の幾何平均値を用いるべきであるが、連続した測定値のうち後で測定した方が高い値であり、感覚的には濃度が上昇傾向にあると思われる場合でも、幾何平均値としては基準を満たすという場合が起こりうるため、安全側の運用として、連続した測定のいずれにおいても基準値以下とすることとした。

また、L1 及び L2 は、年間感染リスク対策の基準値として設定される基準上限値を超過して設定してはならないこととした。

ここで、基準上限値は、表4-1の曝露シナリオを仮定して、式—1を基に年間許容リスク 10^{-2} を満足する濃度として算出され、利用対象別の基準上限値は表5-1に示す通りとなる。

表5-1 利用対象別の下水処理水中のクリプトスポリジウム濃度基準上限値

利用対象	基準上限値 (個/L)
水道	$0.0066 \times \text{水道削減係数} \times \text{濃度比係数}$
水浴	$0.6 \times \text{濃度比係数}$

※水道削減係数は水道の浄水処理工程におけるクリプトスポリジウム除去率を指し、濃度比係数は放流後から利用箇所に至るまでの希釈率を指す。なお、参考文献7)では処理目標水質計算に当たり、水道削減係数 100、濃度比係数 10 を仮定している。

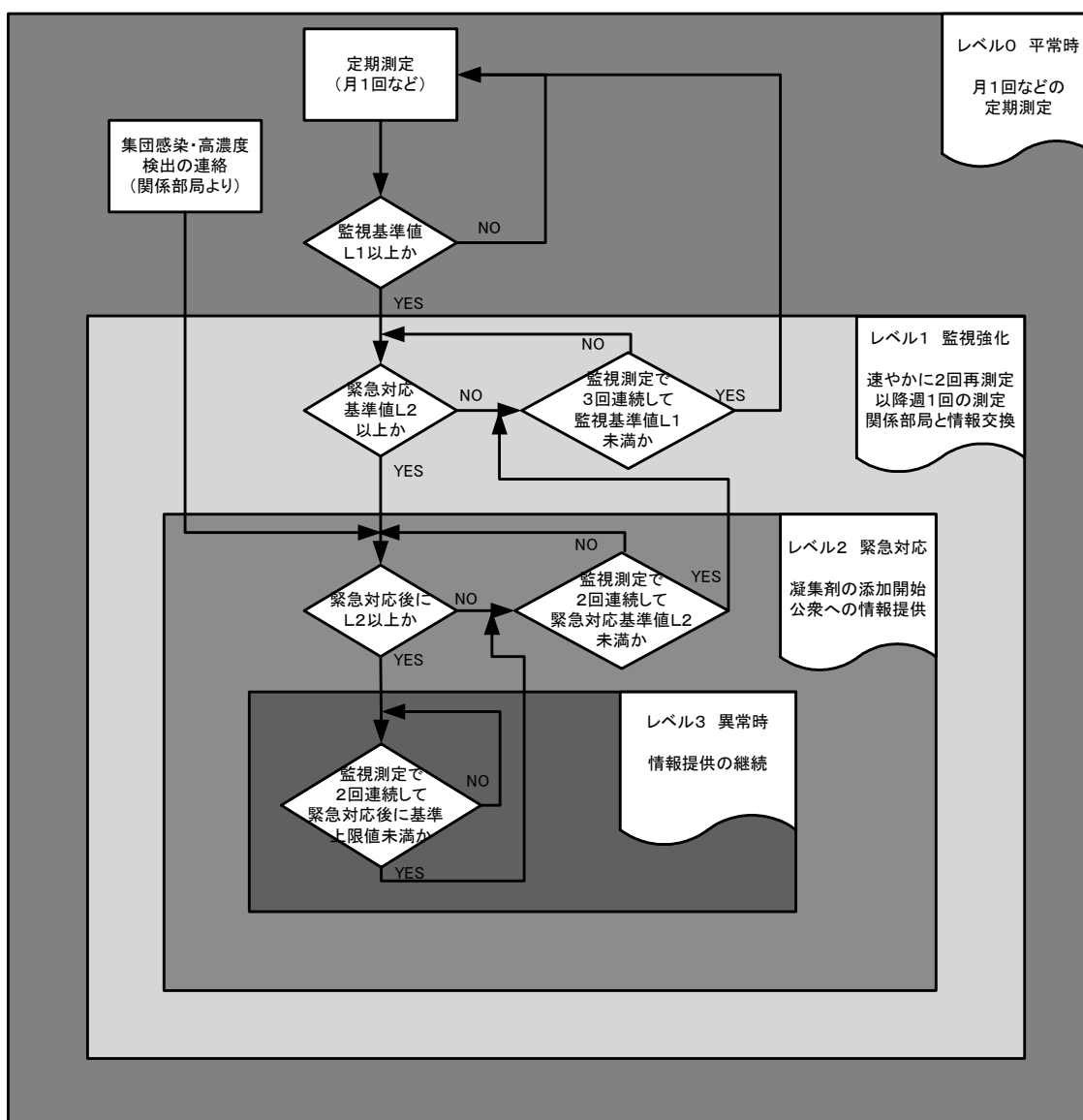


図5-4 集団感染対策の枠組み

L1及びL2の具体的な算出方法は以下の通りである。

- ① 既往の測定値及び回収率を基に、放流水の濃度分布を対数正規分布と仮定した場合の対数平均 (μ) 及び対数標準偏差 (σ) を求める。
- ② n回測定値の幾何平均値の分布の対数標準偏差 (σ / \sqrt{n}) を求める。
- ③ n回測定値の幾何平均値の分布の95%信頼区間幅 ($1.96 \sigma / \sqrt{n}$) を求める。
- ④ n回測定値の幾何平均値の分布の信頼区間上限値 ($\exp(\mu + 1.96 \sigma / \sqrt{n})$) を求める。
- ⑤ ④においてn=3とした場合の値をL1、n=2とした場合の値をL2とする。

なお、本プロジェクトにおいて実施した 5 処理場における放流水(生物処理のみ)及び 2 処理場における放流水(生物処理+砂ろ過)中のクリプトスポリジウム濃度の実態調査結果を基に L1 及び L2 を算出すると、表 5-2 に示す通りとなる。

表 5-2 実態調査結果より算出される L1 及び L2 (単位: 個/L)

処理方法	監視強化基準値 L1	緊急対応基準値 L2
生物処理のみ	2.8 ^{注1)}	4.1 ^{注1)}
生物処理+砂ろ過	0.39 ^{注2)}	0.49 ^{注2)}

注 1) 5 処理場における放流水(生物処理のみ)中のクリプトスポリジウム濃度の実態を基に算出

注 2) 2 処理場における放流水(生物処理+砂ろ過)中のクリプトスポリジウム濃度の実態を基に算出

但し、放流水中のクリプトスポリジウム濃度は、各処理場の流入、処理特性により状況が異なるため、それぞれの処理場において実態を把握した上で、L1 及び L2 を定めるのが望ましいと考えられる。

また、L1 及び L2 を算出するに当たっては、既往の測定値に対し回収率を設定する必要があるが、測定手法、測定技術者の熟練度、試料の水質・性状によって回収率が異なることから、それぞれの処理場において既知濃度試料による回収率をチェックすることが望ましいと考えられる。

なお、L1 及び L2 は、年間感染リスク対策の基準値として設定される基準上限値以下で設定されることとなっているため、図 5-4 の枠組みによりリスク管理を行った場合には、年間感染リスクは目標リスク 10^{-2} をかなり下回ることになるものと想定される。

6. 今後の課題

本プロジェクトにおいて行われたクリプトスポリジウムのリスク管理手法の検討を踏まえ、平成 15 年 6 月 26 日に国土交通省都市・地域整備局下水道部流域管理官付流域下水道計画調整官名にて「下水処理水のクリプトスポリジウム対策について」が通知され、下水道管理者が下水処理水の水系リスク管理計画を策定し、クリプトスポリジウムに関する下水処理水のリスク管理の一層の充実に努めることとなった。

本プロジェクトでは、許容リスクについて暫定的な目標として 10^{-2} を設定したが、クリプトスポリジウム以外の病原微生物のリスク削減便益や汚濁物質削減便益等を含めた総合的な評価を行った上で、目標リスクを設定するのが望ましい。そのため、今後はリスクコミュニケーションにより、下水処理水の病原微生物リスク管理について社会的に合意可能な目標を検討するとともに、病原微生物のリスク削減便益等を含めた総合的な便益と費用について検討を行っていく必要がある。

また、4. の冒頭で述べたとおり、現時点ではウイルス類のリスク評価は困難な状況にあるため、本プロジェクトでは、ウイルス類のリスク管理手法の検討は行わなかったが、今後は、以下の課題に対応することにより、ウイルス類のリスク評価及びリスク管理手法の検討を行っていく必要がある。

(1) 下水試料の濃縮方法の確立

下水中のウイルスは通常、低濃度であることから、検出の前処理として濃縮・誘出操作が必要となるが、下水試料に適したウイルス濃縮法は十分に確立しているとは言えない状況にあり、今後更なる検討が必要である。

(2) 感染性の有無を含めたウイルス検出方法の確立

細胞培養法で検出ができないウイルス種については、PCR 法により検出を行うことが可能であるが、PCR 法では感染性の有無まで評価することはできない。そこで細胞培養法で検出ができないウイルス種について、感染性の有無を含めた検出方法を確立する必要がある。

(3) 消毒によるウイルス不活化効果の検討

細胞培養法で検出ができないウイルス種については、感染性の有無を評価することができないため、消毒による不活化効果を確認することができない。そこで、(2) で掲げた課題と併せて、消毒によるウイルス不活化効果を検討する必要がある。

(4) リスク管理手法の検討

クリプトスポリジウムとウイルス類では、病原微生物としての特性が異なり、

リスク管理手法も異なると考えられることから、関係者への情報提供手法を含め、ウイルス類のリスク管理手法について検討する必要がある。

7. 参考文献

- 1) (社) 日本下水道協会 (2002)、下水試験方法 (追補暫定版) - 内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編 - 2002 年版
- 2) Katayama H., Shimasaki A. and Ohgaki S. (2002). Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Sea Water, *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1033-1039.
- 3) Kageyama, T., S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda, and K. Katayama. (2003). Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41:1548-1557.
- 4) Shieh, Y. S. C., D. Wait, L. Tai, and M. D. Sobsey. (1995). Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 54:51-66.
- 5) Heim, A., C. Ebnet, G. Harste, and P. Pring-Akerblom. (2003). Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J. Med. Virol.* 70:228-239.
- 6) 金子光美 (2001)、水道水基準の検討作業の総括、第 4 回日本水環境学会シンポジウム講演集、pp.183-184
- 7) (社) 日本下水道協会 (2000)、下水道におけるクリプトスポリジウム検討委員会最終報告
- 8) 山下洋正ら (2002)、病原性微生物の発生源および対策に関する調査、国総研資料第 64 号、pp.185-190
- 9) 平田強ら (2001)、原虫基準の検討結果、第 4 回日本水環境学会シンポジウム講演集、pp.181-182