

研究助成テーマ；淀川流域における病原ウイルスの 存在把握ならびに健康影響評価

京都大学大学院 工学研究科 浅田安廣

1. はじめに

現在、上下水道の整備に伴い水系感染事例は減少しているものの、未だに水系感染事例が生じている¹⁾ことも事実である。そしてその主な原因は、水源汚染となっている²⁾。このような状況を食い止め、常に微生物学的安全性を確保するためには、日常の水源状況把握といった水源管理が重要となる。

琵琶湖・淀川水系は、滋賀県、京都府、大阪府などの多くの人々の水道水源である。しかし、その水源は滋賀県あるいは京都市の下水処理放流水が混在しており、擬似的に水を反復利用している状況となっている。そのため、上水道に関わる微生物学的安全性の確保には、水源管理と適切な処理が必要不可欠である。さらに将来、淀川に水浴場などのレクリエーション施設を設置した場合、非意図的に河川水を曝露することになることから、非意図的の曝露による健康被害の発生を未然に防ぐためにも日常の河川汚染状況把握といった微生物モニタリングとその制御が重要となる。

水系感染を引き起こす病原微生物として、細菌、原虫、ウイルスが挙げられる。そして近年では、ウイルス検出技術の向上により、水環境中におけるウイルス存在実態が明らかになりつつある。日本での過去の報告事例からは、下水や下水処理水中²³⁾、水道水の原水となる河川水や湖、地下水においても病原ウイルスの検出が報告されている⁴⁾。一方で、関西地方を代表する流域である淀川を対象としたウイルス検出事例はほとんどないのが現状である。また、淀川は水道原水を採取する取水口の上流域にて多数の下水処理場から下水処理水が排出されており、淀川下流域での水道原水は病原ウイルスの影響が他の流域に比べ高いと予想される。

以上の背景を踏まえ、本研究では病原ウイルスの淀川水系での存在状況・汚染源を把握し、その安全性の評価を行うことを目的とする。その際、非意図的に河川水を曝露した病原ウイルスの感染リスクと、淀川を水道原水とした場合の水道水飲用に伴う病原ウイルスの感染リスクの推定を行うことを行うこととした。

ここでは水源調査の対象として下痢症を引き起こす腸管ウイルスであるアデノウイルスF群、ロタウイルスA群、ノロウイルスの3種類のウイルスを選定した。また近年、遺伝子に基づいた分子生物学的手法により病原微生物の測定が可能となってきているものの、遺伝子に基づいた測定方法では、死活あるいは感染能を失った病原微生物も含めて測定してしまう危険性がある。そのため、本研究では通常のqPCR法と同時にPMA-qPCR法による各ウイルスの定量を行った。PMA-qPCRとは、膜損傷があるウイルス、すなわち感染能を失っていると考えられるウイルスの核酸を選択的に除外して定量することができる方法である。また本研究では、淀川水系4河川の中で水道水源となる淀川に対して、次世代シーケンサー機器によるウイルス遺伝子検出を試み、河川水中に存在するウイルスの把握を試みた。

2. 方法

本研究は2種類の実験的検討から構成される。まず、1)河川水中の病原ウイルスの検出、そして、2)各病原ウイルスが引き起こす健康影響を評価し、淀川流域において制御すべき重要なウイルスについて評価する。

2.1. 河川水中の病原ウイルスの検出

2.1.1. 実験器具関係

本実験に用いる全てのガラス器具および金属容器は 250 °C で 2 時間の乾熱滅菌をおこなった。また、Bio-Pak (Millipore) を取り付けた超純水製造システム (Milli-Q, Academic, Millipore) により製造した水 (以下, MilliQ 水と記載) およびプラスチック器具は 121 °C ・ 2 気圧で 20 分間オートクレーブ滅菌したもの、もしくは滅菌済みの器具を使用した。特に記載の無い試薬については、和光純薬製を用いた。

2.1.2. サンプルングについて

河川水については、採水場所として桂川(納所地点, 宮前橋付近), 宇治川(宇治川三山地点, 御幸橋付近), 木津川(八幡地点, 旧京阪国道沿い), 淀川(淀川河川公園付近)を選定した。そして各採水地点で試料水を採取した後、保冷した状態で実験室まで運搬し、測定は原則 2 日以内に行った。

2.1.3. 河川水の濃縮

河川採水試料を PEG 沈殿法により 1 L から 2 mL に濃縮した。まず試料水を滅菌済 2 L 広口丸型ボトル (Thermo Scientific) に入れ, 2.3% (w/v) 塩化ナトリウム, 8% (w/v) Polyethylene Glycol 6000 molecular biology grade (SERVA Electrophoresis) を加え, 完全に溶解するまで攪拌し, 4 °C で一晩静置した。その後, この溶液を BeckmanAvanti HP-26XP (Beckman Coulter) を用いて 4 °C, 10,000 rpm で 45 分間遠心分離し, 上澄み水を捨てた。この操作を試料がなくなるまで繰り返した後, ボトル壁面の付着物に対して滅菌済みのリン酸緩衝液 (PBS, pH7.2) を 2 mL 加え, ピペッティングで再懸濁した後, 4 °C で 30 分間静置した。次に, 再懸濁後に 2 分間の超音波洗浄を加え, この懸濁液にクロロホルム 2 mL を加えて 15 分間振り混ぜた。そして 12,000 rpm, 10 分間の遠心分離, クロロホルム層の吸引除去を行った後, さらにクロロホルム 2 mL を加え同様の操作を行った。最後に微生物汚染による影響を軽減するため, Antibiotic-Antimycotic 100X (Life technologies) を最終濃度 1% (v/v) となるように加えこれを濃縮試料とした。濃縮試料は -80 °C で冷凍保存した。

2.1.4. ウイルス核酸の抽出

濃縮試料から 200 μ L 採り, High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche) を用いてウイルス核酸を抽出した。なお, 溶出液 50 μ L については, 使用直前まで -80 °C で冷凍保存した。

2.1.5. 定量 PCR による各種ウイルスの定量

StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用してウイルスの定量を行った。以下に各ウイルス種別に, 用いた方法や PCR 条件を述べていく。RNA ウイルス (ロタウイルス, ノロウイルス) の定量に際しては, 本研究では全て OneStep 法を用いた。各ウイルスの定量に用いたプライマーとプローブ配列情報を表 1 にまとめる。なお, PEG 濃縮による回収率については添加実験により算出し, ウイルス定量結果の算出に用いた。

1) アデノウイルス F 群

TaqMan プローブによるハイブリダイゼーション法により試料中のアデノウイルス F 群の定量を行った。American Type Culture Collection (ATCC) から購入した DNA from Human Adenovirus 40 (VR931D) (以下 AdV-F と記載) を標準試料とし, $10^1 \sim 10^5$ copies/ μ L の 5 段階の希釈列を作製して検量線を作成した。反応条件は, 95 °C ・ 10 分間の初期熱変性後, 95 °C ・ 15 秒間のアニーリングと 60 °C ・ 1 分間の伸長反応を 1 サイクルとして計 40 サイクルとした。

2) ロタウイルス A 群

TaqMan プローブによるハイブリダイゼーション法によりロタウイルス A 群の定量を行った。American Type Culture Collection (ATCC) から購入した Human rotavirus (VR-201) から抽出した RNA 試料を標準試料とし、 $10^1 \sim 10^5$ copies/ μL の 5 段階の希釈列を作製して検量線を作成した。反応条件は、 $48^\circ\text{C} \cdot 30$ 分間の逆転写反応、 $95^\circ\text{C} \cdot 10$ 分間の初期熱変性後、 $95^\circ\text{C} \cdot 15$ 秒間のアニーリングと $60^\circ\text{C} \cdot 1$ 分間の伸長反応を 1 サイクルとして計 40 サイクルとした。

3) ノロウイルス GI, GII 型

TaqMan プローブによるハイブリダイゼーション法によりノロウイルス GI と GII 型の定量を行った。Thermo Fisher 社に依頼した cDNA 合成試料を標準試料とし、 $0^1 \sim 10^5$ copies/ μL の 5 段階の希釈列を作製して検量線を作成した。反応条件は、 $48^\circ\text{C} \cdot 30$ 分間の逆転写反応、 $95^\circ\text{C} \cdot 10$ 分間の初期熱変性後、 $95^\circ\text{C} \cdot 15$ 秒間のアニーリングと $56^\circ\text{C} \cdot 1$ 分間の伸長反応を 1 サイクルとして計 40 サイクルとした。

表 1 プライマー, プローブ情報一覧

対象	試薬	配列 (5' → 3')	参考文献
アデノウイルス F 型 (128 bp)	Forward primer (AdVF-F)	GCAGGACGCCCTCGGAGTA	Lion et al. (2003) ⁹⁾
	Reverse primer (AdVF-R)	TGTCTGTGGTTACATCGTGGGT	
	Probe (AdVF-P)	FAM- TACTTCAGCCTGGGGAACAAGTTCAGAAA -NFQ MGB VIC- TGGTTCTCCGAAATAGATTTAGGGCTA -NFQ MGB	
ロタウイルス A 群 (87 bp)	Forward primer (Rota-NSP3-F)	ACCATCTACACATGACCCTCTATGAG	Zeng et al. (2008) ⁹⁾
	Reverse primer (Rota-NSP3-R)	GGTCACATAACGCCCTATAGC	
	Probe (NSP3)	FAM- AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAAA -NFQ MGB	
G1-ノロウイルス	Sense primer (COG1F)	CGC TGG ATG CGC TTC CAT GA	Katayama et al. (2008) ⁹⁾
	Antisense primer (COG1R)	CIT AGA CGC CAT CAT CAT TTA C	
	Probe (RING1-TP(a))	FAM-AGA TYG CGA TCG CCT GTC CA	
G2-ノロウイルス	Sense primer (COG2F)	CAA GAG CCA ATG TTC AGA TGG ATG AG	Katayama et al. (2008) ⁹⁾
	Antisense primer (COG2R)	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	
	Probe (RING2-TP)	FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT	

2.1.6. メタゲノム解析手法を用いた水中ウイルスの同定

本実験では 2.1.4. で得られた淀川の核酸試料を用いて、Kraken を用いたメタゲノム解析を実施した。Miseq(イルミナ社)を用いて DNA 配列情報を取得するための前処理, ライブラリー調製は, イルミナ社の説明書に従って行った。なお本研究で用いたキットは, Nextera DNA Library Prep Kit(イルミナ社), Nextera XT Index Kit v2 Set B (イルミナ社), MiSeq Reagent Kit v3 (150-cycle) Kit(イルミナ社)である。最後に得られた DNA 配列情報を Base Space (Web) にインポートした後, Kraken Mini という解析ツールを用いて各試料から得られた DNA 配列情報に基づき, 試料に含まれている微生物種の同定を行った。

2.2. 水浴, 水道水飲用に伴う病原ウイルスが引き起こす健康影響の定量化

ここでは, 河川でのレクリエーションとして最も曝露が多いと考えられる水浴を微生物リスク定量化のシナリオとして設定した。同時に, 淀川を水道原水として用いた場合の水道水飲用による感染リスクについても検討した。詳細なシナリオについては, 表 2 に示す。

表2 水浴、水道水飲用による曝露シナリオ⁷⁾

接触形態	被曝露者	曝露形態	曝露頻度	1回当たりの摂取量
水浴	水浴者	水浴中の誤飲	40日/年	100 mL/日
飲用	飲用者	非加熱飲用	365日/年	2 L/日

まず、得られた淀川河川水中の各ウイルス濃度に曝露量を乗ずることでヒトが1回の水浴、水道水飲用により摂取するウイルス摂取量($Dose$)を求めた。さらに各用量-反応モデル式(式1, 2)を用いて、1回当たりの感染確率($P_{inf,d}$)人⁻¹日⁻¹を算出した。

$$P_{inf,d} = 1 - F_1(\alpha, \alpha + \beta, -Dose_{virus}) \quad (\text{式1: ロタウイルス, ノロウイルス})$$

$$P_{inf,d} = 1 - \exp(-r \times Dose_{AdV}) \quad (\text{式2: アデノウイルス})$$

ここで n は曝露回数を示す。感染-発症割合($P_{ill,y}$)について、アデノウイルス、ロタウイルスは表3示した値を用いた。ノロウイルスについては、式3を用いて感染-発症割合($P_{ill,y, NoV}$)を算出した。

$$P_{ill,y, NoV} = 1 - (1 + \eta \times Dose_{NoV})^{-r} \quad (\text{式3})$$

続いて、式4を用いて1回あたりの発症確率を算出し、そして、表2に示した1年間の水浴日数、水道水飲用日数に基づいて、式5を用いて各病原微生物曝露による年間の発症確率 $P_{ib,y}$ を算出した。

$$P_{ill,d} = P_{inf,d} \times P_{ill,y} \quad (\text{式4})$$

$$P_{ib,y} = 1 - (1 - P_{ill,d})^n \quad (\text{式5})$$

最後に DALYs を用いて、各ウイルス起因の健康影響を定量化した。本研究では、DALYs 算定に Havelaar ら(2003)が用いた単純化した計算式⁸⁾を用いることとする。DALYs 算定式を以下に示す。

$$DALYs = YLL + YLD \quad (\text{式6})$$

$$YLL = \sum_i d_i \times e_i \quad (\text{式7})$$

$$YLD = \sum_i n_i \times t_i \times w_i \quad (\text{式8})$$

ここで、YLL (Years of Life Lost) は早死による生命損失年数、YLD (Years Lived with Disability) は障害を持つことにより失われた生命損失年数を示している。各パラメーターは、 i : 異なる症例群に対する添字、 d_i : 致命的な症例数、 e_i : 死亡時の余命(損失余命)、 n_i : 患者数、 t_i : 疾病の継続時間、 w_i : 重篤度を示している。

続いて各ウイルスが引き起こす健康影響は胃腸炎のみと設定した。DALYs では、YLL と YLD により算出されるが、本研究で対象とした病原ウイルスの死亡率が非常に低いことから DALYs 値への影響が非常に低いことが確認された。そのため、DALYs case は YLD により算出することとした。YLD の算出においては、Havelaar ら(2012)が設定した重篤度、疾病の継続時間⁹⁾を用いることとし、入院率等のパラメーターは日本のデータを用いて推定した。

最後に、式9を用いて年間一人あたりのDALYsを算出した。算出に用いたパラメーターを表3にまとめる。

$$DALYs\ ppppy = DALYs\ case \times P_{ill,y} \quad (式9)$$

表3 健康影響定量化に用いたパラメーター一覧

内容	パラメーター	参考文献
曝露関係(単位換算)		
アデノウイルスF群	TCID ₅₀ /genome copies	1/700 McBride et al. (2013) ¹⁰⁾
ロタウイルスA群	FFU/genome copies	1/1900 McBride et al. (2013) ¹⁰⁾
用量-反応モデル関係		
アデノウイルスF群	r	0.4172 Hass et al. (1999) ¹¹⁾
ノロウイルス	α	0.04 Teunis et al. (2008) ¹²⁾
	β	0.055
ロタウイルスA群	α	0.2531 Hass et al. (1999) ¹¹⁾
	β	0.4265
感染-発症割合		
アデノウイルスF群	P _{ill/inf, Adv}	0.5 McBride et al. (2013) ¹⁰⁾
ノロウイルス	η	0.00255 Teunis et al. (2008) ¹²⁾
	r'	0.086
ロタウイルスA群	P _{ill/inf, RoV}	0.35 McBride et al. (2013) ¹⁰⁾
リスク評価		
DALYs case—アデノウイルスF群	DALYs/illness casa	0.0050 Havelaar et al. (2012) ⁹⁾
DALYs case—ノロウイルス	DALYs/illness casa	0.0049 Havelaar et al. (2012) ⁹⁾
DALYs case—ロタウイルスA群	DALYs/illness casa	0.0052 Havelaar et al. (2012) ⁹⁾

3. 結果と考察

3.1. 河川水中のウイルス検出状況

各河川でのウイルス数測定結果を図1に示す。結果としては、ノロウイルスGII型が最も高い濃度を示していた。一方検出数に関しては、アデノウイルスが最も多く検出していた。各河川には、規模の大小はあるものの、下水放流水が流れていることから、各河川で病原ウイルスが検出された可能性が高い。さらに宇治川の上流部には琵琶湖が存在することから、ウイルス自体は琵琶湖流域から流下している可能性も考えられる。

またノロウイルスについては患者数が冬季に多いことから、冬季で濃度が高い傾向が確認されたが、一方で夏季においてもその存在が確認された。つまり夏季は冬季のような集団感染ではないが、散发事例は起きており、それが下水に流れてきている可能性が推察される。ロタウイルスA群では季節性があり、冬季において水環境水中の濃度が比較的高くなることが確認された。アデノウイルスF群では年間を通して濃度が高いことが明らかとなった。このことから、アデノウイルスF群は

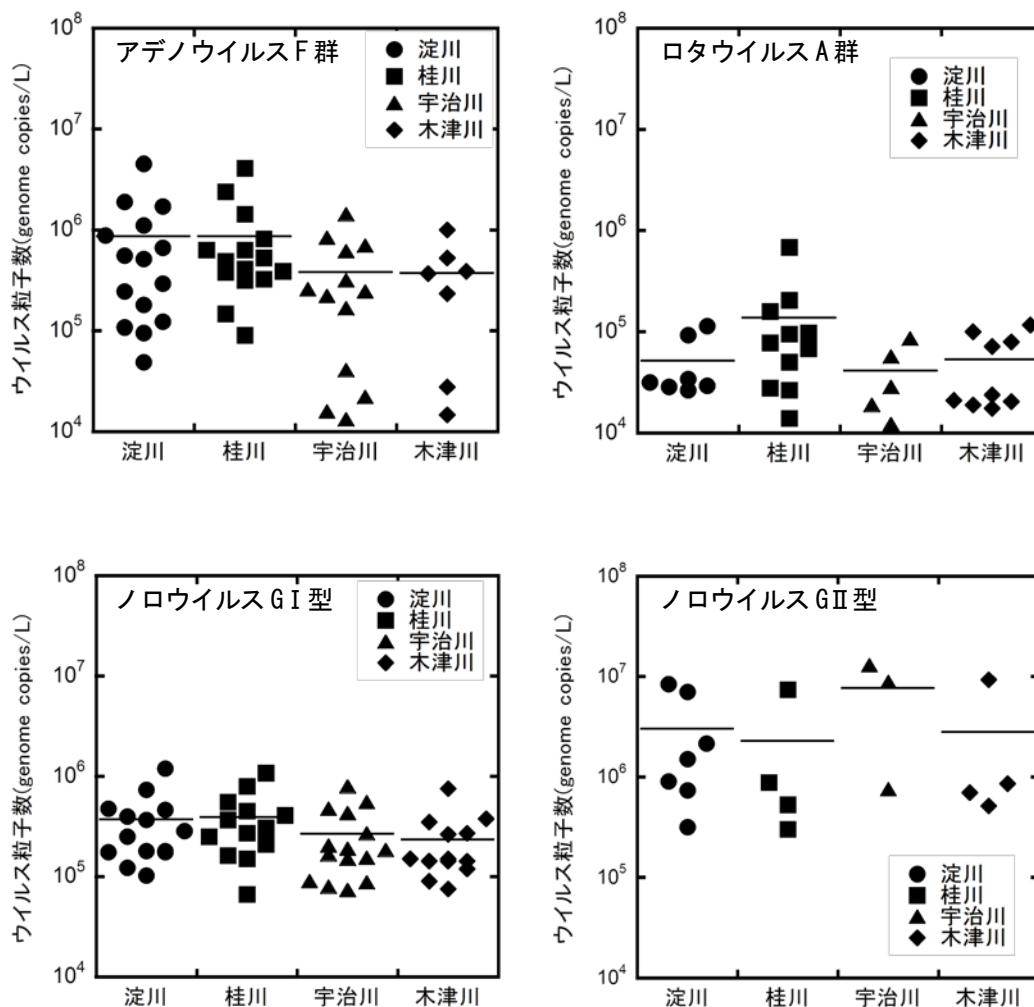


図 1 各河川での全ウイルス粒子数測定結果

恒常的にリスクが高いウイルス種であることが確認された。

続いて、各河川間の比較を行う。アデノウイルス、ロタウイルス濃度は桂川において最も高い傾向を示した。一方でノロウイルスについては河川間で大きな差は確認されなかった。桂川の採水地点の上流には鳥羽環境保全センターで処理された下水処理水の放流口がある。下水処理中には高濃度に病原ウイルスが存在することが明らかになっており、本研究における流域においても下水処理水中に存在するウイルスが水環境中のウイルス濃度に影響を与えていると考えられる。

続いて、PMA-qPCRによるウイルス数測定結果を図 2 に示す。また、各河川での定量 PCR と PMA-qPCR の検出結果を表 4 にまとめる。

PMA-qPCR の結果、定量 PCR より濃度が低下するあるいは全く検出しないケースが多く確認された。つまり、河川水中に存在するウイルスの一部は膜損傷を起こしており、感染価を保有していないウイルス粒子として存在している可能性が指摘された。

続いてウイルス間での検出数の比較を行った。全試料における各ウイルス粒子(qPCR) の検出率はアデノウイルス F 群で 78%、ロタウイルスで 50%、ノロウイルス GI 型で 86%、ノロウイルス GII 型で 38%であった。アデノウイルス F 群やノロウイルス GI 型は淀川水系での検出率が淹あことから病原リスクが高いウイルス種であることが確認された。

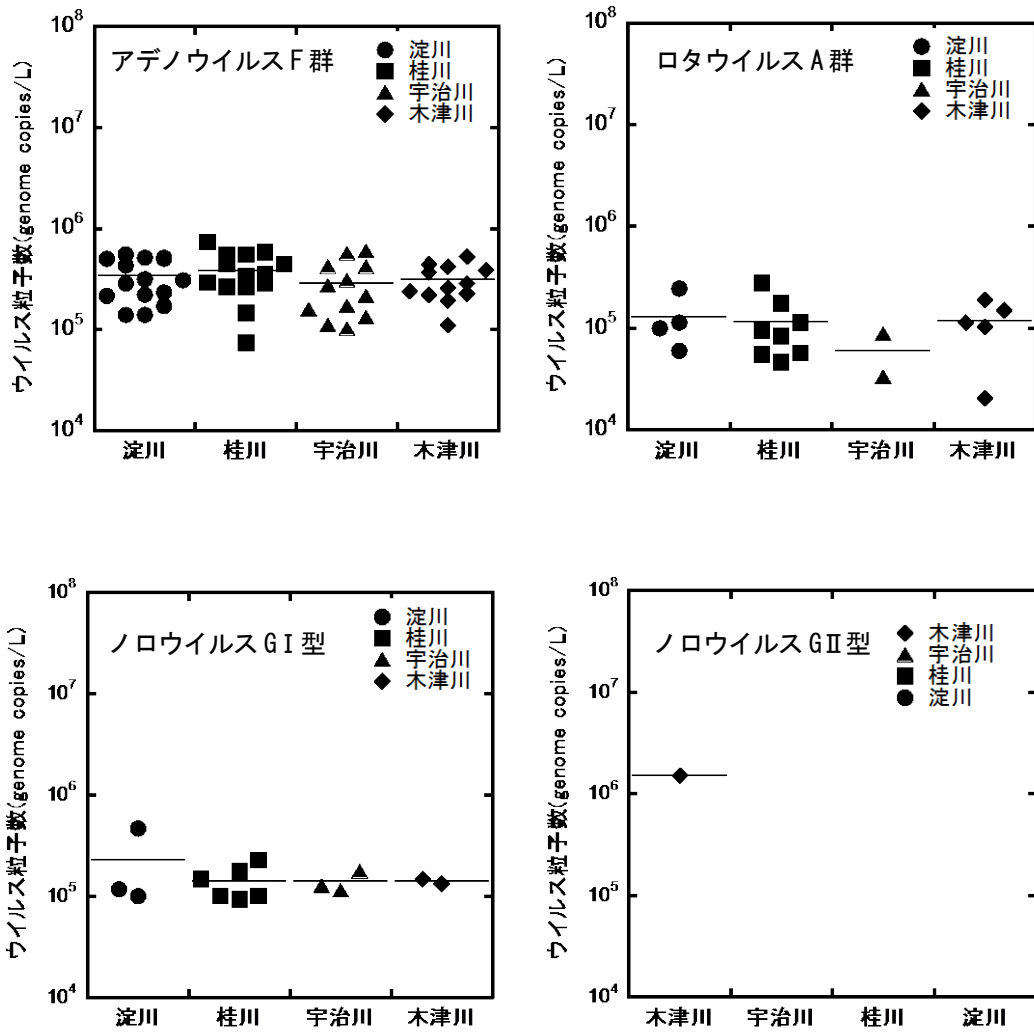


図 2 各河川での膜損傷を有していないウイルス粒子数の測定結果

表 3 各河川での定量 PCR と PMA-qPCR の検出結果

調査地点	アデノウイルス		ロタウイルス		ノロウイルスG I		ノロウイルスG II	
	qPCR	PMA-qPCR	qPCR	PMA-qPCR	qPCR	PMA-qPCR	qPCR	PMA-qPCR
宇治川	81% (13/16)	68.75% (11/16)	31.25% (5/16)	12.50% 2/16	94% 15/16	19% 3/16	25.0% 3/12	0% 0/12
木津川	43.75% (7/16)	87.50% (14/16)	56.25% (9/16)	31.25% 5/16	81% 13/16	13% 2/16	33.33% 4/12	8.33% 1/12
淀川	93.75% (15/16)	75% (12/16)	43.75% (7/16)	25% 4/16	88% 14/16	19% 3/16	58% 7/12	0% 0/12
桂川	93.75% (15/16)	68.75% (11/16)	68.75% (11/16)	50% 8/16	81% 13/16	38% 6/16	33.33% 4/12	0% 0/12
計	78.13% (50/64)	75% (48/64)	50% (32/64)	29.69% 19/64	85.94% 55/64	22% 14/64	37.5% 18/48	2% 1/48

全試料における膜損傷を有していないウイルス粒子の検出率はアデノウイルス F 群で 75%, ロタウイルス A 群では 30%, ノロウイルス GI で 22%, ノロウイルス GII で 2% となった。PMA-qPCR についても qPCR の結果と同様にアデノウイルス F 群の検出率が高いが、ノロウイルス G I 型は検出率が大幅に下がる傾向が確認された。さらに他の qPCR の検出率と PMA-qPCR の検出率の結果の比較を踏まえると、アデノウイルス F 群の減少率が最も低く、水環境中で高濃度に存在し、かつ水環境水中での安定性が高いことが明らかとなった。

3.2. メタゲノム解析による河川水中ウイルスの存在把握

淀川16 試料を用いてメタゲノム解析を実施した。結果として、14 種類のウイルス科が確認された。全試料で確認できたウイルス属は、T4likevirusであった。その中で藍藻類に感染する *Synechococcus phage* が多く検出された。また大腸菌に感染する *Enterobacteria phage* が16 試料中9 試料に確認された。その中で *Enterobacteria phage phix174* が7 試料でその存在が確認され、特に冬季のサンプルでその存在が確認された。しかし、病原ウイルスとしてはほとんど確認されなかった。今後解析を進めていくためには、解析に必要な十分量のウイルス核酸試料の確保といった技術的な課題を解決する必要があると言える。

3.3. 健康影響評価に基づいた微生物学的安全性確保のための要求処理能の推定

本研究では淀川の定量データを用いて、水浴ならびに水道水飲用による病原微生物の健康影響の定量化を試みた。しかし、各ウイルスの感染リスクは感染確率 100%となったため、本研究では WHO が設定した参照リスクである 10^6 DALYs pppy に対してそれを下回るために必要な各病原ウイルスの要求処理能について算出した。結果を図3にまとめる。

まず本研究では実際に起こりうる健康影響を含めた上で必要な要求処理能の比較ができたことが大きな成果と言える。そして比較した結果、アデノウイルス F 群が水浴で $6.4 \log_{10}$ (平均値)、水道水飲用で $8.7 \log_{10}$ (平均値)と要求処理能が最も大きいことが確認され、アデノウイルスの制御の重要性が示唆された。またノロウイルス G I 型はそれぞれ $4.9 \log_{10}$ (平均値)、 $6.8 \log_{10}$ (平均値)、ノロウイルス G II 型はそれぞれ $5.5 \log_{10}$ (平均値)、 $7.4 \log_{10}$ (平均値)、ロタウイルスはそれぞれ $5.0 \log_{10}$ (平均値)、 $7.2 \log_{10}$ (平均値)となった。ウイルスは種によっては消毒耐性が強いウイルスも存在することからも、本研究で得られた要求処理能は非常に高い結果であったと推察できる。そのため、河川あるいは水道水の微生物学的安全性の確保には浄水処理だけでなく下水処理でのウイルス制御、ならびに水環境中の病原ウイルスのモニタリングが重要であると考えられる。

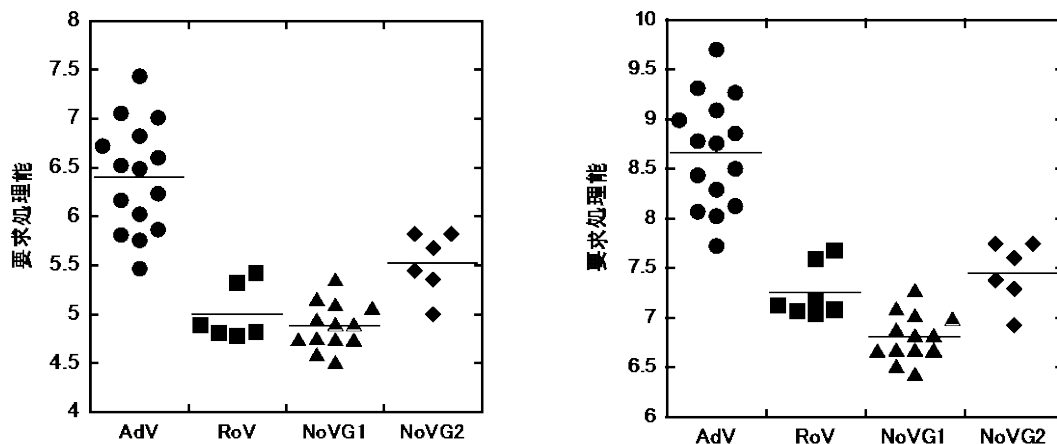


図3 WHO 参照リスク(10^6 DALYs pppy)を満たすのに必要な要求処理能(左：水浴、右：水道水飲用)(AdV:アデノウイルス F 群、RoV:ロタウイルス A 群、NoVG1:ノロウイルス G I 型、NoVG2:ノロウイルス G II 型)

4. まとめ

本研究では、淀川水系を対象とし、病原ウイルスの濃度を測定するとともに、淀川での水浴、水道水飲用を推定した場合の健康影響の定量化を試みた。以下に得られた知見を述べる。

- 1) 各河川でアデノウイルス、ロタウイルス、ノロウイルスの存在を確認した。
- 2) アデノウイルスが他のウイルスと比較して高濃度かつ高頻度に検出し、膜損傷も少ないことから水環境中でのアデノウイルスの安定性を確認した。
- 3) 水浴、水道水飲用を想定し、健康影響の定量化に基づいて要求処理能を推定した結果、アデノウイルスが他のウイルスと比較して要求処理能が大きいことが明らかとなった。そのため、水環境中のアデノウイルスの制御の重要性が示唆された。
- 4) 算定した要求処理能は非常に高いため、河川ならびに水道原水としての微生物学的安全性の確保には下水処理でのウイルス制御、ならびに水環境中の病原ウイルスのモニタリングが重要であることを指摘した。

<参考文献>

- 1) 山田俊郎, 秋葉道宏: 最近 10 年間の水を介した健康被害事例, 保健医療科学, Vol. 56, No. 1, pp.16-23, 2007.
- 2) Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S.: Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments, *J. Appl. Microbiol.*, Vol.103, No.6, pp.2153-2159, 2007.
- 3) Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S. : One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan, *Water Res.*, Vol.42, No.6, pp.1441-1448. 2008.
- 4) Kishida, N., Morita, H., Haramoto, E., Asami, M., Akiba, M.: One-year weekly survey of noroviruses and enteric adenoviruses in the Tone River water in Tokyo metropolitan area, Japan, *Water Res.*, Vol.46, pp.2905-2910, 2012.
- 5) Lion, T., Baumgartinger, R., Watzinger, F., Matthes-Martin, S., Suda, M., Preuner, S., Futterknecht, B., Lawitschka, A., Peters, C., Pötschger, U. *et al.* : Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease, *Blood*, Vol. 102, No. 3, pp. 1114-1120, 2003.
- 6) Zeng, S.-Q., Halkosalo, A., Salminen, M., Szakal, E., Puustinen, L., Vesikari, T. :One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis, *Journal of virological methods*, Vol. 153, No. 2, pp. 238-240, 2008.
- 7) 国土交通省: 「下水道におけるクリプトスポリジウム検討委員会」最終報告全文, URL: <http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewerage/info/kuriputo/all000704.html> (2017年3月31日時点).
- 8) Havelaar, A. H., Melse, J. M.: Quantifying public health risk in the WHO Guidelines for drinking-water quality; A burden of disease approach, Report 734301022, RIVM, Bilthoven, the Netherlands, 2003.
- 9) Havelaar, A. H., Haagsma, J. A., Mangen, M. J., Kemmeren, J. M., Verhoef, L. P., Vijgen, S. M., Wilson, M., Friesema, I. H., Kortbeek, L. M., van Duynhoven, Y. T., van Pelt, W.: Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009, *Int. J. Food Microbiol.*, Vol.156, pp.231-238, 2012.
- 10) McBride, G. B., Stotta R., Miller, W., Bambic, D., Wuertz, S.: Discharge-based QMRA for estimation of public health risks from exposure to stormwater-borne pathogens in recreational waters in the United States, *Water Res.*, Vol.47, pp.5282-5297, 2013.
- 11) Haas, C. N., Rose, J. B., Gerba, C. P.: Quantitative Microbial Risk Assessment. Wiley, NY., 1999.
- 12) Teunis, P. F. M., Moe, C. L., Liu, P., Miller, S. E., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J., Calderon, R.: Norwalk virus: how infectious is it?, *Journal of Medical Virology*, Vol.80, pp.1468-1476. 2008.