

とがわかった。ベースケースで用いたC/E値はマース川で測定された値であり、本浄水場の原水の値ではない。QMRAの評価値の精度を向上させるためには、本浄水場の原水でのC/E値の調査を進める必要性が高い。また、本研究では*E. coli*を用いて除去能の評価を行なったが、可能であれば*Campylobacter*濃度そのものを測定するのが望ましい。

処理前後の微生物濃度データをベアリングする方法についても、方法が異なると年間感染確率は19倍も差がみられた。適切なデータのベアリング方法を選択してからQMRAを行なう必要があるといえる。

#### 4. 結 言

オランダの浄水場を取り上げたケーススタディにおいて、*Campylobacter*の年間感染リスクを評価した。まず、処理前後の微生物濃度データのベアリング方法としてはランク法を使用し、モンテカルロシミュレーションによって4つの処理ステップの総合除去・不活化能を評価したところ、中央値 $7.46\log_{10}$ 、平均値 $6.22\log_{10}$ を得た。年間感染確率の平均値は $1.68 \times 10^{-3}$ /人/yearと評価され、水道水中*E. coli*濃度がほぼすべて0であるにもかかわらず、目標値 $10^{-4}$ /人/yearよりも大きな値となった。感度分析の結果から、処理水中*E. coli*濃度に対してはオゾン処理が最も大きく影響することがわかった。

一方、*E. coli*摂取量に対する感度分析結果からは、飲水量が最も大きく影響することがわかった。これは飲水量データが、48%の人がまったく水道水を飲まない統計データであることによる。飲水量データの統計的扱いを適切な方法で行なわないと、感度分析に混乱を招くおそれがあり注意すべきである。これを回避するためには、少なくとも離散モデルであるポアソンモデルよりも指数モデルのような連続モデルを用いるほうが好ましい。

以上の結果、年間感染確率を低下するためには、オゾン処理を適切に管理し、微生物を確実に不活化することが最も有効と指摘できる。

不確実性分析の結果、浄水処理における除去能に対する水温の影響、病原微生物数と指標微生物

数の比の影響、処理前後の微生物濃度データのベアリング方法の影響が大ききことを示した。これらをもとに、QMRAの評価値の精度を向上させるために必要な事項、および収集する必要性が高いデータを指摘した。

#### 謝 辞

本研究の実施にさいし、協力と助言をいただいたオランダKWR Watercycle Research InstituteのGertjan Medema博士、およびPatrick Smeets博士に謝意を表す。

#### —参考文献—

- 1) Haas, C. N., Rose, J. B., Gerba, C. P. 著, 金子光美監訳: 水の微生物リスクとその評価, p.452, 技報堂出版, 東京(2001).
- 2) Medema, G. J., Loret, J. F., Stenström, T. A., Ashbolt, N. eds.: *MICRORISK ; Quantitative Microbial Risk Assessment in the Water Safety Plan*, Final Report on the EU MicroRisk Project, EC, Brussels(2006).
- 3) 伊藤禎彦: オランダにおける塩素を使用しない水道システムの管理, 水道協会雑誌, 79(10)(2010)(印刷中).
- 4) De Moel, P. J., Verberk, J. Q. J. C., van Dijk, J. C.: *Drinking Water : Principles and Practices*, p.413, World Scientific Publishing Co., Singapore(2006).
- 5) Risebro, H. L., Doria, M. F., Yip, H., Hunter, P. R.: Chapter 1 Intestinal illness through drinking water in Europe, In *MICRORISK ; Quantitative Microbial Risk Assessment in the Water Safety Plan*(Medema, G. J., Loret, J. F., Stenström, T. A., Ashbolt, N. eds.) (2006).
- 6) Smeets, P. W. M. H., Medema, G. J., van Dijk, J. C.: The Dutch secret : how to provide safe drinking water without chlorine in the Netherlands, *Drink. Wat. Eng. Sci.*, 2, 1~14(2009).
- 7) 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, 56(1)16~23(2007).
- 8) 金子光美編著: 水道の病原微生物対策, p.255, 丸善, 東京(2006).
- 9) Hijnen, W. A. M., Dullemeijer, Y. J., Medema, G. J.: Weesperkarspel site report, *Catchment Survey & Monitoring Program, MICRORISK*(2005).
- 10) van Lieverloo, J. H. M., Blokker, E. J. M. J., Medema, G. J.: Chapter 5 Contamination during distribution. In *MICRORISK ; Quantitative Microbial Risk Assessment in the Water Safety Plan*(Medema, G. J., Loret, J. F., Stenström, T. A., Ashbolt, N. eds.) (2006).
- 11) van Lieverloo, J. H. M., Blokker, E. J. M. J., Medema, G. J.: Quantitative microbial risk assessment of distributed drinking water using faecal indicator incidence and concentrations, *J. Wat. Health*, 5(Suppl. 1) 131~149(2007).
- 12) Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E., Medema, G. J.: *Additional memo including rapid sand filtration, GAC*

- Filtration and Direct Filtration to Elimination of Microorganisms by Drinking Water Treatment Processes*, Kiwa NV, Nieuwegein, The Netherlands (2005).
- 13) Smeets, P. W. M. H., Dullemont, Y. J., Medema, G. J. : *E. coli* as surrogate for *Campylobacter* inactivation at bench-scale and full-scale and high ozone resistance of environmental *E. coli* and *Campylobacter*, 17th IOA Conference, 22~26 August 2005, Strasbourg, France (2005).
- 14) Smeets, P. W. M. H., Dullemont, Y. J., van Gelder, P. H., van Dijk, J. C., Medema, G. J. : Improved methods for modelling drinking water treatment in quantitative microbial risk assessment ; a case study of *Campylobacter* reduction by filtration and ozonation, *J. Wat. Health*, 6(3)301~314(2008).
- 15) 伊藤禎彦, Smeets, P. W. M. H., Medema, G. J., 宋金姫 : 定量的感染リスク評価における浄水処理プロセスの流入・流出水濃度のデータベアリング方法, 第44回日本水環境学会年会講演集, 75(2010).
- 16) Dullemont, Y. J., Schijven, J. F., Hijnen, W. A. M., Colin, M., Magic-Knezev, A., Oorthuizen, W. A. : Chapter 2 Removal of microorganisms by slow sand filtration. In *Recent Progress in Slow Sand and Alternative Biofiltration Processes* (Gimbel, R., Graham, N. J. D., Collins, M. R. eds.), p.12~20, IWA Publishing, London, UK (2006).
- 17) Evans, J. R., Olsen, D. L. 著, 服部正太監訳 : リスク分析・シミュレーション入門—Crystal Ballを利用したビジネスプランニングの実際—, pp.353, 構造計画研究所/共立出版, 東京(1999).
- 18) Mons, M. N., van der Wielen, J. M., Blokker, E. J. M., Sinclair, M. I., Hulshof, K. F. A. M., Dangendorf, F., Hunter, P. R., Medema, G. J. : Estimation of the consumption of cold-tap water for microbiological risk assessment: an overview of studies and statistical analysis of data, *J. Wat. Health*, 5(Suppl.1)151~170 (2007).
- 19) Teunis, P., van den Brandhof, W., Nauta, M., Wagenaar, J., van den Kerkhof, H., van Pelt, W. : A reconsideration of the *Campylobacter* dose-response relation, *Epidemiol. Infect.*, 133(4)583~592(2005).
- 20) Petterson, S., Singor, R., Ashbolt, N., Roser, D. : Chapter 7 QMRA methodology. In *MICRORISK ; Quantitative Microbial Risk Assessment in the Water Safety Plan* (Medema, G. J., Loret, J. F., Stenström, T. A., Ashbolt, N. eds.) (2006).
- 21) Asano, T., Leong, L. Y. C., Rigby, M. G., Sakaji, R. H. : Evaluation of the California wastewater reclamation criteria using enteric virus monitoring data, *Wat. Sci. Technol.*, 26(7-8)1513~1524(1992).
- 22) WHO : *Guidelines for Drinking-Water Quality, 3rd edition*, WHO, Geneva, Switzerland (2004).
- 23) Smeets, P. W. M. H. : *Stochastic modeling of drinking water treatment in quantitative microbial risk assessment*, Water Management Academic Press, Delft, The Netherlands (2008).

(原稿受付日 ; 2010年 4月 3日)

(原稿受理日 ; 2010年 5月26日)

## (15) ブロモデオキシウリジン修飾 DNA 量に基づいた浄水中の従属栄養細菌数迅速推定法の開発

浅田 安廣<sup>1\*</sup>・大河内 由美子<sup>2</sup>・伊藤 禎彦<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 (〒 615-8540 京都府京都市西京区京都大学桂)

<sup>2</sup> 京都大学大学院地球環境学堂地球益学廊 (〒 615-8540 京都府京都市西京区京都大学桂)

\* E-mail: asada@urban.env.kyoto-u.ac.jp

水道水中の微生物汚染の指標である従属栄養細菌に着目して、微生物の DNA 合成時に 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) により DNA を標識し、定量することでそれらの迅速測定を試みた。まずモデル微生物を用いて BrdU ラベル化反応条件を検討し、BrdU 濃度を 1  $\mu$ M と設定した。この条件により得られた標識 DNA を細胞固定化法、DNA 固定化法の 2 種類の 방법으로固定化して定量したところ、両手法ともに  $10^1 \sim 10^3$  CFU/mL の範囲で定量性が確認され、測定時間は約 2 日間に短縮された。最後に水道水中の従属栄養細菌数測定に適用したところ、測定値の変動がより少ないこと、また感度の点から DNA 固定化法の方が有用性が高いことを示した。

*Key Words* : drinking water, BrdU labeling, heterotrophic bacteria, immobilization method, distribution system

### 1. はじめに

日本の水道水は塩素消毒剤を注入・残留させることで病原微生物の再増殖能を抑制し、感染リスクを低下させている。その一方で、塩素消毒によりカルキ臭が発生し快適性が低下することから、需要者の水道水離れが進んでいる<sup>1)</sup>。またカルキ臭のみならず、トリハロメタン等といった消毒副生成物の生成による健康影響も問題視されている。そのため、現在では残留塩素濃度の低減が提案されている。しかし残留塩素低減を実行する場合、塩素によりこれまで抑制されていた微生物再増殖やバイオフィーム形成などの問題が引き起こされる可能性がある。そのため、残留塩素濃度と微生物再増殖との関係が重要となり、各処理過程並びに給配水過程での微生物の挙動が重要視されるようになった。

従属栄養細菌数は、浄水処理過程や消毒過程での微生物の挙動評価、塩素消失や滞留の結果としての微生物再増殖に代表される給配水過程での微生物汚染の評価に適している<sup>2)</sup>として、2007年の水道水質基準の改正により水質管理目標設定項目として追加され、データの蓄積が進められている。しかし、その測定には7日間の培養期間を要することから、給配水時間が1~2日間程度と短い我が国の水道システムにおいて、従属栄養細菌数測定結果のフィードバックによる水質管理

は難しいと考えられる。上水試験法には培養によらない検出法としてアクリジンオレンジ染色法や DAPI 染色法、ATP 法などが記載されている<sup>3)</sup>。DAPI 染色などによる測定法は生きているが培養できない状態になった細菌や死滅した細菌も区別なく検出するという問題点がある。また ATP 法に関しては、死滅した微生物から遊離した ATP も存在する<sup>3)</sup>ことから、消毒後の浄水中の ATP 量で微生物数の定量を正確に行うのは困難であると予想される。そこで、現行の培養法に代わる迅速測定法が必要である。

こうした背景を踏まえて、本研究では微生物再増殖の指標として従属栄養細菌を取り上げ、5-ブロモ-2'-デオキシウリジン (以下、BrdU と記載) を用いた核酸標識法 (以下、BrdU ラベル化法と記載) により従属栄養細菌数の迅速測定を試みた。この方法は、微生物増殖に伴う DNA 合成時にチミジンの類似体である BrdU を用いて標識を行い、BrdU 標識 DNA 量の定量を行う手法であり、培養細胞の増殖アッセイによく使用される。そのため水道水中の従属栄養細菌についても、BrdU を添加した培地上で短時間培養を行うことにより、DNA 合成活性を有する微生物のみを検出することが可能となると考えられる。しかし、微生物検出を目的とした検討では、海洋微生物の生産速度測定<sup>4), 5)</sup>への適用が報告されているのみである。そこで微生物数

の測定法として適用するために、DNAのBrdUラベル化反応条件ならびに検出条件を検討する必要がある。

そこで本研究では、まずモデル微生物を使用し、BrdUラベル化反応条件として微生物数を定量的に測定可能なBrdU濃度を検討した。そしてBrdU標識DNAの固定化法として、BrdUを取り込ませた微生物細胞をマイクロプレートに固定化して定量的測定を行う手法(以下、細胞固定化法と記載)と、抽出したBrdU標識DNAを直接マイクロプレートに固定化して抗原抗体反応を行う手法(以下、DNA固定化法と記載)を検討した。最後に、実際の浄水中の従属栄養細菌を対象として本手法を適用し、BrdUラベル化法の従属栄養細菌数迅速測定法としての適用性について検討した。

## 2. 実験方法

### (1) モデル微生物懸濁液の調製

モデル微生物として *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642; P17 株) および *Aquaspirillum* sp. NOX (ATCC 49643; NOX 株) を選定した。これらは元々水道水から単離された菌株であり、一般的に存在する微生物と考えられている。それぞれの微生物は使用する直前に R2A 液体培地 10 mL に植菌し、20±1 °C で約 2 日間の前培養を行った。その後、分光光度計 (MultiSpec-1200, 島津製作所) を用いて培養液の光学密度を波長 660 nm で測定し、あらかじめ算出した光学密度と平板培養によるコロニー数の関係式を用いておおよその微生物濃度を把握し、微生物濃度が  $10^1 \sim 10^5$  CFU/mL の範囲になるように、R2A 液体培地を用いて段階希釈を行い、BrdU ラベル化反応に供した。

### (2) BrdU ラベル化反応条件の検討

BrdU ラベル化法は、Hamasaki らによる方法<sup>9)</sup>を参考にし、多検体同時処理が可能となるよう 96 穴マイクロプレートに細胞増殖時に標識された BrdU 標識 DNA を固定化し、酵素抗体法を用いて BrdU 標識 DNA 量を吸光度として測定した。主な試薬については、BrdU Labeling & Detection Kit III (ロシュ・ダイアグノティクス) に同梱された試薬を用いた。それと同時に、リン酸緩衝液で 10 倍ごとに希釈した微生物懸濁液を用いて、R2A 寒天培地 (日本製薬) による平板法により、培養液中の微生物濃度を算出した。そして BrdU 標識 DNA 量と微生物濃度の関係を調べた。BrdU ラベル化反応および各インキュベーションは遮光状態で行った。

#### a) ラベル化反応における BrdU 濃度が BrdU 標識 DNA 量に及ぼす影響

BrdU 濃度が高濃度であると DNA 合成期におけ

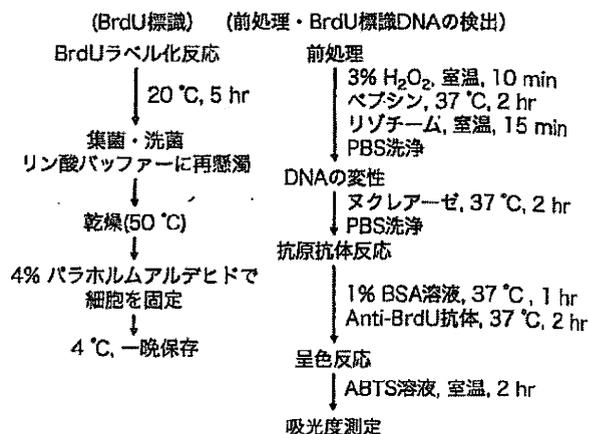


図-1 細胞固定化法の操作フロー

る BrdU の DNA への取り込み率があがると考えられる。一方で高濃度の場合には、BrdU の遺伝毒性により DNA 合成反応が妨げられる可能性もあると報告されている<sup>9)</sup>。そこで、BrdU 濃度を 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM と変化させ、最適な BrdU 濃度を検討した。

#### b) 細胞固定化法による BrdU 標識 DNA 量の定量方法

細胞固定化法の操作フローを図-1に示す。段階的に希釈した微生物懸濁液を用いて BrdU ラベル化反応 (20 °C, 5 時間) を行った後に 96 穴マイクロプレートへ 50  $\mu$ L ずつ分注し、等量の 99.5% エタノールを加え 50 °C で乾燥した。次に 99.5% エタノールを 100  $\mu$ L 加えて再度 50 °C で乾燥し、4% パラホルムアルデヒド緩衝液を 100  $\mu$ L 加えて 4 °C で一晩微生物細胞を固定した。固定液を除去した後に、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 100  $\mu$ L による内因性ペルオキシダーゼの不活化と 2 mg/mL ペプシン溶液 100  $\mu$ L と 3 mg/mL リゾチーム溶液 100  $\mu$ L による細胞壁の消化処理を順に行った。その後キットに同梱されたヌクレアーゼ溶液 100  $\mu$ L により DNA 変性を行い、1% ウシ血清アルブミン溶液 250  $\mu$ L を用いてブロッキングを行った。そしてペルオキシダーゼ標識 anti-BrdU 抗体 100  $\mu$ L を添加し、最後に ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) を基質として室温で呈色反応を行い、マイクロプレートリーダー (Model 550, Bio-Rad) により吸光度 (測定波長 405 nm, 対照波長 490 nm) を測定した。得られた吸光度 (すなわち、BrdU 標識 DNA 量) と平板法で求めた微生物濃度との関係を調べた。

#### (3) BrdU 標識 DNA 固定化法の比較

2. (2) で決定したラベル化条件を用いて、全体的な作業時間の短縮、抗原抗体反応の向上を目的として細胞固定化法と、DNA 固定化法を比較した。なお測定値を安定させるため、両手法ともに R2A 液体培地に BrdU を添加した試料をブランクとして設定した。

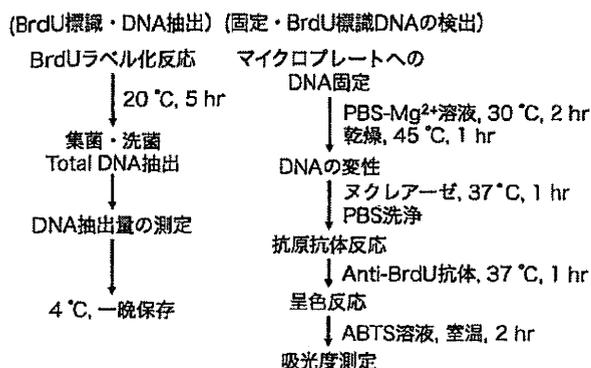


図-2 DNA 固定化法の操作フロー

a) 細胞固定化法による BrdU 標識 DNA 量の定量

BrdU 標識 DNA 量の定量は、2. (2) b) と同様に行った。

b) DNA 固定化法による BrdU 標識 DNA 量の定量

DNA 固定化法の操作フローを図-2 に示す。まず微生物数が  $10^1 \sim 10^6$  cells/mL の範囲になるように、R2A 液体培地を用いて 10 倍ごとの段階希釈を行った。そして R2A 液体培地 49.5 mL を入れた 2 本の 50 mL 遠心チューブに、段階希釈した溶液を 0.5 mL ずつ分注し、BrdU ラベル化反応 (20 °C, 5 時間) を行った。そして遠心分離により集菌・洗菌を行った後に、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて全 DNA を抽出した。抽出した DNA 濃度は Spectrophotometer (ND-1000, Thermo Scientific) により決定した。そして翌日マイクロプレートウェルへの DNA 固定化操作を行うため、DNA 抽出を確認できた試料は、遮光状態で 4 °C, 一晚保存した。続いて、抽出した DNA 溶液 200  $\mu$ L に対して 0.2 M PBS-Mg<sup>2+</sup> 溶液を等量加え、96 穴マイクロプレートに 100  $\mu$ L ずつ分注し、30 °C, 2 時間で DNA の固定を行った。その後ウェル内の溶液を取り除き、45 °C で乾燥を行った後、ヌクレアーゼ溶液を 100  $\mu$ L ずつ加えた。以降の anti-BrdU 抗体の添加、ABTS 基質溶液の添加、吸光度測定については、2. (2) b) と同様に行った。

(4) 浄水中の従属栄養細菌数測定への BrdU ラベル化法の適用

高度浄水処理水の給水区域として大阪市給水区域、急速ろ過処理水給水区域として京都市給水区域を選定し、2008 年、2009 年の冬期にそれぞれ 6 地点で給水栓水 100 mL のサンプリングを行った。チオ硫酸ナトリウム溶液を最終濃度が 0.003% となるよう添加しよく混合した後、遮光状態で 20 ± 1 °C で 6 日間培養した。なお塩素中和直後の試料を 0 日目とし、0, 2, 3, 4, 6 日目に試料を採取して従属栄養細菌数の測定を行った。それと同時に細胞固定化法・DNA 固定化法により

BrdU 標識 DNA 量を定量した。浄水中の従属栄養細菌数は非常に小さいことが予想されるため、R2A 寒天培地による平板法のみでは検出できない可能性がある。そこで、2 日目の試料は、通常法に加えてメンブレンフィルター法により測定を行った。この方法は、吸引ろ過によりメンブレンフィルター (C020G047A, ADVANTEC) 上に微生物を捕集し、メンブレンフィルターを R2A 液体培地を吸収させたパッドの上に乗せ、20 ± 1 °C で 7 日間培養した後、1 mL 中の微生物濃度を計算する方法である。なお微生物濃度は、平板法で検出限界を下回った際にのみメンブレンフィルター法で得られた値を採用した。得られた従属栄養細菌数の経時変化を用いて、各試料中の微生物群の比増殖速度、倍加時間を算出した。

(5) 統計解析方法

微生物濃度と吸光度の関係から得られた回帰式の有意性に関しては、Microsoft Excel 2004 の回帰分析ツールを用いて *p* 値を算出した。また Mac 多変量解析 Ver.1.0 (エスミ) を用いて、得られた回帰式の 95% 信頼区間を求めた。なお、0.05 よりも小さい *p* 値が得られた回帰式について有意性があると判断した。

3. 実験結果と考察

(1) BrdU ラベル化反応条件の検討

BrdU 濃度が吸光度に与える影響を、図-3 に示す。なおエラーバーは、測定値の標準偏差である。培養細胞を用いた実験結果から、BrdU を取込んだ DNA 濃度の対数値に対して吸光度はジグモイド型の応答を示し、良好な応答が見られる領域では、DNA 濃度の対数値と吸光度の間に一次線形関係を示したことが報告されている<sup>9)</sup>。その情報に基づいて、R2A 寒天培地で求めた微生物細胞数 (以下、HPC と記載) と吸光度の関係を調べたところ、HPC が 0.5 CFU/mL 以上の範囲では、吸光度と HPC の対数値に対して一次線形の関係が得られた。また HPC 濃度が高い領域では、およそ  $10^3$  CFU/mL を境に吸光度の減少が確認された。 $10^3$  CFU/mL 以下の濃度範囲では、P17 株、NOX 株ともに BrdU 濃度 1  $\mu$ M で最も大きな吸光度の変化が得られた。これと比較して BrdU 濃度 10  $\mu$ M では、P17 株では吸光度の変化量があまり変化が見られなかったのに対して、NOX 株では吸光度の変化量が大幅に減少した。この結果は、BrdU 添加濃度が高すぎると、BrdU の遺伝毒性により DNA 合成が抑制される可能性を示すと考えられる。BrdU は通常アデニンと結合するが、臭素原子置換基の電気陰性度が高いためにピリミジン環の

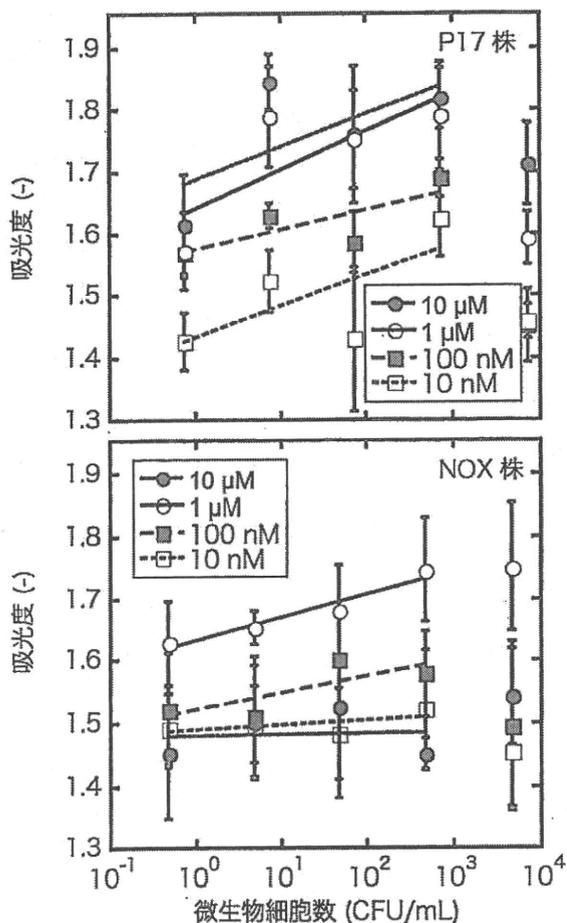


図-3 BrdU 濃度が BrdU 標識 DNA 量に与える影響 (n=3)

化学構造がケト型からエノール型に変化し、グアノシンと結合する場合がある。そして DNA に対してこれらの変異が導入された結果、DNA 合成が停止すると考えられている<sup>4)</sup>。以上から BrdU 濃度の条件を 1 μM と設定した。

## (2) BrdU 標識 DNA 固定化法の比較

### a) 細胞固定化法

決定した BrdU 添加濃度で、定量実験を 3 回繰り返し行った。そして、同一条件で得られた測定値を比較し吸光度変化量の変動幅について確認した。結果を図-4 に、回帰式を以下に示す。なおエラーバーは、測定値の標準偏差である。

(P17 株)

$$y = 0.023 \log(x) + 0.026 \quad (R^2 = 0.942) \quad (1a)$$

$$y = 0.029 \log(x) + 0.040 \quad (R^2 = 0.732) \quad (1b)$$

$$y = 0.029 \log(x) + 0.028 \quad (R^2 = 0.895) \quad (1c)$$

(NOX 株)

$$y = 0.041 \log(x) + 0.022 \quad (R^2 = 0.888) \quad (2a)$$

$$y = 0.033 \log(x) + 0.031 \quad (R^2 = 0.823) \quad (2b)$$

$$y = 0.033 \log(x) + 0.047 \quad (R^2 = 0.802) \quad (2c)$$

$10^{-1} \sim 10^3$  CFU/mL の範囲で直線性が得られ、P17 株の細胞数 1 log 当たりの吸光度変化量は 0.023 ~ 0.029、NOX 株は 0.033 ~ 0.041 と比較的安定した結果となった。また得られた回帰式に対して回帰分析を行ったところ、全ての回帰式に関して傾きが有意であると判断できた ( $p < 0.05$ )。HPC 濃度が高い領域では、各細胞で BrdU の取込みが均一に行われなかった、あるいはマイクロプレートのウェル内で確実に細胞が固定化されなかったなどの理由により、吸光度の低下が生じていると考えられる。そのため、HPC 定量可能範囲は、 $10^{-1} \sim 10^3$  CFU/mL であると判断した。この範囲は、水道システムにおける初期の微生物再増殖の挙動把握に対して有効であると考えられる。また本研究で採用した抗

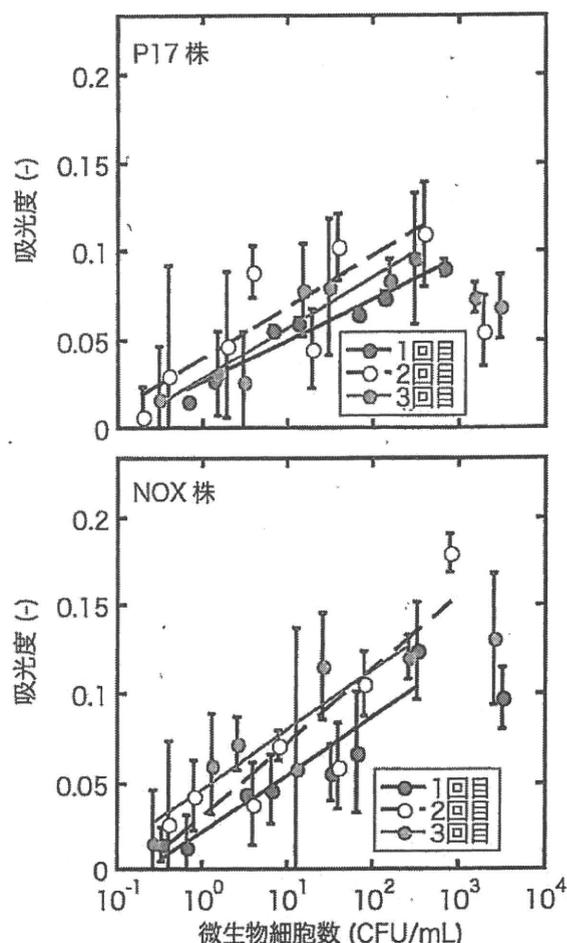


図-4 細胞固定化法による微生物細胞数と BrdU 標識 DNA 量の関係 (n=4)

原抗体反応は、ABTSを基質とした酵素酸化反応に基づいているが、内因性ペルオキシダーゼを不活化しているにも関わらず、酵素活性とは無関係な吸光度上昇が度々確認された。対象試料あるいは測定環境にその要因があると考えられるが、原因特定はできなかったため、ブランク値を用いた補正を試みた。直線性を示す範囲の下限微生物濃度  $10^{-1}$  CFU/mLでの吸光度の変動は、BrdU濃度の検討では1.383~1.636であったのに対して、ブランク値で補正を行った本実験の結果では-0.011~0.013と測定回ごとの変動幅が小さくなった。そのため、ブランク値補正により吸光度変動要因を除去することができ、BrdUによる発色量のみを測定することが可能になったと考えられる。しかし部分的に測定値が大きく変動しており、さらにP17株とNOX株では細胞数1 log当たりの吸光度変化量に若干ながら差が生じている。この原因として微生物細胞へのBrdUの取込み率が均一でないことや、細胞壁処理効果の違いが考えられる。細胞壁処理では、ペプシンとリゾチームを用いて微生物細胞壁を消化し、表面にDNAを露出させて抗原抗体反応を行っている。そのため、部分的に消化さ

れなかった細胞壁が残存すると、分子量の大きい抗体が通過することができず、抗原抗体反応効率が低下する可能性がある。またその他にも、微生物種間の増殖速度の違い、DNAのGC含量や微生物細胞当たりの核酸量といった要因が吸光度変化量に影響を及ぼす可能性も考えられる。約  $3.0 \times 10^8$  cellからDNAを抽出・精製した場合の微生物細胞当たりの核酸量は、P17株で7.87 fg/cell、NOX株で7.70 fg/cellとなりほぼ同じ値を示したため、微生物細胞当たりの核酸量が吸光度変化量に影響を与える可能性は小さいと考えられる。また一般的にGC含量は微生物種により異なることが知られており<sup>7,8)</sup>、BrdUはDNA2本鎖の構成成分であるチミジンの代わりに取込まれることから、DNA2本鎖中のGC含量により、吸光度変化量が変動する可能性がある。そのため、実際の浄水中の従属栄養細菌数測定に対して本手法を適用し、複合微生物系が測定値に及ぼす影響を確認する必要がある。一方、本手法によりHPC測定に要する時間は、約2日間に短縮された。

b) DNA固定化法

同一条件で3回測定を行い、得られた測定値の比較を行った。結果を図-5に、回帰式を以下に示す。なおエラーバーは、測定値の標準偏差である。

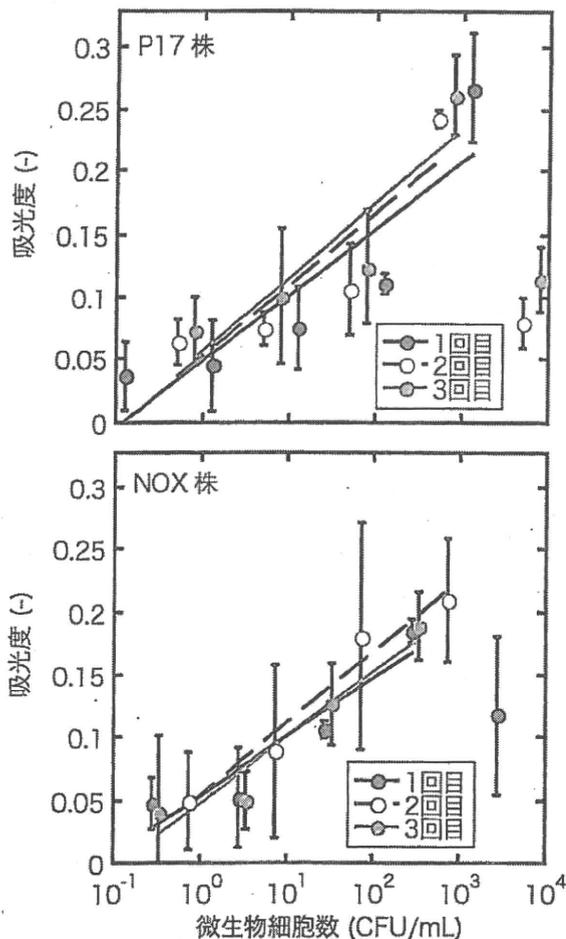


図-5 DNA固定化法による微生物細胞数とBrdU標識DNA量の関係 (n=3)

(P17株)

$$y = 0.053 \log(x) + 0.049 \quad (R^2 = 0.785) \quad (3a)$$

$$y = 0.057 \log(x) + 0.053 \quad (R^2 = 0.792) \quad (3b)$$

$$y = 0.059 \log(x) + 0.057 \quad (R^2 = 0.825) \quad (3c)$$

(NOX株)

$$y = 0.047 \log(x) + 0.054 \quad (R^2 = 0.883) \quad (4a)$$

$$y = 0.057 \log(x) + 0.054 \quad (R^2 = 0.960) \quad (4b)$$

$$y = 0.052 \log(x) + 0.048 \quad (R^2 = 0.930) \quad (4c)$$

細胞数1 log当たりの吸光度変化量はP17株で0.053~0.059、NOX株で0.047~0.057と多少変動があるものの、両株とも類似かつ比較的安定した値を示した。そしてこれらの吸光度変化量は、細胞固定法を用いた場合に得られた値よりも増大した。この理由としては、細胞壁処理方法の違いが強く影響していると考えられる。細胞固定化法の場合、細胞をマイクロプレートに固定してから細胞壁処理を行っているため、消化しきれなかった細胞壁が残存などの理由により、抗原抗体反応効率が低下した可能性がある。一方DNA固定化法は、微生物濃度が小さいためDNA抽出効率を

100%と考えると、抽出段階で細胞壁を完全に除去しているため、抗原抗体反応への妨害がなく、より大きな吸光度変化量が得られたと考えられる。また、P17株とNOX株それぞれの吸光度変化量はほとんど同じであったことから、DNAに取込まれたBrdU量はP17株、NOX株でほぼ同程度と考えられる。また得られた回帰式に対して回帰分析を行ったところ、全ての回帰式の傾きに関して有意性があると判断できた( $p < 0.05$ )。一方、細胞数が多い場合については、やはり吸光度の低下が確認されており、この原因としてマイクロプレートへのDNA固定が不完全である、あるいはDNAが重層された状態で固定化されたことにより、DNA変性をはじめとした抗原抗体反応の効率が低下した可能性が考えられる。細胞固定化法と同様、直線性が得られる範囲は $10^{-1} \sim 10^3$  CFU/mLと判断した。また、細胞固定化法が両日ともに1日当たり約12時間の作業時間を要するのに対して、DNA固定化法では1日目が約10時間、2日目が約8時間と更なる時間短縮が可能となった。

### (3) 浄水中の従属栄養細菌数測定へのBrdUラベル化法の適用

残留塩素中和後、全ての給水栓試料で再増殖が確認された。そこで、0~6日目まで測定された従属栄養細菌数データを用いて、各試料の最大比増殖速度( $\mu$ )および倍加時間( $t_b$ )を算出した。水道水中微生物の倍加時間は、DNA合成時間とも密接に関係すると考えられるため、水道水試料を対象としたBrdUラベル化反応時間決定の際の有用な情報となる。2008年冬期の測定結果では、最も小さい比増殖速度は通常処理水の場合で $0.056 \text{ hr}^{-1}$ 、高度浄水処理水の場合には $0.049 \text{ hr}^{-1}$ であり、これらは倍加時間で考えると12.4時間、14.2時間にそれぞれ相当した。また2009年冬期の測定結果では、最も小さい比増殖速度は通常処理水で $0.075 \text{ hr}^{-1}$ 、高度浄水処理水で $0.045 \text{ hr}^{-1}$ であり、これらを倍加時間に換算すると、9.8時間、15.3時間となった。Hamasakiらは、微生物の倍加時間が25時間以内であれば、5時間のBrdUラベル化反応時間で検出可能と報告している<sup>4)</sup>。今回得られた倍加時間を考えると、採用したラベル化反応時間5時間は妥当であると判断でき、水道水試料中の従属栄養細菌の核酸がBrdUにより十分に標識されたと考えられる。

続いて、水道水中で再増殖した従属栄養細菌に3.(2)で検討した2種類の固定化法を用いてBrdU標識DNA量を測定し、細菌数との関係を調べた。なお細胞固定化法は2回、DNA固定化法は1回、一連の測定を行った。細胞固定化法、DNA固定化法で得られた結果をそれぞれ図-6に示す。ここでプロットについては、従属栄養細菌数が測定可能であったもののみ記載した。 $10^1$  CFU/mL以下の領域では両手法ともにブランクにより補正した吸光度がほぼ0あるいは負の値を示し、正確な測定ができていないと考えられる。さらに $10^3$  CFU/mL以上の領域では、吸光度が低下する傾向が確認された。そこで、 $10^{-1} \sim 10^3$  CFU/mLの領域で回帰式を算出し、95%信頼区間と合わせて図-6に示した。得られた回帰式を以下に示す。

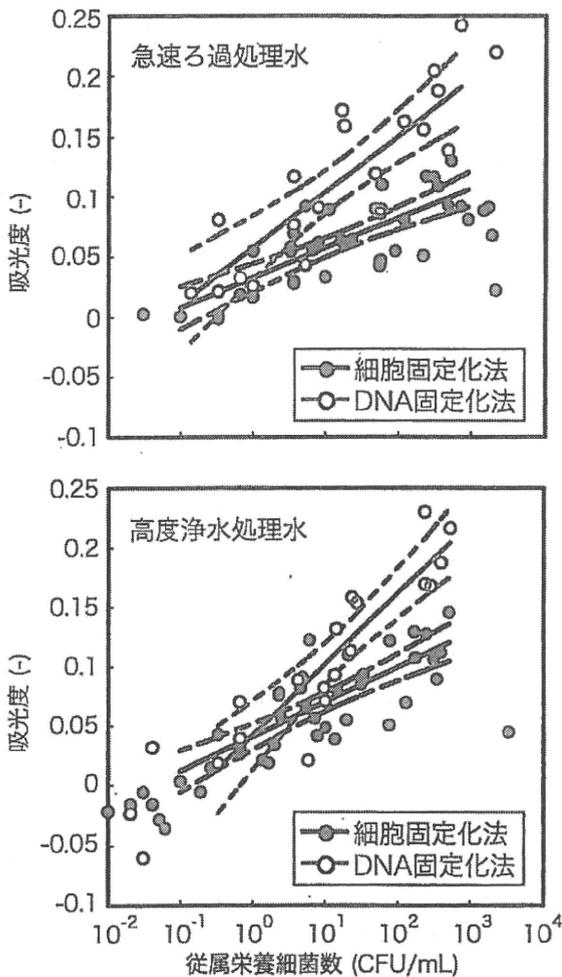


図-6 給水栓試料で再増殖した従属栄養細菌数とBrdU標識DNA量の関係

(急速ろ過処理水)

〈細胞固定化法〉

$$y = 0.025 \log(x) + 0.032 \quad (R^2 = 0.632) \quad (5a)$$

〈DNA固定化法〉

$$y = 0.048 \log(x) + 0.056 \quad (R^2 = 0.711) \quad (5b)$$

(高度浄水処理水)

〈細胞固定化法〉

$$y = 0.030 \log(x) + 0.040 \quad (R^2 = 0.643) \quad (6a)$$

〈DNA固定化法〉

$$y = 0.059 \log(x) + 0.047 \quad (R^2 = 0.806) \quad (6b)$$

その結果、従属栄養細菌数の対数値と吸光度の間に一次線形の関係が得られた。急速ろ過処理水を対象とした場合の決定係数は細胞固定化法で  $R^2 = 0.632$ , DNA 固定化法で  $R^2 = 0.711$  であった。また高度浄水処理水では、細胞固定化法で決定係数が  $R^2 = 0.643$ , DNA 固定化法で  $R^2 = 0.806$  であり、ともに正の相関が確認された。そのため、細胞固定化法、DNA 固定化法ともに  $10^1 \sim 10^3$  CFU/mL の範囲で定量性があると判断した。回帰式の傾きから細胞数 1 log あたりの吸光度変化量は 2 つの固定化法ともに高度浄水処理水の方が大きいことが確認された。この原因として、従属栄養細菌数の測定誤差が考えられる。培養法による従属栄養細菌数測定は、上水試験法<sup>3)</sup>に従って7日間で形成される集落を確認している。急速ろ過処理水と高度浄水処理水で再増殖した細菌のコロニーを比較すると、高度浄水処理水の方には視認が困難な非常に小さいコロニーが数多く確認された。そのため、培養法による高度浄水処理水の従属栄養細菌数測定結果は、実際に存在する従属栄養細菌数よりも若干低い値を示している可能性があり、その影響で細胞数当たりの吸光度変化量が大きくなったと考えられる。また、今回の水道水試料で得られた細胞数 1 log あたりの吸光度変化量は、モデル微生物で検討した際のそれと同程度の値となった。

3. (2) で検討した 2 種類の固定化法が BrdU 標識 DNA 量に及ぼす影響を比較すると、細胞数 1 log あたりの吸光度変化量は細胞固定化法で 0.025 程度、DNA 固定化法では 0.050 程度と約 2 倍の値を示した。これもモデル微生物で得られた結果と同様の傾向を示しており、DNA 抽出により細胞壁処理の影響を排除することでより大きな吸光度変化量が得られることを示している。3. (2) で述べたように、モデル微生物を用いた場合においても、同一試料の測定値の変動が抑制できなかったことを考慮すると、細胞数 1 log あたりの吸光度変化量が大きいほど微生物数推定値の誤差を低減可能であると言えるため、水道水中の従属栄養細菌数測定には DNA 固定化法を採用することが望ましい。また、細胞固定化法では 95% 信頼区間をはずれる吸光度値が半数程度存在する。これと比較すると、DNA 固定化法で得られた吸光度値の方が変動幅が抑制できていると考えられる。そのため、DNA 固定化法の方がより信頼度が高い手法であると言える。さらに前述の通り、DNA 固定化法では 1 日あたりの作業時間がより短縮されている。以上から、浄水中の従属栄養細菌数推定法として、DNA 固定化法がより有用性が高い推定法であると判断できる。

しかし、DNA 固定化法を用いた場合でも、式 (5b), (6b) からわかるように細胞数 1 log の変化に伴う吸光度

の変化量は 0.05 前後と非常に小さく、従属栄養細菌数の推定精度を向上させるためには、より鋭敏かつ特異的な BrdU 標識 DNA の検出方法を模索していく必要があると考えられる。具体的には、anti-BrdU 抗体濃度を上げて BrdU に対して結合可能な抗体量を増やす、あるいは酵素反応の特異性及び反応性を高めるために、吸光度測定を行う場合は ABTS 以外の基質として TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) を使用する、さらに蛍光強度測定を行うなどの方策が挙げられる。

#### 4. 結論

本研究では水道システムにおける微生物再増殖指標として従属栄養細菌をとりあげ、BrdU ラベル化法によるその迅速推定手法を提案した。まずモデル微生物を用いて、BrdU ラベル化反応条件について検討し、BrdU 濃度を  $1 \mu\text{M}$  と決定した。そしてこの条件を用いて合成された BrdU 標識 DNA を対象として、細胞固定化法と DNA 固定化法を比較検討した。その結果、細胞固定化法、DNA 固定化法ともに  $10^1 \sim 10^3$  CFU/mL の範囲で細菌数の対数値との間で直線性が確認できた。最後に実際の水道水中の従属栄養細菌数を対象として、BrdU 標識 DNA 量に基づいた従属栄養細菌数測定を適用した。両手法ともに  $10^1 \sim 10^3$  CFU/mL の範囲で定量性が確認された。測定に要する時間も 2 日間に短縮でき、両手法の有用性が示された。2 種類の固定化法を比較した結果、細胞数 1 log あたりの吸光度変化量が大きいこと、1 日の作業時間がより短いことから、DNA 固定化法を用いた BrdU ラベル化法が浄水中の従属栄養細菌数の迅速推定法としてより有用性が高いと結論づけた。

謝辞: 本研究の成果の一部は、厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業, H20-健危-一般-006, 代表者 島崎大)によるものである。記して謝意を表す。

#### 参考文献

- 1) 伊藤 禎彦, 越後信哉: 水の消毒副生成物, 技報堂出版, 2008.
- 2) 厚生科学審議会: 水質基準の見直し等について(答申), 2003.
- 3) (社) 日本水道協会: 上水試験方法, 日本水道協会, 2001.
- 4) Hamasaki, K., Long, R. A. and Azam, F.: Individual cell growth rates of marine bacteria measured by bromodeoxyuridine incorporation, *Aquat. Microb. Ecol.*, Vol. 35, No. 3, pp. 217-227, 2004.

- 5) Steward, G. F. and Azam, F.: Bromodeoxyuridine as an alternative to  $^3\text{H}$ -thymidine for measuring bacterial productivity in aquatic samples, *Aquat. Microb. Ecol.*, Vol. 19, pp. 57-66, 1999.
- 6) Muir, D., Varon, S. and Manthorpe, M.: An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures, *Anal. Biochem.*, Vol. 185, pp. 377-382, 1990.
- 7) Belozersky, A. N. and Spirin, A. S.: A correlation between the compositions of deoxyribonucleic and ribonucleic acids, *Nature*, Vol. 182, pp. 111-112, 1958.
- 8) Lobry, J. R.: Influence of genomic G + C content on average amino-acid composition of proteins from 59 bacterial species, *Gene*, Vol. 205, pp. 309-316, 1997.

(2010.05. 21 受付)

## Development of a prompt estimation method for heterotrophic bacteria in drinking water based on the amount of DNA labeled with bromodeoxyuridine

Yasuhiro ASADA<sup>1</sup>, Yumiko OHKOUCHI<sup>2</sup> and Sadahiko ITOH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University

<sup>2</sup>Dept. of Global Ecology, Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University

Advanced monitoring of regrown bacteria is highly required to minimize microbiological risk in water supply systems with lower chlorine residual. In this study, DNA labeling method with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) during short time incubation was applied to estimate promptly heterotrophic bacterial counts in distributed water. The DNA amounts labeled with BrdU were increased linearly with the logarithmic values of cell counts in the range of  $10^1 \sim 10^3$  CFU/mL. The cell counts could be estimated within 2 days. BrdU concentration for labeling reaction was determined as 1  $\mu\text{M}$  using two kinds of model bacterial strains. Then, two different immobilization methods of DNA labeled with BrdU, cell-immobilization and DNA-immobilization, were compared using both model bacterial strains and heterotrophic bacteria in water samples. It was suggested that DNA immobilization method had a better sensitivity and a smaller variation for an estimation of heterotrophic bacteria in drinking water than cell immobilization method.

## 「事例報告」

## オランダにおける塩素を使用しない水道システムの管理

伊 藤 禎 彦

京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻  
教授・工博

要旨：オランダにおいて、いかに塩素を使用しない水道水の配水が可能になっているかについて論じた。まず、トリハロメタンが発見されてから2005年の完全停止に至るまで、30年以上の歳月をかけて、科学的な知識・技術、その実用化、行政的施策・体制などを積み重ねながら進めてきた点を強調した。微生物的安全確保の上で特筆されるのは、定量的感染リスク評価の実務への導入である。そこでは、水道水から微生物が検出されないからリスクゼロとするのではなく、リスク問題と真摯に向き合う姿勢がみられた。これに加えて、微生物的に安定な水の配水、配水管材質の選定を含む配水管内面での生物膜生成の制御、配水管網の維持管理など、実務上必要と考えられる方策を重ね合わせている。総じて、塩素を使用しないシステムとするために、配水系統で起きる現象を注意深く監視するとともに、維持管理を強力に行っている。安全方策を幾重にも設けることによって、はじめて塩素を使用しない水道水の配水を実現しているとみることができる。

キーワード：塩素消毒、残留塩素、AOC、リスク評価、定量的感染リスク評価※

分類項目：塩素及び塩素剤 (050702)、配水系の水質管理 (070503)、オランダ (140405)、健康リスク評価 (120106)

## 1. はじめに

オランダはかねてから水道水の消毒に塩素を使用しない国として有名である。筆者は2008年から2009年にかけて5カ月間 KWR 水道・水循環技術研究所 (KWR Watercycle Research Institute、以下、KWR と記す) に滞在し、特に定量的感染リスク評価 (Quantitative Microbial Risk Assessment; QMRA) に関する実務を行う機会を得た<sup>1)</sup>。本稿では、この滞在経験をもとに、オランダにおける塩素使用の停止の理由・背景、またそれを可能とするための方策などについて、筆者の考察を交えつつ紹介する。

## 2. オランダにおける塩素消毒停止の現状

トリハロメタン問題<sup>2-4)</sup>は周知のように、1972年、ライン川下流から取水していたオランダ、ロッテルダムの水道水中にクロロホルムが含まれている事実が報告されたことに始まる。1974年には、米国で、ミシシッピ川を水源とするルイジアナ市民に関する疫学調査結果が報告された。1976年には米国国立がん研究所が動物実験によってクロロホルムの発がん性を確認する。これがトリハロメ

タン問題の端緒ということが出来る。それらを受けて、米国環境保護庁は1979年、総トリハロメタン濃度を0.1mg/L以下(年間平均値)とする規制を開始する。わが国でも1981年になって、総トリハロメタン暫定制御目標値として0.1mg/L以下(年間平均値)が設定されるに至る。なお、トリハロメタンはロッテルダム市水道のルークによって発見されたとされるが、その発表に至る経緯や当時のオランダの対応などについては、芦谷<sup>5), 6)</sup>が詳述している。

トリハロメタンの発見と併行して、各国で塩素消毒の位置づけの根本的な見直し、浄水処理プロセスの再構築などが進められていった。塩素消毒そのものも、注入量の低減や、代替消毒剤の検討などが行われてきた。もちろんオランダでも同様の動きがみられるが<sup>7), 8)</sup>、この国に特徴的なのは、塩素消毒そのものを中止する浄水場も広まっていったことである。

オランダはかねてから塩素消毒を殆ど行っていない国としてわが国でも有名であった<sup>9)</sup>。しかし実は、全国で塩素が全く使用されなくなったのは

比較的最近のことなのである。

オランダで最後の塩素消毒を停止したのは、ロッテルダムをはじめとする南西地域へ配水している水道会社エビデスであり、2005年のことである。クロロホルムが世界で初めて発見されたのは、このエビデスがつべーレンプラート浄水場である。そこで国内で最後まで塩素を使用していたというのは、ある意味で皮肉なことといえよう。

ただ注意すべきなのは、確かに塩素使用を停止はしたが、二酸化塩素の使用 (UV 消毒も併用) に切り替えたという点である。二酸化塩素はいうまでもなく配水系での残留性を確保できる消毒剤である。筆者がべーレンプラート浄水場を訪問 (2008年) したとき、国内の他地域では塩素を停止したのに、ここで2005年まで停止できなかった理由を尋ねた。それに対して、配水系でのアエロモナスのリスクが依然として懸念され払拭できないからという回答であった。現段階では、残留性が確保できる二酸化塩素はまだ必要と考えており、懸念が払拭されれば将来的には止めたいと考えているという。

ここで重要な点は、1972年にクロロホルムが発見されてから2005年塩素使用の完全停止に至るまで、実に30年以上の歳月をかけて、一步一步進めてきているということである。この間、科学的に必要な知識・技術、その実用化、行政的施策・体制などをひとつひとつ積み重ねながら今日に至っている。塩素を入れないのは、文化が異なるから、リスクに対する考え方が異なるから、水温が低いから可能だったということでは決してない。実際、上記の例のように、微生物リスクの懸念がある場合には、塩素使用は停止したものの二酸化塩素を使用し残留性を確保しているのである。2010年現在、二酸化塩素を使用している浄水場はオランダ国内に数ヶ所ある (ただし給水末端までの残留性保持を要件としているわけではない)。

### 3. 塩素消毒停止の理由、可能であった背景

塩素消毒の停止に至る経緯は単純ではない。ここでは、停止の動機、塩素の役割と限界に関する認識、オランダという国で可能であった背景などについて紹介する。塩素なしを可能とするための技術・方策については別に4章で述べる。

## 3.1 塩素消毒停止への動きの理由

### (1) 消毒副生成物

トリハロメタンが世界で初めてこの国で発見されたインパクトが大きかったことは想像に難くない。トリハロメタン発見の後、中間塩素処理を含む塩素消毒の見直しや注入量の低減、オゾン—粒状活性炭を使用する高度処理の導入などの浄水処理プロセスの再構築などが進められていった<sup>7), 8)</sup>。しかしこのこと自体はわが国を含む多くの国に共通することであり、トリハロメタンの世界初の発見が塩素停止の決定的な理由とはいえないようである。

### (2) 味とにおい

塩素消毒停止への動きの大きな理由のひとつに味とにおいに関する問題があるという。これに対する苦情の影響<sup>9)</sup>が大きかったようである。

塩素が使われなくなった現在では、95%以上の人が水質と安全性に満足し信頼しており、89%の人が水質からみた料金水準に満足しているという統計もある<sup>10)</sup>。実際、味指数 (taste number) でみると、塩素使用時には値が大きかったが、塩素停止後は小さな値となり、苦情はなくなったという。ボトルウォーターの消費量も欧州の先進国と比べると極めて低く、このことはオランダ国民の水道水への満足度を反映したものであるとしている<sup>10)</sup>。現在、オランダにおいて、性状関連項目のうち改善ニーズが高いのは硬度である<sup>10)</sup>。

## 3.2 可能であった背景

オランダにおいて水道水源は、1/3が表流水 (浸透河過後の水を含む) であり、2/3は地下水である<sup>11)</sup>。表流水を水源としている地域は主として国の西部であり、地下水を水源としているのは東部、北部、南部地域である。汚染されたライン川とマース川の下流域に位置するこの国では、歴史的に、水源としては微生物的に安全な地下水が好ましいとされてきた<sup>7)</sup>。

そして地下水を水源としている地域では、数百年間、塩素を全く入れていないという。通常、地下水は微生物的に安定な水質であり、塩素を入れる必要がないという判断である。

このためこの国では、塩素を順次停止していくことに抵抗感が大きくないのである。それに対し

てわが国のように塩素を全国どこでも使用している国では、ある水道事業者が塩素使用を中止することは例外をつくることを意味し、容易なことではないだろう。ひとつの国の中で塩素をそもそも使用していない地域が広く存在していたことが、塩素停止する浄水場を増やし、さらには全面停止へ向けても動きやすかったということがいえる。

また、東部地域では、従来から塩素使用しておらず、カルキ臭がない。このため塩素注入されている西部地域と比べ、国内で味とにおいの差が顕著となる。このため西部地域でもカルキ臭を嫌う傾向が強かったという。塩素を入れなくなると、塩素を入れているところとの味とにおいの差が顕著となることから、さらに塩素をやめる方向に動いていったようである。

もちろんその他の背景要因も無視できない。経済力、地理的条件、人口密度などが間接的な関連因子と考えられる<sup>7)</sup>。

### 3.3 塩素の役割と限界に関する認識

先に述べたように一步一步塩素使用を回避してきているのであって、当然のことながらその間、塩素消毒の意義についても賛否交えた議論が長くなされてきた。その結果、現在では概ね以下のような認識に到達している。以下は Smeets らの報文<sup>7)</sup>から要約しつつ抜粋したものであるが、論点として4つがあげられている。

1) 英国及びフランス（最終消毒剤として塩素を使用）と、オランダ（塩素不使用）において、浄水場での浄水処理後の水について *E. coli* などの検出頻度を整理した。英国では0.02%のサンプルで *E. coli* 陽性であり、フランスでは1%のサンプルで大腸菌群が検出されている。これに対してオランダにおける2001-2003年の測定結果によれば、0.01-0.09%で *E. coli* または高温耐性大腸菌群が検出されている<sup>12)</sup>。国レベルではあるが、この検出頻度を塩素の有無で比較すると、塩素消毒を行っている方が極めて低いわけではなかった。

2) 配水過程で汚染が発生した場合、その汚染水には一般に有機物が多く含まれるので塩素は容易に消費されてしまう。汚染水（下水、表流水、土壌及び浅層地下水）中に含まれる粒子状物質に付着している微生物は、塩素から保護され不活化

されない。また、*E. coli* は容易に不活化されてしまうので、たとえ指標菌が検出されなくてもクリプトスポリジウムなどは不活化されず、結局リスクは残ることになる。総じて、残留塩素は配水過程での再汚染に対しては限定的な効果しか持たない。

英国及びフランス（塩素使用）と、オランダ（塩素不使用）において、配水過程の水について *E. coli* などの検出頻度を整理した。英国では0.03から0.04%のサンプルで *E. coli* 陽性であり、フランスでは0.4から1.0%のサンプルで大腸菌群が検出されている。これに対してオランダにおける2001-2003年の測定結果によれば、0.1%で *E. coli* または高温耐性大腸菌群が検出されている<sup>12)</sup>。これらのことは、塩素消毒を行わないことが、直接配水中での指標菌の検出頻度を高めているわけではないことを示している。この結論は、一部で消毒剤が残留していないドイツとの比較でも同じである<sup>13)</sup>。

3) 残留塩素は確かに細菌の再増殖を抑制する効果がある。これに対しオランダでは、AOC (Assimilable Organic Carbon; 生物同化可能有機炭素) 指標によって微生物的安定性を確保することによっても、再増殖は制御できるという考え方をとっている。

4) EU 諸国で発生した61の感染流行事例を分析した<sup>14)</sup>。このうち27事例は配水過程での問題（逆流、クロスコネクション、修理、漏水、低水圧）が原因のひとつと考えられたが、残留塩素は感染流行を防止するために十分な役割を果たせなかった。感染流行の他の原因としては、浄水処理での不具合や原水汚染があげられたが、これらのケースでも塩素消毒が有効なバリアとはなっていない。また、ほとんどの感染流行は残留塩素が保持されている配水システムでおきているのも事実である。

以上はこれまでの議論を Smeets らがとりまとめたものであり、オランダにおける塩素なしの水道システムの合理性を支持する内容となっている。ただ、上記の範囲では、多くが国レベルでの比較に基づいて議論されている点には注意が必要で、この考察のみをもって塩素は不要という結論を導くことはできないし、オランダもそう考えている

わけではない。

4. 塩素なしでの給配水を可能にするための方策  
 塩素を使用せず安全な水道水を配水するためにはさまざまな方策が必要である。ここでは水源の水質保全、浄水場での運転管理、給配水システムの衛生管理など一般的な事項ではなく、塩素なしでの給配水を実現するのに直接関係する事項、あるいはオランダに特徴的にみられる事項に焦点をあてる。

4.1 水源確保と浄水処理におけるマルチバリア

まずは、良好な原水を確保することが基本であることは論をまたない。国際河川であるライン川やマース川の下流域・河口域に位置するオランダでは特に重要である。その考え方は以下のとおりである<sup>7)</sup>。

1) 微生物的に安全な地下水を用いるのがもっとも好ましい。地下水の取水位置の周囲には、概ね地下で60日程度の流達時間が確保できるように保全区域が設定されている。

2) 表流水の場合は、なるべく浸透ろ過させた後取水し、これを原水とするのがよい。

3) 特に表流水を直接原水としなければならない場合には、浄水処理システムを、多くのユニットプロセスを重ねた処理システム（マルチバリアシステムと呼ばれる）とする。

なお、地下水使用が好ましいとされるものの、表流水の割合は次第に増加する傾向にあり、2007年現在で38.6%に達している<sup>10)</sup>。

表流水を直接原水とし、浄水処理プロセスとしてマルチバリアシステムを備えている代表的な処理フローを図-1に示す<sup>11)</sup>。水道会社ウォーターネットがもつライダイク浄水場のプロセスであるが、大きな特徴は、凝集・沈殿—急速砂ろ過による前処理を行った水を砂丘に導いて浸透ろ過処理<sup>12)</sup>を行っていることである。砂丘浸透させる水を蓄えた運河・浸透池の様子を写真-1に示す。この水が土壤に浸透し、60-400日滞留した後、集水管などによって水路に集められる。また、その後、オゾン—粒状活性炭処理を行っているが、このいわゆる高度処理水を緩速砂ろ過処理している点も大きな特徴である。この他、PWN北ホラント州水道がもつヘムスカーク浄水場では、オゾン—粒状活

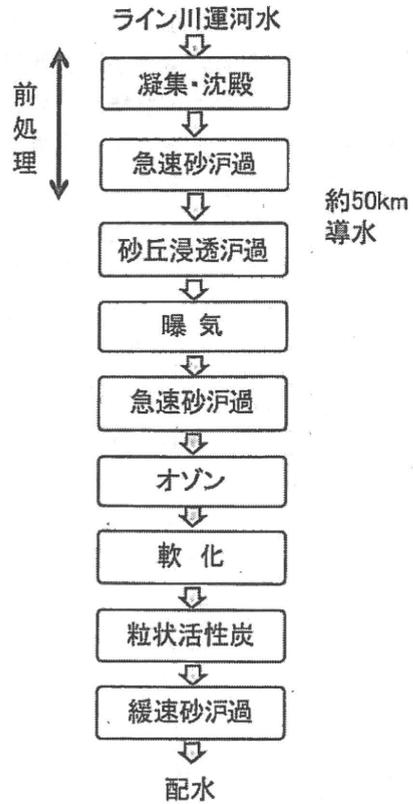


図-1 ウォーターネット・ライダイク浄水場におけるマルチバリアシステム



写真-1 砂丘と浸透ろ過させる水を蓄えた運河・浸透池 (ウォーターネット・ライダイク浄水場)

性炭による高度処理水をなんと自然に返して浸透ろ過を行っている<sup>8)</sup>。

マルチバリアシステムを備える目的は、汚染河川の下流に位置するためさまざまな汚染化学物質の除去や硝酸態窒素の除去など多様である。中で

も特徴としてあげられるのは、処理プロセスにおける微生物の除去・不活化を重要な目的として位置づけている点である。浄水処理プロセスでの微生物の除去・不活化能を評価する研究<sup>17)</sup>も数多く行われており、例えば、砂丘などによる浸透汙過処理では  $8 \log_{10}$  以上の高い除去能を期待できる<sup>18),19)</sup> などの結果が得られている。砂丘浸透汙過については、芦谷<sup>20),21)</sup>が、微生物の除去・不活化に加えて、水量確保、希釈、水質の平準化などの機能について論じている。さらに、マルチバリアシステムでは、4.3で述べる AOC 濃度の低減も重要な目的となっている。

ただ、周知のように、近年は膜汙過の導入が進んでいる。膜汙過では、除去対象物質を明確にでき、その除去能も確定的であることから、筆者は水質変換マトリックスの観点から、マルチバリアシステムを備える必要は必ずしもなく浄水処理システムの再構築が可能であろうと考えている。実際、ヘムスカーク浄水場では、一部の水についてUFとROで処理を行っているが、この水は（あたりまえのことだが）浸透汙過には回されていない<sup>8),11)</sup>。

4.2 QMRA

上述した良好な原水の確保や浄水処理におけるマルチバリアシステムの構築に加えて、オランダの水道水質管理において特筆されるのは、水道水の微生物的安全性を確保するため、定量的感染リスク評価 (QMRA) の手法を実務に導入していることである。オランダにおける現行の水質基準<sup>22)</sup> は2001年から施行されているものであるが、そのうち微生物に関する項目を表-1に示す。上述したアエロモナスなど4つの項目（うち3つは運転管理上の基準）があるが、注目すべきは、これに加えて、「QMRAによって、腸管系ウイルス、クリプトスポリジウム、ジアルジア等の年間感染リスクが $10^{-4}$ 以下と評価されること」という項目が存在することである。こんな項目があるのは世界でここだけである。

すなわち各水道会社は、法律によって、自分たちが供給する水道水の微生物感染リスクを定量評価し提示することが義務付けられている（主として表流水を原水とする場合）。そして、感染リス

表-1 オランダにおける微生物に関する水質要件 (2001年施行)

項 目	基 準 値
QMRAによって、腸管系ウイルス、クリプトスポリジウム、ジアルジア等の年間感染リスクが $10^{-4}$ 以下と評価されること	
大腸菌と腸球菌	0 CFU/100mL
アエロモナス <sup>a</sup>	1,000 CFU/100mL以下
従属栄養細菌 (22℃における形成集落数) <sup>a</sup>	100 CFU/mL以下
大腸菌群とクロストリジウム <sup>a</sup>	0 CFU/100mL

a : 運転管理基準

クが年間 $10^{-4}$ 以下の安全な水道水を供給する義務を負う。QMRAの手法自体はオランダが構築したわけではなく、学術的成果は別にある<sup>23)</sup>。しかしQMRAの手法を水道水供給の実務の場に適用しているという点では、世界の中でオランダが抜きん出ている。筆者が滞在したKWRは、オランダ国内でQMRAの重要性を認識させ、法律によって評価を義務付けることに成功しているのである。そして、実務者が扱いやすいようにソフトウェアのインターフェイスを構築し、QMRA toolとして各水道会社に配布している。

ある浄水場の浄水についてリスク評価を行った例<sup>7)</sup>を図-2に示す。腸管系ウイルス、カンピロバクター、クリプトスポリジウム、ジアルジアの結果を示している。“要求除去能”とは、原水中微

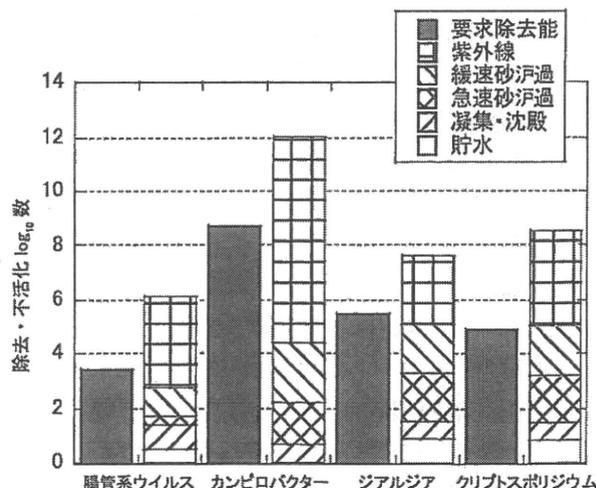


図-2 微生物に対する要求除去能と保証除去能の評価例<sup>7)</sup>

生物濃度と $10^{-4}$ リスクレベルを満足する微生物濃度から、浄水処理で除去・不活化することが要求される  $\log_{10}$  数を計算したものである。これに対して、この浄水場がもつ貯水、凝集・沈殿、急速・緩速砂濾過、UV で期待できる除去・不活化  $\log_{10}$  数を積み上げている。“要求除去能”が示す  $\log_{10}$  数は $10^{-4}$ レベルを意味するので、例えば 2  $\log_{10}$  大きければ $10^{-6}$ レベルであることを意味する。こうしてこの浄水場では、4種の微生物について、塩素消毒を行わなくても十分安全な水道水を生産できることを示している。ただしこの感染確率値については、表-1に示す他の水質項目のように一般の人がウェブ等を通じて容易にアクセスできるほどには情報公開は進んでいない。

さて筆者は、水道会社ウォーターネットがもつヴェスバカスブル浄水場を対象としてQMRAを行う機会を得た<sup>24-26)</sup>。浄水場の処理フローは、凝集—貯水（滞留時間89日）—急速砂濾過—オゾン処理—軟化—粒状活性炭—緩速砂濾過である。もちろん塩素消毒は行われておらず、緩速砂濾過が「最終消毒装置」とみなされている。*E. coli*を指標微生物とし、カンピロバクターの年間感染リスクを評価した。

塩素消毒を行わないので、緩速砂濾過処理後の水は配水される水道水そのものである。2系列について合計1,393回（2003年～2004年）のデータをみたが、さすがに*E. coli*については、1回検出例（0.2 *E. coli*/100mL）があるほかはすべて0であった。

しかし、 $10^{-4}$ リスクレベルを満足する微生物（細菌、ウイルス、原虫）濃度とは100～10,000<sup>m3</sup>に数単位というレベルである<sup>27)</sup>。したがって、この分野では一般に、微生物の測定値が0であることをもってリスクゼロと考えるのは非常に初歩的な段階であると考えられている。

このため筆者は、処理プロセスの除去・不活化能をひとつひとつ丁寧に評価<sup>28)</sup>することとした。緩速砂濾過後の*E. coli*測定値はほぼ全て0なので、そのままでは緩速砂濾過の除去能を評価することができない。そこで、パイロットスケールで行われた緩速砂濾過による*E. coli*の除去実験結果を用いた。先述したようにこの国では、処理プ

ロスにおける微生物の除去・不活化能の評価<sup>17)</sup>は、わが国よりもはるかに重要視されている。こうして処理プロセスの総合除去・不活化能をモンテカルロシミュレーションによって計算したところ、中央値7.46  $\log_{10}$ 、平均値6.22  $\log_{10}$ を得た。処理水中の*E. coli*濃度がほぼ全て0であるにもかかわらず除去率を100%とは考えず、上記除去・不活化能を有すると評価している点が重要である。この結果、水道水中*E. coli*濃度の計算値は0にはならない（平均値 $1.64 \times 10^{-4}$  *E. coli*/100 mL）。表流水で測定された比率を用いて*E. coli*数をカンピロバクター数に換算し、カンピロバクターによる年間感染確率を計算した。結果として、平均値 $1.68 \times 10^{-3}$ /人/年を得た。注目されるのは、水道水の*E. coli*測定値がほぼ0であるにも関わらず、年間感染確率はその目標値である $10^{-4}$ より大きな値となったことである。これは、微生物の測定値が0だから感染リスクもゼロであると片づけるのではなく、なんとか定量化しようとしたからこそ得られた値である。リスク問題と真正面から向き合うとはこういうことをいうのだろう。

この成果をもとに、感度分析によって重要管理点（この浄水場の場合、オゾン処理）を指摘した<sup>29)</sup>ほか、不確実性分析と組み合わせることで、今後情報の集積が必要な個所を指摘することができた<sup>25)</sup>。

このようなQMRAの手法について、EU諸国では、MICRORISKプロジェクトとして体系的に実施して整備し、現段階での集大成をみている<sup>27)</sup>。

筆者がこの国で、高度処理を含むわが国の浄水処理プロセスについて話したとき、「こんなにきちんと処理しているのに、なぜその後、塩素なんか入れる必要があるのか？」という質問を何度も受けた。「浄水処理した後、塩素を入れるということは、処理後の水がまだ安全ではないということになってしまう。」これも複数の人から聞いた見解である。これらの発言は、決してお国柄や文化が違うからではなく、科学的根拠に基づいていることが上述したことで理解できると思う。

さて、このように微生物的安全性を確保しているわけだが、これは主として浄水場で作った処理水水質を対象としているという限界もある。年

間感染リスク $10^{-4}$ とは、本来は給水栓水で確保されるべき安全レベルである。しかし、容易に想像できるように、配水過程でおきる諸現象を取りこんでリスク評価を行うことは容易ではない。もちろん研究レベルではそのような検討も進められている<sup>12),29)</sup>。例えば、1994年から2003年までの10年間に、オランダで起きた水道水の汚染事故50例によって、影響を受けた人口は延べ185,000人と推定されている<sup>12)</sup>。しかしながら、実務上は、感染リスク値は浄水水質に対して評価しているという段階なのである。

また、一般に、QMRAでは、主として感染確率を推算することに焦点が当てられる。しかし、水系感染症には特性、重篤度、期間に大きな差があるのであって、本来は、感染後の健康影響の大きさ全体を測定する基準が必要である。これを可能にする基準がDALYs (Disability Adjusted Life Years; 障害調整生存年数)である<sup>30),31)</sup>。食品や水(水道水に加えて下水の再利用水なども含む)のDALYs指標による安全評価の分野<sup>32-34)</sup>でも、オランダが最も進んでいるとみられる。筆者の評価例<sup>26)</sup>でも、カンピロバクターの感染確率を計算するにとどまらず、配水地域におけるDALYsを推算した。ついでその健康影響がもたらすコストも試算した。このように現在では、感染確率値を提示する段階から、健康影響を直接記述する方向へ進んでいる<sup>35)</sup>。微生物的安全性に関する指標が、「微生物濃度」→「感染確率」→「DALYs」と変化してきていることに注目していただきたい。DALYsを用いた水質表示例は今後増えていくと予想される。

#### 4.3 微生物的に安定な水の配水

浄水水質レベルとはいえ、微生物的安全性を定量化し管理しているわけだが、それで十分とは考えず、幾重にも対策を講じている。はじめは、水道水中での微生物再増殖の制御である。もちろん、水道水中で検出される細菌数は、配管内面に生育した生物膜から離脱してくるものが大部分である<sup>36)</sup>。水道水からそのような細菌が検出されないように制御するという意味である。

もっとも有名なのが、van der Kooijら<sup>37)</sup>によるAOC指標の開発である。そして、実際の配水系

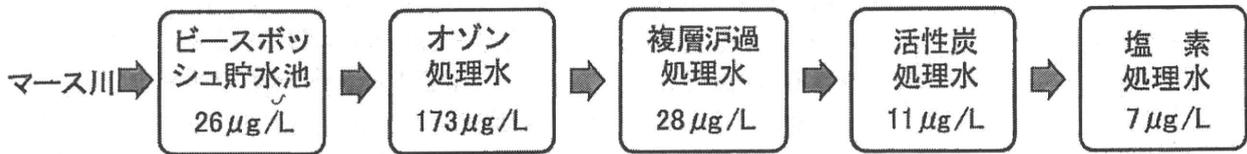
統において浄水処理後のAOC濃度と配水後の水中従属栄養細菌数には相関が認められること、また、配水管内でAOC濃度は低減するが、低減後もその値は $10-15\mu\text{g/L}$ 以下にはならないことを見出した。これらをもとに、水道水中の従属栄養細菌数の増大を制御するための目標値として $10\mu\text{g/L}$ を設定したのである<sup>38),39)</sup>。

ここで注意すべきは、AOC  $10\mu\text{g/L}$ 以下とは、細菌がまったく繁殖しない条件ではない点である。この値は、生物膜が形成されても、水道水中の細菌濃度が高くなるわけではないということを意味している。また、この濃度レベルでは細菌は水相でなお増殖可能である。これに対して筆者らは、低残留塩素条件下( $0.05\text{mg/L}$ )で許容できるAOC濃度として $11\mu\text{g/L}$ を提示した<sup>40),41)</sup>。この条件では水相で細菌は増殖できないので、配水管内で生物膜も形成しにくいとみなすことができる。

そして、目標値 $10\mu\text{g/L}$ をクリアするための浄水処理プロセスの構築をさまざまな形で行っている。1980年代にはAOC低減のためには粒状活性炭処理が効果的とされた<sup>8)</sup>が、現在ではそれに加えて、貯水、浸透沝過(砂丘浸透沝過、バンクフィルトレーション<sup>42)</sup>)、生物活性炭沝過、緩速砂沝過などの生物処理が有効と認識されている<sup>7)</sup>。この国の成功には、前処理過程を含めて、この生物処理が充実していることが大きく寄与していると考えられる。これらの生物が関与する処理プロセスは、無論微生物に対する除去・不活性化を有するが、水のAOC低減にも大きく寄与している。水温はわが国よりも低いが、それにもかかわらず生物沝過過程を重要なプロセスと位置付けているのである。

こうした検討や数々の調査研究の過程で、塩素を使用しなくても、AOCを用いて制御すれば、微生物的に安定な水の配水が可能との理解が次第に広まっていったのである。

浄水処理プロセスにおけるAOCの変化を測定した例を図-3に示す<sup>37)</sup>。図-3は $10\mu\text{g/L}$ 以下の低AOC濃度の水の生産に成功している例であるが、一般にAOC  $10\mu\text{g/L}$ 以下を達成するのは容易ではない。オランダにおいても $10\mu\text{g/L}$ 以上やさらには $20\mu\text{g/L}$ 以上となる水道水もしばしばあり、



注：1) 処理プロセスの全段階で測定されたわけではない。

2) 塩素が使用されているが、現在は二酸化塩素に切り替えられている。

図-3 浄水処理プロセス（水道会社エビダス・クラールンヘン浄水場）における AOC 濃度変化の測定例<sup>37)</sup>

浄水処理プロセスにおける対策や調査研究が継続されている<sup>43)</sup>。この低 AOC を達成する方法の中には、オゾン処理の中止も含まれる。オゾン処理はよく知られるように、AOC 濃度の増大をもたらす。このことと臭素酸イオンの生成を理由にして、PWN 北ホランド州水道のように、オゾン処理を回避し、促進酸化法である UV/過酸化水素法に移行した例もある<sup>44),45)</sup>。

#### 4.4 配水管内面での生物膜生成の制御

さて、浄水処理で安全な水を生産し、かつ微生物的に安定な水を配水すればそれで安心なはずだが、これにとどまらずさらに対策が講じられている。それは、微生物的に安定な水を配水している条件下で、配水管内面で実際に生物膜が生成していないかを監視し制御するものである<sup>46)</sup>。

##### (1) 生物膜生成に関する指標と監視

このために以下のいくつかの指標が考案されてきた。生物膜生成能 (Biofilm Formation Potential; BFP) ( $\text{pgATP}/\text{cm}^2$ )、生物膜生成速度 (Biofilm Formation Rate; BFR) ( $\text{pgATP}/\text{cm}^2 \cdot \text{日}$ )、レジオネラ増殖ポテンシャル (*Legionella* Growth Potential) である。

KWR に設置されている BFP 及び BFR の試験装置を写真-2 に示す。管を輪切りにしてカラムに詰め、試水を流して BFP や BFR を測定するためのものである。そして微生物的安定性は、AOC と BFR の2つのパラメータによって定義している<sup>39)</sup>。

レジオネラについてはオランダでは1999年のフラワーショーでの感染事故から関心が高まった。従属栄養細菌とは増殖至適条件が異なるため、BFP に加えてレジオネラ増殖ポテンシャル指標を考案したのである。写真と同様な装置であるが、

BBM (Boiler-biofilmmonitor) と呼ばれ、37-38°C でのレジオネラ増殖を調べている。かつ、このような BBM を国内の浄水場及び配水系統に設置してモニタリングを行い、レジオネラ増殖ポテンシャルの比較や制御に関する研究が続けられている<sup>47),48)</sup>。

##### (2) 配水管材質の選定

また、配水管についても生物的に安定な材質のものを使用するようにしている。その指標は上記の BFP である。

例えば、ポリ塩化ビニル (硬質 PVC)、テフロンは生物膜の生成量が少ない、可塑剤添加 PVC、ポリエチレンでは生物が生育しやすい、などの結果が得られている<sup>39),39)</sup>。典型的な BFP 値については、ガラスで  $10 \text{pgATP}/\text{cm}^2$  (陰性対照とみなしている)、硬質 PVC は  $20-50 \text{pgATP}/\text{cm}^2$  でありテフロンも同程度、ポリエチレンで  $500-3,000 \text{pgATP}/\text{cm}^2$ 、可塑剤添加 PVC で  $10,000 \text{pgATP}/\text{cm}^2$  程度と報告されている。

試験は、写真-2 と同様の装置を用いて、異な

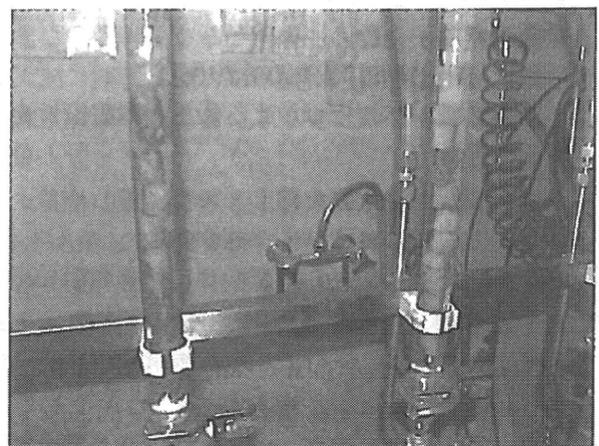


写真-2 生物膜生成試験装置 (KWR 所有)

る材質の管を輪切りにしてカラム内に入れ、生物膜の生成状況を調べる。KIWA は名称変更し KWR Watercycle Research Institute となったが、KIWA という組織は残っており、各種認証業務等を行っている。そして、すべての管材料は使用前に KIWA で試験しなければならないこととなっている。さらに、この試験方法を欧州での標準試験方法として整備しようとしている。

現在オランダで使用されている管の49%は硬質 PVC、29%が石綿セメント、9%が鋳鉄管である。生物的安定性に関する基準値があるわけではないが、上記の BFP 値を参考に、前二者が生物的に安定であることが、更新の際もこれらの使用が推奨される理由のひとつになっている(ただし、石綿セメントの BFP 値は不明)。なお、使用割合が増加しているのは硬質 PVC である<sup>51)</sup>。

#### 4.5 配水管網の維持管理

一方、漏水率を低下させることは配水過程での再汚染の防止に有効である。オランダでは2%程度と極めて低い漏水率を達成しており、これは世界一を誇る<sup>11)</sup>。

配水管網における洗管も頻度高く行われている。4~5年に1度程度といわれる<sup>49)</sup>ほか、2年に1度実施しているという水道会社ウォーターネットもある。洗浄方法は、ピグ洗浄よりもフラッシング洗浄が主体(1.5m/sec程度)である<sup>50)</sup>。近年、通常使用時の配水管網の流速を高めて(日に一度0.4m/sec以上の流速が出現するように設計)配水管内の自浄作用の効果を期待する考え方が提案されている<sup>51)</sup>。微粒子の上にも生物膜は形成されるから、微粒子は動く生物膜とみなされる。なお今後は、膜汚過の導入が進めば、配水管網に流入する微粒子数が格段に少なくなることが期待されている<sup>52)</sup>。

さらに、経年管も25年程度と非常に短いサイクルで更新が実施されているようである<sup>53)</sup>。

#### 4.6 水安全計画との関連

以上の各種方策は、水道事業全体からみると、水安全計画(Water Safety Plan)の一環として位置づけられている。運転管理上の衛生規準(Hygiene Code)含め、全体としては水安全計画の各要素としてとらえている<sup>54),55)</sup>。

また、リスク管理を行うためにソフトウェア MaRisk A を独自に開発して使用している<sup>54)</sup>。その考え方は WHO 飲料水水質ガイドラインに示されたものと同様であり、水源から蛇口までで抽出した危害事象に対して、発生頻度×重大性でスコアを計算する。その総合計が水道システム全体のリスクの大きさである。何らかの対策を講ずれば、発生頻度ないし重大性が低減するからスコアが小さくなる。これにより、必要な費用と、その対策によるスコアの低下量も計算できる。これを用いれば、対策の優先順位や費用対効果の議論を行うことが可能になる。

#### 5. おわりに

本稿では、オランダにおいて、いかに塩素を使用しない水道水の配水が可能になっているかについて論じたが、わが国の水道システムの将来を展望する上で参考にできる点が多々あると考えられる。

微生物的安全確保の方策で特筆されるのは、QMRA の実務への導入であることを述べた。ここでは、水道水中から微生物が検出されないからリスクもゼロであると片づけるのではなく、なんとか定量化しようとする。リスク問題と真摯に向き合っている姿をみることができるといえる。

また、浄水水質として低感染リスク値を得て安心するのではなく、実務上必要と考えられる方策を重ね合わせていることを紹介した。総じて、塩素を使用しないシステムとするために、配水システムで起きる現象を注意深く監視するとともに、しっかり維持管理を行っているといえる。安全のための方策を幾重にも設けることによって、やっと塩素を使用しない水道水の配水を実現しているとみることができる。

なお、このように高度な管理を実施しているオランダ水道であるが、コスト<sup>15)</sup>については、一般家庭における水道料金は平均1.43€/m<sup>3</sup>(2007年)とそれほど高くはない。また家庭内での水使用原単位は128L/人・日(2007年)で、家計に占める水道料金の比率は0.6%となっている<sup>10)</sup>。

## 参 考 文 献

- 1) 伊藤慎彦: オランダ・ユトレヒト滞在記、環境衛生工学研究、Vol. 23, No. 1, pp. 28-32 (2009)
- 2) 丹保憲仁編著: 水道とトリハロメタン、技報堂出版、p. 273 (1983)
- 3) 米国環境保護庁編、眞柄泰基監訳: 飲料水とトリハロメタン制御、公害対策技術同友会、p. 334 (1985)
- 4) 「近代水道百年の歩み」編集委員会: 近代水道百年の歩み、日本水道新聞社、p. 303 (1987)
- 5) 芦谷和芳、ロッテルダム水道とルーク博士 (その1)、水道事業研究、第114号、pp. 74-79 (1986)
- 6) 芦谷和芳、ロッテルダム水道とルーク博士 (その2)、水道事業研究、第115号、pp. 77-87 (1986)
- 7) P. W. M. H. Smeets, G. J. Medema, J. C. van Dijk: The Dutch secret: how to provide safe drinking water without chlorine in the Netherlands, *Drink. Wat. Eng. Sci.*, Vol. 2, pp. 1-14 (2009)
- 8) J. C. Kruithof: Disinfection by-product formation: Dutch approach of control strategies, pp. 23-30, *Disinfection By-products in Drinking Water: Current Issues*, M. Fielding and M. Farimond eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK (1999)
- 9) 島崎大、国包章一: 水道水の残留塩素保持に係る規定及び研究の動向、環境衛生工学研究、Vol. 23, No. 3, pp. 16-19 (2009)
- 10) Vewin: Reflections on performance 2006, p. 62 (2007)
- 11) P. J. de Moel, J. Q. J. C. Verberk, J. C. van Dijk: *Drinking Water; Principles and Practices*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, p. 413 (2006)
- 12) J. H. M. van Lieverloo, E. J. M. Blokker, G. Medema: Quantitative microbial risk assessment of distributed drinking water using faecal indicator incidence and concentrations, *J. Water Health*, Vol. 5, pp. 131-149 (2007)
- 13) B. Hamsch, K. Bockle, J. H. M. van Lieverloo: Incidence of faecal contaminations in chlorinated and non-chlorinated distribution systems of neighbouring European countries, *J. Water Health*, Vol. 5, pp. 119-130 (2007)
- 14) H. L. Risebro, M. F. Doria, Y. Andersson, G. Medema, K. Osborn, O. Schlosser, P. R. Hunter: Fault tree analysis of the causes of waterborne outbreaks, *J. Water Health*, Vol. 5, pp. 1-18 (2007)
- 15) Vewin: *Water Supply Statistics 2007*, p. 31 (2008)
- 16) T. N. Olsthoorn, M. J. M. Mosch: Fifty years artificial recharge in the Amsterdam dune area, *Management of Aquifer Recharge for Sustainability*, Dillon ed., Swets&Zeitlinger, Lisse (2002)
- 17) W. A. M. Hijnen: Elimination of micro-organisms in water treatment, KWR Watercycle Research Institute, the Netherlands, p. 289 (2009)
- 18) J. F. Schijven, H. A. M. de Bruin, S. M. Hassanizadeh, A. M. D. Husman: Bacteriophages and clostridium spores as indicator organisms for removal of pathogens by passage through saturated dune sand, *Water Res.*, Vol. 37, No. 9, pp. 2186-2194 (2003)
- 19) J. F. Schijven, W. Hoogenboezem, P. J. Nobel, G. J. Medema, A. Stakelbeek: Reduction of FRNA-bacteriophages and faecal indicator bacteria by dune infiltration and estimation of sticking efficiencies, *Water Science and Technology*, Vol. 38, No. 12, pp. 127-131 (1998)
- 20) 芦谷和芳、アムステルダム市の水道と砂丘浄水場 (その1)、水道事業研究、第117号、pp. 64-70 (1987)
- 21) 芦谷和芳、アムステルダム市の水道と砂丘浄水場 (その2)、水道事業研究、第118号、pp. 143-151 (1987)
- 22) *Staatsblad van het Koninkrijk der Nederlanden*, p. 53 (2001)
- 23) C. N. Haas, J. B. Rose, C. P. Gerba 著、金子光美監訳: 水の微生物リスクとその評価、技報堂出版、p. 452 (2001)
- 24) 伊藤慎彦、P. Smeets, G. Medema、宋金姫: 定量的感染リスク評価における浄水処理プロセスの流入・流出水濃度のデータベアリング方法、第44回日本水環境学会年会講演集、p. 75 (2010)
- 25) 伊藤慎彦: 定量的感染リスク評価の感度分析における非加熱飲料水消費量データの影響、用水と廃水、Vol. 52, No. 8, pp. 55-65 (2010)
- 26) 伊藤慎彦、P. Smeets, G. Medema: 定量的感染リスク評価の不確実性分析による必要調査項目の提示、第61回全国水道研究発表会講演集、pp. 498-499 (2010)
- 27) G. Medema, I. F. Loret, T.-A. Stenstrom, N. Ashbolt eds.: *MICRORISK, Quantitative Microbial Risk Assessment in the Water Safety Plan* (2006)
- 28) P. W. M. H. Smeets: *Stochastic modelling of drinking water treatment in quantitative microbial risk assessment*, Water Management Academic Press, Delft, the Netherlands, p. 202 (2008)
- 29) M. Prevost: Application of QMRA to distribution systems, American Water Works Association Water Quality Technology Conference, Washington State Convention & Trade Center, Seattle, Washington, USA, November 15-19 (2009)
- 30) L. Fewtrell, J. Bartram 著、金子光美、平田強監訳: 水系感染症リスクのアセスメントとマネジメント、WHO ガイドライン・基準への適用、技報堂出版、p. 434 (2003)
- 31) 伊藤慎彦、越後信哉: 水の消毒副生成物、技報堂出版、p. 325 (2008)
- 32) World Health Organization: WHO Initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases, A summary document (2008)
- 33) A. H. Havelaar, J. M. Melse: Quantifying health risks in