

表1 各要素に当てはめた確率密度関数

要素	分布形	パラメータとその推算値
原水中 <i>E. coli</i> 濃度(<i>E. coli</i> /100ml)	ガンマ分布	$\mu = -2.50$; $\lambda = 383$; $p = 0.674$
<i>E. coli</i> の除去・不活性化能(log ₁₀ 数)	凝集-貯水	ロジスティック分布 $\mu = 1.48$; $\lambda = 0.15$
	急速砂ろ過	ワイブル分布 $\mu = 1.74$; $\lambda = 0.59$; $p = 2.38$
	オゾン処理	正規分布 $\mu = 1.91$; $\sigma = 0.88$
	緩速砂ろ過	三角分布 最小値=2.00; 平均値=2.40; 最大値=4.20
C/E値	対数正規分布	$\mu = 0.0415$; $\sigma = 0.104$

水量, C/E値に対してモンテカルロシミュレーションを行ない, 年間感染確率 P_y を計算した。なお, シミュレーションにおいて各項目の間の相関関係は仮定していない。シミュレーションの回数は, 安定した結果を得るために必要な100,000回とした。

2.6 感度分析

4つの処理ステップの総合除去・不活性化能, 水道水中*E. coli*濃度, *E. coli*摂取量, 年間感染確率に対して感度分析を行なった。感度分析のためには, まず, 予測される項目と条件設定された各要素の間でスピアマンの順位相関係数を算出する。つぎに, この順位相関係数を2乗した後, それらの値を要素全体で100%となるように正規化することによって寄与率を算出する。寄与率は, 予測対象の不確実性に対して各要素が何%寄与しているかを表わす。

2.7 不確実性分析

QMRAにおける各予測項目および最終的に評価された年間感染確率は, 当然, 大きな不確実性をもつ。ここでは結果に大きく影響すると予想される項目を取り上げ, 不確実性分析を行なった。検討する項目は, アムステルダム-ライン運河水の取水の影響, 緩速砂ろ過における高水温期の除去率の影響, C/E値の影響, 用量反応モデルの影響, ランク法とデイト法の比較である。

3. 結果と考察

3.1 分布形の当てはめ

原水の*E. coli*, 凝集-貯水, 急速砂ろ過, オゾン処理, 緩速砂ろ過の各ステップでの除去・不活性化能, およびC/E値について分布形を当てはめた。分布形の選定に当たっては, 感染確率に大きな影

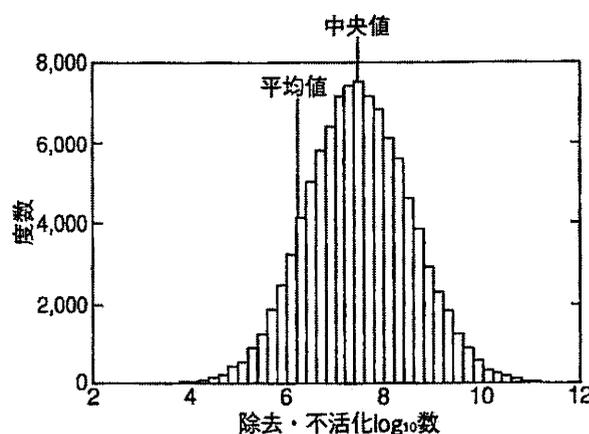


図1 総合除去・不活性化能の分布

響を及ぼす低頻度ケースへの適合性を重視して, カイ2乗(χ^2)検定やコルモゴロフ・スミルノフ検定よりも, アンダーソン・ダーリング検定の結果を重視した。選定したPDFを表1に示した。

1994年に1年間にわたって, マース川で*E. coli*と*Campylobacter*の濃度を22回測定した例¹⁰⁾があり, この表流水の測定値をC/E値の評価に用いた。*E. coli*と*Campylobacter*の比率を求めた後, それに分布形を当てはめたところ, 対数正規分布が最も適合した(表1に併記)。ただし, これは原水であるポルダー水そのもののC/E値ではない。C/E値は大きな不確実度をもつと考えられるので, 不確実性分析で取り上げる。

3.2 総合除去・不活性化能と年間感染確率

4段階の処理ステップの総合除去・不活性化能の分布を, 図1に示した。中央値7.46log₁₀, 平均値6.22log₁₀が得られた。処理水中の*E. coli*濃度がほぼすべて0であるにもかかわらず, 除去率を100%とは考えず, 7.46log₁₀(中央値)の除去能を有すると評価している点が重要である。

表2 QMRAによる推算値

	P2.5	中央値	平均値	P97.5
総合除去・不活化log ₁₀ 数	5.41	7.46	6.22	9.58
水道水中 <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> /100ml)	1.07×10^{-8}	4.35×10^{-6}	1.64×10^{-4}	9.25×10^{-4}
<i>E. coli</i> 摂取量(<i>E. coli</i> /d)	0	1.24×10^{-8}	2.99×10^{-4}	1.36×10^{-3}
<i>Campylobacter</i> 摂取量 (<i>Campylobacter</i> /d)	0	1.35×10^{-10}	9.52×10^{-6}	3.36×10^{-5}
1日当たり感染確率(/人/d)	0	9.24×10^{-11}	6.51×10^{-6}	2.30×10^{-5}
年間感染確率(/人/year)	0	3.37×10^{-8}	1.68×10^{-3}	9.06×10^{-3}

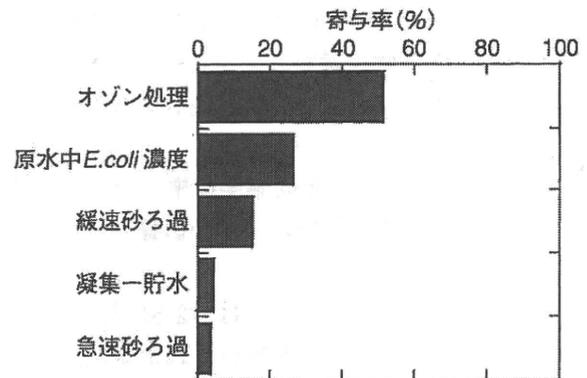
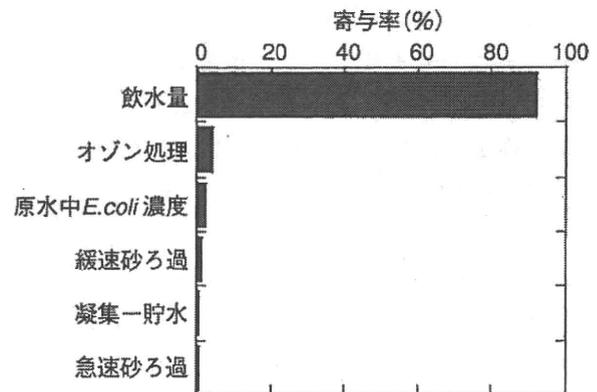
原水中*E. coli*濃度にこの除去率を適用するので、表2に示したように処理水中*E. coli*濃度は0にはならない。結果として、平均値は 1.64×10^{-4} *E. coli*/100ml, 中央値は 4.35×10^{-6} *E. coli*/100mlと計算された。

*E. coli*摂取量は、水道水中*E. coli*濃度に飲水量を乗じて求められる。平均値は 2.99×10^{-4} *E. coli*/dと求められた。C/E値を用いて*E. coli*摂取量を*Campylobacter*摂取量に換算した後、*Campylobacter*に関する用量反応関係を適用した。その結果、*Campylobacter*による1日当たりの感染確率は、平均値 6.51×10^{-6} /人/d, 中央値 9.24×10^{-11} /人/dと推算された。

1日当たりの感染確率から式(1)によって年間感染確率を計算した結果、平均値 1.68×10^{-3} /人/year, 中央値 3.37×10^{-8} /人/yearが得られた。以下、この評価結果をベースケースとよぶ。オランダでは、QMRAによって年間感染確率が 1×10^{-4} /人/year以下であることが求められているが、平均値はこれより大きな値となった。

3.3 感度分析と飲水量の影響

処理水中*E. coli*濃度に対する感度分析結果を、図2に示す。オゾン処理が最も大きく、ついで原水中*E. coli*濃度となっている。凝集-貯水、急速砂ろ過、オゾン処理、緩速砂ろ過の4段階の処理ステップのなかではオゾン処理の影響が最も大きい。これはすなわち、オゾン処理による*E. coli*不活化率に差が大きく0 log₁₀から4 log₁₀まで分布しており、ここでいかに不活化されるかが処理水中*E. coli*濃度に大きく影響するのである。処理水中*E. coli*濃度を低下させるためには、オゾン処理の段階で*E. coli*を確実に不活化することが最も重要

図2 処理水中*E. coli*濃度に対する感度分析結果図3 *E. coli*摂取量に対する感度分析結果

であると指摘できる。

*E. coli*摂取量に対する感度分析結果を、図3に示した。*E. coli*摂取量に最も大きく影響するのは飲水量で、これに比べて他の項目は非常に小さい寄与と評価された。*E. coli*摂取量は、処理水中*E. coli*濃度に飲水量を乗じて求めるだけだが、感度分析結果は図2と大きく異なる結果となった。なお、年間感染確率に対する感度分析結果は、図3

とはほぼ同じ結果であった(C/E値の寄与はわずか)。

これは、飲水量のデータ集計の方法に理由がある。飲水量は連続分布ではなくポアソン分布という離散分布で与えられており、そのパラメータは平均値0.706である。この結果、48%の人々がまったく水道水を飲まない統計となっている。表2で*E. coli*摂取量、*Campylobacter*による1日当たりの感染確率、年間感染確率の2.5パーセントイル(P2.5)がいずれも0なのはこのためである。すなわち、48%の人々はまったく水道水を飲まないため、*E. coli*摂取量は0であり、感染確率も0である。この飲水量が0であるか否かが、*E. coli*摂取量および年間感染確率に最も大きく影響すると考えられる。

*E. coli*摂取量と年間感染確率に対する飲水量データの統計的取り扱い方法の影響について、さらに検討した。

飲水量データについては、2.5に記したように、統計的取り扱い方法が検討された結果、分布形としてはポアソンモデルを使うことが推奨された¹⁸⁾。しかし、感度分析の結果、*E. coli*摂取量および年間感染確率に対して飲水量の寄与が最も大きいという意外な結果を得た。

そこで飲水量データに指数モデルを適用した。指数分布のパラメータである比率は 6.05×10^{-3} と推定された。年間感染確率は平均値 1.64×10^{-3} /人/yearと計算され、ポアソンモデルを適用した場合(表2に示した 1.68×10^{-3} /人/year)とほとんど変化はなかった。わずかに小さくなったのは、ポアソンモデルの場合、飲水量の平均値が177mlであるのに対して、指数モデルでは165mlであるためと考えられる。また、ポアソンモデルの場合では、48%の人は水道水を飲まないため彼らの感染確率も0であったが、指数モデルでは、*E. coli*摂取量および年間感染確率に0ではない下限値が存在する。この結果、年間感染確率の2.5パーセントイルは 1.64×10^{-8} /人/yearであった。年間感染確率に対する感度分析の結果を、図4に示す。図3とは大きく異なる結果であることが明らかで、最も寄与するのはオゾン処理であり、飲水量は第3位である。このように、飲水量データの統計的取り扱い方法が感度に大きく影響するので注

意を要する。

さらに、飲水量データの影響について考察を行なった。一般に日常生活においては、シャワー・入浴、歯磨き時の誤飲などがあり、水道水の飲水量が完全に0とは考えにくい。ここでは歯磨き時の誤飲を想定する。誤飲量については、河川や海域での水泳、ダイビング、ゴルフ(下水処理水による灌漑後の芝の上のゴルフボールへの接触)などの活動に対して設定されてきた²¹⁾。これらを参考に、歯磨き時の誤飲量として1ml および10mlを設定する。ポアソンモデルにおいて、これらの量を摂取水量として上積みした。つまり、飲水量が0グラス/dである人も1ml/dあるいは10ml/dを飲用しているとみなす。

年間感染確率は、誤飲量1mlの場合、平均値 1.67×10^{-3} /人/yearとなり、ベースケースと比較してほとんど変化はなかった。しかし、*E. coli*摂取量および年間感染確率に下限値が存在するため、2.5パーセントイルには0ではなく 9.21×10^{-10} /人/yearという値が表われた。誤飲量10mlの場合では、平均値は 1.76×10^{-3} /人/yearとなり、わずかに増大した。2.5パーセントイルも 7.96×10^{-9} /人/yearと増大した。年間感染確率に対する感度分析の結果では、誤飲量1mlの場合、最も大きく寄与するのは図3と同様に飲水量であるが、その寄与率は91.9%から50.5%に大きく低減した。誤飲量10mlの場合では、オゾン処理(寄与率32.0%)と飲水量(寄与率25.7%)の大小関係が逆転し、オゾン処理が最も影響する結果となった。や

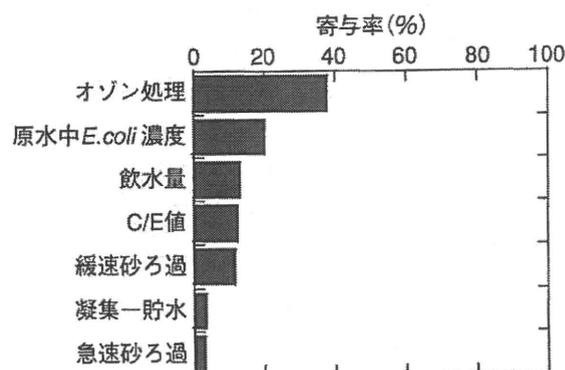


図4 年間感染確率に対する感度分析結果(飲水量データに指数モデルを適用した場合)

はり、ポアソンモデルにおいて飲水量0が出現することが大きく影響しているとわかる。

このように、飲水量データの統計的取り扱い方法が感度分析の結果に大きく影響することがわかった。感度分析は、重要管理点を抽出したり、データ収集を重点的に行なうべきポイントを指摘するのが目的である。飲水量のデータ集計の方法が混乱を招くおそれがあるので注意すべきである。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と考えられる。

3.4 不確実性分析

(1) アムステルダムーライン運河水の取水

アムステルダムーライン運河水の取水量は年間の全水量の5%であるが、ポルダー水よりも汚染されている。しかし、日々の取水量や微生物濃度の変動などに関する詳しいデータは不足している。そこで、ベースケースではポルダー水に含まれる*E. coli*を解析対象とし、アムステルダムーライン運河水の取水は、これに影響を与える因子として不確実性分析の対象とした。

アムステルダムーライン運河水を取水するのは、夏季の主として6月～8月の3カ月間である。したがって、この間ポルダーからの水にアムステルダムーライン運河水が20%加わるものと考えられる。アムステルダムーライン運河水の*E. coli*濃度は、ポルダー水の1.75倍に設定した⁹⁾。

年間感染確率の計算結果を表3に示す。平均値は 1.72×10^{-3} /人/yearとわずかに増大したが、大

きな影響はみられなかった。

(2) 緩速砂ろ過における高水温期の除去率の影響

水温13℃以下での測定結果6例に対し、13℃以上での測定結果が3例ある¹⁰⁾。これを用いて、緩速砂ろ過の年間の除去能が一定ではなく変化するものとして組み込むことも可能である。しかし、他の3つの処理ステップにおいて除去能に対する水温の影響は調べられていない。したがって、ここでは緩速砂ろ過における高水温期の除去能の影響については不確実性分析の対象とした。

3回の除去能測定値から、最小値 $3.1 \log_{10}$ 、平均値 $3.6 \log_{10}$ 、最大値 $5.6 \log_{10}$ を求め、これらをパラメーターとする三角分布を設定した。水温13℃以下での除去能(平均値 $2.4 \log_{10}$)と比較して、高水温期のほうが除去能は向上することがわかる。水温13℃以上となるのは、5月～9月のおおむね5カ月間である。この期間の緩速砂ろ過の除去能は上記の値に従うものとした。

年間感染確率の計算結果を表3に示した。平均値は 1.01×10^{-3} /人/yearとやや低減した。1年のうち5カ月間にわたって緩速砂ろ過の除去能を $1 \log_{10}$ 以上高めた効果が表われているといえる。

(3) C/E値

ベースケースに用いたC/E値としては、マース川での測定値に対して平均値0.042、標準偏差0.10をもつ対数正規分布を設定した。これに対して、WHO飲料水水質ガイドライン第3版²⁰⁾には、科学文献をレビューし、各種の水源における腸管系病原微生物とその指標微生物の存在濃度の範囲が記載されている。このデータから、C/Eの最小値としては0.001(0.1%)を設定する。一方、平均滞留時間89日の貯水池においては水鳥等による再汚染も観察されている。オランダ西部のライダイン浄水場では、原水である河川水はまず前処理されるが、その後砂丘で浸透ろ過された後、さらに池に貯水される。この池でも、やはり再汚染があるという。この池の水の*E. coli*

表3 年間感染確率に対する不確実性分析結果

	年間感染確率(/人/year)		
	P2.5	平均値	P97.5
ベースケース	0	1.68×10^{-3}	9.06×10^{-3}
アムステルダムーライン運河水の取水	0	1.72×10^{-3}	8.60×10^{-3}
緩速砂ろ過における高水温期の除去	0	1.01×10^{-3}	3.72×10^{-3}
C/E値	0.001(0.1%)	6.59×10^{-5}	3.54×10^{-4}
	1(100%)	2.53×10^{-2}	2.84×10^{-1}
用量反応モデル	最大感染確率曲線	2.30×10^{-3}	1.27×10^{-2}
	ベータ-ポアソン	4.24×10^{-3}	2.77×10^{-2}
デイト法	0	3.18×10^{-2}	4.72×10^{-1}

と *Campylobacter* の濃度の調査結果によれば、*Campylobacter* 濃度の平均値は *E. coli* 濃度の平均値の約50%であった²³⁾。これを参考にして、ここではC/Eの最大値として1 (100%)を設定する。

年間感染確率の計算結果を、表3に示した。0.001に設定した場合では、平均値は 6.59×10^{-5} /人/yearときわめて低い値となった。一方、1とした場合では、平均値は 2.53×10^{-2} /人/yearと増大した。C/Eの値が感染確率の評価値に大きく影響することがわかる。ベースケースに用いたC/E値はマース川で測定された値であり、ポルダー水やこれにアムステルダム-ライン運河水が加わった水の値ではない。本浄水場の原水でのC/E値、または*Campylobacter*濃度そのものの調査を進める必要性が高いと指摘できる。

(4) 用量反応モデルの影響

指数モデルの代わりに最大感染確率曲線を適用した。これは、摂取されたどんな微生物も感染を起こし得ると想定した場合の感染確率を表わす。年間感染確率の計算結果を、表3に示した。平均値は 2.30×10^{-3} /人/yearとやや増大した。最大感染確率曲線の場合、感染確率 P_d (/人/d)は $P_d = 1 - \exp(-D)$ と記述される。これは、 D が小さいとき(低用量域)では $P_d \approx D$ と近似できる。これに対して、指数モデルは低用量域では $P_d = 1 - \exp(-\gamma D) \approx \gamma D = 0.686 \times D$ と近似される。ベースケースの平均値 1.68×10^{-3} /人/yearと最大感染確率曲線での平均値 2.30×10^{-3} /人/yearとは、ほぼこの比率になっていることが確認できる。

ベータ-ポアソンモデル¹⁹⁾を使用することは適切でない、と記した。ここでは、試しにベータ-ポアソンモデルを使用して感染確率を計算してみた。平均値は 4.24×10^{-3} /人/yearとなり、最大感染確率曲線での平均値 2.30×10^{-3} /人/yearよりも大きな値となった。やはり、ここでベータ-ポアソンモデルを使用するのは適切ではないことが確認される。

(5) ランク法とデイト法の比較

処理前後の微生物濃度データをペアリングする方法としては、デイト法やランダム法よりもランク法を使用するのが適切であると述べた。ここでは参考のため、凝集-貯水、急速砂ろ過、オゾン

処理の3段階の除去・不活化能を、デイト法を用いて評価した。不確実性分析の項目として取り上げたのは、データのペアリング方法を吟味しない場合、通常、デイト法を採用するからである。

まず、総合除去・不活化能の中央値は $6.18 \log_{10}$ とランク法の中央値 $7.46 \log_{10}$ より $1.28 \log_{10}$ 小さい値となった。また、平均値は $2.16 \log_{10}$ であり、ランク法の平均値 $6.22 \log_{10}$ よりも非常に小さな値であった。これは、デイト法では、しばしば低除去率がみられるため、負の除去率が出現することさえある。これは通常あり得ない。年間感染確率の計算結果を、表3に示した。平均値 3.18×10^{-2} /人/yearとランク法(ベースケース)と比較して19倍も大きな確率となった。QMRAを行なう前に、データの適切なペアリング方法を選択する必要があるといえる。

3.5 感度分析と不確実性分析結果に関する総合的考察

飲水量のデータ集計の方法やあてはめ分布の種類は、感染確率の大きさにはあまり影響しないが感度分析の結果には大きく影響する。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。

本浄水場では、年間感染確率の大きさに最も寄与するのはオゾン処理である。この処理施設では年間感染確率の平均値が 1.68×10^{-3} /人/yearとなり、 10^{-4} /人/yearより大きいと評価された。この感染確率を低下させるためには、オゾン処理で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。滞留水等をなくし、オゾン槽全体でCt値(溶存オゾン濃度×接触時間)を保持することなどが有効な手段であろう。

緩速砂ろ過において高水温期の除去能が高まるが、このデータを組み込んだ場合、年間感染確率はやや低減した。水温が除去・不活化能に大きく影響すると予想される処理ステップでは、除去・不活化能に対する水温の影響を調べるのが望ましい。

C/E値が感染確率の評価値に大きく影響するこ

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ペ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。適切なデータのペ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ペ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 1.68×10^{-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ペアリング方法の影響が大きいことを示した。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) 伊藤慎彦, 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^{1*}・大河内 由美子²・伊藤 禎彦²

¹ 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)

² 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-プロモ-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 $1 \mu\text{M}$ 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 種類の方法で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¹⁾。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²⁾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³⁾。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³⁾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-プロモ-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^{4), 5)}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 10¹ ~ 10⁵ 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⁹⁾ 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 (ロシユ・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

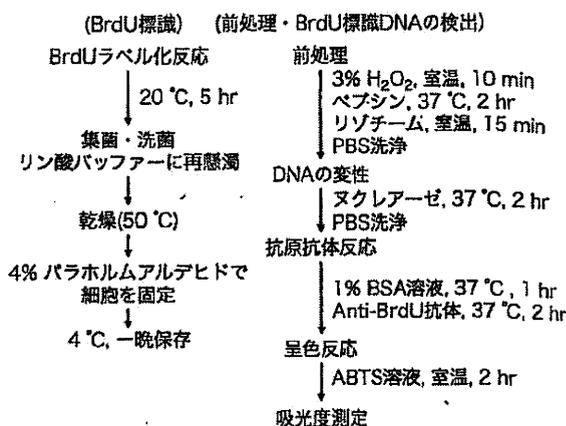


図-1 細胞固定化法の操作フロー

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⁹⁾。そこで、BrdU 濃度を 10 μM, 1 μM, 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 μL 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 μL 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 μL 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% H₂O₂ 溶液 100 μL 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 μL と 3 mg/mL リゾチーム溶液 100 μL 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 μL により DNA 変性を行い、1% ウシ血清アルブミン溶液 250 μL 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 μL 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。

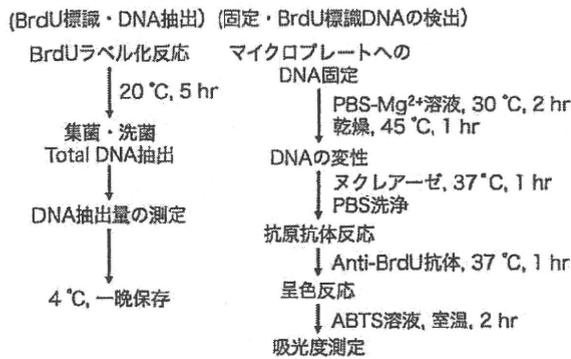


図-2 DNA固定化法の操作フロー

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 μ L に対して 0.2 M PBS-Mg²⁺ 溶液を等量加え、96 穴マイクロプレートに 100 μ 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 μ 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シ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⁹⁾。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 μ 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 μ 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

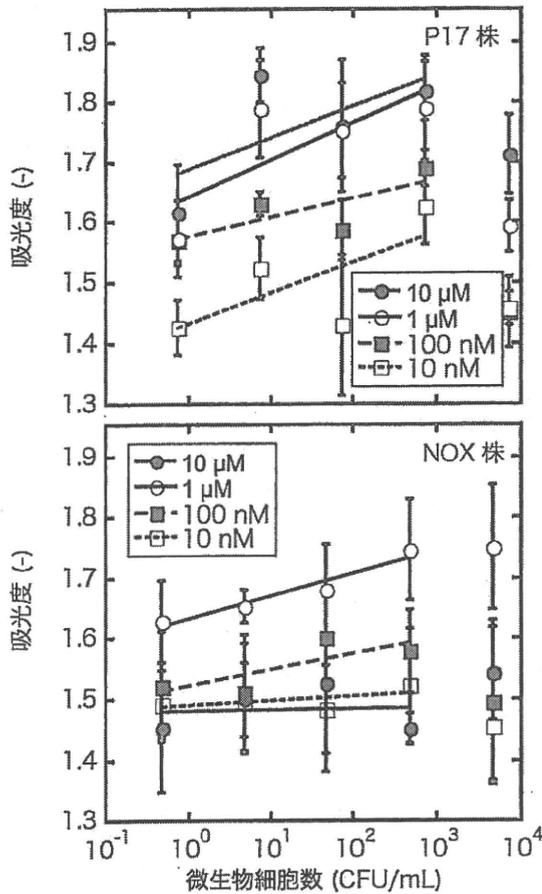


図-3 BrdU 濃度が BrdU 標識 DNA 量に与える影響 (n=3)

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⁴⁾。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

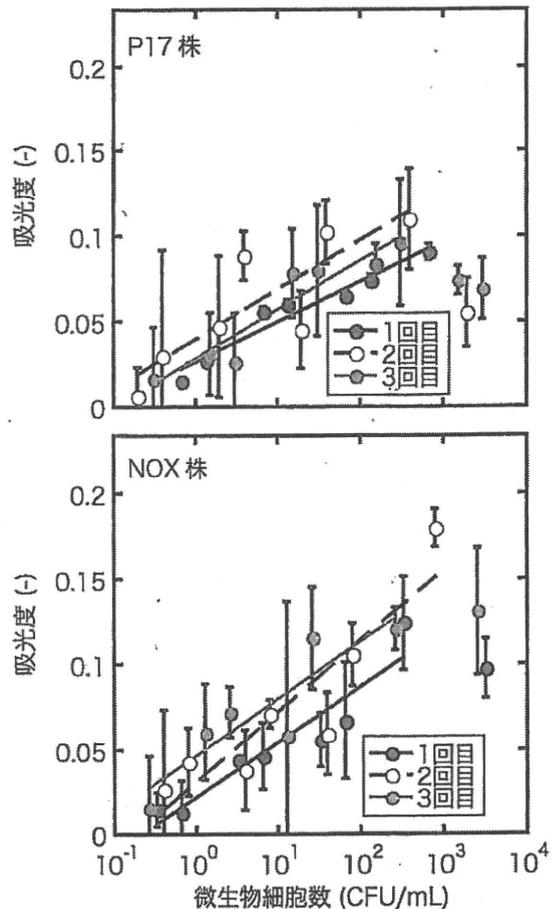


図-4 細胞固定化法による微生物細胞数と BrdU 標識 DNA 量の関係 (n=4)

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 と測定回数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が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に、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 3.0×10^8 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^{7), 8)}、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。

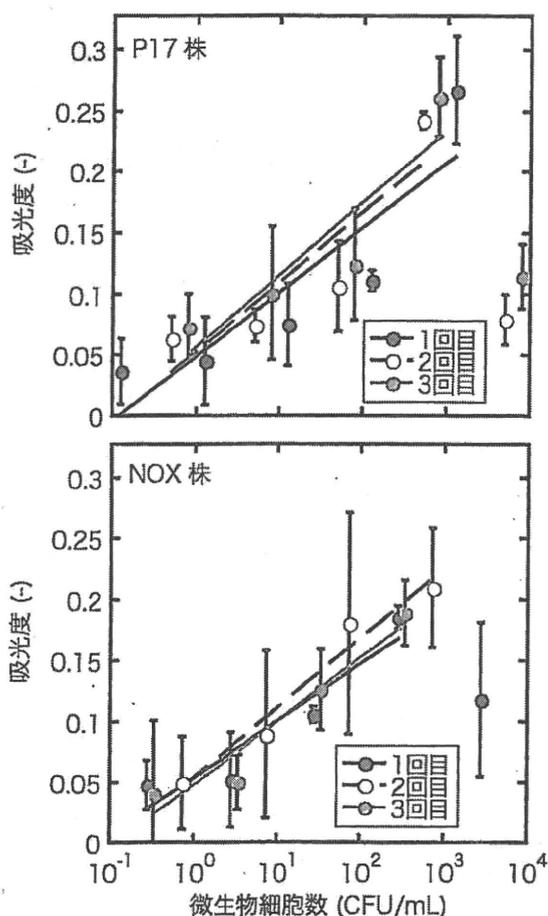


図-5 DNA 固定化法による微生物細胞数と BrdU 標識 DNA 量の関係 (n=3)

(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するなどの理由により、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。

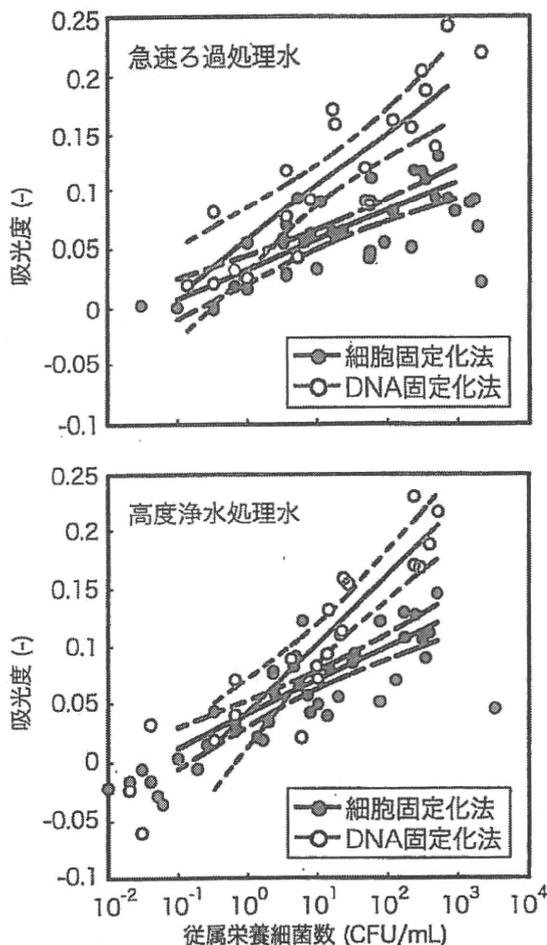


図-6 給水栓試料で再増殖した従属栄養細菌数とBrdU標識DNA量の関係

(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(μ)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 hr^{-1} 、高度浄水処理水の場合には 0.049 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 hr^{-1} 、高度浄水処理水で 0.045 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⁹⁾。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。

(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³⁾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、その影響で細胞数あ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 ^3H -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 ASADA¹, Yumiko OHKOUCHI² and Sadahiko ITOH²

¹Dept. of Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University

²Dept. 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 μM 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。ここでは、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¹⁾。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²⁻⁴⁾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^{5),6)}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^{7),8)}、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⁹⁾。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、このエビデスがもつペ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。筆者がペ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^{7),8)}。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の問題があるという。これに対する苦情の影響⁹⁾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¹⁰⁾。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。ポ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¹⁰⁾。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¹⁰⁾。

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 (浸透戸過後の水を含む) であり、2/3は地下水である¹¹⁾。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⁷⁾。

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⁷⁾。

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、塩素消毒の意義に関し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⁷⁾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¹²⁾。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附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¹²⁾。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¹³⁾。

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の感染流行情例を分析した¹⁴⁾。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⁷⁾。

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、なるべく浸透処理させた後取水し、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¹⁵⁾。

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¹¹⁾。水道会社ウォーターネットがもつライダイネ浄水場のプロセスであるが、大きな特徴は、凝集・沈殿—急速砂処理による前処理を行った水を砂丘に導いて浸透処理¹⁶⁾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処理している点も大きな特徴である。この他、PWN北ホランド州水道がもつヘムスカーク浄水場では、オゾン—粒状活

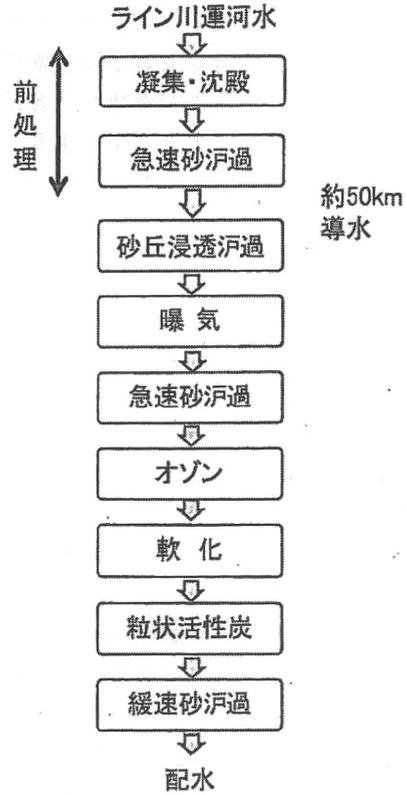


図-1 ウォーターネット・ライダイネ浄水場におけるマルチバリアシステム



写真-1 砂丘と浸透処理させる水を蓄えた運河・浸透池（ウォーターネット・ライダイネ浄水場）

性炭による高度処理水をなんと自然に返して浸透処理を行っている⁸⁾。

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¹⁷⁾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^{18),19)} 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^{20),21)}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^{8),10)}。

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²²⁾ 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*	1,000 CFU/100mL以下
従属栄養細菌 (22℃における形成集落数)*	100 CFU/mL以下
大腸菌群とクロストリジウム*	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²³⁾。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⁷⁾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

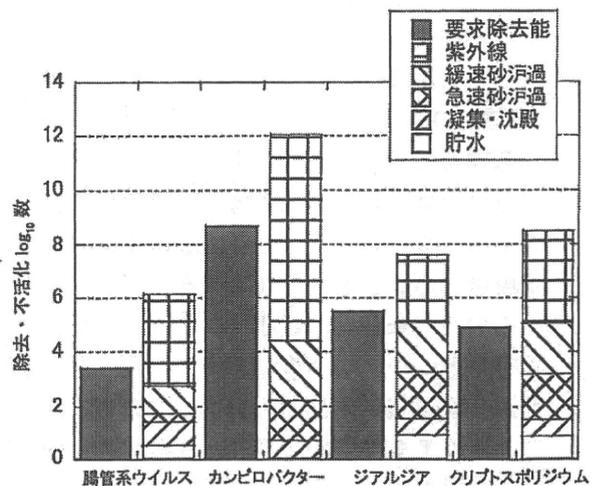


図-2 微生物に対する要求除去能と保証除去能の評価例⁷⁾