



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	下水再生システムにおけるウイルス除去効率の定量評価および除去目標値算出に関する研究
Author(s)	伊藤, 寿宏
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第12769号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12769
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68534
Type	doctoral thesis
File Information	Toshihiro_Ito.pdf



下水再生システムにおけるウイルス除去効率の 定量評価および除去目標値算出に関する研究

北海道大学 大学院工学研究科 環境創生工学専攻

伊藤 寿宏

-目次-

第 1 章 序論.....	1
1.1 本研究の背景.....	1
1.2 本研究の目的.....	6
1.3 本研究の構成.....	6
第 2 章 既往の知見.....	9
2.1 下水再生の利用状況 と国際基準化の動き	
2.1.1 諸外国と我が国における下水再生利用状況の比較.....	9
2.1.2 下水再生利用の国際標準化.....	19
2.2 腸管系ウイルスの基礎的情報	
2.2.1 ウイルスと他の病原微生物の違い.....	22
2.2.2 腸管系ウイルスによる水系感染症の伝搬経路.....	32
2.2.3 世界および我が国における腸管系ウイルス感染症の発生動向.....	35
2.2.4 腸管系ウイルスの感染と抵抗性.....	38
2.3 下水再生利用に起因する腸管系ウイルスの感染症リスク評価	
2.3.1 定量的微生物リスク評価.....	42
2.3.2 腸管系ウイルスの年間許容疾病負荷と目標除去効率の関係.....	45
2.3.3 諸外国および我が国における下水再生利用に関する指針.....	46
2.4 腸管系ウイルスの目標除去効率を算出する上での課題	
2.4.1 腸管系ウイルス濃度の左側打ち切りデータ (left-censored data)	49
2.4.2 地域特性を考慮した下水再生利用に起因する感染症リスク制御・管理.....	52
第 3 章 下水処理プロセスにおける腸管系ウイルス除去効率のベイジアンモデリング.....	53
3.1 本章の目的.....	53
3.2 研究方法	
3.2.1 腸管系ウイルス除去効率のベイジアンモデリング.....	54
3.2.2 腸管系ウイルス濃度の人工左側打ち切りデータの生成.....	56
3.2.3 統計解析.....	57
3.3 研究結果.....	58

3.4	考察.....	63
3.5	結論.....	64
第 4 章	国内下水処理場における腸管系ウイルス除去効率の推定.....	65
4.1	本章の目的.....	65
4.2	研究方法	
4.2.1	本章で用いた腸管系ウイルス濃度の左側打ち切りデータ.....	65
4.2.2	ベイズ推定手法を用いた腸管系ウイルス対数除去効率分布の推定.....	68
4.2.3	統計解析.....	71
4.3	研究結果.....	71
4.4	考察.....	83
4.5	結論.....	86
第 5 章	下水再生システムにおける腸管系ウイルスの目標除去効率の算定.....	87
5.1	本章の目的.....	87
5.2	研究方法	
5.2.1	未処理下水中腸管系ウイルス濃度の定量.....	88
5.2.2	ベイズ推定手法を用いたウイルス濃度分布の推定.....	90
5.2.3	目標年間リスクおよび下水再生水の利用用途、誤摂取量と頻度の設定.....	91
5.2.4	下水再生システムにおける腸管系ウイルスの目標除去効率の算出.....	91
5.3	研究結果.....	99
5.4	考察.....	103
5.5	結論.....	106
第 6 章	結論.....	107
6.1	本研究で得られた知見	
6.1.1	統計学的アプローチ（ベイズ推定法）に基づいた病原微生物除去効率の定量評価法の有用性.....	107
6.1.2	地域的特性を考慮した目標除去効率の算定の重要性.....	107

6.2 本研究の課題と今後の展望

6.2.1 病原微生物除去効率の定量評価法の実用に向けたベイズ推定モデルの拡張.....108

6.2.2 病原微生物の目標除去効率を算出する上で必要とされるデータの蓄積.....108

第2章 既往の知見 -Appendix-.....109

参考文献.....125

謝辞.....150

第 1 章

序章

1.1 本研究の背景

2015 年に「ミレニアム開発目標 (Millennium Development Goals: MDGs)」が最終年を迎え、国際連合 (United Nations: UN) の潘基文 (Ban Ki-moon) 事務総長から「The Millennium Development Goals Report 2015」が公表された。MDGs は、2000 年 9 月に米国・ニューヨークで開催された国連ミレニアム・サミットで採択された国連ミレニアム宣言をもとに作成されたものであり、2015 年までの開発途上国における貧困削減が目標として 8 個の開発目標と 21 個のターゲットが設定された(United Nations, 2015a)。設定された 8 個の開発目標の中で、水・衛生環境に係る開発目標およびターゲットとしては、目標 7「Ensure Environmental Sustainability (環境の持続可能性の確保)」におけるターゲット 7C「Halve, by 2015, the proportion of the population without sustainable access to safe drinking water and basic sanitation (2015 年までに安全な飲料水と衛生施設を利用できない人口の割合を半減させる)」が設定された(United Nations, 2015a)。The Millennium Development Goals Report 2015 によると、世界人口に対する安全な飲料水に継続的に利用できる人口の割合は、1990 年の段階において世界全体で約 76%、開発途上国で約 70%とされていたが、2015 年では世界全体で約 91%、開発途上国で約 89%にまで改善された(United Nations, 2015a)。しかしながら、2015 年の段階において世界総人口約 71 億人のうち約 6.6 億人が継続的に安全な飲料水を確保できない状況にあるとされており(United Nations, 2015a)、2011 年の段階の統計 (6.3 億人) と比較して僅かに増加したことが認められた(World Health Organization, 2011)。他方で、トイレや下水道などの衛生施設を継続的に利用できない人口の割合は、1990 年と 2015 年の段階においてそれぞれ 54%、68%となっており、MDGs で設定されたターゲットが達成されておらず、約 9.5 億人の衛生環境が改善されていない状況にあるとされている(United Nations, 2015a)。国際連合は、2015 年 9 月に開催された「国連持続可能な開発サミット」において、MDGs の後継となる新たな開発目標である「持続可能な開発目標 (Sustainable Development Goals: SDGs)」を採択し、2030 年までの持続可能な社会の形成のために 17 個の開発目標と 169 個のターゲットを設定した(United Nations, 2015b)。SDGs では、水・衛生環境に係る単独の開発目標 (開発目標 6「全ての人々の水と衛生の利用可能性と持続可能な管理を確保する」と 8 個のターゲットが設定されており(United Nations, 2015b)、今後 SDGs をもとに世界各地域における水・衛生環境に係る政策が実施されることが予測される。

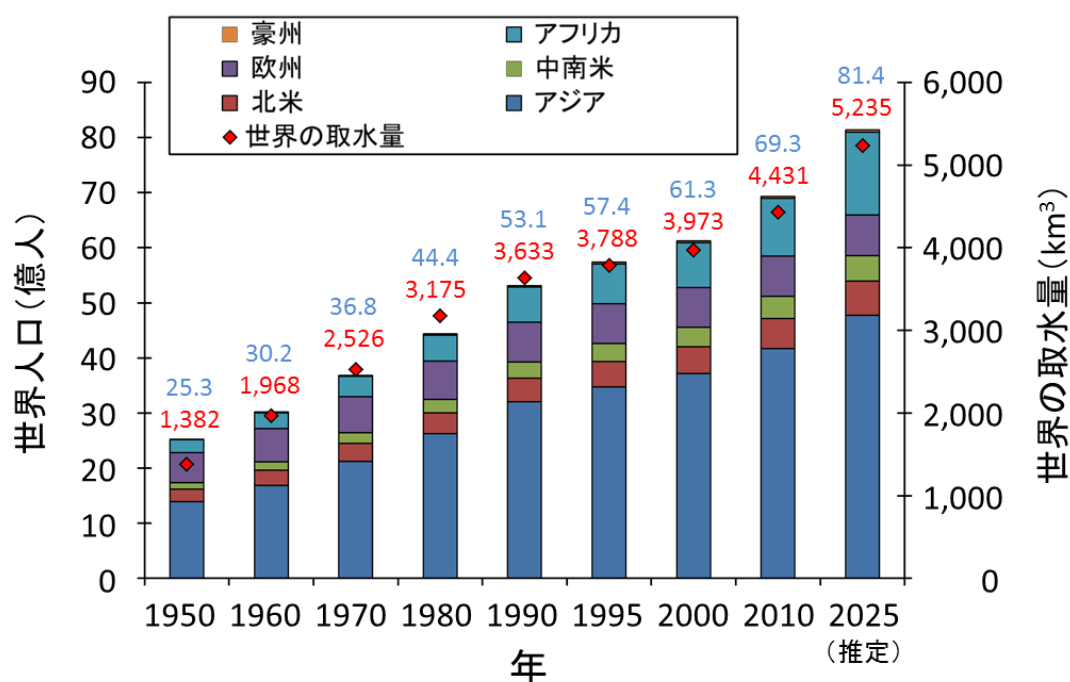


図 1-1 世界の人口および取水量の推移（青文字：世界人口、赤文字：世界の取水量）
 （United Nations, 2015c および United Nations Educational Scientific and Cultural Organization, 2006 をもとに作成）

SDGs による水・衛生環境に係る開発目標が設定されているものの、乾燥地域を主とした世界各地における深刻な水不足は、世界人口の爆発的な増加を背景に、今後さらに深刻化することが予測されている。世界の人口および取水量の推移を図 1-1 に示す(United Nations, 2015c; United Nations Educational Scientific and Cultural Organization, 2006)。1950 年から 2010 年までに世界人口は約 2.7 倍に増加し、それに伴って年間水使用量は約 3.2 倍に増加した(United Nations, 2015c; United Nations Educational Scientific and Cultural Organization, 2006)。特に人口が急増している発展途上国において、限られた水資源の枯渇に対する懸念が強まっており、今後渇水被害を受ける人口がさらに増加すると予測されている。

急激な世界人口の増加に加え、世界的な都市部への人口集中が進んでおり、水の使用量の分布は局所的に集中する傾向を強めている。国際連合が 2012 年に発表した「国連世界都市化予測（UN World Urbanization Prospects）」によると、1960 年から 2010 年にかけて、世界人口に対する都市人口の割合は約 33%から約 51%にまで増加し、2050 年には世界人口の約 67%が都市部に集中すると予測されている(United Nations, 2012)。このような都市化は、アジアとアフリカを中心に発展途上国において特に顕著であるものの、先進国においても同様に認められている。我が国においても、1960 年から 2010 年にかけて、日本の総人口に対する都市人口の割合は約 44%から約 66%まで増加した(United Nations, 2012)。都市部への人口集中による産業の発展および生活水準の向上に伴い、我が国における都市用水の年間開発水量

は 1975 年から 2010 年にかけて約 70 億 m^3 から約 182 億 m^3 まで増加した(国土交通省, 2010)。国際エネルギー機関 (International Energy Agency: IEA) が 2012 年に発表した「World Energy Outlook 2012」によると、世界全体で稼働している発電施設の約 90%が水集約型であることのほかに、都市部における先進的な冷却システムを搭載した発電設備への移行や地方におけるバイオマス燃料の生産量の増加により (International Energy Agency, 2012)、2035 年までにエネルギー生産に係る取水量と水消費量がそれぞれ 20%増、85%増となることが予測されている (United Nations, 2014)。このような背景をもとに、世界の水需要は都市部における製造業、発電および生活に係る水を主として、2050 年までに約 55%増加することが予測されている (United Nations, 2014)。その結果として、世界人口の約 40%が深刻な水ストレスのある地域での生活を余儀なくされると予測されている (United Nations, 2014)。

先進国の都市部において発展してきた水供給システムは、身近な水資源の量的限界により、量的条件や質的条件を満たす遠隔地の水を都市部へ導水・給水するために構築されてきた。しかしながら、従来型の水供給システムでは、遠隔地からの水の大量輸送による水輸送コストの増大や、取水量の増加に伴う水資源の枯渇が問題視されている。東京都水道局および東京都下水道局によると、上水道システムで消費するエネルギーの内 80%が水の輸送に利用されており、都市部における持続可能な水供給システムを構築する上で最大のコスト要因となる (Tambo et al., 2012)。他方で、我が国においても都市部への人口集中に起因する取水量の増加とそれに伴う地下水の過剰な揚水により、地盤沈下や地下水塩水化などの地下水障害が多く地域で発生した (国土交通省, 2014)。SDGs においても、持続可能な水供給システムおよび衛生施設の構築が求められており (United Nations, 2015b)、上述したような課題の克服が必要とされている (Tambo et al., 2012)。

都市部における持続可能な水供給システムを構築するにあたり、水資源の安定性や安全性、および水環境への負荷が配慮されている昨今、限られた水資源の有効利用や省エネルギー化による環境負荷の少ない水供給システムの構築が重要な課題となる。こうした要求を満たすために現在実行可能な代替水資源の開発施策の一つとして、下水を信頼性のある下水処理方法を用いて処理し、得られた処理水を再生水として有効利用する「下水再生利用」に関する施策が注目を集めている。下水再生利用は、水源となる下水が都市内に点在していることから、水供給と水需要の場が近接しているという利点を有している。さらに閉鎖系において水循環を管理する下水再生水の利用は、処理水の排出による水環境への負荷を低減させることが可能である (Asano et al., 2007)。

下水再生水を代替水資源として有効利用するに際し、下水再生水の安全性が担保されなければならない。一般的に、未処理下水中には化学物質 (医薬品、内分泌かく乱物質など) (Krasner et al., 2013; Luo et al., 2014; Ratola et al., 2012) や、糞便由来の病原微生物 (原虫、細菌、ウイルスなど) (Bosch et al., 2008; Hunter, 2003) が高濃度で含まれており、こうした危害因子を適切に排除する必要がある。Craun (2012) は、1971 年から 2008 年にかけて米国で発生した公共水道システムを介した健康被害事例 733 件をまとめ、その内 341 件 (46%) および 73 件 (10%) がそれぞれ病原微生物および化学物質に起因することを示した (Craun,

2012)。我が国においても、1997 年から 2006 年にかけて発生した飲用水を介した健康被害事例約 900 件の内、病原微生物に関連した事例が約 80%。化学物質などに関連した事例が約 17%であると報告されている(山田ら, 2007)。他方で、病原微生物に起因する感染症は、化学物質の曝露とは異なり、一回ごとの曝露が即座に健康被害を及ぼすとともに、伝搬性を有することから二次以降の感染を通じて広範囲に蔓延する恐れがある。二次以降の感染は無症状者(病原微生物を保有したヒト)と接触することによって生じ得ることから、化学物質による汚染とは異なる見地からの集団に対する健康リスクを考慮しなければならない。

世界保健機関(World Health Organization: WHO)が 2006 年に発行した「WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater: volume 2 wastewater use in agriculture」では、下水再生利用に起因する微生物リスクを適切に評価・管理するために、下水再生水の利用用途に応じて下水再生システムで達成すべき病原微生物の目標除去効率を設定することを推奨している(World Health Organization, 2006)。WHO は、同ガイドラインにおいて下水再生システムの設計コンセプトである「multiple-barrier system」を提唱しており、下水再生システムで設定された病原微生物の目標除去効率を達成するように、下水処理ユニット(一次処理、二次処理、消毒など)を組み合わせることを規定している(World Health Organization, 2006)。この multiple-barrier system に基づいて下水再生システムを設計する場合、下水処理ユニットの製造業者は病原微生物の除去効率に関する情報を販売の段階で提示する必要があり、その情報をもとに下水再生利用の提案者(事業者)は病原微生物の目標除去効率を達成するように下水再生システムを設計する(図 1-2)。しかしながら、製造業者向けの下処理ユニットの除去効率の評価方法、もしくは事業者向けの下処理システムの目標除去効率の算定法については、国際的なガイドラインにおいて明記されておらず、今後下水再生利用ガイドラインなどにそれらの手法が統合され、体系的にまとめられる必要があると考えられる。

下水再生利用ガイドラインにおいて規定されるべき事項[下水再生システム稼働までの流れ(例)]

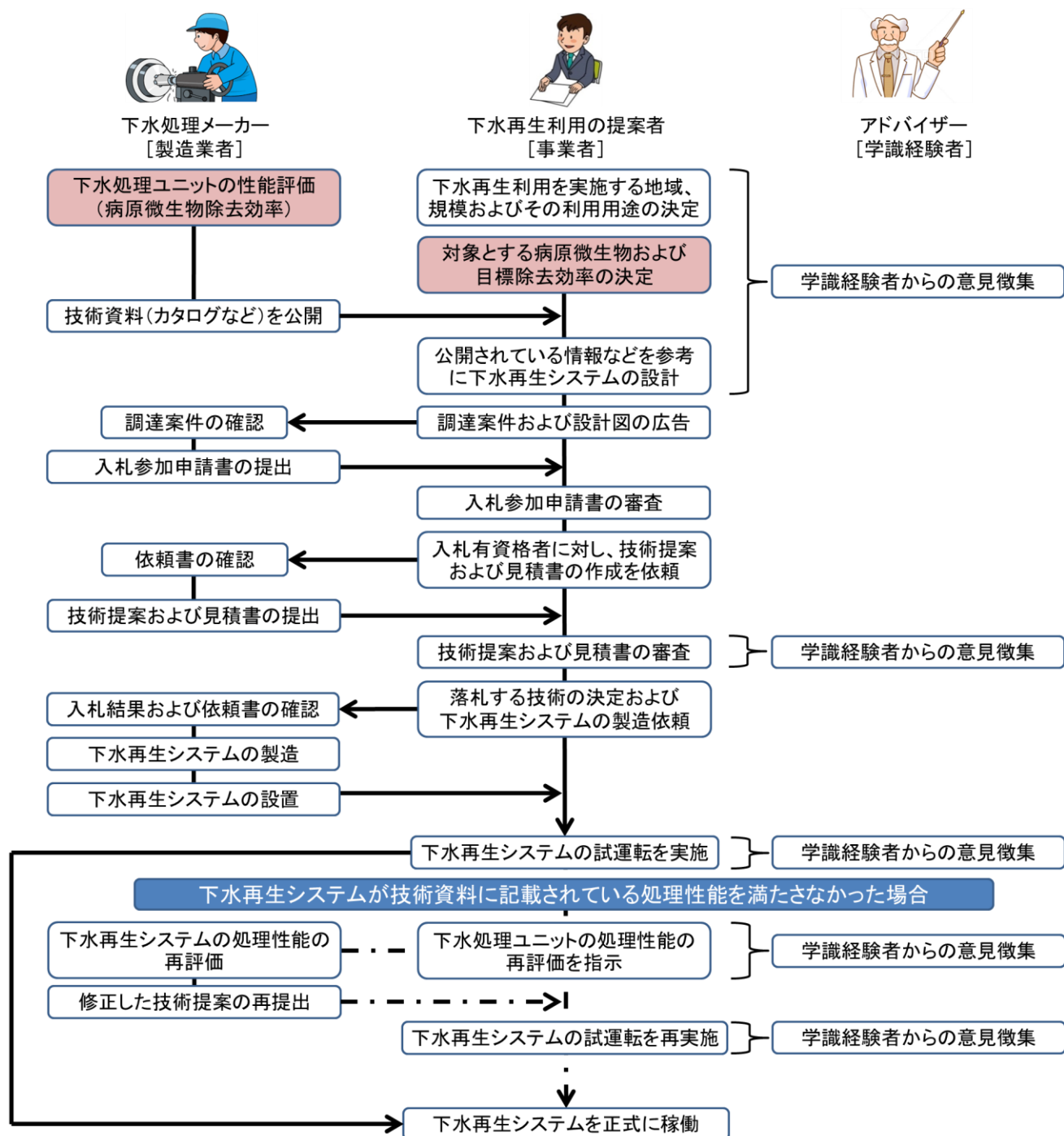


図 1-2 下水再生事業開始から下水再生システム稼働までの流れの具体例（我が国における一般競争入札制度に基づく）（赤色で示す項目が本研究の研究対象）

1.2 本研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究では病原微生物により引き起こされる水系感染症リスクに焦点を当て、下水処理ユニットにおける病原微生物除去効率の定量評価および下水再生システムにおける目標除去効率の算定法をそれぞれ確立・提案することを目的とする。病原微生物の除去効率の定量評価では、統計学的アプローチを用いて下水再生システムにおける病原微生物の除去効率を確率密度分布として表す。下水再生システムにおける病原微生物の目標除去効率の設定については、定量的微生物リスク評価（Quantitative microbial risk assessment: QMRA）の手法を用いて下水再生水中許容濃度を試算し、病原微生物の未処理下水中濃度および下水再生水中許容濃度から下水再生システムにおける病原微生物の目標除去効率を算出する。本研究では、我が国における重要な水系感染症原因微生物である腸管系ウイルスを対象とし、始めに不検出データを含む下水中ウイルス濃度データを用いて下水処理ユニットのウイルス除去効率を評価するための方法論を確立した。次いで、実下水処理場の下水サンプルから得られた腸管系ウイルス濃度データを用いて、確立したウイルス除去効率の評価方法の有用性を示した。最後に、QMRA で用いる腸管系ウイルスの疫学データおよび下水再生利用の曝露パラメータに関する文献値を収集し、上述した手法に従って下水再生システムにおける腸管系ウイルスの目標除去効率を試算した。

1.3 本研究の構成

前節で述べた目的を達成するために、本研究では図 1-2 に従って研究を展開する。

第 2 章では、下水再生利用、腸管系ウイルスおよび QMRA に関する知見を整理するとともに、腸管系ウイルスの年間許容疾病負荷と目標除去効率の関係性を示した。また、下水再生システムにおける腸管系ウイルス除去効率を評価・算出する上での課題を指摘し、今後の研究の方向性を示した。

第 3 章では、先行研究で開発されたベイズ推定モデルを用いて、不検出データを含む腸管系ウイルス濃度データから下水中濃度分布および下水処理プロセスにおける腸管系ウイルス除去効率分布を正確に推定するための方法論を確立した。本ベイズ推定モデルは、従来から採用されている代入法（欠測値に定量下限値やゼロなどの特定の値を代入すること）を用いずに、検出・不検出すべてのデータが対数正規分布に従うと仮定して、ウイルス濃度分布を推定する手法である。本章では、ベイズ推定モデルを用いた統計学的アプローチのウイルス除去効率分布の推定精度を評価するために、検出・非検出のデータを含む人工ウイルス濃度データを生成し、人工ウイルス濃度データを用いて得られたウイルス除去効率分布と、人工ウイルス濃度データを生成した真の分布から得られたウイルス除去効率分布を比較した。

第 4 章では、第 3 章で得られた知見を応用して、4 ヶ所の国内下水処理場の下水サンプル（未処理下水、二次処理水および塩素処理水）から得られた 3 種類の腸管系ウイルス [ア

デノウイルス (AdV)、ノロウイルス genogroup I (NoV GI) およびノロウイルス genogroup II (NoV GII) の下水中濃度分布および各下水処理ユニット (二次処理および塩素消毒) における腸管系ウイルス除去効率分布を推定した。次いで、得られた腸管系ウイルス除去効率および統計学的検定手法を用いて、各下水処理場の下水処理プロセスユニット (二次処理、消毒処理) およびウイルス種の間におけるウイルス処理性能の差をそれぞれ評価した。

第 5 章では、我が国における非細菌性感染性胃腸炎の主要な病因微生物であるノロウイルスを対象として、未処理下水中の NoV GI 濃度、NoV GII 濃度およびノロウイルス genogroup IV (NoV GIV) のモニタリング調査を行った。次いで、未処理下水中から検出された NoV GII をモデルウイルスとして、年間感染症リスクと WHO などにより提唱されている下水再生利用の許容年間疾病負荷の関係式から下水再生水中許容濃度を試算した。また本章では、日本国内における下水再生水の農業灌漑利用を仮定し、農業従事者による下水再生水の誤飲と消費者による生食野菜の喫食のリスクシナリオそれぞれに対し、文献調査の結果をもとに曝露パラメータを設定した。最後に、先行研究で開発されたベイズ推定モデルを用いて推定した未処理下水中 NoV GII 濃度分布と下水再生水中 NoV GII 許容濃度の試算値に基づいて、下水再生プロセス全体における NoV GII 目標除去効率を試算し、諸外国で既に運用されているガイドライン値などと比較・考察した。

第 6 章では、本研究の結論および今後の課題を示した。

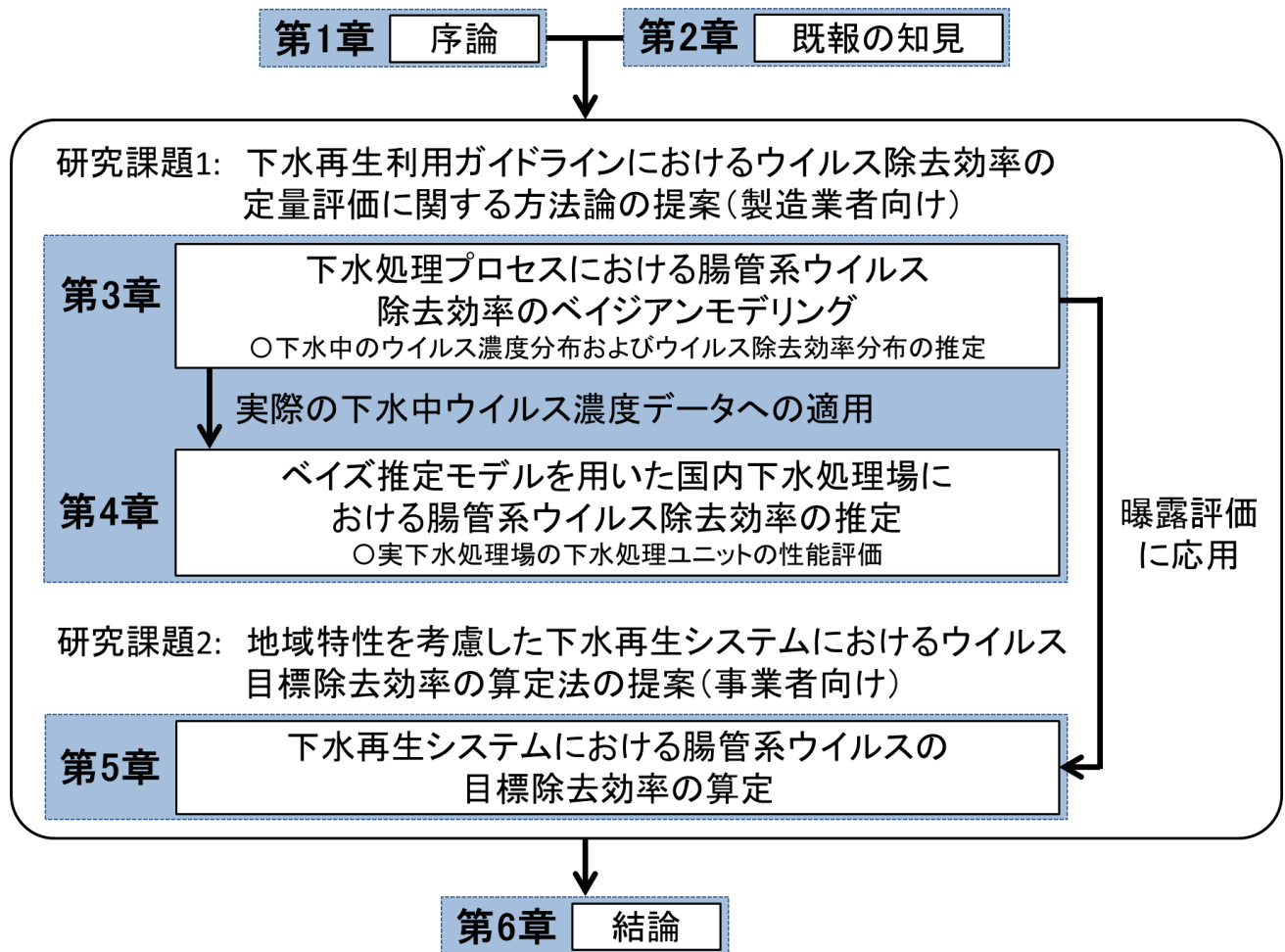


図 1-3 本論文の構成

第2章

既往の知見

2.1 下水再生水の利用状況と国際基準化の動き

2.1.1 諸外国と我が国における下水再生利用状況の比較

都市部への人口集中に伴う水需要量の増加は、世界の下水再生水市場の規模を急速に拡大している。2013 年 2 月に発行された「Water World Magazine: Global wastewater reuse, recycling markets expected to expand, research says」によると、世界の下水再生水市場の規模は 2009 年から 2012 年にかけて約 67 億 \$ から約 95 億 \$ にまで増加し、2017 年までに約 234 億 \$ まで増加することが予想されている(Water World, 2013)。世界全体での下水再生水の生産量としては、2008 年の段階において日量約 2,100 万 m^3 (年間約 766,500 万 m^3) であり、国別の下水再生水生産量の割合では米国が圧倒的多数(36%)を占めている(図 2-1a)(Jiménez and Asano, 2008)。他方で、世界各国における国内で発生した処理水の再利用率については、2007 年の段階においてイスラエルで約 83%、スペインで約 12%、イタリアで約 7%、米国で約 6.5%、日本で約 1.4%となっており(図 2-1b)、イスラエル国内における下水再生利用の割合が他国と比較して群を抜いて高い(国土交通省, 2008)。乾燥地域に属する国の一つであるイスラエルでは、慢性的な水資源の不足や人口増加による水需要量の増加に対処する必要

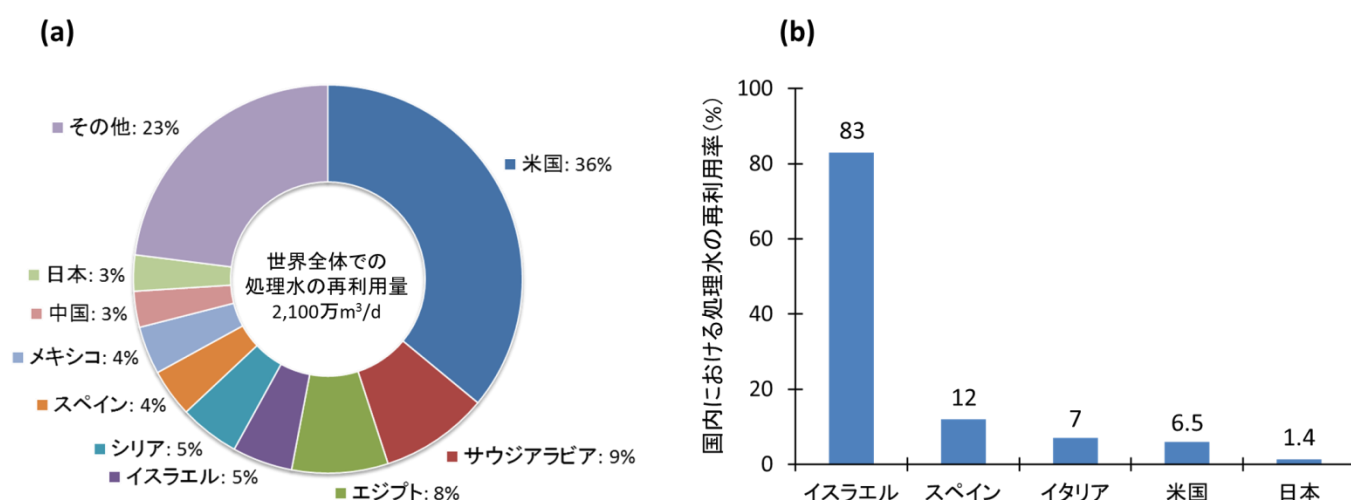


図 2-1 (a) 処理水の再利用量の国別割合、および(b) 各国における処理水の再利用率 (National Reserach Council, 2012 および国土交通省, 2008 をもとに作成)

性から、下水再生利用に係る事業が同国内における一大産業となっている (European Environment Agency, 2014)。イスラエルは、イスラエル政府が後援する国際水環境技術博覧会 (Water Technology and Environmental Control Exhibition and Conference: WATEC) を通じて、イスラエルが保有する下水再生利用や下水再生水の水質管理に係る事業を紹介している (Water Technology and Environmental Control Exhibition and Conference, 2016)。イスラエルが直面している環境条件や人口増加による水不足問題は、イスラエル固有の課題ではなく、国土の大部分が乾燥地域もしくは半乾燥地域に属している米国や中国などを始め各国が同様の課題に直面している (Liu et al., 2016; U.S. Environmental Protection Agency, 2012)。WATEC では、イスラエルが保有する水関連技術の導入を予定している多くの国々が参加しており、イスラエル国内の水関連企業と技術提携を締結している (Israel Ministry of Economy and Industry, 2013)。このような背景から、イスラエルは下水再生利用に係る事業に対して世界的先駆者の立場にあり、イスラエルを中心として下水再生利用に係る事業が世界規模で展開している。

世界における下水再生水の利用用途を図 2-2 に示す。世界全体で生産された下水再生水の約 32%は農業灌漑利用されており、次いで修景灌漑で約 20%、工業用水で約 19%である (Lautze et al., 2014)。世界の水利用状況を概観すると、世界全体の取水量の約 70~80%が農業灌漑利用されている (Attwater et al., 2016)。下水再生利用の先導的立場にあるイスラエルにおいても、2015 年の段階において同国内で発生する処理水の約 86%が農業利用されている [イスラエルにおける下水再生水生産量は、2008 年の段階において日量約 101 万 m^3 (年間約 36,865 万 m^3) である] (Israel Water Authority, 2015; National Research Council (US). Committee on the Assessment of Water Reuse as an Approach for Meeting Future Water Supply Needs, 2012)。先述 (1.1) したように、世界的な人口増加および都市部への人口集中による産業の発展や生活

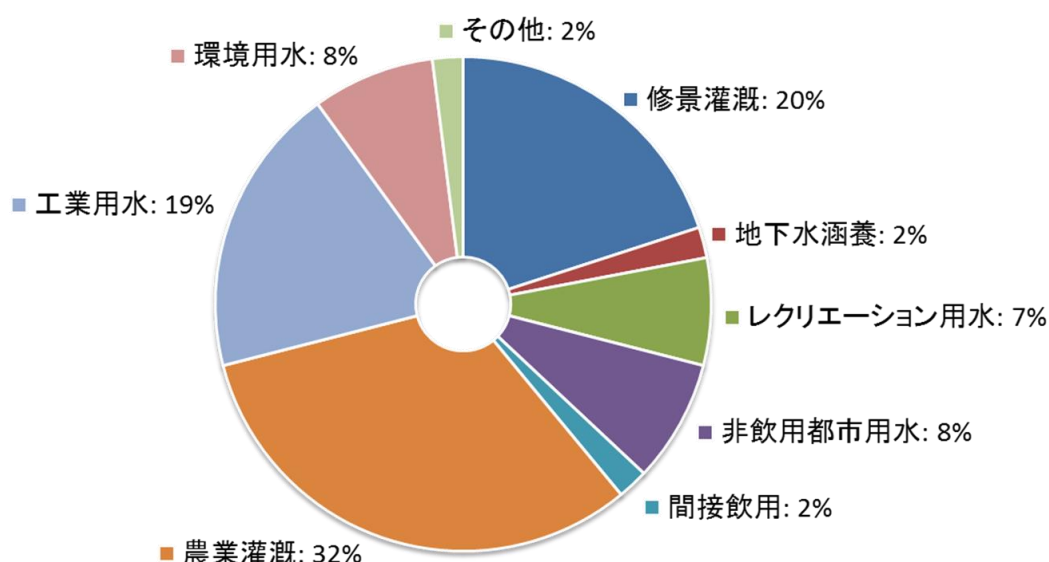


図 2-2 世界の下水再生水（三次処理水）の利用用途
(Lautze et al., 2014 をもとに作成)

水準の向上に伴う食料作物やバイオマス燃料の生産量の増加が予測されており (International Energy Agency, 2012)、世界各国における農業用水の安定確保が今後重要な施策になると考えられる。

○米国

下水再生水の生産量が最も多い米国は、世界で初めて下水再生利用に係る事業に着手した国であり、1926 年にアリゾナ州で下水再生水の非飲用利用が始まり、1970 年代にはフロリダ州において下水再生水の非飲用利用を目的とした大規模な下水再生施設が建造されている (National Academy of Sciences, 2012)。米国における下水再生水の利用状況を図 2-3 に示す (BlueTech Research, 2016)。米国において再生利用された処理水量は、2008 年の段階において日量約 760 万 m^3 (年間約 277,400 万 m^3) であり、同国内で発生する処理水の約 6.5% 程度であった (BlueTech Research, 2016; Jiménez and Asano, 2008)。米国内で発生した処理水は、農業灌漑用水としての再利用 (29%) が最も多く、次いで都市用水・商業用水 (25%)、間接的飲用水 (15%) となっている (BlueTech Research, 2016)。その他にも、カリフォルニア州、フロリダ州およびテキサス州などの慢性的な水資源不足が課題とされている地域では、発電施設、油精製、化学工業、金属加工などの産業分野において下水再生水を工場冷却水として利用している (U.S. Environmental Protection Agency, 2012)。米国における下水再生水は、比較的低いコストで生産可能、且つ合法的な代替水資源として位置づけられており (National Research Council (US). Committee on the Assessment of Water Reuse as an Approach for Meeting Future Water Supply Needs, 2012)、今後米国全体において水資源確保に係る事業の重要な構成部分を占めることが予測されている (U.S. Environmental Protection Agency, 2012)。

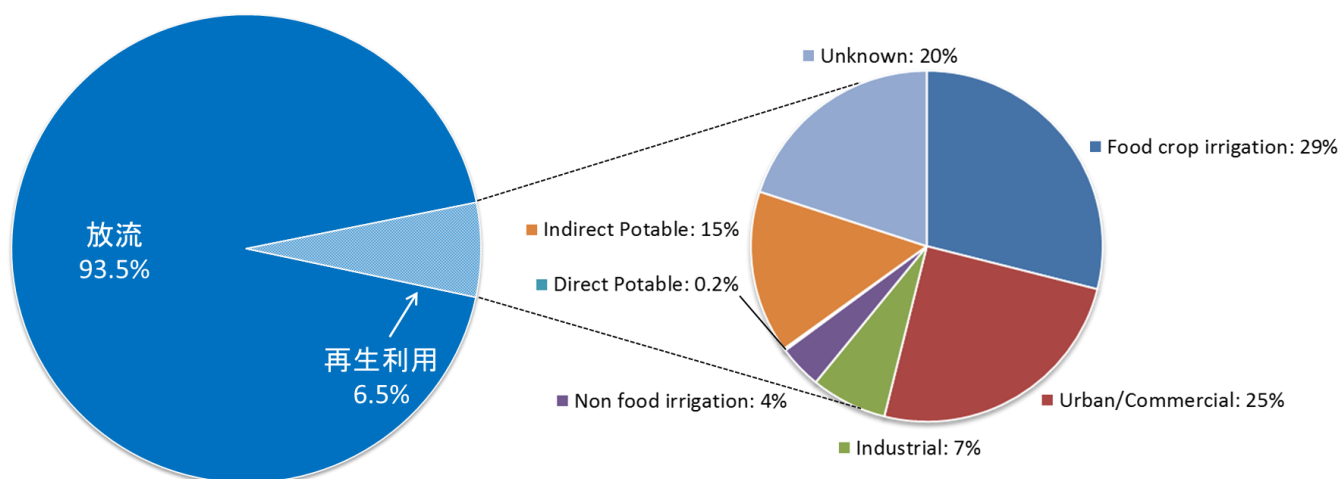


図 2-3 米国における下水再生水の利用状況
(BlueTech Research, 2016 をもとに作成)

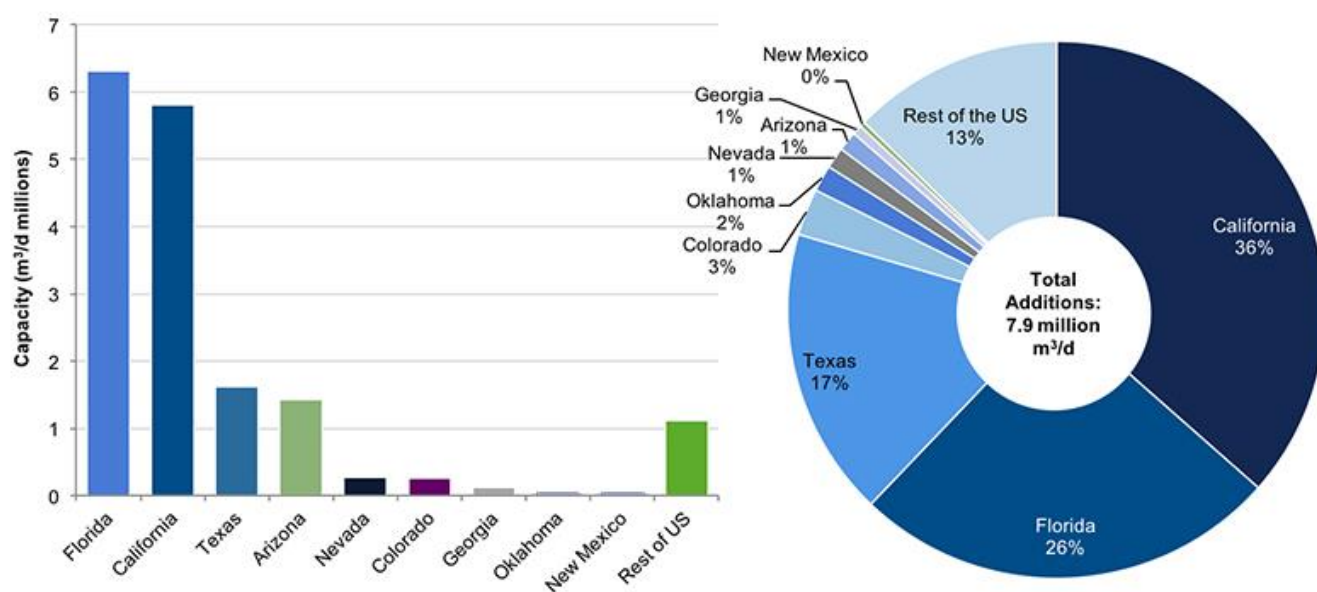


図 2-4 米国各州における下水再生水量および 2016-2026 年にかけて予測される下水再生水量の州別割合 (Bluefield Research, 2016 から抜粋)

米国各州における下水再生水量および 2016-2026 年にかけて予測される下水再生水量の州別割合を図 2-4 に示す(Bluefield Research, 2016)。米国における州別下水再生水の生産量はフロリダ州が最も多く、次いでカリフォルニア州、テキサス州である(Bluefield Research, 2016)。他方で、2016-2026 年にかけて予測される下水再生水量の州別割合を概観すると、カリフォルニア州がフロリダ州を抜いて米国全体の約 36%を占めており、次いでフロリダ州で約 26%、テキサス州で約 17%となることが予測されている(Bluefield Research, 2016)。

カリフォルニア州は米国内で最も人口の多い州であり(World Population Review, 2016)、人口の大部分が乾燥地域に居住している(California Department of Water Resources, 2008)。カリフォルニア州の同地域では、従来からの水不足に対応するために、総合的な水資源管理の中に下水再生利用を位置づけ、2030 年までに予測される人口増加に伴う生活用水の需要量の増加に対し、約 30~50%を下水再生水から賄うことを目標としている(California Department of Water Resources Recycled Water Task Force, 2003)。カリフォルニア州は、米国内においても下水再生利用の先導的立場にあり、1890 年から下水再生水の農業利用を実施している(California Department of Water Resources Recycled Water Task Force, 2003)。カリフォルニア州で利用されている下水再生水は、2009 年の段階において年間約 72,000 万 m^3 (日量約 197 万 m^3) であり(California State Water Resources Control Board, 2014)、その利用用途としては農業灌漑利用の約 37%が最も多く、次いで修景灌漑用水で約 23%、地下水涵養で約 19%である(California Department of Water Resources, 2012)。上述したように、カリフォルニア州では、農業用水の安定確保を目的として下水再生水が利用され始めたものの(California Department of Water Resources Recycled Water Task Force, 2003)、近年では都市部における修景灌漑利用の

割合が大きく増加している(California Department of Water Resources, 2012)。修景灌漑用水としては、カリフォルニア州・ロサンゼルス郡において下水再生水が修景灌漑利用されて以降(Environmental News Network, 2013)、ゴルフ場、公園、校庭などで下水再生水が利用されている(California Department of Water Resources, 2012)。地下水涵養としては、2004年カリフォルニア州・オレンジ郡の水地区(Orange County Water District: OCWD)および衛生地区(Orange County Sanitation District: OCSD)の共同プロジェクトとして、1974年に建造された大規模地下水涵養システムである「Water Factory 21」を更新し、日量26万 m^3 (年間約9,490万 m^3)の処理水が地下水涵養に利用される施設を構築した(National Research Council (US). Committee on the Assessment of Water Reuse as an Approach for Meeting Future Water Supply Needs, 2012; Orange County Water District and Orange County Sanitation District, 2015)。オレンジ郡の同施設では、一次処理と二次処理が行われた処理水を、隣接するオレンジ郡水道局によって運営されている施設にパイプを通じて送水し、さらに二次処理水を精密ろ過(Microfiltration: MF)、逆浸透(Reverse osmosis: RO)および促進酸化処理(Advanced Oxidation Process: AOP)により処理し、その後高度処理水が天然の砂を通して地下帯水層に供給している(Orange County Water District and Orange County Sanitation District, 2015)。下水処理水の地下水涵養は、遠隔地からの河川水導水や海水淡水化と比較して必要とされるエネルギーが低いことから、その持続可能性の観点からも重要性の高い施策として注目されている。

フロリダ州では、1970年代においてセントピーターズバーグ市での大規模な下水再生利用に係る事業の着手を始めとして(National Academy of Sciences, 2012)、水環境中への処理水の放流量の削減および飲用水源の保全を目的とし、下水再生水を用いた湿地帯の再生などに取り組んでいる。フロリダ州は、カリフォルニア州とは異なり年間の降水量が多いものの、沿岸部を中心に人口が爆発的に増加していることから(World Population Review, 2016)、将来的な水資源の不足が懸念されている。フロリダ州では、1987年に下水再生利用や海水淡水化などの再生水利用を推進するプログラムである「Florida Statutes Section 403.064: Reuse of reclaimed water」が策定され、次いで1989年にフロリダ州内のWater Resource Caution Areasにおいて再生水利用の実施が義務づけられている(Turcotte, 1997)。図2-4より、フロリダ州で利用されている下水再生水は、2015年の段階において日量約280万 m^3 (年間約102,200万 m^3)であり(Florida Department of Environmental Protection, 2016)、米国内で生産される下水再生水の40%近くを占めている。フロリダ州で生産される下水再生水の大部分は修景灌漑用水として利用されており、2015年の段階において362,737世帯の家庭、537のゴルフ場、1022の公園、369の校庭およびその他の公共施設において下水再生水が修景灌漑利用されている(Florida Department of Environmental Protection, 2016)。他方で、フロリダ州における下水再生水の工業利用の割合が近年著しく増加しており、2014年から2015年にかけての工業用水利用の増加率は5.9%であり、他の利用用途と比較して高い増加率を示している(Florida Department of Environmental Protection, 2016)。しかしながら、農業灌漑や地下水涵養に利用される下水再生水量については年々減少傾向にあり、フロリダ州全体で利用される下水再生水量は2012年以降僅かに減少傾向にある(Florida Department of Environmental Protection,

2016)。フロリダ州は、下水再生水を将来的に重要な代替水資源の一つとして位置づけており、同州における下水再生利用を継続的に推奨している(Florida Department of Environmental Protection, 2016)。

テキサス州では、サンアントニオ市における下水再生水の農業灌漑利用を始めとし、河川流量の増加による景観改善や地下水涵養などに下水再生水を利用している(Texas Water Development Board, 2011)。テキサス州は、カリフォルニア州に次いで 2 番目に人口が多い州であり、カリフォルニア州、フロリダ州と並んで高い人口増加率を示している(World Population Review, 2016)。それに加え、2011 年にはテキサス州において記録的な干ばつが観測されており(Hoerling et al., 2013)、高気温・低降水量である同州において水資源の安定確保は逼迫した課題となっている。テキサス州は、テキサス州水開発委員会 (Texas Water Development Board: TWDB) 主導のもと「Direct Potable Reuse Project」を策定し、2013 年において米国内で初めてとなる直接飲用水製造施設をビッグスプリング市に建設した(Texas Water Development Board, 2015)。ビッグスプリング市の同施設では、一次処理と二次処理が行われた処理水に対し、塩素消毒処理、砂ろ過、MF、RO、AOP および紫外線消毒処理を行い、その処理水を浄水施設に送水し、浄水処理後に飲用水として用いている(Texas Water Development Board, 2015)。テキサス州は、ビッグスプリング市のほかに、コロラド川流域の 3 都市において直接飲用水製造施設の建設を予定しており、2014 年にウィチタフォールズ市で直接飲用水製造施設を一時的に稼働している(Texas Water Development Board, 2015)。直接飲用利用のほかに、テキサス州では 2005 年に「The Texas manual on rainwater harvesting」を発行しており、貯水した雨水を修景灌漑用水、生活用水、環境用水および地下水涵養として利用している(Texas Water Development Board, 2005)。

○欧州

欧州連合 (European Union: EU) では、2014 年の段階において EU 全体で年間 75,000 万 m^3 (日量約 205 万 m^3) の下水再生水が利用されており(Angelakis and Gikas, 2014)、スペインなどの高温・低降水量である欧州南部の国が先導的立場となり、二次処理水もしくは三次処理水の再利用が実施されている(European Commission, 2010)。EU 加盟国における下水再生利用は、2000 年に策定された「EU Water Framework directives: EU WFD」に従って実施されている(European Commission, 2010)。EU WFD は必要に応じて適宜修正・更新されており、2010 年に発行された最新の EU WFD によると、EU 加盟国の都市の 60%において、地下水が過剰揚水されていることや、EU 加盟国全体で保有する表流水の 20%が下水処理場からの放流水などにより汚染されていることなどが報告されている(European Commission, 2010)。このような背景のもと、EU は EU WFD に加え、2006 年と 2008 年に新たに策定された「2006/118/EC: Groundwater Directive」と「2008/105/EC: Environmental Quality Standards Directive」をもとに、EU 加盟国における水資源保全を目的とした下水再生利用の推奨と、水環境に対する処理水の影響の最小化に係る施策を実施している(European Commission, 2010)。EU 全体における下水再生水利用に係る活動は活発化しており、2025 年には EU 全体で年間 322,200 万 m^3 (日

量約 883 万 m^3) の下水再生水が利用されると予測されている。

世界的にも下水再生利用の先導的立場にあるスペインは、2008 年の段階において日量約 82 万 m^3 (年間約 29,930 万 m^3) であり(Jiménez and Asano, 2008)、上述したように同国内で発生する処理水の約 12%を再利用している(国土交通省, 2008)。スペインでは、同国内における適切な下水再生システムの整備を目的とした事業である「State Water Reuse Plan」の基盤として、2005 年に同国内の土木事業に係る政策に従事する機関である CEDEX (Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas) とスペイン環境田園海洋省 (Ministry of Environment and Rural and Marine Affairs: MARM) が合同で「Reuse Database (RDB)」を構築した(Iglesias et al., 2010)。RDB は、スペイン国内で稼働している下水再生システムの要約だけでなく、下水再生利用に係る情報 (下水再生水の利用用途、下水再生システムの建設および運転に必要な費用、指針など) を提供している(Iglesias et al., 2010)。RDB によると、2005 年から 2007 年にかけてスペイン国内で生産される下水再生水の約 71%が農業灌漑利用されており、次いで環境用水で約 18%、レクリエーション用水で約 7%、都市用水で 4%である(Iglesias et al., 2010)。スペインで整備された RDB は、米国・カリフォルニア州においても同様のデータベースが整備されており(California State Water Resources Control Board, 2014)、下水再生水の水質もしくは汚染状況のモニタリングなどにも役立てられている。

○豪州

豪州では、2008 年の段階において日量 46 万 m^3 (年間約 16,648 万 m^3) の下水再生水が利用されており、特に都市部の人口密度が高く、且つ取水量が比較的多い南東部地域 (クイーンズランド州、ビクトリア州、ニューサウスウェールズ州) や西オーストラリア州において下水再生利用が推奨されている(Apostolidis et al., 2011)。豪州は、国土の大部分が乾燥地域もしくは半乾燥地域であること、降雨量が地理的に偏在していること、人口の大部分が南東部および西部の都市部に集中していることなどに加え、人口が集中する南東部の低降水量地域に位置するマーレーダーリング川において農業灌漑用水が大量取水されていることから、世界的にも水資源逼迫地域として認識されている(安田ら, 2007; 三石真也, 2010)。豪州全体で取水される水量の約 70%は農業灌漑利用されており(Adapa et al., 2016)、近年では 2001 年以降豪州の各地域で年々深刻化している干ばつの影響により、農業分野における経済的ダメージが懸念されている(安田ら, 2007)。豪州では農業灌漑用水の確保を目的として、各主要都市におけるダムの貯水状況に応じた都市用水の使用制限を段階的に課すといった節水対策を敢行している(安田ら, 2007)。一例として、クイーンズランド州・ブリスベンでは、1 日 1 人当たりの水使用量の目標値として 140 L を規定しており (1 日 1 人当たりの水使用量は 188~274 L とされている) (Asano et al., 2007; Walton and Hume, 2011)、水使用量の目標値を規定した後では 1 日 1 人当たりの水使用量の平均が 180 L から 129 L まで減少した(Walton and Hume, 2011)。しかしながら、特に南東部地域における干ばつの長期化が予測されていることから(Jenkins et al., 2012)、上述した水利用の効率化を図るとともに、下水再生利用や雨水再利用などの新たな水資源開発に係る事業の推進が検討されている。

豪州における下水再生水の利用用途としては、農業灌漑用水や都市用水が主であり、次いで工業用水として利用されている(Apostolidis et al., 2011)。豪州連邦政府 (Australian Commonwealth Government) は、同国内最大規模の下水再生利用に係る事業として「Western Corridor Recycled Water Project」に着手し、2008年にクイーンランド州・ブリスベンにおいて日量 23 万 m^3 (年間約 8,468 万 m^3) の下水再生水を製造可能な下水再生施設を設立した (Queensland Government, 2009)。同施設は、2009年の段階において同地区で発生した未処理下水の約 75%を下水再生水として利用できるよう処理しており、その下水再生水は主に工業用水や間接的飲用水として利用されている(Apostolidis et al., 2011)。ビクトリア州メルボルンにおける下水再生施設「Eastern Treated Plant」および「Western Treatment Plant」は、2009年の段階において同地区で発生した未処理下水の約 20%および約 25%をそれぞれの施設で処理しており、その下水再生水は主に農業灌漑用水や修景灌漑用水として利用されている(Apostolidis et al., 2011)。他方で、西オーストラリア州は、家庭雑排水 (greywater) や雨水の再利用を推奨しており、各家庭の住宅設備として污水处理システムおよびその処理水の分配システムの設置に助成制度を整備している(Eastern Metropolitan Regional Council, 2011)。

○シンガポール

アジア圏内では、シンガポールにおいて二次処理水を MF もしくは限外ろ過 (Ultrafiltration: UF) した後、RO および紫外線消毒処理を行うことで、飲用水を生産する「NEWater プロジェクト」が実施されている(Public Utilities Board Singapore's National Water Agency, 2016a)。シンガポールは、マレーシアのジョホール州と「Johor River Water Agreement of 1961-1962」(シンガポールへの原水の提供と、ジョホール州への水道水の提供の双務契約)を締結しており、シンガポール国内の水消費量の約 40%をジョホール州からの輸入に依存しているのが現状である(Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016)。しかしながら、ジョホール州との協定は 2061 年を契約期限としており、国内において水資源を確保することが困難であるシンガポールは、代替水資源開発に関する新たな政策を講ずるに至っている。NEWater プロジェクトはシンガポールが実施する水資源確保に関する政策の一つであり、2014 年時点において同国内の水需要量の約 30%を 4 施設の NEWater プラントから賄っており、2060 年までに同国内における年間水需要量の約 55%を同プロジェクトにより賄うことを目標としている(Public Utilities Board Singapore's National Water Agency, 2016b)。NEWater プロジェクトは、海水淡水化などの政策と比較して、再生水の生産に必要とされるコストが低いことから、シンガポールにおける代替水資源開発に係る政策の中で重要な立ち位置にある(Tortajada, 2006)。

○中国

中国では、国内において利用可能な水資源が偏在しており、特に中国北部の地域では水資源問題が深刻な状況にある(王, 2011)。中国が保有する国民 1 人当たりの年間水資源量は、2010 年の段階において約 2,000 m^3 であり、世界平均と比較して 1/4 程度である(王, 2011)。

さらに、行政区画ごとの1人当たりの年間水資源量を概観すると、中国北部に位置する北京市の1人当たりの年間水資源量は 126 m^3 であり、国連開発計画（United Nations Development Programme: UNDP）が定義する「絶対的な水不足（ 500 m^3 以下）」の状況に直面している（United Nations Development Programme, 2006; 王, 2011）。中国では、2008年の段階において年間 $166,000\text{ 万 m}^3$ （日量 455 万 m^3 ）の下水再生水が生産されており、同国内で発生する処理水の約8%が再利用されている（Yi et al., 2011）。特に、政治の中心的な機能を有する北京市では、下水再生利用に係る事業が活発化しており、2010年の段階において同市の年間処理水量の約59.3%（中国全体で生産される下水再生水の約40%）である年間 $68,000\text{ 万 m}^3$ （日量 186 万 m^3 ）の処理水を再利用しており、その内訳は農業灌漑用水で約44%、環境用水で約31%、工業用水で約21%、都市用水で約4%である（Chang and Ma, 2012; Yi et al., 2011）。北京市は、同市の年間水消費量の約19.3%を下水再生水に依存しており、下水再生水が同市における「第2の水資源」として位置づけられている（Chang and Ma, 2012）。

○日本

我が国では、1980年に水洗用水として下水再生水の利用が始まって以来、様々な用途に下水再生水が利用されている（Asano et al., 1996）。2007年度に我が国において再生利用された処理水の割合およびその目的別割合を図2-5に示す（国土交通省, 2008）。我が国において再生利用された処理水量は、2005年の段階において年間約 $19,591\text{ 万 m}^3$ （日量約 54 万 m^3 ）

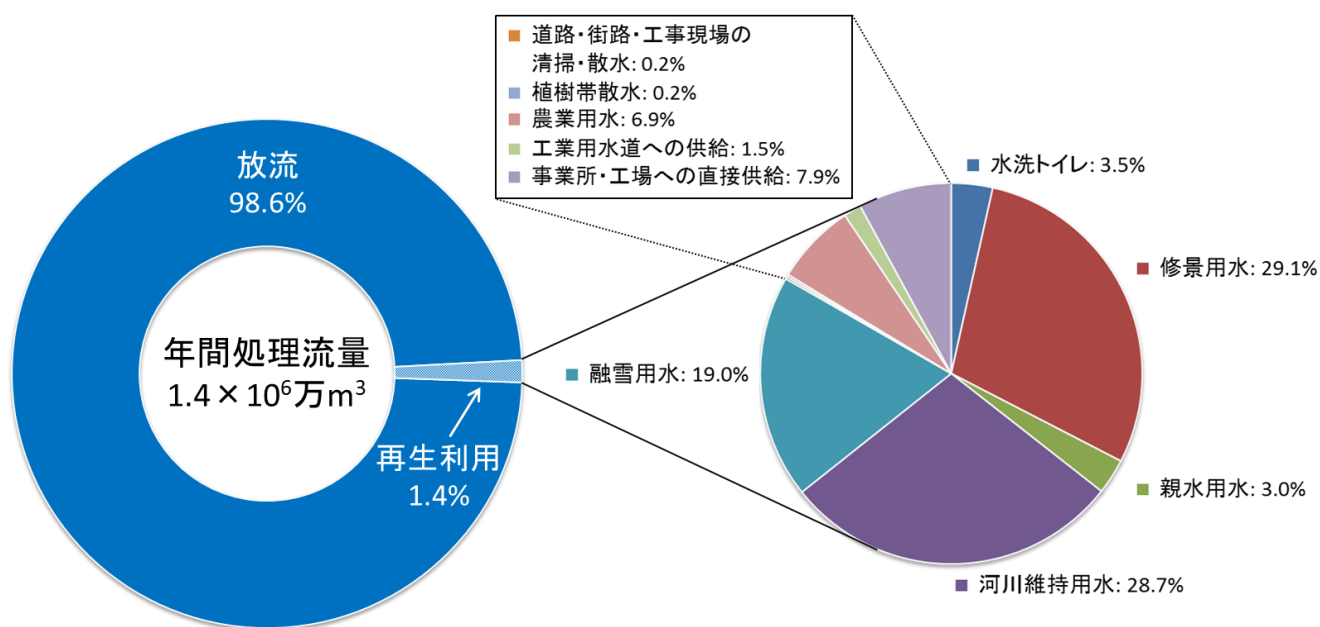


図2-5 我が国における下水再生水の利用状況
（国土交通省, 2008 をもとに作成）

であり、我が国の下水処理場における年間処理流量の約 1.4%程度であった(国土交通省, 2008)。図 2-5 に示した下水再生水の用途は、再生水としての利用を目的として下水処理場から直接送水され利用されている処理水を対象としたものであり、河川への放流後に河川水とともに取水している事例や、下水処理場から近隣の河川などに放流された処理水が河川流量の増加に寄与している事例などは含まれていない(国土交通省, 2008)。我が国における下水再生水の利用用途は、河川維持用水(約 29.1%)、修景用水(約 28.7%) および融雪用水(約 19.0%) が大部分を占めており、次いで工業用水(約 9.4%)、農業灌漑用水(約 6.9%)、トイレ水洗水(約 3.5%) である(国土交通省, 2008)。トイレ洗浄水としての利用割合(約 3.5%) は他国(図 2-2)と比較して高く、特に東京における下水再生利用については、大便器や小便器の水洗利用を主眼に置いている(国土交通省, 2008; 東京都下水道局, 2016a)。高く、特に東京における下水再生利用については、大便器や小便器の水洗利用を主眼に置いている(国土交通省, 2008; 東京都下水道局, 2016a)。東京都では、下水再生施設 3 ヶ所(落合水再生センター、有明水再生センター、有明水再生センター)から都内 7 地区(西新宿および中野坂上地区、臨海副都心地区、品川駅東口地区、大崎地区、汐留地区、永田町および霞が関地区、八潮および東品川地区)に対しそれぞれ下水再生水を供給しており(東京都下水道局, 2016b)、平成 27 年度において日量約 1 万 m^3 (年間約 371 万 m^3) の下水再生水が供給されている(表 2-1) (東京都下水道局, 2016a)。これら下水再生施設から供給される下水再生水は、上述したようにトイレ洗浄水などの都市用水としての利用が主であり、その他にも環境用水や修景灌漑用水としても利用されている(東京都下水道局, 2016c)。下水再生利用の経済的効果についても実証されており、下水再生水を 1 月当たり 2,000 m^3 使用した場合では、水道料金(水道孔径 30~100 mm)と比較して 33~43%の費用削減が期待されている(東京都下水道局, 2016d)。

我が国における下水再生水の農業灌漑利用についてみると、国内で利用されている下水再生水全体の 6.9%程度であり、他国と比較して低い水準であった(国土交通省, 2008)。近年、我が国では農業の多様化に伴い、農業灌漑用水の利用形態が大きく変化しており、年間を通じた農業灌漑用水の安定確保が課題となっている(濱田ら, 2011)。下水再生水の農業灌漑利用に関しては水資源の確保のみならず、下水再生水中に含まれる窒素やリンなどによる肥料削減効果が期待されている。特に主要栄養塩の一つであるリンの有効利用に関しては、リン資源の確保をリン鉱石の輸入に 100%依存している我が国の状況を考慮すると(農林水産省, 2010)、下水再生水の農業灌漑利用は農業代替品の存在しない貴重な資源の延命を実施する上で極めて重要な試みであるといえる。

他方で、食料生産量と水資源量は密接な関係をもっており、食料の貿易量と水資源量を定量的に関連づける方法として、「ヴァーチャルウォーター」の概念が提唱されている(Howsam and Carter, 1996)。ヴァーチャルウォーターは、輸入物質を自国内で生産すると仮定した場合に必要とされる水量であり、国境を越えて利用される水資源量を定量化したものである(Okamoto et al., 2003)。我が国では、2000 年の段階において年間のヴァーチャルウォーター輸入量が約 62.7 km^3 であり、先進国の中では最大であった(Okamoto et al., 2003)。農林水

表 2-1 東京都の下水再生施設およびその供給地区
(東京都下水道局, 2016a および東京都下水道局, 2016b をもとに作成)

下水再生施設	下水再生水供給地区	下水再生水供給量 (m ³ /日)
落合水再生センター	西新宿および中野坂上地区	3,351
有明水再生センター	臨海副都心地区	2,130
	品川駅東口地区	1,755
	大崎地区	812
芝浦水再生センター	汐留地区	1,119
	永田町および霞が関地区	427
	八潮および東品川地区	574
合計		10,168

産省の報告では、我が国におけるカロリーベースの食料自給率は40%前後で推移しており、日本国内で消費される食料の大部分を諸外国からの輸入に依存している(農林水産省, 2016)。これをヴァーチャルウォーターに換算した場合、我が国は水資源の大部分を諸外国からの食料の輸入に依存している状況にあるといえる。

2.1.2 下水再生利用の国際標準化

これまで下水再生利用に係る事業については、イスラエル、米国、日本など各国においてそれぞれ独立して実施されてきたが、最近では国際標準化団体の一つである国際標準化機構 (International Organization for Standardization: ISO) に基づき、下水再生利用に係る国際基準化活動が活発化している。水環境に係る ISO 専門委員会 (Technical Committee: TC) を表 2-2 に示す(館ら, 2015)。水環境分野においては、ISO/TC224「Service activities relating to drinking water supply systems and wastewater systems - Quality criteria of the service and performance indicators (飲用水および下水サービスに関する活動—サービス品質基準および業務指標)」(International Organization for Standardization, 2017a)に係る専門委員会の設置以前は、製品の形状、材質および測定方法などを定める「製品標準」の作成が主流であったものの、最近では社会的課題の解決策や事業など「サービス標準」の作成が顕著である(館ら, 2015)。「サービス標準」の作成に係る専門委員会としては、ISO/TC268「Sustainable cities and communities (水インフラを含めた都市の持続的発展)」(International Organization for Standardization, 2017b)や ISO/TC282「Water Reuse (水の再利用)」(International Organization for Standardization, 2017c)などがあり、社会的課題の解決に貢献する新技術の開発や新たな市場の創生を目的とした活動が主となっている(館ら, 2015)。

表 2-2 水環境に係る ISO 専門委員会
(館ら, 2015 をもとに作成)

ISO 専門委員会	内容 (幹事国)
TC5 ^a	金属管および管継手 (中国)
TC23/SC18 ^b	灌漑・排水装置とシステム (イスラエル)
TC30	管路における流量測定 (イギリス)
TC113	開水路における流量測定 (インド)
TC138	流体輸送用プラスチック管, 継手およびバルブ類 (日本)
TC147	水質 (ドイツ)
TC223	社会の危機管理 (スウェーデン) → TC292に併合
TC224	飲料水および下水サービスに関する活動 - サービス品質基準および業務指標 (フランス)
PC251 ^c	アセットマネジメント (イギリス)
PC253	灌漑のための下水処理水再利用 (イスラエル) → TC282に併合
TC255	バイオガス (中国)
TC268	都市の持続的発展 [スマートコミュニティ] (フランス)
TC275	汚泥の回収, リサイクル, 処理および処分 (フランス)
TC282	水の再利用 (日本・中国)
TC292	セキュリティ (スウェーデン)

a. TC (Technical Committee: 専門委員会) ; b. SC (Sub-committee: 分科委員会) ;

c. PC (Project Committee: プロジェクト委員会)

下水再利用に係る専門委員会である ISO/TC282 の発足としては、始めにイスラエルが提案したプロジェクト委員会 (Project Committee: PC) である ISO/PC253「Treated wastewater reuse for irrigation (灌漑のための下水処理水再利用)」の設置を皮切りに、中国において都市域での下水再生利用と、日本において下水再生利用における下水処理性能およびリスク評価方法についての国際規格化がそれぞれ提案されたことにより、イスラエルを議長国、中国と日本を共同幹事国として 2013 年 6 月に設立された(館ら, 2015)。2014 年 1 月に東京で開催された ISO/TC282 第 1 回会議では専門委員会の体制構築を目指した討議が行われ、イスラエル、中国および日本がそれぞれ提案した課題について個別の分科委員会 (Sub Committee: SC) が設置された (図 2-6) (館ら, 2015)。具体的には、ISO/TC282 は、イスラエルが主導する SC1「Treated wastewater reuse for Irrigation (灌漑目的の下水処理水の再利用)」、中国が提案する SC2「Water reuse in urban areas (都市における水の再利用)」、日本が提案する SC3「Risk and performance evaluation of water reuse systems (水再利用システムのリスク・性能評価)」の 3 つの SC を設置し、ISO/TC282 全体および SC の直下にそれぞれ設置された作業部会 (Working Group: WG)、および 37 ヶ国の参加国から構成される (International Organization for Standardization, 2017c)。ISO/TC282 において、日本が主導的立場にあるのは TC282/WG2

「Terminology (用語)」および SC3 であり (International Organization for Standardization, 2017c)、2014 年 11 月にポルトガル・リスボンで開催された ISO/TC282 第 2 回会議において日本が提案した議題である「下水再生利用における下水処理性能の評価および健康リスクの評価方法に係るガイドラインの開発」が可決された(国土交通省, 2014)。このガイドラインの策定については、今後 ISO/TC282 関係各国との協議のもとに、下水再生システムの下水処理性能評価方法および下水再生利用に起因するリスク評価手法の国際規格素案を作成する必要がある、日本の同事業に対する貢献が期待されている。

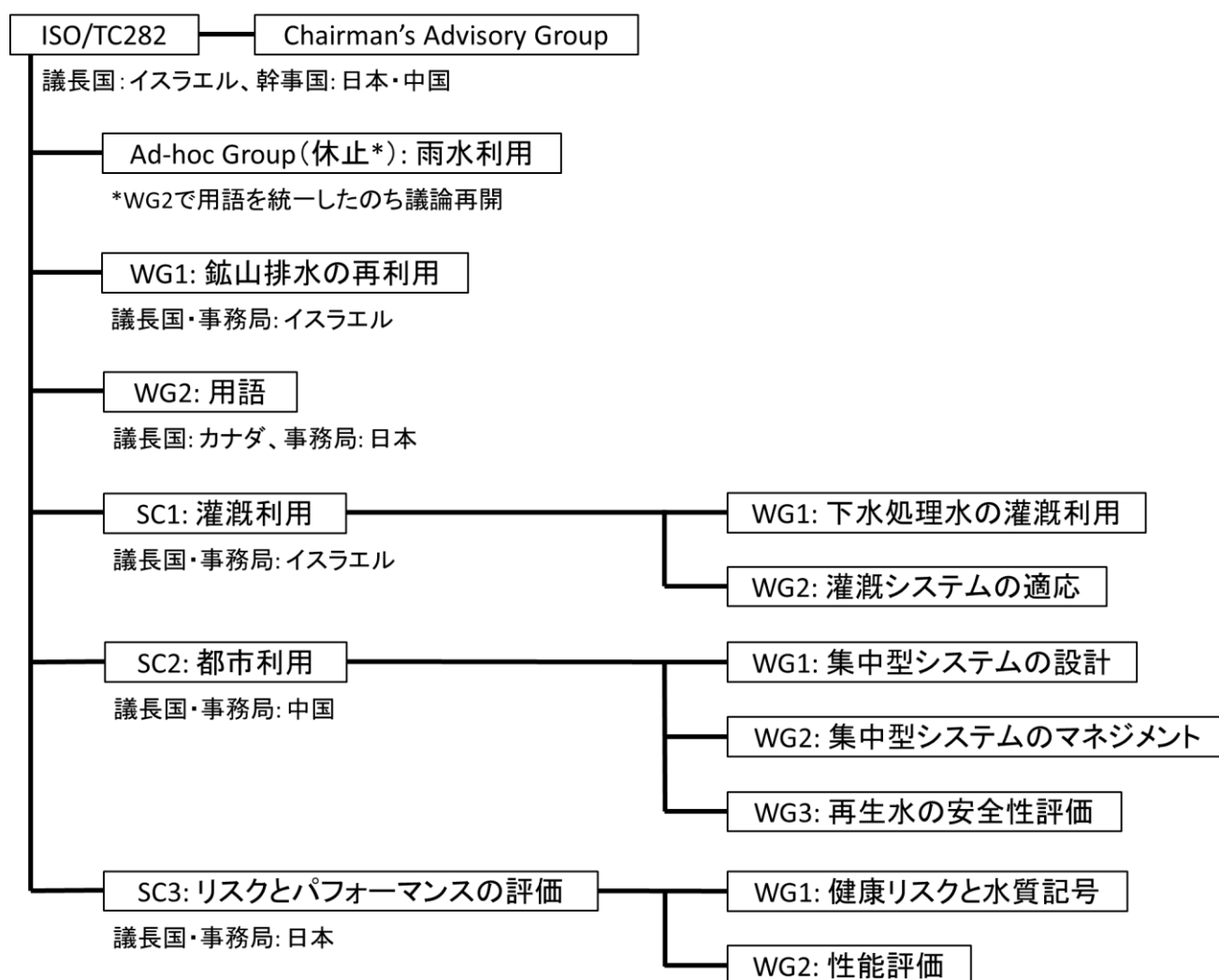


図 2-6 ISO/TC282 「水の再利用」の構成
(館ら, 2015 をもとに作成)

2.2 腸管系ウイルスの基礎的情報

2.2.1 ウイルスと他の病原微生物の違い

先述 (2.1.2) したように、我が国は下水再生利用の国際基準化活動 (ISO/TC282) において、下水再生システムの下水処理性能評価方法および下水再生利用に起因するリスク評価手法の国際規格素案を作成する必要がある、下水再生水の安全性を担保するための具体案の提示が求められている。先述 (1.1) した病原微生物に起因する水系感染症リスクについても、下水再生利用に係る事業を実施するに際し、科学的根拠に基づいてリスク評価の枠組みを構築する必要がある。ここでは、始めに水系感染症に係る水系感染症に係る病原微生物を原虫、細菌およびウイルスに分け、その特徴についてそれぞれ記述する。

水系感染症に係る病原微生物は、大別して細胞核を有する真核生物と明瞭な細胞核を持たない原核生物が存在し、原虫と細菌はそれぞれ真核生物と原核生物に分類される (Bridle, 2013)。ウイルスは完全な細胞内寄生生物であり、真核生物もしくは原核生物どちらにも属さない一群である (Raoult and Forterre, 2008)。近代上下水道システムでは、凝集処理、膜処理、消毒処理などにより病原微生物を物理的もしくは化学的に除去・不活化し、水の微生物学的な安全性を担保してきた (Au, 2004)。その成果として、我が国における水質衛生上の重要な細菌であったコレラ菌や赤痢菌などによる健康被害事例は、近年大幅に低減している (山田ら, 2007)。米国においても、1981 年から 2008 年にかけて報告された公共水道システムを介した水系感染症事例が 1/4 程度まで減少したと報告されている (Craun, 2012)。しかしながら、病原微生物の中には消毒処理に対し強い耐性を示す原虫やウイルスなどが存在し、1970 年代以降原虫やウイルスによる水系感染症が新たに注目され始めた (Leclerc and Moreau, 2002)。特に水系感染症に係るウイルスは、その粒子直径 ($0.02\sim0.3\ \mu\text{m}$) が下水処理プロセスで一般的に採用されているろ過膜の孔径 ($0.1\sim0.4\ \mu\text{m}$) より小さいことから (Bridle, 2013; Westerhoff et al., 2011)、下水処理プロセスで十分に除去・不活化されず、処理水とともに水環境中に排出される可能性がある (Tajima et al., 2007)。

○原虫

原虫は単細胞真核生物であり、生活環の一部で被囊したシスト (cyst)、オーシスト (oocyst) もしくは孢子 (spore) を形成し、塩素消毒処理に対して強い耐性を示す (Karanis et al., 2007)。水系感染症の病因微生物となりえる主要な原虫を表 2-3 に示す (Haas et al., 2014)。原虫は、大別してアメーバ類 (*Acanthamoeba* など)、鞭毛虫類 (*Giardia lamblia* など) および孢子虫類 (*Cryptosporidium parvum* など) に分類される (Bridle, 2013)。*Giardia* や *Cryptosporidium* に代表される鞭毛虫類および孢子虫類は、温血動物の消化官に感染する原虫であり、ヒトと動物の両方に感染する能力を有する、すなわち人獣共通感染症を引き起こす一群である (Karanis et al., 2007)。温血動物の消化管に寄生する原虫は、糞 - 口感染を伝播様式としており、糞便とともに感染性を有するシスト、オーシストとして排出され、糞便で汚染された飲料水もしくは食品を介して伝播する (Karanis et al., 2007)。*Giardia* および

表 2-3 水系感染症の病因微生物となりえる主要な原虫
(Haas et al., 2014 をもとに作成、一部改変)

	分類	原虫名	環境耐性のある生活相
糞便由来	鞭毛虫類	<i>Giardia lamblia</i>	シスト
	孢子虫類	<i>Cryptosporidium parvum</i>	オーシスト
	孢子虫類	<i>Cyclospora</i>	オーシスト
	孢子虫類	<i>Isospora belli</i>	オーシスト
	孢子虫類	<i>Microsporidia</i>	孢子
	孢子虫類	<i>Toxoplasma gondii</i>	オーシスト
環境由来	アメーバ類	<i>Entamoeba histolytica</i>	シスト
	アメーバ類	<i>Naegleria fowleri</i>	シスト
	アメーバ類	<i>Acanthamoeba</i>	シスト
	アメーバ類	<i>Balamuthia mandrilaris</i>	シスト

Cryptosporidium の感染力は高く、接種した 50%のヒトが感染する病原微生物量 (Median infectious dose: ID50) がそれぞれ 25~100 cyst および 9 oocyst と報告されている(Karanis et al., 2007)。他方で、*Acanthamoeba* や *Entamoeba histolytica* に代表されるアメーバ類は、自由生活性の原虫であり、土壌や水から単離される(Rowbotham, 1980; Schuster and Visvesvara, 2004; Seal et al., 1992)。*Giardia* や *Cryptosporidium* などの原虫により引き起こされる疾病は、主に下痢症であるものの、*Acanthamoeba* はコンタクトレンズなどを介してヒトに感染し、アメーバ性核膜炎を引き起こすことがある(Baldursson and Karanis, 2011)。*Acanthamoeba* のシストも同様に強い塩素耐性を示すことから、水道水を介したコンタクトレンズの汚染の可能性についても示唆されている(Seal et al., 1992)。*Entamoeba histolytica* は、*Giardia* や *Cryptosporidium* と同様に人獣共通感染症を引き起こすことが知られているものの、主要な伝播様式はヒト-ヒト感染である(Schuster and Visvesvara, 2004)。

上述したように、原虫が生活環の中で形成するシストもしくはオーシストは強い塩素消毒耐性を示すことから、水道水などを介した水系感染症が多数報告されている(Baldursson and Karanis, 2011; Karanis et al., 2007)。Baldursson (2011) らによると、2004 年から 2010 年にかけて報告された原虫に起因する水系感染症事例 199 件の約 60% (120 件) は、*Cryptosporidium* によるものであり、次いで *Giardia* で約 35% (70 件)、*Toxoplasma* で約 2% (4 件)、*Cyclospora* で約 1.5% (3 件)、*Acanthamoeba* で約 1% (2 件) である(Baldursson and Karanis, 2011)。地域別の統計では、世界における原虫に起因する水系感染症事例の約 47% (93 件) が豪州から報告されており、次いで北米で約 31% (61 件)、欧州で約 17% (33 件)、アジアで約 3.5% (7 件) である(Baldursson and Karanis, 2011)。感染源別の統計では、プールな

どのレクリエーション水および飲用水がそれぞれ約 34% (67 件) および約 21% (41 件) であり、さらにレクリエーション水を介した原虫に起因する水系感染症事例の約 97% (65 件) を *Cryptosporidium* が占めていた(Baldursson and Karanis, 2011)。*Cryptosporidium* に起因する水系感染症を代表する事例は、1993 年に米国・ミルウォーキー群で発生した大規模な集団感染症などがあり(Mac Kenzie et al., 1994)、我が国においても 1996 年に埼玉県越生町で水道水を介した集団感染症事例が報告されている(埼玉県衛生部, 1997)。

Cryptosporidium は疫学的に重要な病因微生物として認識されており(Karanis et al., 2007)、水系感染症の蔓延を未然に防止するために、下水処理施設において適切に除去される必要がある。*Cryptosporidium* は塩素消毒処理に対し強い耐性を示すオーシストを形成し、水道水を介して水系感染症を伝播する(Baldursson and Karanis, 2011; Karanis et al., 2007)。Pereira (2013) らは、飲料水中の *Cryptosporidium* の 99% ($2 \log_{10}$) 不活化を達成するために必要とされる CT 値 [残留遊離塩素濃度 (mg/L) と接触時間の積 (min) の積] を 7,200 以上としており、糞便汚染の指標微生物として用いられる大腸菌 (0.6 CT) の約 12,000 倍であることを示した(Pereira et al., 2013)。他方で、*Cryptosporidium* のオーシストは、乾燥への耐性が弱く、室温で 2 時間乾燥させた場合では 97% ($1.5 \log_{10}$)、4 時間以上ではすべてのオーシストが感染力を失うことが報告されている(Robertson et al., 1992)。また Robertson (1992) らは、*Cryptosporidium* のオーシストを凍結処理した場合においても、すべてのオーシストが感染性を失うことを報告している(Robertson et al., 1992)。King (2007) らは、*Cryptosporidium* 紫外線消毒に関する報告例をまとめ、オーシストが紫外線消毒に高い感受性を示すことを述べている(King and Monis, 2007)。*Cryptosporidium* が形成するオーシストは、細菌やウイルスと比較して大きいことから (4~6 μm) (Karanis et al., 2007)、MF 膜 (0.01~0.1 μm) を用いて比較的容易に除去することが可能である(膜分離技術振興協会・膜浄水委員会, 2008)。

○細菌

水系感染に係る細菌は、基本的に 0.3~2 μm 程度の単細胞によって構成され、グラム染色によってグラム陽性菌もしくはグラム陰性菌に大別される(Bridle, 2013)。グラム染色は細菌を分類するための基準の一つであり、トリフェニル系塩基性色素液(クリスタルバイオレットなど)を用いて細菌の細胞壁を染色し、染色性の違いにより細菌を分類する手法である(Coico, 2001)。グラム陽性菌とグラム陰性菌は、細胞壁の構造の違いに基づいてそれぞれ青紫色と赤色に染色される(Coico, 2001)。グラム陽性細菌は、ペプチドグリカンから構成される 20~80 nm の細胞壁を有しており、グラム陰性菌は比較的薄い細胞壁 (5~10 nm) の上に脂質二重層から構成される外膜を有している(Silhavy et al., 2010; Uma Suganya et al., 2015)。外膜の最外葉には、リピッド A、コア多糖および O 抗原多糖から構成されるリポ多糖があり(Silhavy et al., 2010)。グラム陰性菌のリポ多糖は、宿主の防御機構から免れる役割を有するほかに、発熱などの原因となるエンドトキシンとして作用する(Manuscript and Endotoxins, 2002; Silhavy et al., 2010)。

水系感染症の病因微生物となりえる主要な細菌を表 2-4 に示す(Haas et al., 2014)。細菌

表 2-4 水系感染症の病因微生物となりえる主要な細菌
(Haas et al., 2014 をもとに作成、一部改変)

グラム染色	形態	細菌
グラム陽性	球菌	黄色ブドウ球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	球菌	腸球菌 (<i>Enterococcus</i>)
	有芽胞桿菌	ウェルシュ菌 (<i>Clostridium perfringens</i>)
	桿菌	抗酸菌 (<i>Mycobacterium</i> spp.)
グラム陰性	桿菌	レジオネラ (<i>Legionella pneumophila</i>)
	桿菌	緑膿菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	桿菌	赤痢菌 (<i>Shigella dysenteriae</i>)
	桿菌 (<i>Escherichia coli</i>)	腸管凝集接着性大腸菌 (Enteraggregative <i>E. coli</i> ; EAEC)
	桿菌 (<i>Escherichia coli</i>)	腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> ; EHEC)
	桿菌 (<i>Escherichia coli</i>)	腸管組織侵入性大腸菌 (Enteroinvasive <i>E. coli</i> ; EIEC)
	桿菌 (<i>Escherichia coli</i>)	腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic <i>E. coli</i> ; EPEC)
	桿菌 (<i>Escherichia coli</i>)	腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic <i>E. coli</i> ; ETEC)
	桿菌	サルモネラ (<i>Salmonella</i> spp.)
	桿菌	コレラ菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)
	螺旋菌	カンピロバクター (<i>Campylobacter jejuni</i>)

による感染症の特徴の一つとしては、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、腸球菌 (*Enterococcus*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) などの健常なヒトの腸管もしくはヒトの住環境に普遍的に存在する細菌が、免疫力の低下した易感染宿主に感染し疾病を引き起こす、すなわち日和見感染症が挙げられる (Colombo et al., 2013)。日和見感染症は、日和見感染菌の病原因子の種類、宿主の免疫力、宿主の遺伝的背景など多様な要因に基づいており、宿主と細菌の相対的な力関係において、ある一定期間に細菌の毒力 (ビルレンス) が宿主の防御力 (免疫力や感染抵抗性などの総合的な防御能) を上回ることにより発生する (Casadevall and Pirofski, 1999, 2000)。免疫力の低下は、後天性免疫不全症候群 (Acquired immunodeficiency syndrome: AIDS)、白血病、重症熱傷や創傷などに起因し、日和見感染により重大な疾病リスクを引き起こす (Mehta et al., 2014)。特に病院では、上述した疾病により感染症に対する抵抗力が低下した人々が多く、医療従事者や医療器具を通じて院内感染症を引き起こす重要な微生物として知られている (Mehta et al., 2014)。日和見感染症の病因微生物となる細菌としては、上述した緑膿菌や黄色ブドウ球菌などが広く知られており (Colombo et al., 2013)、水系感染症に関係する日和見感染菌としては、抗酸菌 (*Mycobacterium*) やレジオネラ (*Legionella pneumophila*) などがある (Garrido et al., 2006)。

日和見感染症に関連する課題の一つとして、抗生物質や合成抗菌薬などの抗菌薬に耐性

を示す薬剤耐性菌の存在が挙げられる(Muto et al., 2003)。薬剤耐性菌は、抗菌薬の感受性が低く、高濃度の抗菌薬が存在する環境下においても生残する細菌であり、抗菌薬に対する親和性の低下や不活化酵素の分泌などにより薬剤の抗菌力を低下させる(Gold and Moellering Jr, 1996)。薬剤耐性には、抗菌薬に対して元々感受性の低い自然耐性と、遺伝的要因により抗菌薬に対する感受性が低くなる獲得耐性がある(Acar and Röstel, 2001)。特に病院では、抗菌薬の多用による選択圧の影響で、薬剤耐性菌が蔓延しやすい環境にあり、上述した院内感染症の治療を困難としている(Muto et al., 2003)。水系感染症に係る薬剤耐性菌の代表的な例としては、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)、バンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin Resistant Enterococci: VRE) などの単剤耐性菌 (Brumfitt and Hamilton-Miller, 1989; Cetinkaya et al., 2000) や、多剤耐性緑膿菌 (Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: MDRP) などの多剤耐性菌がある(Aloush et al., 2006)。

細菌のある特定の株だけが疾病を引き起こすことも知られている。大腸菌は、すべての温血動物の常在菌であるものの、ある特定の種類の大腸菌 [腸管凝集接着性大腸菌 (Enteraggregative *E. coli*; EAEC)、腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *E. coli*; EHEC)、腸管組織侵入性大腸菌 (Enteroinvasive *E. coli*; EIEC)、腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic *E. coli*; EPEC)、腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E. coli*; ETEC)] がヒトに感染し、疾病症状を引き起こす(Croxen and Finlay, 2010)。大腸菌などの腸内細菌の抗原は、O 抗原、H 抗原、K 抗原および F 抗原の 4 種類に大別され、それぞれ菌体、鞭毛、莢膜および線毛を表す(Iguchi et al., 2008; Van et al., 2008)。大腸菌の抗原性 (血清型) は、主に O 抗原と H 抗原の組合せに基づいており、代表的な例としては EHEC である O157:H7 株などがある(Croxen and Finlay, 2010; Mead and Griffin, 1998)。

水系感染症を引き起こす細菌の多くは、*Cryptosporidium* などの原虫と同様に人獣共通感染症を引き起こす(Christou, 2011)。抗酸菌や EHEC は、ブタやウシなどの家畜に感染し、農業従事者や食用肉の消費者に対し重大な微生物リスクを引き起こす(Cray and Moon, 1995; Pavlik et al., 2005)。カンピロバクター (*Campylobacter*) やサルモネラ (*Salmonella*) は、トリやウシなどのほかに、ハトなどの都市型野生動物やイヌ、ネコなどの愛玩動物に感染する(Chomel, 2015, 1992; Zhao et al., 2001)。一方で、赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*) などのヒト病原細菌の一部は、ヒトやサルの霊長類のみに感染し臨床的症状を引き起こす(Eiklid and Olsnes, 1983)。

上述したように、近代上下水道システムの整備により赤痢菌やコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) などの細菌による水系感染症事例はほとんど認められない(Craun, 2012; 山田ら, 2007)。しかしながら、最近では飲用水を介したレジオネラによる水系感染症事例の件数は年々増加傾向にあり、2011 年から 2012 年にかけて米国で発生した飲用水を介した水系感染症事例 431 件の内、約 26% (111 件) がレジオネラによるものである(Beer et al., 2015)。同時期に米国内で発生した飲用水を介したレジオネラ以外の細菌による水系感染症事例の割合は約 21%であり、EHEC O157:H7 株などがある(Beer et al., 2015)。汚染源別の統計では、飲料水を介したレ

ジオネラに起因する水系感染症事例の約 66%がビル内の配管内で増殖したレジオネラの摂取によるものである(Beer et al., 2015)。他方で、プールなどの親水施設において細菌に起因する水系感染症が報告されており、2011 年から 2012 年にかけて米国で発生した飲用水を介した細菌に起因する水系感染症事例 151 件の内、レジオネラと EHEC O157:H7 株による水系感染症は、それぞれ約 22%と約 34%である(Hlavsa et al., 2015)。

レジオネラは、*Acanthamoeba* などに寄生することにより外界からのストレス（高温、消毒処理など）から守られることにより、水環境中において長期間生残することが知られている(Bouyer et al., 2007)。Bouyer (2007) らは、37°C、5%CO₂ 下において *Acanthamoeba* のトロフォゾイト（栄養体）に感染した状態のレジオネラ菌体とレジオネラ菌体のみをそれぞれ培養し、レジオネラ菌体のみを培養した場合では培養開始 11 日後において培養可能なレジオネラ菌体が検出されなかったことに対し、*Acanthamoeba* 内のレジオネラ菌体を培養した場合では培養開始 6 ヶ月後においても比較的高い濃度で培養可能なレジオネラが検出されることを示した(Bouyer et al., 2007)。また Bouyer (2007) らは、*Acanthamoeba* 内のレジオネラ菌体とレジオネラ菌体のみをそれぞれゲンタマイシンで処理し、*Acanthamoeba* に感染した状態ではレジオネラ菌体数の減少がほとんど認められないことを示した(Bouyer et al., 2007)。*Acanthamoeba* が形成するシストは、温度の変化、乾燥、塩素消毒処理および抗菌薬に対し強い耐性を示すことから(Bagheri et al., 2012; De Jonckheere and Van de Voorde, 1976; Khunkitti et al., 1998; Lloyd et al., 2001; Sriram et al., 2008; Vivian, 1986)、*Acanthamoeba* 内のレジオネラを上述した方法により処理することは困難である。

レジオネラに限らず、下水中の細菌を除去する方法としては膜ろ過処理と消毒処理の組合せが有効である。水系感染症に係る細菌の大きさは 0.3~2 μm 程度であり、下水処理プロセスにおいて一般的に採用されている処理膜の孔径 (0.1~0.4 μm) より大きい(Bridle, 2013; Westerhoff et al., 2011)。また細菌は、原虫やウイルスなどと比較して消毒処理に対して比較的高い感受性を示すことから(Pereira et al., 2013)、膜処理水中に残存する細菌を消毒処理により不活化することができる。

○ウイルス

ウイルスは、一般的に直径 30~200 nm の大きさとして認識されており、絶対従属栄養性の細胞内寄生生物であることから、温血動物の消化管に感染する原虫同様に宿主体外において増殖することができない(Bridle, 2013)。通常、細菌などの細胞には、タンパク質の合成場であるリボソームを有し、環境中において自身の複製を可能とする(Haas et al., 2014)。しかしながら、ウイルスは、ウイルス粒子中にリボソームを持たないことから、宿主細胞内においてタンパク質合成に必要な酵素などを利用することにより自己増殖を可能とする(Bridle, 2013)。ウイルスの主要な構成因子は、ウイルス核酸 (DNA もしくは RNA) とタンパク質の殻であるカプシドである。呼吸器系ウイルスなどは、カプシド表面上に脂質被膜であるエンベロープと特定の酵素を持っており、宿主体内における感染部位への侵入を容易にしている(Bridle, 2013)。

表 2-5 水系感染症の病因微生物となりえる主要な腸管系ウイルス
(Gibson et al., 2014 をもとに作成、一部改変)

ウイルス	科	属	ウイルス核酸	ウイルス粒子直径 (nm)
アデノウイルス (Adenovirus: AdV)	<i>Adenoviridae</i>	Mastadenovirus	二本鎖DNA	90-100
アイチウイルス (Aichivirus: AiV)	<i>Picornaviridae</i>	Kobuvirus	一本鎖RNA	27-30
アストロウイルス (Astrovirus: AdV)	<i>Astroviridae</i>	Mamastrovirus	一本鎖RNA	28-30
エンテロウイルス (Enterovirus: EV)	<i>Picornaviridae</i>	Enterovirus	一本鎖RNA	24-30
A型肝炎ウイルス (Hepatitis A virus: HAV)	<i>Picornaviridae</i>	Hepatovirus	一本鎖RNA	25-30
E型肝炎ウイルス (Hepatitis E virus: HEV)	<i>Hepeviridae</i>	Orthohepevirus	一本鎖RNA	25-30
ノロウイルス (Norovirus: NoV)	<i>Caliciviridae</i>	Norovirus	一本鎖RNA	27-38
ロタウイルス (Rotavirus: RoV)	<i>Reoviridae</i>	Rotavirus	一本鎖RNA	70-75
サポウイルス (Sapovirus: SaV)	<i>Caliciviridae</i>	Sapovirus	二本鎖RNA	27-38

1950 年代以降のウイルスの検出および同定法の開発に伴い、非細菌性と分類されてきた水系感染症の多くが腸管系ウイルスに起因すると推測され始めた(Bridle, 2013)。代表的な腸管系ウイルスを表 2-5 に示す(Gibson, 2014)。ノロウイルス (NoV) に代表される腸管系ウイルスは、下水再生利用を実施する際に、水系感染症を引き起こす可能性が懸念されている。腸管系ウイルスは、現在までに 120 種類以上存在することが確認されており(Gibson, 2014)、ノロウイルスのほかにアデノウイルス (AdV)、アストロウイルス (AsV)、エンテロウイルス (EV)、A 型肝炎ウイルス (HAV)、E 型肝炎ウイルス (HEV)、ロタウイルス (RoV) およびサポウイルス (SaV) などがある(Gibson, 2014)。アイチウイルス (AiV) も、他の腸管系ウイルス同様に重要な水系感染症に関連するウイルスとして認識されており(Le Guyader et al., 2008)、年間を通して下水中から比較的高濃度で検出されることから、糞便汚染指標もしくは下水処理性能評価における代替指標ウイルスとして利用可能であることが示唆されている(Kitajima and Gerba, 2015)。

- ノロウイルス (NoV) -

ノロウイルスは、カリシウイルス科 (*Caliciviridae*) に属する一本鎖 RNA ウィルスであり、約 7,500 bp のウイルスゲノムから構成される(Robilotti et al., 2015)。ノロウイルスのウイルスゲノムには、3 種類のタンパク質合成に係る領域 (Open reading frame: ORF) があり、それぞれ非構造タンパク質 (RNA 依存性 RNA ポリメラーゼなどの酵素) の合成に係る ORF1、構造タンパク質 (カプシド) の合成に係る ORF2 (Viral protein: VP1)、ノロウイルス粒子形成に関与するタンパク質の合成に係る ORF3 (VP2) に分けられる(Robilotti et al., 2015) (図 2-7)。ノロウイルスの種類は、VP1 の塩基配列に基づいて分類され、大別して 6 種類の遺伝子群 (Genogroup) が存在する (2015 年の段階において、Vinjé (2015) により genogroup VII の分類が提唱されている) (Robilotti et al., 2015; Vinjé, 2015)。特に、ノロウイルス genogroup

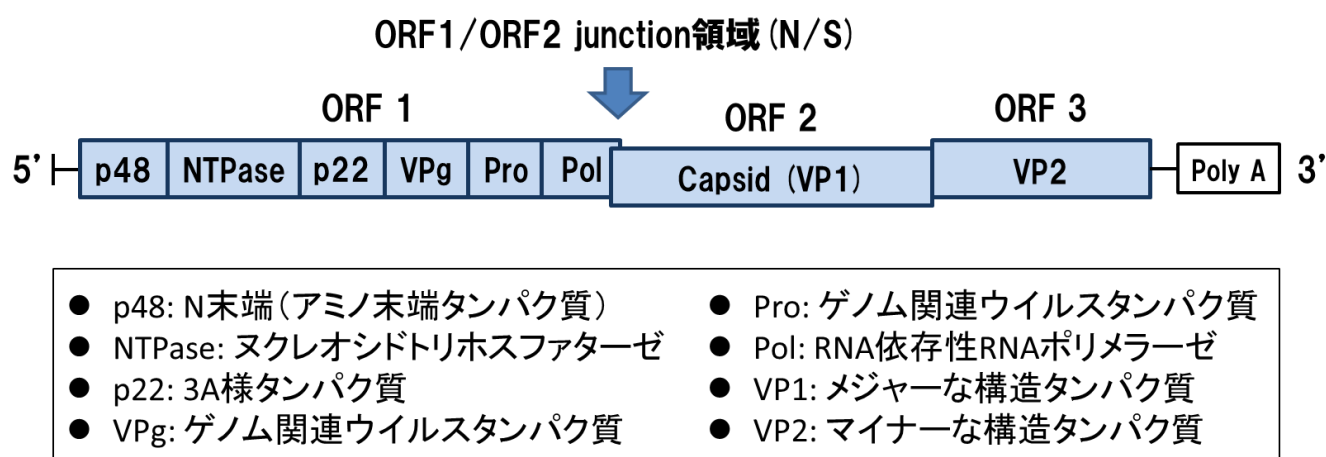


図 2-7 ノロウイルスのゲノム構造図
(Robilotti et al., 2015 をもとに作成、一部改変)

I (NoV GI) およびノロウイルス genogroup II (NoV GII) は、非細菌性急性胃腸炎の主要な病因微生物であり、それぞれの 9 種類および 22 種類の遺伝子型 (Genotype) に分類され、genogroup の後ろに数字を付加して表記される (例: GI.1 など) (Vinjé, 2015)。ノロウイルス GI およびノロウイルス GII の遺伝子型解析は、ORF1 下部末端の RNA ポリメラーゼ (Pol) と ORF2 上部末端に位置する比較的保存性が高い領域である ORF1/ORF2 junction 領域 [カプシド N-terminal/shell (N/S)] に基づいて分類する手法が広く用いられている (Katayama et al., 2002)。ノロウイルスは、この ORF1/ORF2 junction 領域を基点として遺伝子の組み換えが頻繁に生じ、キメラウイルスがたびたび検出される (Bull et al., 2005)。こうしたキメラウイルスの遺伝子型は ORF1 の Pol 領域に基づいた遺伝子型 (P) と、VP1 に基づいた遺伝子型の両方を表記する (例: GII.P4_II.4) (Kroneman et al., 2013)。他方で、ノロウイルス遺伝子の Pol 領域に基づいた遺伝子型分類法もたびたび用いられており、この場合 genogroup の後ろに小文字のアルファベットを付加して表記される (Buesa et al., 2002)。

ノロウイルス感染症は 1990 年中頃から世界的に流行しており、毎年多くの人々が感染していると予想されている (Glass et al., 2009)。Bartsch (2016) らは、世界的におけるノロウイルス胃腸炎の罹患者とその世界的な社会経済的損害をそれぞれ推定し、毎年 7 億人 (22 万人が死亡) がノロウイルス胃腸炎に罹患し、ノロウイルス胃腸炎の治療に要する医療費が年間 42 億 \$ となるとした (Bartsch et al., 2016)。また Bartsch (2016) らは、ノロウイルス胃腸炎の罹患による欠勤、看護、生産性の低下などの社会的な損失を 603 億 \$ としており、1 人あたりの医療費および社会的損失額がそれぞれ約 6 \$ および約 86 \$ であるとした (Bartsch et al., 2016)。以上のことから、ノロウイルス感染症は世界における大きな社会問題の一つとして認識されており、ノロウイルスによる社会的リスクおよび経済的リスクを軽減するために、今後ノロウイルスに関する基礎的な知見の蓄積およびその科学的根拠に基づいた対策が求められる。

-アデノウイルス (AdV) -

アデノウイルスは、アデノウイルス科 (*Adenoviridae*) に属する二本鎖 DNA ウィルスであり、腸管系ウィルスの中では比較的大型のウィルスである (直径約 90~100 nm) (表 2-5) (Gibson, 2014)。アデノウイルスは、赤血球凝集能により 7 種類の亜型 (A~F 群) と 51 種類の血清型に分類され (Lynch and Karon, 2016)、水系感染症の病因微生物となりえる亜型と血清型は F 群の 40 型および 41 型である (Jothikumar et al., 2005)。アデノウイルスに起因する感染症は、季節的偏りが少なく年間を通じて報告される (Lynch and Karon, 2016)。アデノウイルス 40 型およびアデノウイルス 41 型による疾病は、発熱、嘔吐、下痢を主とするウィルス性胃腸炎であり、5 歳以下の乳幼児に好発する (Lynch and Karon, 2016)。

-アイチウイルス (AiV) -

アイチウイルスは、ピコルナウイルス科 (*Picornaviridae*) に属する一本鎖 RNA ウィルスであり、1989 年に愛知県で発生した牡蠣を介した集団感染症患者の糞便から単離された (Yamashita et al., 1991)。アイチウイルスの遺伝子型は、A~C の 3 種類が存在し、A 型がヒトに感染しえることが知られている (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017a)。アイチウイルスによる疾病は、アデノウイルスと同様に発熱、嘔吐、下痢などが主である (Yamashita et al., 1991)。他方で、A 型アイチウイルスに対する日本人の抗体保有率は比較的高く、30 歳の約 80%がアイチウイルスに対する抗体を保有する (Khamrin et al., 2014)。

-アストロウイルス (AdV) -

アストロウイルスは、アストロウイルス科 (*Adenoviridae*) に属する一本鎖 RNA ウィルスであり、特に小児に急性胃腸炎を引き起こすことが知られている (Jeong et al., 2012)。ヒトを含む哺乳類に感染するアストロウイルス (*Mamastrovirus*) には、8 種類の血清型 (1~8) が存在し、1 型が主に検出される (Jeong et al., 2012)。アストロウイルスは、上述したように小児に急性胃腸炎を引き起こすものの、一般的に軽症であり発熱や嘔吐が少ない (Jeong et al., 2012)。

-エンテロウイルス (EV) -

エンテロウイルスは、ピコルナウイルス科 (*Picornaviridae*) に属する一本鎖 RNA ウィルスであり、8 種類のウィルス群から構成される (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017b)。ヒトに感染する代表的なエンテロウイルスとしては、エコーウイルス (echovirus)、コクサッキーウイルス (coxsackievirus)、ポリオウイルス (poliovirus) などがあり (Solomon et al., 2010)、約 7,300 bp のウィルスゲノムから構成される (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017b)。腸管系ウィルスは一般的に病原性が弱いとされているものの (Haas et al., 2014)、ピコルナウイルス科に属する腸管系ウィルスに起因する感染症では神経組織に波及する可能性があり、麻痺性灰白髄炎 (小児麻痺) やウィルス性急性髄膜炎など臨床的に重大な疾病を引き起こすことが知られている (Solomon et al., 2010)。

－A 型肝炎ウイルス（HAV）－

A 型肝炎ウイルスは、ピコルナウイルス科（*Picornaviridae*）に属する一本鎖 RNA ウィルスであり、ウィルス性肝炎の主な病因物質である(Jacobsen and Wiersma, 2010)。ウィルス性肝炎には、肝炎ウィルスの種類により急性肝炎と慢性肝炎が存在し、A 型肝炎ウイルスは一過性の急性感染を引き起こすものの、B 型肝炎ウイルス（HBV）や C 型肝炎ウイルス（HCV）と重複感染することにより、慢性肝炎を引き起こす(Beg and Kharal, 2010)。A 型肝炎ウイルスによるウィルス性肝炎は、衛生環境が劣悪な地域において主に乳幼児の間で流行しており、先進国では上下水道などの整備により感染者は著しく減少している(Jacobsen and Wiersma, 2010)。しかしながら、A 型肝炎ウイルス感染症の流行が少ない状態が長期間継続する場合、全人口に対する抗体保有者の割合が減少し、流行が再度認められるようになる(Jacobsen and Wiersma, 2010)。

－ E 型肝炎ウイルス（HEV）－

E 型肝炎ウイルスは、ヘペウイルス科（*Hepeviridae*）に属する一本鎖 RNA ウィルスであり、A 型肝炎ウイルスと同様に衛生環境が劣悪な地域においてウィルス性急性肝炎の主要な病因物質である(Skidmore, 2002)。E 型肝炎ウイルスは、他の肝炎ウイルスと異なり人獣共通感染症を引き起こすことが知られており、ヒトから分離された E 型肝炎ウイルスと全ゲノム配列が 99%以上一致している E 型肝炎ウイルスがブタからも分離されている(Ward et al., 2008)。我が国においても、調理が不十分なブタやイノシシの肉を喫食するで E 型肝炎ウイルスに感染した事例が報告されている(Li et al., 2005; Miyashita et al., 2012)。上述したように、E 型肝炎ウイルスによるウィルス性肝炎は、衛生環境が劣悪な地域において流行しているものの、A 型肝炎ウイルスとは異なり青壮年期に好発する(Yugo and Meng, 2013)。

－ロタウイルス（RoV）－

ロタウイルスは、レオウイルス科（*Reoviridae*）に属する 11 本の二本鎖分節 RNA ウィルスであり、アデノウイルスと同様に腸管系ウイルスの中では比較的大型である（直径約 70~75 nm）（表 2-5）(Gibson, 2014)。RoV 粒子は VP1、VP2 および VP3 から構成され、VP6 が結合して一重殻粒子を形成し、さらに VP7 と VP4 の外殻タンパク質で覆われて感染性粒子となる。ロタウイルスは、RNA 配列（A~F 群）、もしくは VP7 と VP4 の抗原性〔G 型（glycoprotein）および P 型（protease-sensitive）〕に基づいて分類される（例: G2[P8]）(Papp et al., 2013)。ロタウイルスによる疾病は、冬季乳幼児嘔吐下痢症として知られており、A 群ロタウイルスの分布頻度および重症度が最も高い(Papp et al., 2013)。

－ サポウイルス（SaV）－

サポウイルスは、カリシウイルス科（*Caliciviridae*）に属する一本鎖 RNA ウィルスであり、ノロウイルスと異なり乳幼児の急性胃腸炎患者の糞便から検出されることが多い(Chiba

et al., 2000)。サポウイルスによる症状は、ノロウイルスと同様に嘔吐や下痢が主であり、一般的に軽症である(Chiba et al., 2000)。

腸管系ウイルスは、水環境中において長期間生存することができ、上下水道システムの整備された先進国においても腸管系ウイルス由来の水系感染症を制御することが困難とされている(Gibson, 2014)。腸管系ウイルスは、ヒトの腸管内で増殖し、感染患者の糞便 1 g あたり 10^{10} ~ 10^{12} 個の多量のウイルス粒子が排出される(Haas et al., 2014)。排出された糞便は家庭雑排水に混入し、下水処理場で処理されるため、糞便に含まれる腸管系ウイルスの大部分は下水処理過程で除去または不活化される。通常ウイルス粒子は、構成するタンパク質、核酸またはエンベロープの損傷によって不活化する。水系感染症に起因する腸管系ウイルスは、酸化ストレスに脆弱であるエンベロープを有しないことから、塩素消毒処理および紫外線消毒処理などへの抵抗性が強く、不活化が容易ではないことが知られている(Leclerc and Moreau, 2002)。Sobsey ら (1989) および Chang ら (1985) の報告によると、腸管系ウイルスは、大腸菌と比較して塩素消毒処理および紫外線消毒処理に高い耐性を持つことが示されており、ロタウイルスと大腸菌の消毒耐性を比較した実験では、塩素消毒処理で約 4 倍、紫外線消毒処理で約 3 倍であることが示された(Chang et al., 1985; Sobsey, 1989)。

2.2.2 腸管系ウイルスによる水系感染症の伝搬経路

腸管系ウイルスによる感染は基本的に糞口感染であり、ほぼすべての腸管系ウイルスが糞便に由来する。先述 (2.2.1) したように、腸管系ウイルスは酸化ストレスに脆弱であるエンベロープを有しないことから、胃酸、胆汁酸、消化酵素に抵抗性を示し、消化管の感受性細胞に到達し感染する。糞便とともに排出された腸管系ウイルスは、汚染された手指、種々の媒介物もしくはハエなどの媒介昆虫を介して感受性宿主に伝播される(Gibson, 2014)。媒介物感染は、大別して水系感染、食物感染もしくはその他の媒介物を介した感染がある。Melnick (1978) らは、水環境中に排出されたヒト糞便由来の腸管系ウイルスが多岐な経路を介して広域な水環境汚染を引き起こし、再びヒトの消化管感染を引き起こす経路図を作成した(図 2-8) (Melnick et al., 1978)。図 2-8 を概観することにより、腸管系ウイルスに対する感染予防策としては、上下水道の整備および個人衛生的な注意(手洗い、生食野菜の洗浄など)が有効であることが理解される。

図 2-8 より、下水中に含まれる腸管系ウイルスは、多様な感染経路を有しており、水系感染症の主要な病因物質の一つとなっている。Kvitsand (2010) らは、1984 年から 2007 年にかけてノルウェーで発生した水系感染症事例 102 件の約 54% (55 件) と約 12% (12 件) が飲用水源への未処理下水の混入および下水処理施設の故障を原因であることを示した(Kvitsand and Fiksdal, 2010)。我が国では、処理水が流入する河川において、河川水からの腸管系ウイルスの検出報告があり(Kishida et al., 2012)、汚染された河川水を介した腸管系ウイルスに起因する集団感染症が懸念されている。汚染された食品に起因する水系感染症事例を

みると、感染性急性胃腸炎の流行時期に採取した患者の糞便、未処理下水、牡蠣および牡蠣養殖場から同一の塩基配列を有する NoV が検出された事例が報告されている(Le Guyader et al., 2006)。米国・カリフォルニア州では、下水再生水で育てられる農作物の中にレタスなどの生食用農作物が含まれており、それらの農作物を摂取することにより腸管系ウイルスに感染する恐れがある(Olivieri et al., 2014)。Brassard (2012) らは、農地で栽培されたイチゴから NoV GI、ロタウイルス、E 型肝炎ウイルスを検出しており、農業灌漑用水が汚染源であることを示唆した(Brassard et al., 2012)。汚染された飲用水や食品の直接的な摂取のほかに、トイレ洗浄水からの飛沫感染や、感染者の手指または汚染された便器などを介した二次感染が主要な感染経路となる。我が国におけるノロウイルス、ロタウイルスおよびサポウイルスの推定感染経路別の統計では、2010 年度から 2015 年度にかけて 3 種類すべての腸管系ウイルスにおいてヒトーヒト経路（感染者が接触した水道やドアノブを介した感染経路）による感染症の伝播が最も多く、推定される感染経路全体に対する割合はノロウイルスで約 51%、ロタウイルスで約 75%、サポウイルスで約 68%である(National Institute of Infectious Disease, 2017)。先述 (2.1.1) したように、東京都の下水再生システムから供給される下水再生水がトイレ洗浄水などに利用されていることから(東京都下水道局, 2016c)、腸管系ウイルスによる二次感染の危険性を高めていると考えられる。

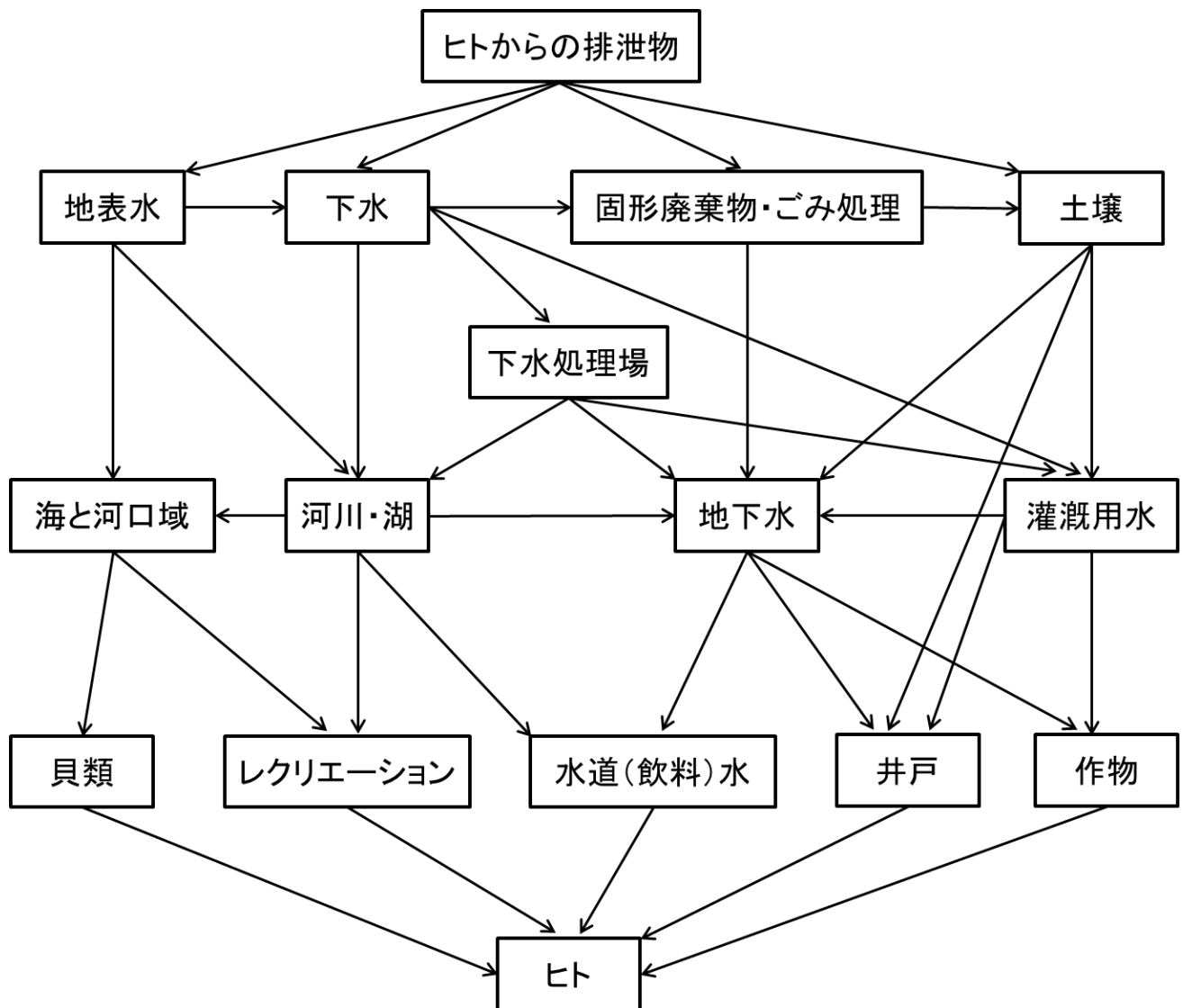


図 2-8 腸管系ウイルスの水系感染
(Melnick et al., 1978 をもとに作成、一部改変)

2.2.3 世界および我が国における腸管系ウイルス感染症の発生動向

○世界における腸管系ウイルス感染症の発生動向

世界中の水系感染症に関連する死亡者数は、毎年 220 万人以上と推定されており、毎年約 12 億 \$ の経済的損失に関連するとされている(Ramírez-Castillo et al., 2015)。米国疾病管理予防センター (Centre for Disease Prevention and Control: CDC) の報告によると、米国で発生する非細菌性急性胃腸炎事例の約 80%は、ノロウイルスによるものであることが示されている(Centers for Disease Control and Prevention, 2016)。CDC が管理する米国で発生したノロウイルスに起因する感染症事例が登録されているデータベース「CaliciNet」には、2009 年から 2013 年にかけて 3,960 件のノロウイルス感染症事例が報告されており、その内訳は NoV GI で約 11%、NoV GII で約 89%である(Centers for Disease Control and Prevention, 2016)。さらに、NoN GII に起因する感染症の事例を概観すると、その約 80%は NoV GII.4 によるものである(Centers for Disease Control and Prevention, 2016)。他方で、ノロウイルスに起因する水系感染症のみに焦点を当てた場合では、NoV GII と比較して NoV GI が高い割合を占めている(Lysén et al., 2009; Maunula and Von Bonsdorff, 2005)。Hee Jung (2011) らは、韓国において飲用水として用いられる地下水中からノロウイルス、アデノウイルスおよびエンテロウイルスを検出し、検出されたノロウイルスの約 71%が NoV GI であることを示した(Jung et al., 2011)。

ここで、2000 年以降に Google Scholar で公表された腸管系ウイルス起因の水系感染症事例を表 2-6 [本論文末に付録 (第 2 章 -Appendix-)] に示す。なお、表 2-6 に示す水系感染症事例に関する文献は、Google Scholar において検索キーワード「virus」+「waterborne」+「outbreak」を使用して検索し (2017 年 1 月 27 日時点での検索数: 12,000 件)、感染症事例の病因ウイルス、時期、国もしくは地域、感染源、汚染源、被害規模などの情報を取得可能な英語文献 100 件を無作為抽出し、引用した。表 2-6 に示される水系感染症事例を概観すると、ノロウイルスに起因する事例が 86% (86/100) を占めており、次いでロタウイルスで 10% (10/100)、A 型肝炎ウイルスで 5% (5/10)、エンテロウイルスで 4% (4/100)、である。報告件数は少ないものの、アデノウイルス、アストロウイルス、E 型肝炎ウイルスおよびサポウイルスが病因ウイルスであった事例についても数件報告されている。感染源としては、下水の混入などにより汚染された飲用水が大部分を占めており、汚染された水を使用して養殖もしくは栽培された貝類や農作物の喫食による事例も存在する (表 2-6)。飲用水を介したノロウイルス感染症事例では、NoV GI が高い割合を占めていることが示されており、汚染された農業灌漑用水を用いて栽培されたレタスや冷凍イチゴなどの喫食によるノロウイルス感染症事例では、NoV GII が高い割合を占めることが示されている (表 2-6)。

地域別では、欧州において腸管系ウイルスに起因する水系感染症が多く報告されている。フィンランドでは、NoV GI および NoV GII に起因する集団感染症事例が多数報告されており、そのほとんどが飲用水を介したものである(Laine et al., 2011; Maunula et al., 2005)。牡蠣やムール貝などの喫食によるノロウイルスの集団感染症事例についても報告されており、2010 年ではアイルランド、英国、フランス、デンマーク、スウェーデンにおいて、各国間

での牡蠣の輸出入による大規模な集団感染症が発生した(Rajko-Nenow et al., 2014; Westrell et al., 2010)。ドイツでは、2012 年に中国から輸入した冷凍イチゴを介した大規模な集団感染症が発生しており(Bernard et al., 2014)、ノロウイルスの遺伝子型解析の結果からイチゴの栽培時に未処理下水を農業灌漑用水として使用したことが示唆された(Höhne et al., 2015)。デンマークにおいても、2005 年にポーランドから輸入した冷凍ラズベリーを介したノロウイルスに起因する集団感染症が発生し、遺伝子型解析の結果から栽培に使用された農業灌漑用水の汚染が強く示唆された(Falkenhorst et al., 2005)。オーストリアでは、2005 年に大雨により氾濫した河川水〔合流式下水道雨天時超流水(Combined Sewer Overflow: CSO)を含む〕と接触した米国人旅行客 26 人がノロウイルスに感染・発症したことが報告されている(Schmid et al., 2005)。ノロウイルス感染症以外では、2000 年にフランスで飲用水を介した A 群ロタウイルスに起因する集団事例が報告されている(Gallay et al., 2006)。アルバニア共和国では、2000 年と 2002 年にそれぞれアデノウイルス、アストロウイルス、ロタウイルスの重複感染症と A 型肝炎ウイルスに起因する集団感染症が発生し、公共水道システムを介した水系感染症が疑われている(Divizia et al., 2004; Villena et al., 2003)。フィンランドでは、2012 年に発生した集団感染症事例の病因微生物として SaV が疑われている(Jalava et al., 2014)。ベラルーシ共和国では、1997 年および 2003 年に飲用水を介したエンテロウイルス(エコーウイルス、コクサッキーウイルス)に起因する集団感染症事例が報告されている(Amvrosieva et al., 2006)。北アフリカに位置するスーダンでは、2004 年に E 型肝炎ウイルスに起因する大規模な集団感染症が発生し、感染源は特定されていないものの、塩素消毒された飲用水に E 型肝炎ウイルスが残留していたと推察されている(Guthmann et al., 2006)。

北米では、飲料水を介したノロウイルスに起因する集団感染症事例が数件報告されている(Anderson et al., 2003; Brown et al., 2001; O'Reilly et al., 2007; Parshionikar et al., 2003)。他方で、汚染された水を用いて栽培した緑ネギに付着していた A 型肝炎ウイルスに起因する集団感染症についても報告されている(Dentinger et al., 2001; Wheeler et al., 2005)。南米では、ナミビア共和国では 1995 年に E 型肝炎ウイルスに起因する集団感染症が発生し、公共水道システムを介した水系感染症が疑われている(Maila et al., 2004)。

アジア圏では、中国および韓国において飲用水を介したノロウイルスに起因する集団感染症事例が多数報告されている(Kim et al., 2005; Li et al., 2013; Zhou et al., 2016)。韓国では、汚染された水を用いて調理された食品を介してノロウイルス感染症が蔓延した事例があり(Cho et al., 2014; Jung et al., 2010)、中国では、2012 年に雑用井戸から取水された家庭雑用水を介したノロウイルスに起因する集団感染症事例がある(Zhou et al., 2012)。インドでは、地震による都市機能の低下に伴い、飲用水を介したロタウイルスに起因する集団感染症が蔓延した(Karmakar et al., 2008)。またインドでは、2005 年に公共水道システムから供給される飲用水を介した E 型肝炎ウイルスに起因する集団感染症が発生しており、遺伝子型解析の結果から公共水道システムへの未処理下水の混入によることが示されている(Sailaja et al., 2009; Sarguna et al., 2007)。

○我が国における腸管系ウイルス感染症の発生動向

我が国においては、国内で発生した腸管系ウイルスに起因する集団感染症に関する情報が国立感染症研究所（National Institute of Infectious Diseases: NIID）が管理するデータベースである「感染症発生動向調査週報（Infectious Disease Weekly Report: IDWR）」に登録され、感染症動向調査の結果が週報として公表される（National Institute of Infectious Disease, 2017）。IDWRに登録されている2006年度から2015年度の都道府県別ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス検出報告状況およびその年次推移をそれぞれ図2-9【本論文末に付録（第2章-Appendix-）】と図2-10に示す。IDWRによると、我が国ではノロウイルスやロタウイルスなどに起因する集団感染症事例が全国的に多数報告されており、それらのウイルスに感染した患者の糞便や吐物から検出されている（図2-9）（National Institute of Infectious Disease, 2017）。我が国における腸管系ウイルスの検出報告数ではノロウイルスが最も多く、平均して毎年約3,000件の検出報告がある（図2-10）（National Institute of Infectious Disease, 2017）。ノロウイルス検出の年次報告数の内訳としては、NoV GIで約9.2%、NoV GIIで約90%、ノロウイルス not typed（NoV NT）で約0.8%である（National Institute of Infectious Disease, 2017）。このことから、我が国では全国的にNoV GIIが流行しており、重要な病因微生物の一つであることが理解される。他方で、ロタウイルスとサポウイルスについても、毎年それぞれ500-800件と100-300件の検出報告がある（図2-10）（National Institute of Infectious Disease, 2017）。ロタウイルス検出の年次報告数については、A群ロタウイルスが最も多く、NoV GII同様に全国的に流行していることが理解される（National Institute of Infectious Disease, 2017）。

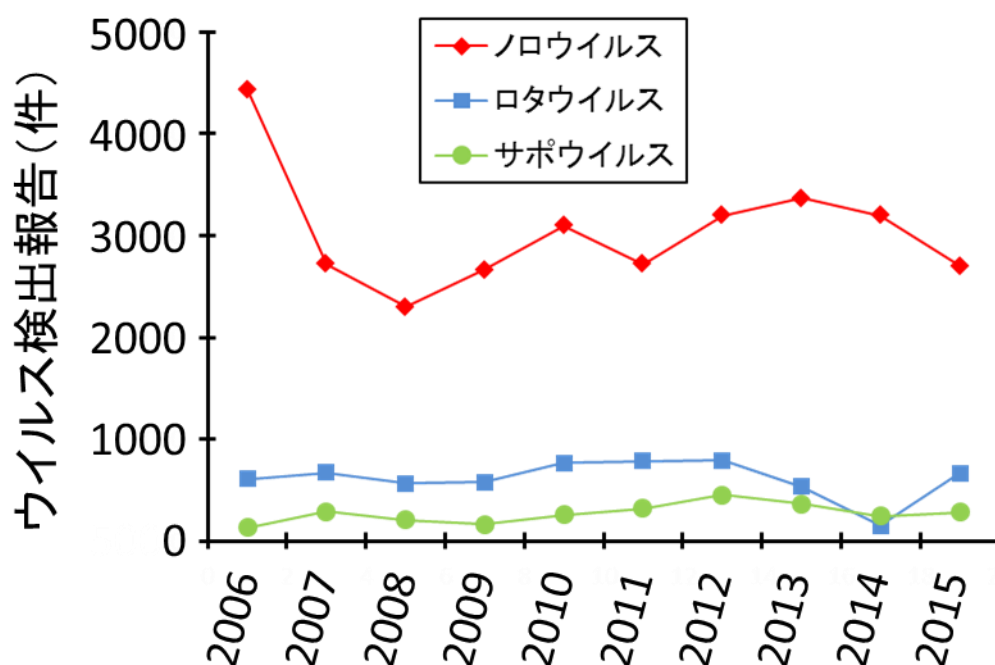


図2-10 日本国内における腸管系ウイルス検出報告数の年次推移
(National Institute of Infectious Disease, 2017 をもとに作成)

2.2.4 腸管系ウイルスの感染と抵抗性

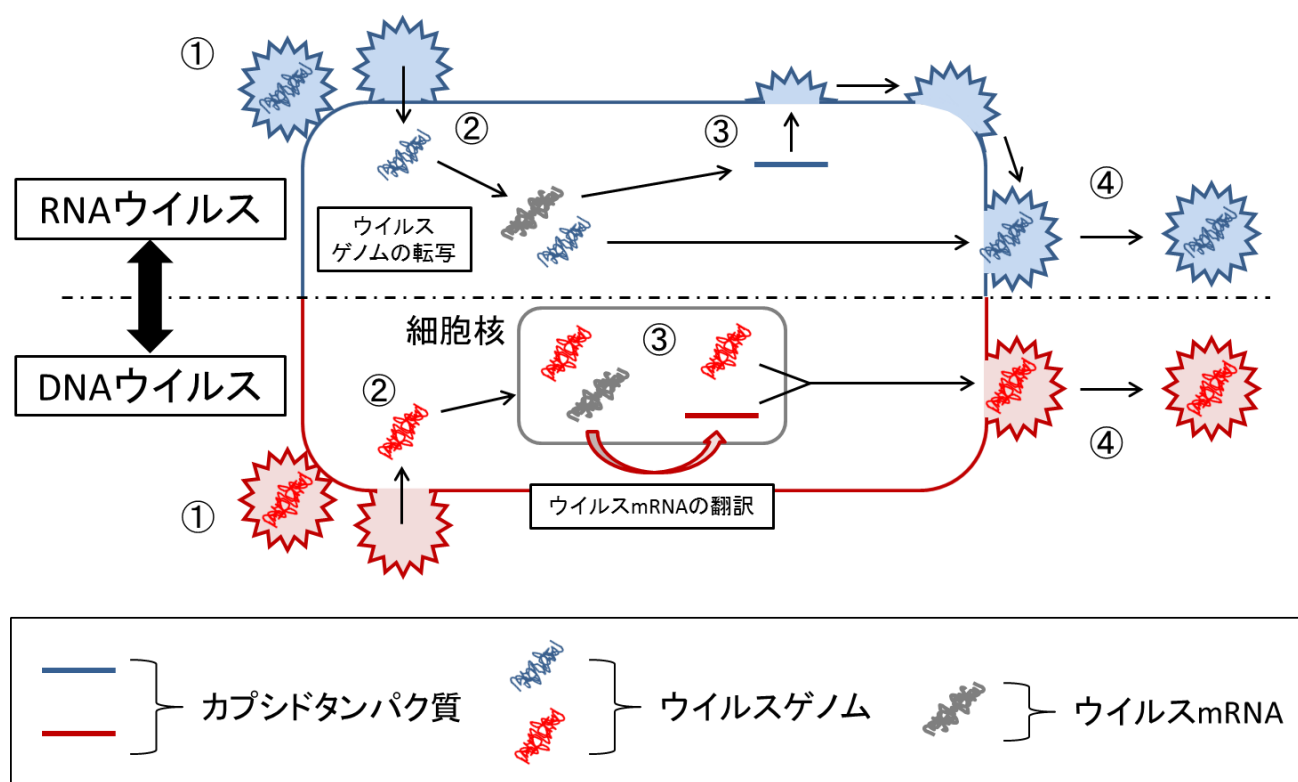


図 2-11 宿主細胞内における動物ウイルス増殖過程
(高田, 2012 をもとに作成、一部改変)

腸管系ウイルスや呼吸器ウイルスなどの動物ウイルスが細胞内において増殖し、子孫ウイルスを産生する過程については、大別して以下の4段階から成る(図 2-11)(高田, 2012)。

①吸着 (adsorption) :

ウイルス粒子が細胞膜上のウイルス特異的レセプターに付着する段階である。

②侵入 (penetration) および脱殻 (uncoating) :

ウイルス粒子は、細胞の食作用によって取り込まれたウイルス固定 (virophexis) か、ウイルス粒子表面のエンベロープと細胞膜が融合してウイルス粒子内組成のヌクレオカプシドが細胞質に入る。細胞質内のリソソーム酵素によって、あるいはウイルス遺伝子から転写、翻訳されてできたタンパク質すなわち uncoating protein の作用によって、ウイルス核酸からカプシドタンパク質が取り除かれる。

③素材の合成 (synthesis of viral components) :

ウイルス核酸の遺伝情報を転写した初期メッセンジャーRNA (mRNA) が合成され、細胞のリボソーム上でカプシドタンパク質、エンベロープ組成が合成される。一方では、ウイルス自身の核酸の複製が起こる。この素材の生合成段階は初期過程と後期課程に区別され、ウイルスの種類でその過程は異なる。

④粒子の組み立て (assembly) および細胞外への放出 (release) :

生合成された核酸とカプシドタンパク質の組合せが起こってウイルス粒子が形成され、細胞の破壊によって細胞外へ放出される。エンベロープを持つウイルスの場合は、カプシドで包まれた核酸が、ウイルス特異的タンパク質で修飾された細胞膜に被覆され、細胞外に遊離する (出芽)。

ウイルスの細胞への吸着は、宿主細胞膜表面に存在するレセプターを介して行われる。ウイルス粒子表面には標的細胞上のレセプターとの結合に関与するレセプター認識タンパク質が存在し、レセプターとレセプター認識タンパク質が鍵と鍵穴の関係にあり、それぞれのウイルス特異的な感染を引き起こす(Tan and Jiang, 2011)。代表的な呼吸器系ウイルスであるインフルエンザによる感染症は、ウイルス粒子表面にある突起の一つである赤血球凝集素 (hemagglutinin: HA) の HA 糖タンパク質が、標的細胞表面のレセプターであるシアル酸を末期に持つ糖質に対し特異的に結合し、ウイルス粒子と細胞膜との膜融合を引き起こす(König et al., 2009)。A 型インフルエンザウイルスはヒト、トリ、ウマ、ブタ、ミンク、アザラシ、クジラなど多くの動物に感染するものの、ヒトに感染する亜型のヒトインフルエンザウイルスはトリには感染せず、またトリインフルエンザウイルスはヒトに感染しない(König et al., 2009)。細胞膜表面に存在するウイルスレセプターは、上記のシアル酸結合糖質のほか、糖タンパク質などがある。シアル酸結合糖質や糖タンパク質などは、細胞生理活性物質のレセプターで細胞の活性制御の役割を担っている(König et al., 2009)。それぞれのレセプター分子と特異的に結合するリガンドとウイルス粒子表面の結合分子が、分子構造上の類似性を有しており、言い換えれば、細胞の活性制御の役割を担う細胞生理活性物質レセプター分子を、ウイルスが感染を成立させるためのレセプターとして利用している。

代表的な腸管系ウイルスである NoV 感染症は、上述したような特異的なウイルス - レセプター結合により感染が成立する。Lindesmith (2003) らによると、NoV は際表面上に存在する組織血液型抗原 (Histo-blood group antigen: HBGA) をレセプターとして認識し、細胞に吸着することが示唆されている(Lindesmith et al., 2003)。ABO 型抗原やルイス型抗原は、H 型抗原前駆多糖体にフコースが付加されたものが基本骨格となるが (図 2-12)、この反応には FUT1 と FUT2 という遺伝子座の産物であるフコシルトランスフェラーゼという酵素が関与する(Shirato, 2011)。FUT2 がコードする α 1, 2-フコース転移酵素は唾液中の H 抗原を合成するのに必須であり、この遺伝子座に変異があると、ABH 型抗原が粘膜上皮細胞に発現せず、唾液中にも分泌されない非分泌型個体 (nonsecretor) となる(Shirato, 2011)。血液型とノ

ノーウォークウイルスに対する感受性に関しては、O型の個体がノーウォークウイルスに感染する割合が高く、B型の個体が感染する割合が低いという報告がある(Shirato, 2011)。また、ノーウォークウイルスを昆虫細胞で発現させて作ったウイルス様中空粒子 (Virus like particle: VLP) は、ABH型抗原を粘膜上皮細胞に発現している分泌型個体の腸管上皮細胞には結合するが、これを発現していない非分泌型個体の腸管上皮細胞には結合しない(図2-13)(Tan and Jiang, 2011)。NoV濃度を段階的に変化させたNoV懸濁液を投与された77人のボランティアのうち34人(44%)が発症し、43人(56%)には発症が認められなかった(表2-7)(Lindesmith et al., 2003)。この結果を被検者のFUT2遺伝子の発現の違い(HBGA分泌型個体もしくは非分泌型個体)の観点からみると、非分泌型個体である22人の被検者では投与されたNoV懸濁液の濃度に係らず、非分泌型個体全員にNoV感染が認められなかった。一方、分泌型個体である55人の被検者においては、34人(62%)が発症し、21人(38%)には発症が認められなかった(Lindesmith et al., 2003)。なお、RT-PCRの検出限界を基準として、この検出限界量の $10^4 \sim 10^8$ 倍の範囲でNoV濃度を変化させ感染確率を得た場合では、NoV懸濁液のすべての希釈段階において、感染者の割合が分泌型個体の50~69%の範囲となることが確認された(Lindesmith et al., 2003)。これはノーウォークウイルスが非常に微量でも強い感染性を示すという先行研究の結果と合致するものである(Atmar et al., 2014)。

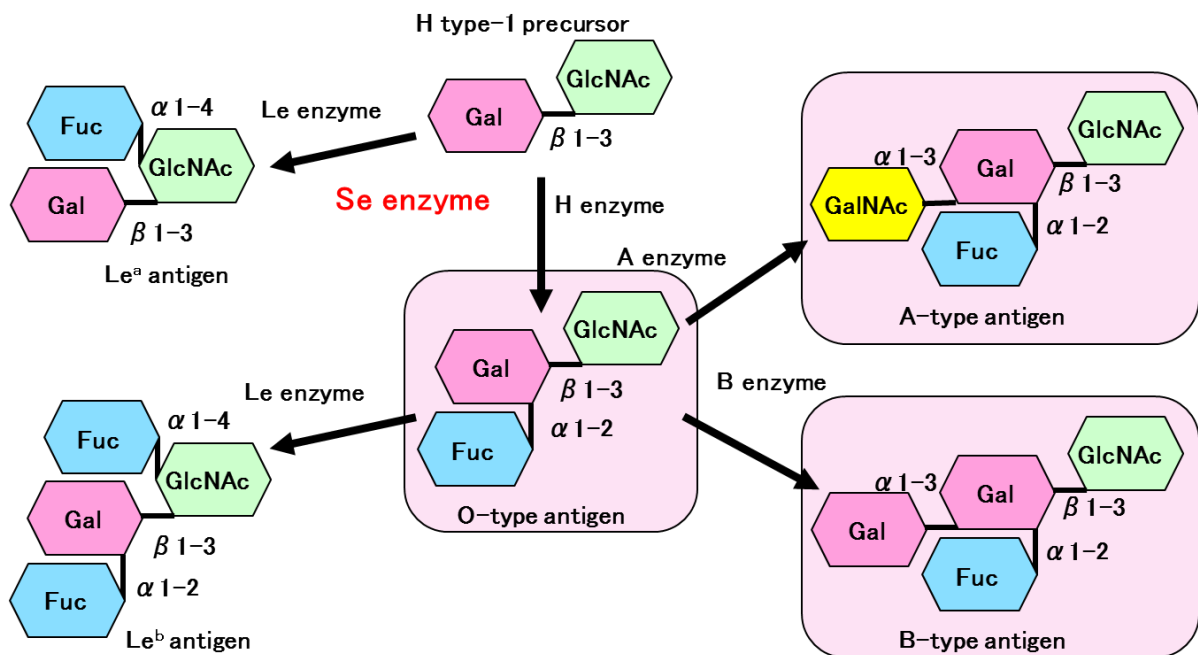


図2-12 各血液型抗原の骨格

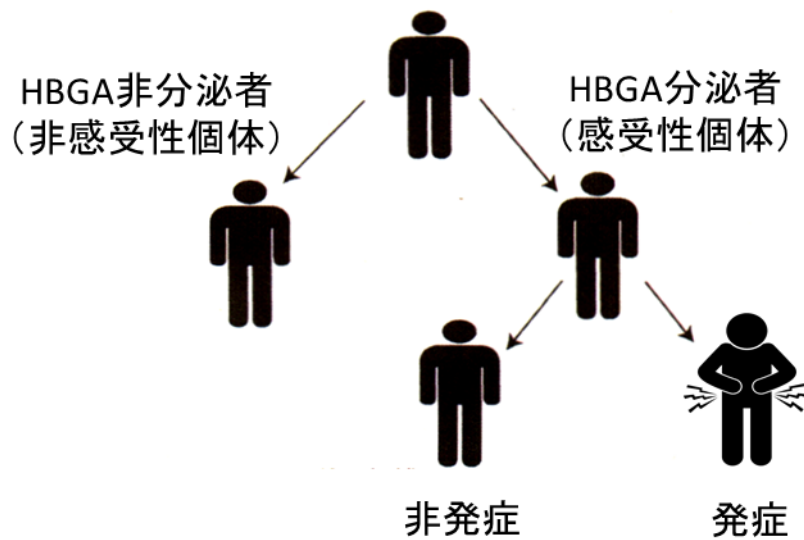


図 2-13 ノロウイルス感染症と組織血液型抗原（HBGA）との関係性
(Lindesmith et al., 2003 をもとに作成)

表 2-7 ノロウイルス感染症と組織血液型抗原（HBGA）との関係性
(Lindesmith et al., 2003 から抜粋)

Table 1 Infection ^a among Se+ and Se- volunteers by Norwalk virus dose						
PDU NV	$\leq 10^4$	10^5	10^6	10^7	10^8	Total
Se+	9/13 ^b (69%)	3/6 (50%)	2/3 (67%)	7/14 (50%)	13/19 (68%)	34/55 (62%)
Se-	0/6 (0%)	0/4 (0%)	0/2 (0%)	0/6 (0%)	0/4 (0%)	0/22 (0%)

NV, Norwalk virus. ^aViral RNA detected in stool ($n = 34$) or a ≥ 4 -fold increase in Norwalk virus-specific serum IgG ($n = 32$). ^bNumber of volunteers infected/number of volunteers dosed. PDU, PCR-detectable units.

2.3 下水再生水利用に起因する腸管系ウイルスの感染症リスク評価

2.3.1 定量的微生物リスク評価

WHO は、下水再生利用に起因する病原微生物のリスク評価方法として、定量的微生物リスク評価（Quantitative microbiological risk assessment: QMRA）に基づいた手法により評価することを推奨している（World Health Organization, 2006）。QMRA は、病原微生物により汚染された水、空気および食品などの媒体をヒトが摂取することにより発生する感染症リスクを具体的な数値として示すことである（Haas et al., 2014）。QMRA の主な作業は、大別して以下の4つから構成され、図 2-14 に示す例に従って実施される（World Health Organization, 2006）。

- 危害の同定（Hazard identification）：病原微生物の特徴づけ、感染シナリオの設定
- 曝露評価（Exposure assessment）：病原微生物への曝露量の推定
- 用量-反応解析（Dose-response analysis）：曝露量と健康被害の関連付け
- リスクの記述（Risk characterization）：健康被害の推定

一般的に、QMRA では特定の病原微生物により汚染された媒体をある一つの経路で摂取することにより生じる感染症リスクを評価する。水系感染症の危害因子となる病原微生物は、ヒトが各病原微生物に曝露される経路も多岐におよぶことから、すべての病原微生物による感染症リスクを評価することは困難である。したがって、QMRA を用いた病原微生物による感染症リスクを評価する際、媒体に含まれる可能性が高い病原微生物の中で最も重要な微生物を選択し、その微生物による感染症リスクを評価するアプローチが一般的である。

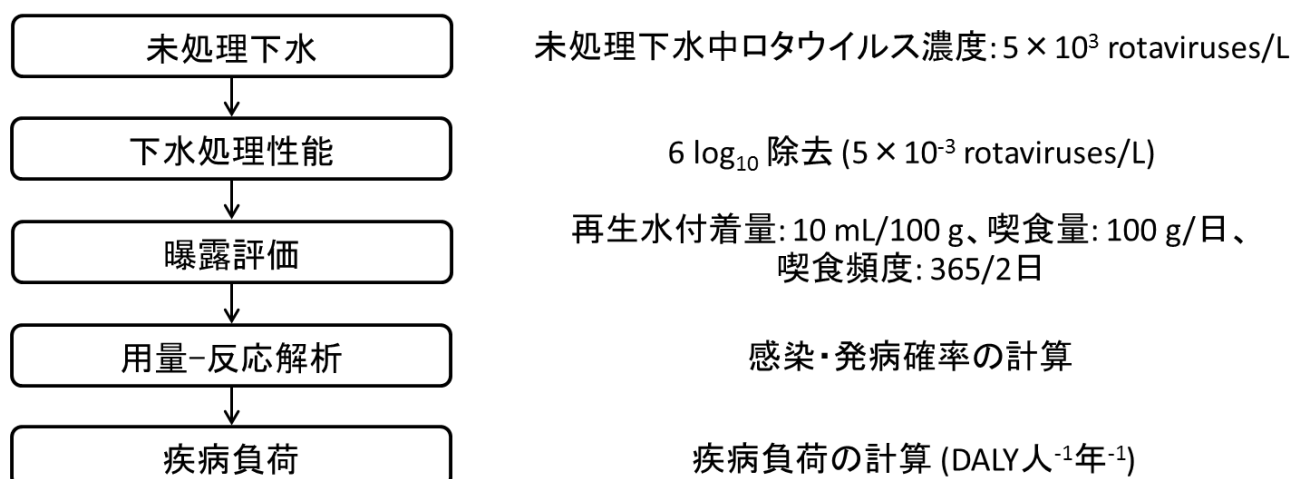


図 2-14 QMRA を用いた年間疾病負荷の計算例
(World Health Organization, 2006 をもとに作成)

QMRA を用いた病原微生物の感染症リスク評価に係る研究では、QMRA により推定された感染症リスクの結果自体を最終目標とするのではなく、QMRA で仮定したシナリオにおいて許容可能な感染症リスクを超過していた際に、その感染症リスクを許容範囲内に制御することを目的とした有効策（下水処理の改善、衛生管理の徹底）について議論することが可能である。下水再生利用に起因する病原微生物の水系感染症リスクを制御・管理する際、水家感染症の発生リスクを一定の基準値以下、すなわち「許容感染値」以下に抑えることを目的としている。具体的な例として、U.S. EPA が提唱する年間感染確率（Infection per person per year）（U.S. Environmental Protection Agency, 2012）や、WHO が提唱する障害調整生存年数（Disability adjusted life year per person per year: DALY_{pppy}）などの利用が推奨されている（World Health Organization, 2006）。

ここで、ある病原微生物がヒト集団に感染することを考慮する場合では、対象とする病原微生物の摂取量と感染症の発生確率の関係性が定式化（用量反応モデル）されている必要がある。病原微生物の用量反応モデルの原理は、以下に要約される（Haas et al., 2014）。

- 宿主であるヒトが発病する能力を有する 1 個以上の微生物を摂取する
- その微生物は死滅する、もしくは宿主の応答により感染や疾病を引き起こさない程度に増殖を阻害される。次いで、摂取された微生物の一部が感染部位に到達する

用量反応モデルとしては、一般的に指数関数モデルやベータポアソンモデルなどが多く用いられている。指数関数モデルは、病原微生物が宿主体内においてそれぞれ独立して活動し、ある一定の確率で生残することを仮定している。指数関数モデルではこれに対し、ベータポアソンモデルでは、病原微生物に対する宿主の抵抗性が一様でないことを考慮するために、宿主体内における病原微生物の生残確率がベータ分布に従って変化することを仮定している。一般的に、病原微生物を対象とした用量反応モデルではウイルスの感染価を反映するために、コロニー形成単位（Colony Forming Unit: PFU）、プラーク形成単位（Plaque Forming Unit: PFU）、感染単位（Infection unit: IU）などが病原微生物の摂取量の単位として用いられている。

NoV の用量反応モデルは、これまでに Masago (2006) ら、Teunis (2008) ら、Schmidt (2015) ら、Messner (2014) らにより発表されている。NoV は、細胞培養実験を用いたウイルス感染価測定手法がこれまでに確立されていないことから、PCR の定量値（Copy）が感染性を有するウイルス粒子量として直接用いられている。Masago (2006) らは、指数関数モデルを用いて NoV の感染確率を表している（Masago et al., 2006）。Masago らのモデルでは、NoV の感染確率がモデルパラメータである 50%感染量（ID50）によってのみ支配されることから、モデルの扱いやモデルパラメータ更新の容易さが利点となる。Teunis (2008) らは、ベータポアソン分布をもとに NoV 粒子（GI.1）の凝集もしくは分散状態を考慮した用量反応モデルをそれぞれ提案した（Teunis et al., 2008）。Teunis (2008) らの用量反応モデルは 2 つのモデルパラメータ（ α 、 β ）を持つベータポアソンモデルをベースとし、そこに凝集

粒子パラメータ a (NoV 凝集体の粒子数及び大きさがそれぞれポアソン分布と対数級数分布に従うことを仮定) を加えて NoV の感染確率を表現している。一方で、Schmidt は NoV 粒子の凝集状態よりも宿主側の免疫力の変動を考慮すべきとの立場にあり、NoV 粒子の分散状態を考慮した (パラメータ a を含まない) Teunis (2008) らの用量反応モデルに免疫力パラメータ ϕ を加えたモデルを提案した (Schmidt, 2015)。Messner (2014) らは、NoV 感染に対する感受性を考慮するために、HBGA を唾液などの体液中に分泌する NoV 感染感受性個体 (Se^+) と非感受性個体 (Se^-) の全人口に対する割合をそれぞれ P 及び $1-P$ (Fractional Poisson モデル内では単一パラメータ P) として組み入れた Fractional Poisson モデルを提案した (Messner et al., 2014)。Fractional Poisson モデルでは、Teunis (2008) らと同様に体外に排出された NoV 粒子が凝集もしくは分散状態にあると仮定しており、1 凝集粒子中の NoV 粒子をモデルパラメータ μ で表している。Messner (2014) らは、モデル選択基準の一つである「赤池情報量基準 (Akaike's information criterion: AIC)」を用いて Fractional Poisson モデルと Teunis (2008) らのモデルを評価・比較し、Fractional Poisson モデルを用いることによってより尤もらしい NoV の感染確率が推定できると主張している。

これまで報告されている NoV を対象病原体とした定量的微生物リスク評価 (quantitative microbial risk assessment: QMRA) では、Teunis (2008) らの用量反応モデルとそのモデルパラメータが比較的によく用いられてきた。しかしながら、Teunis (2008) らによって報告されているモデルパラメータはノーウォークウイルス (GI.1) のみを用いたボランティア摂取実験のデータを用いて推定されたものであり、NoVGII による感染確率に関しては代替モデルの位置付けであった。Messner (2014) らは NoVGI.1 のデータに加え、世界的に流行している遺伝子型の一つである NoVGII.4 のボランティア摂取実験のデータをもとに、Teunis (2008) らのモデルのパラメータを更新している (Messner et al., 2014)。Schmidt によって構築された用量反応モデルのパラメータも、Messner (2014) らと同様に NoVGI 及び GII のボランティア摂取実験データをもとに推定されている (Messner et al., 2014; Schmidt, 2015)。NoV 感染に対する感受性は遺伝子型により差があることが知られており (Van Abel et al., 2016)、一例として NoV GII.4 が非感受性個体 (Se^-) に感染した事例が報告されている (Shirato et al., 2008)。

これまでに NoV の用量反応モデルについてはいくつか紹介したが、QMRA に適用する場合にどのモデルを選択すればよいかについては議論を深化させる必要がある。特に NoV の凝集状態や感受性及び抵抗性の仮定においては、NoV の凝集状態を実験的に測定することが事実上困難であることや、NoV 感染に対する感受性及び抵抗性 (特に獲得免疫) についての知見が不足していることが言及されており (Van Abel et al., 2016)、どのモデル (仮定) が最適であるかを一概には言えない状況にある。NoV の用量反応モデルについては、それぞれのモデルにおいて想定されている状況に加え、最終的に得られる推定結果が大きく異なってくることから、QMRA に適用するモデルの選択には慎重を期する必要がある。

2.3.2 腸管系ウイルスの年間許容疾病負荷と目標除去効率の関係

先述(2.3.1)したように、QMRAを用いた感染症リスク評価自体は本来の目的ではなく、ある感染症リスクの許容レベルを達成するためのリスク管理の起点として用いられる。許容リスクの概念は、病原微生物による感染症リスクを考慮する場合において、ゼロリスク(無菌状態)を仮定できないことから、許容可能なリスクレベルを考える必要があるというものである。下水再生利用においてリスク管理を実施する場合には、明確化した健康目標である許容リスクに基づき、水質目標と管理目標を設定するのが望ましい。この場合における水質目標と管理目標は、それぞれ下水再生水中許容濃度と下水再生システムのことを指し、下水中の病原微生物濃度に関するデータと関連づけて設定することが推奨されている(World Health Organization, 2006)。

WHOが2006年に発行したガイドライン「WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater: volume 2 wastewater use in agriculture」では、QMRAを用いて許容疾病負荷 10^{-6} DALY_{pppy} 以下となるように下水再生システムにおける病原微生物の目標除去効率を設定することを推奨している(図2-15)(World Health Organization, 2006)。WHOが提案する目標除去効率算出のプロセスでは、QMRAを用いて病原微生物の目標除去効率を算出する際、未処理下水中の病原微生物濃度をあらかじめ把握しておく必要があることを言及しており、未処理下水中の病原微生物濃度と許容疾病負荷である 10^{-6} DALY_{pppy} をもとに、下水

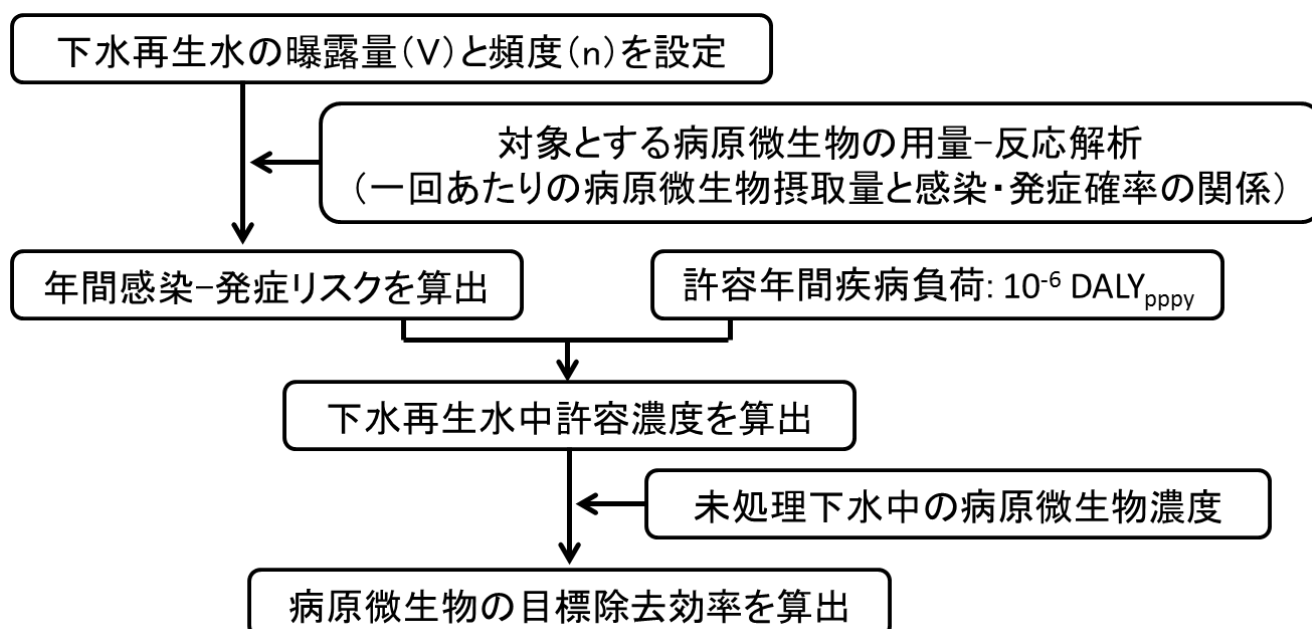


図2-15 QMRAを用いた下水再生システムにおける病原微生物の目標除去効率の計算例
(World Health Organization, 2006 をもとに作成)

再生システムにおいて必要とされる病原微生物の除去効率を算出する (World Health Organization, 2006)。WHO が提唱する病原微生物の目標除去効率の算出方法は、我が国においても同様の方法が提唱されており、国土交通省が 2001 年に発行したガイドライン「ウイルスの安全性からみた下水処理水の再生処理法検討マニュアル（案）」では、下水再生水の利用用途に応じて、下水再生システムにおいて必要とされるウイルス除去効率の算出に関する枠組みを公表している (国土交通省, 2001)。

下水再生利用に係るガイドラインにおいて、下水再生水中許容濃度と下水再生システムにおける目標除去効率は、感染症の発生確率を最小にするために、定常的状況に対してだけでなく、短期間に発生しうる出来事（下水中の病原微生物濃度の一時的な上昇など）に対応する必要がある。こうした予測不可能な事象、すなわち変動性と不確実性を考慮することは、より頑強なシステムを構築する上で極めて重要な試みであるといえる。

2.3.3 諸外国および我が国における下水再生利用に関する指針

下水再生利用に関する国際的な指針としては、WHO が 1973 年に下水再生利用に関する専門委員会を設置し、健康関連評価基準や下水処理システムに関する報告書を取りまとめている。1973 年の報告書は、1989 年に下水の農業灌漑利用に係るガイドライン「Health guidelines for the use of wastewater for agriculture and aquaculture」として更新・発行され、下水を農業灌漑利用する場合における具体的な水質基準を規定している。1989 年 WHO ガイドラインでは、当時の下水再生利用における主な微生物リスクが原虫の感染に関連していることに基づいて、農業灌漑および養殖漁業における下水の安全利用のためには原虫の卵を当時の糞便性大腸菌群の水質基準である 1,000 個/100 mL まで除去することを規定している (Asano et al., 2007)。この 1989 年 WHO ガイドラインは、2006 年に発行されたガイドライン

「WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater: volume 2 wastewater use in agriculture」として更新され、先述 (1.1) した multiple barrier system のコンセプトに基づいて下水再生システムで必要とされる病原微生物の目標除去効率を農業灌漑用水の利用用途ごとに設定している (World Health Organization, 2006)。一例として、レタスなどの生食用農作物を栽培する場合（シナリオ B）に、下水再生システムで達成されるべき病原微生物の目標除去効率を $6 \log_{10}$ としており、その他にも集約農業（シナリオ F）および高度機械化農業（シナリオ G）では、それぞれ $4 \log_{10}$ および $3 \log_{10}$ の目標除去効率を規定している (図 2-16) (World Health Organization, 2006)。Multiple barrier system とは、下水処理システムの各下水処理ユニットもしくは野菜の洗浄・消毒などの衛生管理手法を適切に組み合わせることにより、下水再生システム全体として目標除去効率を達成することをいう (World Health Organization, 2006)。この Multiple barrier system のコンセプトは、米国や豪州などにおいても採用されており (The Victoria Department of Health, 2013; U.S. Environmental Protection Agency, 2012)、下水処理ユニットおよび衛生管理手法において病原微生物の除去効率が事前に定められている必要があることを記述している。

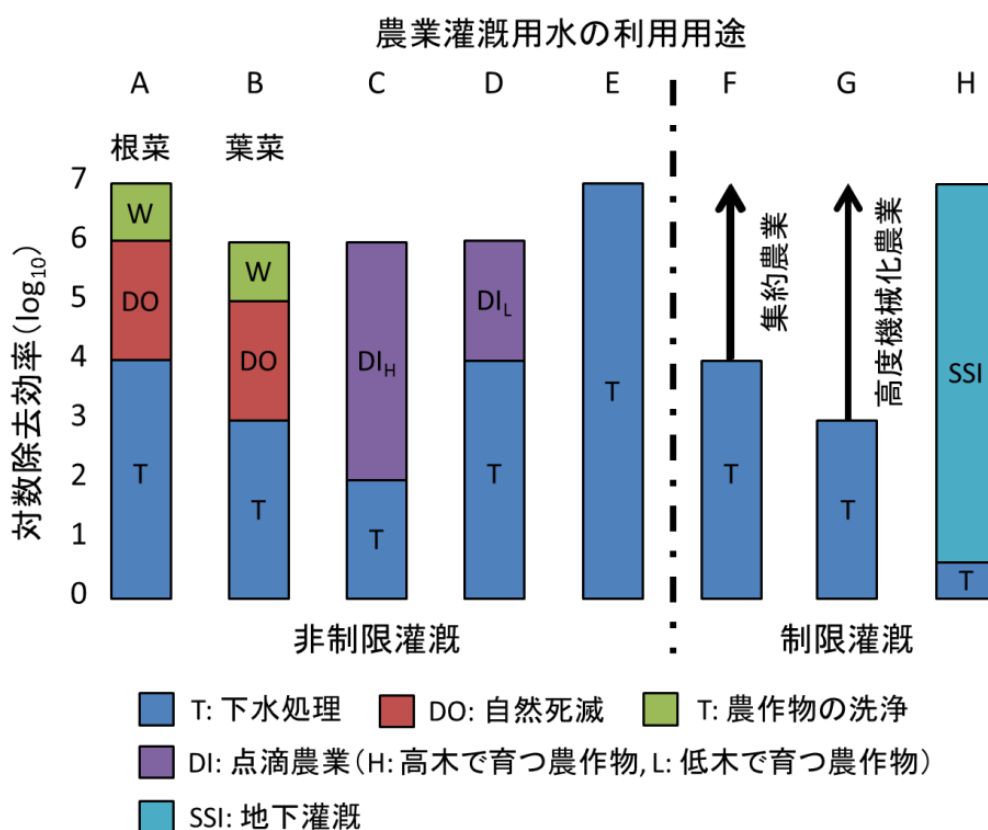


図 2-16 2006 年 WHO ガイドラインに記載されている農業灌漑用水の利用用途ごとに設定された病原微生物の目標除去効率および下水再生システムの組合せの例 (World Health Organization, 2006 をもとに作成)

米国では、米国環境保護庁 (United States Environmental Protection Agency: U.S. EPA) と米国国際開発庁 (United States Agency for International Development: U.S. AID) が 1992 年に共同で発行した「Guidelines for Water Reuse」を始めに、米国各州において下水再生利用に関する指針が策定されている (U.S. Environmental Protection Agency, 2012)。下水再生利用に関して先導的な立場にあるカリフォルニア州では、2000 年に下水再生利用に係るガイドライン「Title 22 of California Water Regulations」を公表し、下水再生システムにおける下水処理ユニットの組合せを下水再生水の利用用途ごとにそれぞれ規定している (California Department of Water Resources Recycled Water Task Force, 2003)。またカリフォルニア州は、Title 22 の規定「§60320.108. Pathogenic Microorganism Control」において、下水再生水の地下水涵養利用を目的として、下水再生システムで 12 log₁₀ のウイルス除去効率を達成するように規定している (California State Water Resources Control Board, 2015)。テキサス州では、TWDB が主導する Direct Potable Reuse Project において、直接飲用水製造施設での 12 log₁₀ のウイルス除去効率を達成するように規定している。ワシントン州では、ワシントン州生態局 (Washington State Department of Ecology: WSDE) が 2015 年に発行した下水再生施設運用指針「The Purple book:

Reclaimed Water Facilities Manual」において、下水再生水をその利用用途に応じて「A クラス」と「B クラス」に分類し、A 分類の下水再生水（親水用水やトイレ水洗用水として用いられる可能性の高い水）を製造する場合に、二次処理および膜処理の後段処理としての消毒処理のみで大腸菌ファージ MS2 の不活化効率 $4 \sim 5 \log_{10}$ を達成する必要がある旨を記述している (Washington State, 2015)。

豪州においても、米国同様に各州において下水再生利用に関する指針が規定されている。クイーンズランド州では、2008 年に発行したガイドライン「Water quality guidelines for recycled water schemes」において、A+分類（非飲用）の下水再生水を生産する場合に、ヒトに感染する腸管系ウイルス（アデノウイルス、アストロウイルス、カリシウイルス、コロナウイルス、エンテロウイルス、A 型肝炎ウイルス、ノロウイルス、ロタウイルス）、もしくは代替指標ウイルス（F 特異的大腸菌ファージ、体表面吸着大腸菌ファージ）を用いて、 $6.5 \log_{10}$ の除去効率を達成するよう規定されている (The state of Queensland, 2008)。ビクトリア州では、2003 年、2005 年および 2013 年に下水再生利用に係るガイドラインとして「Guidelines for environmental management: use of reclaimed water」、「Guidelines for environmental management: dual pipe water recycling schemes—health and environmental risk management. Southbank, Victoria」および「Guidelines for validating treatment processes for pathogen reduction Supporting Class A recycled water schemes in Victoria」をそれぞれ発行し、エンテロウイルス（ポリオウイルス、コクサッキーウイルス）を用いて下水処理ユニットごとに対数除去効率を評価し、且つ対数除去効率の和最最終的に下水再生システム全体で $7 \log_{10}$ の目標除去効率を達成するよう規定している (Environment Protection Agency Victoria, 2005, 2003; The Victoria Department of Health, 2013)。

上述したように、諸外国で発行された下水再生利用に係るガイドラインでは、下水再生水を製造する上で必要とされる病原微生物の目標除去効率が具多的な数値として示されている (California State Water Resources Control Board, 2015; Environment Protection Agency Victoria, 2005, 2003; Texas Water Development Board, 2015; The state of Queensland, 2008; The Victoria Department of Health, 2013; Washington State, 2015; World Health Organization, 2006)。我が国における処理水の再利用上での基準については、国土交通省が 2005 年に発行した「再生水水質基準等マニュアル（案）」に基づいて、下水再生水の水質基準や施設基準などが提示されている (国土交通省, 2005)。我が国では、下水再生水中の大腸菌数もしくは大腸菌群数に対し許容濃度を設定し、それぞれ「下水再生水中から検出されないこと」として規定している (国土交通省, 2005)。しかしながら、原虫およびウイルスについては、下水再生水中許容濃度が設けられておらず、濁度および大腸菌濃度などからそれぞれの水中濃度を間接的に管理している (国土交通省, 2005)。原虫に関しては、先述 (2.2.1) した膜処理技術を採用することにより水中の浮遊物質 (Suspended solids) とともに除去することが可能である (膜分離技術振興協会・膜浄水委員会, 2008)。しかしながら、ウイルスは、消毒耐性や水中濃度が代替指標微生物として用いられる大腸菌と大きく異なることが知られている (Leclerc and Moreau, 2002)。特に、エンテロウイルスやノロウイルスなどの感染症の流行に季節性を示す

ウイルスについては、それぞれのウイルスが流行する季節においてその感染症リスクが上昇することから、下水再生水中の大腸菌もしくは大腸菌群数のモニタリングでは適切なリスク制御・管理を実施する上で限界が生じると考えられる。

2.4 腸管系ウイルスの目標除去効率を算出する上での課題

2.4.1 腸管系ウイルス濃度の左側打ち切りデータ (left-censored data)

先述 (2.3.2) したように、下水再生水の利用に関する WHO ガイドラインでは、下水再生水の用途に応じてウイルス除去効率の目標値を設定することを推奨している (World Health Organization, 2006)。このウイルス除去効率の目標値を達成するように、WHO が提唱する下水再生利用のコンセプトである **multiple-barrier system** に基づいて下水処理ユニットを組み合わせる際、各下水処理ユニットのウイルス除去効率を把握しておく必要がある (World Health Organization, 2006)。しかしながら、水中のウイルス濃度は頻繁に検出下限値以下となり (Kitajima et al., 2014; Rachmadi et al., 2016)、不検出データを含むウイルス濃度データ (左側打ち切りデータ) を用いて除去効率を算出することは困難である。他方で、先述 (2.1.2) した ISO/TC282 の SC3 (図 2-6) においても、我が国は下水再生システムの下水処理性能評価方法に関する国際規格素案の作成を担当しており、左側打ち切りデータの問題についても解決策を講じる必要があると考えられる。代表的な左側打ち切りデータの処理方法としては、以下の方法などが挙げられる。

ー代表的な左側打ち切りデータの処理方法ー

- ペアワイズ除去法
- リストワイズ除去法
- 単純な補完方法 (代入法)
- モデルに基づく方法 (最尤推定法、ベイズ推定法)

ペアワイズ除去法は、2 個のデータ群の片方もしくは両方が欠損値を持つ場合に、欠損があるケースを計算から除去する方法である。一方、リストワイズ除去法は、解析対象となる複数のデータ群において、データ群内に 1 個でも欠損値を持つデータ群を計算から除外する方法である。データ群における欠損パターンが完全にランダムである場合は、欠損値のあるケースをリストワイズ除去法もしくはペアワイズ除去法でデータ群から除去して計算したとしても、その計算結果に大きな偏りが生じないとされている。しかしながら、欠測値の出現パターンに別の変数との因果関係が認められる場合には、その計算結果に大きく影響することが知られている。

左側打ち切りデータの問題は、リスク評価の分野においても最重要課題の一つとして認識されている。欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority: EFSA) は、2010 年に「Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances」と題す

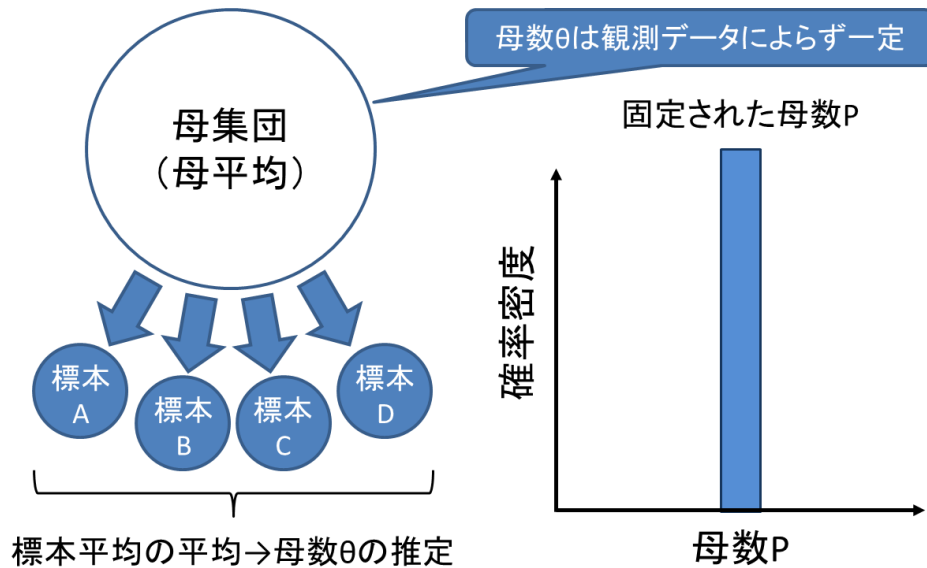
る報告書を公表した(European Food Safety Authority, 2010)。EFSA は、これまでに定量下限値未満のデータ（不検出データ）に対し、ゼロ、定量下限値もしくは定量下限値の半値などを代入する手法（代入法）を採用してきた(European Food Safety Authority, 2010)。しかしながら、左側打ち切りデータの処理方法として代入法を採用する場合、欠測値に代入する値の科学的根拠が明確にされている必要があり、EFSA が推奨する方法ではその根拠が欠如していることが指摘されている。以上のことから、EFSA は現在用いられている化学物質リスク評価の枠組みでの課題は定量下限値の取り扱いにあるとし、曝露評価に係る化学物質左側打ち切りデータを取り扱うための適切な統計学的アプローチについて勧告を行った(European Food Safety Authority, 2010)。

EFSA は、左側打ち切りデータを処理するための先進的な統計手法として、パラメトリックモデルを用いた統計手法の利用を推奨している(European Food Safety Authority, 2010)。パラメトリックモデルを用いた統計手法の代表的なものとしては、最尤推定法（図 2-17a）やベイズ推定法（図 2-17b）などがある。最尤推定法は、与えられたデータからそれが従う確率分布の母数 θ を点推定する方法である（図 2-17a）(Zhu and Wong, 2001)。最尤推定法では、始めに尤度（ある確率論的モデルを仮定しているときに、その観測データが得られる確率もしくは確率密度）を計算し、尤度を「手持ちの観測データのもとで、あるパラメータ値が得られる確率」と仮定し、尤度を最大化するようなパラメータ値を探索する(Zhu and Wong, 2001)。しかしながら、一般的に水中の腸管系ウイルス濃度には季節変動性がみられることから、最尤推定法による母数を点推定する方法ではその変動性を十分に評価することが難しいとされている(Pradhan and Kundu, 2011)。また、最尤法では後述するベイズ推定法とは異なり、データをもとに白紙の状態から尤もらしい母数を推定することから、正確な推定を行うために膨大なデータ量を一度に分析する必要となる。

ベイズ推定法は、母数 θ 自体を確率分布として考えており、得られたデータを情報として扱うことにより、その母数 θ の分布を更新する方法である（図 2-17b）(Pradhan and Kundu, 2011)。ベイズ推定法では、データを得る前の真値の分布を「事前分布」、データが得られた後更新された分布を「事後分布」と定義し、分布の更新により尤もらしいと思われる母数 θ を推定する(Pradhan and Kundu, 2011)。ベイズ推定の長所としては、あるデータから得られた事後分布を次の推定の事前分布として扱えることから、比較的少ないデータから母数を推定することが可能である。最近では、水環境サンプルから得られた化学物質濃度や微生物濃度の左側打ち切りデータに対し、ベイズ推定法を用いて母数を推定する先行研究が増加しており(Pradhan and Kundu, 2011)、左側打ち切りデータを処理するに際し有用な手法として認識されている。

(a)

最尤推定法: 母数(P)の下でデータ(X)が得られる確率
 $\rightarrow \Pr(X|P)$ が最大になるPを推定する



(b)

ベイズ推定法: データ(X)の下で母数(P)が得られる確率
 $\rightarrow \Pr(P|X)$ を推定する

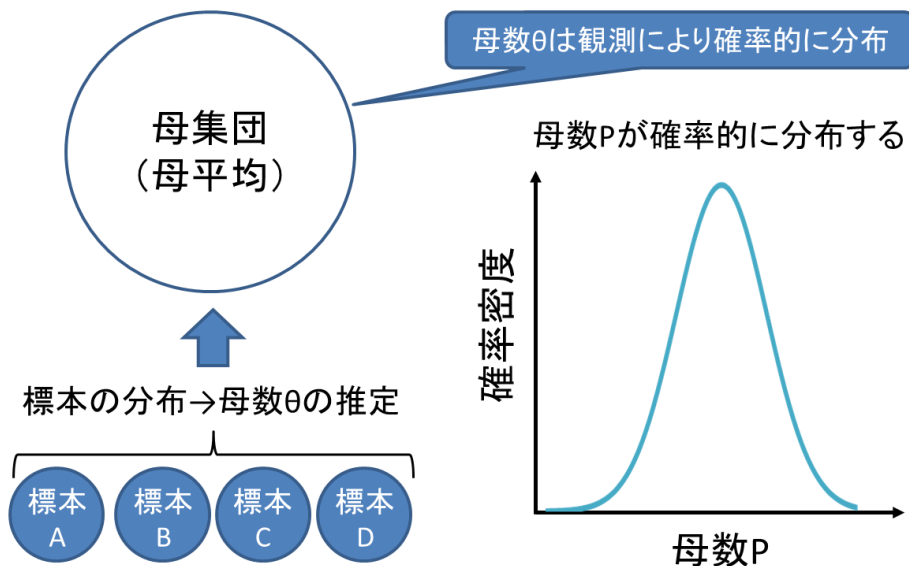


図 2-17 (a) 最尤推定法および(b) ベイズ推定モデルの原理

2.4.2 地域特性を考慮した下水再生利用に起因する感染症リスク制御・管理

先述 (2.1.2) したように、ISO/TC282 をもとに下水再生利用の国際基準化活動が活発化しているものの、国際的な基準を規定するに際し克服すべき課題が残されている。国際的なガイドラインを規定した場合においても、国もしくは地域レベルの検討が行われた後、それぞれ国や地域の状況を考慮して修正される必要がある。WHO はガイドラインを規定するに際し、「ガイドライン値を採用する最終判断には、各国が決定すべきコストや許容リスクレベルに係る」という立場にあるとした (World Health Organization, 2006)。一例として、2006 年 WHO ガイドラインでは、下水再生利用に係る年間許容疾病負荷として 10^{-6} DALY_{pppy} の採用を推奨しているものの、採用する地域によっては 10^{-6} DALY_{pppy} を達成できない、または現実的ではないことを指摘している (World Health Organization, 2006)。この場合、年間許容疾病負荷を 10^{-5} DALY_{pppy}、もしくは 10^{-4} DALY_{pppy} などのより緩和されたレベルの許容リスクを設定した場合においても、その地域において質の高い安全な水を提供するという目的に合致していることが考えられる。

他方で、ガイドラインなどに記述されている病原微生物の下水再生水許容濃度および下水再生システムにおける目標除去効率の疫学的妥当性についても議論する必要がある。病原微生物による感染症の流行には風土的特性があることから (表 2-6)、下水再生利用を実施する地域における疫学的証拠に基づいてガイドライン値を規定することが望ましい。2006 年 WHO ガイドラインでは、ロタウイルスに起因する健康リスクがその他の病原微生物 (原虫、細菌よりも高いと仮定した上で、農業灌漑用水の利用用途ごとに病原微生物の目標除去効率を算定している (図 2-16) (World Health Organization, 2006)。欧州の下水再生利用ガイドライン「Royal Decree-Law 1620/2007 of Purified Water Reuse」では、WHO ガイドラインを参考として、欧州における下水再生利用を規定している (Iglesias et al., 2010)。しかしながら、欧州における水系感染症の大部分はノロウイルスに起因しており (表 2-6)、このことから国際的なガイドラインに明記されている目標除去効率が、必ずしもそれぞれの国や地域の状況 (未処理下水中の病原微生物濃度のモニタリングデータ、下水再生水の利用用途、許容年間疾病負荷など) を考慮した値ではないことが考えられる。したがって、下水再生システムにおける目標除去効率については、それぞれの国や地域の状況に基づいて算出するためのシステムが構築され、共有されるべきであるといえる。

第3章

下水処理プロセスにおける腸管系ウイルス 除去効率のベイジアンモデリング

3.1 本章の目的

第2章(2.4.1)で述べたように、下水中の腸管系ウイルス濃度はたびたび定量下限値以下となることが報告されている(Kitajima et al., 2014; Rachmadi et al., 2016)。下水再生利用に関するWHOや米国、豪州・ビクトリア州などにおいて公表されているガイドラインでは、下水再生システムを設計する場合、各下水処理ユニットにおいて腸管系ウイルスの対数除去効率が事前に算出される必要があることを記述している(The Victoria Department of Health, 2013; U.S. Environmental Protection Agency, 2012; World Health Organization, 2006)。しかしながら、不検出データを含む腸管系ウイルス濃度データ(左側打ち切りデータ)を用いて下水処理ユニットにおける対数除去効率を正確に評価することは困難であるとされていた(Kitajima et al., 2014; Nordgren et al., 2009)。

リスク評価においても、左側打ち切りデータの取り扱いについては、曝露評価における不確実性を考慮する上で重要な課題であり、従来用いられてきた手法の正確性評価や新規統計学的手法の利用が試みられてきた(European Food Safety Authority, 2010; Kennedy and Hart, 2009; Kennedy, 2010)。先述(2.4.1)したベイズ推定法も左側打ち切りデータを取り扱うための手法として提案された統計学のアプローチの一つであり(European Food Safety Authority, 2010)、不検出データを含む実験データ群がパラメトリックモデルに従うことを仮定し、実験データ群の母集団のモデルパラメータを推定する手法である(Pradhan and Kundu, 2011)。ベイズ推定モデルは、実験データ X を観測する前にモデルパラメータが取りえる値の確率密度分布を事前分布として表現し、実験データが観測された後にモデルパラメータが取りえる値の確率密度分布を推定する(Pradhan and Kundu, 2011)。既往の研究において、Paulo (2005)らは食品中の農薬汚染レベルが頻繁に不検出となることに着目し、農薬汚染食品サンプルから得られた農薬濃度の打ち切りデータを用いて、対数正規分布のモデルパラメータをベイズ推定モデルにより推定した(Paulo et al., 2005)。Pauloらの研究では検出下限値以下の農薬濃度データ、すなわち不検出データがゼロもしくは定量下限値の状態で存在すると仮定し、その判定が二項分布に従うとするモデルを開発した(Paulo et al., 2005)。しかしながら、Pauloらによって提案されている不検出データにゼロもしくは定量下限値の値を代入する手法は、

EFSA がこれまで採用してきた代入法の域を出るものではなく、特定の値を代入することによりデータに偏りが生じることが指摘されている(Helsel, 2006)。

Kato (2013) らは Paulo (2005) らによって提案されたベイズ推定モデルを改良するとともに、下水中の腸管系ウイルス濃度分布の正確な推定に必要な検出データ数を定義した(Kato et al., 2013)。結果として、下水中の腸管系ウイルス濃度のデータ総数が 12 個以上であるときに、少なくとも 8 個以上の検出データ数を必要とすることが示された(Kato et al., 2013)。EFSA が 2010 年に発行した左側打ち切りデータの処理方法に関するマニュアルでは、最尤法やベイズ推定法などのパラメトリックモデルを用いて濃度分布を推定するに際し、正確な推定のために必要とされる検出データ数および検出率が定義される必要があることを言及している(European Food Safety Authority, 2010)。他方で、Kato (2013) らでは、ベイズ推定手法を用いた左側打ち切りデータからの下水中腸管系ウイルス濃度分布の正確な推定に焦点を当てており、下水処理システムにおける腸管系ウイルス除去効率の推定方法については、深く議論されていなかった(Kato et al., 2013)。

本章では、先行研究で開発されたベイズ推定モデル(Kato et al., 2013)を用いて未処理下水中および処理水中の腸管系ウイルス濃度分布をそれぞれ推定し、その分布の比から下水処理システムにおける腸管系ウイルス除去効率を確率密度分布として得るための方法論を確立した。また本章では、推定された腸管系ウイルス除去効率分布の精度を評価するために、人工的に生成された左側打ち切りデータを使用し、推定された分布と人工左側打ち切りデータを生成した真の分布を比較し、推定精度を評価した。

3.2 研究方法

3.2.1 腸管系ウイルス除去効率のベイジアンモデリング

本研究で用いるベイズ推定モデルは、不検出データに定量下限値やゼロなどの特定の値を代入することなく、検出・不検出すべてのデータが対数正規分布に従うことを仮定し、ウイルス濃度分布を推定する手法である(図 3-1) (Kato et al., 2013)。ベイズ推定モデルの尤度関数には切断対数正規分布(Truncated log-normal distribution: TLN) (Eq. 3-1) が組み込まれており、ウイルス定量データはタプル関数 $X = \{(x_i, y_i)\}_{i=1}^n$ として定義される。ここで、変数 x および y はそれぞれ i 番目に観測されたウイルス定量データとサンプルの検出・非検出を示すベルヌーイ確率変数 ($y = 1$: 検出, $y = 0$: 非検出) を、変数 n は定量データの全サンプル数を表している。タプル関数は i 番目の定量下限値を表す変数 θ_i を有しており、ウイルス定量データ x とベルヌーイ確率変数 y の个数 (例; $1 = 8$ 個、 $0 = 4$ 個) をもとに、条件付き確率密度分布を推定する (Eq. 3-2 および Eq. 3-3)。

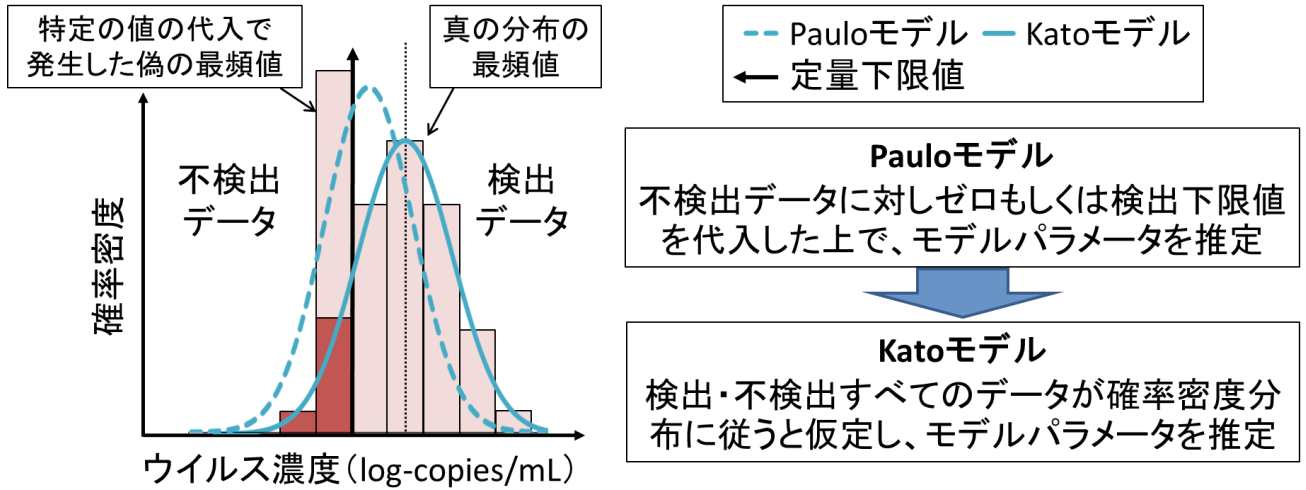


図 3-1 Paulo モデルと Kato モデルのウイルス濃度分布推定の原理の比較

○切断対数正規分布

$$TLN(c; \mu, \beta^{-1}, \theta) = \frac{\sqrt{\beta}}{(1 - \varphi(\sqrt{\beta}(\theta - \mu)))\sqrt{2\pi} \ln(10) x} \times \exp\left(-\frac{\beta}{2}(\log_{10}(x) - \mu)^2\right)$$

(Eq. 3-1)

○ベルヌーイ確率変数

$$y = 1 \text{ のとき、 } (1 - \varphi(\sqrt{\beta}(\theta - \mu)))$$

(Eq. 3-2)

$$y = 0 \text{ のとき、 } \varphi(\sqrt{\beta}(\theta - \mu))$$

(Eq. 3-3)

ここで、 φ は標準正規分布の累積密度関数である。切断対数正規分布に含まれる 2 つの未知のモデルパラメータ μ (平均) と β (精度) は、周辺事後分布 $(\mu, \beta | X)$ (Eq. 3-4) から推定される。

$$p(X|\mu, \beta) = \prod_i^n \left(\varphi(\sqrt{\beta}(\theta_i - \mu)) \right)^{1-y_i} \times (1 - \varphi(\sqrt{\beta}(\theta_i - \mu)))^{y_i} TLN(x_i; \mu, \beta^{-1}, \theta_i)^{y_i} \quad (\text{Eq. 3-4})$$

本研究では、周辺事後分布 $(\mu, \beta | X)$ から未知のモデルパラメータ μ と β を推定するために、既往の研究で報告されている事前分布 $\mu \sim N(0, 100)$ および $\beta \sim \text{Gam}(0.01, 0.01)$ を用いる。ここで、正規分布 $N(m, v)$ およびガンマ分布 $\text{Gam}(a, b)$ は平均 m と分散 v 、および形状母数 a と尺度母数 b によりそれぞれ定義される。下水中ウイルス濃度の事後予測分布 $P_{\text{pred}}(x_{\log} | X)$ は、周辺事後分布より得られたモデルパラメータ μ と β をもとに推定された。したがって、下水中ウイルス濃度 $X_{\log}$ の確率密度分布は、次式 (Eq. 3-5) により表される。

$$P_{\text{pred}}(x_{\log} | X) = \int N(x_{\log}; \mu, \beta^{-1}) p(\mu, \beta | X) d\mu d\beta \quad (\text{Eq. 3-5})$$

ウイルス除去効率分布は、未処理下水および処理水の事後予測分布の対数比分布 $p(r | X_{\text{inf}}, X_{\text{eff}})$ として与えられる。ここで、変数 X_{inf} および X_{eff} は、未処理下水および処理水のウイルス濃度データをそれぞれ表す。

3.2.2 腸管系ウイルス濃度の人工左側打ち切りデータの生成

3.2.1 で構築した統計学的アプローチにより得られた対数比分布の推定精度を評価するために、始めに未処理下水および処理水の人工左側打ち切りデータをそれぞれ生成し、人工左側打ち切りデータを用いて得られた対数比分布と、人工左側打ち切りデータを生成した真の分布を用いて得られた対数比分布の類似度を算出した。人工左側打ち切りデータの真の分布は、対数正規分布 $LN(X; \mu; \beta; \infty)$ として与えられた。未処理下水および処理水の人工左側打ち切りデータは、データ群のシーケンス番号 $i = 1, \dots, 100$ において切断対数正規分布から得られた総データ数 n 個のウイルス濃度データに対し、任意の検出データ数 n_p が得られるように生成された。具体的には、総データ数 $n = 12, 18, 24$ 個の未処理下水のウイルス濃度データを $LN(X_{\text{inf}}; 4.0; 1.0; \infty)$ によりそれぞれ 100 個ずつ生成し、任意の検出データ数 $n_p = 1, 2, \dots, n$ 個の打ち切りデータ群 $X_{1,1}[n, n_p], \dots, X_{1,100}[n, n_p]$ が得られるように検出下限値 $\theta_1, \dots, \theta_n$ を設定した。次いで、総データ数 $n = 12, 18, 24$ 個の処理水のウイルス濃度データを $LN(X_{\text{eff}}; 1.0; 1.0; \infty)$ によりそれぞれ 100 個ずつ生成し、同様の方法で打ち切りデータ群 $X_{2,1}[n, n_p], \dots, X_{2,100}[n, n_p]$ を生成した。次いで、 $i = 1, \dots, 100$ に対し n^2 の対数比分布 $p(y | X_{1,i}[n, 1], X_{2,i}[n, 1]), p(y | X_{1,i}[n, 1], X_{2,i}[n, 2]), \dots, p(y | X_{1,i}[n, n], X_{2,i}[n, n])$ を得た。

3. 2. 3 統計解析

先述 (3. 2. 2) した対数比分布間の類似度の算出には、確率密度分布の類似度を表す尺度であるバタチャリア係数を用いた。バタチャリア係数は、常に 0~1 の範囲で変動し、最大値 1 に近いほど確率密度分布間の類似度が高いことを示している (Bhattacharya, 1943; Jones, 2015; Kazama et al., 2010)。本研究では、バタチャリア係数を次式 (Eq. 3-6) により定義した。

$$BC = \int p(r|X_{inf}, X_{eff})p_{true}(r)dr \quad (Eq. 3-6)$$

ここで、 $p_{true}(r)$ は未処理下水および処理水の人工左側打ち切りデータの真の分布 [LN (X_{inf} ; 4.0; 1.0; ∞), LN (X_{eff} ; 1.0; 1.0; ∞)] の対数比分布である。

上述したように、バタチャリア係数は最大値 1 に近いほど確率密度分布間の類似度が高いことを示しているものの、「バタチャリア係数の数値がある一定以上であることが望ましい」などの絶対的基準が存在しない。そこで本研究では、未処理下水および処理水の人工左側打ち切りデータの検出率がともに 100% のときに、推定された事後予測分布および対数比分布の精度が極めて高い、すなわち真の分布に限りなく近似すると仮定した。本研究では、Kruskal-Wallis 検定 (ノンパラメトリック法による一元要因分散分析) (Eq. 3-7) により、未処理下水および処理水の総データ数が 12 個、且つ検出率がともに 100% のときに得られたバタチャリア係数を評価基準として、それ以外の条件で得られたバタチャリア係数との統計的有意差を検定した。なお、Kruskal-Wallis 検定の有意水準は、 $\alpha = 0.01$ とした。

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^c \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1) \quad (Eq. 3-7)$$

同順位のデータが存在する場合は、次式 (Eq. 3-8) により検定統計量 H を補正する。

$$H_0 = \frac{H}{1 - \sum(t_i^3 - t_i)/(N^3 - N)} \quad (Eq. 3-8)$$

ここで、 N は全体のデータ総数、 C はデータ群の数、 $\sum R_i$ は各データ群における順位、 n_i は各データ群におけるデータ総数、 t_i は i 番目 (i 位) における同順位のデータ数である。

本研究では、Kruskal-Wallis 検定を行う前に、バタチャリア係数のデータ外れ値 (outliers)

と考えられる数値を、四分位範囲（Interquartile Range: IQR）を用いて除外した。IQR は、箱ひげ図における 25%tile 値と 75%tile 値の間の距離であり、第 1 分位点および第 3 四分位点から $1.5 \times \text{IQR}$ 以上離れている数値を外れ値とした。

3.3 研究結果

未処理下水および処理水の腸管系ウイルス濃度の人工左側打ち切りデータ群は、対数正規分布 $\text{LN}(X_{\text{inf}}; 4.0; 1.0; \infty)$ および $\text{LN}(X_{\text{eff}}; 1.0; 1.0; \infty)$ に従って、データ総数 $n = 12, 18, 24$ に対しそれぞれ 100 個の人工左側打ち切りデータ群 ($i = 1, \dots, 100$) が得られるように生成された。生成された 100 個の人工左側打ち切りデータ群は、それぞれ任意の検出データ数 $n_p = 1, 2, \dots, n$ を含み、144 通り (12×12)、324 通り (18×18)、576 通り (24×24) のすべての検出データの組合せに対し、バタチャリア係数がそれぞれ 100 個ずつ得られた。

データ総数 $n = 12$ のときに得られた 100 個のバタチャリア係数のパーセンタイル値（5%tile 値、25%tile 値、50%tile 値、75%tile 値）を図 3-2 に示す。上述したように、 $n = 12$

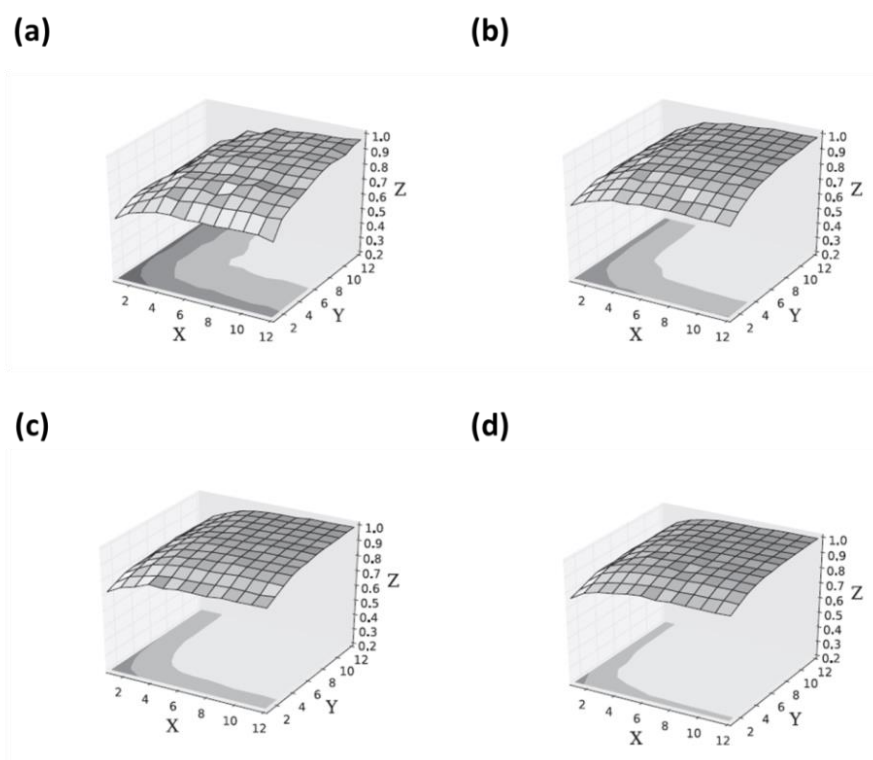


図 3-2 未処理下水および下水処理水のデータ総数がそれぞれ $n = 12$ であるときの人工左側打ち切りデータから得られたバタチャリア係数: (a) 5%tile 値、(b) 25%tile 値、(c) 50%tile 値、(d) 75%tile 値。X 軸および Y 軸は未処理下水および処理下水中におけるそれぞれの検出データ数、Z 軸はバタチャリア係数を示している。底面の等高線は、内側からそれぞれ 0.9、0.8 および 0.7 を示す。

では、100 個のバタチャリア係数が 144 セット得られた。図 3-2 より、バタチャリア係数の値は、未処理下水中および処理水中の検出データ数の増加に伴い上昇する傾向にあることが認められた。先述 (3.2.3) したように、バタチャリア係数は確率密度分布間の類似度を表す統計量であることから、言い換えれば、未処理下水中および処理水中のウイルス濃度の検出データ数が増加することにより、対数比分布の推定精度が上昇することが示された。

IQR に基づいて外れ値を除外したバタチャリア係数を図 3-3a に示す。先述 (3.2.3) したように、本研究では、未処理下水および処理水の人工左側打ち切りデータの検出率がともに 100% であるときに得られたバタチャリア係数を評価基準とし、Kruskal-Wallis 検定により統計学的有意差が認められなかった検出データの組合せの最小値を、ベイズ推定モデルを用いた下水処理システムにおける腸管系ウイルス除去効率の推定に必要な検出データ数の組合せとして定義した。Kruskal-Wallis 検定の結果より、検出率 100% の組合せを除く 143 通りの検出データの組合せの中から、10 通りの組合せから得られたバタチャリア係数と検出率 100% の組合せから得られたバタチャリア係数の間で統計学的有意差が認められなかった (図 3-3b)。また、統計学的有意差が認められなかった検出データ数の組合せの内、検出データ数および検出率の組合せの最小値は、それぞれ (12, 9) および (100%, 75%) であった。

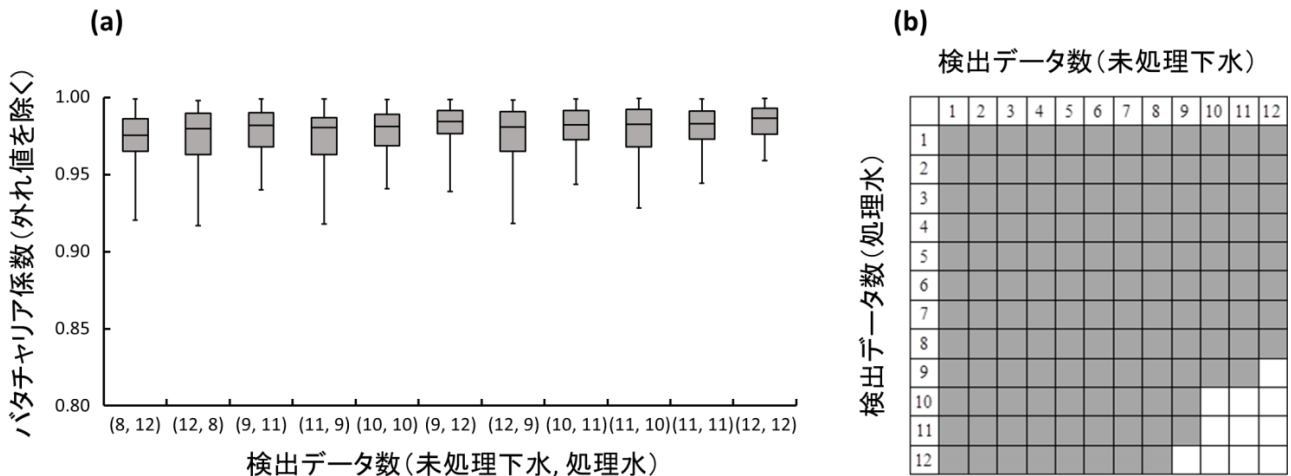


図 3-3 未処理下水および下水処理水のデータ総数がそれぞれ $n = 12$ であるときの人工左側打ち切りデータから得られたバタチャリア係数: (a) 四分位範囲 (IQR) に基づいて外れ値を除外したバタチャリア係数の箱ひげ図、(b) 未処理下水および下水処理水の検出データの組合せ。白色および灰色のマスは、Kruskal-Wallis 検定により統計学的有意差が認められなかった検出データの組合せ、および統計学的有意差が認められた検出データの組合せをそれぞれ示す。

データ総数 $n = 18$ のときに得られた 100 個のバタチャリア係数のパーセンタイル値 (5%tile 値、25%tile 値、50%tile 値、75%tile 値) および外れ値を除外したバタチャリア係数をそれぞれ図 3-4 および図 3-5a に示す。データ総数 $n = 18$ では、100 個のバタチャリア係数が 323 セット得られた。図 3-5a より、 $n = 18$ の未処理下水および処理水の人工左側打ち切りデータの検出率がともに 100%である場合では、 $n = 12$ のときと比較して得られるバタチャリア係数の値が比較的高いことが示された。本研究では、 $n = 12$ の未処理下水および処理水の人工左側打ち切りデータの検出率がともに 100%であるときに得られた対数比分布の推定精度が高いとみなし、そのときに得られたバタチャリア係数を以降の解析 ($n = 18$ 、 $n = 24$ の場合) においても評価基準として利用できるものとした。具体的には、 $n = 18$ のときに得られたバタチャリア係数 323 セットと $n = 12$ のときの検出率 100%の組合せから得られたバタチャリア係数の間における統計学的有意差を順次検定し、統計学的有意差が認められなかった $n = 18$ の検出データの組合せの最小値を必要な検出データ数および検出率として定義

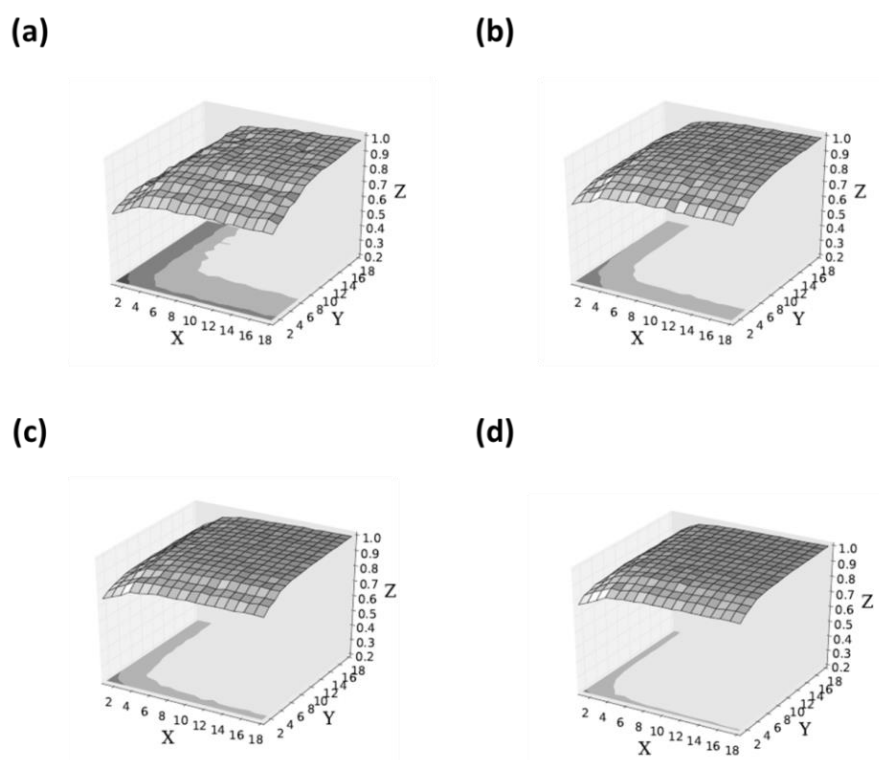


図 3-4 未処理下水および下水処理水のデータ総数がそれぞれ $n = 18$ であるときの人工左側打ち切りデータから得られたバタチャリア係数: (a) 5%tile 値、(b) 25%tile 値、(c) 50%tile 値、(d) 75%tile 値。X 軸および Y 軸は未処理下水および処理下水中におけるそれぞれの検出データ数、Z 軸はバタチャリア係数を示している。底面の等高線は、内側からそれぞれ 0.9、0.8 および 0.7 を示す。

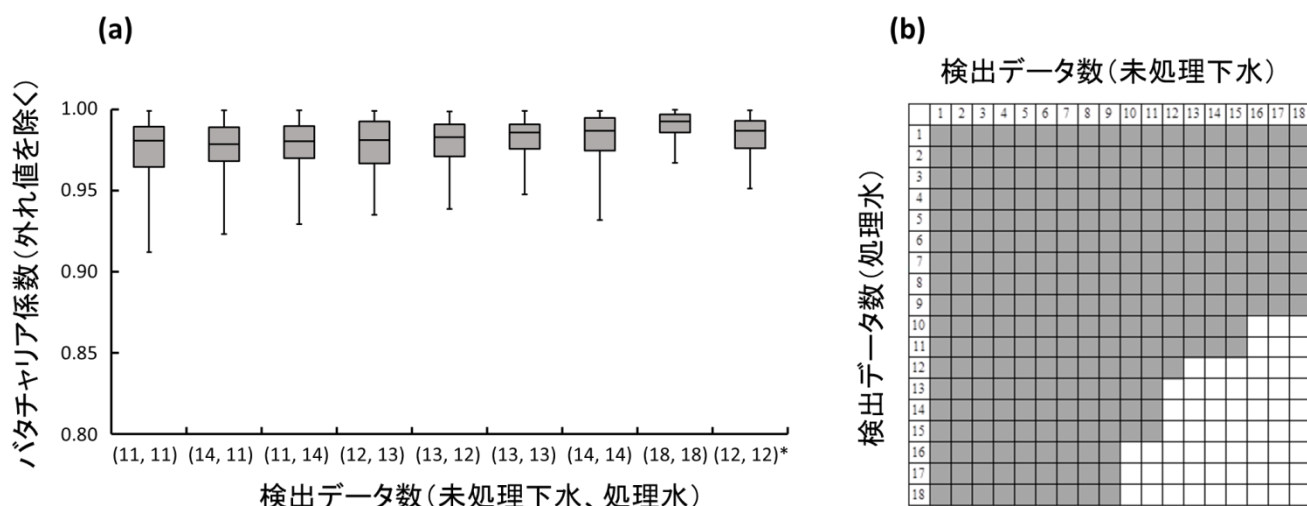


図 3-5 未処理下水および下水処理水のデータ総数がそれぞれ $n = 18$ であるときの人工左側打ち切りデータから得られたバタチャリア係数: (a) 四分位範囲 (IQR) に基づいて外れ値を除外したバタチャリア係数の箱ひげ図、(b) 未処理下水および下水処理水の検出データの組合せ。白色および灰色のマスは、Kruska-Wallis 検定により統計学的有意差が認められなかった検出データの組合せ、および統計学的有意差が認められた検出データの組合せをそれぞれ示す。

した。結果として、 $n = 18$ のときの 323 通りの検出データの組合せの中から、60 通りの組合せから得られたバタチャリア係数と、 $n=12$ のときの検出率 100%の組合せから得られたバタチャリア係数の間で統計学的有意差が認められなかった (図 3-5b)。また、統計学的有意差が認められなかった検出データ数の組合せの内、検出データ数および検出率の組合せの最小値は、それぞれ (16, 10) および (89%, 56%) であった。

データ総数 $n = 24$ のときに得られた 100 個のバタチャリア係数のパーセンタイル値（5%tile 値、25%tile 値、50%tile 値、75%tile 値）および外れ値を除外したバタチャリア係数をそれぞれ図 3-6 および図 3-7a に示す。データ総数 $n = 24$ では、100 個のバタチャリア係数が 576 セット得られた。 $n = 24$ の場合においても、 $n = 12$ の未処理下水および処理水の人工左側打ち切りデータの検出率がともに 100%であるときに得られたバタチャリア係数を Kruskal-Wallis 検定における評価基準として使用した。Kruskal-Wallis 検定の結果より、検出率 100%の組合せを除く 576 通りの検出データの組合せの中から、201 通りの組合せから得られたバタチャリア係数と検出 100%の組合せから得られたバタチャリア係数の間で統計学的有意差が認められなかった（図 3-7b）。また、統計学的有意差が認められなかった検出データ数の組合せの内、検出データ数および検出率の組合せの最小値は、それぞれ（21, 8）および（89%, 56%）であった。

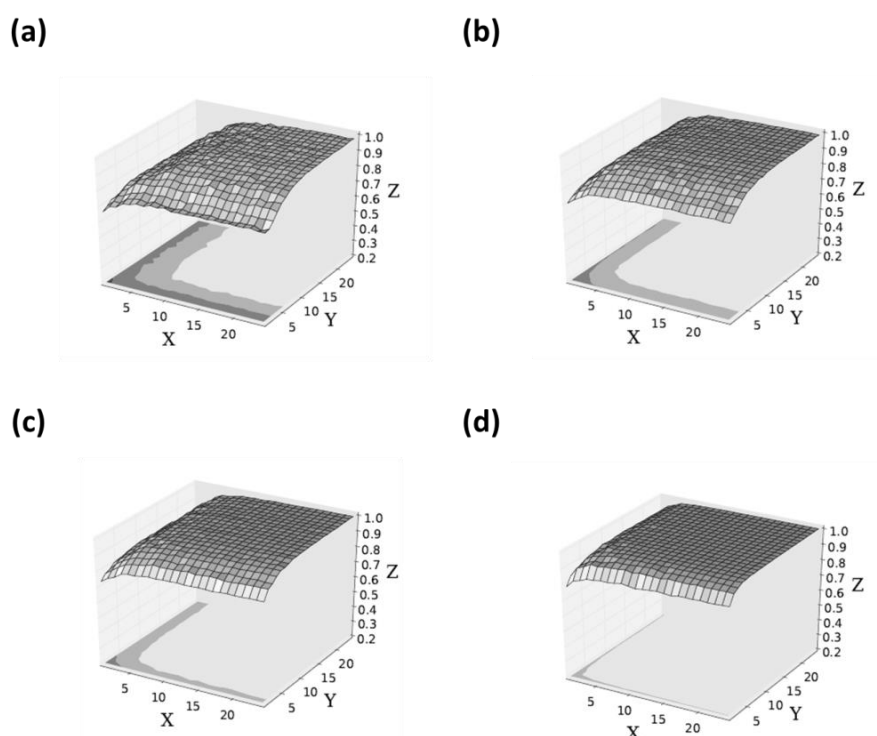


図 3-6 未処理下水および下水処理水のデータ総数がそれぞれ $n = 24$ であるときの人工左側打ち切りデータから得られたバタチャリア係数: (a) 5%tile 値、(b) 25%tile 値、(c) 50%tile 値、(d) 75%tile 値。X 軸および Y 軸は未処理下水および処理下水中におけるそれぞれの検出データ数、Z 軸はバタチャリア係数を示している。底面の等高線は、内側からそれぞれ 0.9、0.8 および 0.7 を示す。

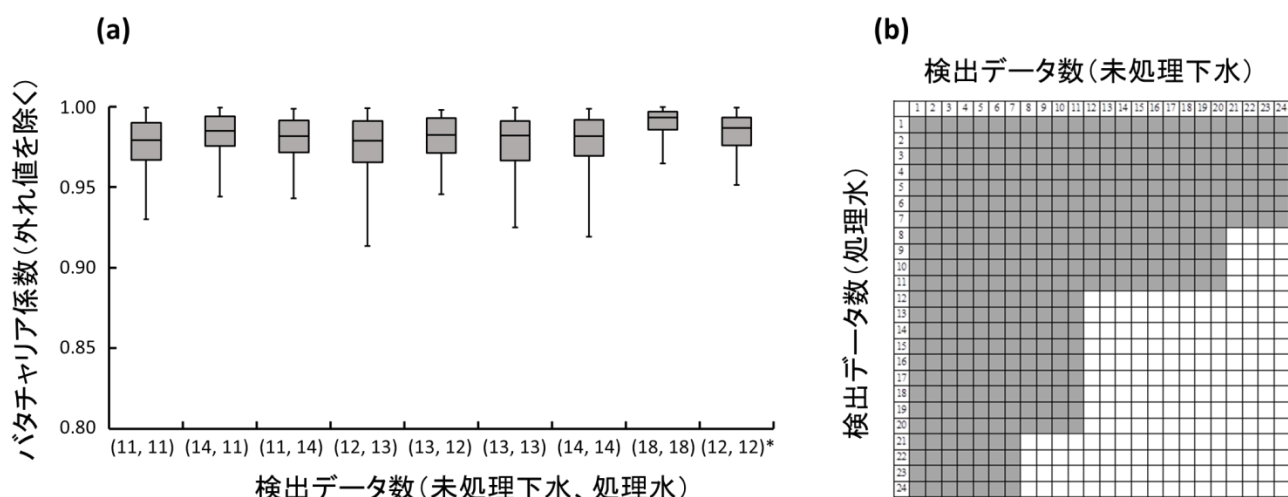


図3-7 未処理下水および下水処理水のデータ総数がそれぞれ $n = 24$ であるときの人工左側打ち切りデータから得られたバタチャリア係数: (a) 四分位範囲 (IQR) に基づいて外れ値を除外したバタチャリア係数の箱ひげ図、(b) 未処理下水および下水処理水の検出データの組合せ。白色および灰色のマスは、Kruska-Wallis 検定により統計学的有意差が認められなかった検出データの組合せ、および統計学的有意差が認められた検出データの組合せをそれぞれ示す。

3.4 考察

本章では、下水再生システムにおける腸管系ウイルス除去効率のより正確な評価を目的として、ベイズ推定モデルを用いて得られた未処理下水中および処理水中の腸管系ウイルス濃度分布の比から、腸管系ウイルス除去効率を確率密度分布として得るための確率論を確立した。また本章で確立した手法により得られたウイルス除去効率分布 (対数比分布) の推定精度を評価するために、人工的に生成した腸管系ウイルス濃度の左側打ち切りデータから対数比分布を推定し、左側打ち切りデータを生成した真の分布との類似度をバタチャリア係数により評価した。データ総数 $n = 12$ のときに未処理下水および処理水の左側打ち切りデータにおいて必要とされる検出データ数および検出率の組合せの最小値は、それぞれ (12, 9) および (100%, 75%) であった (図 3-3b)。 $n = 24$ の場合、未処理下水および処理水の左側打ち切りデータにおいて必要とされる検出データ数および検出率の組合せの最小値は、それぞれ (21, 8) および (88%, 33%) であった (図 3-7b)。対数比分布の推定に必要とされる検出率の組合せの最小値は、データ総数の増加に伴い減少する傾向を示した。対数比分布の推定に必要とされる検出データ数の組合せの最小値については、処理水中で必要とされる検出データ数がデータ総数の変化によらずほぼ一定であることが示された。以上のことから、本章で確立した腸管系ウイルス除去効率の推定手法では、腸管系ウイルスの検出率よりも検出データ数に依存することが示唆された。

下水再生システムの腸管系ウイルス除去の原理は極めて複雑であり、先行研究において知見の蓄積が試みられている。Miura (2005) らは、下水処理システムにおける腸管系ウイルス除去効率が下水処理ユニットの運転条件や腸管系ウイルスの種類によって異なることを示している(Miura et al., 2015)。本章で構築した腸管系ウイルス除去効率分布の推定手法は、除去効率の推定に際し腸管系ウイルス濃度の定量値のみを必要とすることから、下水処理プロセスの運転条件および形状、もしくは腸管系ウイルスの種類などに依存することなく腸管系ウイルス除去効率分布を推定することが可能である。他方で、本手法では腸管系ウイルス除去効率分布の形状を推定するに際し、腸管系ウイルスの検出・不検出の頻度が重要なパラメータとなり、その頻度は定量下限値に依存する。

本研究で採用したベイズ推定モデルは、欠測値を含む下水中の腸管系ウイルス濃度データが対数正規分布に従うことを仮定している(Kato et al., 2013)。しかしながら、環境サンプルなどから得られた腸管系ウイルス濃度データが対数正規分布以外に従う場合には、本手法を適用できないことが課題となる。したがって、今後対数正規分布以外の確率密度分布を用いた場合におけるウイルス除去効率の推定および評価が必要になると考えられる。

3.5 結論

本章では、先行研究で開発されたベイズ推定モデルを用いて、未処理下水中および処理水中の左側打ち切りデータから腸管系ウイルス濃度分布をそれぞれ推定し、その分布の比から下水処理システムにおける腸管系ウイルス除去効率分布を確率密度分布として得た。さらに本章では、下水処理システムにおける腸管系ウイルス除去効率分布を正確に推定する上で、未処理下水中および処理水中において必要な腸管系ウイルス濃度の検出データ数および検出率を定義した。結果として、未処理下水および処理水の人工左側打ち切りデータ総数が $n = 12$ (12×12)、 18 (18×18)、 24 (24×24) である場合に必要な検出データ数の最小の組合せは、それぞれ $(12, 9)$ 、 $(16, 10)$ 、 $(21, 8)$ であり、必要な検出率の最小の組合せは、それぞれ $(100\%, 75\%)$ 、 $(89\%, 56\%)$ 、 $(88\%, 33\%)$ であった。本研究で提案する手法を用いて得られたウイルス除去効率分布の精度は、腸管系ウイルスの検出率よりも検出データ数に依存することが示唆された。

第 4 章

国内下水処理場における腸管系ウイルス 除去効率の推定

4.1 本章の目的

第 3 章では、先行研究で開発されたベイズ推定モデル(Kato et al., 2013)を用いて、より正確な下水処理性能の評価を目的とした手法を確立し、さらに下水処理システムにおける腸管系ウイルス除去効率分布を推定する上で、未処理下水中および処理水中において必要な腸管系ウイルス濃度の検出データ数を定義した(Ito et al., 2015)。そこで本章では、実下水処理場の下水サンプルから得られた腸管系ウイルスの実測値に対して、先述した方法 (3.2.1) を適用し、下水サンプル中の腸管系ウイルスの濃度分布およびその除去効率分布を推定した。下水中の腸管系ウイルス濃度データは、先行研究において国内下水処理場 4 ヶ所の下水サンプル（未処理下水、二次処理水および塩素消毒水）から得られたノロウイルス genogroup I (NoV GI)、ノロウイルス genogroup II (NoV GII) およびアデノウイルス (AdV) の定量値を用いた(Katayama et al., 2008)。また本章では、各下水処理場の下水処理ユニットごと（二次処理、塩素消毒）に NoV GI、NoV GII および AdV の除去効率分布をそれぞれ推定し、各下水処理場の二次処理間、塩素消毒間もしくは下水処理ユニットのウイルス種間における除去効率の差を、統計学的手法を用いて検定した。

4.2 研究方法

4.2.1 本章で用いた腸管系ウイルス濃度の左側打ち切りデータ

腸管系ウイルスの左側打ち切りデータは、先行研究で報告されている 4 ヶ所の国内下水処理場（表 4-1）の未処理下水、二次処理水および塩素消毒水から得られた NoV GI、NoV GII および AdV の定量値を用いた(Katayama et al., 2008)。未処理下水中、二次処理水中および塩素処理水中の NoV GI、NoV GII および AdV の定量データを表 4-2 に示す。本研究で用いるベイズ推定モデルによるウイルス除去効率分布の推定には、処理前後のそれぞれのデータ群において一定の検出データ数を必要とするが（第 3 章、図 3-3）、先行研究で報告されている NoV GI、NoV GII および AdV の濃度データ群は本研究で用いたベイズ推定モデルを適用可能な検出データ数を有していた。先行研究において、NoV GI、NoV GII および AdV 濃度

は、最確数法（Most probable number: MPN）による検出・非検出のサンプル数に基づいた定量計算法と定量 PCR による迅速な対象遺伝子の検出を組み合わせた定量法である MPN-qPCR を用いて定量された。MPN 法は、サンプル中の微生物濃度がポアソン分布に従うことを仮定し、選択培地などに段階的に希釈したサンプルを接種することで、サンプルの希釈率と微生物の増殖が認められた培地の数（陽性数）から最確数表に基づいて微生物濃度を推定する手法である。先行研究(Katayama et al., 2008)では、AdV、NoV GI および NoV GII の DNA・cDNA サンプルから 10 倍段階希釈系列を作製し、各希釈段階のサンプルを 3 反復（in triplicate）の qPCR に供した後、3 反復すべてが陰性（対象遺伝子の増幅が認められない）となる希釈段階を求めた。最終的に、サンプルの希釈率および各希釈段階における陽性（対象遺伝子の増幅が認められる）・陰性の数から最確数表により MPN を求め、下水サンプル中の NoV GI、NoV GII および AdV 濃度を推定した。また、先行研究では PCR における腸管系ウイルスの検出単位として、PCR 検出単位（PCR detection unit: PDU）を採用している。

表 4-1 対象とした国内下水処理場の概要
(Katayama et al., 2008 をもとに作成)

下水処理場	所在地	水理学的滞留時間 (hr)	流域面積 (km ²)	流域人口 (人)	処理流量 (m ³ /day)
A ^a	大阪府	8.1	25	290,000	73,000
B ^a	京都府	8.1	81	770,000	571,000
C ^a	埼玉県	9.3	44	297,000	121,000
D ^a	東京都	14.1	35	63,000	28,000

a. 本研究では、各下水処理場を A、B、C、D として定義（Katayama et al., 2008 では、A、B、C、E としてそれぞれ定義されている）

表 4-2 下水サンプル（未処理下水、二次処理水および塩素消毒水）から得られたノロウイルス genogroup I（NoV GI）、ノロウイルス genogroup II（NoV GII）およびアデノウイルス（AdV）の定量データ（Katayama et al., 2008 をもとに作成）

サンプル	ウイルス	下水処理場	検出サンプル数 (検出率)	対数平均	対数標準偏差	定量値の範囲 (log-PDU/mL)
未処理下水	NoVGI	A	11/12 (92%)	1.3	0.9	0.26~2.74
		B	12/12 (100%)	1.4	1.2	-0.36~3.12
		C	12/12 (100%)	1.7	0.8	0.44~3.12
		D	12/12 (100%)	1.7	1.0	0.44~3.74
	NoVGII	A	12/12 (100%)	1.2	0.8	0.04~2.46
		B	12/12 (100%)	1.6	0.9	-0.05~3.12
		C	12/12 (100%)	1.7	0.6	1.05~3.12
		D	12/12 (100%)	2.0	0.9	0.76~3.74
	AdV	A	12/12 (100%)	2.4	0.6	1.53~3.19
		B	12/12 (100%)	2.0	0.5	1.11~3.19
		C	12/12 (100%)	2.6	0.5	1.53~3.51
		D	12/12 (100%)	2.8	1.0	0.51~3.81
二次処理水	NoVGI	A	12/12 (100%)	0.2	1.2	- 1.36~2.12
		B	12/12 (100%)	0.4	0.8	- 0.96~1.74
		C	12/12 (100%)	0.3	0.8	- 1.43~1.12
		D	11/12 (92%)	0.0	0.7	- 0.96~1.46
	NoVGII	A	10/12 (83%)	-0.1	0.9	-1.36~1.12
		B	12/12 (100%)	0.2	0.8	- 1.36~1.12
		C	12/12 (100%)	-0.1	0.9	-1.36~1.46
		D	12/12 (100%)	-0.2	0.8	- 1.36~1.12
	AdV	A	12/12 (100%)	0.8	0.7	-0.22~2.19
		B	12/12 (100%)	1.0	0.7	-0.53~1.81
		C	12/12 (100%)	1.2	0.7	0.53~2.81
		D	11/12 (92%)	1.0	0.7	0.11~2.19
塩素処理水	NoVGI	A	12/12 (100%)	-0.2	0.9	- 1.36~1.12
		B	12/12 (100%)	0.2	0.7	- 0.96~1.46
		C	12/12 (100%)	-0.1	0.8	- 1.14~1.46
		D	11/12 (92%)	0.1	0.9	- 0.96~1.46
	NoVGII	A	10/12 (83%)	-0.2	0.7	-1.43~0.74
		B	11/12 (91%)	0.3	0.8	- 0.96~1.74
		C	12/12 (100%)	-0.4	0.9	-1.36~1.46
		D	12/12 (100%)	-0.5	0.7	-1.43~0.74
	AdV	A	12/12 (100%)	0.8	0.4	0.11~1.53
		B	12/12 (100%)	1.1	1.0	-0.98~2.53
		C	12/12 (100%)	1.1	0.5	0.11~1.53
		D	12/12 (100%)	0.8	0.6	-0.68~1.53

4.2.2 ベイズ推定手法を用いた腸管系ウイルス対数除去効率分布の推定

本章では、先述した方法 (3.2.1) に従って未処理下水、二次処理水および塩素処理水中の AdV、NoVGI および NoV GII 濃度を確率密度分布として推定した。未処理下水中の NoV GII 濃度分布として採用する確率密度分布を選択するために、赤池情報量基準 (Akaike's information criterion: AIC、Eq. 4-1) およびベイズ情報量基準 (Bayesian Information Criterion: BIC、Eq. 4-2) を用いて (Vrieze, 2012)、微生物の濃度データを表すために比較的多く用いられている 3 種類の確率密度分布 (正規分布、対数正規分布およびガンマ分布) (Haas et al., 2014) の適合性評価を行った。AIC と BIC は、統計モデルの「予測の良さ」を表すモデル選択基準であり、AIC と BIC の統計量が最小となる統計モデルを対象とするデータ群の分布を表す上で最適なモデルの候補として選択するものである (Vrieze, 2012)。AIC と BIC の算出式 (Eq. 4-1 および Eq. 4-2) は、対象とするデータ群に対する統計モデルの「あてはまりの悪さ」を表す統計量である逸脱度 $[-2 \ln(L)$ 、最大対数尤度 $\ln(L)$ に -2 を乗じたパラメータ] が組み込まれており、原理としては逸脱度が最小となる統計モデルを最適なモデルとして逆説的に選択する (Vrieze, 2012)。

$$AIC = -2(\ln(L) - k) \quad (\text{Eq. 4-1})$$

$$BIC = -2 \ln(L) + k \ln(n) \quad (\text{Eq. 4-2})$$

ここで、 $\ln(L)$ は最大対数尤度、 k は最尤推定したパラメータ数、 n はデータ総数である。なお、AIC および BIC の算出には以下の R コードを用いた。

○AIC と BIC の算出に用いた R コードを以下に示す。

```
#Virus concentration datasets in influent, secondary effluent and chlorine disinfected effluent
conc <- c()                                #Input of virus concentration datasets
logconc <- log10(conc)                    #logarithmic virus concentration
mean <- mean (conc)                       #mean of virus concentration
logmean <- mean(logconc)                  #logarithmic mean of virus concentration
sd <- sd(conc)                            #standard deviation of virus concentration
logsd<- sd(logconc)                       #logarithmic standard deviation of virus concentration
count.data <- length(conc)                #number of virus concentration data observed

# Estimation of logarithmic maximum likelihood estimator in normal distribution
kn <- 2                                   #the number of parameters in normal distribution
Ln <- function(arg){
likelihoodn <- 1/sqrt(2*pi*arg[2]^2)*exp(-(conc-arg[1])^2/(2*arg[2]^2))
return(sum(log(likelihoodn)))
}
data.optn <- optim(par=c(mean, sd), Ln, control=list(fnscale=-1))
LMLEn <- data.optn$value                  #logarithmic maximum likelihood estimator for normal distribution

# Calculation of Akaike and Bayesian information criterion (AIC and BIC) for normal distribution
AICn <- -2*(LMLEn-kn)
# Akaike information criterion for normal distribution
print(AICn)
BICn <- -2*LMLEn+kn*log(count.data)
# Bayesian information criterion for normal distribution
print(BICn)

# Estimation of logarithmic maximum likelihood estimator in log-normal distribution
kln <- 2                                 #the number of parameters in log-normal distribution
Lln <- function(arg){
likelihoodln <- 1/sqrt(2*pi*arg[2]^2)*exp(-(logconc-arg[1])^2/(2*arg[2]^2))
return(sum(log(likelihoodln)))
}
data.optln <- optim(par=c(logmean, logsd), Lln, control=list(fnscale=-1))
LMLEln <- data.optln$value
#logarithmic maximum likelihood estimator for log-normal distribution
```

```
# Calculation of Akaike and Bayesian information criterion (AIC and BIC) for log-normal distribution
```

```
AICln <- -2*(LMLEln-kln)
```

```
# Akaike information criterion for log-normal distribution
```

```
print(AICln)
```

```
BICln <- -2*LMLEln+kln*log(count.data)
```

```
# Bayesian information criterion for log-normal distribution
```

```
print(BICln)
```

```
# Estimation of logarithmic maximum likelihood estimator in gamma distribution
```

```
library(MASS)
```

```
kg <- 2 #the number of parameters in gamma distribution
```

```
parameter <- fitdistr(conc,"gamma")
```

```
parameterlist <- matrix(unlist(parameter), ncol=1)
```

```
shape <- parameterlist[1]
```

```
rate <- parameterlist[2]
```

```
LMLEg <- sum(dgamma(conc, shape, rate, log=TRUE))
```

```
#logarithmic maximum likelihood estimator for gamma distribution
```

```
# Calculation of Akaike and Bayesian information criterion (AIC and BIC) for gamma distribution
```

```
AICg <- -2*(LMLEg-kg)
```

```
# Akaike information criterion for gamma distribution
```

```
print(AICg)
```

```
BICg <- -2*LMLEg+kg*log(count.data)
```

```
# Bayesian information criterion for gamma distribution
```

```
print(BICg)
```

4.2.3 統計解析

4.2.2 で得られた各下水処理場の下水処理ユニットにおける NoV GI、NoV GII および AdV 除去効率分布をもとに、統計学的手法を用いてそれぞれの統計量（平均、標準偏差、95%信頼区間）を算出した。具体的には、始めに NoV GI、NoV GII および AdV 除去効率分布をもとに 10,000 個の乱数を発生させ、それぞれのデータ群に含まれる外れ値を前章で用いた IQR に基づく手法（3.2.3）により除外した。外れ値を除外したそれぞれのデータ群からパーセンタイル値を 0%tile 値から 100%tile 値まで 1%間隔で抽出し（それぞれのデータ群から 101 個のパーセンタイル値が得られる）、抽出したパーセンタイル値をもとに平均、標準偏差および 95%信頼区間を算出した。次いで、101 個のパーセンタイル値を用いて、各下水処理場の二次処理間、塩素消毒間、もしくはウイルス種間の除去効率の統計学的有意差を、一元配置分散分析（one-way analysis of variance: ANOVA）および多重比較検定（Scheffe test）を用いて検定した。ANOVA は検定対象となるデータ群全体における統計学的有意差を検定する手法であり、Scheffe test は各データ群間における統計学的有意差を検定する手法である。ANOVA では扱うデータ群の正規性を前提としていることから、101 個のパーセンタイル値の正規性についてカイ二乗の正規性検定を用いて事前に検定した。なお、ANOVA および Scheffe test は、エクセル統計 2012（Microsoft corporation, SSRI, Tokyo, Japan）を用いて行った。

4.3 研究結果

各下水処理場（A、B、C、D）の未処理下水中、二次処理水中、塩素処理水中の NoV GI、NoV GII および AdV の濃度データ群に対するベイズ推定モデルの適合性を評価するために、正規分布、対数正規分布およびガンマ分布について AIC および BIC を算出した（表 4-3）。先述（4.2.2）したように、AIC と BIC が最小となる統計モデルが対象データ群の分布を表す上で最適なモデルの候補として選択される。AIC と BIC の結果として、下水処理場 D の塩素消毒水中の NoV GII 濃度データ群を除くすべての濃度データ群が対数正規分に適合することが示唆され、下水処理場 D の塩素消毒水中の NoV GII 濃度データ群については、ガンマ分布に適合することが示唆された（表 4-3）。本研究で用いるベイズ推定モデルでは、腸管系ウイルス濃度データ群が対数正規分布に従うことを仮定していることから（Ito et al., 2015; Kato et al., 2013）、下水処理場 D の塩素消毒水中の NoV GII 濃度データ群については以降の解析から除外した。

ベイズ推定モデルにより得られた各下水処理場の未処理下水中、二次処理水中および塩素消毒水中の NoV GI、NoV GII および AdV の濃度分布の統計量（事後平均、事後標準偏差）を表 4-4 に示す。未処理下水中の AdV 濃度の事後平均は $2.0 \sim 2.8 \log_{10}$ PDU/mL の範囲であり、NoV GI 濃度の事後平均（ $1.2 \sim 1.7 \log_{10}$ PDU/mL）および NoV GII 濃度の事後平均（ $1.3 \sim 2.0 \log_{10}$ PDU/mL）と比較して AdV が高濃度で存在することが認められた。次いで、二次処理水中

のNoV GI濃度、NoV GII濃度およびAdV濃度の事後平均は、それぞれ $-0.2 \sim 0.4 \log_{10}$ PDU/mL、 $-0.6 \sim 0.2 \log_{10}$ PDU/mL、 $0.8 \sim 1.2 \log_{10}$ PDU/mLであり、二次処理におけるNoV GI、NoV GIIおよびAdVの除去が認められた。しかしながら、塩素処理水中のNoV GI濃度、NoV GII濃度およびAdV濃度の事後平均は、それぞれ $-0.2 \sim 0.2 \log_{10}$ PDU/mL、 $-0.6 \sim 0.1 \log_{10}$ PDU/mL、 $0.8 \sim 1.1 \log_{10}$ PDU/mLであり、塩素消毒におけるNoV GI、NoV GIIおよびAdVの除去が認められなかった。他方で、NoV GI、NoV GIIおよびAdV濃度の定量データ群から直接算出した対数平均（表4-2）とベイズ推定モデルを用いて推定した事後平均（表4-4）をそれぞれ比較した結果、下水サンプルからの腸管系ウイルス検出率と平均値の差が増加することが認められた。

表 4-3 赤池情報量基準（AIC）およびベイズ情報量基準（BIC）
（青色は、最適なモデルの候補として選択される確率モデルを示す）

ウイルス	サンプル	下水処理場	AIC			BIC		
			正規分布	対数正規分布	ガンマ分布	正規分布	対数正規分布	ガンマ分布
NoVGI	未処理下水	A	148.2	32.8	125.4	146.2	30.9	123.5
		B	180.0	41.5	195.8	178.2	39.6	194.0
		C	179.0	31.0	146.8	177.2	29.1	145.0
		D	213.8	37.7	NaN ^a	212.0	35.9	NaN
	二次処理水	A	124.1	42.2	77.0	122.2	40.4	75.1
		B	104.3	31.9	74.5	102.5	30.1	72.6
		C	79.7	31.3	65.6	77.9	29.5	63.8
		D	82.3	27.7	52.0	80.4	25.7	50.1
	塩素処理水	A	69.9	34.3	42.3	68.0	32.5	40.5
		B	89.1	30.0	63.5	87.3	28.1	61.7
		C	88.7	31.6	52.8	86.8	29.8	50.9
		D	83.6	32.4	57.4	81.7	30.5	55.4
NoVGII	未処理下水	A	143.0	30.5	121.2	141.1	28.6	122.2
		B	179.1	35.3	145.9	177.3	33.5	144.1
		C	178.8	25.3	145.7	177.0	23.4	143.9
		D	213.6	34.9	NaN	211.8	33.1	NaN
	二次処理水	A	60.2	28.6	39.4	58.3	26.8	37.6
		B	73.7	31.6	62.0	71.8	29.8	60.1
		C	88.5	34.6	53.5	86.7	32.8	51.6
		D	75.7	33.0	45.1	73.8	31.1	43.3
	塩素処理水	A	46.9	25.2	33.1	44.9	23.2	30.4
		B	96.8	30.2	68.3	94.9	28.3	66.4
		C	88.9	35.6	39.7	87.1	33.8	37.9
		D	50.3	28.6	26.1	48.4	26.8	24.3
AdV	未処理下水	A	188.0	22.7	177.0	186.2	20.9	175.1
		B	182.2	22.2	156.8	180.3	20.4	155.0
		C	200.1	21.3	184.6	198.3	19.4	182.8
		D	226.0	37.3	NaN	224.2	35.5	NaN
	二次処理水	A	127.3	27.7	96.6	125.4	25.9	94.8
		B	115.0	29.7	105.0	113.2	27.9	103.2
		C	161.8	28.0	123.9	159.9	26.2	122.1
		D	118.0	25.5	100.5	116.0	23.6	98.6
	塩素処理水	A	89.4	13.9	80.0	87.5	12.0	78.1
		B	145.7	36.7	113.5	143.9	34.8	111.6
		C	97.5	18.7	96.6	95.6	16.9	94.7
		D	96.0	26.5	87.8	94.2	24.7	85.9

a. Not a Number

表 4-4 ベイズ推定により得られた各下水処理場（A、B、C、D）の未処理下水中、二次処理水中および塩素消毒水中のノロウイルス genogroup I（NoV GI）、ノロウイルス genogroup II（NoV GII）およびアデノウイルス（AdV）の濃度分布の統計量（事後平均、事後標準偏差）（下水処理場 D の塩素消毒水中の NoV GII 濃度データ群は、ガンマ分布に従うことが示唆されたため、本解析から除外）

サンプル	ウイルス	下水処理場	事後平均	事後標準偏差	95%信頼区間 ^a (下限, 上限)
未処理下水	NoVGI	A	1.2	1.4	(0.4, 2.0)
		B	1.4	1.3	(0.7, 2.2)
		C	1.7	0.9	(1.2, 2.2)
		D	1.7	1.1	(1.1, 2.4)
	NoVGII	A	1.3	0.8	(0.8, 1.7)
		B	1.6	1.0	(1.0, 2.2)
		C	1.7	0.7	(1.3, 2.1)
		D	2.0	1.0	(1.4, 2.6)
	AdV	A	2.4	0.6	(2.1, 2.7)
		B	2.0	0.6	(1.6, 2.3)
		C	2.6	0.6	(2.2, 2.9)
		D	2.8	1.1	(2.2, 3.5)
二次処理水	NoVGI	A	0.2	1.4	(-0.5, 1.0)
		B	0.4	0.9	(-0.1, 0.9)
		C	0.3	0.9	(-0.2, 0.8)
		D	-0.2	1.1	(-0.8, 0.5)
	NoVGII	A	-0.6	1.5	(-1.4, 0.3)
		B	0.2	0.9	(-0.3, 0.7)
		C	-0.1	1.0	(-0.7, 0.5)
		D	-0.2	0.9	(-0.7, 0.3)
	AdV	A	0.8	0.8	(0.4, 1.2)
		B	1.1	0.8	(0.6, 1.5)
		C	1.2	0.8	(0.8, 1.7)
		D	0.8	1.4	(0.0, 1.6)
塩素処理水	NoVGI	A	-0.2	1.0	(-0.8, 0.3)
		B	0.2	0.8	(-0.3, 0.7)
		C	-0.1	0.9	(-0.6, 0.4)
		D	-0.1	1.3	(-0.9, 0.6)
	NoVGII	A	-0.6	1.3	(-1.3, 0.2)
		B	0.1	1.3	(-0.6, 0.8)
		C	-0.4	1.0	(-1.0, 0.2)
		D	—	—	—
	AdV	A	0.8	0.7	(0.4, 1.2)
		B	1.1	1.1	(0.4, 1.7)
		C	1.1	0.5	(0.8, 1.4)
		D	0.8	0.7	(0.4, 1.2)

a. 95%信頼区間は、事後平均および事後標準偏差をもとに算出

先述した方法 (3.2.1) により得られた各下水処理場の二次処理および塩素消毒における NoV GI、NoV GII および AdV の除去効率分布の統計量を表 4-5 と表 4-6 にそれぞれ示す。また、各下水処理場の二次処理および塩素消毒における NoV GI、NoV GII および AdV の除去効率分布をそれぞれ図 4-1(a)～(c)、図 4-3(a)～(d) と図 4-2(a)～(c)、図 4-4(a)～(d) にそれぞれ示す。次いで、各下水処理場の二次処理間、塩素消毒間もしくは各下水処理ユニットのウイルス種間における除去効率の統計学的有意差を、ANOVA と Scheffe test により検定した。抽出した 101 個のパーセンタイル値の正規性については、カイ二乗の正規性検定を用いて事前に検定した結果、すべてのパーセンタイル値のデータ群において正規性が棄却されなかった (結果は表示せず)。先述 (4.2.3) したように、本章では各下水処理場の二次処理間、塩素消毒間もしくはウイルス種全体における統計学的有意差を ANOVA と Scheffe test を用いて検定した。ANOVA の結果として、下水処理場の二次処理間において NoV GI、NoV GII および AdV の除去効率の統計学的有意差がそれぞれ認められた ($P<0.01$) [図 4-1(d)～(f)]。しかしながら、下水処理場の塩素処理槽間については、NoV GI、NoV GII および AdV すべての除去効率において統計学的有意差が認められなかった ($P\geq 0.05$) [図 4-2(d)～(f)]。ANOVA において二次処理全体の除去効率において統計学的有意差が認められたことから、次に Scheffe test を用いて各下水処理場の二次処理間の NoV GI、NoV GII および AdV の除去効率における統計学的有意差を検定した。Scheffe test の結果として、二次処理における NoV GI 除去効率では、下水処理場 A vs 下水処理場 D ($P<0.01$)、下水処理場 B vs 下水処理場 D ($P<0.01$) において統計学的有意差が認められた。二次処理における NoV GII および AdV 除去効率については、それぞれ NoV GII [下水処理場 B vs 下水処理場 D ($P<0.01$)] と AdV [下水処理場 A vs 下水処理場 B ($P<0.01$)、下水処理場 A vs 下水処理場 D ($P<0.01$)、下水処理場 B vs 下水処理場 D ($P<0.01$)] の組合せで統計学的有意差が認められた。

各下水処理場の二次処理および塩素消毒における NoV GI、NoV GII および AdV 除去効率の統計学的有意差についても同様に検定した。ANOVA の結果として、下水処理場 A および C の二次処理においてウイルス種間の除去効率に統計学的有意差が認められた (それぞれ $P<0.01$ 、 $P<0.05$) [図 4-3(e)～(h)]。次いで、Scheffe test を用いて下水処理場 A および C の二次処理における各ウイルス種間の除去効率の統計学的有意差を検定した結果、下水処理場 A [NoV GI vs NoV GII ($P<0.01$)、NoV GI vs AdV ($P<0.05$)] および下水処理場 C [NoV GII vs AdV ($P<0.01$)] の組合せで統計学的有意差が認められた [図 4-3(e)～(h)]。以上の結果より、下水処理システムの下水処理ユニット間もしくはウイルス種間において腸管系ウイルス除去効率に違いがあることが示された。

さらに本章では、各下水処理場の二次処理および塩素消毒における NoV GI、NoV GII および AdV の除去効率を対データ (paired data、同じサンプリング日から得られた処理前後のウイルス濃度データの差) から算出し、非対データ (unpaired data、処理前後のウイルス濃度分布の比) から得られた結果と比較した。なお、対データを用いたウイルス除去効率の推定には、処理前後の検出率がともに 100%の濃度データ群のみを用いた。結果として、対データと非対データから得られた NoV GI、NoV GII および AdV 除去効率の平均値には差が

認められなかった（表 4-5 および表 4-6）。他方で、非対データから推定されたウイルス除去効率の標準偏差は、対データから推定されたウイルス除去効率の標準偏差と比較して大きい値を示し（表 4-5 および表 4-6）、一例として下水処理場 B の二次処理における NoV GI 除去効率では、非対データと対データの間に標準偏差に約 $1 \log_{10}$ の差が認められた。この要因として、ベイズ推定モデルより得られた下水中のウイルス濃度分布の事後標準偏差がウイルス濃度データ群から直接算出された対数標準偏差と比較して大きい値を示したことから（表 4-2 および表 4-4）、その差が非対データと対データの間ににおけるウイルス除去効率の推定結果の差に直接影響していると推察される。

表 4-5 各下水処理場（A、B、C、D）の二次処理におけるノロウイルス genogroup I（NoV GI）、ノロウイルス genogroup II（NoV GII）およびアデノウイルス（AdV）の除去効率の統計量（対数平均、対数標準偏差、95%信頼区間）〔非対データ（処理前後の濃度分布の比）および対データ（同じサンプリング日から得られた処理前後の濃度データの差）から算出〕

ウイルス	下水処理場	未処理下水中における ウイルス検出数 (検出率)	二次処理水中における ウイルス検出数 (検出率)	非対データ(nonpaired data)			対データ(paired data)		
				対数平均	対数標準偏差	95%信頼区間 (下限, 上限)	対数平均	対数標準偏差	95%信頼区間 (下限, 上限)
NoVGI	A	11/12 (92%)	12/12 (100%)	1.0	2.0	(0.6, 1.4)	—	—	—
	B	12/12 (100%)	12/12 (100%)	1.0	1.6	(0.7, 1.3)	1.1	0.6	(0.8, 1.4)
	C	12/12 (100%)	12/12 (100%)	1.4	1.2	(1.2, 1.6)	1.4	0.6	(1.1, 1.7)
	D	12/12 (100%)	11/12 (92%)	1.9	1.6	(1.6, 2.2)	—	—	—
NoVGII	A	12/12 (100%)	10/12 (83%)	1.8	1.7	(1.5, 2.1)	—	—	—
	B	12/12 (100%)	12/12 (100%)	1.4	1.4	(1.1, 1.7)	1.4	0.5	(1.1, 1.7)
	C	12/12 (100%)	12/12 (100%)	1.8	1.2	(1.6, 2.0)	1.8	0.7	(1.4, 2.2)
	D	12/12 (100%)	12/12 (100%)	2.2	1.4	(1.9, 2.5)	2.2	0.8	(1.7, 2.7)
AdV	A	12/12 (100%)	12/12 (100%)	1.6	1.0	(1.4, 1.8)	1.6	0.6	(1.3, 1.9)
	B	12/12 (100%)	12/12 (100%)	0.9	1.0	(0.7, 1.1)	0.9	0.8	(0.5, 1.3)
	C	12/12 (100%)	12/12 (100%)	1.3	1.0	(1.1, 1.5)	1.3	0.6	(0.9, 1.7)
	D	12/12 (100%)	11/12 (92%)	2.0	1.8	(1.6, 2.4)	—	—	—

表 4-6 各下水処理場 (A、B、C、D) の塩素消毒におけるノロウイルス genogroup I (NoV GI)、ノロウイルス genogroup II (NoV GII) およびアデノウイルス (AdV) の除去効率の統計量 (対数平均、対数標準偏差、95%信頼区間) [非対データ (処理前後の濃度分布の比) および対データ (同じサンプリング日から得られた処理前後の濃度データの差) から算出] (下水処理場 D の塩素消毒水中の NoV GII 濃度データ群は、ガンマ分布に従うことが示唆されたため、本解析から除外)

ウイルス	下水処理場	二次処理水中における ウイルス検出数 (検出率)	塩素消毒水中における ウイルス検出数 (検出率)	非対データ (nonpaired data)			対データ (paired data)		
				対数平均	対数標準偏差	95%信頼区間 (下限, 上限)	対数平均	対数標準偏差	95%信頼区間 (下限, 上限)
NoVGI	A	12/12 (100%)	12/12 (100%)	0.5	1.7	(0.2, 0.8)	0.5	0.6	(0.2, 0.8)
	B	12/12 (100%)	12/12 (100%)	0.2	1.2	(0.0, 0.4)	0.2	0.5	(-0.1, 0.5)
	C	12/12 (100%)	12/12 (100%)	0.4	1.3	(0.1, 0.7)	0.4	0.6	(0.1, 0.7)
	D	11/12 (92%)	11/12 (92%)	-0.1	1.7	(-0.4, 0.2)	—	—	—
NoVGII	A	10/12 (83%)	10/12 (83%)	0.0	2.0	(-0.4, 0.4)	—	—	—
	B	12/12 (100%)	11/12 (91%)	0.1	1.6	(-0.2, 0.4)	—	—	—
	C	12/12 (100%)	12/12 (100%)	0.3	1.5	(0.0, 0.6)	0.3	0.4	(0.1, 0.5)
	D	12/12 (100%)	12/12 (100%)	—	—	—	0.3	0.4	(0.1, 0.5)
AdV	A	12/12 (100%)	12/12 (100%)	0.0	1.1	(-0.2, 0.2)	0.0	0.4	(-0.2, 0.2)
	B	12/12 (100%)	12/12 (100%)	0.0	1.4	(-0.3, 0.3)	0.0	0.6	(-0.3, 0.3)
	C	12/12 (100%)	12/12 (100%)	0.1	0.9	(-0.1, 0.3)	0.1	0.8	(-0.4, 0.6)
	D	11/12 (92%)	12/12 (100%)	0.0	1.5	(-0.3, 0.3)	—	—	—

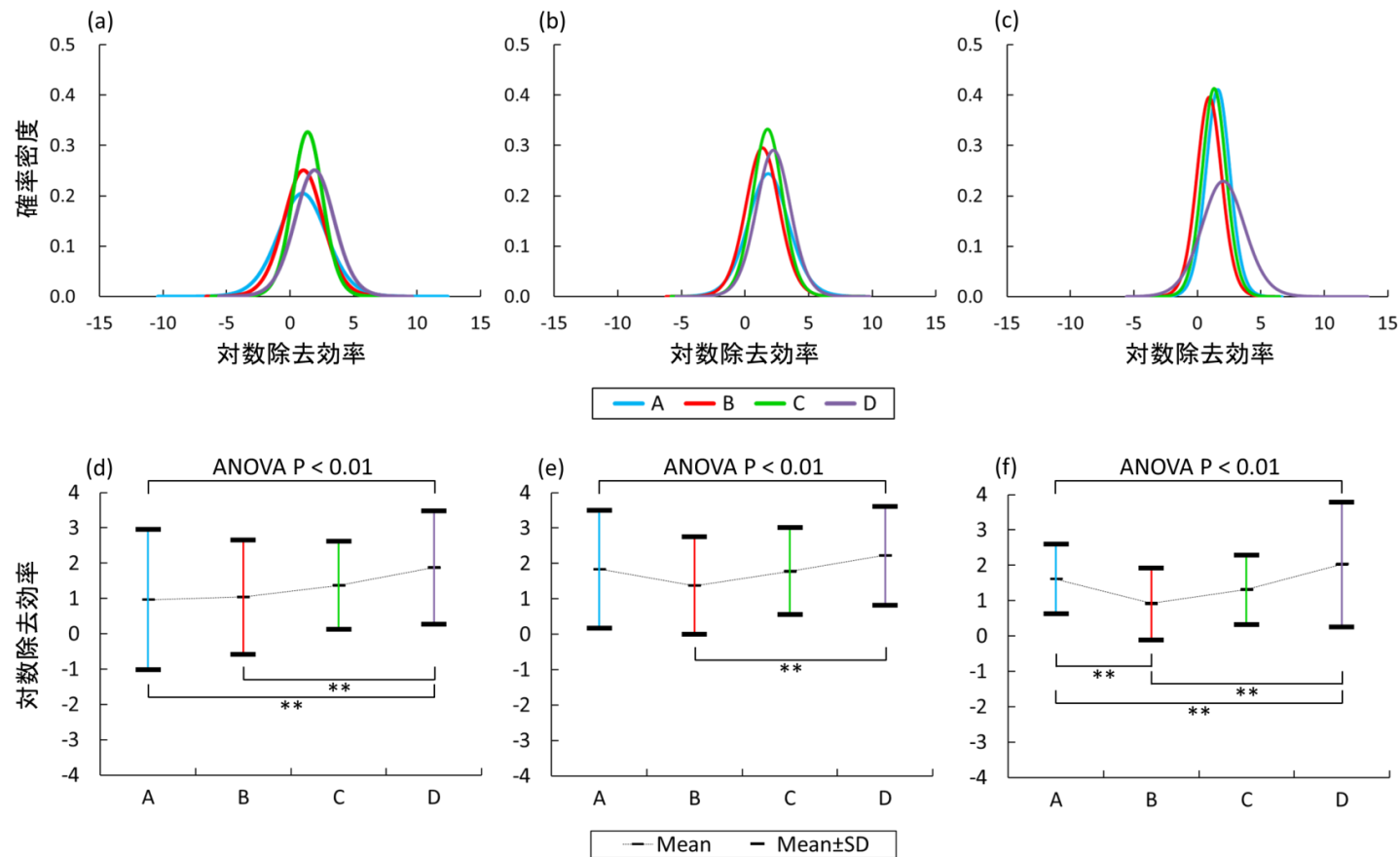


図 4-1 ベイズ推定により得られた各下水処理場 [A (青線)、B (赤線)、C (緑線)、D (紫線)] の二次処理における (a) ノロウイルス genogroup I (NoV GI)、(b) ノロウイルス genogroup II (NoV GII)、(c) アデノウイルス (AdV) の除去効率分布、および各下水処理場の二次処理間における (d) NoV GI 除去効率、(e) NoV GII 除去効率、(f) AdV 除去効率の有意差検定 [上側、一元分散分析 (ANOVA) ; 下側、多重比較検定 (Scheffe test) * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$]

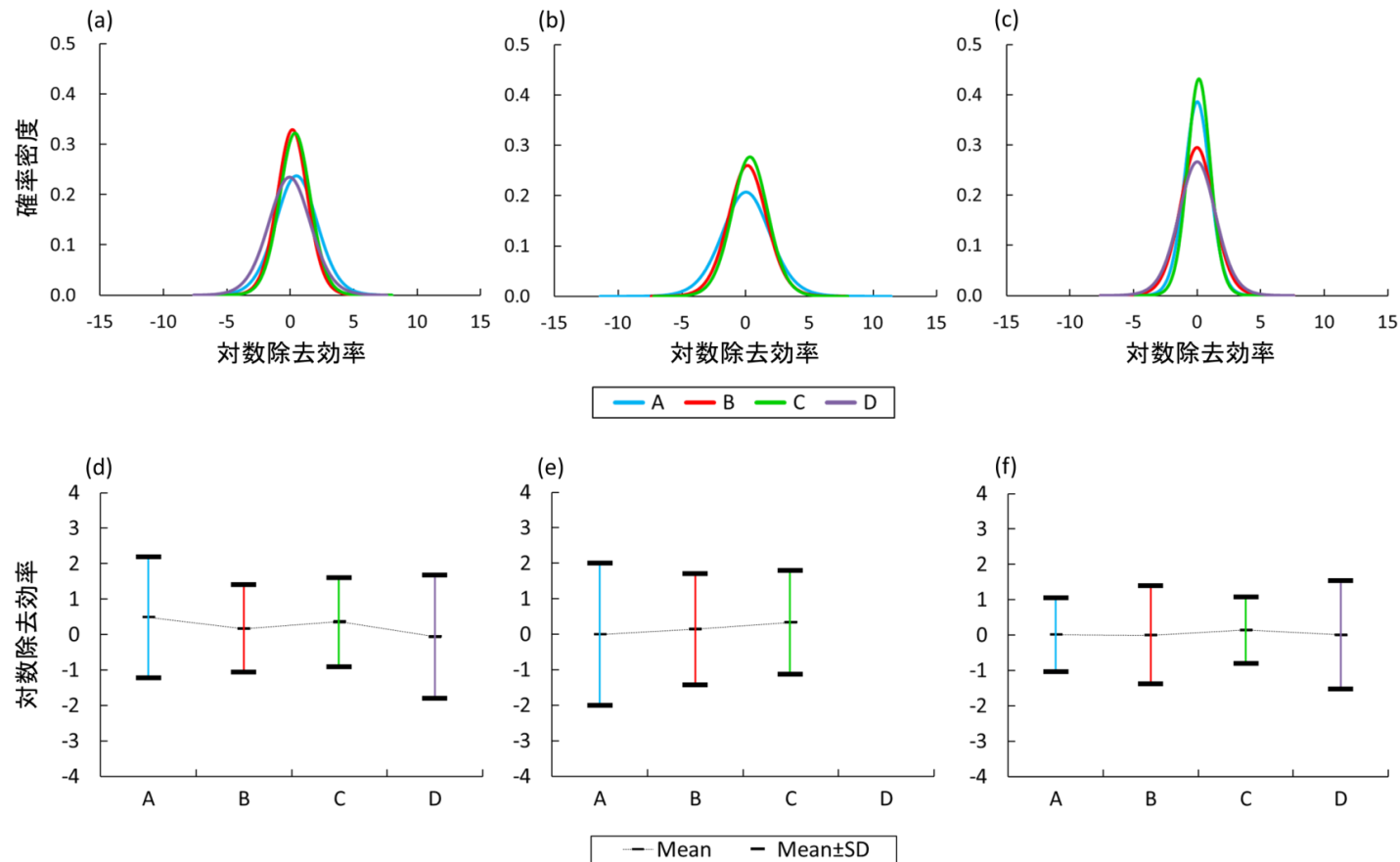


図 4-2 ベイズ推定により得られた各下水処理場 [A (青線)、B (赤線)、C (緑線)、D (紫線)] の塩素消毒における (a) ノロウイルス genogroup I (NoV GI)、(b) ノロウイルス genogroup II (NoV GII)、(c) アデノウイルス (AdV) の除去効率分布、および各下水処理場の二次処理間における (d) NoV GI 除去効率、(e) NoV GII 除去効率、(f) AdV 除去効率の有意差検定 (下水処理場 D の塩素消毒水中の NoV GII 濃度データ群は、ガンマ分布に従うことが示唆されたため、本解析から除外) [上側、一元分散分析 (ANOVA) ; 下側、多重比較検定 (Scheffe test) * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$]

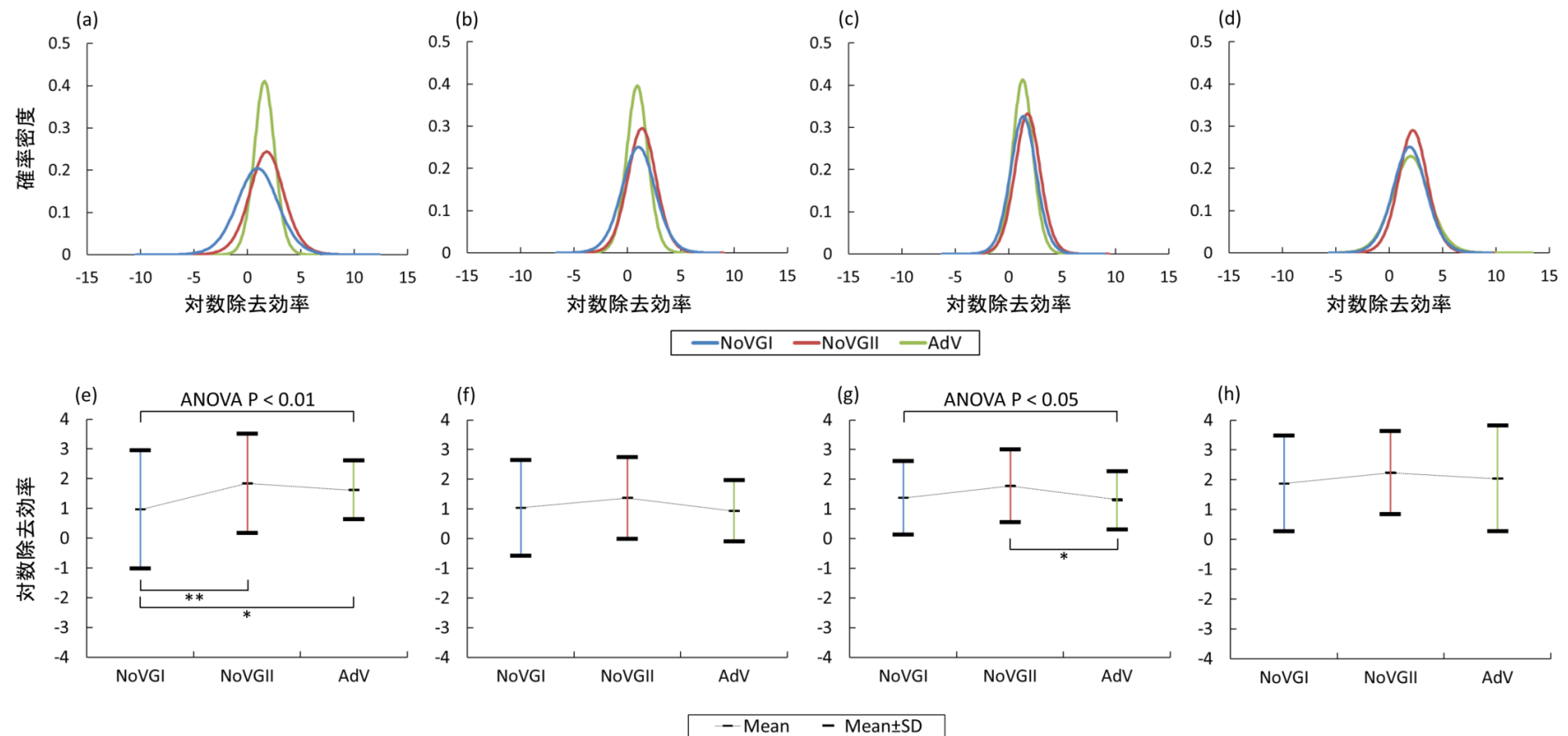


図 4-3 バイズ推定により得られた (a) 下水処理場 A、(b) 下水処理場 B、(c) 下水処理場 C、(d) 下水処理場 D の二次処理におけるノロウイルス genogroup I (NoV GI、青線)、ノロウイルス genogroup II (NoV GII、赤線)、(c) アデノウイルス (AdV、緑線) の除去効率分布、および (e) 下水処理場 A、(f) 下水処理場 B、(g) 下水処理場 C、(h) 下水処理場 D の二次処理間におけるウイルス種間の除去効率の有意差検定 [上側、一元分散分析 (ANOVA) ; 下側、多重比較検定 (Scheffe test) * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$]

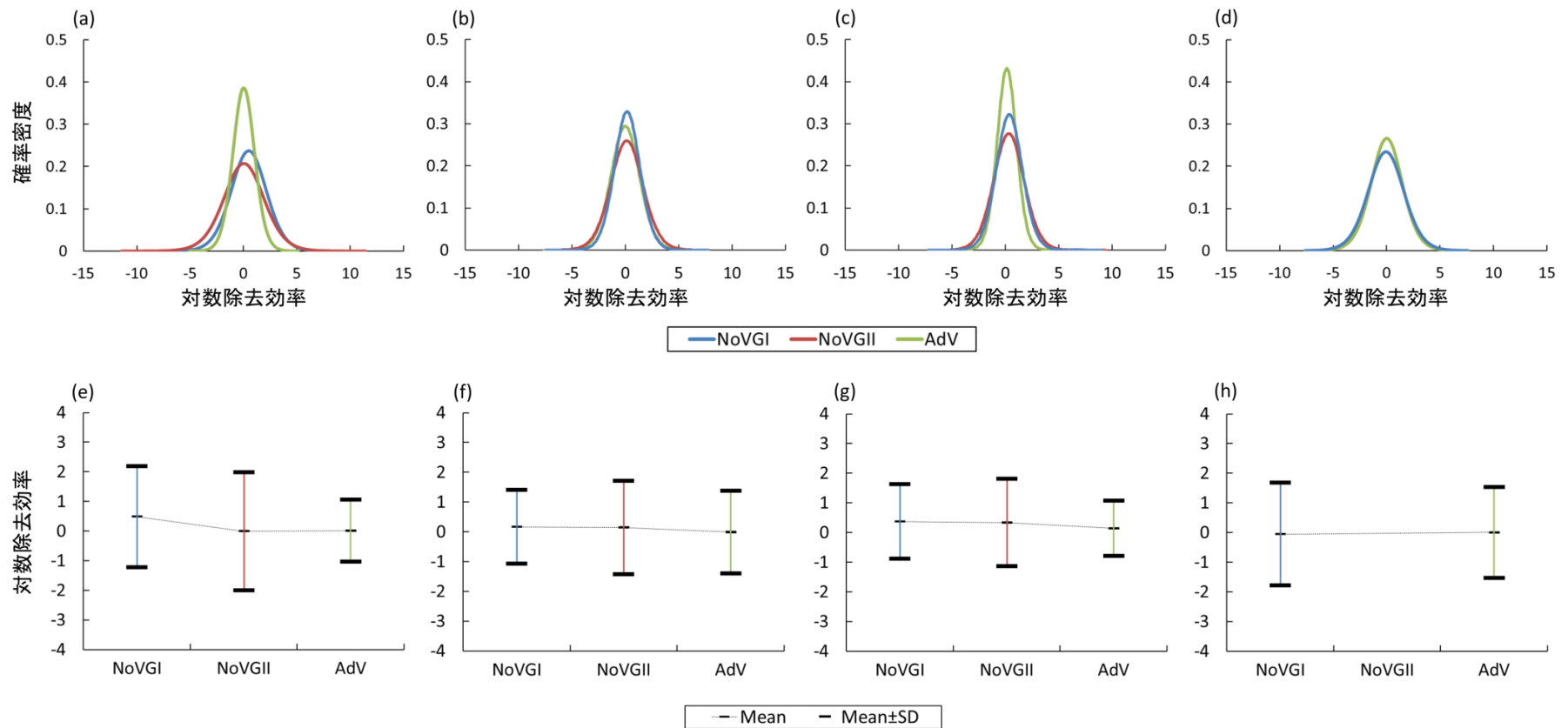


図 4-4 ベイズ推定により得られた (a) 下水処理場 A、(b) 下水処理場 B、(c) 下水処理場 C、(d) 下水処理場 D の二次処理におけるノロウイルス genogroup I (NoV GI、青線)、ノロウイルス genogroup II (NoV GII、赤線)、アデノウイルス (AdV、緑線) の除去効率分布、および (e) 下水処理場 A、(f) 下水処理場 B、(g) 下水処理場 C、(h) 下水処理場 D の二次処理間におけるウイルス種間の除去効率の有意差検定 (下水処理場 D の塩素消毒水中の NoV GII 濃度データ群は、ガンマ分布に従うことが示唆されたため、本解析から除外) [上側、一元分散分析 (ANOVA) ; 下側、多重比較検定 (Scheffe test) * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$]

4.4 考察

本章では、先述した方法 (3.2.1) に従って、各下水処理場の下水処理ユニットごと（二次処理、塩素消毒）の NoV GI、NoV GII および AdV 除去効率分布を推定した。各下水処理ユニットにおける対象ウイルスの除去効率分布は、未処理下水、二次処理水および塩素消毒水中のウイルス濃度分布を、ベイズ推定モデルを用いてそれぞれ独立して推定し、処理前後の濃度分布の比を除去効率分布として得た。次いで、得られたウイルス除去効率分布から先述した方法 (4.2.3) に従って 101 個のパーセンタイル値を抽出し、得られたパーセンタイル値を用いて各下水処理場の二次処理間、塩素消毒間もしくは各下水処理ユニットのウイルス種間における除去効率の統計学的有意差を、ANOVA および Scheffe test により検定した。結果として、各下水処理場の二次処理間および各下水処理ユニットのウイルス種間における除去効率に統計学的有意差が認められた。

下水処理システムにおけるウイルス除去効率の評価は、一般的に対データを用いた手法により行われている(Dizer et al., 2015; Ottoson et al., 2006; Schmitz et al., 2016; Sima et al., 2011)。対データを用いたウイルス除去効率の算出では、処理前後の下水中ウイルス濃度が従属関係にあることを仮定しており、その差の平均がウイルス除去効率として得られる。しかしながら、処理前後の下水中ウイルス濃度の変動性はそれぞれ独立しており、処理後の下水中ウイルス濃度が処理前の下水中ウイルス濃度をたびたび上回ることが報告されている(Katayama et al., 2008; Kitajima et al., 2014; Rachmadi et al., 2016)。本研究で提案するウイルス除去効率の推定手法は、処理前後の下水中ウイルス濃度がそれぞれ異なる母数の確率密度分布に従うことを仮定し、それぞれの濃度分布の比、すなわち非対データから除去効率分布を得るものである。欠測値を含むウイルス濃度データ群から下水中ウイルス濃度分布を推定し、且つ処理前後の下水中ウイルス濃度分布の比からウイルス除去効率分布を算出する本手法は、ウイルス除去効率の不確実性および変動性を表す上で有用な方法の一つであると考えられる。本章で得られた結果 [図 4-1(f)] の例では、下水処理場 D の二次処理における AdV 除去効率は他のウイルスよりも比較的高いものの、その除去効率分布の下側確率が比較的大きい（達成される AdV 除去効率が平均値を下回る確率が高い）ことが示された。他方で、非対データから推定されたウイルス除去効率の標準偏差は、対データから推定されたウイルス除去効率の標準偏差と比較して大きい値を示しており（表 4-2 および表 4-4）、言い換えれば、非対データからの推定結果をある下水処理システムで達成されるウイルス除去効率分布として採用した場合では、ウイルス汚染レベルを評価する上でより安全側に立つことになる。上述したように、下水処理システムにおけるウイルス除去効率の評価は、その除去効率分布の信頼区間に影響されることから、下水処理システムで達成されるウイルス除去効率の不確実性および変動性を十分に考慮する必要があると考えられる。

本手法を用いてウイルス除去効率を評価するに際し、下水中のウイルス濃度分布モデルが普遍的でないことについて議論する必要がある。一般的に、水中の微生物は離散的な粒子として捉えられており、その挙動が確率密度分布に従うと仮定されている(Eisenhart and

Wilson, 1943)。特に、環境中の微生物の濃度データは、対数正規分布に従うと仮定して解析されることが多く (Limpert et al., 2001)、本章で得られた AIC および BIC の結果についても、下水処理場 D の塩素消毒水中の NoV GII 濃度データ群を除くすべての濃度データ群が対数正規分布により適合することが示唆された (表 4-3)。しかしながら、下水処理場 D の塩素消毒水から得られた NoV GII 濃度データ群はガンマ分布により適合することが示唆されており、このデータ群同様に対数正規分布以外の確率密度分布に従うことが十分に想定される。他方で、処理前後の下水中ウイルス濃度データ群がそれぞれ異なる確率密度分布に適合した場合では、その分布比からウイルス除去効率を算出することが不可能となる。2 種類の確率密度分布に基づいた分布比の算出については既往の知見が少ないことから、下水中ウイルス濃度分布の推定にパラメトリックモデルを用いる本手法を採用する上で今後克服すべき課題の一つであると考えられる。

ANOVA および Scheffe test の結果より、二次処理におけるウイルス除去効率は、その運転条件 (水理学的滞留時間など) に依存することが示唆された。図 4-1 (d) ~ (f) より、下水処理場 D の二次処理における NoV GI および AdV 除去効率は、下水処理場 A および B の二次処理における NoV GI および AdV 除去効率との間にそれぞれ統計学的有意差 ($P < 0.01$) が認められた。また、下水処理場 D の二次処理における NoV GII 除去効率についても、下水処理場 B の二次処理における NoV GII 除去効率との間に統計学的有意差 ($P < 0.01$) が認められた。下水処理場 D は、他の下水処理場と比較して長い水理学的滞留時間 (14.1 hr) で運転されており、水理学的滞留時間の違いが各下水処理場の二次処理間におけるウイルス除去効率の差に影響を与えたと推察される。既往の研究によると、Miura (2015) らは、孔径 $0.4 \mu\text{m}$ の浸漬型 PVDF (Polyvinylidene difluoride) 製中空糸膜を使用した膜分離活性汚泥リアクター (Membrane bioreactor: MBR) において 3 種類の腸管系ウイルス [NoV GII、サポウイルス (SaV)、エンテロウイルス (EV)] の除去効率を評価し、汚泥混合液 (Mixed liquor suspended solids: MLSS) 濃度が MBR によるウイルス除去に影響を与えることを示し、さらにカリシウイルス科に属するウイルス (NoV GII、SaV) の除去については、EV と比較してより MLSS 濃度に依存することを示した (Miura et al., 2015)。Lu (2013) らは、孔径 $0.04 \mu\text{m}$ の PVDF 製 UF 膜を使用した MBR による大腸菌ファージ MS2 の除去効率を評価し、大腸菌ファージ MS2 の除去効率と膜ファウリングの進行度の間に線形相関があることを示した (Lu et al., 2013)。他方で、Rachmadi (2016) らは、米国・アリゾナ州にある表面流式の人工湿地における腸管系ウイルスおよび代替指標ウイルスの除去効率をそれぞれ評価し、人工湿地の水温および微生物による生物学的分解能がウイルス除去に影響したことを示唆した (Rachmadi et al., 2016)。このように、下水処理ユニットによるウイルス除去はそれぞれ異なる原理に基づいており、ユニットの運転条件に大きく左右されることが示されている。したがって、下水処理ユニットにおけるウイルス除去効率を評価する場合には、その運転条件が明記され、且つ評価方法の詳細について説明する必要があると考えられる。

下水処理ユニットのウイルス除去効率を評価するに際し、対象とするウイルスの種類についても十分に考慮する必要がある。本章で得られた結果についても、二次処理のウイルス

除去効率においてウイルス種間で統計学的有意差が認められることを示しており [図 4-3 (e) ~ (h)]、既往の研究で得られた知見と整合的である(Hata et al., 2013; Miura et al., 2015; Rachmadi et al., 2016)。これらの知見は、下水再生利用を実施する地域において流行しえるウイルスすべてに対して、下水処理ユニットによる除去効率を評価する必要があることを示唆している。しかしながら、下水中には多様なウイルスが含まれることが想定され、下水中から検出されるすべてのウイルスを対象として下水処理ユニットによる除去効率を評価することは事実上不可能である。豪州・ビクトリア州は、上述した問題点を指摘した上で、下水処理ユニットにおけるウイルス除去効率の評価に表面吸着大腸菌ファージ、F 特異大腸菌ファージ、大腸菌ファージ MS2 を用いることを推奨している(The Victoria Department of Health, 2013)。Kitajima (2014) らは、標準活性汚泥法および散水ろ床法を使用した下水処理施設における 10 種類の腸管系ウイルス [NoV GI、NoV GII、NoV GIV、SaV、EV、A 群ロタウイルス (RoV)、アイチウイルス (AiV)、AdV、JC ポリオーマウイルス (JCPyV)、BK ポリオーマウイルス (BKPyV)] とトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) をそれぞれ評価し、下水再生システムの腸管系ウイルス除去効率を評価する上で AiV および PMMoV が有用な代替指標ウイルスとなりえることを示唆した(Kitajima et al., 2014)。他方で、Kitajima (2015) らは、下水および貝類からの AiV の検出率が国によって異なることを示している(Kitajima and Gerba, 2015)。このように、代替指標ウイルスについても風土的特性を有することが考えられることから、下水中に含まれるウイルスの種類をモニタリング調査し、下水処理ユニットにおけるウイルス除去効率を評価する上で代表となりえるウイルスを事前に選定することが望ましい。

先述 (2.3.3) したように、下水再生システムにおいて規定されているウイルス目標除去効率を達成するためには、multiple barrier system に基づいて下水処理ユニットおよび衛生管理手法を組み合わせることが推奨されている(The Victoria Department of Health, 2013; US Environmental Protection Agency, 2012; World Health Organization, 2006)。この場合、各下水処理ユニットの除去効率および運転条件に関する情報については、下水再生システムを設計する段階ですでに公開されている必要があり、システムティックレビューおよびメタアナリシスなどにより複数のデータを統合し、取得することが望ましい(Pouillot et al., 2015; Sano et al., 2016; Xagorarakis et al., 2014)。システムティックレビューとは、既往の文献を徹底的に調査し、複数のデータを統計学的に解析し、且つ統合することをいい(Denyer and Transfield, 2009)、システムティックレビューのデータ解析に対応するプロセスをメタアナリシスという(Moher et al., 2009)。Moher (2009) らは、システムティックレビューおよびメタアナリシスの国際的な指針として「PRISMA (Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses) statement」を公表し、文献検索、得られた文献からのデータの統合、データの偏りの除外および知見の要約に関するプロセスを示している(Moher et al., 2009)。PRISMA に基づいて既往の文献からウイルス除去効率に関するデータを抽出する場合、ウイルス除去効率の統計量 (平均、標準偏差) およびその統計量の算出に用いられたデータ総数が必要となる(Moher et al., 2009)。本研究では、NoV GI、NoV GII および AdV 除去効率分布の統計量

を算出するために、先述した方法（4.2.3）に従って抽出した 101 個のパーセンタイル値を用いていることから、本章で得られた解析結果を PRISMA に基づいたメタアナリシスに直接用いることが可能である。

4.5 結論

本章では、先述した方法（3.2.1）に従って、国内下水処理場 4 ヶ所の二次処理および塩素消毒における NoVGI、NoV GII および AdV 除去効率分布をそれぞれ算出した。本章で得られた主な知見としては、① 下水処理ユニットによるウイルス除去効率はウイルスの種類や運転条件に依存すること、② 非対データから得られたウイルス除去効率を採用することにより、下水処理においてより安全側の立場からウイルス汚染リスクを考慮することができる、③ 本手法を用いて得られた解析結果は PRISMA に基づいたメタアナリシスに直接用いることが可能であること、が挙げられる。①で得られた知見から、下水処理ユニットの製造業者（第1章、図 1-2）は、試運転の段階において、設置する下水処理場（下水再生利用を実施する地域）でウイルス除去効率を評価する必要があると考えられる。

第 5 章

下水再生システムにおける腸管系ウイルスの 目標除去効率の算定

5.1 本章の目的

本章では、実下水場の未処理下水サンプルから検出されたノロウイルス genogroup II (NoV GII) の濃度分布および WHO などに提唱されている年間疾病負荷をもとに、下水再生システムにおける腸管系ウイルスの目標除去効率を算出した。下水再生利用に関する WHO や米国、豪州・ビクトリア州などにおいて公表されているガイドラインでは、下水再生水の用途に応じ、下水再生システム全体で達成されるべき病原微生物除去効率の目標値が明記されている(The Victoria Department of Health, 2013; U.S. Environmental Protection Agency, 2012; World Health Organization, 2006)。他方で、腸管系ウイルスに起因する感染症の流行は風土的特性がみられることから(第 2 章、表 2-6)、下水再生利用を実施する地域の社会的背景に基づいて、感染症リスク制御の対象となる腸管系ウイルスを慎重に選定する必要がある。本章では、先述(2.4.2)した国際的なガイドラインに記載されている病原微生物の目標除去効率の地域的未処理下水中の腸管系ウイルス濃度を地域特性の一つと考え、先行研究で開発されたベイズ推定モデル(Kato et al., 2013)を用いて腸管系ウイルス濃度データから未処理下水中濃度分布を推定し、且つ許容年間疾病負荷から下水再生水中許容濃度を算出し、未処理下水中濃度と下水再生水中許容濃度の関係から下水再生処理プロセス全体におけるウイルス除去効率の目標値を算出する枠組みを構築することを試みた。本章では、我が国における非細菌性感染性胃腸炎の主要な病因微生物であるノロウイルスを対象として(第 2 章、図 2-9 および図 2-10)、未処理下水中のノロウイルス genogroup I (NoV GI)、NoV GII 濃度およびノロウイルス genogroup IV (NoV GIV) のモニタリング調査を行い、未処理下水サンプルから検出された NoV GII をモデルウイルスとして用いた。未処理下水中の腸管系ウイルス濃度の変動性および不確実性を考慮するために、ベイズ推定モデル(3.2.1)を用いて欠測値を含む NoV GII 濃度データから条件付き確率密度分布を水中濃度分布として推定した。次いで、下水再生水利用シナリオにおいて許容年間疾病負荷を与える NoV GII の下水再生水中許容濃度を定量的微生物リスク評価(Quantitative microbial risk assessment: QMRA)の手法を用いて算出した。最後に、下水再生処理後の NoV GII 濃度が許容濃度を下回る確率を定義し、NoV GII の未処理下水中濃度分布および下水再生水中許容濃度から NoV GII の目

標除去効率を算出した。

5.2 研究方法

5.2.1 未処理下水中腸管系ウイルス濃度の定量

○サンプル処理

対象とする未処理下水サンプルは、実下水を処理するパイロットスケールの下水处理施設の未処理下水（一次処理水）とした。未処理下水サンプルは 2013 年 11 月～2014 年 10 月にかけて一ヶ月に 2 回（1 月・2 月のみ一ヶ月に 4 回）採取された（サンプル総数: 26）。

定量操作（ウイルス濃縮、RNA 抽出・cDNA 合成および PCR 反応）における阻害を検出するために、マウスノロウイルス S7-PP3 株（MNV）、メンゴウイルス vMC0 株および細菌由来プラスミド DNA を、それぞれの定量操作のプロセスコントロールとして用いた。未処理下水サンプル 50 mL に既知濃度の MNV 懸濁液 10 μ L（約 10^8 copies/10 μ L）を添加して混合し、ポリエチレングリコール沈殿法(Lewis and Metcalf, 1988)に供した。具体的には、MNV 懸濁液を添加した未処理下水サンプルにポリエチレングリコール 4 g（終濃度 8% w/v）および塩化ナトリウム 1.17 g（終濃度 0.4 M）を添加して 4°C 以下で一晩攪拌し、全量を 10,000×g で 30 分間遠心分離した。遠心分離後の上清を捨て、沈渣を 1 M リン酸緩衝液 5 mL で再懸濁させることで、ウイルス濃縮液を得た。

RNA 抽出および cDNA 合成における阻害を検出するために、ウイルス濃縮液 1 mL に対し既知濃度の MgV 懸濁液 10 μ L（約 10^6 copies/10 μ L）を添加して混合した。MgV 懸濁液を添加したウイルス濃縮液から Nuclisens magnetic extraction reagent kit（BioMérieux）を用いてウイルス核酸を抽出し、Prime Script RT reagent Kit（TAKARABio）を用いた cDNA 合成反応に供した。cDNA 合成反応液は、Primer Buffer および random 6mers をそれぞれ 8 μ L、PrimeScript RT Enzyme Mix I および oligo dT primer をそれぞれ 2 μ L、ウイルス核酸 8 μ L に、超純水で全量が 40 μ L となるように調整した。

○流体工学に基づく定量 PCR

NoV GI、NoV GII、NoV GIV、MNV および MgV に由来する遺伝子の定量には、マイクロ流体工学に基づく定量 PCR（microfluidic quantitative PCR: MF-qPCR）を用いた(Ishii et al., 2014)。MF-qPCR は、ナノスケールの微細流路を用いて各標的遺伝子に特異的な PCR 反応液と核酸試料とを順次混合し、複数の微小反応槽にて独立・並行した定量 PCR 反応に供することで複数のサンプルから複数の標的遺伝子を同時に検出・定量する技術である(Surgeon et al., 2008)。定量 PCR における阻害を検出するために、cDNA サンプル 30 μ L に対し既知濃度の細菌由来プラスミド DNA（約 10^5 copies）を添加し混合した。

サンプル中の標的遺伝子を高感度に検出・定量するため、MF-qPCR の前段で TaqManPreAmp master mix（Applied Biosystems）を用いた Multiplex PCR により標的遺伝子を増幅した。MF-qPCR の反応槽の容量は約 10 nL であることから、理論上 100 copies/ μ L (=1

copies/10 nL) の DNA 濃度が必要とされる。定量 PCR の検出限界値は 95%確率で検出される値が一般的であり (Laverick et al., 2004)、理論的に可能な検出下限値は 3 copies/well とされている。Multiplex PCR 反応液は、2×TaqManPreAmp master mix (Applied Bio-systems) 5 µL、各プライマーセット (0.2µM) 2.5µL に、超純水で全量が 10 µL となるように調整した。温度条件は 95°C で 10 分加熱後、95°C で 10 秒の熱変性、60°C で 4 分のアニーリングおよび伸長反応のサイクルを 14 回繰り返した。その後、Multiplex PCR 産物を Tris-EDTA (TE) を用いて 6 倍希釈した。なお、NoV GI、NoV GII、NoV GIV、MNV、MgV および細菌由来プラスミド DNA の定量は、表 5-1 に示すプライマー・プローブセットを用いて行った。

表 5-1 本研究で用いたプライマー・プローブセット

対象遺伝子	プライマー・プローブ	プライマー・プローブ配列 (5' → 3')	参考文献
Norovirus genogroup I	NIFG1F	ATGTTCCGCTGGATGCG	Miura et al., 2013
	NV1LCR	CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	
	NIFG1P	FAM-TGTGGACAG/ZEN/GAGAYCGCRATCT-BHQ	
Norovirus genogroup II	NIFG2F	ATGTTCAAGTGGATGAGRTTCTC	Miura et al., 2013
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	
	QNIFS	FAM-AGCACGTGG/ZEN/GAGGGCGATCG-IBFQ	
Norovirus genogroup IV	NIFG4F	ATGTACAAGTGGATGCGRTTC	Miura et al., 2013
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	
	NIFG4P	FAM-AGCACTTGG/ZEN/GAGGGGGATCG-BHQ	
Mengovirus	Mengo110	GCGGGTCCTGCCGAAAGT	Pintó et al., 2009
	Mengo209	GAAGTAACATATAGACAGACGCACAC	
	Mengo147	FAM-ATCACATTACTGGCCGAAGC-NFQ-MGB	
Murine norovirus	MNV-S	CCGCAGGAACGCTCAGCAG	Kitajima et al., 2010
	MNV-AS	GGYTGAATGGGGACGGCCTG	
	MNV-TP5062	FAM-ATGAGTGATGGCGCA-NFQ-MGB	
<i>Pseudogulbenkiania</i> sp. NH8B-1D2	NH8B3960tmp-1841F	CTGGCTGTCTAGGCCCTGTCT	Zhang and Ishii, 2015
	NH8B3960tmp-1901R	CCTGCAGGCATGCAAGCT	
	NH8B3960tmp-1863	FAM-TTATACACATCTCAACCCTG-NFQ-MGB	

* FAM; 6-fluorescein amidite, ZEN; ZEN internal quencher (Integrated DNA Technologies), NFQ-MGB; nonfluorescent quencher with a minor groove binder (Applied Biosystems), IBFQ; Iowa Black fluorescent quencher (Integrated DNA Technologies)

Multiplex PCR 産物を TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems)、Dynamic Array 96.96 chip (Fluidigm) および BioMark HD reader (Fluidigm) を用いた MF-qPCR に供し、既知濃度プラスミド DNA ($2 \times 10^0 \sim 10^6$ copies/ μ L) と Real-Time PCR Analysis software version 3.0.2 (Fluidigm) を用いて未処理下水サンプル中の NoV GI、NoV GII、NoV GIV、MNV および MgV および細菌由来プラスミド DNA を定量した。TaqMan Universal PCR master mix には、デオキシウリジン三リン酸 (deoxyuridine triphosphate; dUTP) とウラシル N グリコシラーゼ (Uracil-N-glycosylase; UNG) が含まれており、dUTP が組み込まれた PCR 産物が UNG に分解されることにより、PCR 間のキャリーオーバーコンタミネーション (前回の PCR 反応で発生した PCR 産物による汚染) を防止する。温度条件は 50°C で 2 分の UNG 処理および 95°C で 10 分の加熱後、95°C で 15 秒の熱変性、60°C で 60 秒のアニーリングおよび伸長反応のサイクルを 40 回繰り返した。なお、対象ウイルスは 1 サンプルにつき 3 反復 (in triplicate) させて定量した。

ウイルス回収率、RNA 抽出効率および定量 PCR 効率は、未処理下水サンプル、ウイルス濃縮サンプルおよび cDNA サンプルにそれぞれ添加した MNV、MgV および細菌由来プラスミド DNA の定量値から算出した (Eq. 5-1~Eq. 5-3)。ウイルス回収率、RNA 抽出効率および定量 PCR 効率が極めて低い (1%以下) 場合には (Da Silva et al., 2007)、定量操作において阻害があったと判断し、ウイルス濃縮、RNA 抽出もしくは MF-qPCR から再分析を行った。

$$\text{ウイルス回収率} = \frac{\text{下水サンプルに添加した MNV の定量値}}{\text{Nuclease - free water に添加した MNV の定量値}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5-1})$$

$$\text{RNA 抽出効率} = \frac{\text{下水濃縮サンプルに添加した MgV の定量値}}{\text{Nuclease - free water に添加した MgV の定量値}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5-2})$$

$$\text{PCR 効率} = \frac{\text{逆転写反応後の産物 (cDNA) に添加した細菌由来 DNA プラスミドの定量値}}{\text{Nuclease - free water に添加した細菌由来 DNA プラスミドの定量値}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5-3})$$

5.2.2 ベイズ推定手法を用いたウイルス濃度分布の推定

本章では、先行研究で開発されたベイズ推定モデル (第 3 章) を用いて未処理下水中の NoV GII 濃度を確率密度分布として推定した。未処理下水中の NoV GII 濃度分布として採用する確率密度分布を選択するために、ベイズ情報量基準 (Bayesian Information Criterion: BIC) を用いて (Vrieze, 2012)、3 種類の確率密度分布 (正規分布、対数正規分布およびガンマ分布) の適合性評価を行った。なお、BIC の算出は第 4 章の方法 (4.2.2) に従って行った。

5.2.3 目標年間リスクおよび下水再生水の利用用途、誤摂取量と頻度の設定

本研究では、下水再生水が農業灌漑利用されることを仮定し、曝露対象者を農業従事者（仮定 1）と生食野菜消費者（仮定 2）としてリスクシナリオを設定した。なお、仮定 1 および仮定 2 における 1 回もしくは 1 日当たりの NoV GII 摂取量 (copies) は、パラメータ λ として表される (Eq. 5-4 および Eq. 5-5)。

仮定 1: 農業従事者による灌漑用水の誤飲

- 1 日あたり曝露水量 V : 1 mL/回 (Ottoson and Stenström, 2003)
- 年間曝露頻度 n : 300 回/年 (Mara et al., 2007)

$$\lambda = 10^c \cdot V \quad (\text{仮定 1}) \quad (\text{Eq. 5-4})$$

仮定 2: 消費者による生食野菜の喫食

- 野菜に付着している再生水量 V : 0.1 mL/g (Asano et al., 1992; Shuval et al., 1997)
- 1 日あたり生食野菜消費量 W : 38.9 g/日 (Voorrips et al., 2000)
- 年間生食野菜喫食頻度 n : 365 日/年 (Voorrips et al., 2000)
- 野菜の収穫から喫食までに生じる NoV GII 死滅率 R : 1.69 log (Dawson et al., 2005; World Health Organization, 2006)

$$\lambda = 10^c \cdot V \cdot W / 10^R \quad (\text{仮定 2}) \quad (\text{Eq. 5-5})$$

5.2.4 目標年間リスクの達成に必要な目標ウイルス除去効率の算出

NoV GII の下水再生水中許容濃度を QMRA により算出した。QMRA による年間疾病負荷の算出には、既報の研究で報告されているモデルおよびモデルパラメータを用いた。NoV GII の感染確率モデルとして Teunis らおよび Messner らによりそれぞれ報告されている合流式超幾何モデル (Eq. 5-6) (Teunis et al., 2008) と Fractional-Poisson モデル (Eq. 5-7) (Messner et al., 2014) を用いた。

$$P_{inf}(d) = 1 - ({}_2F_1(\beta, \frac{\lambda(1-a)}{a}, \alpha + \beta; a) \times (\frac{1}{1-a})^{-\frac{\lambda(1-a)}{a}}) \quad (\text{Eq. 5-6})$$

$$P_{inf}(d) = P \times (1 - e^{-\left(\frac{cV}{\mu}\right)}) \quad (\text{Eq. 5-7})$$

ここで $P_{inf}(d)$ は NoV GII の 1 回もしくは 1 日当たりの感染確率、 λ は 1 回もしくは 1 日当たりの NoV GII の摂取量(copies) (Eq. 5-4 および Eq. 5-5)、 c は NoV GII 濃度(copies/mL)、 V は 1 回もしくは 1 日当たりの摂取水量 (mL)、 ${}_2F_1$ は合流式超幾何モデル、 α 、 β および a は合流式超幾何モデルのパラメータ、 P および μ は Fractional-Poisson モデルのパラメータである。用量 (NoV 濃度) の単位は PCR による定量値である。PCR の定量値はウイルスの感染力を必ずしも反映しないが、ノロウイルスは感染価を定量することが不可能であるため、ノロウイルスの用量反応関係に関する既往の研究では、用量の単位として PCR での定量値 (ゲノムコピー数) が用いられている。

合流式超幾何モデルではノロウイルスの感染力を 2 つのモデルパラメータ (α 、 β) で表しており、そこに体外に排出されたノロウイルスが凝集状態であることを仮定するために凝集粒子パラメータ a (ノロウイルス凝集体の粒子数および大きさがそれぞれポアソン分布と対数級数分布に従うことを仮定) を加えてノロウイルスの感染確率を表現している。

Fractional-Poisson モデルではノロウイルス感染に対する感受性を考慮するために、組織血液型抗原 (histo-blood group antigens: HBGA) が唾液などの体液中に分泌される分泌型のヒトを感受性個体 (HBGA 分泌者: Se^+) とし、全人口に占める感受性個体と非感受性個体 (HBGA 非分泌者: Se^-) の割合をそれぞれモデルパラメータ P および $1 - P$ (Fractional Poisson モデル内では単一パラメータ P) として表している。また、Fractional-Poisson モデルにおいても同様に体外に排出されたノロウイルス粒子が凝集状態にあると仮定しており、1 凝集粒子中のノロウイルス粒子数をモデルパラメータ μ で表している。

発症確率の算出には、Teunis らが提案した感染・発症確率モデル (Eq. 5-8) を用いた (Teunis et al., 2008)。

$$P_{ill|inf} = 1 - (1 + \eta cV)^{-r} \quad (\text{Eq. 5-8})$$

$$P_{ill}(d) = P_{inf} \cdot P_{ill|inf} \quad (\text{Eq. 5-9})$$

$$P_{ill}(y) = 1 - (1 - P_{ill}(d))^n \quad (\text{Eq. 5-10})$$

ここで $P_{ill|inf}$ は感染者に占める発症者の割合 (感染・発症確率)、 $P_{ill}(d)$ (Eq. 5-9) および $P_{ill}(d)$

(Eq. 5-10) はそれぞれ 1 回もしくは 1 日当たりの当たり発症確率および年間発症確率、 n は年間曝露頻度、 η および r は感染・発症確率モデルのパラメータである。 η および r は凝集状態にあるノロウイルス粒子のボランティアへの投与試験の結果をもとに推定されたものであり、本モデルにより凝集状態のノロウイルス粒子を摂取した際の感染・発症確率が算出される。

年間疾病負荷は (Eq. 5-11) を用いて算出した。

$$DALY_{pppy} = P_{ill}(y) \cdot DB \quad (\text{Eq. 5-11})$$

ここで $DALY_{pppy}$ は 1 人 1 年当たりの疾病負荷 ($DALY_{pppy}$)、 DB は感染症事例 1 件当たりの疾病負荷 ($DALY/\text{case}$) である。NoV 感染症の重篤度の個人差を考慮するために、感染症事例 1 件当たりの疾病負荷 (DB) を一様分布 $\text{unif}(3.71 \times 10^{-4}; 6.23 \times 10^{-3})$ として与えた (Mok et al., 2014)。

本研究では、下水再生水利用の各シナリオにおいて算出した $DALY_{pppy}$ の値が 10^{-4} (Mara et al., 2010) もしくは 10^{-6} $DALY_{pppy}$ (World Health Organization, 2006) を下回る NoV GII 濃度を下水再生水中許容濃度とした。具体的には、始めにある NoV 濃度を仮定して年間発症確率を算出し、 DB の一様分布における最大値 (6.23×10^{-3}) を掛け合わせることで、仮定した NoV GII 濃度に対応した 1 人 1 年当たりの疾病負荷 ($DALY_{pppy}$) の最大値を得た。次いで、仮定する NoV GII 濃度を変化させ、繰り返し $DALY_{pppy}$ を得ることで NoV GII 濃度— $DALY_{pppy}$ 曲線を得た。得られた NoV GII 濃度— $DALY_{pppy}$ 曲線と、許容年間疾病負荷である 10^{-4} もしくは 10^{-6} $DALY_{pppy}$ との交点における NoV GII 濃度を下水再生水中許容濃度として採用した。

本研究では、下水再生処理後の NoV GII 濃度が下水再生水中許容濃度を下回る確率が 95、99 および 99.9% となるように NoV GII 除去効率の目標値を設定した。具体的には、5.2.2 で得られた NoV GII の水中濃度分布をもとに、累積確率が 95、99 および 99.9% となる NoV 濃度の値 (95、99 および 99.9%tile 値) を得た (Tanaka et al., 1998)。次いで、NoV 濃度の 95、99 および 99.9%tile 値と上記の方法で得られた下水再生水中許容濃度の算出値の差を、下水再生水利用の各シナリオにおける NoV GII 除去効率の目標値とした。

なお、仮定 1 および仮定 2 における NoV GII の下水再生水中許容濃度および目標除去効率の算出には、以下の R コードをそれぞれ用いた。

○仮定 1: 農業従事者による灌漑用水の誤飲

```
library(hypergeo)
DALY_limit <- 0.0001      #Tolerable annual disease burden
iter <- 10000             #Iteration (Number of trials)
step1 <- 0.1              #Increments for calculation of tolerable concentration

#Infection model parameters for hypergeometric model (pinfHM)
a <- 0.9999
a1 <- (1-a)/a
alpha <- 0.0044
beta <- 0.0020

#Infection model parameters for fractional Poisson model (pinfFP)
mu <- 1106
P <- 0.772

#Illness among infection (pillinf) model parameters
eta <- 0.00255
r <- 0.086

#Assumptions about exposure and disease burden
DB <- 0.00623  #Maximum disease burden per cases of illness (unif(0.000371; 0.006.23))
n <- 300       #Frequency of exposure per year
V <- 1         #Volume of treated wastewater ingested per exposure

#Dose-response models
pinfHM <- function(c){Re(1-(hypergeo(beta,c*V*a1,alpha+beta,a)*((1/a1)^(-c*V*a1))))}
#Probability of infection per exposure (hypergeometric model)
pinfFP <- function(c){P*(1-exp(-c*V/mu))}
#Probability of infection per exposure (fractional Poisson model)
pillinf <- function(c){(1-(1+eta*c*V)^(-r))}
#Illness rate among infection

#Calculation of tolerable concentration in treated wastewater (confluent hypergeometric model)
c <- 0
for(i in 1:iter){
  pillHMD <- pinfHM(c)*pillinf(c)          #Probability of illness per exposure
```

```

PillHMy <- 1-(1-pillHMD)^n          #Probability of illness per year
DALYHM <- PillHMy*DB                #DALY calculation
ifelse(DALYHM<DALY_limit, c <- c+step1, c <- c)
}

```

```

TCHM <- log10(c-step1)
#Tolerable concentration in treated wastewater (hypergeometric model)
print(TCHM)

```

#Calculation of tolerable concentration in treated wastewater (fractional Poisson model)

```

c <- 0
for(i in 1:iter){
  pillFPd <- pinfFP(c)*pillinf(c)    #Probability of illness per exposure
  PillFPy <- 1-(1-pillFPd)^n        #Probability of illness per year
  DALYFP <- PillFPy*DB               #DALY calculation
  ifelse(DALYFP<DALY_limit, c <- c+step1, c <- c)
}

```

```

TCFP <- log10(c-step1)
#Tolerable concentration in treated wastewater (fractional Poisson model)
print(TCFP)

```

#Calculation of required log reduction to meet tolerable annual disease burden (hypergeometric model)

```

logmeanin <- 0.7          #Mean of norovirus concentration in untreated wastewater
logsdin <- 1.7            #Standard deviation of norovirus concentration in untreated wastewater
Inf95tile <- qnorm(0.95,logmeanin,logsdin)
LRHM <- Inf95tile-TCHM    #Required log reduction (hypergeometric model)
print(LRHM)

```

#Calculation of required log reduction to meet tolerable annual disease burden (fractional Poisson model)

```

logmeanin <- 0.7          #Mean of norovirus concentration in untreated wastewater
logsdin <- 1.7            #Standard deviation of norovirus concentration in untreated wastewater
Inf95tile <- qnorm(0.95,logmeanin,logsdin)
LRFP <- Inf95tile-TCFP    #Required log reduction (fractional Poisson model)
print(LRFP)

```

○仮定 2: 消費者による生食野菜の喫食

```
library(hypergeo)
```

```
DALY_limit <- 0.0001      #Tolerable annual disease burden
  iter <- 10000            #Iteration (Number of trials)
  step1 <- 0.1             #Increments for calculation of tolerable concentration
```

#Infection model parameters for hypergeometric model (pinfHM)

```
a <- 0.9999
a1 <- (1-a)/a
alpha <- 0.0044
beta <- 0.0020
```

#Infection model parameters for fractional Poisson model (pinfFP)

```
mu <- 1106
P <- 0.772
```

#Illness among infection (pillinf) model parameters

```
eta <- 0.00255
r <- 0.086
```

#Assumptions about exposure and disease burden

```
DB <- 0.00623  #Maximum disease burden per cases of illness (unif(0.000371; 0.006.23))
n <- 365       #Days of exposure per year
W <- 38.9      #Mean daily intake of crops eaten raw
V <- 0.1       #Volume of treated wastewater remaining on 1g crops
R <- 49.0      #Total norovirus reduction between last irrigation and intake
```

#Dose-response models

```
pinfHM <- function(c){Re(1-(hypergeo(beta,((c*V*W)/R)*a1,alpha+beta,a)
*((1/a1)^(-(c*V*W)/R)*a1))))}
#Probability of infection per day (hypergeometric model)
pinfFP <- function(c){P*(1-exp(-(c*V*W)/R)/mu)}
#Probability of infection per day (fractional Poisson model)
pillinf <- function(c){(1-(1+eta*(c*V*W)/R)^(-r))}
#Illness rate among infection
```

#Calculation of tolerable concentration in treated wastewater (confluent hypergeometric model)

```
c <- 0
for(i in 1:iter){
  pillHMD <- pinfHM(c)*pillinf(c)           #Probability of illness per day
  PillHMy <- 1-(1-pillHMD)^n                 #Probability of illness per year
  DALYHM <- PillHMy*DB                       #DALY calculation
  ifelse(DALYHM<DALY_limit, c <- c+step1, c <- c)
}

TCHM <- log10(c-step1)
#Tolerable concentration in treated wastewater (hypergeometric model)
print(TCHM)
```

#Calculation of tolerable concentration in treated wastewater (fractional Poisson model)

```
c <- 0
for(i in 1:iter){
  pillFPd <- pinfFP(c)*pillinf(c)           #Probability of illness per day
  PillFPy <- 1-(1-pillFPd)^n                 #Probability of illness per year
  DALYFP <- PillFPy*DB                       #DALY calculation
  ifelse(DALYFP<DALY_limit, c <- c+step1, c <- c)
}

TCFP <- log10(c-step1)
#Tolerable concentration in treated wastewater (fractional Poisson model)
print(TCFP)
```

#Calculation of required log reduction to meet tolerable annual disease burden (hypergeometric model)

```
logmeanin <- 0.7          #Mean of norovirus concentration in untreated wastewater
logsdin <- 1.7            #Standard deviation of norovirus concentration in untreated wastewater
Inf95tile <- qnorm(0.95,logmeanin,logsdin)
LRHM <- Inf95tile-TCHM    #Required log reduction (hypergeometric model)
print(LRHM)
```

#Calculation of required log reduction to meet tolerable annual disease burden (fractional Poisson model)

```
logmeanin <- 0.7          #Mean of norovirus concentration in untreated wastewater
```

```
logsdin <- 1.7          #Standard deviation of norovirus concentration in untreated wastewater
Inf95tile <- qnorm(0.95,logmeanin,logsdin)
  LRFP <- Inf95tile-TCFP #Required log reduction (fractional Poisson model)
  print(LRFP)
```

5.3 研究結果

上記の定量方法に従い、未処理下水 26 サンプル中の NoV GI、NoV GII および NoV GIV を定量した。本研究では 26 サンプル全てで MNV、MgV および細菌由来プラスミド DNA の定量値をもとに算出したウイルス回収率、RNA 抽出効率および定量 PCR 効率がそれぞれ 1%を上回ったため、定量値の棄却・再分析の必要はないと判断し、得られた定量値をそのまま採用した。未処理下水中 NoV GII の検出データ数（検出率）は 12（46%）であり（表 5-2）、定量値は $1.04 \sim 2.97 \log_{10}\text{-copies/mL}$ の範囲であった。一方で、NoV GI および NoV GIV の検出率は、ともに 0%（0/26）であった（表 5-2）。これらの結果から、本章では NoV GII を当該地域において下水再生利用を行う上での危害因子として設定し、NoV GII 濃度の定量データを以降の解析に用いた。

先行研究で開発されたベイズ推定モデルによる水中濃度分布推定では、正確な推定を行うために、データ総数が 12 個以上である場合に 8 個以上の検出データ数を必要とする (Kato et al., 2013)。本研究で用いた NoV GII 濃度データ群は、12 個の検出データを含むことから、ベイズ推定モデルを用いた正確な NoV GII 濃度分布推定が可能であるとした。次いで、本研究で用いた NoV GII 濃度データ群に対するベイズ推定モデルの適合性を評価するために、正規分布、対数正規分布およびガンマ分布を NoV GII 濃度データ群に適用した場合の BIC を算出した。その結果、NoV GII の濃度データ群を対数正規分布に当てはめた場合に BIC が最小値となった（表 5-3）。BIC は、得られる統計量が小さいほど高い適合度（予測の良さ）を示すことから、本研究で用いた NoV GII 濃度データ群は候補の分布の中で対数正規分布に最も適合すると判断した。ベイズ推定モデルを用いて未処理下水中の NoV GII の水中濃度分布を推定した（図 5-1）。結果として、未処理下水中の NoV GII 濃度（ $\log_{10}\text{-copies/mL}$ ）は平均（ μ ）= 0.7、標準偏差（ σ ）= 1.7 の対数正規分布で表された。

表 5-2 未処理下水中のノロウイルス genogroup I (NoV GI)、ノロウイルス genogroup II (NoV GII) およびノロウイルス genogroup IV (NoV GIV) の検出データ数とベイズ推定モデルにより得られた対数平均および対数標準偏差

ウイルス	総サンプル数	検出データ数	対数平均	対数標準偏差
NoV GI	26	0	— ^a	— ^a
NoV GII	26	12	0.7	1.7
NoV GIV	26	0	— ^a	— ^a

^a NoV GI および NoV GIV の検出率はともに 0%であったことから、ベイズ推定モデルによる対数平均および対数標準偏差の推定が不可能であった

表 5-3 ベイズ情報量基準 (BIC)

ウイルス	サンプル	BIC		
		正規分布	対数正規分布	ガンマ分布
NoVGII	未処理下水	176.0	26.5	156.1

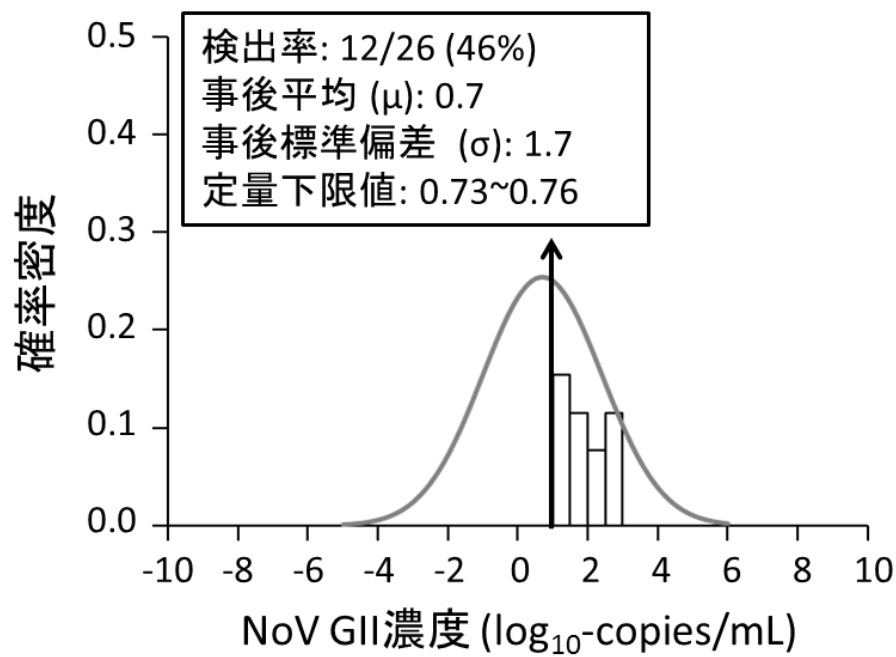


図 5-1 未処理下水中 NoV GII 濃度分布 (確率密度分布: NoV GII 濃度分布、確率度数分布: NoV GII 検出データのヒストグラム、矢印: 定量下限値)

表 5-4 農業従事者による灌漑用水の誤飲（仮定 1）と消費者による生食野菜の喫食（仮定 2）のシナリオにおいて算出した下水再生水中 NoV GII 許容濃度

	用量反応モデル	年間許容疾病負荷 (DALY _{pppy})	下水中許容濃度 (log ₁₀ -copies/mL)
仮定 1	合流式超幾何 モデル	10 ⁻⁴	1.3
		10 ⁻⁶	0.29
	Fractional Poisson モデル	10 ⁻⁴	1.3
		10 ⁻⁶	0.27
仮定 2	合流式超幾何 モデル	10 ⁻⁴	2.4
		10 ⁻⁶	1.4
	Fractional Poisson モデル	10 ⁻⁴	2.3
		10 ⁻⁶	1.3

下水再生利用の仮定 1 および仮定 2 において得られた NoV GII 濃度-DALY_{pppy} 曲線と、許容年間疾病負荷である 10⁻⁴ もしくは 10⁻⁶ DALY_{pppy} との交点を、それぞれの仮定における NoV GII の下水再生水中許容濃度とした（表 5-4）。次いで、ベイズ推定により得られた NoV GII の未処理下水中濃度分布と、下水再生水利用の各シナリオにおいて得られた NoV GII の下水再生水中許容濃度をもとに、除去効率の目標値を算出した（表 5-5）。この結果は、NoV GII の未処理下水中濃度分布の累積確率をもとに得られた 95、99 および 99.9%tile 値と下水再生水中許容濃度の算出値（表 5-4）の差を、下水再生水利用の各シナリオにおける NoV 除去効率の目標値として得たものである。一例として、仮定 1（農業従事者による灌漑用水の誤飲）における NoV GII の下水再生水中許容濃度および除去効率の目標値の 95%tile 値は、10⁻⁶ DALY_{pppy} を採用した場合にそれぞれ 0.29 log₁₀-copies/mL と 5.7 log であるが、これは未処理下水中の NoV GII 濃度が 0.7±1.7 log₁₀-copies/mL であり、かつ下水再生システムにおいて 5.7 log₁₀ の NoV GII 除去効率が達成可能である場合に、95%以上の確率で下水再生水中の NoV GII 濃度が 0.29 log₁₀-copies/mL 以下となることを示している。

表 5-5 農業従事者による灌漑用水の誤飲（仮定 1）と消費者による生食野菜の喫食（仮定 2）のシナリオにおいて算出した下水再生システムにおいて必要とされる NoV GII 除去効率

	用量反応モデル	年間許容疾病負荷 (DALY _{pppy})	除去効率目標値		
			95% ^a	99% ^a	99.9% ^a
仮定 1	合流式超幾何 モデル	10 ⁻⁴	2.2	3.4	4.7
		10 ⁻⁶	3.2	4.4	5.7
	Fractional Poisson モデル	10 ⁻⁴	2.2	3.4	4.7
		10 ⁻⁶	3.2	4.4	5.7
仮定 2	合流式超幾何 モデル	10 ⁻⁴	1.1	2.3	3.6
		10 ⁻⁶	2.1	3.3	4.6
	Fractional Poisson モデル	10 ⁻⁴	1.2	2.3	3.6
		10 ⁻⁶	2.2	3.3	4.6

a. 下水再生処理後の NoV GII 濃度が下水再生水中許容濃度を下回る確率（信頼度）が 95、99 および 99.9%となるように NoV GII 除去効率の目標値を設定

5.4 考察

本研究では、日本国内における下水再生水の農業灌漑利用シナリオを想定して 2 種類の曝露形態〔仮定 1（農業従事者による灌漑用水の誤飲）および仮定 2（消費者による生食野菜の喫食）〕を仮定し、それぞれの仮定において必要とされる NoV GII の目標除去効率を、未処理下水中の腸管系ウイルスの水中濃度分布および下水再生水中許容濃度を用いて算出した。WHO が 2006 年に発行されたガイドライン「WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater: volume 4 safe use of wastewater, excreta and greywater」では、ガイドラインなどに記載されている単一の指標微生物（例：表面吸着大腸菌ファージ、F 特異大腸菌ファージ、大腸菌ファージ MS2 など）を用いて、多様な微生物学的リスクを適正に管理することには限界があると指摘している (World Health Organization, 2006)。先述 (4. 4) したように、豪州・クイーンズランド州では、下水処理ユニットにおけるウイルス除去効率の評価に 3 種類の大腸菌ファージ（表面吸着大腸菌ファージ、F 特異大腸菌ファージ、大腸菌ファージ MS2）を用いることを推奨しており、また下水再生システムの稼働後のモニタリング調査においても、これら大腸菌ファージを用いることを規定している (The state of Queensland, 2008)。しかしながら、Meng (1996) らは、腸管系ウイルスと大腸菌ファージの除去効率の間に有意な差が認められることを示しており (Meng, 1996)、下水処理ユニットにおける大腸菌ファージの除去効率が目標値を達成していたとしても、腸管系ウイルスの除去効率が同様に達成されているとは限らない。他方で、クイーンズランド州は、ヒトに感染する 8 種類の腸管系ウイルス（アデノウイルス、アストロウイルス、カリシウイルス、コロナウイルス、エンテロウイルス、A 型肝炎ウイルス、ノロウイルス、ロタウイルス）に対し、下水中から検出されうるウイルスを対象として目標除去効率を算定することについても記述している。一般的に、下水中には多様な腸管系ウイルスが含まれており (Kitajima et al., 2014; Schmitz et al., 2016)、且つ現段階で腸管系ウイルスの感染症リスク評価のために利用可能な用量反応モデルが限られていることから (Community, 2017)、未処理下水中のモニタリング調査によって検出された腸管系ウイルスすべてに対し目標除去効率を設定することは現段階では不可能である。下水再生利用を実施する地域において腸管系ウイルスに起因する水系感染症リスクを適正に評価・管理するためには、その地域で流行しているもしくは水圏感染症の主要病因生物となりえる腸管系ウイルスをモデルウイルスとして選定し、そのモニタリング調査結果に基づいて目標除去効率を設定することが望ましい。

本章では、NoV GII をモデルウイルスとして、下水再生システムにおける目標除去効率を算出した。NoV GII は、我が国における集団感染症の主要な病因微生物であることに加え（第 2 章、図 2-9 および図 2-10）、QMRA に関する研究も比較的進んでいることから (Van Abel et al., 2016)、腸管系ウイルスを代表するものとして適当であると考えた。NoV GII の感染確率を計算する際には、Teunis (2008) らが開発した合流型超幾何モデルが比較的多く用いられてきた (Teunis et al., 2008)。しかしながら、Teunis (2008) らによって開発された合流型超幾何モデルのパラメータは、ノーウォークウイルス (NoV GI. 1) を用いたボランティア実

験データ(Lindesmith et al., 2003)のみについて最適化されたものであり(Teunis et al., 2008)、NoV GII に対しては代替モデルの域を出なかった。本研究では、Messner (2014) らが更新した合流型超幾何モデルのパラメータに加え、Messner(2014)らが開発した Fractional-Poisson モデルを用いて NoV GII の感染確率を算出した(Messner et al., 2014)。Messner (2014) らは、Teunis (2008) らが用いた NoV GI.1 のボランティア実験データ(Lindesmith et al., 2003)に加え、最近報告された NoV GI. 1(Atmar et al., 2014; Seitz et al., 2011)および NoV GII. 4(Frenck et al., 2012)のボランティア実験データをもとに、合流型超幾何モデルおよび Fractional-Poisson モデルのパラメータをそれぞれ最適化した。他方で、NoV GII の感染・発症確率の算出に用いたモデルのパラメータは、NoV GI. 1 のボランティア実験データのみに基づいており(Teunis et al., 2008)、NoV GII に対しては代替モデルとの位置付けである。しかしながら、現在利用可能な NoV の感染・発症モデルが極めて限られていることから、NoV 粒子の凝集・分散状態などある程度の条件に沿うモデルおよびモデルパラメータを使用せざるを得ない状況にある。NoV に関しては用量反応モデルおよびモデルパラメータが新規のボランティア実験データをもとに更新され続けていることから(Van Abel et al., 2016)、新規知見を蓄積するとともに、想定する条件に沿う用量反応モデルを採用することが重要となる。

腸管系ウイルスの目標除去効率を算出するに際し、本研究では WHO および Mara(2010) らがそれぞれ推奨している年間許容疾病負荷である 10^{-6} DALY_{pppy} および 10^{-4} DALY_{pppy} を採用した(Mara et al., 2010; World Health Organization, 2006)。水系感染症に対する許容リスクの設定については、その地域の状況（経済状況、曝露経路など）および現状のリスクレベルを十分に考慮する必要がある。Mara (2010) らは、開発途上国における病原体の年間疾病負荷の算出結果から適切な年間許容リスクについて議論しており、年間許容リスクとして 10^{-4} DALY_{pppy} を採用した場合でも、比較的安全性の高い水を提供することが可能であるとした(Mara et al., 2010)。本研究の算出結果を一例として用いると、農業従事者による灌漑用水の誤飲を仮定したシナリオにおいて必要とされる NoV GII 除去効率は、 10^{-6} DALY_{pppy} を採用した場合では $2.2 \log_{10}$ (95%信頼度) であるが、 10^{-4} DALY_{pppy} では $3.2 \log_{10}$ (95%信頼度) となる(表 4-4)。北島 (2008) らは、マウスノロウイルスを用いたウイルス不活化効率と塩素消毒強度の関係を調査し、ウイルス不活化効率を $1 \log_{10}$ から $2 \log_{10}$ にまで上昇させる場合、必要とされる CT 値 [残留遊離塩素濃度 (mg/L) と塩素接触時間 (min) の積] が約 25 増加することを示している(北島 et al., 2008)。言い換えれば、下水再生システムにおけるウイルス除去効率を $1 \log_{10}$ 上昇させる場合には、残留遊離塩素濃度もしくは塩素接触時間をそれぞれ約 25 mg/mL もしくは約 25 min 増加させる必要がある。このことから、腸管系ウイルスの目標除去効率の $1 \log_{10}$ の違いが、下水再生システムの運転費用に大きな影響を与えることは明らかである。したがって、下水再生利用において設定される年間許容疾病負荷については、下水再生利用を実施する地域の現状健康被害レベルや下水再生に伴う経済的負担を考慮した議論が必要となる。

下水再生水の利用シナリオで設定される曝露パラメータ（曝露量および曝露頻度）の値に関する精査についても、継続して取り組む必要がある。本研究で採用した曝露パラメータ

は、日本国内における下水再生水の農業灌漑利用を想定して設定された。農業従事者による農業灌漑用水の誤飲を仮定したシナリオ（仮定 1）では、農業従事者が農地でノズル付きホースもしくはスプリンクラーを用いて散水したと仮定し、1 回の灌漑あたり 1 mL の農業灌漑用水を誤飲するとした。年間の農業従事回数 300 回は、1 週間あたり 5 日もしくは 6 日農業従事日があると仮定し、既往の文献から報告されている値を採用した(Mara et al., 2007)。消費者による生食野菜の喫食を仮定したシナリオ（仮定 2）では、日本における 1 日あたりの生食野菜喫食量が取得できなかったことから、オランダで報告された値（38.9 g/日）を採用した(Voorrips et al., 2000)。仮定 2 では、生食野菜の収穫から喫食までの間で野菜の洗浄などによる NoV GII の除去が生じると仮定し、既往の文献から報告されている値（1.69 log₁₀）を採用した(Dawson et al., 2005; World Health Organization, 2006)。本章では、これらの曝露シナリオおよび曝露パラメータを暫定的に仮定している。下水再生水の農業灌漑利用のシナリオでは、農業形態（栽培する農作物の種類、その地域における農地の大きさなど）や、社会的および文化的背景（農作物の洗浄が義務化されている、購入した農作物の調理方法など）に大きく左右されることから、日本国内であっても普遍的なものとして使用できないことが想定される。地域の特性に基づいた利用シナリオおよび曝露パラメータを設定すること、およびパラメータ値の更新に必要な情報を蓄積することは、下水再生利用事業を実施する上で必ず求められるべきものと考えられる。

本研究では、仮定 1 および仮定 2 においてそれぞれ算出した DALY_{pppy} の値が、10⁻⁶ DALY_{pppy} もしくは 10⁻⁴ DALY_{pppy} を下回る NoV 濃度を下水再生水中許容濃度とした。また、NoV GII の目標除去効率を算出するに際し、下水再生処理後の NoV GII 濃度が下水再生水中許容濃度を下回る確率（信頼度）が 95%、99%もしくは 99.9%となるように NoV GII 目標除去効率を設定した。これらの計算過程で用いた確率は暫定的なものであり、現段階では採用根拠に欠ける値である。採用する値を 100%に近づければことで下水再生利用における安全性は向上するものの、必要とされる腸管系ウイルス除去効率は上昇する。上述したように、腸管系ウイルスの目標除去効率については、下水再生利用を実施する地域の経済的、社会的および文化的背景を考慮する必要がある、今後の進展が必要な論点であると考えられる。

本章では、仮定 1 および仮定 2 において WHO が推奨する年間許容疾病負荷 10⁻⁶ DALY_{pppy} を採用した場合、それぞれ 3.2~5.5 log₁₀（信頼度: 95~99.9%）および 2.1~4.6 log₁₀（信頼度: 95~99.9%）であった（表 5-4）。2006 年 WHO ガイドラインは、下水再生水をレタスなどの生食野菜の栽培に利用する場合には、下水再生システムにおいて原虫、細菌、ウイルスそれぞれに対し 6 log₁₀ の除去効率を達成することを推奨している(World Health Organization, 2006)。本章で得られた NoV GII 目標除去効率は、WHO が推奨する目標除去効率と比較して 1~3 log₁₀ 程度低いことが示された。WHO が推奨する目標除去効率は、下水再生利用においてロタウイルスによる微生物リスクが最も高いと仮定した上で、下水中のロタウイルス (RoV) 濃度の文献値をもとに算出された(World Health Organization, 2006)。QMRA において対象とする腸管計ウイルスの濃度や種類の違いが計算結果に影響を与えたと推察されるものの、2006 年 WHO ガイドラインは目標除去効率に使用した曝露シナリオおよび

曝露パラメータを公表していないため、明確な理由を定かにすることが出来ない状況にある。いずれにせよ、腸管系ウイルスの目標除去効率を算出する場合、一律の年間疾病負荷、曝露シナリオ、ウイルス濃度および種類を設定するのではなく、下水再生利用を実施する地域の疫学的、経済的、社会的、文化的背景に基づいて下水再生利用シナリオを定める必要がある。

5.5 結論

本研究では、未処理下水中の NoV GII 濃度のモニタリングデータと年間許容疾病負荷をもとに、下水再生水の曝露シナリオごとに下水再生システムにおける NoV GII 除去効率の目標値を算出した。結果として、農業従事者による灌漑用水の誤飲と消費者による生食野菜の喫食のシナリオにおいて、NoV GII 目標除去効率は 10^{-6} DALY_{pppy} を採用した場合にそれぞれ 3.2～5.7 log および 2.1～4.6 log が除去効率の目標値として得られた。また、 10^{-4} DALY_{pppy} を採用した場合には、それぞれのシナリオにおいて 1 log ほど低い値が得られた。QMRA を用いて腸管系ウイルスの除去効率を算出する場合、未処理下水中の腸管系ウイルス濃度のモニタリング、用量反応モデル情報の蓄積・更新、および下水再生利用を実施する地域の状況に基づいた曝露シナリオの設定に取り組む必要がある。

第 6 章

結論

6.1 本研究で得られた知見

本研究では、下水再生システムにおける微生物リスクの制御・管理に資する病原微生物除去効率の定量評価法（3 章、第 4 章）、および目標除去効率の算出法（第 5 章）の確立を目的とした。以下、各章で得られた知見をまとめ、結論とする。

6.1.1 統計学的アプローチ（ベイズ推定法）に基づいた病原微生物除去効率の定量評価法の有用性

本研究では、ベイズ推定モデルを用いて、下水中の腸管系ウイルス濃度の左側打ち切りデータからウイルス除去効率をより正確に推定するための方法論を確立した。下水処理システムにおける腸管系ウイルス除去の原理は複雑であり、下水処理プロセスユニットの運転条件やウイルスの種類により大きく左右される。本研究で提案する手法は、下水中の腸管系ウイルス濃度、検出・非検出の頻度および定量下限値のみを用いて始めに下水中ウイルス濃度分布を推定し、処理前後において得られる濃度分布の比からウイルス除去効率を確率密度分布として得るものである。下水再生システムの腸管系ウイルス除去効率に基づいて感染症リスクを評価する場合、信頼区間に最も影響を受ける。欠測値を含むデータをもとにウイルス濃度及びその除去効率を確率密度分布として表す本研究の試みは、ウイルス定量や除去の不確実性及び変動性を考慮する上で有用な手法であると考えられる。

他方で、本研究では下水処理ユニットによるウイルス除去率がウイルスの種類や運転条件に依存することを示唆する結果を得た。このことから、下水処理ユニットの製造業者（第 1 章、図 1-2）は、試運転の段階において、設置する下水処理場（下水再生利用を実施する地域）でウイルス除去効率を評価する必要があると考えられる。

6.1.2 地域的特性を考慮した目標除去効率の算定の重要性

下水再生利用を実施するに際し、下水再生システムにおいて必要と病原微生物の除去効率は、WHO ガイドラインなどに記載される値が参考値として運用されている。しかしながら、病原微生物に起因する感染症の流行には、風土的特性が示されており、また下水再生水

の利用シナリオについても、下水再生利用を実施する地域の経済的、社会的および文化的背景に大きく左右される。本研究では、下水中の腸管系ウイルス濃度を地域的特性の一つとしてみなし、流入下水中の腸管系ウイルス濃度と年間許容疾病負荷の関係から、下水再生水中許容濃度および下水再生システムにおける腸管系ウイルスの目標除去効率を算出する枠組みを確立した。下水再生水中の腸管系ウイルス許容濃度および下水再生システムにおいて必要とされる腸管系ウイルスの目標除去効率の算出は、下水中の腸管系ウイルスの濃度や種類に大きく左右されることが示唆された。また、算出された目標除去効率をある地域の下水再生利用の指針値として採用する場合には、その妥当性を評価するために下水再生利用シナリオにおいて仮定した曝露パラメータなどの情報を明確に記述する必要があると考えられる。

6.2 本研究の課題と今後の展望

6.2.1 病原微生物除去効率の定量評価法の実用に向けたベイズ推定モデルの拡張

本研究で採用したベイズ推定モデルには、尤度関数として切断対数分布が組み込まれており、下水中の微生物濃度が対数正規分布以外のパラメトリックモデルに適合する場合、第3章で提案する手法を用いることができない。他方で、本研究で用いたベイズ推定正確な除去効率分布の推定のために、ある一定以上の検出データ数を必要とすることから、下水中から得られた微生物濃度の検出データ数が低い場合、推定される除去効率分布の精度が低い、もしくは推定自体が不可能となることが考えられる。以上のことから、対数正規分布以外のパラメトリックモデルを尤度関数として用いるベイズ推定モデルを開発するとともに、モデルの計算能力を向上させるための方法を検討する必要がある。

6.2.2 病原微生物の目標除去効率を算出する上で必要とされるデータの蓄積

本研究では、日本国内における下水再生水の農業灌漑利用を想定し、モデルウイルスの選定や曝露パラメータの設定を行った。しかしながら、本研究で用いたパラメータ（曝露量、曝露頻度、信頼度など）は、暫定的なものであり、現段階では採用根拠に欠ける値である。また、QMRA に用いる用量反応モデルについても、病原微生物の新規ボランティア実験データをもとに更新され続けている。QMRA を用いて目標除去効率を算出するためには、用量反応モデルおよびモデルパラメータに関する情報の蓄積、および下水再生利用シナリオで用いる曝露パラメータの更新を継続的に取り組む必要がある。

第 2 章

既往の知見 -Appendix-

表 2-6 世界における腸管系ウイルス起因の水系感染症事例（その 1）

ウイルス	時期	国	感染源	汚染源	被害規模	参考文献
HEV	1995	ナミビア共和国	不明 (水供給システムの疑い)	不明	不明	Maila et al., 2004
EV (ECHO 30)	1997	ベラルーシ共和国	飲用水	水供給システム	461 人	Amvrosieva et al., 2006
HAV	1998	米国	緑ネギ	不明 (汚染された水の疑い)	43 人	Dentinger et al., 2001
NoV	1998	スイス	飲用水	地下水 (未処理下水の混入)	1,750 人以上	Häfliger et al., 2000
NoV GII	1998	バミューダ諸島	飲用水、飲用水	不明 (糞便汚染の疑い)	448 人以上	Brown et al., 2001
NoV GII.5	1998	フィンランド	不明	井戸	40 人	Maunula et al., 2005
NoV (GI.6 および GII.4)	1998	フィンランド	水道水	表流水	2,500 人	Maunula et al., 2005
NoV (GI.6 および GII.d)	1998	フィンランド	不明	地下水	2,000 人	Maunula et al., 2005
NoV (GI および GII)	1998	フィンランド	不明	井戸	13 人	Maunula et al., 2005
NoV GI.3	1999	フィンランド	不明	地下水	100 人	Maunula et al., 2005

表 2-6 世界における腸管系ウイルス起因の水系感染症事例（その 2）

ウイルス	時期	国	感染源	汚染源	被害規模	参考文献
NoV GI.3	1999	フィンランド	不明	井戸	60 人	Maunula et al., 2005
NoV GI.6	1999	フィンランド	不明	地下水	58 人	Maunula et al., 2005
NoV GII.4	1999	フィンランド	不明	地下水	200 人	Maunula et al., 2005
NoV	2000	イタリア	飲用水	リゾート施設の水供給システム	344 人	Boccia et al., 2002
NoV GI.3	2000	フィンランド	不明	井戸	13 人	Maunula et al., 2005
NoV (GI.3 および GII)	2000	フィンランド	不明	地下水	5,500 人	Maunula et al., 2005
NoV (GII.1 および GII.4)	2000	フィンランド	不明	地下水	300 人	Maunula et al., 2005
NoV (GI および GII), AdV, AsV serotype 1, RoV (G9[P8]および G3[P8])	2000	アルバニア共和国	不明	不明 (水供給システムの疑い)	2,722 人:通院 982 人:胃腸炎	Villena et al., 2003
NoV, RoV group A	2000	フランス	水道水の飲用	地下水 (農業排水の混入)	202 人	Gallay et al., 2006
AdV, EV, RoV group A (<i>Cryptosporidium</i> が主要な病因微生物)	2001	フランス	水道水の飲用	水供給システム (未処理下水の混入の疑い)	約 563 人	Dalle et al., 2003

表 2-6 世界における腸管系ウイルス起因の水系感染症事例（その 3）

ウイルス	時期	国	感染源	汚染源	被害規模	参考文献
NoV	2001	米国	飲用水	井戸	32 人	Anderson et al., 2003
NoV GII, AsV	2001	フィンランド	プール水	ヒト糞便による汚染	242 人以上	Maunula et al., 2004
NoV GII.b	2001	スウェーデン	飲用水	井戸 (未処理下水の混入)	200 人以上	Nygård et al., 2003
NoV (GI.3 および GII.6)	2001	米国	飲用水、飲用氷	井戸 (未処理下水の混入)	84 人	Parshionikar et al., 2003
HAV	2002	アルバニア共和国	不明 (飲用水の疑い: RoV のみ検出)	不明	210 人	Divizia et al., 2004
HAV	2002	ニュージーランド	ブルーベリー	不明 (汚染された地下水の疑い)	81 人	Calder et al., 2003
NoV	2002	オランダ	レクリエーション水 (噴水)	不明 (地下貯水槽の疑い)	100 人以下	Hoebe et al., 2004
NoV	2002	スウェーデン	飲用水	井戸 (未処理下水の混入)	175 人以上	Carrique-Mas et al., 2003
NoV	2002	ノルウェー	飲用水、シャワー水	不明 (水供給システムの疑い)	134 人	Nygård et al., 2004
NoV GII	2002	フィンランド	不明	井戸	25 人	Maunula et al., 2005

表 2-6 世界における腸管系ウイルス起因の水系感染症事例（その 4）

ウイルス	時期	国	感染源	汚染源	被害規模	参考文献
NoV GII.b	2002	フィンランド	不明	地下水	300 人	Maunula et al., 2005
NoV (GI.4, GI.6, GII.4 および GII.8)	2002	フランス	牡蠣	牡蠣養殖場 (未処理下水の混入)	127 人	Le Guyader et al., 2006
NoV (GI.4, GII.4 および GII.b)	2002	イタリア	牡蠣	牡蠣養殖場 (未処理下水の混入)	202 人	Le Guyader et al., 2006
EV (ECHO 6, ECHO 30 および Coxsackievirus B5)	2003	ベラルーシ共和国	飲用水	水供給システム	1,351 人	Amvrosieva et al., 2006
HAV	2003	米国	緑ネギ	不明 (汚染された水の疑い)	601 人	Wheeler et al., 2005
NoV	2003	フィンランド	不明	河川	40 人	Maunula et al., 2005
NoV	2003	フィンランド	不明	地下水	40 人	Maunula et al., 2005
NoV GI.6	2003	フィンランド	不明	井戸	20 人	Maunula et al., 2005
NoV GII.4	2003	フィンランド	飲用水	湖	11 人	Maunula et al., 2005
NoV GII.4	2003	フィンランド	不明	井戸	95 人	Maunula et al., 2005

表 2-6 世界における腸管系ウイルス起因の水系感染症事例（その 5）

ウイルス	時期	国	感染源	汚染源	被害規模	参考文献
NoV (GI.3, GI.6 および GII.6), RoV group A, SaV	2003	英国 (ペルシャ湾遠征中の船)	サラダ野菜	不明 (汚染された水の疑い)	37 人	Gallimore et al., 2005
HEV	2004	スーダン	不明 (塩素消毒水の飲用の疑い)	不明	2,621 人	Guthmann et al., 2006
NoV	2004	米国	飲用水	地下水 (未処理下水の混入)	1,450 人	O'Reilly et al., 2007
NoV GI	2004	韓国	飲用水	不明 (地下貯水槽の疑い)	97 人	Kim et al., 2005
NoV GII	2004	アイスランド	飲用水	汚水処理タンク	100 人以上	Gunnarsdottir et al., 2013
NoV (GI および GII)	2004	韓国	飲用水	不明 (地下貯水槽の疑い)	97 人	Kim et al., 2005
HEV (HAV, HBV の共感染の報告あり)	2005	インド	飲用水	水供給システム (未処理下水の混入)	1,611 人以上	Sarguna et al., 2007 Sailaja et al., 2009
NoV	2005	イタリア	水道水から作られた食用氷、イガイ	不明 (水供給システムの疑い)	41 人以上	Rizzo et al., 2007
NoV	2005	オーストリア	洪水	未処理下水との接触	26 人	Schmid et al., 2005
NoV (GII.4, GII.7 および GII.b)	2005	デンマーク	冷凍ラズベリー (ポーランド産)	農業灌漑用水	1,000 人以上	Falkenhorst et al., 2005

表 2-6 世界における腸管系ウイルス起因の水系感染症事例（その 6）

ウイルス	時期	国	感染源	汚染源	被害規模	参考文献
RoV	2005	インド	飲用水	水道水、河川 (地震による都市機能の低下)	1,783 人	Karmakar et al., 2008
RoV group A	2005	トルコ	飲用水	井戸	9,907 人	Koroglu et al., 2011
NoV	2006	韓国	汚染された水で調理された食物	地下水	約 3,000 人	Jung et al., 2010; Lee et al., 2014
NoV GI.5	2006	ニュージーランド	飲用水	リゾート施設の水供給システム (未処理下水の混入)	218 人	Hewitt et al., 2007
NoV GII	2006	ギリシャ	不明 (飲用水の疑い)	不明	1,640 人	Vantarakis et al., 2011
不明 (NoV の疑い)	2006	ハンガリー	不明 (飲用水の疑い)	不明 (水供給システム汚染の疑い)	3,673 人以上	Dura et al., 2010
NoV	2007	ドミニカ共和国	不明 (海水浴場の疑い)	下水処理施設からの放流水	800 人以上	Doménech-Sánchez et al., 2011
NoV	2007	フィンランド	飲用水	下水処理施設からの放流水	約 8,453 人	Laine et al., 2011
NoV GI.2	2007	米国	帯水層から供給される水道水	汚水処理タンク	229 人	Borchardt et al., 2011
NoV GII.4	2007	中国	飲用水	水供給システムの故障	43 人	He et al., 2010

表 2-6 世界における腸管系ウイルス起因の水系感染症事例（その 7）

ウイルス	時期	国	感染源	汚染源	被害規模	参考文献
NoV (GI.2 および GII.7)	2007	ベルギー	飲用水	農場の井戸	不明	ter Waarbeek et al., 2010
NoV GI	2008	スウェーデン	浄水施設から供給される飲用水	河川	約 2,400 人	Larsson et al., 2014
NoV GI.4	2008	韓国	不明 (水公園内で提供された水の疑い)	地下水	67 人	Koh et al., 2011
不明 (NoV, AdV, RoV)	2008	スロベニア共和国	飲用水	水供給システム (未処理下水の混入)	400 人以上	Kopilović et al., 2008
不明 (NoV の疑い)	2008	スイス	飲用水	下水処理施設の故障による 下水混入	126 人以上	Breitenmoser et al., 2011
NoV	2009	スペイン	不明 (飲用水、レクリエーション水の疑い)	不明	14 人	Doménech-Sánchez, 2011
NoV	2009	中国	飲用水	地下貯水槽	258 人	Li et al., 2013
NoV GI.3	2009	スウェーデン	飲用水	水供給システム(井戸)	約 200 人	Riera-Montes et al., 2011
NoV GI.4, EV	2009	イタリア	浄水施設から供給される飲用水	湖	299 人	Di Bartolo et al., 2011; Zanini et al., 2011
NoV GII.12	2009	米国	加熱が不十分な牡蠣	牡蠣養殖場	200 人以上	Alfano-Sobsey et al., 2012

表 2-6 世界における腸管系ウイルス起因の水系感染症事例（その 8）

ウイルス	時期	国	感染源	汚染源	被害規模	参考文献
NoV GII.4	2009	中国	家庭雑用水	雑用井戸	不明	Zhou et al., 2012
NoV (GI.2, GI.3, GI.13, GII.2, GII.4 および GII.17),	2009	モンテネグロ	水道水の飲用	不明 (水供給システムの疑い)	1,699 人	Werber et al., 2009
NoV (GI.7, GII.12 および GII.17)	2009	グアテマラ	飲用水	不明	92 人	Arvelo et al., 2012
NoV (GII.8, GII.9, GII.10 および GII.15)	2009	米国	不明 (飲用水の疑い)	不明	187 人	Ahmed et al., 2012
NoV	2010	中国	浄水施設から供給される飲用水	河川 (未処理下水の混入)	391 人	Yang et al., 2011
NoV	2010	デンマーク	レタス (フランス産)	不明 (汚染された水の疑い)	260 人	Ethelberg et al., 2010
NoV GII.4	2010	アルバニア共和国	不明 (飲用水の疑い)	不明	815 人	Donia et al., 2011
NoV GI および NoV GII	2010	アイルランド	牡蠣	不明 (汚染された牡蠣養殖場の疑い)	約 70 人	Rajko-Nenow et al., 2014
NoV (GI および GII)	2010	英国	牡蠣 (英国産、スコットランド産、アイルランド産)	牡蠣養殖場	120 人以上	Westrell et al., 2010
NoV (GI および GII)	2010	デンマーク	牡蠣 (フランス産)	牡蠣養殖場	58 人以上	Westrell et al., 2010

表 2-6 世界における腸管系ウイルス起因の水系感染症事例（その 9）

ウイルス	時期	国	感染源	汚染源	被害規模	参考文献
不明 [NoV (GI および GII), RoV の疑い]	2010	ベルギー	飲用水	河川	603 人以上	Braeye et al., 2015
不明[NoV (GI および GII) の疑い]	2010	スウェーデン	不明 [牡蠣(オランダ産、フランス産)の疑い]	牡蠣養殖場	50 人	Westrell et al., 2010
不明[NoV (GI および GII) の疑い]	2010	ノルウェー	不明 [牡蠣(フランス産)の疑い]	牡蠣養殖場	39 人	Westrell et al., 2010
不明[NoV (GI および GII) の疑い]	2010	フランス	不明 [牡蠣(フランス産)の疑い]	牡蠣養殖場	67 人	Westrell et al., 2010
NoV GI.3	2011	韓国	キャベツキムチ	調理に使われた地下水	451 人	Cho et al., 2014
NoV GI.4	2011	イタリア	河川水の飲用	下水処理施設からの放流水	33 人	Di Bartolo et al., 2015
NoV GII.4	2011	イタリア	飲用水	水供給システム (井戸、湧水)	156 人	Giammanco et al., 2014
NoV GII.17	2012	韓国	不明	調理に使われた地下水	22 人	Cho et al., 2014
NoV GII.2	2012	韓国	不明 (レストランの飲用水、調理用水の疑い)	地下水	76 人	Cho et al., 2014
NoV GII.4	2012	デンマーク	水道水	下水管からの漏水	不明	Van Alphen et al., 2014

表 2-6 世界における腸管系ウイルス起因の水系感染症事例（その 10）

ウイルス	時期	国	感染源	汚染源	被害規模	参考文献
NoV GII.4	2012	フィンランド	不明 (汚染された環境からの感染の疑い)	不明	23 人	Polkowska et al., 2014
NoV GI および NoV GII	2012	アイルランド	牡蠣	不明 (汚染された牡蠣養殖場の疑い)	18 人	Rajko-Nenow et al., 2014
NoV (GI.3, GI.4 GI.9, GII.6, GII.7, GII.8, GII.P7_II.6 および GII.P16_II.14)	2012	ドイツ	冷凍イチゴ(中国産)	下水に汚染された農業灌漑用水	約 11,000 人	Bernard et al., 2014; Höhne et al., 2015
NoV (GI および GII)	2012	ニュージーランド	飲用水	河川 (下水処理施設からの放流水)	53 人	Jack et al., 2013
RoV (G2[P8]および G3[P8])	2012	ギリシャ	水道水	不明 (未処理下水混入の疑い)	3,600 人以上	Mellou et al., 2014
不明 (SaV の疑い)	2012	フィンランド	飲用水	水供給システムの故障	不明	Jalava et al., 2014
不明[NoV (GI および GII), AdV の疑い]	2012	ギリシャ	不明(水系感染症の疑い)	不明	79 人以上	Mellou et al., 2013
Nov, RoV	2013	スペイン	飲用水	工業用水	238 人	Altzibar et al., 2015
NoV (GI.1, GI.2, GI.3, GI.4, GI.8, GI.9 および GII.17)	2014	中国	汚染された水で調理された食物	不明 (客船の貯水槽の疑い)	51 人	Wang et al., 2016
NoV (GI.1, GI.2, GI.6, GII.4, GII.6 および GII.13)	2014	中国	飲用水	不明 (汚水処理タンク、下水管の疑い)	1,614 人	Zhou et al., 2016

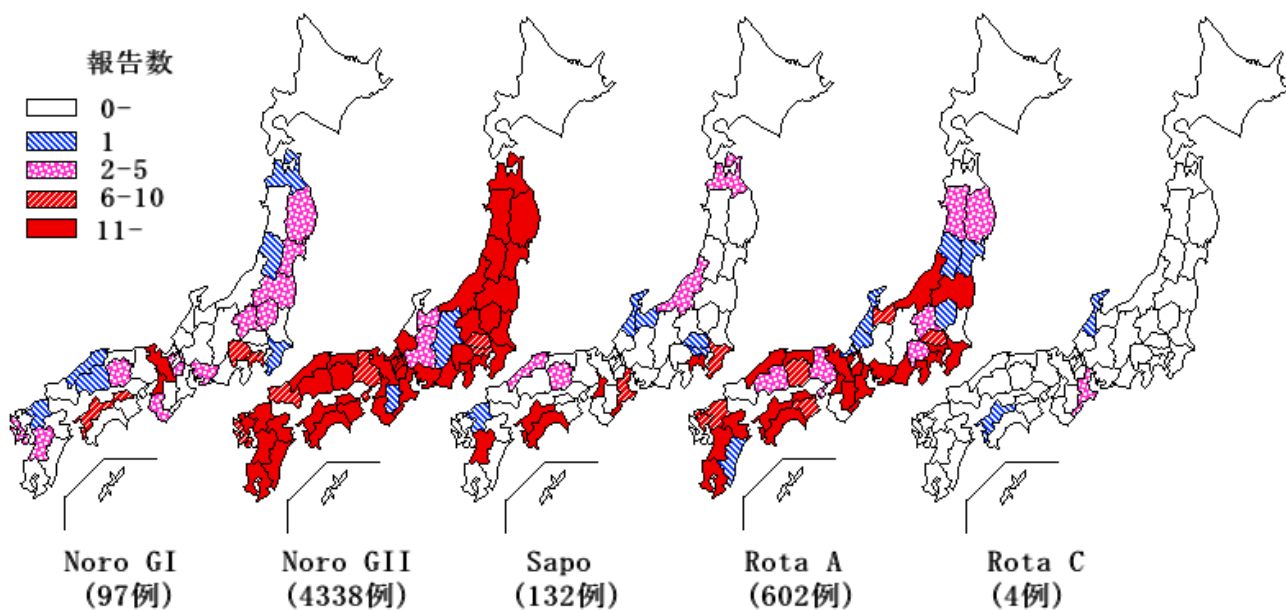


図 2-9 日本国内における都道府県別腸管系ウイルス検出報告数（2006/2007 シーズン）
 (National Institute of Infectious Disease, 2017 より抜粋)

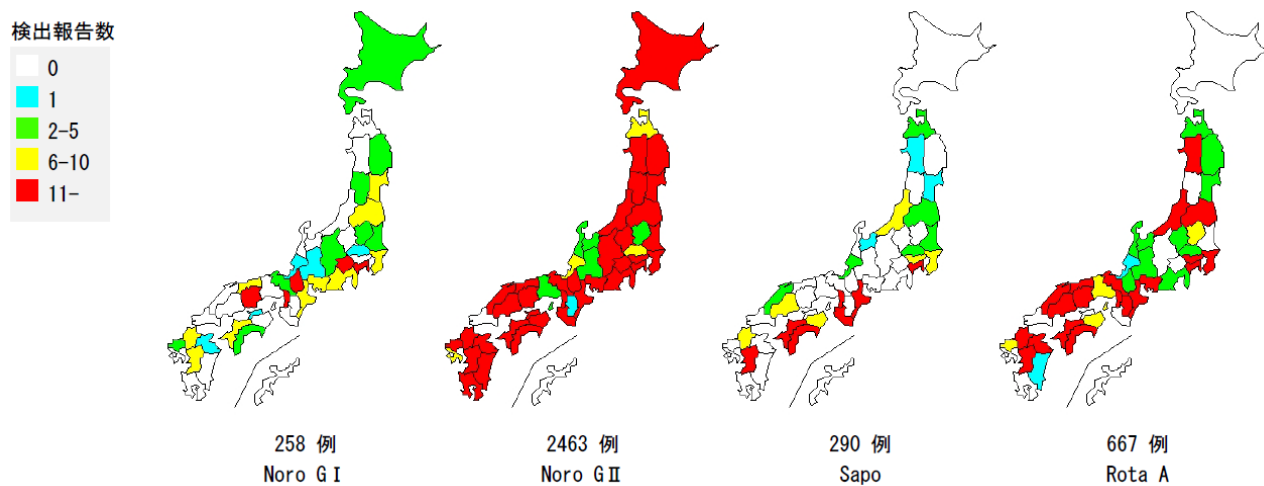


図 2-9 日本国内における都道府県別腸管系ウイルス検出報告数（2007/2008 シーズン）
 (National Institute of Infectious Disease, 2017 より抜粋)

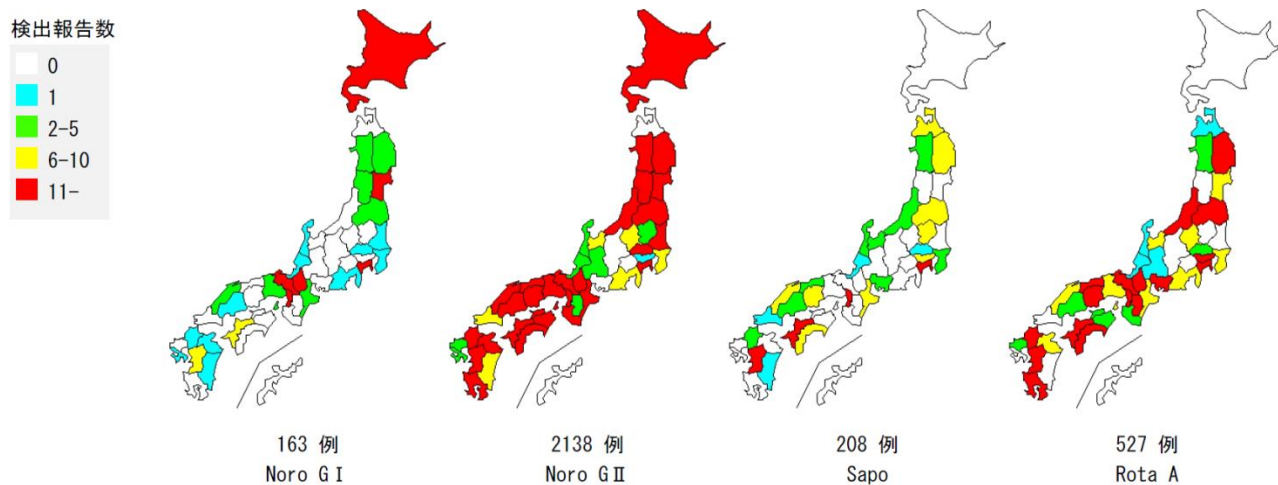


図 2-9 日本国内における都道府県別腸管系ウイルス検出報告数（2008/2009 シーズン）
（National Institute of Infectious Disease, 2017 より抜粋）

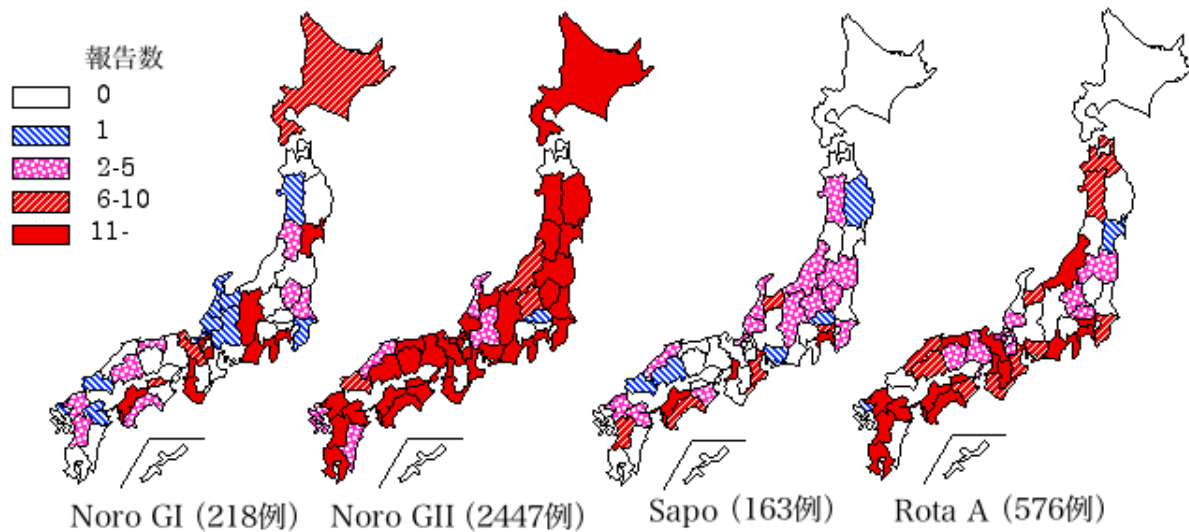


図 2-9 日本国内における都道府県別腸管系ウイルス検出報告数（2009/2010 シーズン）
（National Institute of Infectious Disease, 2017 より抜粋）

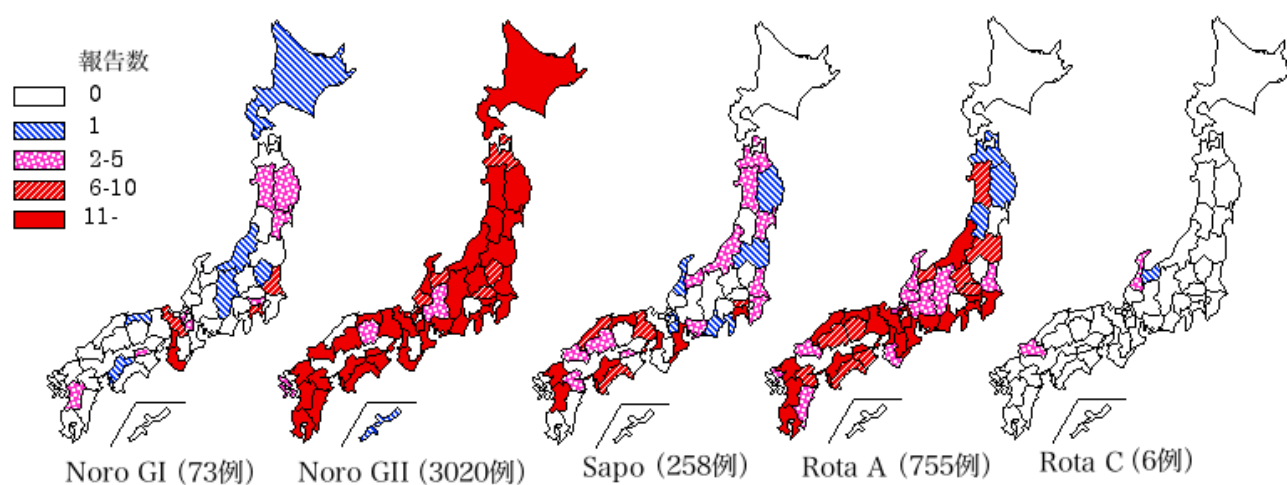


図 2-9 日本国内における都道府県別腸管系ウイルス検出報告数（2010/2011 シーズン）
 (National Institute of Infectious Disease, 2017 より抜粋)

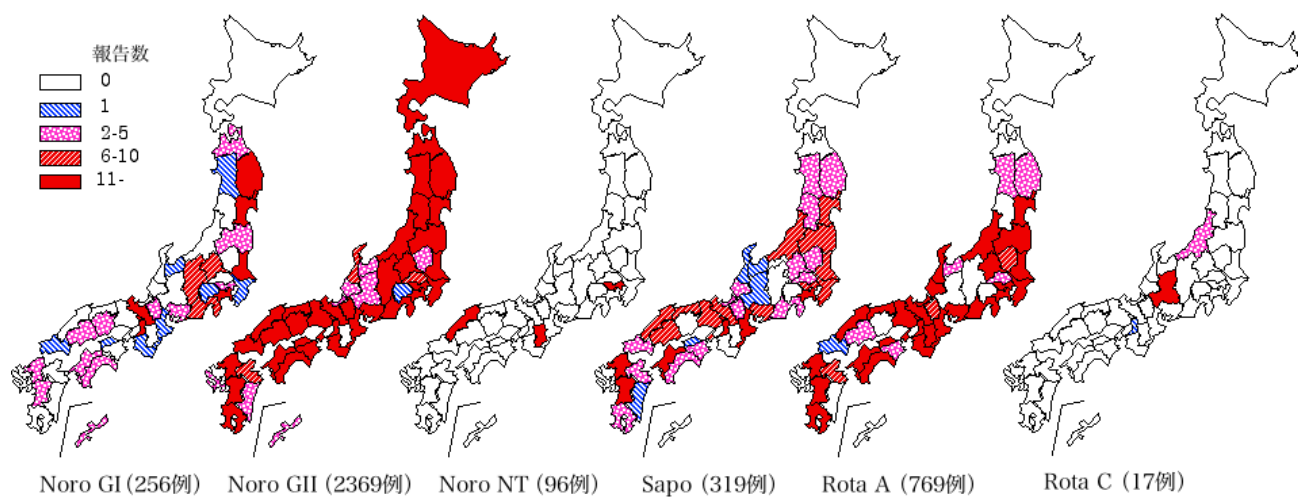


図 2-9 日本国内における都道府県別腸管系ウイルス検出報告数（2011/2012 シーズン）
 (National Institute of Infectious Disease, 2017 より抜粋)

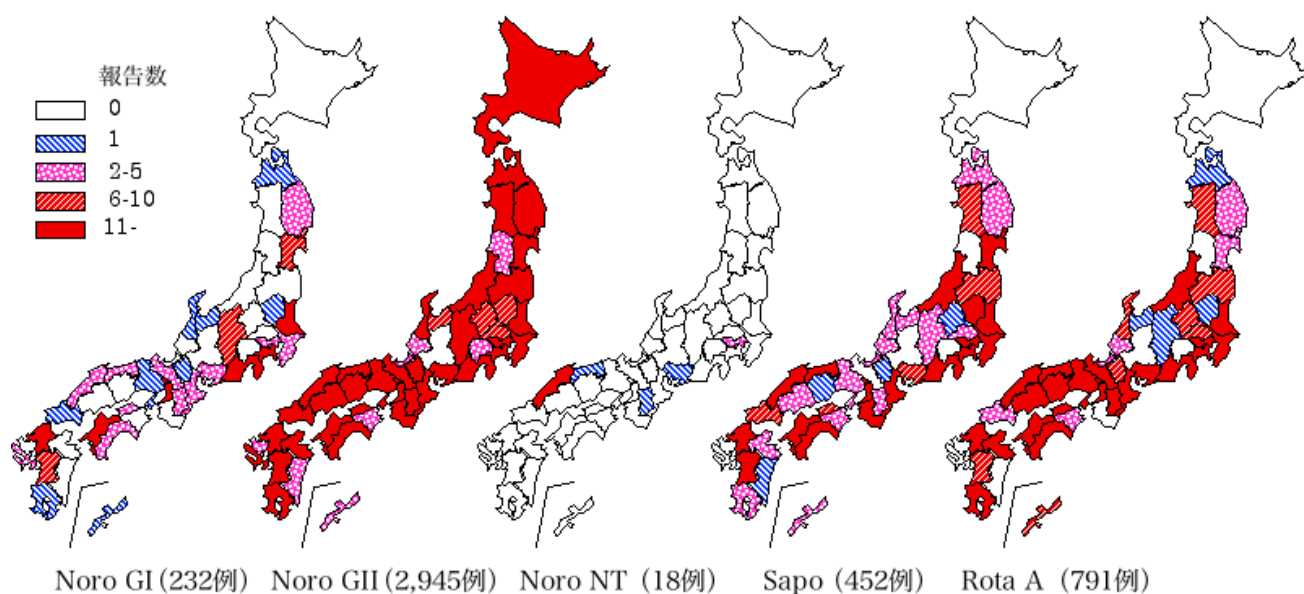


図 2-9 日本国内における都道府県別腸管系ウイルス検出報告数（2012/2013 シーズン）
 (National Institute of Infectious Disease, 2017 より抜粋)

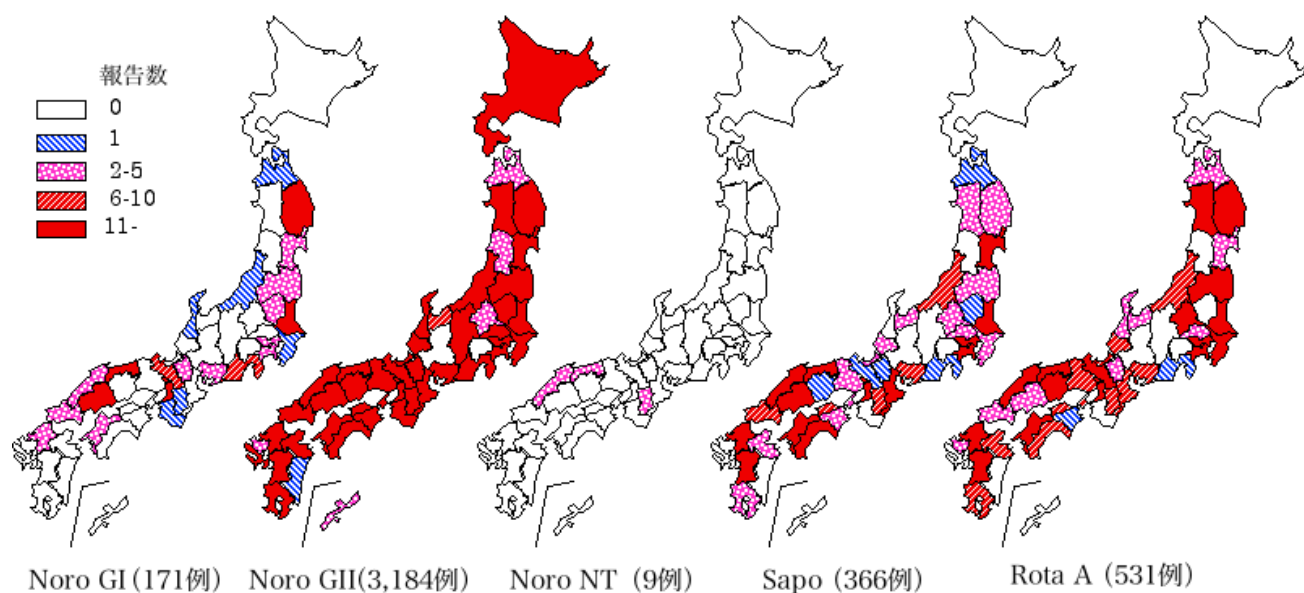


図 2-9 日本国内における都道府県別腸管系ウイルス検出報告数（2013/2014 シーズン）
 (National Institute of Infectious Disease, 2017 より抜粋)

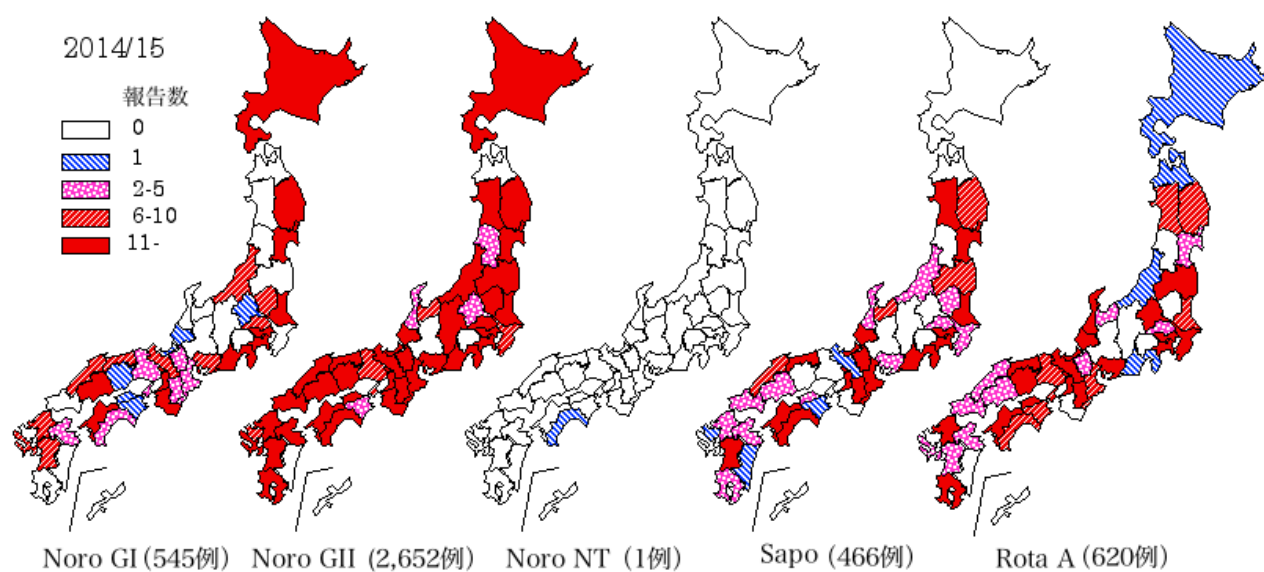


図 2-9 日本国内における都道府県別腸管系ウイルス検出報告数（2014/2015 シーズン）
 （National Institute of Infectious Disease, 2017 より抜粋）

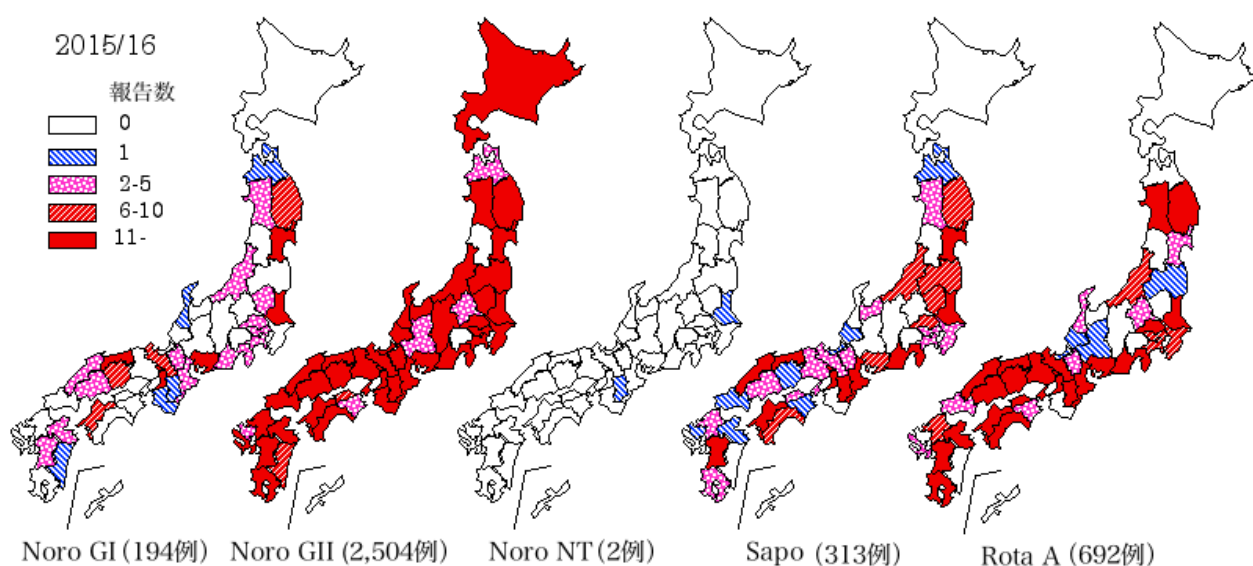


図 2-9 日本国内における都道府県別腸管系ウイルス検出報告数（2015/2016 シーズン）
 （National Institute of Infectious Disease, 2017 より抜粋）

参考文献

- [1] Acar, J., Röstel, B., 2001. Antimicrobial resistance: an overview. *Rev. Sci. Tech. Int. des Epizoot.* 20, 797–810.
- [2] Adapa, S., Bhullar, N., De Souza, S.V., 2016. A systematic review and agenda for using alternative water sources for consumer markets in Australia. *J. Clean. Prod.* 124, 14–20. doi:10.1016/j.jclepro.2016.02.083
- [3] Ahmed, S.F., Klena, J.D., Mostafa, M., Dogantemur, J., Middleton, T., Hanson, J., Sebeny, P.J., 2012. Viral gastroenteritis associated with genogroup II norovirus among U.S. military personnel in Turkey, 2009. *PLoS One* 7, 3–8. doi:10.1371/journal.pone.0035791
- [4] Alfano-Sobsey, E., Sweat, D., Hall, A., Breedlove, F., Rodriguez, R., Greene, S., Pierce, A., Sobsey, M., Davies, M., Ledford, S.L., 2012. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiol. Infect.* 140, 276–82. doi:10.1017/S0950268811000665
- [5] Aloush, V., Navon-venezia, S., Seigman-igra, Y., Cabili, S., Carmeli, Y., 2006. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 43–48. doi:10.1128/AAC.50.1.43
- [6] Altzibar, J.M., Zigorraga, C., Rodriguez, R., Leturia, N., Garmendia, A., Rodriguez, A., Alkorta, M., Arriola, L., 2015. Outbreak of acute gastroenteritis caused by contamination of drinking water in a factory, the Basque Country. *J. Water Health* 13, 168–173. doi:10.2166/wh.2014.048
- [7] Amvrosieva, T. V., Paklonskaya, N. V., Biazruchka, A.A., Kazinetz, O.N., Bohush, Z.F., Fisenko, E.G., 2006. Enteroviral infection outbreak in the Republic of Belarus: Principal characteristics and phylogenetic analysis of etiological agents. *Cent. Eur. J. Public Health* 14, 67–73.
- [8] Anderson, A.D., Heryford, A.G., Sarisky, J.P., Higgins, C., Monroe, S.S., Beard, R.S., Newport, C.M., Cashdollar, J.L., Fout, G.S., Robbins, D.E., Seys, S.A., Musgrave, K.J., Medus, C., Vinjé, J., Bresee, J.S., Mainzer, H.M., Glass, R.I., 2003. A waterborne outbreak of Norwalk-like virus among snowmobilers-Wyoming, 2001. *J. Infect. Dis.* 187, 303–306. doi:doi: 10.1086/346239
- [9] Angelakis, A., Gikas, P., 2014. Water reuse: Overview of current practices and trends in the world with emphasis on EU states. *Water Util. J.* 8, 67–78.
- [10] Apostolidis, N., Hertle, C., Young, R., 2011. Water recycling in Australia. *Water* 3, 869–881. doi:10.3390/w3030869
- [11] Arvelo, W., Sosa, S.M., Juliao, P., López, M.R., Estevéz, A., López, B., Morales-Betoulle, M.E., González, M., Gregoricus, N.A., Hall, A.J., Vinje, J., Parashar, U., Lindblade, K.A., 2012. Norovirus outbreak of probable waterborne transmission with high attack rate in a Guatemalan resort. *J. Clin. Virol.* 55, 8–11. doi:10.1016/j.jcv.2012.02.018

- [12] Asano, T., Burton, F.L., Leverenz, H.L., Tsuchihashi, R., Tchobanoglous, G., 2007. *Water Reuse: Issues, Technologies, and Applications*. Metcalf & Eddy/AECOM and McGraw Hill, New York, NY.
- [13] Asano, T., Leong, L., Rigby, M., 1992. Evaluation of the California wastewater reclamation criteria using enteric virus monitoring data. *Water Sci.*
- [14] Asano, T., Maeda, M., Takaki, M., 1996. Wastewater reclamation and reuse in Japan: Overview and implementation examples. *Water Sci. Technol.* 34, 219–226.
- [15] Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Ramani, S., Hill, H., Ferreira, J., Graham, D.Y., 2014. Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. *J. Infect. Dis.* 209, 1016–22. doi:10.1093/infdis/jit620
- [16] Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Ramani, S., Hill, H., Ferreira, J., Graham, D.Y., 2014. Determination of the 50% human infectious dose for norwalk virus. *J. Infect. Dis.* 209, 1016–1022. doi:10.1093/infdis/jit620
- [17] Attwater, R., Anderson, L., Derry, C., 2016. Agricultural risk management of a peri-urban water recycling scheme to meet mixed land-use needs. *Agric. Water Manag.* 176, 266–269. doi:10.1016/j.agwat.2016.05.025
- [18] Au, K.K., 2004. *Water treatment and pathogen control: Process efficiency in achieving safe drinking-water*. IWA Publishing.
- [19] Bagheri, H.R., Shafiei, R., Shafiei, F., Sajjadi, S.A., 2012. Isolation of *Acanthamoeba* Spp. from Drinking Waters in Several Hospitals of Iran. *Iran. J. Parasitol.* 5, 19–25.
- [20] Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. *Water Res.* 45, 6603–6614. doi:10.1016/j.watres.2011.10.013
- [21] Bartsch, S.M., Lopman, B.A., Ozawa, S., Hall, A.J., Lee, B.Y., 2016. Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *PLoS One* 11, e0151219. doi:10.1371/journal.pone.0151219
- [22] Beer, K.D., Gargano, J.W., Roberts, V.A., Hill, V.R., Garrison, L.E., Kutty, P.K., Hilborn, E.D., Wade, T.J., Fullerton, K.E., Yoder, J.S., 2015. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water—United States,. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 64, 842–848.
- [23] Beg, A., Kharal, T.H., 2010. Frequency of Risk Factors for Hepatitis B (HBV) and Hepatitis C Virus (HCV). *Ann Pak Inst Med Sci* 6, 161–163.
- [24] Bernard, H., Faber, M., Wilking, H., Haller, S., Höhle, M., Schielke, A., Ducomble, T., Siffczyk, C., Merbecks, S.S., Fricke, G., Hamouda, O., Stark, K., Werber, D., Outbreak Investigation Team, 2014. Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012. *Euro Surveill.* doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.8.20719
- [25] Bhattacharya, A., 1943. On a measure of divergence between two statistical populations

- defined by their probability distribution. *Bull. Calcutta Math. Soc.* 35, 99–110.
- [26] Bluefield Research, 2016. Water Reuse Gains Momentum In U.S. Amid Drought, Water Scarcity.
 - [27] BlueTech Research, 2016. Water Reuse and Alternative Water [WWW Document]. URL <http://inside.bluetechresearch.com/streams/practice-area/waterreuse/> (accessed 12.31.16).
 - [28] Boccia, D., Tozzi, A.E., Benvon, C., Rizzo, C., Russo, T., Buttinelli, G., Caprioli, A., Marziano, M.L., Ruggeri, F.M., 2002. Waterborne outbreak of norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 563–568. doi:10.3201/eid0806.010371
 - [29] Borchardt, M.A., Bradbury, K.R., Alexander, E.C., Kolberg, R.J., Alexander, S.C., Archer, J.R., Braatz, L.A., Forest, B.M., Green, J.A., Spencer, S.K., 2011. Norovirus Outbreak Caused by a New Septic System in a Dolomite Aquifer. *Ground Water* 49, 85–97. doi:10.1111/j.1745-6584.2010.00686.x
 - [30] Bosch, A., Guix, S., Sano, D., Pinto, R.M., 2008. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. doi:10.1016/j.copbio.2008.04.006
 - [31] Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M.H., Héchard, Y., 2007. Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles: Brief report. *Environ. Microbiol.* 9, 1341–1344. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01229.x
 - [32] Braeye, T., DE Schrijver, K., Wollants, E., van Ranst, M., Verhaegen, J., 2015. A large community outbreak of gastroenteritis associated with consumption of drinking water contaminated by river water, Belgium, 2010. *Epidemiol. Infect.* 143, 711–9. doi:10.1017/S0950268814001629
 - [33] Brassard, J., Gagné, M.J., Gagné, M., Côté, C., 2012. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3763–3766. doi:10.1128/AEM.00251-12
 - [34] Breitenmoser, A., Fretz, R., Schmid, J., Besl, A., Etter, R., 2011. Outbreak of acute gastroenteritis due to a washwater-contaminated water supply, Switzerland, 2008. *J. Water Health* 9, 569–576. doi:10.2166/wh.2011.158
 - [35] Bridle, H., 2013. Overview of waterborne pathogens, in: Bridle, H. (Ed.), *Waterborne Pathogens: Detection Methods and Applications*. Newnes, pp. 9–40.
 - [36] Brown, C.M., Cann, J.W., Simons, G., Fankhauser, R.L., Thomas, W., Parashar, U.D., Lewis, M.J., 2001. Outbreak of Norwalk virus in a Caribbean island resort: application of molecular diagnostics to ascertain the vehicle of infection. *Epidemiol. Infect.* 126, 425–432. doi:10.1017/S0950268801005556
 - [37] Brumfitt, W., Hamilton-Miller, J., 1989. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 320, 1188–1196. doi:10.1056/NEJM198905043201806
 - [38] Buesa, J., Collado, B., López-Andújar, P., Abu-Mallouh, R., Diaz, J.R., Diaz, A.G., Prat, J., Guix, S., Llovet, T., Prats, G., Bosch, A., 2002. Molecular Epidemiology of Caliciviruses

Causing Outbreaks and Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Spain Molecular Epidemiology of Caliciviruses Causing Outbreaks and Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2854–2859. doi:10.1128/JCM.40.8.2854

- [39] Bull, R. a, Hansman, G.S., Clancy, L.E., Tanaka, M.M., Rawlinson, W.D., White, P.A., 2005. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1079–1085. doi:10.3201/eid1107.041273
- [40] Calder, L., Simmons, G., Thornley, C., Taylor, P., Pritchard, K., Greening, G., Bishop, J., 2003. An outbreak of hepatitis A associated with consumption of raw blueberries. *Epidemiol. Infect.* 131, 745–751. doi:10.1017/S0950268803008586
- [41] California Department of Water Resources, 2012. Municipal Recycled Water: Volume 3 Resource Management Strategies.
- [42] California Department of Water Resources, 2008. California Geography And Its Water Needs [WWW Document]. URL <http://www.water.ca.gov/swp/geography.cfm> (accessed 12.27.16).
- [43] California Department of Water Resources Recycled Water Task Force, 2003. Water Recycling 2030: Recommendations of California’s Recycled Water Task Force.
- [44] California State Water Resources Control Board, 2015. Regulations related to recycled water.
- [45] California State Water Resources Control Board, 2014. 2009 Water Recycling Survey Results by Regional Board_Type of Use [WWW Document]. URL http://www.swrcb.ca.gov/about_us/performance_report_1314/plan_assess/12515_ww_recycling.shtml (accessed 12.31.16).
- [46] Carrique-Mas, J., Andersson, Y., Petersén, B., Hedlund, K.O., Sjögren, N., Giesecke, J., 2003. A norwalk-like virus waterborne community outbreak in a Swedish village during peak holiday season. *Epidemiol. Infect.* 131, 737–744. doi:10.1017/S0950268803008604
- [47] Casadevall, A., Pirofski, L., 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* 67, 3703–3713.
- [48] Casadevall, A., Pirofski, L.A., 2000. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.* 68, 6511–6518. doi:10.1128/IAI.68.12.6511-6518.2000.Updated
- [49] Centers for Disease Control and Prevention, 2016. No Title.
- [50] Cetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C.G., 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 686–707. doi:10.1128/CMR.13.4.686-707.2000
- [51] Chang, D., Ma, Z., 2012. Wastewater reclamation and reuse in Beijing: Influence factors and policy implications. *Desalination* 297, 72–78. doi:10.1016/j.desal.2012.04.019
- [52] Chang, J.C.H., Ossoff, S.F., Lobe, D.C., Dorfman, M.H., Dumais, C.M., Qualls, R.G., Johnson, J.D., 1985. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1361–1365.
- [53] Chiba, S., Nakata, S., Numata-Kinoshita, K., Honma, S., 2000. Sapporo virus: history and recent findings. *J. Infect. Dis.* 181(Supple, S303–S308. doi:10.1086/315574

- [54] Cho, H.G., Lee, S.G., Kim, W.H., Lee, J.S., Park, P.H., Cheon, D.S., Jheong, W.H., Jho, E.H., Lee, J.B., Paik, S.Y., 2014. Acute gastroenteritis outbreaks associated with ground-waterborne norovirus in South Korea during 2008-2012. *Epidemiol. Infect.* 142, 2604–9. doi:10.1017/S0950268814000247
- [55] Chomel, B.B., 2015. Diseases Transmitted by Less Common House Pets. *Microbiol. Spectr.* 3, 479–487. doi:10.1097/00006454-199206000-00011
- [56] Chomel, B.B., 1992. Zoonoses of house pets other than dogs, cats and birds. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11, 479–487.
- [57] Christou, L., 2011. The global burden of bacterial and viral zoonotic infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 326–330. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03441.x
- [58] Coico, R., 2001. Gram Staining. *Curr. Protoc. Immunol.* 23, A.30.1–A.30.2.
- [59] Colombo, A. V., Barbosa, G.M., Higashi, D., di Micheli, G., Rodrigues, P.H., Simionato, M.R.L., 2013. Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* in human oral epithelial cells from subjects with periodontitis and periodontal health. *J. Med. Microbiol.* 62, 1592–1600. doi:10.1099/jmm.0.055830-0
- [60] Community, Q. wiki, 2017. QMRAwiki [WWW Document]. URL [http://qmrawiki.canr.msu.edu/index.php/Quantitative_Microbial_Risk_Assessment_\(QMRA\)_Wiki](http://qmrawiki.canr.msu.edu/index.php/Quantitative_Microbial_Risk_Assessment_(QMRA)_Wiki) (accessed 1.11.17).
- [61] Craun, G.F., 2012. The importance of waterborne disease outbreak surveillance in the United States. *Ann. Ist. Super. Sanita* 48, 447–459. doi:10.4415/ANN_12_04_11
- [62] Cray, W.C., Moon, H.W., 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157: H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1586–1590.
- [63] Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38. doi:10.1038/nrmicro2265
- [64] Da Silva, A.K., Le Saux, J.C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors of genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7891–7897. doi:10.1128/AEM.01428-07
- [65] Dalle, F., Roz, P., Dautin, G., Di-Palma, M., Kohli, E., Sire-Bidault, C., Fleischmann, M.G., Gallay, A., Carbonel, S., Bon, F., Tillier, C., Beaudeau, P., Bonnin, A., 2003. Molecular characterization of isolates of waterborne *Cryptosporidium* spp. Collected during an outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2690–2693. doi:10.1128/Jcm.41.6.2690-2693.2003
- [66] Dawson, D.J., Paish, A., Staffell, L.M., Seymour, I.J., Appleton, H., 2005. Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for norovirus. *J. Appl. Microbiol.* 98, 203–209. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02439.x
- [67] De Jonckheere, J., Van de Voorde, H., 1976. Differences in Destruction of Cysts of Pathogenic and Nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by Chlorine. *Appl. Environ.*

Microbiol. 31, 294–297.

- [68] Dentinger, C.M., Bower, W.A., Nainan, O. V, Cotter, S.M., Myers, G., Dubusky, L.M., Fowler, S., Salehi, E.D.P., Bell, B.P., 2001. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *J. Infect. Dis.* 183, 1273–1276. doi:10.1086/319688
- [69] Denyer, D., Transfield, D., 2009. Producing a systematic review, in: Buchanan, D., Bryman, A. (Eds.), *The SAGE Handbook of Organizational Research Methods*. Sage Publications Ltd, London, pp. 671–689.
- [70] Di Bartolo, I., Monini, M., Losio, M.N., Pavoni, E., Lavazza, A., Ruggeri, F.M., 2011. Molecular characterization of noroviruses and rotaviruses involved in a large outbreak of gastroenteritis in Northern Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5545–5548. doi:10.1128/AEM.00278-11
- [71] Di Bartolo, I., Pavoni, E., Tofani, S., Consoli, M., Galuppini, E., Losio, M.N., Ruggeri, F.M., Varisco, G., 2015. Waterborne norovirus outbreak during a summer excursion in Northern Italy. *New Microbiol.* 38, 109–112.
- [72] Divizia, M., Gabrieli, R., Donia, D., Macaluso, A., Bosch, A., Guix, S., Villena, C., Palombi, L., Buonomo, E., Cenko, F., Leno, L., Bebeci, D., Bino, S., 2004. Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Sci. Technol.* 50, 57–61.
- [73] Dizer, H., Brackmann, B., Rahman, M.A., Szewzyk, R., Sprenger, C., Holzbecher, E., López-Pila, J.M., 2015. Virus removal vs. subsurface water velocity during slow sand filtration. *J. Water Health* 13, 371–382. doi:10.2166/wh.2014.086
- [74] Doménech-Sánchez, A., 2011. Gastroenteritis outbreak caused by norovirus associated with the children's club of a hotel located in Majorca, Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 949–951. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03342.x
- [75] Doménech-Sánchez, A., Juan, C., Pérez, J.L., Berrocal, C.I., 2011. Unmanageable norovirus outbreak in a single resort located in the Dominican Republic. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 952–954. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03411.x
- [76] Donia, D., Kota, M., Leno, L., Ylli, A., Cenko, F., Divizia, M., 2011. First outbreak of norovirus in Albania. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 283–287. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03104.x
- [77] Dura, G., Pándics, T., Kádár, M., Krisztalovics, K., Kiss, Z., Bodnár, J., Asztalos, Á., Papp, E., 2010. Environmental health aspects of drinking water-borne outbreak due to karst flooding: Case study. *J. Water Health* 8, 513–520. doi:10.2166/wh.2010.099
- [78] Eastern Metropolitan Regional Council, 2011. Reuse of Greywater in Western Australia : Discussion paper.
- [79] Eiklid, K., Olsnes, S.J.U.R., 1983. Animal toxicity of *Shigella dysenteriae* cytotoxin: evidence that the neurotoxic, enterotoxic, and cytotoxic activities are due to one toxin. *J. Immunol.* 130, 380–384.
- [80] Eisenhart, C., Wilson, P.W., 1943. *Statistical Methods and Control in Bacteriology*.

Microbiol. Mol. Biol. Rev. 7, 57–137.

- [81] Environmental News Network, 2013. Climate Change News: Grey Water [WWW Document]. URL <http://www.enn.com/climate/article/45578> (accessed 1.6.17).
- [82] Environment Protection Agency Victoria, 2005. Guidelines for environmental management: dual pipe water recycling schemes—health and environmental risk management. Southbank, Victoria.
- [83] Environment Protection Agency Victoria, 2003. Guidelines for environmental management: use of reclaimed water.
- [84] Ethelberg, S., Lisby, M., Böttiger, B., Schultz, A.C., Villif, A., Jensen, T., Olsen, K.E., Scheutz, F., Kjelsø, C., Müller, L., 2010. Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. *Eurosurveillance* 15, 1. doi:19484 [pii]
- [85] European Commission, 2010. Water Framework Directive.
- [86] European Environment Agency, 2014. Horizon 2020 Mediterranean report. Toward shared environmental information systems 146. doi:10.2800/13326
- [87] European Food Safety Authority, 2010. Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. *Eur. Food Saf. Auth. J.* 8, 1–96. doi:10.2903/j.efsa.2010.1557.
- [88] Falkenhorst, G., Krusell, L., Lisby, M., Madsen, S.B., Böttiger, B., Mølbak, K., 2005. Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 10, E050922-2.
- [89] Florida Department of Environmental Protection, 2016. Florida’s Reuse Activities [WWW Document]. URL <http://www.dep.state.fl.us/water/reuse/activity.htm> (accessed 12.28.16).
- [90] Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. International water issues - AQUASTAT [WWW Document]. URL http://www.fao.org/nr/water/aquastat/countries_regions/Profile_segments/MYS-IntIss_eng.stm
- [91] Frenck, R., Bernstein, D.I., Xia, M., Huang, P., Zhong, W., Parker, S., Dickey, M., McNeal, M., Jiang, X., 2012. Predicting susceptibility to norovirus GII.4 by use of a challenge model involving humans. *J. Infect. Dis.* 206, 1386–1393. doi:10.1093/infdis/jis514
- [92] Gallay, A., De Valk, H., Cournot, M., Ladeuil, B., Hemery, C., Castor, C., Bon, F., Mégraud, F., Le Cann, P., Desenclos, J.C., 2006. A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 561–570. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01441.x
- [93] Gallimore, C.I., Pipkin, C., Shrimpton, H., Green, a D., Pickford, Y., McCartney, C., Sutherland, G., Brown, D.W.G., Gray, J.J., 2005. Detection of multiple enteric virus strains within a foodborne outbreak of gastroenteritis: an indication of the source of contamination. *Epidemiol. Infect.* 133, 41–47. doi:10.1017/S0950268804003218
- [94] Garrido, R.S.J., Aguado, J.M., Díaz-Pedroche, C., Len, O., Montejo, M., Moreno, A., Gurguí,

- M., Torre-Cisneros, J., Pareja, F., Segovia, J., Garcia, M., Lumbreras, C., 2006. A review of critical periods for opportunistic infection in the new transplantation era. *Transplantation* 82, 1457–1462. doi:10.1097/01.tp.0000245676.43979.86
- [95] Giammanco, G.M., Di Bartolo, I., Purpari, G., Costantino, C., Rotolo, V., Spoto, V., Geraci, G., Bosco, G., Petralia, A., Guercio, A., Macaluso, G., Calamusa, G., De Grazia, S., Ruggeri, F.M., Vitale, F., Maida, C.M., Mammina, C., 2014. Investigation and control of a Norovirus outbreak of probable waterborne transmission through a municipal groundwater system. *J. Water Health* 12, 452–464. doi:10.2166/wh.2014.227
- [96] Gibson, K.E., 2014. Viral pathogens in water: Occurrence, public health impact, and available control strategies. *Curr. Opin. Virol.* 4, 50–57. doi:10.1016/j.coviro.2013.12.005
- [97] Glass, R.I., Parashar, U.D., Estes, M.K., 2009. Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 361, 1776–1785. doi:10.1056/NEJMra0804575
- [98] Gold, H.S., Moellering Jr, R.C., 1996. Antimicrobial-drug resistance. *N. Engl. J. Med.* 335, 1445–1453.
- [99] Gunnarsdottir, M.J., Gardarsson, S.M., Andradottir, H.O., 2013. Microbial contamination in groundwater supply in a cold climate and coarse soil: case study of norovirus outbreak at Lake Mývatn, Iceland. *Hydrol. Res.* 44, 1114–1128. doi:10.2166/nh.2013.076
- [100] Guthmann, J.-P.P., Klovstad, H., Boccia, D., Hamid, N., Pinoges, L., Nizou, J.-Y.Y., Tatay, M., Diaz, F., Moren, A., Grais, R.F., Ciglenecki, I., Nicand, E., Guerin, P.J., 2006. A Large outbreak of Hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan: The role of water treatment methods. *Clin. Infect. Dis.* 42, 1685–1691. doi:10.1086/504321
- [101] Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C.P., 2014. Quantitative microbial risk assessment: 2nd edition. John Wiley & Sons, Inc.
- [102] Häfliger, D., Hübner, P., Lüthy, J., 2000. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *Int. J. Food Microbiol.* 1, 123–126. doi:10.1016/S0168-1605(99)00176-2
- [103] Hata, A., Kitajima, M., Katayama, H., 2013. Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 114, 545–554. doi:10.1111/jam.12051
- [104] He, Y.Q., Ma, H.W., Yao, X.J., Bu, Q.L., Yang, H., Huang, W., Duan, Y.X., Zhang, H.L., Dai, C.W., Li, W.K., Yu, S.Y., 2010. Norovirus Gastroenteritis Outbreak is Associated with Contaminated Drinking Water in South China. *Food Environ. Virol.* 2, 207–210. doi:10.1007/s12560-010-9047-0
- [105] Helsel, D.R., 2006. Fabricating data: how substituting values for nondetects can ruin results, and what can be done about it. *Chemosphere* 65, 2434–2439.
- [106] Hewitt, J., Bell, D., Simmons, G.C., Rivera-Aban, M., Wolf, S., Greening, G.E., 2007. Gastroenteritis outbreak caused by waterborne norovirus at a New Zealand Ski Resort. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7853–7857. doi:10.1128/AEM.00718-07

- [107] Hlavsa, M.C., Roberts, V.A., Kahler, A.M., Hilborn, E.D., Mecher, T.R., Beach, M.J., Wade, T.J., Yoder, J.S., 2015. Outbreaks of illness associated with recreational water—United States, 2011–2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 64, 668–672.
- [108] Hoebe, C.J.P.A., Vennema, H., de Roda Husman, A.M., van Duynhoven, Y.T.H.P., 2004. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. *J. Infect. Dis.* 189, 699–705. doi:10.1086/381534
- [109] Hoerling, M., Kumar, A., Dole, R., Nielsen-Gammon, J.W., Eischeid, J., Perlwitz, J., Quan, X.W., zhang, T., pegion, P., Chen, M., 2013. Anatomy of an extreme event. *J. Clim.* 26, 2811–2832. doi:10.1175/JCLI-D-12-00270.1
- [110] Hühne, M., Niendorf, S., Mas Marques, A., Bock, C.T., 2015. Use of sequence analysis of the P2 domain for characterization of norovirus strains causing a large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis in Germany 2012. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 612–618. doi:10.1016/j.ijmm.2015.08.010
- [111] Howsam, P., Carter, R., 1996. *Water Policy: Allocation and Management in Practice*. CRC Press.
- [112] Hunter, P.R., 2003. Climate change and waterborne and vector-borne disease. *J. Appl. Microbiol.* 94, 37–46. doi:10.1046/j.1365-2672.94.s1.5.x
- [113] Iglesias, R., Ortega, E., Batanero, G., Quintas, L., 2010. Water reuse in Spain: Data overview and costs estimation of suitable treatment trains. *Desalination* 263, 1–10. doi:10.1016/j.desal.2010.06.038
- [114] Iguchi, A., Ooka, T., Ogura, Y., Asadulghani, Nakayama, K., Frankel, G., Hayashi, T., 2008. Genomic comparison of the O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia coli* O55 strains belonging to three distinct lineages. *Microbiology* 154, 559–570. doi:10.1099/mic.0.2007/013334-0
- [115] International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017a. Change the names of species Aichi virus and Bovine kobuvirus (family Picornaviridae, genus Kobuvirus) to Aichivirus A and Aichivirus B, respectively [WWW Document]. URL <http://ictvonline.org/proposals/2012.014aV.A.v1.Kobuvirus-Sp,Ren.pdf>
- [116] International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017b. Enterovirus Taxonomy [WWW Document]. URL <http://www.nlv.ch/Enterovirus/Enterotaxonomy.htm> (accessed 1.11.17).
- [117] International Energy Agency, 2012. *World Energy Outlook 2012*.
- [118] International Organization for Standardization, 2017a. ISO/TC 224 Service activities relating to drinking water supply systems and wastewater systems - Quality criteria of the service and performance indicators [WWW Document]. URL http://www.iso.org/iso/iso_technical_committee?commid=299764 (accessed 1.16.17).
- [119] International Organization for Standardization, 2017b. ISO/TC 268 Sustainable cities and communities [WWW Document]. URL http://www.iso.org/iso/iso_technical_committee?commid=656906 (accessed 1.16.17).

- [120] International Organization for Standardization, 2017c. ISO/TC 282 Water reuse [WWW Document]. URL http://www.iso.org/iso/iso_technical_committee?commid=4856734 (accessed 1.16.17).
- [121] Ishii, S., Kitamura, G., Segawa, T., Kobayashi, A., Miura, T., Sano, D., Okabe, S., 2014. Microfluidic quantitative PCR for simultaneous quantification of multiple viruses in environmental water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7505–7511. doi:10.1128/AEM.02578-14
- [122] Israel Ministry of Economy and Industry, 2013. Nevada and Texas Hope for Increased Water Collaborations with Israel [WWW Document]. URL <http://itrade.gov.il/us/nevada-and-texas-hope-for-increased-water-collaborations-with-israel/> (accessed 12.23.16).
- [123] Israel Water Authority, 2015. Wastewater & effluents in Israel: Monitoring and prevention of water pollution. 7th World Water Forum.
- [124] Ito, T., Kato, T., Takagishi, K., Okabe, S., Sano, D., 2015. Bayesian modeling of virus removal efficiency in wastewater treatment processes. *Water Sci. Technol.* 72, 1789–1795. doi:10.2166/wst.2015.402
- [125] Jack, S., Bell, D., Hewitt, J., 2013. Norovirus contamination of a drinking water supply at a hotel resort. *New Zeal. Med. J.* 126, 98–107.
- [126] Jacobsen, K.H., Wiersma, S.T., 2010. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 28, 6653–6657. doi:10.1016/j.vaccine.2010.08.037
- [127] Jalava, K., Rintala, H., Ollgren, J., Maunula, L., Gomez-Alvarez, V., Revez, J., Palander, M., Antikainen, J., Kauppinen, A., Räsänen, P., Siponen, S., Nyholm, O., Kyyhkynen, A., Hakkarainen, S., Merentie, J., Pärnänen, M., Loginov, R., Ryu, H., Kuusi, M., Siitonen, A., Miettinen, I., Santo Domingo, J.W., Hänninen, M.L., Pitkänen, T., 2014. Novel microbiological and spatial statistical methods to improve strength of epidemiological evidence in a community-wide waterborne outbreak. *PLoS One* 9, e104713. doi:10.1371/journal.pone.0104713
- [128] Jenkins, G.A., Greenway, M., Polson, C., 2012. The impact of water reuse on the hydrology and ecology of a constructed stormwater wetland and its catchment. *Ecol. Eng.* 47, 308–315. doi:10.1016/j.ecoleng.2012.06.006
- [129] Jeong, H.S., Jeong, A., Cheon, D.S., 2012. Epidemiology of astrovirus infection in children. *Korean J. Pediatr.* 55, 77–82. doi:10.3345/kjp.2012.55.3.77
- [130] Jiménez, B., Asano, T., 2008. Water reclamation and reuse around the world, in: Jiménez, B., Asano, T. (Eds.), *Water Reuse: An International Survey of Current Practice, Issues and Needs*. IWA Publishing, London, pp. 3–26.
- [131] Jones, A., 2015. Differences between Bhattacharyya distance and KL divergence I ' m looking for an intuitive explanation for the following questions : 2 Answers The Bhattacharyya coefficient is defined as we have the complete ordering 1–2.

- [132] Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Hill, V.R., Lu, X., Sobsey, M.D., Erdman, D.D., 2005. Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3131–3136. doi:10.1128/AEM.71.6.3131
- [133] Jung, J.H., Yoo, C.H., Koo, E.S., Kim, H.M., Na, Y., Jheong, W.H., Jeong, Y.S., 2011. Occurrence of norovirus and other enteric viruses in untreated groundwaters of Korea. *J. Water Health* 9, 544–555. doi:10.2166/wh.2011.142
- [134] Jung, W.Y., Eom, J.H., Kim, B.J., Yun, M.H., Ju, I.S., Kim, C.S., Kim, M.R., Byun, J.A., Park, Y.G., Son, S.H., Lee, E.M., Jung, R.S., Na, M.A., Yuk, D.Y., Gang, J.Y., Heo, O.S., 2010. Investigation of norovirus occurrence and influence of environmental factors in food service institutions of ChungCheong area. *J. Food Hyg. Saf.* 25, 153–161.
- [135] Karanis, P., Kourenti, C., Smith, H., 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water Health* 5, 1–38. doi:10.2166/wh.2006.002
- [136] Karmakar, S., Rathore, A.S., Kadri, S.M., Dutt, S., Khare, S., Lal, S., 2008. Post-earthquake outbreak of rotavirus gastroenteritis in Kashmir (India): An epidemiological analysis. *Public Health* 122, 981–989. doi:10.1016/j.puhe.2008.01.006
- [137] Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S., 2008. One-year monthly quantitative survey of noroviruses , enteroviruses , and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan 42, 1441–1448. doi:10.1016/j.watres.2007.10.029
- [138] Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama, T., Oka, T., Hoshino, F., Fukushima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Suzuki, Y., Gojobori, T., Takeda, N., 2002. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk- like viruses. *Virology* 299, 225–239.
- [139] Kato, T., Miura, T., Okabe, S., Sano, D., 2013. Bayesian Modeling of Enteric Virus Density in Wastewater Using Left-Censored Data. *Food Environ. Virol.* 5, 185–193. doi:10.1007/s12560-013-9125-1
- [140] Kazama, J., De Saeger, S., Kuroda, K., Murata, M., Torisawa, K., 2010. A Bayesian Method for Robust Estimation of Distributional Similarities, in: *In: Proceedings of the 48th Annual Meeting of the Association for Computational Linguistics, Association for Computational Linguistics.* pp. 247–256.
- [141] Kennedy, M., Hart, A., 2009. Bayesian modeling of measurement errors and pesticide concentration in dietary risk assessments. *Risk Anal.* 29, 1427–1442.
- [142] Kennedy, M.C., 2010. Bayesian modeling of long-term dietary intakes from multiple sources. *Food Chem. Toxicol.* 48, 250–263. doi:10.1016/j.fct.2009.10.008
- [143] Khamrin, P., Maneekarn, N., Okitsu, S., Ushijima, H., 2014. Epidemiology of human and animal kobuviruses. *VirusDisease* 25, 195–200. doi:10.1007/s13337-014-0200-5
- [144] Khunkitti, W., Lloyd, D., Furr, J.R., Russell, a D., 1998. *Acanthamoeba castellanii*: growth,

encystment, excystment and biocide susceptibility. *J. Infect.* 36, 43–48.

doi:10.1016/S0163-4453(98)93054-7

- [145] Kim, S.H., Cheon, D.S., Kim, J.H., Lee, D.H., Jheong, W.H., Heo, Y.J., Chung, H.M., Jee, Y., Lee, J.S., 2005. Outbreaks of gastroenteritis that occurred during school excursions in Korea were associated with several waterborne strains of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4836–4839. doi:10.1128/JCM.43.9.4836-4839.2005
- [146] King, B.J., Monis, P.T., 2007. Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology* 134, 309–323. doi:10.1017/S0031182006001491
- [147] Kishida, N., Morita, H., Haramoto, E., Asami, M., Akiba, M., 2012. One-year weekly survey of noroviruses and enteric adenoviruses in the Tone River water in Tokyo metropolitan area, Japan. *Water Res.* 46, 2905–2910. doi:10.1016/j.watres.2012.03.010
- [148] Kitajima, M., Gerba, C., 2015. Aichi Virus 1: Environmental Occurrence and Behavior. *Pathogens* 4, 256–268. doi:10.3390/pathogens4020256
- [149] Kitajima, M., Iker, B.C., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2014. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes - Identification of potential viral indicators. *Sci. Total Environ.* 488–489, 290–296. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.04.087
- [150] Kitajima, M., Oka, T., Takagi, H., Tohya, Y., Katayama, H., Takeda, N., Katayama, K., 2010. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *J. Virol. Methods* 169, 269–273. doi:10.1016/j.jviromet.2010.07.018
- [151] Koh, S.J., Cho, H.G., Kim, B.H., Choi, B.Y., 2011. An outbreak of gastroenteritis caused by norovirus-contaminated groundwater at a waterpark in Korea. *J. Korean Med. Sci.* 26, 28–32. doi:10.3346/jkms.2011.26.1.28
- [152] König, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H., 2009. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463, 813–817. doi:10.1038/nature08699.Human
- [153] Kopilović, B., Ucakar, V., Koren, N., Krek, M., Kraigher, A., 2008. Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a coastal area in Slovenia in June and July 2008. *Eurosurveillance* 13, 1–3.
- [154] Koroglu, M., Yakupogullari, Y., Otlu, B., Ozturk, S., Ozden, M., Ozer, A., Sener, K., Durmaz, R., 2011. A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in malatya, Turkey. *New Microbiol.* 34, 17–24.
- [155] Krasner, S.W., Mitch, W.A., McCurry, D.L., Hanigan, D., Westerhoff, P., 2013. Formation, precursors, control, and occurrence of nitrosamines in drinking water: A review. *Water Res.* 47, 4433–4450. doi:10.1016/j.watres.2013.04.050
- [156] Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., Koopmans, M., 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* 158, 2059–2068. doi:10.1007/s00705-013-1708-5
- [157] Kvitsand, H.M.L., Fiksdal, L., 2010. Waterborne disease in Norway: Emphasizing outbreaks

- in groundwater systems. *Water Sci. Technol.* 61, 563–571. doi:10.2166/wst.2010.863
- [158] Laine, J., Huovinen, E., Virtanen, M.J., Snellman, M., Lumio, J., Ruutu, P., Kujansuu, E., Vuento, R., Pitkänen, T., Miettinen, I., Herrala, J., Lepistö, O., Anttonen, J., Helenius, J., Hänninen, M.-L., Maunula, L., Mustonen, J., Kuusi, M., Pirkanmaa Waterborne Outbreak Study Group, 2011. An extensive gastroenteritis outbreak after drinking-water contamination by sewage effluent, Finland. *Epidemiol. Infect.* 139, 1105–1113. doi:10.1017/S0950268810002141
- [159] Larsson, C., Andersson, Y., Allestam, G., Lindqvist, A., Nenonen, N., Bergstedt, O., 2014. Epidemiology and estimated costs of a large waterborne outbreak of norovirus infection in Sweden. *Epidemiol. Infect.* 142, 592–600. doi:10.1017/S0950268813001209
- [160] Lautze, J., Stander, E., Drechsel, P., Da Silva, A.K., Keraita, B., 2014. Global experiences in water reuse, Resource Recovery and Reuse Series 4. International Water Management Institute, Colombo, Sri Lanka.
- [161] Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P., Carter, M.J., 2004. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 127–136. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01534.x
- [162] Le Guyader, F.S., Bon, F., DeMedici, D., Parnaudeau, S., Bertone, A., Crudeli, S., Doyle, A., Zidane, M., Suffredini, E., Kohli, E., Maddalo, F., Monini, M., Galloway, A., Pommepuy, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M., 2006. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3878–3882. doi:10.1128/JCM.01327-06
- [163] Le Guyader, F.S., Le Saux, J.C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P., Atmar, R.L., 2008. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 46, 4011–4017. doi:10.1128/JCM.01044-08
- [164] Leclerc, H., Moreau, A., 2002. Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol Rev* 26, 207–222. doi:S0168644502000979 [pii]
- [165] Lee, G.C., Kim, M.J., Kim, J.I., Lee, C.H., 2014. Occurrence and molecular characterization of noroviruses in Korean surface water between 2007 and 2010. *J Microbiol Biotechnol* 24, 556–562. doi:10.4014/jmb.1311.11089
- [166] Lewis, G.D., Metcalf, T.G., 1988. Polyethylene-glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis-a virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1983–1988.
- [167] Li, T., Chijiwa, K., Sera, N., Ishibashi, T., Etoh, Y., Kurata, Y., Ishida, M., Sakamoto, S., Takeda, N., Miyamura, T., 2005. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1958–1960.
- [168] Li, Y., Guo, H., Xu, Z., Zhou, X., Zhang, H., Zhang, L., Miao, J., Pan, Y., 2013. An outbreak

- of norovirus gastroenteritis associated with a secondary water supply system in a factory in south China. *BMC Public Health* 13, 283. doi:10.1186/1471-2458-13-283
- [169] Limpert, E., Stahel, W. a., Abbt, M., 2001. Log-normal Distributions across the Sciences: Keys and Clues. *Bioscience* 51, 341. doi:10.1641/0006-3568(2001)051[0341:LNDATS]2.0.CO;2
- [170] Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., LePendou, J., Baric, R., 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med.* 9, 548–553. doi:10.1038/nm
- [171] Liu, J., Liu, Q., Yang, H., 2016. Assessing water scarcity by simultaneously considering environmental flow requirements, water quantity, and water quality. *Ecol. Indic.* 60, 434–441. doi:10.1016/j.ecolind.2015.07.019
- [172] Lloyd, D., Turner, N. a, Khunkitti, W., Hann, A.C., Furr, J.R., Russell, A.D., 2001. Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48, 11–16. doi:10.1111/j.1550-7408.2001.tb00410.x
- [173] Lu, R., Mosiman, D., Nguyen, T.H., 2013. Mechanisms of MS2 bacteriophage removal by fouled ultrafiltration membrane subjected to different cleaning methods. *Environ. Sci. Technol.* 47, 13422–13429. doi:10.1021/es403426t
- [174] Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473, 619–641. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.065
- [175] Lynch, J.P., Kajon, A.E., 2016. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention, in: *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. pp. 586–602. doi:10.1055/s-0036-1584923
- [176] Lysén, M., Thorhagen, M., Brytting, M., Hjertqvist, M., Andersson, Y., Hedlund, K.O., 2009. Genetic diversity among food-borne and waterborne norovirus strains causing outbreaks in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2411–2418. doi:10.1128/JCM.02168-08
- [177] Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., Davis, J.P., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331, 161–167. doi:10.1056/NEJM199407213310304
- [178] Maila, H.T., Bowyer, S.M., Swanepoel, R., 2004. Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995. *J. Gen. Virol.* 85, 89–95. doi:10.1099/vir.0.19587-0
- [179] Manuscript, A., Endotoxins, L., 2002. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
- [180] Mara, D., Hamilton, A., Sleight, A., Karavarsamis, N., 2010. Discussion paper: Options for updating the 2006 WHO guidelines. *Who* 1–8.

- [181] Mara, D.D., Sleight, P.A., Blumenthal, U.J., Carr, R.M., 2007. Health risks in wastewater irrigation: Comparing estimates from quantitative microbial risk analyses and epidemiological studies. *J. Water Health* 5, 39–50. doi:10.2166/wh.2006.055
- [182] Masago, Y., Katayama, H., Watanabe, T., Haramoto, E., Hashimoto, A., Omura, T., Hirata, T., Ohgaki, S., 2006. Quantitative risk assessment of noroviruses in drinking water based on qualitative data in Japan. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7428–7433. doi:10.1021/es060348f
- [183] Maunula, L., Kalso, S., Von Bonsdorff, C.H., Pönkä, A., 2004. Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. *Epidemiol. Infect.* 132, 737–743. doi:10.1017/S0950268804002249
- [184] Maunula, L., Miettinen, I.T., Von Bonsdorff, C.H., 2005. Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1716–1721. doi:10.3201/eid1111.050487
- [185] Maunula, L., Von Bonsdorff, C.H., 2005. Norovirus genotypes causing gastroenteritis outbreaks in Finland 1998–2002. *J. Clin. Virol.* 34, 186–194.
- [186] Mead, P.S., Griffin, P.M., 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 352, 1207–1212. doi:10.1016/S0140-6736(98)01267-7
- [187] Mehta, Y., Gupta, A., Todi, S., Myatra, S.N., Samaddar, D.P., Patil, V., Bhattacharya, P.K., Ramasubban, S., 2014. Guidelines for prevention of hospital acquired infections. *Indian J. Crit. Care Med.* 18, 149–163. doi:10.4103/0972-5229.128705
- [188] Mellou, K., Katsioulis, A., Potamiti-Komi, M., Pournaras, S., Kyritsi, M., Katsiaflaka, A., Kallimani, A., Kokkinos, P., Petinaki, E., Sideroglou, T., Georgakopoulou, T., Vantarakis, A., Hadjichristodoulou, C., 2014. A large waterborne gastroenteritis outbreak in central Greece, March 2012: challenges for the investigation and management. *Epidemiol. Infect.* 142, 40–50. doi:10.1017/S0950268813000939
- [189] Mellou, K., Sideroglou, T., Potamiti-Komi, M., Kokkinos, P., Ziros, P., Georgakopoulou, T., Vantarakis, A., 2013. Epidemiological investigation of two parallel gastroenteritis outbreaks in school settings. *BMC Public Health* 13, 241. doi:10.1186/1471-2458-13-241
- [190] Melnick, J.L., Gerba, C.P., Wallis, C., 1978. Viruses in water. *Bull. World Health Organ.* 56, 499–508. doi:10.1016/S0140-6736(75)93156-6
- [191] Messner, M.J., Berger, P., Nappier, S.P., 2014. Fractional poisson - A simple dose-response model for human norovirus. *Risk Anal.* 34, 1820–1829. doi:10.1111/risa.12207
- [192] Miura, T., Okabe, S., Nakahara, Y., Sano, D., 2015. Removal properties of human enteric viruses in a pilot-scale membrane bioreactor (MBR) process. *Water Res.* 75, 282–291. doi:10.1016/j.watres.2015.02.046
- [193] Miura, T., Parnaudeau, S., Grodzki, M., Okabe, S., Atmar, R.L., Le Guyader, F.S., 2013. Environmental detection of genogroup I, II, and IV noroviruses by using a generic real-time reverse transcription-PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6585–6592. doi:10.1128/AEM.02112-13
- [194] Miyashita, K., Kang, J.H., Saga, A., Takahashi, K., Shimamura, T., Yasumoto, A.,

- Fukushima, H., Sogabe, S., Konishi, K., Uchida, T., Fujinaga, A., Matsui, T., Sakurai, Y., Tsuji, K., Maguchi, H., Taniguchi, M., Abe, N., Fazle Akbar, S.M., Arai, M., Mishiro, S., 2012. Three cases of acute or fulminant hepatitis E caused by ingestion of pork meat and entrails in Hokkaido, Japan: Zoonotic food-borne transmission of hepatitis E virus and public health concerns. *Hepatol. Res.* 42, 870–878. doi:10.1111/j.1872-034X.2012.01006.x
- [195] Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D.G., Prisma Group, 2009. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement (Reprinted from *Annals of Internal Medicine*). *Ann. Intern. Med.* 151, 264–269. doi:10.1371/journal.pmed.1000097
- [196] Mok, H.F., Barker, S.F., Hamilton, A.J., 2014. A probabilistic quantitative microbial risk assessment model of norovirus disease burden from wastewater irrigation of vegetables in Shepparton, Australia. *Water Res.* 54, 347–362. doi:10.1016/j.watres.2014.01.060
- [197] Muto, C.A., Jernigan, J.A., Ostrowsky, B.E., Richet, H.M., Jarvis, W.R., Boyce, J.M., Farr, B.M., 2003. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug - resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 24, 362–386. doi:10.1086/502213
- [198] National Academy of Sciences, 2012. Understanding Water Reuse.
- [199] National Institute of Infectious Disease, 2017. Detection of gastroenteritis viruses in Japan, 2014/15-2016/17 season (as of January 26, 2017) [WWW Document]. URL <http://www.nih.go.jp/niid/en/2013-03-15-04-55-59/2100-disease-based/na/norovirus/idsc/iasr-noro-e/5700-iasr-noro-e-150529.html> (accessed 1.11.17).
- [200] National Research Council (US). Committee on the Assessment of Water Reuse as an Approach for Meeting Future Water Supply Needs, 2012. *Water Reuse: Potential for Expanding the Nation's Water Supply Through Reuse of Municipal Wastewater*. National Academies Press.
- [201] Nordgren, J., Matussek, A., Mattsson, A., Svensson, L., Lindgren, P.E., 2009. Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Res.* 43, 1117–1125. doi:10.1016/j.watres.2008.11.053
- [202] Nygård, K., Torvén, M., Ancker, C., Knauth, S.B., Hedlund, K.O., Giesecke, J., Andersson, Y., Svensson, L., 2003. Emerging Genotype (GGIIB) of Norovirus in Drinking Water, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* doi:10.3201/eid0912.030112
- [203] Nygård, K., Vold, L., Halvorsen, E., Bringeland, E., Røttingen, J.A., Aavitsland, P., 2004. Waterborne outbreak of gastroenteritis in a religious summer camp in Norway, 2002. *Epidemiol. Infect.* 132, 223–229. doi:10.1017/S0950268803001894
- [204] O'Reilly, C.E., Bowen, A.B., Perez, N.E., Sarisky, J.P., Shepherd, C.A., Miller, M.D., Hubbard, B.C., Herring, M., Buchanan, S.D., Fitzgerald, C.C., Hill, V., Arrowood, M.J., Xiao, L.X., Hoekstra, R.M., Mintz, E.D., Lynch, M.F., 2007. A waterborne outbreak of gastroenteritis with multiple etiologies among resort island visitors and residents: Ohio, 2004.

Clin. Infect. Dis. 44, 506–512. doi:10.1086/511043

- [205] Oki, T., Sato, M., Kawamura, A., Miyake, M., Kanae, S., Musiake, K., 2003. Virtual water trade to Japan and in the world, in: In Hoekstra, AY “Virtual Water Trade: Proceedings of the International Expert Meeting on Virtual Water Trade”, Value of Water Research Report Series. p. No. 12.
- [206] Olivieri, A.W., Seto, E., Cooper, R.C., Cahn, M.D., Colford, J., Crook, J., Debroux, J.-F., Mandrell, R., Suslow, T., Tchobanoglous, G., Hultquist, R. a., Spath, D.P., Mosher, J.J., 2014. Risk-Based Review of California’s Water-Recycling Criteria for Agricultural Irrigation. J. Environ. Eng. 140, 4014015. doi:10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000833
- [207] Orange County Water District, Orange County Sanitation District, 2015. A joint effort of the Orange County Water District and Orange County Sanitation District.
- [208] Ottoson, J., Hansen, A., Björleinius, B., Norder, H., Stenström, T.A., 2006. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. Water Res. 40, 1449–1457. doi:10.1016/j.watres.2006.01.039
- [209] Ottoson, J., Stenström, T.A., 2003. Faecal contamination of greywater and associated microbial risks. Water Res. 37, 645–655. doi:10.1016/S0043-1354(02)00352-4
- [210] Papp, H., L??szl??, B., Jakab, F., Ganesh, B., De Grazia, S., Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Martella, V., B??nyai, K., 2013. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. Vet. Microbiol. 165, 190–199. doi:10.1016/j.vetmic.2013.03.020
- [211] Parshionikar, S.U., Willian-True, S., Fout, G.S., Robbins, D.E., Seys, S.A., Cassady, J.D., Harris, R., 2003. Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a norovirus. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5263–5268. doi:10.1128/AEM.69.9.5263-5268.2003
- [212] Paulo, M.J., Van Der Voet, H., Jansen, M.J.W., Ter Braak, C.J.F., Van Klaveren, J.D., 2005. Risk assessment of dietary exposure to pesticides using a Bayesian method. Pest Manag. Sci. 61, 759–766. doi:10.1002/ps.1060
- [213] Pavlik, I., Matlova, L., Dvorska, L., Shitaye, J.E., Parmova, I., 2005. Mycobacterial infections in cattle and pigs caused by Mycobacterium avium complex members and atypical mycobacteria in the Czech Republic during 2000 – 2004. Vet. Med. 50, 281–290.
- [214] Pereira, V.J., Marques, R., Marques, M., Benoliel, M.J., Barreto Crespo, M.T., 2013. Free chlorine inactivation of fungi in drinking water sources. Water Res. 47, 517–523. doi:10.1016/j.watres.2012.09.052
- [215] Pintó, R.M., Costafreda, M.I., Bosch, A., 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7350–7355. doi:10.1128/AEM.01177-09
- [216] Polkowska, A., Rönqvist, M., Lepistö, O., Roivainen, M., Maunula, L., Huusko, S., Toikkanen, S., Rimhanen-Finne, R., 2014. Outbreak of gastroenteritis caused by norovirus GII.4 Sydney variant after a wedding reception at a resort/activity centre, Finland, August 2012. Epidemiol. Infect. 142, 1877–1883. doi:10.1017/S0950268813002847
- [217] Pouillot, R., van Doren, J.M., Woods, J., Plante, D., Smith, M., Gobllick, G., Roberts, C.,

- Locas, A., Hajen, W., Stobo, J., White, J., Holtzman, J., Buenaventura, E., Burkhardt, W., Catford, A., Edwards, R., DePaola, A., Calci, K.R., 2015. Meta-analysis of the reduction of norovirus and male-specific coliphage concentrations in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 4669–4681. doi:10.1128/AEM.00509-15
- [218] Pradhan, B., Kundu, D., 2011. Bayes estimation and prediction of the two-parameter gamma distribution. *J. Stat. Comput. Simul.* 81, 1187–1198. doi:10.1080/00949651003796335
- [219] Public Utilities Board Singapore's National Water Agency, 2016a. PUB NEWater [WWW Document]. URL <https://www.pub.gov.sg/watersupply/fournationaltaps/newater> (accessed 12.30.16).
- [220] Public Utilities Board Singapore's National Water Agency, 2016b. Innovation in Water Singapore.
- [221] Queensland Government, 2009. Final progress report Western Corridor Recycled Water Project: Stage 2.
- [222] Rachmadi, A.T., Kitajima, M., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2016. Enteric and indicator virus removal by surface flow wetlands. *Sci. Total Environ.* 542, 976–982. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.001
- [223] Rajko-Nenow, P., Keaveney, S., Flannery, J., McINTYRE, A., Doré, W., 2014. Norovirus genotypes implicated in two oyster-related illness outbreaks in Ireland. *Epidemiol. Infect.* 142, 2096–2104. doi:10.1017/S0950268813003014
- [224] Ramírez-Castillo, F.Y., Loera-Muro, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-González, F.J., Harel, J., Guerrero-Barrera, A.L., 2015. Waterborne pathogens: detection methods and challenges. *Pathog. (Basel, Switzerland)* 4, 307–34. doi:10.3390/pathogens4020307
- [225] Raoult, D., Forterre, P., 2008. Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 315–319. doi:10.1038/nrmicro1858
- [226] Ratola, N., Cincinelli, A., Alves, A., Katsoyiannis, A., 2012. Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment process. A mini review. *J. Hazard. Mater.* 239, 1–18. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.05.040
- [227] Riera-Montes, M., Brus Sjölander, K., Allestam, G., Hallin, E., Hedlund, K.-O., Löfdahl, M., 2011. Waterborne norovirus outbreak in a municipal drinking-water supply in Sweden. *Epidemiol. Infect.* 139, 1928–1935. doi:10.1017/S0950268810003146
- [228] Rizzo, C., Di Bartolo, I., Santantonio, M., Coscia, M.F., Monno, R., De Vito, D., Ruggeri, F.M., Rizzo, G., 2007. Epidemiological and virological investigation of a Norovirus outbreak in a resort in Puglia, Italy. *BMC Infect. Dis.* 7, 135. doi:10.1186/1471-2334-7-135
- [229] Robertson, L.J., Campbell, T., Smith, H. V., 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Society* 58, 3494–3500.
- [230] Robilotti, E., Deresinski, S., Pinsky, B.A., 2015. Norovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 134–164. doi:10.1128/CMR.00075-14
- [231] Rowbotham, T.J., 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila*

- for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 33, 1179–1183. doi:10.1136/jcp.33.12.1179
- [232] Sailaja, B., Murhekar, M. V., Hutin, Y.J., Kuruva, S., Murthy, S.P., Reddy, K.S.J., Rao, G.M., Gupte, M.D., 2009. Outbreak of waterborne hepatitis E in Hyderabad, India, 2005. *Epidemiol. Infect.* 137, 234–240. doi:10.1017/S0950268808000952
- [233] Sano, D., Amarasiri, M., Hata, A., Watanabe, T., Katayama, H., 2016. Risk management of viral infectious diseases in wastewater reclamation and reuse: Review. *Environ. Int.* 91, 220–229. doi:10.1016/j.envint.2016.03.001
- [234] Sarguna, P., Rao, A., Ramana, K.S., 2007. Outbreak of acute viral hepatitis due to hepatitis E virus in Hyderabad.
- [235] Schmid, D., Lederer, I., Much, P., Pichler, A.M., Allerberger, F., 2005. Outbreak of norovirus infection associated with contaminated flood water, Salzburg, 2005. *Euro Surveill* 10, E050616.
- [236] Schmidt, P.J., 2015. Norovirus Dose-Response: Are Currently Available Data Informative Enough to Determine How Susceptible Humans Are to Infection from a Single Virus? *Risk Anal.* 35, 1364–1383. doi:10.1111/risa.12323
- [237] Schmitz, B.W., Kitajima, M., Campillo, M.E., Gerba, C.P., Pepper, I.L., 2016. Virus reduction during advanced bardenpho and conventional wastewater treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 50, 9524–9532. doi:10.1021/acs.est.6b01384
- [238] Schuster, F.L., Visvesvara, G.S., 2004. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet. Parasitol.* 126, 91–120. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.019
- [239] Science, E., 1996. COMPARATIVE INACTIVATION OF ENTERIC ADENOVIRUSES , POLIOVIRUS A N D COLIPHAGES BY ULTRAVIOLET I R R A D I A T I O N 30, 2665–2668.
- [240] Seal, D., Stapleton, F., Dart, J., 1992. Possible environmental sources of *Acanthamoeba* spp in contact lens wearers. *Br. J. Ophthalmol.* 76, 424–427. doi:10.1136/bjo.76.7.424
- [241] Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M.L., Lindesmith, L.C., Baric, R.S., Moe, C.L., 2011. Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6884–6888. doi:10.1128/AEM.05806-11
- [242] Shirato, H., 2011. Norovirus and histo-blood group antigens. *Jpn. J. Infect. Dis.* 64, 95–103.
- [243] Shirato, H., Ogawa, S., Ito, H., Sato, T., Kameyama, A., Narimatsu, H., Xiaofan, Z., Miyamura, T., Wakita, T., Ishii, K., Takeda, N., 2008. Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J. Virol.* 82, 10756–10767. doi:10.1128/JVI.00802-08
- [244] Shuval, H., Lampert, Y., Fattal, B., 1997. Development of a risk assessment approach for evaluating wastewater reuse standards for agriculture, in: *Water Science and Technology*. Elsevier Science Ltd, pp. 15–20.
- [245] Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb.*

Perspect. Biol. 2, a000414.

- [246] Sima, L.C., Schaeffer, J., Le Saux, J.C., Parnaudeau, S., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., 2011. Calicivirus removal in a membrane bioreactor wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5170–5177. doi:10.1128/AEM.00583-11
- [247] Skidmore, S., 2002. Overview of Hepatitis E Virus. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 4, 118–123.
- [248] Sobsey, M.D., 1989. Inactivation of Health Related Microorganisms in Water by Disinfection Processes. *Water Sci. Technol.* 2, 179–195.
- [249] Solomon, T., Lewthwaite, P., Perera, D., Cardosa, M.J., McMinn, P., Ooi, M.H., 2010. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect. Dis.* 10, 778–790. doi:10.1016/S1473-3099(10)70194-8
- [250] Spurgeon, S.L., Jones, R.C., Ramakrishnan, R., 2008. High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS One* 3. doi:10.1371/journal.pone.0001662
- [251] Sriram, R., Shoff, M., Booton, G., Fuerst, P., Visvesvara, G.S., 2008. Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. *J. Clin. Microbiol.* 46, 4045–4048. doi:10.1128/JCM.01903-08
- [252] Tajima, A., Sakurai, K., Minamiyama, M., 2007. Behavior of pathogenic microbes in a treated wastewater reuse system and examination of new standards for the reuse of treated wastewater. *Environ. Monit. Assess.* 129, 43–51. doi:10.1007/s10661-006-9424-1
- [253] Tambo, N., Nakamura, M., Wang, X.C., 2012. The Fractal Lentic-Lotic Basin Complex as a Conceptual Basis for Future Urban Water Systems. *J. Water Sustain.* 2, 105–120. doi:10.11912/jws.2.2.105-120
- [254] Tan, M., Jiang, X., 2011. Norovirus-host interaction: Multi-selections by human histo-blood group antigens. *Trends Microbiol.* 19, 382–388. doi:10.1016/j.tim.2011.05.007
- [255] Tanaka, H., Asano, T., Schroeder, E.D., Tchobanoglous, G., 1998. Estimating the safety of wastewater reclamation and reuse using enteric virus monitoring data. *Water Environ. Res.* 70, 39–51. doi:10.2175/106143098X126874
- [256] ter Waarbeek, H.L.G., Dukers-Muijrs, N.H.T.M., Vennema, H., Hoebe, C.J.P.A., 2010. Waterborne gastroenteritis outbreak at a scouting camp caused by two norovirus genogroups: GI and GII. *J. Clin. Virol.* 47, 268–272. doi:10.1016/j.jcv.2009.12.002
- [257] Teunis, P.F.M., Moe, C.L., Liu, P., E. Miller, S., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J., Calderon, R.L., 2008. Norwalk virus: How infectious is it? *J. Med. Virol.* 80, 1468–1476. doi:10.1002/jmv.21237
- [258] Texas Water Development Board, 2015. Direct potable reuse resource document: Final Report.
- [259] Texas Water Development Board, 2011. History of Water Reuse in Texas.
- [260] Texas Water Development Board, 2005. The Texas Manual on Rainwater Harvesting: 3rd edition. doi:10.1007/s10350-008-9244-1

- [261] The state of Queensland, 2008. Water quality guidelines for recycled water schemes.
- [262] The Victoria Department of Health, 2013. Guidelines for validating treatment processes for pathogen reduction - Supporting Class A recycled water schemes in Victoria.
- [263] Tortajada, C., 2006. Water Management in Singapore. *Int. J. Water Resour. Dev.* 22, 227–240. doi:10.1080/07900620600691944
- [264] Turcotte, J.W., 1997. Follow-Up Report on the Water Resources Management Program and the Consumptive Use Permitting Program.
- [265] U.S. Environmental Protection Agency, 2012. Guidelines for Water Reuse.
- [266] Uma Suganya, K.S., Govindaraju, K., Ganesh Kumar, V., Stalin Dhas, T., Karthick, V., Singaravelu, G., Elanchezhian, M., 2015. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms. *Mater. Sci. Eng. C* 47, 351–356. doi:10.1016/j.msec.2014.11.043
- [267] United Nations, 2015a. The Millennium Development Goals Report 2015.
- [268] United Nations, 2015b. Sustainable Development Goals [WWW Document]. URL <http://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/> (accessed 12.31.16).
- [269] United Nations, 2015c. World Population Prospects: the 2015 revision.
- [270] United Nations, 2014. The United Nations world water development report 2014: Water and energy.
- [271] United Nations, 2012. UN World Urbanization Prospects, the 2011 Revision.
- [272] United Nations Development Programme, 2006. Human Development Report 2006.
- [273] United Nations Educational Scientific and Cultural Organization, 2006. World water resources and their use : a joint SHI/UNESCO product [WWW Document]. URL <http://webworld.unesco.org/water/ihp/db/shiklomanov/summary/html/summary.html#4>. The (accessed 12.31.16).
- [274] US Environmental Protection Agency, 2012. Guidelines for Water Reuse. Development 26, 252. doi:EPA16251R-921004
- [275] Van, T.T.H., Chin, J., Chapman, T., Tran, L.T., Coloe, P.J., 2008. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence gene. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 217–223. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.029
- [276] Van Abel, N., Schoen, M.E., Kissel, J.C., Meschke, J.S., 2016. Comparison of Risk Predicted by Multiple Norovirus Dose-Response Models and Implications for Quantitative Microbial Risk Assessment. *Risk Anal.* doi:10.1111/risa.12616
- [277] Van Alphen, L.B., Dorléans, F., Schultz, A.C., Fonager, J., Ethelberg, S., Dalgaard, C., Adelhardt, M., Engberg, J.H., Fischer, T.K., Lassen, S.G., 2014. The application of new molecular methods in the investigation of a waterborne outbreak of norovirus in Denmark, 2012. *PLoS One* 9, e105053. doi:10.1371/journal.pone.0105053
- [278] Vantarakis, A., Mellou, K., Spala, G., Kokkinos, P., Alamanos, Y., 2011. A gastroenteritis

- outbreak caused by noroviruses in Greece. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 3468–3478. doi:10.3390/ijerph8083468
- [279] Villena, C., Gabrieli, R., Pintó, R.M., Guix, S., Donia, D., Buonomo, E., Palombi, L., Cenko, F., Bino, S., Bosch, A., Divizia, M., 2003. A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. *Epidemiol. Infect.* 131, 1105–1110. doi:10.1017/s0950268803001353
- [280] Vinjé, J., 2015. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 53, 373–381. doi:10.1128/JCM.01535-14
- [281] Vivian, C.M.G., 1986. Tracers of sewage sludge in the marine environment: a review. *Sci. Total Environ.* 53, 5–40. doi:10.1016/0048-9697(86)90091-4
- [282] Voorrips, L.E., Goldbohm, R.A., Verhoeven, D.T.H., van Poppel, G.A.F.C., Sturmans, F., Hermus, R.J.J., van den Brandt, P.A., 2000. Vegetable and fruit consumption and lung cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Cancer Causes Control* 11, 101–115. doi:10.1023/A:1008906706084
- [283] Vrieze, S.I., 2012. Model selection and psychological theory: a discussion of the differences between the Akaike information criterion (AIC) and the Bayesian information criterion (BIC). *Psychol. Methods* 17, 228–43. doi:10.1037/a0027127
- [284] Walton, A., Hume, M., 2011. Creating positive habits in water conservation: the case of the Queensland Water Commission and the Target 140 campaign. *Int. J. Nonprofit Volunt. Sect. Mark.* 16, 215–224. doi:10.1002/nvsm.421
- [285] Wang, X., Yong, W., Shi, L., Qiao, M., He, M., Zhang, H., Guo, B., Xie, G., Zhang, M., Jin, M., Ding, J., 2016. An outbreak of multiple norovirus strains on a cruise ship in China, 2014. *J. Appl. Microbiol.* 120, 226–233. doi:10.1111/jam.12978
- [286] Ward, P., Müller, P., Letellier, A., Quessy, S., Simard, C., Trottier, Y.-L., Houde, A., Brassard, J., 2008. Molecular characterization of hepatitis E virus detected in swine farms in the province of Quebec. *Can. J. Vet. Res.* 72, 27–31.
- [287] Washington State, 2015. Reclaimed water facilities manual. The purple book.
- [288] Water Technology and Environmental Control Exhibition and Conference, 2016. Watec Israel 2017 - Water Technology and Environmental Control Event [WWW Document]. URL <http://watec-israel.com/> (accessed 12.26.16).
- [289] Water World, 2013. Global wastewater reuse, recycling markets expected to expand, research says [WWW Document]. URL <http://www.waterworld.com/articles/2013/02/global-wastewater-reuse--recycling-markets-expected-to-expand-ac.html> (accessed 12.23.16).
- [290] Werber, D., Lausević, D., Mugosa, B., Vratnica, Z., Ivanović-Nikolić, L., Zizić, L., Alexandre-Bird, A., Fiore, L., Ruggeri, F.M., Di Bartolo, I., Battistone, A., Gassilloud, B., Perelle, S., Nitzan Kaluski, D., Kivi, M., Andraghetti, R., Pollock, K.G.J., 2009. Massive outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of municipal drinking water in a

- European capital city. *Epidemiol. Infect.* 137, 1713–1720. doi:10.1017/S095026880999015X
- [291] Westerhoff, P., Song, G., Hristovski, K., Kiser, M.A., 2011. Occurrence and removal of titanium at full scale wastewater treatment plants: implications for TiO₂ nanomaterials. *J. Environ. Monit.* 13, 1195–1203. doi:10.1039/c1em10017c
- [292] Westrell, T., Dusch, V., Ethelberg, S., Harris, J., Hjertqvist, M., da Silva, N.J., Koller, A., Lenglet, A., Lisby, M., Vold, L., 2010. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Eurosurveillance* 15, 7–10. doi:19524 [pii]
- [293] Wheeler, C., Vogt, T.M., Armstrong, G.L., Vaughan, G., Weltman, A., Nainan, O. V, Dato, V., Xia, G., Waller, K., Amon, J., Lee, T.M., Highbaugh-Battle, A., Hembree, C., Evenson, S., Ruta, M.A., Williams, I.T., Fiore, A.E., Bell, B.P., 2005. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *N. Engl. J. Med.* 353, 890–897. doi:10.1056/NEJMoa050855
- [294] World Health Organization, 2011. World Health Statistics 2011.
- [295] World Health Organization, 2006. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater-volume 2: wastewater use in agriculture.
- [296] World Population Review, 2016. State Populations 2016 [WWW Document]. URL <http://worldpopulationreview.com/states/> (accessed 12.28.16).
- [297] Xagorarakis, I., Yin, Z., Svambayev, Z., 2014. Fate of Viruses in Water Systems. *J. Environ. Eng.* 140, 4014020-1–18. doi:10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000827.
- [298] Yamashita, T., Kobayashi, S., Sakae, K., Nakata, S., Chiba, S., Ishihara, Y., Isomura, S., 1991. Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 164, 954–957.
- [299] Yang, Z., Wu, X., Li, T., Li, M., Zhong, Y., Liu, Y., Deng, Z., Di, B., Huang, C., Liang, H., Wang, M., 2011. Epidemiological survey and analysis on an outbreak of gastroenteritis due to water contamination. *Biomed. Environ. Sci.* 24, 275–283. doi:10.3967/0895-3988.2011.03.011
- [300] Yi, L., Jiao, W., Chen, X., Chen, W., 2011. An overview of reclaimed water reuse in China. *J. Environ. Sci.* 23, 1585–1593. doi:10.1016/S1001-0742(10)60627-4
- [301] Yugo, D.M., Meng, X.J., 2013. Hepatitis E virus: Foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 4507–4533. doi:10.3390/ijerph10104507
- [302] Zanini, B., Caselani, F., Magni, A., Roga, A.M., Bandera, F., Ricci, C., Cassarino, C., Romanini, M., Cecchi, D., Vassallo, F., Scarcella, C., Lanzini, A., 2011. Incidence of functional intestinal disorders and postinfectious irritable bowel syndrome following a waterborne viral gastroenteritis outbreak. *Gut* 60, A161. doi:10.1136/gut.2011.239301.341
- [303] Zhang, Q., Ishii, S., 2015. New Process Control to Evaluate DNA Recovery Efficiency in Environmental Samples, in: *Soil Biology & Biochemistry*. Minnesota.
- [304] Zhao, C., Ge, B., Villena, J. De, Sudler, R., Yeh, E., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D., 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken,

- turkey, pork, and beef from the Greater Washington, DC, area. *Appl Microbiol* 67, 5431–5436. doi:10.1128/AEM.67.12.5431
- [305] Zhou, N., Zhang, H., Lin, X., Hou, P., Wang, S., Tao, Z., Bi, Z., Xu, A., 2016. A waterborne norovirus gastroenteritis outbreak in a school, eastern China. *Epidemiol. Infect.* 144, 1212–1219. doi:10.1017/S0950268815002526
- [306] Zhou, X., Li, H., Sun, L., Mo, Y., Chen, S., Wu, X., Liang, J., Zheng, H., Ke, C., Varma, J.K., Klena, J.D., Chen, Q., Zou, L., Yang, X., 2012. Epidemiological and molecular analysis of a waterborne outbreak of norovirus GII.4. *Epidemiol. Infect.* 140, 2282–2289. doi:10.1017/S0950268812000374
- [307] Zhu, W., Wong, W.K., 2001. Maximum likelihood inference for left-censored HIV RNA data. *Stat. Med.* 20, 33–45. doi:10.1002/1097-0258(20010115)20:1<33::AID-SIM640>3.0.CO;2-O
- [308] 安田成夫, 多田智和, 2007. オーストラリアの水資源管理に関する調査, 国総研資料.
- [309] 王雷軒, 2011. 中国の水資源問題について — 問題点の整理と改善の方向性 —. *農林金融* 39–51.
- [310] 館隆広, 大熊那夫紀, 2015. 水環境分野の国際標準化活動: ISO/TC224, ISO/TC282への貢献と展望. *日立評論* 97, 479–482.
- [311] 高田賢蔵, 2012. 医科ウイルス学 第3版. 南江堂.
- [312] 国土交通省, 2014a. 平成 26 年版 日本の水資源.
- [313] 国土交通省, 2014b. ISO/TC282 Water-reuse (水の再利用に関する専門委員会) 第2回会議出席報告.
- [314] 国土交通省, 2010. 水資源白書.
- [315] 国土交通省, 2008. 下水処理水の再利用のあり方を考える懇談会: 懇談会の検討の方向性について.
- [316] 国土交通省, 2005. 再生水水質基準等マニュアル (案) .
- [317] 国土交通省, 2001. ウイルスの安全性からみた下水処理水の再生処理法検討マニュアル(案).
- [318] 埼玉県衛生部, 1997. クリプトスポジウムによる集団下痢症報.
- [319] 三石真也, 2010. オーストラリアにおける水事情. *ダム技術* 26–39.
- [320] 山田俊郎, 秋葉道宏, 2007. 最近10年間の水を介した健康被害事例. *保健医療科学* 56, 16–23.
- [321] 東京都下水道局, 2016a. 再生水とは [WWW Document]. URL <http://www.gesui.metro.tokyo.jp/jigyousaiseisui/saiseisui.html> (accessed 1.4.17).
- [322] 東京都下水道局, 2016b. 再生水の供給地区 [WWW Document]. URL <http://www.gesui.metro.tokyo.jp/jigyousaiseisui/kyokyu-map.html> (accessed 1.4.17).
- [323] 東京都下水道局, 2016c. 再生水の用途 [WWW Document]. URL <http://www.gesui.metro.tokyo.jp/jigyousaiseisui/youto.html> (accessed 1.4.17).
- [324] 東京都下水道局, 2016d. 再生水利用の効果 [WWW Document]. URL <http://www.gesui.metro.tokyo.jp/jigyousaiseisui/kouka.html> (accessed 1.4.17).

- [325] 農林水産省, 2016. 平成27年度 食料自給率等について.
- [326] 農林水産省, 2010. 肥料原料の安定確保に関する論点整理: 参考資料.
- [327] 北島正章, 遠矢幸伸, 松原康一, 原本英司, 宇田川悦子, 片山浩之, 大垣眞一郎, 2008. 新たな代替指標としてマウス分離株を用いた水道水中のノロウイルスの塩素耐性の解明. 環境工学研究論文集 45, 361–370. doi:org/10.11532/proes1992.45.361
- [328] 膜分離技術振興協会・膜浄水委員会, 2008. 浄水膜, 第2版. ed. 技報堂出版.
- [329] 濱田康治, 白谷栄作, 人見忠良, 2011. 再生水の農業利用におけるわが国の現状と国際規格化の動き. 水土の知 79, 827–830.

謝辞

指導教官の佐野大輔准教授には、本研究を遂行する上で必要な教材および実験環境を整えていただき、またご多忙にもかかわらず温かく指導していただいたことに深謝致します。

岡部聡教授（北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門）および北島正章助教（北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門）には、研究の方向性や具体的な実験内容についてたくさんのご指導をいただきましたことに感謝致します。

高橋正宏教授（北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門）および佐藤久准教授（北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門）には、博士論文の審査を引き受けていただいたことに感謝致します。松井利仁教授（北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門）、松藤敏彦教授（北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門）、松井佳彦教授（北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門）、長野克則教授（北海道大学大学院環境空間性能システム部門）、濱田靖弘教授（北海道大学大学院工学研究院空間性能システム部門）および松下拓准教授（北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門）には、公聴会審査員を引き受けていただいたことに感謝致します。

加藤毅准教授（大学院理工学府）には、本研究の骨子となるベイズ推定モデルを開発していただき、また第3章の研究を遂行するに際し、多大なご助力をいただいたことに感謝致します。

石井聡助教（Department of Soil, Water, and Climate, the University of Minnesota）および瀬川高弘助教（山梨大学総合分析実験センター）には、マイクロ流体工学に基づく定量PCRを用いた腸管系ウイルスの定量操作についてご指導いただいたことに感謝致します。

片山准教授（東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻）には、第4章の研究を遂行するに際し、腸管系ウイルスのデータ群を提供していただいたことに感謝致します。

研究室の方々には、研究室の一員として私を温かく受け入れていただいたことに感謝いたします。技術補佐員の野町理慧氏および平野麗子氏には、実験を行う上でご協力いただいたことに感謝致します。秘書の水流俊江氏および口村里絵氏には、事務手続きなどでご助力いただいたことに感謝致します。同期の石崎創氏、栗田宗大氏とは、博士後期課程在籍時に苦楽を共にできたことを大変嬉しく思っております。

すべての人たちの支えのお蔭で無事に研究を遂行することができたことに改めて感謝します。鈴木祥広教授（宮崎大学工学部社会環境システム工学科）および井上謙吾准教授（宮崎大学農学部応用生物科学科）には、宮崎大学大学院工学研究土木環境工学専攻修士課程在籍時にご指導いただいたことに感謝致します。高見徹准教授（大分工業高等専門学校都市・環境工学科）には、大分工業高等専門学校都市システム工学科および大分工業高等専門学校専攻科機械・環境システム工学専攻在籍時にご指導いただいたことに感謝致します。

そして、私をいつも温かく支えてくれる家族に感謝していることもここに記させていただきます。

伊藤 寿宏