

# 研究助成テーマ；淀川流域におけるアデノウイルス血清型の網羅的探索に基づいた水系感染による健康影響の推定

京都大学大学院 工学研究科 浅田安廣

## 1. はじめに

上下水道の整備に伴い水系感染事例は減少しているものの、未だに確認されていることも事実である。その主な原因として、水源汚染、消毒不備が挙げられる<sup>1)</sup>。このような状況を食い止め、常に微生物学的安全性を確保するためには、水源での病原微生物汚染状況把握といった情報の収集が重要となる。

琵琶湖・淀川水系は、滋賀県、京都府、大阪府などの多くの人々が利用する水道の水源である。しかし、その水源は滋賀県あるいは京都市の下水処理放流水が混在しており、擬似的に水を反復利用している状況となっている。下水には排泄物等が含まれていることから、下水処理水であっても多くの病原微生物が存在していると思われる。そのため、このような水環境を水道水源とする場合、微生物学的安全性の確保には水源管理と適切な処理が必要不可欠となる。

水系感染を引き起こす病原微生物として、細菌、原虫、ウイルスが挙げられる。そして近年ではウイルス検出技術の向上により、水環境中におけるウイルス存在実態が明らかになりつつある。日本での過去の報告事例からは、下水や下水処理水中<sup>2)</sup>、水道水の原水となる河川水や湖、地下水においても病原ウイルスの検出が報告されている<sup>4)</sup>。そして淀川を対象としたウイルス検出の試みにおいて、アデノウイルスF群、ロタウイルスA群、ノロウイルスGI型、GII型の存在が確認された<sup>5)</sup>。その中で、アデノウイルスF群が年間を通して濃度が高いことが明らかとなり、最も恒常的にリスクが高い病原ウイルスであることが確認されている<sup>5)</sup>。

一方、アデノウイルス自体は様々な血清型が存在し、それに伴い胃腸炎以外にも様々な健康影響を引き起こすことが知られている(表1)。その中でも咽頭結膜熱(プール熱)、流行性角結膜炎は主に小児を中心とした感染症であり、学校安全法では第二種伝染病に位置づけられている。河川水あるいは水道水の曝露は飲用のみではなく、眼などの様々な部位に触れることを考慮すると、胃腸炎のリスクのみで安全性評価を行うのではなく、様々な健康影響のリスクを考慮する必要がある。

表1 ヒトアデノウイルスの血清型と引き起こす感染症<sup>6)</sup>

種	主な血清型	感染症
A	31	胃腸炎
B	3,7,11, 14,55	呼吸器感染症 咽頭結膜熱(プール熱) 出血性膀胱炎 流行性角結膜炎
C	1,2,5, 6,57	呼吸器感染症 咽頭結膜熱(プール熱)
D	18,19,37, 53,54,56	流行性角結膜炎 尿道炎
E	4	呼吸器感染症 咽頭結膜熱(プール熱) 流行性角結膜炎
F	40,41	胃腸炎
G	52	胃腸炎

以上の背景を踏まえ、本研究ではまず、淀川水系でのアデノウイルス血清型存在状況の把握を試みる。その存在状況に合わせ、水道水曝露により引き起こされる健康影響について推定する。その際、各疾病によるヒトへの健康影響の指標として障害調整生存年数(Disability Adjusted Life Years: DALYs)を用い、明らかとなったアデノウイルス血清型に対する健康影響を定量化し、重要度について比較・評価する。そしてこれらの得られた知見を統合し、WHOで提唱している健康成果目標( $10^6$  DALYs/人・年)達成に必要な浄水処理で要求処理能を定量的微生物リスク評価(Quantitative Microbial Risk Assessment: QMRA)手法を用いて評価する。

## 2. 実験方法

本研究では以下に示す実験的検討を行った。

まず淀川、桂川及び、下水処理水の濃縮試料を用いて、(1)アデノウイルスの血清型把握が可能な遺伝子配列に対して、次世代シーケンス機器を用いてそのDNA配列情報を取得し、データベースとの比較により存在するアデノウイルスの血清型を把握する。そして(2)淀川に対して、(1)で明らかとなった主要な血清型を対象としqPCRによる遺伝子数の把握を行い、QMRA実施に向けたデータ収集を実施する。続いて(3)主要な血清型に対する健康影響をDALYsにより定量化し、淀川を水道水源とした場合の水道水の微生物学的安全性確保に必要な浄水処理の処理能を、健康成果目標に基づき推定する。

### 2.1 シーケンス解析に基づくアデノウイルス血清型の存在把握

#### 2.1.1. 実験器具関係

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

#### 2.1.2. サンプルングについて

採水試料として桂川(納所地点、宮前橋付近)、淀川(淀川河川公園付近)、A下水処理場の最終沈殿越流水を選定した。そして各採水地点で試料水を採取した後、保冷した状態で実験室まで運搬し、濃縮、DNA抽出は原則2日以内に行った。

#### 2.1.3. 河川水の濃縮

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

#### 2.1.4. ウイルス核酸の抽出

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

#### 2.1.5. シークエンス解析試料の作製

本研究では、血清型判定のために Ogorzaly らが取り組んだ次世代シークエンス解析による血清型判定方法<sup>7)</sup>に基づき、ヘキソン遺伝子の可変領域をターゲットとし、Miseq(イルミナ社)による DNA 配列解析が行えるように、プライマー1 (5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCC SCARTGGKWCWTACATGCACATC-3' )とプライマー2 (5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTAT AAGAGACAGCAGCACSCCICGRATGTCAA-3' )を設定した。

しかしながら、対象以外の DNA 配列増幅やプライマーダイマーの形成が生じてしまった(図 1)ため、方法の改善を試みた。改善した手順は以下の通りである。

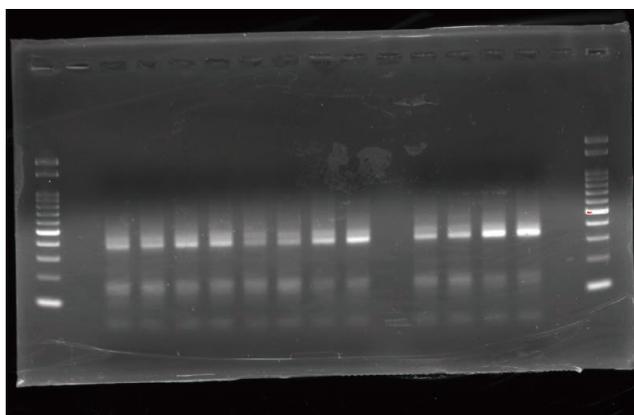


図 1 電気泳動による PCR 産物の検出結果(400 bp 付近：ターゲット DNA, その他：副産物)

まず、50  $\mu$ L の PCR 反応液 (10X High Fidelity PCR buffer without magnesium salts : 5  $\mu$ L (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity kit, Invitrogen), 50 mM MgSO<sub>4</sub> : 2  $\mu$ L (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity kit, Invitrogen), 2.5 mM 各 dNTPs 溶液 : 2.5  $\mu$ L (Invitrogen), Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity : 0.2  $\mu$ L (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity kit, Invitrogen), 上述した各プライマー (50 mM) : 0.5  $\mu$ L, PCR グレード水:29.3  $\mu$ L, DNA 溶液:10  $\mu$ L) を作製した。PCR はサーマルサイクラー (TAKARA PCR Thermal Cycler Dice, タカラバイオ株式会社) を用いて、94  $^{\circ}$ C  $\cdot$  60 秒の鋳型 DNA 変性の後、94  $^{\circ}$ C  $\cdot$  30 秒の変性、55  $^{\circ}$ C  $\cdot$  30 秒のアニーリング、68  $^{\circ}$ C  $\cdot$  60 秒の伸長ステップを 25 サイクル行った。その後、AMPure XP beads (Beckman Coulter) 90  $\mu$ L を用いて、増幅産物の精製を行った。この操作を 2 回行った後、1.5% アガロースゲル電気泳動により増幅断片を分離し、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色後、UV トランスイルミネーター(BIO-RAD)で増幅断片を確認した。そして、400 bp 付近の増幅断片をカットし、NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ株式会社)により、PCR 産物を精製した。

続いて、Nextera XT Index kit v2 Set C (イルミナ社)を用いて、説明書に従い、デュアルインデックスおよびイルミナシークエンスアダプターを付加した。その後、AMPure XP beads (Beckman Coulter) 50  $\mu$ L を用いて、増幅産物の精製(解析試料の作製)を行った。

#### 2.1.6. シークエンス解析による血清型の同定

得られた解析試料に対して、イルミナ社の説明書に従い、ライブラリー試料を作製した。ここで

は、DNA濃度を4pMに調整し、同様の濃度に調整したPhiXコントロール(PhiX control v3: イルミナ社)が全体の20%になるように混和した試料を解析に供した。なお、DNA配列情報取得にはMiseq(イルミナ社)を用いた。得られたDNA配列情報をBase Space (Web)にインポートした後、Fastq Trimming Toolを用いてクオリティが低い3'末端部100bpを取り除き、Kraken Miniという解析ツールを用いて各試料から得られたDNA配列情報に基づき、アデノウイルス血清型の同定を行った。

### 2.1.7. 定量PCRによるウイルスの定量

StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用して、最も多い割合を占めたアデノウイルスF群(3.結果と考察を参照)の定量を行った。以下に用いた方法やPCR条件を述べていく。用いたプライマーとプローブ配列情報を表2にまとめる。なお、PEG濃縮による回収率については添加実験により算出し、ウイルス定量結果の算出に用いた。

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

また試料中の阻害影響評価を行うため、全試料に対して内在性コントロールとして既知濃度のプライマー共有コントロール遺伝子(PSC-DNA)を加えて反応を行った。その結果、阻害影響は確認されなかった。

表2 プライマー、プローブ情報一覧

対象	試薬	配列(5'→3')	参考文献
アデノウイルスF群(128 bp)	Forward primer(AdVF-F)	GCAGGACGCCTCGGAGTA	Lion et al.(2003) <sup>8)</sup>
Hexon gene	Reverse primer(AdVF-R)	TGTCTGTGGTTACATCGTGGGT	
	Probe(AdVF-P)	FAM-TACTTCAGCCTGGGGAACAAGTTCAGAAA-NFQ MGB	
	Probe(AdVF-PSC-DNA)	VIC-TGGTTCCTCTCCGAAATAGATTAGGGGCTA-NFQ MGB	

## 2.2. 水道水飲用に伴う病原ウイルスが引き起こす健康影響の定量化

まず、得られた淀川水中のアデノウイルス数の単位を genome copies から  $\text{TCID}_{50}$  に変換(表3参照)した後、曝露量(小松らによるインターネット調査データ<sup>9)</sup>を使用)を乗ずることでヒトが1回水道水飲用により摂取するウイルス摂取量(Dose)を求めた。さらに各用量-反応モデル式(式1)を用いて、1回当たりの感染確率( $P_{inf,d}$ ) $\text{人}^{-1}\text{日}^{-1}$ を算出した。

$$P_{inf,d} = 1 - \exp(-r \times \text{Dose}_{AdV}) \quad (\text{式1:})$$

ここでnは曝露回数を示す。感染-発症割合( $P_{ill,inf}$ )については、表3に示した値を用いた。続いて、式2を用いて1回あたりの発症確率を算出し、そして、1年間の水道水飲用日数(365日)に基づいて、式3を用いて各病原微生物曝露による年間の発症確率 $P_{ill,y}$ を算出した。

$$P_{ill,d} = P_{inf,d} \times P_{ill,inf} \quad (\text{式2})$$

$$P_{ill,y} = 1 - (1 - P_{ill,d})^n \quad (\text{式3})$$

最後にDALYsを用いて、アデノウイルスF群起因の健康影響を定量化した。本研究では、DALYs算定にHavelaarら(2003)が用いた単純化した計算式<sup>10)</sup>を用いることとする。DALYs算定式を以下に

示す。

$$DALYs=YLL+YLD \quad (式4)$$

$$YLL=\sum_i d_i \times e_i \quad (式5)$$

$$YLD=\sum_i n_i \times t_i \times w_i \quad (式6)$$

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

続いてアデノウイルスF群が引き起こす健康影響は胃腸炎のみと設定した。DALYsでは、YLLとYLDにより算出されるが、本研究で対象とした病原ウイルスの死亡率が非常に低いことからDALYs値への影響が非常に低いことが確認された。そのため、DALYs caseはYLDにより算出することとした。YLDの算出においては、Havelaarら(2012)が設定した重篤度、疾病の継続時間<sup>11)</sup>を用いることとし、入院率等のパラメーターは日本のデータを用いて推定した。

最後に、式7を用いて年間一人あたりのDALYsを算出した。算出に用いたパラメーターを表3にまとめる。

$$DALYs\ ppp\ y = DALYs\ case \times P_{ill,y} \quad (式7)$$

表3 健康影響定量化に用いたパラメーター一覧

内容	パラメーター	参考文献
曝露関係(単位換算)		
アデノウイルスF群	TCID <sub>50</sub> /gonome copies	1/700 McBride <i>et al.</i> (2013) <sup>12)</sup>
用量-反応モデル関係		
アデノウイルスF群	$r$	0.4172 Hass <i>et al.</i> (1999) <sup>13)</sup>
感染-発症割合		
アデノウイルスF群	$P_{ill/inf, Adv}$	0.5 McBride <i>et al.</i> (2013) <sup>12)</sup>
リスク評価		
DALYs case—アデノウイルスF群	DALYs/illness casa	0.0050 Havelaar <i>et al.</i> (2012) <sup>11)</sup>

### 2.3 健康成果目標達成に必要な要求処理能の推定

ここでは、2.2で示した式とパラメーターを用いて、図2の手順に従い、健康成果目標(10<sup>6</sup>DALYs/人・年)達成に必要な浄水処理の要求処理能を推定した。シミュレーションにはCrystal Ball<sup>®</sup>7 (Decisinoering)を用い、対象微生物の年間感染確率の算出に用いる各データセットに対する分布形の適合とモンテカルロシミュレーションを行った。シミュレーション回数は安定した結果が得られる100,000回とした。

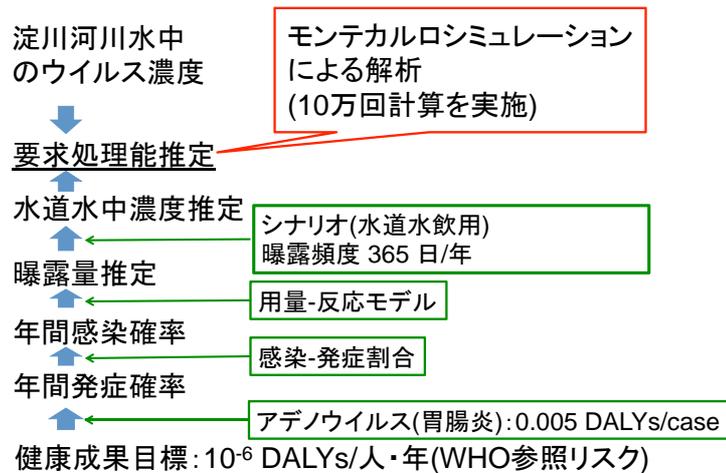


図2 健康成果目標達成に必要な処理能の推定手順

### 3. 結果と考察

#### 3.1. シークエンス解析試料作製の検討

シークエンス解析試料の精製状況を図3に示す。図1と比較すると、2.1.5.に記述した手法によりPCR副産物(プライマーダイマーなど)の出現を抑制できたと言える。そのため、本研究にて提示した手法を用いて、シークエンス解析試料の作製を行うこととした。

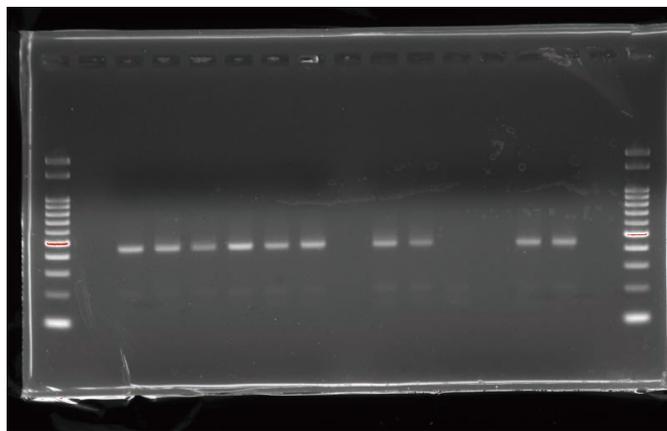


図3 電気泳動像：シークエンス解析試料の精製状況

#### 3.2. 河川水中のアデノウイルス血清型検出状況

下水処理水、淀川、桂川でのアデノウイルス血清型の検出結果の一部を図4に示す。確認されたヒトアデノウイルスは、C群、D群、F群、G群であった。確認されたアデノウイルスの血清型と表1の情報から、下水処理水、河川環境中には、胃腸炎以外にも咽頭結膜熱や呼吸器感染症など様々な疾病を発症させる可能性があるアデノウイルスの存在が示された。しかし、それらの検出率は0.01%未満が多く、99%近くはアデノウイルスF群が占める結果となった。また、ヒト以外にはサルに感染するアデノウイルスが確認された。

さらに、A549細胞を用いた感染実験を実施し、感染が確認された試料からDNAを抽出したものをシ

一クエンス解析に供した結果も、同様にアデノウイルス F 群が 99%以上を占める結果となった。まとめると、下水処理水がアデノウイルス F 群の大きな汚染源であり、アデノウイルス F 群は感染価を保持しながら水環境で生存していることが明らかとなった。

以上、水道水曝露により健康影響を引き起こす着目すべき血清型は、アデノウイルス F 群であると判断した。そこで、要求処理能推定のターゲットをアデノウイルス F 群とし、引き起こされる健康影響を胃腸炎と設定した。

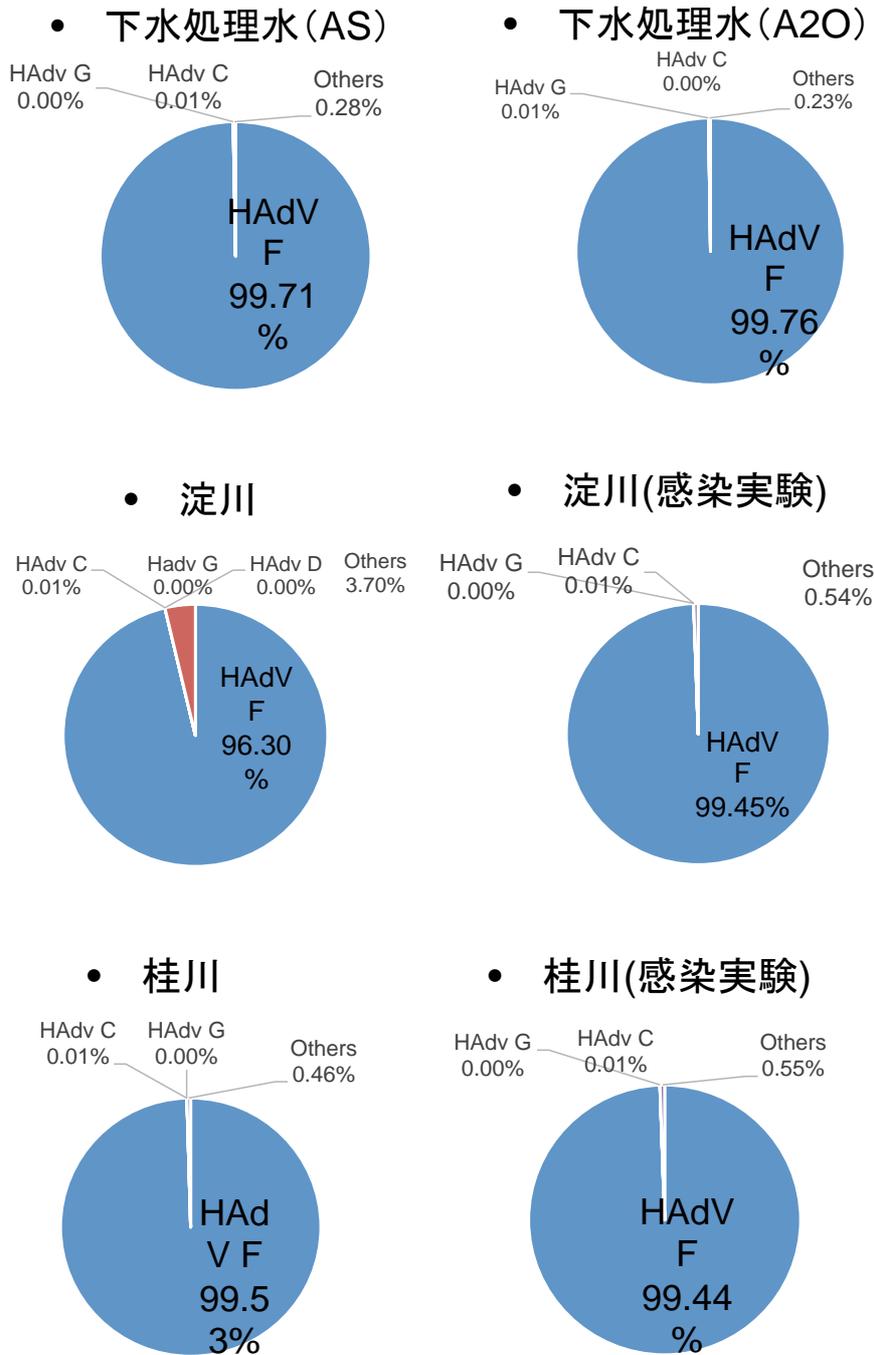


図 4 各試料でのアデノウイルス血清型検出状況

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

本研究では淀川の定量データを用いて、水道水飲用による病原微生物の健康影響定量化を試みた。まず、淀川でのアデノウイルス F 群の定量結果を図 5 に示す。定量結果のほとんどは  $10^5$ - $10^7$ copies/L に収まっているが、 $10^8$ copies/L の定量結果も確認された。これは、豪雨など一時的に発生する濃度レベルである可能性が高い。そのため、安全性評価においてどこまで制御すべきか検討する必要がある。そこで、QMRA 手法を用いて得られた全データに対して分布を適合させ、モンテカルロシミュレーションを行うことで頻度は低いが高濃度の部分も考慮したリスク評価を試みることにした。

続いて、得られたデータから感染確率を推定したところ、アデノウイルスの感染リスクは感染確率 100% となった。そのため、WHO が設定した参照リスクである  $10^6$  DALYs/人・年を健康成果目標とし、微生物学的安全性確保のために必要なアデノウイルス F 群の要求処理能についてモンテカルロシミュレーションを用いて算出した。シミュレーション結果を図 6、結果をまとめたものを図 7 に示す。

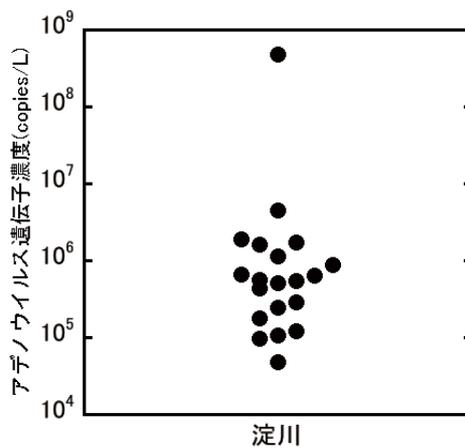


図 5 淀川でのアデノウイルス遺伝子数の測定結果

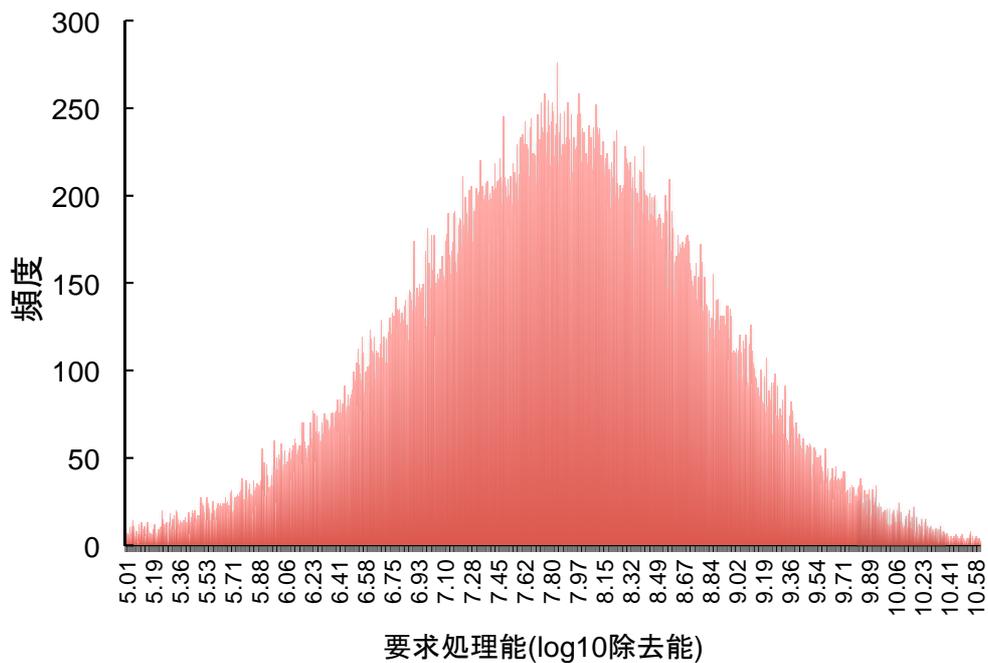


図 6 健康成果目標を達成するための要求処理能分布の結果(100,000 回)

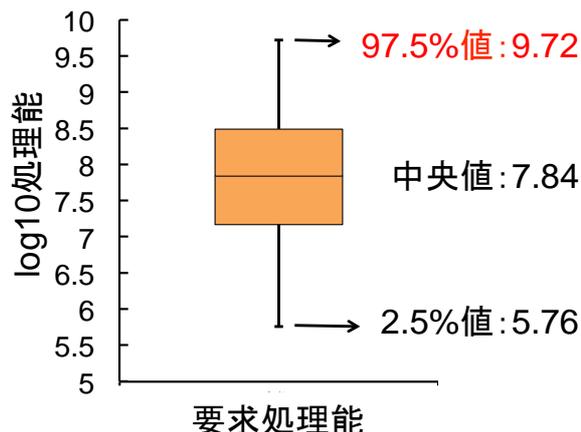


図7 要求処理能のシミュレーション結果のまとめ(箱ひげ図: 2.5% ~ 97.5%の範囲)

シミュレーション結果では、要求処理能の平均値が  $7.81 \log_{10}$ 、中央値が  $7.84 \log_{10}$  となった。安全側を考慮する場合には 97.5%値が考慮されており、本研究で得られた結果は  $9.72 \log_{10}$  であった。アデノウイルスに対して塩素は消毒効果があることが示されている<sup>14)</sup>が、本研究で得られた要求処理能は非常に高い結果であるため、水道水の微生物学的安全性の確保には塩素以外の処理プロセスにも消毒効果を期待する、あるいは浄水処理だけでなく下水処理でのウイルス制御が重要であると考えられる。

#### 4. まとめ

本研究では、淀川水系を対象とし、シーケンス解析によるアデノウイルス血清型の検出を試みた。そしてその結果に基づき、水道水飲用を推定した場合の健康影響の定量化を試み、健康成果目標の達成に必要な浄水処理での要求処理能を推定した。

以下に得られた知見を述べる。

- 1) アデノウイルス血清型の存在実態調査に向けて、シーケンス解析に供する試料の精製方法を示した。
- 2) 調査の結果、アデノウイルス C, D, F, G 群の存在が確認された。その中で、アデノウイルス F 群が高頻度で確認されたことから、その管理の重要性を指摘した。そしてリスク評価において、引き起こされる主な健康影響として胃腸炎を設定した。
- 3) 水道水飲用を想定し、健康成果目標( $10^6$  DALYs/人・年)に基づいて要求処理能を推定した結果、安全側(97.5%値)で  $9.72 \log_{10}$  の処理能が必要であることを示した。
- 4) 算定した要求処理能は非常に高いため、水道水としての微生物学的安全性の確保には、塩素以外の処理プロセスの消毒効果の把握や下水処理でのウイルス制御が重要であることを指摘した。

#### <参考文献>

- 1) 山田俊郎, 秋葉道宏: 最近 10 年間の水を介した健康被害事例, 保健医療科学, Vol. 56, No. 1, pp.16-23, 2007.
- 2) Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S.: Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments, *J. Appl. Microbiol.*, Vol.103, No.6, pp.2153-2159, 2007.
- 3) Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S.: One-year monthly

- quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan, *Water Res.*, Vol.42, No.6, pp.1441-1448, 2008.
- 4) Kishida, N., Morita, H., Haramoto, E., Asami, M., Akiba, M.: One-year weekly survey of noroviruses and enteric adenoviruses in the Tone River water in Tokyo metropolitan area, Japan, *Water Res.*, Vol.46, pp.2905-2910, 2012.
  - 5) 浅田安廣：淀川流域における病原ウイルスの存在把握ならびに健康影響評価, 平成 28 年度水質保全研究助成成果報告書, 琵琶湖・淀川水質保全機構, 2017, [www.byq.or.jp/josei/h28/presentation\\_materials/presen16\\_asada.pdf](http://www.byq.or.jp/josei/h28/presentation_materials/presen16_asada.pdf), (2018 年 3 月 30 日閲覧)
  - 6) 国立感染症研究所：アデノウイルス感染症 2008~2017 年 6 月, *IASR*, Vol.38, pp.133-135, 2017.
  - 7) Ogorzaly, L., Walczak, C., Galloux, M., Etienne, S., Gassilloud, B., Cauchie, H. M.: Human Adenovirus Diversity in Water Samples Using a Next-Generation Amplicon Sequencing Approach, *Food Environ. Virol.*, Vol.7, pp.112-121, 2015.
  - 8) Lion, T., Baumgartinger, R., Watzinger, F., Matthes-Martin, S., Suda, M., Preuner, S., Futterknecht, B., Lawitschka, A., Peters, C., Pötschger, U. *et al.* : Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease, *Blood*, Vol. 102, No. 3, pp. 1114-1120, 2003.
  - 9) 小松良光, 近藤才寛, 田川克弘: インターネットアンケートに基づく蛇口からの非加熱飲水量の調査およびデータ解析, 水道協会雑誌, Vol.82, No.3, pp.16-25, 2013.
  - 10) Havelaar, A. H., Melse, J. M.: Quantifying public health risk in the WHO Guidelines for drinking-water quality; A burden of disease approach, Report 734301022, RIVM, Bilthoven, the Netherlands, 2003.
  - 11) Havelaar, A. H., Haagsma, J. A., Mangen, M. J., Kemmeren, J. M., Verhoef, L. P., Vijgen, S. M., Wilson, M., Friesema, I. H., Kortbeek, L. M., van Duynhoven, Y. T., van Pelt, W.: Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009, *Int. J. Food Microbiol.*, Vol.156, pp.231-238, 2012.
  - 12) McBride, G. B., Stotta R., Miller, W., Bambic, D., Wuertz, S.: Discharge-based QMRA for estimation of public health risks from exposure to stormwater-borne pathogens in recreational waters in the United States, *Water Res.*, Vol.47, pp.5282-5297, 2013.
  - 13) Haas, C. N., Rose, J. B., Gerba, C. P.: *Quantitative Microbial Risk Assessment*. Wiley, NY., 1999.
  - 14) Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J. and Gerba, C. P.: Chlorine Inactivation of Adenovirus Type 40 and Feline Calicivirus, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.69, No.7, pp.3979-3985, 2003.