

# 障害調整生存年数に基づいた飲用水に起因する カンピロバクター感染症の健康影響評価

(研究助成金 60万円)

代表研究者 京都大学大学院 工学研究科

浅田 安廣

## I はじめに

我が国の水道システムでは、塩素消毒後のカルキ臭がもたらす快適性の低下、副生成物がもたらす健康影響などによる水道水離れ問題の解決策として残留塩素の低減が提案されている。残留塩素濃度低減型水道システムを想定する場合には多くの病原微生物による感染リスクが増大する危険性が考えられるため、多種多様な病原微生物が引き起こす様々な健康影響の評価に有益である障害調整生存年数(DALYs)に基づいたより高度な微生物リスク管理手法の構築が必要となる。

日本での水系感染症事例では、病原大腸菌、*Campylobacter jejuni*、最近ではノロウィルスなどが挙げられる<sup>1)</sup>。残留塩素低減を実施する場合、塩素消毒の不備等により水系感染事例を引き起こしている*C. jejuni*は感染リスクを増大させる可能性がある。さらに*C. jejuni*は、下痢症のみならずギラン・バレー症候群(GBS)、反応性関節炎といった重篤な健康影響を引き起こすため、DALYsを用いた評価は有益である。

そこで本研究では、DALYsを用いた病原微生物感染による健康影響評価手法の確立を目的とし、*C. jejuni*をリスク評価対象とした。飲料水曝露による*C. jejuni*が引き起こす健康影響をDALYsで定量化するために必要な情報として、環境水中*C. jejuni*濃度、*C. jejuni*感染症後のGBS発症の有無を取り上げ、水道原水中*C. jejuni*の実態調査を行った。最後に、浄水処理プロセスとして凝集-沈殿処理、急速ろ過処理、塩素処理の3ステップによる従来型の浄水処理プロセスを想定し、得られた*C. jejuni*実態調査の情報から飲料水曝露によるDALYsを推定した。

## II 方法

### 1. 環境水中の*C. jejuni* 定量

本研究では測定対象地域として、*C. jejuni*が高濃度で存在すると予想されるA下水処理場放流水が完全に混合する河川水の下流5 km地点を選定した。この地点は、下水処理施設からの放流水の影響を受けていると判断される。また、対象地点の*C. jejuni*汚染源と予想されるA下水処理場の下水二次処理水の測定も行った。この時、*C. jejuni*濃度の季節変動の把握するために2013年5月から2013年12月までの8ヶ月間で、1ヶ月に1回ずつ*C. jejuni*濃度の測定を行った。

#### *C. jejuni*定量方法

*C. jejuni*定量方法として、二段階増菌培養とMPN-PCR法を組み合わせた定量方法を用いた。MPN-PCR法は、PCRにより*C. jejuni*に特異的なDNA配列を増幅することで、感度良く試料水中の*C. jejuni*を定性的に検出し、MPN法を用いた統計的な方法で定量する方法である。二段階増菌培養は、損傷菌の回復ステップとしてボルトン培養、夾雑細菌抑制および*C. jejuni*増菌ステップとしてプレストン培養を組み合わせた培養方法である。この方法により、対象試料中の夾雑細菌を抑制しつつ、*C. jejuni*をPCR検出可能レベルまで増菌させることが可能である<sup>2)</sup>。実験手順を以下に示す。

試料水を採取後、4℃に保冷した状態で実験室まで運搬し、測定は原則3日以内に行った。検水の接種量は下水処理水で1000mL、100mL、10mL、1 mL、0.1mLの5段階の内、適切と判断した4段階を設定した。また河川水は3 L30本法で測定を行った。

次に、*C. jejuni*の増菌培養手順を示す。検水量が10mL以上であれば、サンプルを孔径0.2μmのメンブレンフィルター（ADVANTEC, C020G047A）を用いて、吸引ろ過により試料中の細菌を無菌的にフィルター上に捕集した後、すぐにフィルターを増菌培養液（ボルトン培地）10 mLに浸し、微好気培養を行った。一方検水量が1 mLの場合は直接10mL培養液に、0.1mLの場合はオートクレーブ滅菌した希釈用リン酸緩衝液（pH7.2）でサンプルを10倍希釈し、希釈液1 mLを直接10 mL培養液に添加し、微好気培養を行った。また3 L30法の場合は3 Lを30本、滅菌した孔径0.2μmのメンブレンフィルター（ADVANTEC, A090G090A）で加圧ろ過した後、すぐにフィルターをボルトン培地20mLに浸した。微好気培養では、それぞれ37℃で24時間培養を行った。その後、培養液を2 mL採取し、プレストン培地10mLに播種し、42℃で24時間微好気培養した。

続いてDNA抽出およびPCRの実験手順を示す。2日間増菌培養した培養液1 mLを採取し、洗菌操作を2回行い、回収した菌体からDNeasy Blood & Tissue Kit®（QIAGEN）を用いて、DNAを抽出した。そしてDNA抽出液を鋳型DNAとし、PCR反応液を作製した。PCR反応液は、TAKARA Ex Taq（タカラバイオ）と*C. jejuni*に特異的な2種類プライマー<sup>3)</sup>を調製して作製した。PCRはサーマルサイクラー（TAKARA PCR Thermal Cycler Dice®, タカラバイオ）を用いて、95℃で5分間の鋳型DNA変性の後、95℃で40秒の変性、59℃で1分のアニーリング、72℃で1分の伸長ステップを35サイクル行い、最後に72℃で10分間の伸長ステップを追加した。その後、

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、Gel Doc™ XR+システム（BIO-RAD）によりUV照射を行い、標的とする589bpの増幅断片が確認できたサンプルを*C. jejuni*陽性と判断した。最後に、各検水量に対する陽性数から、MPN法に従い最確数を決定した。

## 2. 環境水中の*C. jejuni*分離およびGBS発症関連菌株の推定

ここではメンブレンフィルターによる*C. jejuni*分離方法を用いて、*C. jejuni*の分離を行った。次に*C. jejuni*感染症発症後のGBS発症の有無を設定するために、GBS発症関連*C. jejuni*菌株の抽出を行った。その時、分離した*C. jejuni*菌株に対してGBS発症に関連するリポオリゴ糖（LOS）構造クラスA, B, Cのクラス判定を行い、クラスA, B, Cと判定された菌株をGBS発症関連菌株と判断した。

### *C. jejuni*分離方法

*C. jejuni*増菌培養は、定量方法と同様の操作を行った。メンブレンフィルターによる*C. jejuni*分離では、Rechenburgら（2009）が下水中からの*C. jejuni*分離に成功している<sup>4)</sup>。ここでは、Rechenburgら（2009）の研究を参考にメンブレンフィルターによる*C. jejuni*分離方法を構築することとした。実験手順を以下に示す。

まず増菌培養した培養液を1 mL回収し遠心分離した後、上清を取り除いて200  $\mu$ LのPBS（pH 7.4）に再懸濁した。ニトロセルロースメンブレンフィルター（孔径0.45  $\mu$ m, Whatman）をCCDA寒天培地上に乗せて、懸濁溶液を全てメンブレンフィルター上に添加し、37°Cで2時間培養した。培養後、メンブレンフィルターを取り除き、そのまま42°Cで48時間培養した。48時間培養後、CCDA寒天培地に分離されたコロニーから疑わしい集落を全て釣菌し、PBS（pH7.4）に懸濁した後、好気培養用、微好気培養用のCCDA寒天培地2枚に同量添加した。そして、好気条件および微好気条件で42°C、48時間培養し、コロニーの形成状況を確認した。最終的に微好気条件のみで生えたコロニーをリン酸緩衝液（pH7.2）に懸濁し、懸濁液をPCRに供した。PCR以降の操作は、定量方法と同様の操作を行った。

### 遺伝子保有状況によるGBS発症関連菌株の存在実態把握

LOS構造クラス判定には、様々な遺伝子保有状況の確認が必要である<sup>5)</sup>。本研究ではLOS構造クラスとして、クラスA, B, Cのみを判定するため、Kogaら（2006）がクラスA, B, C判定に用いた遺伝子（*orf 7 a/b* (*cst II*)：クラスA, B, *orf 5 II b* (*cgtA II b*)：クラスB, *orf 14 c*：クラスC）に特異的な2種類のプライマー<sup>6)</sup>を用いた。そして*C. jejuni*分離菌株に対してPCRにより各遺伝子の保有状況を把握し、LOS構造クラスを判定した。判定方法は、*orf 7 a/b*のみ保有している場合はクラスA, *orf 7 a/b*, *orf 5 II b*を保有している場合はクラスB, *orf 14 c*のみ保有している場合はクラスCとした。いずれの遺伝子も検出しなかった場合はUC（Unclassified）とした。

### 3. *C. jejuni* 感染症に伴う障害調整生存年数の推定

従来の浄水処理として、①凝集－沈殿処理、②急速ろ過処理、③塩素処理の3つのステップを想定した。障害調整生存年数算出の手順を図1に示す。

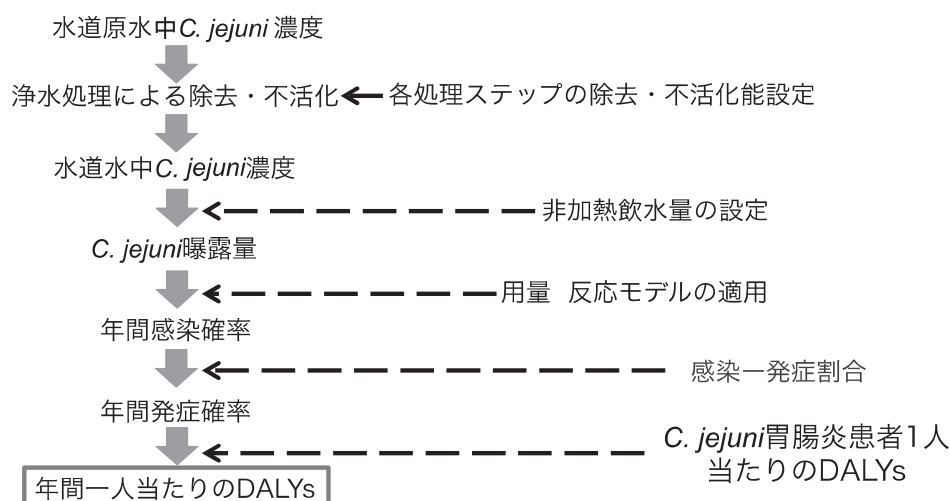


図1 障害調整生存年数推定の手順

まず水道原水中の *C. jejuni* 濃度を決定し、各処理プロセスの除去・不活化能を適用し、水道水中の *C. jejuni* 濃度を算出する。なお各処理プロセスの除去・不活化能については、*C. jejuni* に関するデータが不足しているため、同程度の除去・不活化能を示すと考えられる大腸菌のデータを用いることとした。次に大阪市水道局が2009年に行った飲水量調査のデータ<sup>7)</sup>を用いて、水道水中 *C. jejuni* 濃度から1日当たりの *C. jejuni* 摂取量を算出する。*C. jejuni* の用量－反応モデルを適用し、*C. jejuni* の年間感染確率を求める。求めた *C. jejuni* の年間感染確率に対して、浅田ら(2012)が推定した感染－発症割合<sup>8)</sup>を適用し、1人当たりの年間の *C. jejuni* 感染症発症率を算出する。次に *C. jejuni* 感染症が発症した場合に起こりうる疾病を選定(詳細後述)し、各疾病に対して重篤度、持続期間、発症率を設定する。設定したパラメータに基づいて *C. jejuni* 感染症患者1人当たりのDALYsを求める。最後に1人当たりの年間の *C. jejuni* 感染症発症率を用いて *C. jejuni* 感染症による年間1人当たりのDALYsを算定する。

#### 年間感染確率算出に必要なデータ群に対する分布形の選定

年間感染確率算出には水道原水中 *C. jejuni* 濃度、凝集－沈殿処理、急速ろ過処理、塩素処理の各ステップの除去・不活化能、飲料水調査データが必要となる。そして、得られたデータ群に対して適した分布形を当てはめる。これは、各データ群の変動性を考慮するために行われる。そしてモンテカルロシミュレーションを行うことで、データ群の変動性を含んだ形で最終目的の推定値、つまり年間感染確率の推定値を分布で示すことが可能となる。

ここでは、上述した各データ群に対してCrystal Ball 7 (Decisinoeering 社製)を用いて、最

も適した分布形の選定を行った。判断基準としては、感染確率に大きな影響を及ぼす低頻度ケースへの適合性を重視するために、アンダーソン・ダーリング検定の結果を重視し、必要に応じてカイ2乗 ( $\chi^2$ ) 検定や、コルモゴロフ・スミルノフ検定の結果も踏まえて判断した。なお、データ数が15個未満の場合は、データ群に対して三角分布を設定した。

年間感染確率推定に必要な分布データと適用した分布形を表1にまとめる。

表1 年間感染確率推定に必要な分布データと適用した分布形

要素	適合分布形	パラメーターとその推定値	使用データ
原水中 <i>C. jejuni</i> 濃度 ( <i>C. jejuni</i> /L)	対数正規分布	平均値: $1.80 \times 10^{-1}$ , 標準偏差: $4.32 \times 10^{-1}$	取得データ
凝集・沈殿	$\beta$ 分布	最小値: 0.65, 最大値: 5.25, $\alpha=6.23$ , $\beta=7.51$	研究室未発表データ
除去・不活化能 急速砂ろ過	三角分布	最小値: 0.4, 最大値: 1.5, 最尤値: 0.9	Medema et al. 2006 <sup>9)</sup>
塩素	三角分布	最小値: 3.44, 最大値: 5.83, 最尤値: 4.03	研究室未発表データ
非加熱飲水量 (mL 日 <sup>-1</sup> )	指数分布	比率: $3.06 \times 10^{-3}$	小松ら 2013 <sup>7)</sup>

#### DALYs算定に必要なパラメータの設定

*C. jejuni*は胃腸炎 (*C. jejuni*感染症) を発症させ、回復後に様々な疾病を引き起こす(続発症)ことが知られている。Havelaarら(2003)はDALYs算定で続発症として、ギラン・バレー症候群(GBS)という重篤な神経疾患と反応性関節炎を設定している<sup>10)</sup>。GBS発症関連菌株が確認された場合、GBSも続発症として疾病モデルに組み込むことにしている。*C. jejuni*感染症と続発症を含めた疾病モデルを図2に示す。この疾病モデルに従った場合、*C. jejuni*胃腸炎患者1,000人当たりのDALYsを4.59 DALYs/1000人<sup>9)</sup>と設定した。

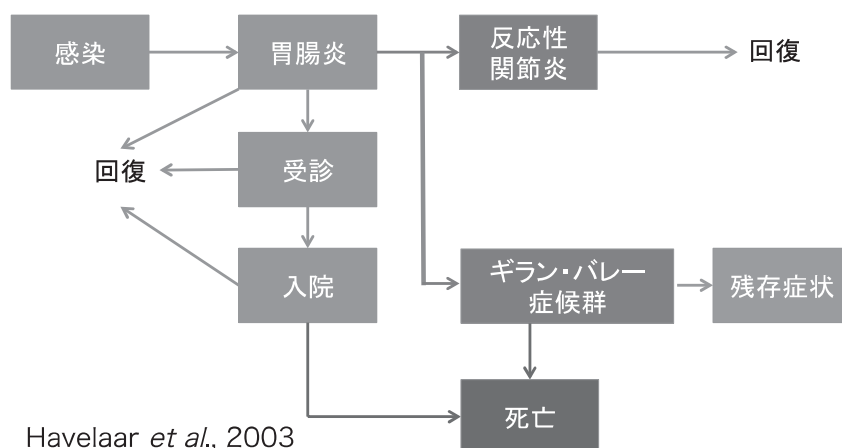


図2 *C. jejuni* 感染症疾病モデル

### Ⅲ 結果

#### 1. *C. jejuni* 感染症に伴う障害調整生存年数の推定

河川水、下水処理水の *C. jejuni* 定量結果を今まで取得したデータとともに図3に示す。河川水では、0.011~1.5MPN/Lの濃度範囲で変動し、8月、12月に高い濃度上昇が見られた。一方、下水処理水では  $7.4\sim 1.2\times 10^4$ MPN/Lの濃度範囲で変動し、特に7~8月と冬季に $10^4$ MPN/Lを越える濃度上昇が見られた。

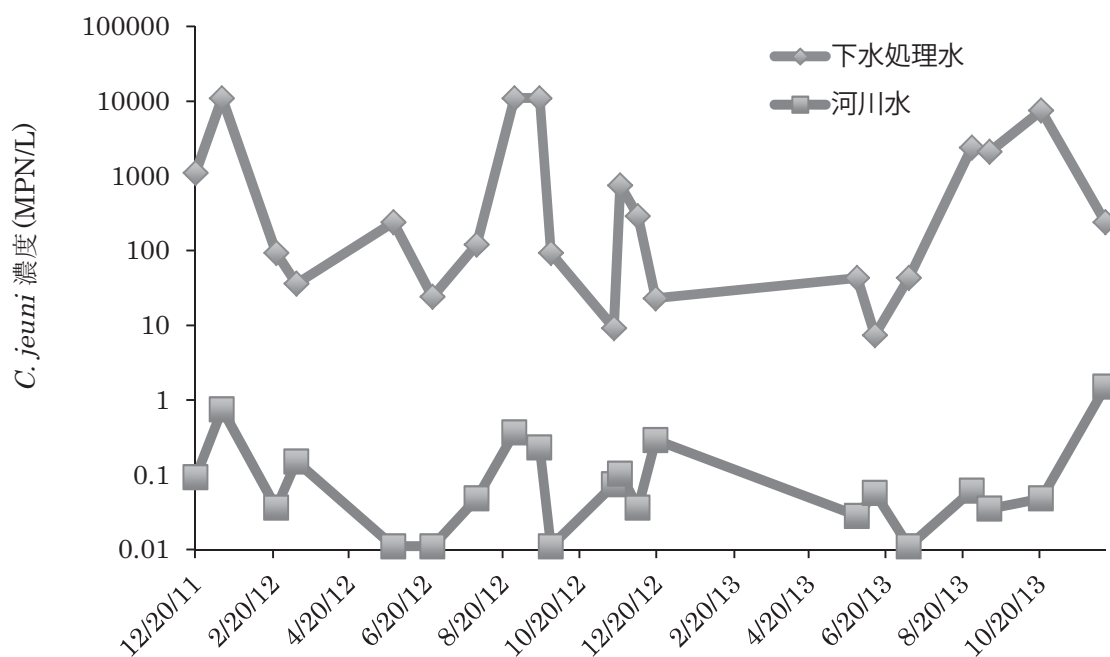


図3 河川水、下水処理水の *C. jejuni* 数測定結果

今回のサンプリング地点は、下水処理水放流口から距離があまりないことから、高濃度の *C. jejuni* を含む下水処理水が放流されることが影響して、河川水の *C. jejuni* 濃度が上昇している可能性がある。

#### 2. 環境水中の *C. jejuni* 分離およびGBS発症関連菌株の推定

河川水から分離した *C. jejuni* 分離菌株全76株のLOS構造クラスを判定した結果、クラスAが14株 (16%)、クラスBが0株 (0%)、クラスCが3株 (4%)、クラスA、Cの複合クラスが3株 (4%)、UCが56株 (73%) であった。GBS発症に関連する構造クラスの中では、クラスAが最も多い割合を占めていた。Kogaら (2006) は、胃腸炎、GBS 発症患者から分離した *C. jejuni* 菌株に対して、LOS構造クラス判定 (クラスA~F) と抗ガングリオシド抗体 (GM1a抗体、GD1a抗体、GQ1b抗体) との交差反応性の確認を行っている<sup>6)</sup>。その結果、クラスAを持つ菌株とGM1a

抗体、GD 1 a抗体と交差反応が最も強く起きており、GBS発症との関連性を高いと報告している<sup>6)</sup>。本研究でも、クラスAが最も多く確認されていることから、河川水から分離した菌株の中にGBS発症関連菌株が存在する可能性が高いと判断できる。そのため、飲料水曝露後の *C. jejuni* が引き起こす疾病の中にGBS発症のリスクが存在すると考えられる。

### 3. *C. jejuni* 感染症に伴う障害調整生存年数の推定

解析で得られた、各要素のシミュレーション結果を以下に示す。

まず凝集-沈殿処理、急速砂ろ過、塩素処理の3ステップからなる浄水処理プロセスでの総合除去・不活化能の分布は、平均値7.42log<sub>10</sub>、中央値8.08 log<sub>10</sub>となった。

原水の *C. jejuni* 濃度分布と総合除去・不活化能分布から求めた水道水中の *C. jejuni* 濃度の分布は、平均値6.70×10<sup>9</sup> *C. jejuni*/L、中央値5.59×10<sup>10</sup> *C. jejuni*/Lとなった。ここでは、総合除去・不活化能で分布を与えていることから、水道水中の *C. jejuni* 濃度が0とはならない点が重要となる。つまり、この結果は *C. jejuni* は非常に小さい濃度で存在することを表しており、年間感染確率を算出することが可能であると言える。

次に一日当たりの *C. jejuni* 摂取量分布は、平均値2.22×10<sup>9</sup> *C. jejuni* 日<sup>-1</sup>、中央値1.08×10<sup>10</sup> *C. jejuni* 日<sup>-1</sup>となった。そしてこの分布と用量-反応モデルから、一日当たりの *C. jejuni* 感染確率が求められる。その結果、一日当たりの *C. jejuni* 感染確率の分布は、平均値1.52×10<sup>9</sup> 人<sup>-1</sup>日<sup>-1</sup>、中央値7.38×10<sup>11</sup> 人<sup>-1</sup>日<sup>-1</sup>となった。

続いて一日当たりの *C. jejuni* 感染確率を用いることで、*C. jejuni* の年間感染確率が計算される。その結果、*C. jejuni* の年間感染確率の分布は、平均値で5.56×10<sup>7</sup> 人<sup>-1</sup>年<sup>-1</sup>、中央値では2.70×10<sup>8</sup> 人<sup>-1</sup>年<sup>-1</sup>となった。ここで、各要素の推定値を、2.5パーセンタイル値、97.5パーセンタイル値とともに表2にまとめる。

表2 年間感染確率推定の各要素と推定値

	P <sub>2.5</sub>	中央値	平均値	P <sub>97.5</sub>
総合除去・不活化能	6.58	8.08	7.42	9.75
水道水中 <i>C. jejuni</i> 濃度 ( <i>C. jejuni</i> /L)	5.17×10 <sup>-12</sup>	5.59×10 <sup>-10</sup>	6.70×10 <sup>-9</sup>	4.76×10 <sup>-8</sup>
<i>C. jejuni</i> 摂取量 ( <i>C. jejuni</i> 日 <sup>-1</sup> )	4.40×10 <sup>-13</sup>	1.08×10 <sup>-10</sup>	2.22×10 <sup>-9</sup>	1.46×10 <sup>-8</sup>
一日当たりの感染確率 (人 <sup>-1</sup> 日 <sup>-1</sup> )	3.02×10 <sup>-13</sup>	7.38×10 <sup>-11</sup>	1.52×10 <sup>-9</sup>	1.00×10 <sup>-8</sup>
年間感染確率 (人 <sup>-1</sup> 年 <sup>-1</sup> )	1.10×10 <sup>-10</sup>	2.70×10 <sup>-8</sup>	5.56×10 <sup>-7</sup>	3.66×10 <sup>-6</sup>

続いて、飲料水起因の *C. jejuni* 感染にともなう健康影響をDALYsを用いて推定した。結果について、2.5パーセンタイル値、97.5パーセンタイル値を含めて表3に示す。ここで、最も大きいDALYsは、感染-発症割合の最大値53.8%を用いている場合である。その時の推定値が平均値で、 $1.37 \times 10^{-9}$  DALYs人<sup>-1</sup>年<sup>-1</sup>あった。

表3 飲料水起因の *C. jejuni* 曝露による健康影響推定値 (DALYs人<sup>-1</sup>年<sup>-1</sup>)

	P <sub>2.5</sub>	中央値	平均値	P <sub>97.5</sub>
ケース1 (感染-発症割合最大)	$2.72 \times 10^{-13}$	$6.66 \times 10^{-11}$	$1.37 \times 10^{-9}$	$9.03 \times 10^{-9}$
ケース2 (感染-発症割合最小)	$6.12 \times 10^{-14}$	$1.50 \times 10^{-11}$	$3.09 \times 10^{-10}$	$2.03 \times 10^{-9}$

注)感染-発症割合：最大 53.8%, 最小12.1%

#### IV 考 察

まず、*C. jejuni* 存在量の年間変動について考察する。諸外国での下水処理水 *Campylobacter* 存在量の年間調査では夏季に存在量が多いという報告がある<sup>11-13)</sup>。そして放流下水中の *Campylobacter* 存在量の季節変動は、*Campylobacter* 感染症の患者数の季節変動と同じ傾向を示すという報告もある<sup>11-12)</sup>。

本研究での調査期間における、病原微生物検出情報で報告されている *C. jejuni* 検出件数は5月～8月と夏季に多い傾向であった。そして本研究で調査した下水処理水での *C. jejuni* 定量結果も7月、8月は存在量で多い結果となった。しかし、食中毒件数が最も少なくなる冬季でも、下水処理水中の *C. jejuni* の存在量は夏季と同レベルであった。この傾向の要因の一つとしては、鶏肉の消費量が大きく関わっている可能性がある。

家計報告による京都市の鶏肉の購入頻度および購入金額を調査したところ、冬季に多い傾向であった。本研究で測定対象とした下水処理場には、鶏肉の消費量が直接下水流入水への *C. jejuni* 濃度に影響し、それが下水処理水の濃度にも影響していると考えられる。そして鶏肉の消費が多い冬季で、*C. jejuni* 排出量が多く、下水処理水中の *C. jejuni* 存在量も多くなったと予想される。

次に河川水における *C. jejuni* 存在量の年間変動について考察する。本研究で得られた桂川河川水の *C. jejuni* 濃度測定結果の年間変動は下水処理水と似た傾向を示しており、夏季、冬季が高く、春季、秋季が低い結果となった。

イギリスのルーン川で *C. jejuni* の年間変動を調査した報告では、夏季よりも冬季の方が *C. jejuni* 存在量が多い結果を示している<sup>14)</sup>。そして、この傾向は河川水の水温変化、太陽からの紫外線レベルの上昇が生残性に大きく影響していると考えられている<sup>14)</sup>。また、夏季よりも冬季の方が *C. jejuni* 存在量が多いという傾向は、他の研究者からも報告されている<sup>15-17)</sup>。なお、ここで言う生残性は、死滅したある



いは培養できない状態（VBNC状態）に変化したことを表している。

しかし、本研究で得られた結果は冬季のみならず夏季も濃度が高い結果となった。今回のサンプリング地点は、下水処理水放流口から距離があまりないことから、温度による影響で*C. jejuni*が死滅あるいはVBNC状態まで至らなかった可能性が高い。そのため、夏季に他の時期と比較して高濃度の*C. jejuni*を含む下水処理水が放流されることが影響して、河川水の*C. jejuni*濃度が上昇している可能性がある。

次に、研究室で得られた血清型と本研究で得られたLOS構造クラスの関係性を表4に示す。

表4 LOS 構造クラスと血清型の関係

LOS構造クラス	菌株数	血清型								
		D	J	L	U	Y	Z4	UT	D,J	D,L
A	14	3	2	1	0	2	0	2	1	3
C	3	0	1	0	0	0	0	2	0	0
A/C	3	0	0	0	0	0	0	2	1	0
UC	56	2	10	3	1	3	1	27	9	0

GBS発症関連菌株と判断された菌株の血清型では、D群、J群、L群、Y群、D、J群、D、L群（複合型）、UT群であった。なお、UT群は血清型判定試薬で分類できなかった血清型の総称である。比較した結果では、クラスA、CのLOS構造クラスを持つ菌株の血清型は様々であり、さらにUT群のからもGBS発症関連菌株の存在も確認されている。そのため、血清型だけの判定のみではGBS発症関連菌株の存在を把握しきれないと考えられる。

続いて、推定した*C. jejuni*感染による障害調整生存年数について考察する。全てのケースのDALYs推定値は、WHO飲料水水質ガイドラインが提唱している参照リスクレベルである $10^{-6}$ 人 $^{-1}$ 年 $^{-1}$ を下回っており、健康影響の観点からも微生物の安全性が確保されていると言える。しかし、浄水処理を経ずに直接原水を飲用する場合（浄水処理なし）を想定した場合、平均値で $1.94 \times 10^{-3}$  DALYs 人 $^{-1}$ 年 $^{-1}$ となり、直接原水を飲用する場合はそのリスクレベルを大幅に上回る結果となったため、水系感染事例でも確認されたように消毒の不備等により多くの水系感染が生じる危険性が考えられる。しかし、浄水処理を行うことで十分安全な水道水を供給可能であることが確認されている。つまり、原水の*C. jejuni*濃度が高い場合でも、浄水処理システムを適切に制御、管理を行えば、微生物学的安全性を保つことができると考えられる。

## V 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) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦: 環境水中に存在する *Campylobacter jejuni* の定量における増菌培養法の比較, 第47回日本水環境学会年会講演集, p.71, 2013.
- 3) Khan, I. U., Gannon, V., Loughborough, A., Jokinen, C., Kent, R., Koning, W., Lapen, D. R., Medeiros, D., Miller, J., Neumann, N., Phillips, R., Robertson, W., Schreier, H., Topp, E., and van Bochove, E., Edge, T. A.: A methods comparison for the isolation and detection of thermophilic *Campylobacter* in agricultural watersheds, *J. Microbil. Methods*, Vol.79, pp.307-313, 2009.
- 4) Rechenburg, A. and Kistemann, T.: Sewage effluent as a source of *Campylobacter* sp. in a surface water catchment, *Int. J. Environ. Health Res.*, Vol.19, No.4, pp.239-249, 2009.
- 5) Parker, C. T., Horn, S. T., Gilbert, M., Miller, W. G., Woodward, D. L. and Mandrell, R. E.: Comparison of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide biosynthesis loci from a variety of sources. *J. Clin. Microbiol.*, Vol.43, pp.2771-2781, 2005.
- 6) Koga, M., Gilbert, M., Takahashi, M., Li, J., Koike, S., Hirata, K. and Yuki, N.: Comprehensive analysis of bacterial risk factors for the development of Guillain-Barre syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis, *J. Infect. Dis.*, Vol.193, pp.547-555, 2006.
- 7) 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.16-23, 2013.
- 8) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦: 疫学調査に基づいた *Campylobacter jejuni* 感染における感染-発症割合に推定, 水環境学会誌, Vol.35, No.9, pp.135-142, 2012.
- 9) Medema, G.J., Loret, J. F., Stenstrom, T., Ashbolt, N. eds.: *MICRORISK; Quantitative microbial risk assessment in the water safety plan*, Final Report on the EU MicroRisk Project, EC, Brussels, 2006.
- 10) Havelaar, A. H. and 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) Jones, K., Betaieb, M. and Telford, D.R.: Seasonal variation of thermophilic campylobacters in sewage sludge. *J. Appl. Bacteriol.*, Vol.69, pp.185-189, 1990a.
- 12) Jones, K. Betaieb, M. and Telford, D. R.: Correlation between environmental monitoring of thermophilic campylobacters in sewage effluent and the incidence of *Campylobacter* infection in the community. *J. Appl. Bacteriol.* Vol.69, pp.235-240, 1990b.

- 13) Stampi, S., Varoli, O., DeLuca, G. and Zanetti, F.: Occurrence, removal and seasonal variation of "thermophilic" campylobacters in a sewage treatment plant in Italy, *Zentralbl. Hyg.*, Vol.193, pp.199-210, 1992.
- 14) Jones, K.: *Campylobacters* in water, sewage and the environment, *J. Appl. Microbio.*, Vol. 90, Issue S6, pp.68S-79S, 2001.
- 15) Bolton, F. J., Coates, D., Hutchinson, D. N. and Godfree, A. F.: A study of thermophilic *campylobacters* in a river system. *J. Appl. Bacteriol.*, Vol.62, pp.167-176, 1987.
- 16) Brennhovd, O., Kapperud, G. and Langeland, G.: Survey of thermotolerant *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in three surface water sources in Norway. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol.15, pp.327-338, 1992.
- 17) Obiri-Danso, K. and Jones, K.: Distribution and seasonality of microbial indicators and thermophilic *campylobacters* in two freshwater bathing sites on the River Lune in north-west England, *J. Appl. Microbiol.*, Vol.87, pp.822-832, 1999.