

### 1類感染症(診断後直ちに届出)

エボラ出血熱\*  
クリミア・コンゴ出血熱\*  
重症急性呼吸器症候群(病原体が SARS コロナウイルスであるものに限る)\*  
痘そう\*  
ペスト\*  
マールブルグ病\*  
ラッサ熱\*

### 2類感染症(診断後直ちに届出)

急性灰白髄炎\*  
コレラ\*  
細菌性赤痢\*  
ジフテリア\*  
腸チフス\*  
パラチフス\*

### 3類感染症(診断後直ちに届出)

腸管出血性大腸菌感染症\*

### 4類感染症(診断後直ちに届出)

A型肝炎  
E型肝炎\*  
ウエストナイル熱(ウエストナイル脳炎を含む)\*  
エキノコックス症\*  
黄熱\*  
オウム病\*  
回帰熱\*  
Q熱\*  
狂犬病\*  
高病原性鳥インフルエンザ\*  
コクシジオイデス症\*  
サル痘\*  
腎症候性出血熱\*  
炭疽\*  
つつが虫病\*  
デング熱\*  
ニパウイルス感染症\*  
日本紅斑熱\*

日本脳炎\*  
発しんチフス\*  
ハンタウイルス肺症候群\*  
Bウイルス病\*  
ブルセラ症\*  
ボツリヌス症\*  
マラリア  
野兎病\*  
ライム病\*  
リッサウイルス感染症\*  
レジオネラ症\*  
レプトスピラ症\*

## 5 類感染症

<全数把握疾患> (診断から7日以内に届出)

アメーバ赤痢\*  
ウイルス性肝炎(A型肝炎及びE型肝炎を除く)  
急性脳炎(ウエストナイル脳炎及び日本脳炎を除く)\*  
クリプトスポリジウム症  
クロイツフェルト・ヤコブ病\*  
劇症型溶血性レンサ球菌感染症\*  
後天性免疫不全症候群\*  
ジアルジア症  
髄膜炎菌性髄膜炎\*  
先天性風しん症候群\*  
梅毒  
破傷風\*  
バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症\*  
バンコマイシン耐性腸球菌感染症\*

<定点把握疾患>

インフルエンザ定点(週単位で報告)  
小児科定点(週単位で報告)  
眼科定点(週単位で報告)  
性感染症定点(月単位で報告)  
基幹定点

消毒副生成物によるリスクの総括的評価および塩素使用と  
免疫毒性の関連に関する検討

分担研究者 伊藤 禎彦

研究協力者 大河内 由美子、高橋 恭介、小寺 恵介

## 消毒副生成物によるリスクの総括的評価および塩素使用と免疫毒性の関連に関する検討

分担研究者 京都大学大学院工学研究科 伊藤禎彦  
研究協力者 京都大学大学院工学研究科 大河内由美子, 高橋恭介, 小寺恵介

### 研究要旨

消毒副生成物全体の包括的な毒性評価を目的として、クロロ酢酸類およびSRNOM塩素処理水中の全有機ハロゲン化合物の染色体異常誘発性を調べた。また、クロロ酢酸類の動物実験データ（慢性毒性試験および発がん性試験）と染色体異常誘発性試験結果との相関性に基づいて、SRNOM塩素処理水の全有機ハロゲン化合物の毒性推定を試み、未知の成分も含めてトリクロロ酢酸程度の毒性となることを示した。一方、塩素使用と免疫毒性との関連に関する基礎検討として、強い免疫毒性物質であるエンドトキシン（LPS）の環境水・水道水中濃度を調べるとともに、塩素処理によるその活性変化を調べた。その結果、下水処理放流水が混入する地点では原水のエンドトキシン濃度が約10倍上昇すること、塩素処理により総エンドトキシン活性は低下するものの、微生物細胞膜の損傷により遊離エンドトキシンは増大することを示した。塩素注入量によってその増大量が変化することから、適正な塩素注入条件を選定する必要がある。

### A. 研究目的

消毒副生成物の染色体異常誘発性に対するトリハロメタンやハロ酢酸など個別物質の寄与率は、それぞれ高く見積もっても数%であり、非常に小さいことが明らかになっている。すなわち、消毒副生成物全体の毒性に対して、現在規制されている物質以外のものの毒性が大半を占めていると考えられ、包括的な毒性評価が求められる。一方で、原水中、および浄水処理プロセスや水道水中には、生菌や不活化された微生物、あるいはそれらが放出した物質が存在しており、消毒剤の使用によるこれらの物質の化学変化と免疫毒性の関係が指摘されている。本研究では、塩素処理水中の全有機ハロゲン化合物(TOX)の毒性を染色体異常誘発性試験の結果から推定することを試みるとともに、微生物（グラム陰性細菌・シアノバクテリア；不活化されたものを含む）の細胞外膜構成物質に起因する生物活性（エンドトキシン）に着目し、微生物細胞からのエンドトキシン生成の評価を行うとともに、原水あるいは水道水中のエンドトキシン活性量、ならびに塩素消毒による活性量・処理特性の変化を調べる。エンドトキシンはヒトの細胞においても Toll-like レセプターを介して強い免疫反応を惹起する化学物質である。

### B. 研究方法

#### 1. 消毒副生成物によるリスクの総括的評価に関する検討

##### 1-1 ハロ酢酸類の染色体異常試験および全有機ハロゲン化合物(TOX)の毒性の推定

8種類のハロ酢酸化合物（クロロ酢酸、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸、ジブロモ酢酸、トリブロモ酢酸、ブロモクロロ酢酸、ブロモジクロロ酢酸、ジブロモクロロ酢酸）に関しては、10, 30, 50, 100 mg/Lの各濃度でチャイニーズハムスター肺細胞（CHL/HU）に投与し、24時間培養後、染色体異常観察のための標本を作成した。ブロモ酢酸に関しては、0.1, 0.5, 1, 5 mg/Lの各濃度で染色体異常試験を行った。

Suwannee River Natural Organic Matters (SRNOM)を、International Humic Substance Society (IHSS)より購入した。水酸化ナトリウム抽出を行った後、pH 7.0, リン酸緩衝液濃度 100 mM, TOC=1000 mgC/Lとなるように調製した。さらに、初期塩素濃度が1500 mgCl<sub>2</sub>/Lとなるように次亜塩素酸ナトリウムを加え、暗所・20°Cで24時間静置した。以下、この塩素処理水をSRNOM塩素処理水と称する。

調製したSRNOM塩素処理水を蒸留水により希釈し、チャイニーズハムスター肺細胞 (CHL/IU) に投与した。24時間培養後、染色体異常観察のための標本を作製した。本研究で使用したSRNOM塩素処理水には残留塩素が確認されなかったため、濃硝酸でpH2に調整した後に、TOX計(TOX-10Σ, 三菱化学)を用いて全有機ハロゲン化合物(TOX)の測定を行った。

## 1-2 クロロ酢酸類の動物実験データに関する文献考察

当研究室で染色体異常試験を実施したハロ酢酸類 9 種のうち、動物実験によるリスク評価が行われているクロロ酢酸類 3 種(MCA, DCA, TCA)を対象として、バイオアッセイ結果と動物実験結果との相関関係を求めた。なお、本研究で用いるバイオアッセイは、慢性毒性としての発がん性に注目していることから、動物実験による毒性評価試験のうち慢性毒性試験および発がん性試験について文献データをまとめた。

## 2. 塩素使用と免疫毒性との関連性に関する検討

### 2-1 大腸菌細胞からのエンドトキシン生成

*E. coli* NBRC3301 を 36°C・120rpm で振盪培養し、対数増殖期における培養液中の総エンドトキシン・遊離型エンドトキシン・微生物量の定量を行った。エンドトキシン活性は、カプトガン血球抽出成分 LAL(エンドスピーシーES-50M, 生化学工業)を使用したエンドポイント比色法(トキシカラー-DIA-MP, 生化学工業)により測定し、培養液を 14,000rpm で 10 分間遠心分離した上清を遊離型エンドトキシン測定に供した。微生物量の定量は、標準寒天培地およびR2A 寒天培地を用いた平板培養法、ならびにDAPI 蛍光染色法により行った。

### 2-2 環境水中のエンドトキシン濃度

琵琶湖淀川水系(琵琶湖疏水を含む)の計 16 地点において採水し、試料中のエンドトキシン濃度と微生物量(平板培養計数ならびに DAPI 計数)を測定するとともに、TOC・E<sub>20</sub>・濁度・SS・pH の各水質項目の測定を行った。採水は冬季(2005 年 12 月~2006 年 2 月)に実施した。採水瓶は予め 250°C, 2 時間の乾熱滅菌処理を行って使用し、採水後の試料は低温で輸送後直ちに微生物量・TOC 測定に供した。

また、塩素処理によるエンドトキシンの変化を調べるため、宇治川試料水に次亜塩素酸ナトリウムを 0~5.0mgCl<sub>2</sub>/L となるよう添加し、24 時間の塩素処理を行った。反応後、チオ硫酸ナトリウムを添加することにより残留塩素を消去した後に、総エンドトキシン、遊離エンドトキシンをそれぞれ測定した。

## C. 研究結果

### 1. 消毒副生成物によるリスクの総括的評価に関する検討

#### 1-1 SRNOM 塩素処理水の染色体異常試験

SRNOM 塩素処理水の染色体異常試験結果を図 1 に示す。ただし、x 軸は培養液中における TOX mgCl/L の値を示している。

染色体異常試験では、化学物質の毒性の強さを定量的に評価するため、観察細胞の 20%に何らかの異常が見られる用量、D<sub>20</sub>値を用いて評価を行うことがある。ここでは、各投与試料の用量-反応曲線を用いて、観察細胞の 20%に相当する染色体異常数として 10 個/50 細胞となる投与濃度を算出し、D<sub>20</sub>値とした。

表 1 にクロロ酢酸類および SRNOM 塩素処理水の D<sub>20</sub>

値を示す。なお、TOX の毒性を推定するため、mg/L→mg-Cl/L の単位変換を行い用量を表している。

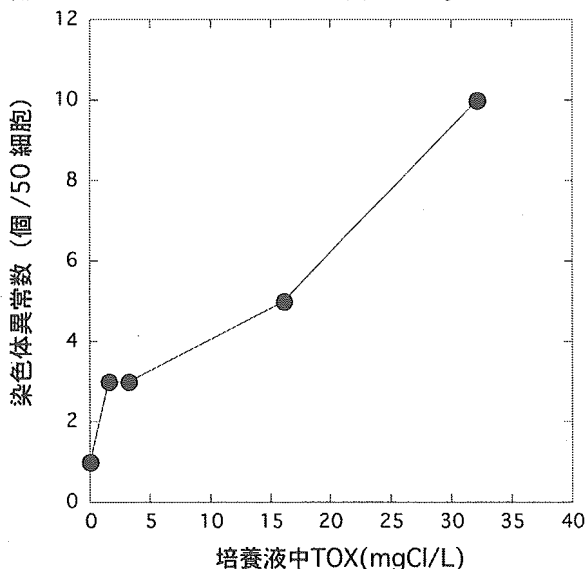


図 1 SRNOM 塩素処理水の染色体異常試験結果

表1 染色体異常試験のD<sub>20</sub>値

物質	D <sub>20</sub> 値 (mgCl/L)
MCA	12.3
DCA	12.6
DCA	35.1
SRNOM塩素処理水	33.3

表1の数値を用いて、SRNOM中のTOX成分が全て当該のクロロ酢酸類であったと仮定した場合の染色体異常誘発性の評価が可能になる。なお、SRNOM塩素処理水をTOX=563mgCl/Lの濃度で投与したサンプルでは、投与22時間後には細胞の死滅が確認され、SRNOMの細胞毒性による影響と考えられる。

### 1-2 ハロ酢酸類の動物実験データに関する文献考察

F344ラットを用いた慢性毒性試験の概要を表2に、B6C3F<sub>1</sub>マウスを用いた慢性毒性試験の概要を表3に示す<sup>1-3)</sup>。一方、発がん性試験の結果を表4に示す<sup>1-3,5)</sup>。表中(P)表示を行っている数値は、分担者が該当文献の試験結果から判断した値である。

表2 文献より得られるF344ラットを用いた慢性毒性試験のデータ

(単位: mg/kg/day)

物質	用量ごとの試験動物数	投与方法	試験期間	摂取量	体重減少	LOAEL	NOAEL
MCA	オス50匹	飲水投与	104週間	0, 3.5, 26, 60	26	3.5	
	オスメス50匹ずつ	混餌投与	104週間	0, 15, 30		15	
DCA	オス60~78匹	飲水投与	100週間	0, 3.6, 40.2		40.2 <sub>(P)</sub>	
	オス78匹	飲水投与	103週間	0, 139	139		
TCA	オス50匹	飲水投与	104週間	0, 3.6, 32.5, 364	364	364 <sub>(P)</sub>	32.5

表3 文献より得られるB6C3F<sub>1</sub>マウスを用いた慢性毒性試験のデータ

(単位: mg/kg/day)

物質	用量ごとの試験動物数	投与方法	試験期間	摂取量	体重減少	NOAEL
MCA	オスメス60匹ずつ	混餌投与	104週間	0, 50, 100	100	50
DCA	オス30~71匹	飲水投与	90~100週間	0, 8, 84, 168, 315, 429	315	84
TCA	メス38~93匹	飲水投与	82週間	0, 78, 262, 784	784	78

表4 文献より得られる発がん性試験のデータ

物質	動物種	50%動物に腫瘍を形成する摂取量 (mg/kg/day)	備考
MCA			発がん性の証拠なし
DCA	F344ラット	16	
	B6C3F <sub>1</sub> マウス	112	
TCA	F344ラット		発がん性の証拠なし
	B6C3F <sub>1</sub> マウス		262 mg/kg/dayで腫瘍生成

## 2. 塩素使用と免疫毒性との関連性に関する研究

### 2-1 大腸菌細胞からのエンドトキシン生成

微生物量と総エンドトキシン活性の相関を図2に示す。いずれの計数方法においても、微生物量が増大するにつれてエンドトキシン活性も増大する傾向が確認できる。特に DAPI 蛍光染色による計数結果(x)と総エンドトキシン(y)の間に最も高い相関( $y = (4.71 \times 10^{-53}) \cdot x^{6.92}$ ,  $R^2=0.631$ )が得られた。また、遊離型エンドトキシン/総エンドトキシンの比は0.1~1以上と大きく変動しており、遊離型エンドトキシンの活性量が総エンドトキシンのそれを上回るケースもあった。

また、表5に示すように、平板培養結果から塩素消毒により *E. coli* NBRC3301 が不活化されたと判断される状況においても、高いエンドトキシン濃度が検出されており、微生物の不活化≠エンドトキシンの不活性化であることが明らかになった。

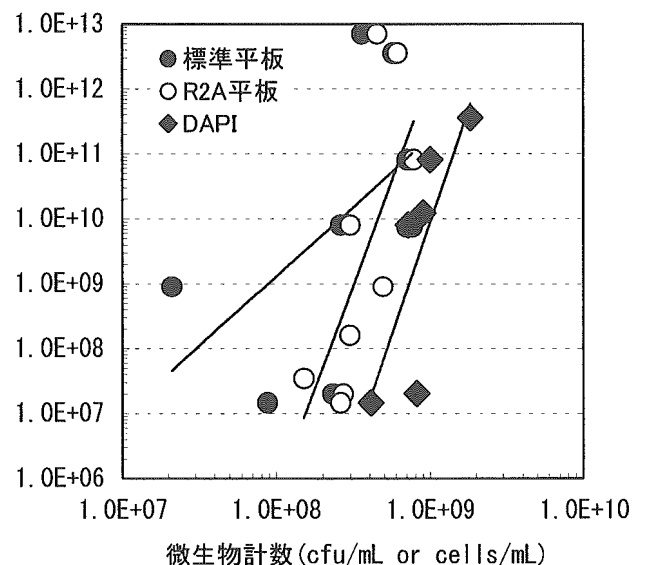


図2 大腸菌細胞数と総エンドトキシンの関係

表5 塩素消毒後のエンドトキシン活性

初期微生物量 DAPI count (cfu/mL)	消毒後の平板培養結果 (cfu/mL)		総エンドトキシン (EU/mL)	遊離型エンドトキシン (EU/mL)
	標準寒天	R2A寒天		
$5.1 \times 10^7$	N. D.	N. D.	$1.32 \times 10^8$	$1.18 \times 10^8$
$5.1 \times 10^6$	N. D.	N. D.	$7.40 \times 10^6$	$7.40 \times 10^6$
$5.1 \times 10^5$	N. D.	N. D.	$5.93 \times 10^5$	$1.27 \times 10^6$

### 2-2 環境水中のエンドトキシン濃度と形態

各試料のエンドトキシン測定結果を表6に、濃度分布図を図3に示す。琵琶湖および河川水中のエンドトキシン濃度は $3.11 \times 10^2 \sim 2.43 \times 10^3$  EU/mLの範囲に分布した。一方、下水処理場放流水のエンドトキシン濃度は $1.08 \times 10^4$  EU/mLと環境水と比べて高い値を示した。また、琵琶湖疏水のエンドトキシン濃度は $1.16 \times 10^2 \sim 6.13 \times 10^2$  EU/mLと比較的一定の値を示した。総エンドトキシンに対する遊離型エンドトキシンの比率は試料間で大きく異なり、水深の浅い琵琶湖疏水では遊離型エンドトキシンが総エンドトキシンを上回っていたことから、紫外線による微生物細胞膜の損傷が起こることで、環境中ではエンドトキシンの遊離化が進む可能性が示された。

一方、水道水中のエンドトキシン濃度は1.41～21.9EU/mLの範囲にあり、浄水処理により琵琶湖疏水・琵琶湖水濃度の1/10～1/100程度に低下していた。

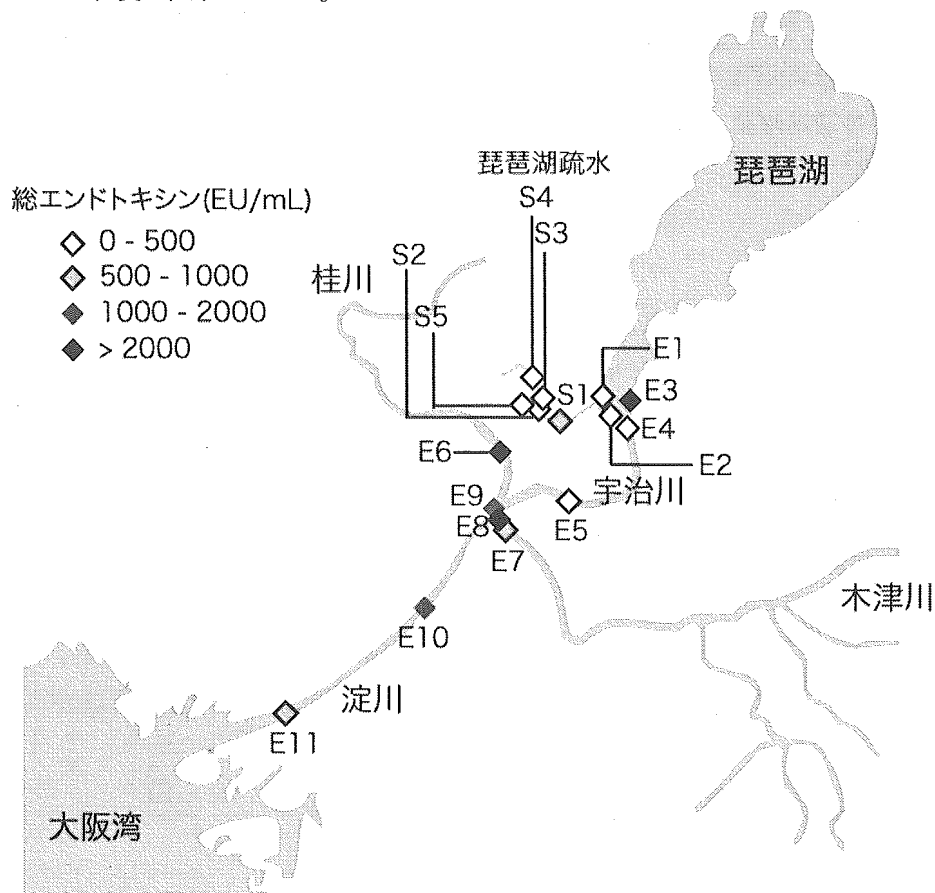


図3 琵琶湖・淀川水系におけるエンドトキシン濃度の分布

また、異なる3手法による微生物計数結果と総エンドトキシンの関係を図4に示す。いずれの試料においても、標準平板培地<R2A平板培地<DAPI蛍光染色の順に微生物検出量が増大し、特に水道水試料では培養法では微生物がほとんど検出されなかったのに対して、DAPI蛍光染色法を用いた場合には微生物が約 $10^6$  cells/mLと計数された。各手法による微生物検出数が増大するにつれて、総エンドトキシンも増大する傾向は確認できるものの、明確な相関は認められず、環境水中の微生物群を構成する種や状態の多様性を反映していると考えられる<sup>7)</sup>。

宇治川河川水を塩素処理した場合に、塩素濃度が各エンドトキシン濃度の変化に及ぼす影響を図5に示す。塩素処理開始前に対して、24時間の塩素処理後のエンドトキシン濃度増加を $\Delta$ エンドトキシン濃度EU/mLで表している。この結果より、塩素注入試料ではいずれの塩素濃度においても総エンドトキシン濃度は減少するものの、遊離エンドトキシン濃度は増大した。特にTOCに対する有効塩素比=0.4以下の範囲では、塩素注入量が増加するにつれて遊離エンドトキシン濃度も増加するが、TOCに対する有効塩素比=0.4以上の範囲では増加量が減少に転じることがわかった。



表6 環境水試料のエンドトキシン濃度とその形態

	水系	採水地点	総Et (EU/mL)	遊離Et (EU/mL)	遊離Et/総Et比
E-1	琵琶湖南湖	大津港	$4.28 \times 10^2$	$2.20 \times 10^2$	0.514
E-2	琵琶湖南湖	なぎさ公園	$3.31 \times 10^2$	$2.30 \times 10^2$	0.695
E-3	琵琶湖南湖	矢橋	$2.43 \times 10^3$	$3.30 \times 10^2$	0.136
E-4	瀬田川	瀬田唐橋	$3.11 \times 10^2$	$2.25 \times 10^2$	0.723
E-5	宇治川	宇治橋	$3.11 \times 10^2$	$1.92 \times 10^2$	0.617
E-6	桂川	下水処理場放流水	$1.08 \times 10^4$	$1.26 \times 10^3$	0.117
E-7	木津川	三川合流地点	$6.21 \times 10^2$	$1.77 \times 10^3$	>1
E-8	宇治川	三川合流地点	$2.03 \times 10^3$	$8.26 \times 10^2$	0.407
E-9	桂川	三川合流地点	$1.80 \times 10^3$	$4.80 \times 10^2$	0.267
E-10	淀川	枚方大橋	$1.51 \times 10^3$	$2.87 \times 10^2$	0.190
E-11	淀川	豊里大橋	$3.40 \times 10^2$	$2.50 \times 10^2$	0.735
S-1	琵琶湖第一疏水	洛東高校前	$6.27 \times 10^2$	$1.18 \times 10^3$	>1
S-2	琵琶湖疏水	蹴上	$1.55 \times 10^2$	$1.82 \times 10^2$	>1
S-3	疏水分線	若王子橋	$1.46 \times 10^2$	$1.77 \times 10^2$	>1
S-4	疏水分線	一乗寺西橋	$1.16 \times 10^2$	$2.95 \times 10^2$	>1
S-5	琵琶湖疏水	冷泉橋	$2.57 \times 10^2$	$1.94 \times 10^2$	0.755

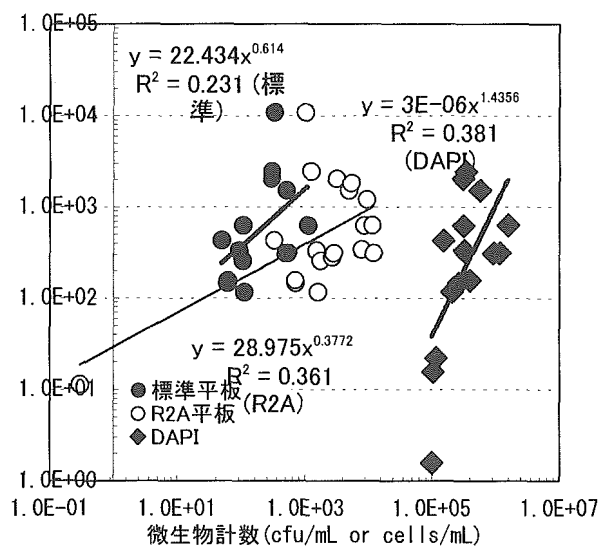


図4 微生物量と総エンドトキシン活性の相関

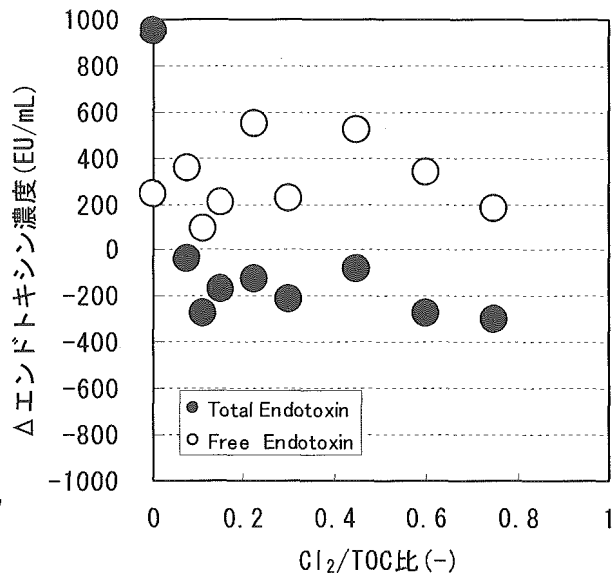


図5 塩素処理によるエンドトキシン活性の変化

D. 考察

1 SRNOM 塩素処理水中の全有機ハロゲン化合物の毒性の推定

F344 ラットを用いた慢性毒性試験において、体重減少のみられた摂取量、LOAEL 値の各値と染色体異常試験で得られた  $D_{20}$  値をプロットした結果を図6に示す。また、B6C3F<sub>1</sub> マウスを用いた試験において体重減少のみられた摂取量と  $D_{20}$  値の関係も、図6中に同様にプロットした。ただし、慢性毒性試験の結果として使用した数値は、全て mgCl/kg/day に換算して使用している。各試験項目と  $D_{20}$  値に対して、線形回帰（原点通過）を行った結果、相関係数は全て 0.9 を超える値を示しており、両者には相関があると判断した。

さらに、前述したSRNOM塩素処理水の  $D_{20}$  値 = 33.3 mgCl/L と得られた各回帰式を用いて、F344 ラット試験における体重減少がみられる摂取量・LOAEL 値、ならびにB6C3F<sub>1</sub> マウス試験における体重減少がみられる摂取量の推定を行った。結果を表7に示す。ラット試験における体重減少および LOAEL、マウス試験における体重減少の全てのケースで、SRNOM塩素処理水のSRNOM塩素処理水の毒性の傾向は同様になっており、MCA > DCA > SRNOM塩素処理水 > TCA となることが推定された。すなわち、SRNOM塩素処理水中のTOXは、未知の成分も含めて平均的にトリクロロ酢酸程度の毒性を持っていると推定される。

以上では、染色体異常試験結果のみを用いた評価を行ったが、発がんプロモーション活性の指標である形質転換試験の結果も併せて評価する必要がある。また、慢性毒性だけでなく、表3に示した発がん性に関する考察も必要である。

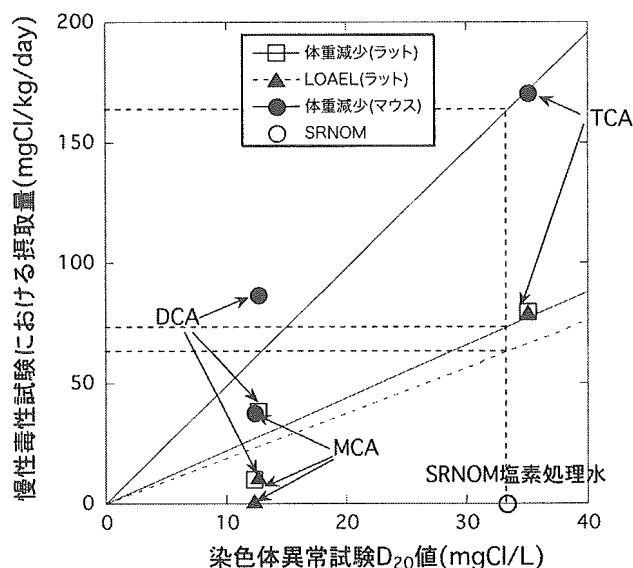


図6 慢性毒性試験と染色体異常試験との相関

表7 染色体異常試験相関から推定した SRNOM 塩素処理水の毒性

(単位: mgCl/kg/day)

物質	体重減少 (ラット)	LOAEL (ラット)	体重減少 (マウス)
MCA	9.8	1.3	38
DCA	38	11	87
SRNOM 塩素処理水	73	63	163
TCA	79	79	171

## 2 環境水中のエンドトキシンについて

図3中では、琵琶湖・淀川水系におけるエンドトキシン濃度の分布を地図上に示したが、自然水で2000 EU/mL前後の高い値を示した地点、E3、E8およびE9はいずれも下水処理放流水の影響を強く受けうる地点であった。これより、取水口が下水処理放流口近くに存在する場合には、原水中のエンドトキシン濃度が1オーダー程度増大する可能性があることから、水資源の循環利用を行っていくうえでは、生菌数のみならずエンドトキシンなどの微生物由来化学物質にも着目することが望ましい。

また、DAPI染色による計数結果から原水である環境水中の微生物量は $3 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  cells/mLの範囲に分布する一方で、水道水中では約 $1 \times 10^5$  cells/mLに減少していた。この結果は、河川水中濃度と浄水中濃度の差から推定される浄水処理によるエンドトキシンの除去率と概ね一致している。

さらに、DAPI蛍光染色による微生物計数結果に基づいて環境試料 ( $10^6$  cells/mL)中の微生物一細胞当たりのエンドトキシン量を試算すると、 $1.13 \times 10^3$  EUであった。一方、図2から大腸菌培養液 (R2A平板培養による計数結果 ;  $10^8$  cells/mL)中の一細胞当たりのエンドトキシン量を同様に計算すると、 $5.64 \times 10^3$  EU/mLと計算されることから、環境水中の微生物群に起因する一細胞当たりのエンドトキシンは大腸菌の1/5程度の値を示すことが明らかとなった。

塩素処理条件がエンドトキシンの活性変化に及ぼす影響では、塩素注入により総エンドトキシンの活性は低下するのに対して、今回検討を行った処理条件の範囲ではいずれの試料においても遊離エンドトキシンの活性は増大した。この結果は、塩素処理により微生物細胞膜からエンドトキシンが放出された結果として、浄水処理プロセスならびに給配水過程においては溶存態有機物画分にその多くが存在することを示している。しかしながら、図5の結果からは、さらに過剰量の塩素を注入することにより塩素によるエンドトキシン不活性化量が放出量を上回り、エンドトキシン活性は全体として低下すると推測されるものの、遊離化したエンドトキシンの浄水処理プロセスにおける挙動はよくわかっておらず、今後は除去特性も考慮したうえで、塩素注入量の適正化により遊離エンドトキシン活性の制御を行う必要があると考えられる

## E. 結論

クロロ酢酸類の染色体異常誘発性試験結果ならびに文献より得られた動物実験データ (慢性毒性試験) を活用し、未規制物質も含めた消毒副生成物全体の毒性の推定を試みた。SRNOM塩素処理水の染色体異常誘発性試験から求めた $D_{50}$ 値に対して、クロロ酢酸類で得られた両試験の相関関係を適用した結果、SRNOM塩素処理水中の全有機ハロゲン化合物の毒性は、平均的にトリクロロ酢酸程度であると評価された。また、代表的な免疫毒性物質であるエンドトキシンの環境水・水道水中濃度を調べた結果、下水処理水放流口周辺ではその他の地点の約10倍濃度で検出されること、また水道水中では環境水の1/10~1/100に低減していることを示した。環境水中の微生物一細胞当たりのエンドトキシン活性は、大腸菌一細胞当たりの約1/5程度と試算された。一方、塩素処理により総エンドトキシン活性は低下する反面、遊離エンドトキシンは増大することを示すとともに、塩素注入条件によるエンドトキシン不活性化量および遊離エンドトキシン増加量の制御可能性を提示した。

## 参考文献

- 1) DeAngelo, A. B., Daniel, F. B., Most, B. M. and Olson, G. R.: Failure of monochloroacetic acid and trichloroacetic acid administered in the drinking water to produce liver cancer in male F344/N rats, *Journal of toxicology and environmental health*, Vol. 52, pp. 425-445, 1997.
- 2) National Toxicology Program: NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of monochloroacetic acid (CAS No. 79-11-8) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies), 1992.
- 3) DeAngelo, A. B., Daniel, F. B., Most, B. M., Olson, G. R.: The carcinogenicity of dichloroacetic acid in the male fischer 344 rat, *Toxicology*, Vol. 114, pp. 207-221, 1996.
- 4) DeAngelo, A. B., George, M. H. and House, D. E.: Hepatocarcinogenicity in the male B6C3F1 mouse following a lifetime exposure to dichloroacetic acid in the drinking water: dose-response determination and modes of action, *Journal of toxicology and environmental health*, Vol. 58, No. 8, pp. 485-507, 1999.
- 5) Pereira, M. A.: Carcinogenic activity of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid in the liver of female B6C3F1 mice, *Fundamental and applied toxicology*, Vol. 31, pp. 192-199, 1996.

- 6) Bull, R.J., Sanchez, I.M., Nelson, M.A., Larson, J.L., Lansinig, A.J.: Liver tumor induction in B6C3F<sub>1</sub> mice by dichloroacetate and trichloroacetate, *Toxicology*, Vol. 63, pp. 341-359, 1990.
- 7) Christian, A. and Ulrich, Z.: Chemical structure of Lipid A—The primary immunomodulatory center of bacterial lipopolysaccharides, *Trends in glycoscience and glycotecnology*, 14(76), pp.69-86, 2002

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

大河内由美子, 高橋恭介, 小寺恵介, 伊藤禎彦 (2006) : 環境水中のエンドトキシン存在形態に関する研究, 第40回日本水環境学会年会講演集, p276

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書 4

給配水過程における健康リスクと消毒技術に関する検討

分担研究者 西村 和之

厚生労働科学研究（健康科学総合研究事業）  
分担研究報告書

給配水過程における健康リスクと消毒技術に関する検討

分担研究者 県立広島大学生命環境学部 西村和之

研究要旨

残留塩素無し水道における健康リスクの所在とその評価を行うために、塩素処理などでは不活化しにくい微生物、低濃度でも発症する感染確立の高い微生物であり、主たる汚染源である家畜糞尿中に存在する可能性が高い微生物とし、クリプトスポリジウム・オーシスト、レジオネラ菌と *Ba. Cereus* を取上げ、既往の研究、実態調査や室内実験等により、主原因となる家畜糞尿や生活排水の持つ感染性微生物負荷量とそれらを処理することにより低減し得る負荷量の把握を試みた。

本年度は、水道原水が持つ病原性微生物による健康影響リスクの把握を行うために、広島県有数の酪農地帯である備北地方を流れ、庄原市の水道原水である西城川に着目し、水道原水と処理水を対象とした調査を行った。得られた結果は以下である。

1) 研究対象地域の概要は、集水域面積約 268km<sup>2</sup>、人口は約 7800 人であり、乳牛 350 頭、肉牛 700 頭、豚 1900 頭（H16 年度）が飼育されていると推計され、経年的に BOD（75%値）が 1 mg/L 以下で推移する A 類型河川である。

2) 平成 17 年度冬季に 2 回実施した調査により、西城川原水からクリプトスポリジウム・オーシストが 1 度 1 個 *C.p.*/100L 検出され、2 回とも腸内細菌群やビブリオ菌群の陽性であり、一般的な水質項目で清浄な河川であっても、糞便由来による微生物汚染が検出範囲内にあると判断された。

3) クリプトスポリジウム・オーシストの実測値と文献値から、排出源を牛糞尿のみと仮定した場合、対象地域内で排出されたオーシストは、取水点までに  $7.1 \times 10^{-5} \sim 2.7 \times 10^{-5}$  程度希釈されると試算された。

また、病原性微生物による水道水源等の汚染と感染事例に関する文献レビューを行い、以下の結論を得た。

4) 飲料水を原因とする感染性微生物による発症事例は、現在でも発生しつづけている。

5) 水道水を原因とする感染症事故は、維持管理上の不備等の人為的なミスと最終バリアーである消毒操作の不備が重なることにより引き起こされる場合が多い。

6) 「塩素消毒なしの水道」を実現する為には、施工を含めた維持管理ミスを無くす事と塩素に変わる最終バリアーとしての代替消毒手法の検討が必須である。

1. はじめに

本研究は、将来的に残留塩素に依存しない水道を実現させることが出来るか否か？に関する基礎的検討事項として、1) 水道原水が持つ病原性微生物による健康影響リスクの把握と 2) 病原性微生物の不活化処理技術の持つ健康影響リスク低減効果の把握を目的としている。

水道水の健康影響リスクを与える主要因は、家畜糞尿を含めた生活排水の混入であることから、本研究で対象とする病原性微生物は、塩素処理などでは不活化しにくい微生物、低濃度でも発症する感染確立の高い微生物であり、主たる汚染源である家畜糞尿中に存在する可能性が高い微生物とし、クリプトスポリジウム・オーシスト、レジオネラ属菌と *Ba. Cereus* を取上げることとした。

また、本研究は、残留塩素無し水道を実現する上で、適切な消毒効果を得るための操作条件を評価するために、前述の微生物に対する不活化処理条件の把握と共に、種々の消毒剤と AOC 等の微量有機物との反応性について室内実験等により把握することとした。

本研究では、広島県有数の酪農地帯である備北地方を流れ、庄原市の水道原水である西城川に着目し研究対象地域とした。

2. 研究対象地域の概要

本学の立地する広島県北東部は、比婆道後帝釈国定公園を有する自然豊かな酪農地帯である。表-1 に対象地域である庄原市の概要を示すが、平成17年4月に旧1市5町が合併し広島県の約1/5の面積を占める過

表-1 対象地域の概要

現庄原市 (H17/4/1)	土地面積 km <sup>2</sup>	総人口 38,077 人	乳用牛(H16/2/1)		肉用牛		豚		採卵鶏		H15.7.15		
			飼養戸数 戸	飼養頭数 頭	飼養戸数 戸	飼養頭数 頭	飼養戸数 戸	飼養頭数 頭	飼養戸数 戸	飼養羽数 1000羽	田畑	田	畑
西城町	226.91	4,825	5	172	56	578	4	1,470	-	-	787	626	161
庄原市	243.55	20,649	27	1,240	106	923	8	3,010	8	777	2,450	2,110	343
比和町	131.3	2,040	-	-	53	270	-	-	-	-	545	478	67
口和町	110.13	2,632	5	361	80	535	4	2,580	-	-	735	661	74
高野町	159.18	2,485	5	132	55	497	1	x	-	-	894	648	246
東城町	304.92	10,306	8	445	206	1,400	1	x	4	2,025	1,890	1,550	344

疎地域であり、表に示すように肉牛を始めとする畜産地域である。その結果、図-1<sup>1)</sup>に示すように、域内に排出される家畜糞尿量は多量であり、その循環利用の拡大と共に適正な処理・処分の確保を検討する必要があると考えられる。

以上の事から、本研究では、比較的清浄な水道原水が得られると期待される一方、多量の家畜排泄物等による汚染が懸念される、旧庄原市部の水道水源である一級河川江の川水系に属する西城川に着目し調査水域とした。

旧庄原市部へ給水する浄水場は、西城川表流水と濁水期に利用される予備貯水池を水源とする布掛山浄水場が1箇所である。布掛山浄水場は、西城川と濁水期に利用する予備貯水池の2箇所を水源とする浄水場であり、前塩素処理を行う急速ろ過と緩速ろ過を併用する旧庄原市街唯一の浄水場である。特徴は、2系列の急速ろ過処理プロセスと1系列の緩速ろ過プロセスを併用しており、2種の処理水を混合して配水している点と、山間部にも集落が点在する事から、平成16年度末における旧市部での水道普及率が78.9%と全国平均より低いことである。

国土利用図 平14国自 第149号

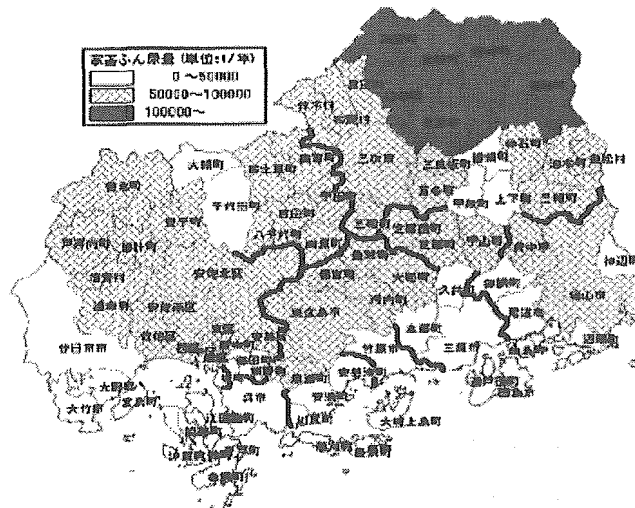
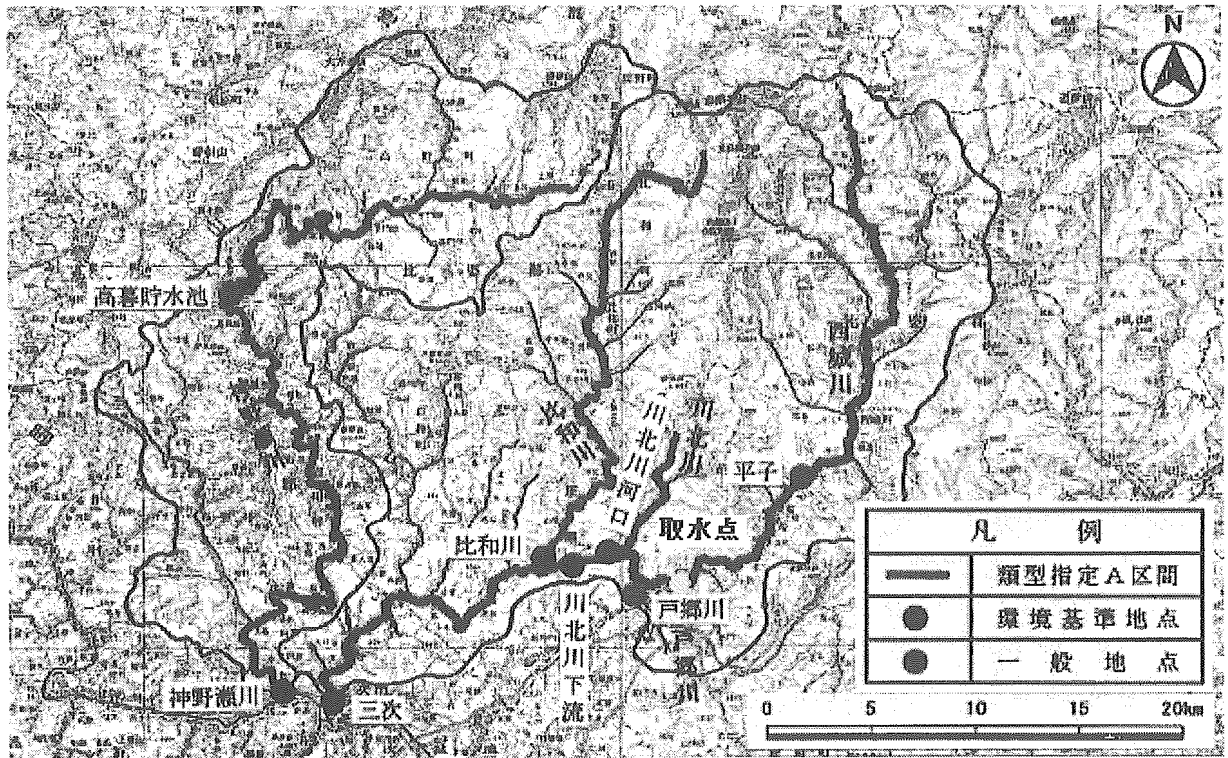


図-1 家畜ふん尿発生量

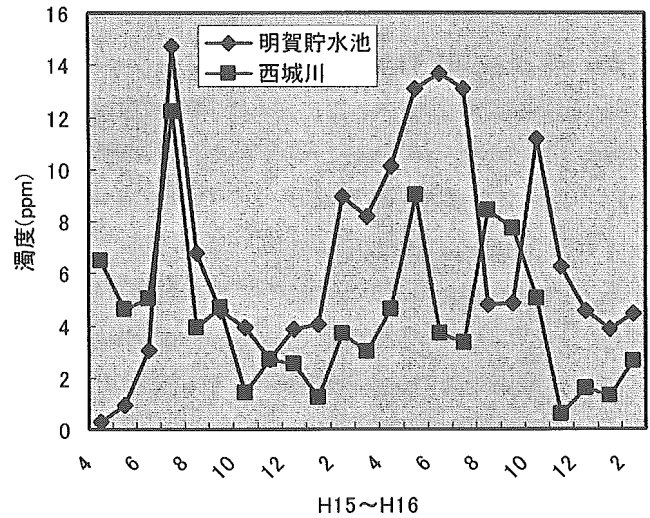


図一3 西城川・神の瀬川ブロック水質観測点と取水点の位置図

図一3に広島県土木部河川局<sup>2)</sup>による西城川・神の瀬川ブロック水質観測点と取水点の位置図を示す。西城川取水地点までの流域は、旧西城町の略全域と旧庄原市の1/6程度を含んでおり、約268km<sup>2</sup>の集水域の人口は約7800人であり、乳牛350頭、肉牛700頭、豚1900頭（H16年度）が飼育されていると推計される。

浄水場で連続的に把握している原水水質データは濁度と電気伝導度であるが、月平均の濁度を見ると、図一4に見る通り所謂梅雨時の多雨時に濁度が高くなる傾向が認められる。また、浄水場側では、上流域の生活排水を原因とした西城川水質の経年的な悪化を指摘している。しかしながら、

旧西城町市街地下流の平子観測点におけるBOD（75%値）は、経年的に1mg/L以下で推移し、BOD（75%値）が2mg/L以下でA類型をクリアしている。また、取水点下流で流入する庄原市街地を流下する戸郷川の水質は、生活雑排水の流入により、BOD75%値が4.0~8.0mg/Lを示していたが、下水道の整備により改善傾向が見られ、平成12年度のBOD（75%値）は2mg/L程度と成っている。以上のように、調査対象の水系は、一般的な水質項目で見ると良好な水質が保たれていると判断される。



図一4 原水濁度の月平均値

### 3. 調査項目及び測定方法

#### 1) 一般水質項目

採水は、布掛山浄水場内で行い、西城川原水、明賀池原水及び塩素消毒前の浄水処理水とし、測定項目として水温、濁度、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素、リン酸態リンを測定した。水温と濁度以外の測定方法は、Hach



社製多項目水質分析計 DR-2400 を用い、標準マニュアルに従って測定した。

## 2) 感染性微生物

水道水に健康影響リスクをもたらす感染性微生物として、クリプトスポリジウム・オーシスト、レジオネラ属菌及びバチルス・セレウス菌を始めとする腸管系微生物を選定した。

### 2) - 1 クリプトスポリジウム・オーシストの計数

クリプトスポリジウム・オーシストの計数は、公定法である顕微鏡計数法と共に、より高感度で計数が行える東和科学（株）が有する PCR 法<sup>3)</sup>により行った。

採水方法を含めた計数手順を図-5 に示す。

#### 2) - 1 - 1 試料の採水と前処理

試料水は、ポリエチレン製 MF 中空糸膜モジュール（孔径 0.1 μm、有効濾過面積 4,000cm<sup>2</sup>、三菱レイヨン製）を用いて V 底遠心容器（175ml 用）に濃縮・採水した<sup>4)</sup>。この時、ろ過速度は、U.S.EPA が推奨している 2L/min という上限を超えないように留意し、ポリエチレン製 MF 中空糸膜モジュールは、濾過速度が 0.5L/min 以下になった時

を交換時期とした。

濃縮試料は、遠心機に試料を採取した V 底遠心容器をセットし、遠心分離（1050g、10 分間、4℃、ノンブレーキ）と PBST 溶液による洗浄を 3 回程度行うことで 10-15ml に調整した。この濃縮試料を 3 等分し 3 種類の定量法の試料とした。

#### 2) - 1 - 2 顕微鏡観察法

比重 1.2 のシヨ糖溶を用いたシヨ糖浮遊法により、1 ml 程度の精製サンプルを調整した。その後、DynaI 社製 anti-Cryptosporidium kit のプロトコルに従って免疫磁気ビーズ法により精製し顕微鏡観察用試料を調整した。また、直接蛍光抗体染色は、Biotechnology Frontier 社製 Easy-stain C&G FITC kit のプロトコルに従って実施し、定法に従い顕微鏡観察により定量を行った。

#### 2) - 1 - 3 DNA 検出法

濃縮試料を 5 回凍結融解し、MagExtractor-Genome-（東洋紡績）のプロトコルに従って DNA を回収した。その後、PCR 用の DNA 検出用プライマー 190f（5' - GTACAAAACCTCACCATTCCCTTGA - 3'）と 465r-B（5' - AGAAATACGCTGAGATGTGA - 3'（ビオチン修飾））により以下のシーケンスで PCR 増幅を行った。DNA 量の定量は、ビオチン多数標識変性プローブによるハイブリダイゼーションにより DNA を増幅し、ストレプトアビジンコート済みマイクロプレートにおいて発光させ、プレートリーダーを用いて吸光度（OD<sub>405</sub>）により定量した。

また、マイクロプレートを用いた DNA 検出法より感度の高い DIG DNA 標識および検出キット（ロシュ製）を用いたドットハイブリダイゼーション法による半定性的検出法を合せて実施した。

#### 2) - 1 - 4 RNA 検出法

試料を 42℃、20 分間保温することにより RNA を誘導・発現させた後、凍結融解を 5 回行い RNA の溶出を行った。その後、MagExtractor-RNA-（東洋紡績）を用いて標準プロトコルにより RNA を回収し、東和科学（株）製 C. parvum 検出キットを用いて NASBA 法により RNA の定量をマイクロプレートリーダー（450nm）により行った。

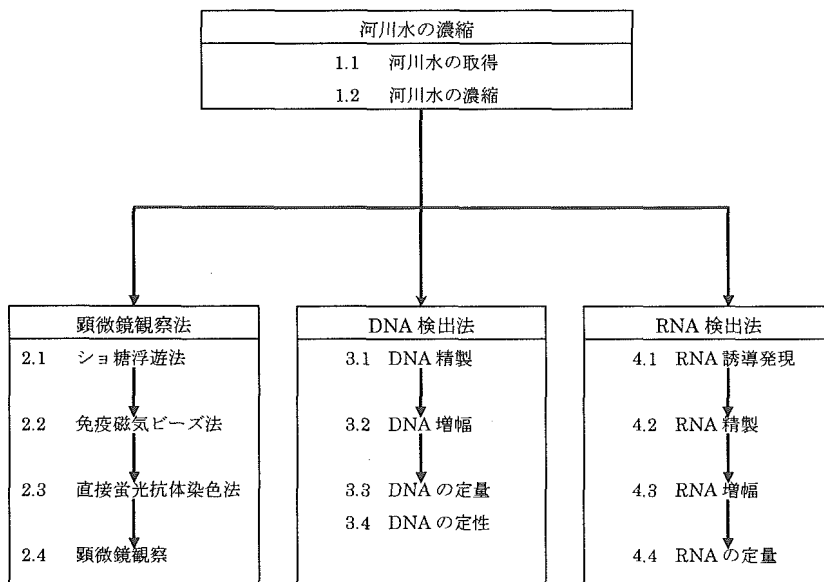


図-5 クリプトスポリジウム・オーシストの計数手順

2) - 2 レジオネラ属菌の検出

レジオネラ属菌の計数には、寒天培地を用いる直接分離培養法により行った。また、より簡易かつ迅速に検出できる手法としてPCR法による簡易検出キットによる定性的検出法の利用を試みた。

2) - 2 - 1 直接分離培養法

増菌培地としてWYO $\alpha$ 寒天培地を用い、試料水500mlを遠心分離により2mlまで濃縮し塩酸処理したものを培養した。その後、L-システインの要求性による推定試験をBCYE $\alpha$ 寒天培地により行った。推定試験陽性菌株については、グルコース添加BCYE $\alpha$ 液体培地を用いたグルコース分解性試験を一次スクリーニングとして順次同定試験を行った。

2) - 2 - 2 PCR法による簡易検出

レジオネラ属菌を広く検出できる5SrRNAとレジオネラ感染症の原因菌である*L. pneumophila*のmip遺伝子の特異的に増幅・検出する為の簡易検出キットであるBed-Side ICAN *Legionella* Detection Kit (タカラ製)とCycleavePCR $\text{\textcircled{R}}$  *Legionella* Detection Kit (タカラ製)の利用を試みた。検出は、試料水500mlを0.22 $\mu$ mメンブレンフィルターでろ過して捕集した後、各kitの標準プロトコルにより行った。

2) - 3 バチルス・セレウス菌及び腸管系微生物の検出。

バチルス・セレウス菌の同定はNGKG培地を用いる培養法で行い、セレウス菌を含む腸管系微生物の検出にはリアルタイムPCR法(RT-PCR法)による迅速スクリーニング法の利用を試みた。

2) - 3 - 1 バチルス・セレウス菌の同定

500mlの試料を遠心分離により濃縮し、沈渣を1mlのリン酸緩衝液に再懸濁させてNGKG培地に塗布して*Ba. Cereus*の検出を行った。

2) - 3 - 2 RT-PCR法による腸管系微生物の検出

微生物の16SrRNAをターゲットとして、大腸菌やサルモネラ菌等を含む腸内細菌群を特異的に検出するプローブとビブリオ菌群、バチルス菌群や黄色ブドウ菌群などを特異的に検出するプローブの2種のプローブを用いたRT-PCRを行う事により、多くの腸管系微生物のスクリーニングが行えるCycleavePCR Bacteria Screening kit (タカラ製)と*Bacillus cereus* (CRS gene) PCR Detection Kit (タカラ株)を用いて検出を行った。

4. 調査結果

本年度の調査は、12月と2月に各1回実施した。各回のサンプリング業況と一般的な水質分析結果を表-2に示す。

一般的な水質個目として窒素に着目して分析したが、顕著な汚染は認められなかった。また、12月の調査日の前後に積雪があり、2月の調査日には降雨があったことから西城川原水の濁度が12月より2月の方がやや高かった。

表-2 サンプリング情報と一般的な水質(その1)

サンプリング箇所	布掛山 西城川原水	浄水場 地点	布掛山 明賀原水	浄水場 地点	布掛山 浄水	浄水場 地点
サンプリング日	2005年12月26日		2005年12月26日		2005年12月26日	
サンプリング開始時間	13時 43分		13時 50分		16時 10分	
サンプリング終了時間	18時 21分		16時 05分		18時 21分	
天候	曇り時々雪		曇り時々雪		曇り時々雪	
気温	6.7 $^{\circ}$ C		6.7 $^{\circ}$ C		7.7 $^{\circ}$ C	
水温	3.2 $^{\circ}$ C		4.3 $^{\circ}$ C		2.6 $^{\circ}$ C	
pH値	7.53		6.47		7.20	
濁度	1.3		3.1		0.0	
採水量	300L		300L		300L	
平均濾過速度	0.65L/min		0.59L/min		1.46L/min	
NO $_3$ -N	0.8		0.5		1.0	
NO $_2$ -N	0.002		0.002		0.003	
NH $_4$ -N	0.06		0.07		0.07	
PO $_4$ -P	0.12		0.16		0.11	
備考	合計採水量 300L (2日間) 最終濃縮液量 12.0ml (25,000倍濃縮) 濾過速度 0.74L/min (2日間平均)		合計採水量 300L (2日間) 最終濃縮液量 9.3ml (32,258倍濃縮) 濾過速度 0.74L/min (2日間平均)		合計採水量 300L (2日間) 最終濃縮液量 11.1ml (27,027倍濃縮) 濾過速度 1.60L/min (2日間平均)	

表-2 サンプル情報と一般的な水質(その2)

サンプリング箇所	布掛山 西城川原水	浄水場 地点	布掛山 明賀原水	浄水場 地点	布掛山 浄水	浄水場 地点
サンプリング日	2006年2月16日		2006年2月16日		2006年2月16日	
サンプリング開始時間	9時57分		9時53分		10時03分	
サンプリング終了時間	19時15分		17時06分		13時06分	
天候	曇り一時雨		曇り一時雨		曇り一時雨	
気温	10°C		10°C		10°C	
水温	8°C		7°C		7°C	
pH値	7.11		6.55		7.19	
濁度	3.3		2.6		0.0	
採水量	300L		300L		300L	
平均濾過速度	L/min		L/min		L/min	
NO <sub>3</sub> -N	0.8		0.7		1.3	
NO <sub>2</sub> -N	0.002		0.004		0.003	
NH <sub>4</sub> -N	0.06		0.07		0.06	
PO <sub>4</sub> -P	0.12		0.13		0.12	
備考	合計採水量 300L (1日間) 最終濃縮液量 ml (倍濃縮) 濾過速度0.33L/min (1日間平均)		合計採水量 300L (1日間) 最終濃縮液量 ml (倍濃縮) 濾過速度0.37L/min (1日間平均)		合計採水量 300L (1日間) 最終濃縮液量 ml (倍濃縮) 濾過速度1.75L/min (1日間平均)	

次に、クリプトスポリジウム・オーシストの検出結果を表-3に示す。

表-3 クリプトスポリジウム・オーシストの検出結果

単位：個/100L

	平成 17 年 12 月実施				平成 18 年 2 月実施			
	顕微鏡 観察法	DNA 検出法		RNA 検出法	顕微鏡 観察法	DNA 検出法		RNA 検出法
		ドット プロット	マイクロ プレート			ドット プロット	マイクロ プレート	
西城川	0 (30%)	陽性	0	1	0 (17%)	陰性	0	0
明賀	0 (22%)	陰性	0	0	0 (15%)	陰性	0	0
浄水	0 (51%)	陰性	0	0	0 (46%)	陰性	0	0

顕微鏡観察法の括弧は回収率を示す

また、ドットプロットハイブリダイゼーションの実施結果を図-6に示す。

図-6 ドットプロットハイブリダイゼーション実施結果 (平成 17 年 12 月分)

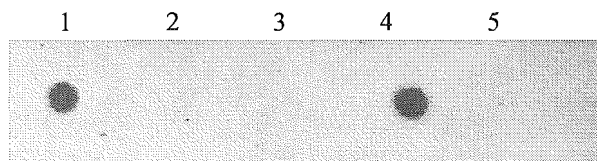
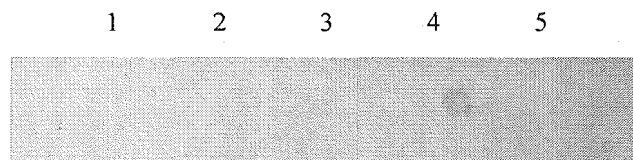


図-6 ドットプロットハイブリダイゼーション実施結果 (平成 18 年 2 月分)



レーン番号

1.西城川原水 2. 明賀原水 3. 浄水 4. P.C. (C. parvum HNJ-11 オースト) 5. N.C. (dH<sub>2</sub>O)

表-3より、本調査では、クリプトスポリジウムは平成17年12月実施の西城川にてDNA検出法(ドットプロット)およびRNA検出法にて検出が認められた。なお、DNA検出法(ドットプロット)は、定性法のため、陽性反応との判定であり、クリプトスポリジウムの存在数は未確定ではあるが、RNA検出法では、定量法であり、

その結果、クリプトスポリジウム・オーシスト 1 個が検出されたと判断された。しかし、顕微鏡観察法では、検出は認められなかった。また、明賀、浄水では、クリプトスポリジウムの検出は、認められなかった。一方、平成 18 年 2 月実施のサンプルについては、全てのサンプルにおいてクリプトスポリジウムの検出は、認められなかった。

以上のように、現有のクリプトスポリジウム・オーシストの DNA 検出法であるマイクロプレート法では、100 個程度以上のクリプトスポリジウムが必要であることから、河川水中等の低濃度でクリプトスポリジウムが存在する試料から検出することが困難であることが言える。一方、ドットプロットハイブリダイゼーション法を用いた検出法は、より定性的ではあるが感度がよく、RNA 検出法と同様に極低濃度でもクリプトスポリジウム・オーシストを検出することができた。今後は、ドットプロットハイブリダイゼーション法による定量法の検討と近年開発が進められているリアルタイム PCR 法 (RT-PCR 法) を用いたクリプトスポリジウムの検出法等を用いた定量的な検査システムの構築を行い、通年調査を実施して行く必要があると判断された。

一方、レジオネラ菌属や腸管系微生物等のその他の感染性微生物の検出結果を表-4 に示す。

表-4 感染性微生物の検出結果(平成17年12月分)

	西城川原水	明賀貯水池	浄水
	レジオネラ菌		
推定試験	5 CFU	13 CFU	不検出
確定試験	不検出	不検出	—
PCR法	不検出	不検出	不検出
*:500mL当り			
	セレウス菌		
培養法	不検出	不検出	不検出
PCR法	不検出	不検出	不検出
*:500mL当り			
	腸内細菌群、ビブリオ菌群		
PCR法	Pos	Neg	Neg
*:500mL当り			
	バチルス属、スタヒロコッカス属		
PCR法	Neg	Neg	Neg
*:500mL当り			

表-4 感染性微生物の検出結果(平成18年2月分)

	西城川原水	明賀貯水池	浄水
	レジオネラ菌		
推定試験	不検出	不検出	不検出
確定試験	—	—	—
PCR法	不検出	不検出	不検出
*:500mL当り			
	セレウス菌		
培養法	不検出	不検出	不検出
PCR法	不検出	不検出	不検出
*:500mL当り			
	腸内細菌群、ビブリオ菌群		
PCR法	Pos	Neg	Neg
*:500mL当り			
	バチルス属、スタヒロコッカス属		
PCR法	Neg	Neg	Neg
*:500mL当り			

レジオネラ菌属は、1 2 月の調査で原水中に推定試験が陽性であるコロニーが認められたが、グルコース分解能による確定試験の結果は全て陰性であり、PCR 法による検出結果は何れも陰性であった。また、2 月結果は、培養法、PCR 法を問わず全ての試料で陰性であった。

また、セレウス菌は、2 回調査において何れの試料からも培養法では検出されなかった。

一方、RT-PCR 法による腸管系微生物のスクリーニング法では、西城川原水中から腸内細菌群やビブリオ菌群を検出する反応系において陽性となり、西城川原水には *Serratia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Yersinia* 等を含む *Enterobacteriaceae* や *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* 等を含む *Vibrionaceae* が存在すると判定された。

## 5. 考察

わが国の家畜に対するクリプトスポリジウムの感染は、昭和 60 年の岡山県の子牛の事例<sup>5</sup>が初発とされている。橋本ら<sup>6</sup>の研究においても畜舎排水流入による汚染の増加が顕著であり、汚染源として家畜糞尿の重要性が指摘できる。一方、猪又ら<sup>7</sup>の調査結果では、野生動物由来の汚染の可能性が指摘されている。

平成十一年に制定された家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律により、家畜糞尿は適切な処理が求められるようになってきているが、表-5 に示すメタン発酵処理施設の調査結果<sup>8</sup>)に見るように、処理条件によっては消化液中にクリプトスポリジウム・オーシストが残留することから、その液肥利用による水系への汚染が起こりうると思われる。

また、家畜糞尿堆肥は、現流通量 300 万 t に対する農林水産省の暫定利用目標 4,000 万 t に見る通り、増加する傾向にあるが、表-6 に示す<sup>8</sup>)ように堆肥化処理により多くの病原微生物は不活化するものの、*Ba. Cereus*