

食中毒による健康危機の原因有害物質検索システム

Search System for Causative Toxic Substances of Food Poisoning Emergency

阿部 和男 森 泰明*

Kazuo ABE, Yasuaki MORI

キーワード：健康危害事例，有害物質，症状

Key Word : Food Poisoning Emergency, Toxic Substances, Clinical Symptoms

有害物質が疑われる健康危機が発生した際に、優先的に検査対象とすべき物質の絞り込むことを目的として、患者の症状等から病因の有害物質を検索するためのシステムを作成した。今回、経口摂取による健康危害が知られている物質として、重金属5物質，農薬8物質，その他の化学物質8物質，毒きのこ18種類，その他の植物性自然毒21種類，動物性自然毒11種類について，事例127件と専門書等に示されている病因物質51例，合計178例の症状，潜伏時間及びその他の情報をExcelで表示しデータベース化した。

1 はじめに

毒物カレー事件に代表されるような有害物質による健康危機の発生に対して，専門的知見や高度検査機能を有する機関としての地方衛生研究所に求められる役割は，近年ますます増大している。健康危機が発生した場合には，その機能を十分に発揮して未知の病因物質の分析・特定を迅速かつ正確に実施して，危害の拡大を可能な限り防がなければならない。そのためには，保健所と連携して現場の状況や患者の症状を十分に把握・検証して，迅速かつ的確な検査対象物質の絞り込みが必要である。そこで今回，化学物質及び自然毒による健康危害に対して，患者の症状及び潜伏時間等から病因物質を検索するためのデータベースを作成し，優先的に検査対象とすべき物質の絞り込みの方法を検討した。

2 材料と方法

今回，経口摂取による健康危害が知られている有害物質として，重金属5物質，農薬8物質，その他の化学物質8物質，毒きのこ18種類，その他の植物性自然毒21種類，動物性自然毒11種類についてExcelを用いてデータベース化した。

本データベースでは，これらの有害物質による健康危害の実例127件と専門書等に示されている病因物質51例（以下「一般例」と呼ぶ），合計178例の症状，潜伏時間及びその他の情報を表示した。発生頻度の多い症状については症状ごと（例えば「下痢」など）の専用の「列」に分類したが，発生頻度の少ない症状については，「その他」の「列」にまとめて表示した（図1）。なお，実

例と一般例の区別を容易にするために，一般例は青字で示し，事例については黒字を原則としたが，事例で発症者の30%以上にみられた症状については赤字の太字で，30%未満は黒字の斜体細字で表示した（図2）。また，下痢の回数のような症状に関する情報や，症状の発生順位についてもできるだけ表示するように努めた。事例の潜伏時間については，最も早く発症した人は「早い」の欄に，患者が最も多発した潜伏時間は「多発」の欄に，最も遅く発症した人は「遅い」の欄に，「日」は「d」，「時間」は「h」，「分」は「m」の記号を用いてそれぞれ表示した。事例については，摂取量や食べたときの味や臭い等，検索に参考となる情報をできるだけ表示し，一般例については，発症毒量や致死量などの情報もできるだけ加えた（図3）。植物性自然毒の成分は「毒の成分」の欄に示したが，類似の毒成分を含有する別の種類の有毒植物も「類似毒及び小分類」の欄に表示した（図4）。また，これらの有毒植物62種類を新たに別な「行」の病因物質の欄にも表示し，当該植物名で事例等の表示済みの有毒植物名が参照できるようにした（図5）。また，事例等が示されていない農薬231物質を有機リン系等の分類名ごとに区分して表示し，一般名により該当する分類の実例等を参照できる「農薬検索」用データベースを別のシートに作成した（図6）。

なお，これらのデータは「食品衛生学雑誌」，「全国食中毒事件録」，「東京都の食中毒事件概要」，「中毒百科」¹⁾，「症例から学ぶ中毒事故とその対策」²⁾，「行政と食中毒」³⁾等から引用した。

* 環境生活部参事兼技術次長

事例・一般例	患者数	病因物質	早い			遅い			嘔気悪心	嘔吐	腹痛	下痢	その他の消化器の症状	頭痛	発熱	口唇・口内・流涎
			多発	遅い	めまい	痙攣	全身(麻痺・皮膚)	関節・筋肉								
腎臓・尿管・副腎		精神	意識昏睡	倦怠感・脱力感	悪寒	発汗	その他	その他	その他	その他	その他	その他	その他	その他	その他	その他

図1 病因物質別の潜伏時間及び各症状の表示項目

事例・一般例	患者数	病因物質	早い	多発	遅い	嘔気悪心	嘔吐	腹痛	下痢	その他の消化器の症状	頭痛	発熱	口唇・口内・
一般		変敗した油脂		2~3h	6h	嘔気	嘔吐	腹痛	下痢		頭痛		
事例1	5人	界面活性剤	直後		15m	②嘔気・	③嘔吐(1~4回)						①口腔内灼
事例2	118人	界面活性剤	直後		50m	②嘔気	②嘔吐	腹痛				発熱	
事例3	1人	高濃度界面活性剤	直後				①嘔吐	腹痛	下痢(1~2h後)				口腔内疼痛
一般		高濃度界面活性剤	直後			嘔気	嘔吐	腹痛	下痢	消化管粘膜ひらん			口腔粘膜腫
事例1		ホウ酸		2h後に症状		嘔気	嘔吐	腹痛					
一般		ホウ酸		なって発症例あり。		嘔気	嘔吐	腹痛	下痢		頭痛		
事例1	169人	鉱物性油	2h	2~3h	3h	嘔気・悪	嘔吐	腹痛	下痢		頭痛		

図2 病因物質別の潜伏時間及び各症状の表示方法

事例・一般例	患者数	病因物質	分類	毒の成分	摂取要因	1人当たり摂取量	残品測定値	致死量	発症量	備考
事例1	390人	ヒ素化合物	重金属		醤油に混入	3mg/day	0.33mg/ml(重ヒ酸)			
事例2	4人	高濃度ヒ素化合物	重金属		てんぷら粉と間違う		2.48g/天ぷら1ヶ			
一般		高濃度ヒ素化合物	重金属					200mg		無色、無味、無臭、
事例1	5人	メチルアルコール	化学物質(その他)		誤食(燃料缶と誤認)	85ml				飲んだ直後、舌に強い刺激あり。
事例2		メチルアルコール	化学物質(その他)		42事例の集積	24~144ml(平均79ml)				1日に全身症状がなく視力障害
一般		メチルアルコール	化学物質(その他)			85ml				30~100ml(10ml以上で失明)

図3 各病因物質別のその他の調査情報の表示状況

病因物質	類似毒 or 小分類	分類	毒の成分	摂取要因	1人当たり摂取量
ヨシヤマコネウ	マロニエ、セイヨウキズタ、レイヨウボタン、タマンシキウの実	植物性自然毒(キノコ除く)	フロラタシ、サボテン	食用のアザミの根(通称ヤマコネウの味噌漬け)	
ヨシヤマコネウ	マロニエ、セイヨウキズタ、レイヨウボタン、タマンシキウの実	植物性自然毒(キノコ除く)	フロラタシ、サボテン	食用のアザミの根(通称ヤマコネウの味噌漬け)	
ヨシヤマコネウ	マロニエ、セイヨウキズタ、レイヨウボタン、タマンシキウの実	植物性自然毒(キノコ除く)	フロラタシ、サボテン	茹でこぼせばよいと思ひ薬を知らぬで食べる	
ヨシヤマコネウ	マロニエ、セイヨウキズタ、レイヨウボタン、タマンシキウの実	植物性自然毒(キノコ除く)	フロラタシ、サボテン		

図4 類似の毒性分を含有するその他の植物(類似毒又は小分類の欄に表示)

事例・一般例	患者数	病因物質	類似毒 or 小分類	分類	毒の成分	摂取要因
一般		マロニエ	参照ヨシヤマコネウ	植物性自然毒(キノコ除く)	サボテン	実を食べる
一般		セイヨウキズタ	参照ヨシヤマコネウ	植物性自然毒(キノコ除く)	サボテン	実を食べる
一般		レイヨウボタン	参照ヨシヤマコネウ	植物性自然毒(キノコ除く)		実を食べる
一般		タマンシキウ	参照ヨシヤマコネウ	植物性自然毒(キノコ除く)		実を食べる

図5 図4の類似の毒性分を含有するその他の植物を行を改めて再表示

分類	種類	備考
有機リン系殺菌剤	トルクロホスメチル	
有機リン系殺菌剤	ピラゾホス	
有機リン系殺菌剤	ホセチル	
有機リン系殺虫剤	MEP	
有機リン系殺虫剤	フェニトロチオン	
有機リン系殺虫剤	マラソン	
有機リン系殺虫剤	マラチオン	
有機リン系殺虫剤	DDVP	

図6 別シートに作成された農薬検索用データベース

3 結 果

今回、有害物質による健康危害データベースをExcelで作成したが、病因物質が不明の健康危害が発生した際には、オートフィルター機能を用いることによって患者の主症状や特異的な症状等からの病因物質の絞り込みが容易になった。すなわち、症状専用の「列」が設けられている下痢などの症状の検索はオートフィルターの「空白以外のセル」で、「その他」の列に区分されている症状の検索はオートフィルターの抽出オプション中の症状でそれぞれ検索する(図7, 8)。絞り込みを開始するには、患者の多くに共通している1~2の症状について検索し、続いて特徴的な症状を1つ程度、すなわち全部で2~3の症状名で検索する(図9)。次に絞り込まれた病因物質の各「行」に表示されているすべての症状や潜伏時間等を把握し、直面している健康危害の発症者の

それらとを比較検討する。これにより疑われる病因物質が見つかった場合には、オートフィルターを一旦解除して当該病因物質名で再度検索し直して、その症状や潜伏時間、その他の記載事項について比較検討する。なお、表示全体の「列」の幅は狭く表示されているので、セルの幅を広げるか「数式バー」で隠れているデータを確認する必要がある。また、植物性自然毒については「類似毒及び小分類」に表示してある類似の毒成分を含有する他種の有毒植物についても確認する。これにより病因物質名の欄から疑わしい有毒植物名を検索し、類似の有毒植物の実例等を参照することができる。疑わし農薬の一般名が判明している場合には「農薬検索」用データベースで該当する分類名を検索し、当該分類名の他の実例の参照が容易となった。

病因物質	早い	多発	遅い	嘔気 悪心	嘔吐	腹痛	下痢	その他の消化器 の症状	頭痛	発熱	口唇・口内・流涎	咽喉・発声	発語・言語	顔
すず	0.5h		3h	嘔気	嘔吐									
カドミウム	20m	1.5h	3h	嘔気・悪心	嘔吐			下痢(1~8回) 下痢(10%) 下痢(12%) 下痢(2~10回)						
カドミウム	20m	1.5h	3h	嘔気・悪心	嘔吐			下痢(2~3回) 下痢(2~5回) 下痢(2~8回)						
カドミウム	0.5h		4h	嘔気	嘔吐(1~5)			下痢(5%) 下痢(8%) 下痢(94%) 下痢(9%) 下痢(黄色い油上物質) 下痢(紅褐色油がに)						
亜鉛		2.5h			嘔吐			下痢(水様血性) 下痢(大半3回以下、粘)						
亜鉛		0.3h			嘔吐			下痢(粘)						
銅	10m	20m	30m	嘔気・悪心	嘔吐			下痢(粘)						
銅	2m	5m	2h		嘔吐			下痢(血性、水様、粘)						
銅		直後	5h					下痢(血便)						
銅			30m		嘔吐			下痢(空白以外のセル)						

図7 オートフィルターの抽出オプションの「空白以外のセル」による検索方法

病因物質	循環器	脈	呼吸・肺	肝臓	腎臓・尿・副 腎	精神	意識昏睡	倦怠感・脱 力感	悪寒	発汗	その他	その他	その他
すず								倦怠感					
カドミウム								倦怠感					
銅													
銅													
ヒ素化合物													
ヒ素化合物													
メチルアルコール													
過酸化水素水													

図8 「その他」の列に表示された症状の検索方法

事例・一般例	患者数	病因物質	早い	多発	遅い	嘔気・悪心	嘔吐	腹痛	下痢	その他の消化器の症状	頭痛	発熱	口唇・口内・流涎	咽頭・発声	発語・言語
事例1	9人	銅	10m	20m	30m	嘔気・悪心	嘔吐	腹痛	下痢(1~2h後)		頭痛		流涎		
一般		高濃度ヒ素化合物	直後	<30m		①嘔気	①嘔吐	①腹痛	②下痢(時に血便)		頭痛		口腔内ヒリヒリ感	咽頭痛	
一般		高濃度たばこ				悪心	嘔吐	腹痛	下痢		頭痛		流涎		
事例3	52人	有機りん系農薬 のじやまのめ 巻貝の唾液腺		通常2h以内		嘔気	嘔吐	腹痛	下痢	上部灼熱感	頭痛		口腔内灼熱感		言語障害
一般			10m	1.5h		嘔気	嘔吐	腹痛	下痢		頭痛		口唇しびれ		発語困難
一般		フグ毒	5m	5m~43h		嘔吐(吐血)	腹痛	下痢			頭痛		口唇、舌知覚異常発声不能		失語症
事例1	18人	シガテラ	.			嘔気	嘔吐		下痢		頭痛		しびれ	しびれ	
事例3	9人	シガテラ	5.5h	15h		嘔気	嘔吐	腹痛	下痢		頭痛		しびれ	しびれ	
一般		シガテラ	24h以内	2h		嘔気		腹痛	下痢		頭痛		しびれ・流涎		
事例1	28人	アレルギー様食中毒	0.5h	0.5~120h		嘔気	嘔吐	腹痛	下痢		頭痛		舌しびれ		

図9 ①嘔吐、②頭痛に加えて、③口唇・口内・流涎の各項目に何らかの症状のみられる病因物質を検索した場合の例

4 考 察

化学物質や自然毒による健康危害では、当該化学物質や自然毒の摂取量によって患者の症状の現れ方や潜伏時間の長さによってバラツキがみられる場合があることから、できるだけ同一物質による事例を数多く収集するように努めた。事例に一般例を加えたこのシステムによって病因物質の検索が迅速かつ容易になり精度も上げることができたと考えている。今回は、有害物質の経口摂取による急性の健康危害を収集したが、今後は、微生物や気体によるものなども含めた事例や一般例を多数収集し、検索の範囲拡充や精度を高める必要があり、多くの自治体の情報提供や専門家の協力によって本データベースが充実できるよう期待している。なお「農薬検索」用データベースの作成は、同一系統の農薬でも物質によって毒性は異なると考えられるが、同一系統共通の症状を呈する場合も少なくないと考え作成した。今回作成したデータベースは、使用人口の多いExcelを用いたので多くの人が何処でも簡単に使用できることや、疑われる病因物質が検索された場合に、検索に用いた症状以外の症状も同一「行」に表示されるので、直面している健康危害の発症者の症状との比較が容易である利点がある。しかし、画面が横に長いので横スクロールを多用しなければならないと

いう欠点もある。今後は今回作成したExcelによるデータベースの充実を図るだけでなく、目的とする情報が1つの画面に表示できる専用ソフトの開発も検討し、将来、できれば使用者の状況によって2つのソフトの使い分けができるようにしたいと考えている。

5 謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究の分担研究「健康危機管理事例のデータベース化とその利用に関する研究」で、宮城県の担当分をまとめたものである。ご協力をいただいた大阪府立公衆衛生研究所の江部所長を始め、当研究班の各位、並びにご助言をいただいた東北大学大学院医学系研究科環境保健医学分野の佐藤洋教授に対して深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 内藤裕史：中毒百科，南光堂（2001）
- 2) (財)日本中毒情報センター，症例で学ぶ中毒事故とその対策，(株)じほう（2000）
- 3) 阿部和男：行政と食中毒，(社)宮城県食品衛生協会（2000）

感染症発生動向調査における病原体検出状況

Infectious Agents Surveillance in Miyagi Prefecture

秋山 和夫 佐々木 美江 山木 紀彦
 後藤 郁男 佐藤 千鶴子*¹ 植木 洋
 渡邊 節 畠山 敬 斎藤 紀行

Kazuo AKIYAMA, Mie SASAKI, Norihiko YAMAKI,
 Ikuo GOTO, Chizuko SATO, Yo UEKI,
 Setsu WATANABE, Takashi HATAKEYAMA, Noriyuki SAITO

キーワード：定点，検出率，呼吸器系疾患，ヒトメタニューモウイルス

Key Words : Clinic Sentinels , Rate of Isolation , Respiratory Infectious Disease , Human metapneumovirus

宮城県感染症発生動向調査において、病原体定点及び患者定点から353件の検体を採取し病原体検査を実施した。その結果、インフルエンザを含む呼吸器系疾患の検体が253件(71.7%)、感染性胃腸炎を含む腸管系疾患が71件(20.1%)、その他の疾患が29件(8.2%)であった。病原体は353件中199件から検出し、検出率は56.4%に達し、県内で流行している感染症の病因因子の把握に有効であった。検出した主な病原体は、Influenza virusが105件、Coxsackievirusが22件、Norovirus及びRotavirusが各々12件、Echovirusが10件等であった。さらに、我が国で初めてHuman metapneumovirus 2件を分離し、冬期の市中呼吸器感染症の病因因子として主要な位置を占めることが示唆された。

1 はじめに

1999年4月1日から施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の中で感染症発生動向調査は大きな柱であり、感染症の発生を予防するための中心として位置づけられ充実が図られている。本調査は、患者の発生を週報単位で収集・分析・提供・公開する患者情報と、患者への良質かつ適切な医療の提供や感染症発生の予防およびまん延防止のための病原体情報の機能を有している。

宮城県において、既に患者情報については順調に機能しているが、病原体情報については取り組みが遅れていた。そこで、感染症の病原体の実態を把握し情報を提供することは、的確、迅速な感染症対策に極めて重要である点を考慮し、2002年4月より宮城県医師会と県内の医療機関および保健所の協力を得て「宮城県結核・感染症発生動向調査事業実施要綱：以下要綱」¹⁾に基づき感染症の病原体検査を本格的に開始した。今回は、2003年3月までに得られた病原体検査状況について総括し報告する。

2 方法と材料

2.1 対象疾患

病原体検査を開始するに当たり健康対策課と協議し、

* 1 がんセンター

要綱で定めている定点把握対象の4類感染症の中から、病原体検査は11疾患を対象に、疾患別予定検査数を340件とした(表1)。なお、調査期間は2002年4月～2003年3月31日までとした。

表1 病原体検査対象疾患及び予定検査数

1. インフルエンザ(150)	7. 麻疹(15)
2. 咽頭結膜炎(15)	8. 急性出血性結膜炎(15)
3. A群溶血性レンサ球菌咽頭炎(30)	9. 流行性角結膜炎(15)
4. 感染性胃腸炎(60)	10. 急性脳炎(5)
5. ヘルパンギーナ(15)	11. 無菌性髄膜炎(5)
6. 手足口病(15)	

()内は予定検査件数

表2 保健所別定点医療機関数

保健所名	患者定点医療機関(病原体定点医療機関)					
	小児科	眼科	科	インフルエンザ	STD	基幹
仙南	5	1		3	1	1(1)
塩釜	10(1*)	3		6(3)	3	1(1)
大崎	5(1*)	1(1)		3(1)	2	1(1)
栗原	3			2	1	1(1)
登米	3			2	1	1(1)
石巻	6(1*)			4(1)	2	1(1)
気仙沼	3	1		2(1)	1	1(1)
計	35(3)	6(1)		22(6)	11	7(7)

*印：インフルエンザ定点を兼ねている。

2.2 検体採取協力医療機関

要綱の基準に従って宮城県医師会が選定した病原体定点医療機関は、3小児科定点、1眼科定点、7基幹定点及び6インフルエンザ定点で、3小児科定点はインフルエンザ定点を兼ねている（表2）。さらに、病原体定点に加え一部の患者定点協力医療機関へも検体採取を依頼した。なお、検体採取から報告までは図1のフローに従って実施した。

2.3 検査材料

インフルエンザと他の呼吸器系疾患、ヘルパンギーナ、手足口病等の10疾患については、主に咽頭ぬぐい液、感染性胃腸炎と他の腸管系疾患については糞便を採取し検体とした。

2.4 検査方法

感染性胃腸炎等の腸管系疾患の細菌検査は、直接選択培地のSS及びDHL培地に検体を塗抹後、37℃、24時間培養した。同時にスキロー培地にも塗抹し、42℃、48時間培養した。また、A群溶血性レンサ球菌咽頭炎の検体は、羊血液寒天培地に塗抹後、炭酸ガス培養器で24時間培養した。菌の同定は、菌の直接鏡検や疑わしいコロニーを釣菌し生化学性状検査、市販免疫血清による血清型の決定、ラテックス凝集反応、薬剤感受性試験および病因子の検索を行い判定した。また、必要に応じて遺伝子検査を実施した。

ウイルス分離には、HEp-2、LLC-MK2、RD-18s、Vero、MDCKおよびHMV-1の6種類の細胞を使用し、Coxsackievirus A群の分離には哺乳マウスも併用した。また、Respiratory syncytial virus (RSV)、Rotavirusの検体に

については、培養検査に加えELISA法のディレクティジェンやロタクロンのキットを用い抗原検出を行った。感染性胃腸炎や他の腸管系疾患の糞便については遺伝子検査も併せて実施した。分離ウイルスの同定は、中和試験、赤血球凝集抑制試験及びPCR法で増幅した遺伝子を直接シーケンスし行った。

3 結果と考察

検体採取は6保健所管内の11医療機関から協力が得られた。その内訳を見ると、17病原体定点のうち石巻保健所管内の1小児科定点、塩釜保健所管内の2インフルエンザ定点および大崎保健所管内の1基幹定点の計4医療機関から185件、患者定点では栗原保健所管内の1定点、登米保健所管内の2定点、石巻保健所管内の1定点及び気仙沼保健所管内の3定点、併せて7医療機関から168件採取された。県内の場合、要綱に従い人口割合で病原体定点を設定すると、基幹病院を除く小児科定点やインフルエンザ定点がない保健所管内も存在し、全域にわたり病原体情報を詳細に把握するには不相当と考えられる。しかし今回、1保健所管内からは検体を採取することができなかったが、病原体定点の機能を補うため患者情報を基にした患者定点からの検体採取は、病原体情報の把握に非常に有効であったと考えられる。

採取された検体数は、年度当初に予定していた340件と同等の353件が確保できた。しかし疾患別・診断名別に見ると、インフルエンザの143件に急性咽頭炎・急性上気道炎・急性気管支炎等の診断名の110件を加えると、呼吸器系疾患の検体が253件（71.7%）と圧倒的に多かつ

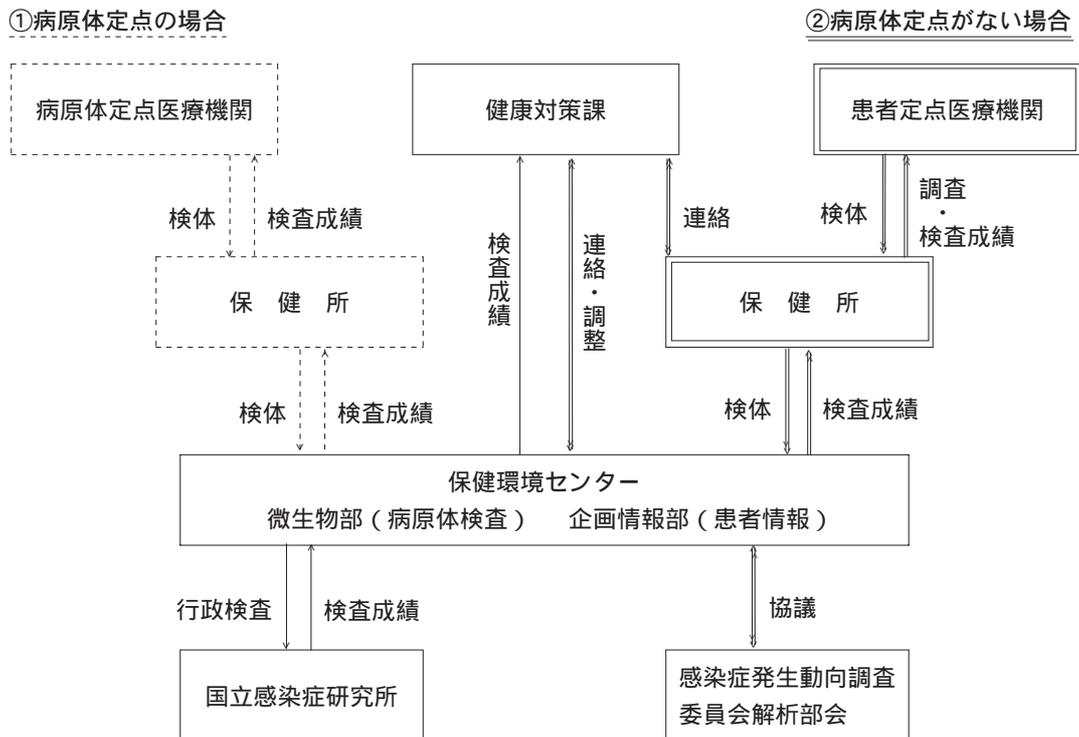


図1 検体採取フロー

た。続いて、感染性胃腸炎を含む腸管系疾患が71件（20.1%）、手足口病が11件（3.1%）、溶血性レンサ球菌感染症が5件、ヘルパンギーナと無菌性髄膜炎が各々4件であり、呼吸器系の類似疾患に偏る傾向が認められた。また、11対象疾患のうち眼科対象である急性出血性結膜炎と流行性角結膜炎の2疾患、及び麻疹・急性脳炎については全く採取されず、県全体或いは11疾患全ての病原体把握には至らなかった。次に月別の検体採取状況は5月初旬にインフルエンザの検体が28件採取されたのに始まり、その後感染性胃腸炎の検体が16件採取され、5月は計44件であったが、6月から9月までの4ヶ月は、ヘルパンギーナ・手足口病・無菌性髄膜炎の14件のみとなった。10月の40週経過後は、呼吸器系疾患や感染性胃腸炎の発生が顕著となったことと、積極的に検体採取の協力を医療機関に依頼した結果、検体数は増加し、11月には31件、12月には101件とピークに達し、2003年1月には97件、2月には36件と4ヶ月間で全体の約75%が採取された。これは、呼吸器系感染症が冬期に流行することと、小児科を中心とした医療機関では呼吸器感染症が主要な疾患であることを反映した結果と考えられた（表3）。

疾患別または診断名別の病原体検出状況を表4に示した。インフルエンザが確定または疑われた検体143件中108件（75.5%）から、Influenza virus100件・Parainfluenza virus・Human metapneumovirus（hMPV）・Adenovirusを各々1件及びgroup A Streptococcus（GAS）2件を分離した。また、かぜ症候群・急性咽頭炎・急性気管支炎等のインフルエンザ以外の呼吸器系疾患の診断名であった110件中36件（32.7%）からは、上述の病原体に加えEchovirus・Coxsackievirus B群・RSV・Herpes simplex virusなど多種類の病原体が分離された。また、1人の咽頭拭い液から2種類（GASとAdenovirus、GASとEchovirus、GASとCoxsackievirus）の病原体が分離された症例も確認された。このように呼吸器系疾患からは、併せて253件中144件（56.9%）から病原体を検出したが、この高い検出率は全検体を6種類の細胞へ接種し、さらに2～3代の盲継代を実施した結果によるものと考えられた。

全国における2001～2002シーズンのインフルエンザは、A/H1N1（ソ連）型・A/H3N2（香港）型・B型を原因とする混合流行であった。この時期に全国や県内で分離された2つのA型Influenza virusは、数年来の流行株と抗原性に大きな変異は認められなかった²⁾。一方、県

表3 月別・疾患別病原体検体数

診 断 名	月 計	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
		インフルエンザ*	143		28					1		11	66
かぜ症候群	22							6	10	5	1		
急性咽頭炎	30							5	4	14	5	1	1
急性上気道炎	4									3	1		
急性気管支炎	26									18	6	2	
急性肺炎	4									4			
扁桃炎	2								1				1
複数の呼吸器系診断名	22									13	8	1	
感染性胃腸炎*	52		16							15	8	7	2
感染性腸炎	12									12			
乳児嘔吐下痢症	3									3			
複数の腸管系診断名	4									3	1		
ヘルパンギーナ*	4					4							
手足口病*	11				6			1	1	3			
無菌性髄膜炎*	4				4								
A群溶血性レンサ球菌咽頭炎*	5							3					2
その他	2									2			
記載無し	3									2	1		
計	353	0	44	0	10	4	0	16	31	101	97	36	14

*：4類感染症届出疾患名

呼吸器系疾患におけるInfluenza virus以外の病原体検出状況の特徴は、これまでに我が国では分離報告がないhMPVを2株分離したことである。このhMPVは、2001年にオランダのvan den Hoogenら³⁾が、小児の気管支炎患者検体から分離したのが世界で初めてであり、その後2002年にオーストラリア、カナダ^{4,5)}において報告されている。今回は、2003年1月にインフルエンザ様疾患と診断された6才の女児及び急性上気道炎と診断された3才の女児から採取された咽頭拭い液をLLC-MK2細胞に3代継代して分離された⁶⁾。hMPVの物理学的・分子生物学的な特徴の詳細は今後の研究課題であるとともにhMPVの疫学的研究を行い、市中呼吸器感染症の一因として明確にすることも急務と考えられる。

感染性胃腸炎・感染性腸炎や他の腸管系疾患の診断名で採取された検体71件中31件(43.7%)から、Norovirus11件 Rotavirus1件 Adenovirus2型 Echovirus13型 Coxsackievirus B群2型、Poliovirus Sabin2型(ワクチン由来株)がそれぞれ1株ずつ分離された。細菌では病原性大腸菌1件とカンピロバクター1件が検出され、さらにNorovirusとRotavirus、NorovirusとCoxsackievirus B群、Norovirusと病原性大腸菌が同一患者から検出された症例が3件あるなど、多種多様な病原体が確認された。

感染性胃腸炎は多種類の細菌やウイルスに起因する疾患であり、年間を通じ発生するが、その流行パターンは初冬から増加し始め12月にピークに達した後、春に再度緩やかな山が認められる。今回、5月及び翌年の2月、3月の検体からは主にRotavirusが、11月以降の翌年の1月までの検体からはNorovirusが検出され、全国の検出状況と同じ傾向であった。なお、患者情報から宮城県において2002年夏期は全国の発生レベルの1.5~2.0倍の感染性胃腸炎の報告があることから、今後夏期には食中毒菌等を含めた細菌の病原体検索に力を入れる必要性が示唆された。

その他の疾患別または診断名別検査状況では、7月に某基幹病院へ無菌性髄膜炎の症状を呈する6~9才の患児が集中して受診したため、4名から咽頭拭い液と髄液が採取された。この時期、福井県、岡山県、高知県、熊本県などの西日本では、Echovirus13型による無菌性髄膜炎の大流行⁷⁾があったことからエンテロウイルスを想定して迅速に検査を行った結果、Echovirus30型を3株分離した。Echovirus30型による無菌性髄膜炎は、1997~1998年に全国的に流行したが、2002年はEchovirus13型の報告数が多い。県内においても、Echovirus13型は、かぜ症候群や急性咽頭炎などの診断名の患者検体から6件検出した。また、手足口病の検体は7月に6件、10月から12月に5件の計11件採取され、10件からCoxsackievirus A群16型が分離され、全国の状況と同様であった。

今後、手足口病の病原体には、無菌性髄膜炎や中枢神経合併症を伴い死に至ることもあるEnterovirus71型や、無菌性髄膜炎としてのEchovirus13型も視野に入れて、そ

の動向を把握する必要があると考えられた。

ヘルパンギーナからは8月に4検体採取され、Coxsackievirus A群6型3件とCoxsackievirus B群4型1件が分離された。全国的にはCoxsackievirus A群4型や6型²⁾が検出されており、ヘルパンギーナの材料からCoxsackievirus B群が分離されたことは、非常に希なケースであった。この情報を医療機関に提供したところ、Coxsackievirus A群6型が検出されたヘルパンギーナ患者とは症状が異なると報告を受けており、ヘルパンギーナとCoxsackievirus B群の関連性について追求する必要がある。その他の疾患としてA群溶血性レンサ球菌咽頭炎の検体が10月に3件、3月に2件採取され、GAST4型が3件とT13型が1件、型不明が1件分離された。

以上の成績から、インフルエンザ・感染性胃腸炎・無菌性髄膜炎・手足口病・ヘルパンギーナ・A群溶血性レンサ球菌咽頭炎の4類感染症として診断された患者より採取された検体は219件で、うち144件(65.8%)から診断名と病因因子との関連が示唆される結果が得られた。一方、急性咽頭炎・急性気管支炎・急性上気道炎などの4類感染症以外の診断名で依頼された検体は134件で、47件(35.1%)から病原体が検出され、前者に比して低い検出率であった。この結果は、現在分離対象としている細菌やウイルス以外の病原体も含め対処する必要性を提示していると考えられる。

4 ま と め

宮城県感染症発生動向調査の病原体検査は2002年度より本格的に開始された。検体は、病原体定点と患者定点医療機関の協力を得るなど変則的なシステムで採取されたが、当初の予定数は確保され、且つ病原体は353検体中199検体から検出し、検出率は56.4%に達し、初期の目的である感染症の予防対策には十分に寄与したと考えられる。さらに、我が国では初めてhMPVの分離に成功するなどの効果も認められた。しかしながら、臨床検体が採取されていない保健所区域もとともに、流行の兆しが見られてもスムーズに検体採取が行われず検体採取時期を逸する場合も経験し、今後さらに検体採取方法については改善する必要性も示唆された。

感染症発生動向調査の2つの機能である病原体検索結果と患者発生届出の解析を行い、感染症流行状況や今後の感染症流行予測などの情報をリンクさせて医療機関、保健所、学校、県民等へ情報を発信していくことは、患者への的確な治療の推進、県民への感染症発生予防措置、まん延防止措置の啓発の根拠としての意義が大きいと考えられる。

今後は、健康対策課・保健環境センター・保健所さらに医療機関と、組織的な連携を取りながら、患者発生情報と連動した形で病原体検査を進める必要がある。

5 謝 辞

本調査を実施するに当たり宮城県医師会及び定点医療機関の先生方，並びに保健福祉事務所健康対策班の方々に御協力を戴き深謝いたします。

6 参 考 文 献

- 1) 宮城県保健福祉部健康対策課：宮城県感染症対策マニュアル，184 - 190 (2000)
- 2) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，23(12)，307 - 308 (2002)

- 3) van den Hoogen,BG,et al：Nat.Med,7(6)，719 - 724 (2001)
- 4) Nissen M D,et al: Med.J.Aust,176(4)，188 - 189 (2002)
- 5) Teresa C.T.Peret,et al：J.Infec.Dis,185，1660 - 1663 (2002)
- 6) 後藤郁男他：病原微生物検出情報，24(3)，64 - 65 (2003)
- 7) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，23(8)，193 - 194 (2002)

小学校における感染性胃腸炎の集団発生事例

Outbreak of Gastroenteritis in a Public School

後藤 郁男 山木 紀彦 植木 洋
佐藤 千鶴子*¹ 渡邊 節 鶴若 美亜*²
鈴木 慶彦*² 村上 れい子*² 小野 日出麻呂*³
秋山 和夫

Ikuo Goto, Norihiko Yamaki, Yo Ueki
Chizuko Sato, Setsu Watanabe, Mia Tsuruwaka
Yoshihiko Suzuki, Reiko Murakami, Hidemaro Ono
Kazuo Akiyama

キーワード：感染性胃腸炎, Norovirus, 集団発生

Key Words : Gastroenteritis, Norovirus, Outbreak

県内の某小学校で発生した胃腸炎を主症状とする集団かぜについて、遺伝子学的手法を用いてNorovirusが原因であることを迅速に判定した。また学校の協力を得て患者発生状況を調査し感染源を追及したところ、同地域で流行していた感染性胃腸炎が発端と考えられた。さらに、学校におけるNorovirusを原因とした感染性胃腸炎発生時の対処法について、特に吐物の取り扱いに関して具体的な方法を情報提供することにより、各関係機関に注意を喚起することができた。

1 はじめに

毎年冬季になると、呼吸器系や消化器系の症状を伴う感染症が流行し、しばしば幼稚園、小中学校および老人施設などで集団発生し社会問題となることもある。一般的に感染症の集団発生を防ぐためには、ワクチン接種が有効とされるが、多種の病原体に対するワクチン開発は不可能であり、また万人にワクチンを接種することは困難である。そこで、感染症の拡大を阻止するためには、地域で流行している病原体の種を確定し、集団発生を防ぐ手段を講ずることも一つの対策であると考えられる。今回、胃腸炎症状の集団かぜ事例に遭遇し、学校の協力を得て原因の追求を行い、さらに関係機関が連携して迅速に予防対策のための注意を喚起することができたのでその概要を報告する。

2 事件の探知および材料と方法

2.1 事件の探知

平成14年12月13日に教育庁スポーツ健康課から健康対策課へ某小学校（在籍数428名）の在籍34名の2年2組において、「かぜ」により18名が欠席し学級閉鎖中との連絡があった。そこで、今冬最初の集団かぜであったこ

* 1 現 がんセンター * 2 気仙沼保健福祉事務所
* 3 登米保健福祉事務所

とから健康対策課・保健所・センターで協議し、学校に検体採取の依頼を行うことになった。当初、インフルエンザが原因と考えられたが、校医の見解や主症状より胃腸炎も考慮して検体は咽頭拭い液及び糞便とした。検体は12月17日より採取が行われ、咽頭拭い液29件と糞便28件となった。

2.2 ウイルス分離

咽頭拭い液および糞便について、定法により検体の前処理を行い、拭い液についてはMDCK, HEp-2, LLC-MK2, RD-18s, Vero, HMV-細胞を、糞便についてはHEp-2, LLC-MK2, RD-18s, Veroを用いた分離培養によりウイルス分離を実施した。

2.3 Norovirus遺伝子検査

糞便についてはさらに、感染性胃腸炎を疑いNorovirus (NV, 従来のNLV)を対象に遺伝子学的手法により検索を行った。すなわち、糞便よりQIAamp Viral RNA mini kitを用いてRNAを抽出し、GI系プライマーとしてGI SKR-SKF, GII系プライマーとしてGII SKR-SKFを用いてRT-PCRを行った。RT-PCR陽性検体についてダイレクトシーケン法により塩基配列を決定し確認試験とした。

2.4 学校欠席調査と患者情報の収集

12月16日に保健所が学校で調査を行い、当該クラス全員への調査を依頼した。さらに12月24日、保健所とセン

ターで再度学校を訪問し検査成績の途中経過、教員からの聞き取りと全校の欠席調査を行った。

3 結果および考察

3.1 病原体の検索

糞便28件中11件からNVのGⅠ型が1件、GⅡ型が10件検出され、シークエンスの結果GⅡ型10件の塩基配列のホモロジーはおよそ100%であったことから、今回の事例はNVを原因とする感染性胃腸炎であることが判明した。

発症者中調査票が回収できた21名についての主な症状は、発熱が最も多く66.7%、次いで腹痛が52.4%、嘔吐が28.6%、吐き気と咽頭痛が28.6%および下痢が23.6%であった。発熱が最も多い頻度で出現し、典型的なNV感染の症状とは異なっており、重複感染も考えられたがインフルエンザを含めた他のウイルスは検出されなかった。

3.2 発生状況

調査票と教員からの聞き取りを参考に集計した結果、初発は12月8日で1名、その後9日3名、10日8名、11日9名、12日2名、16日1名と計34名中24名(70.6%)が発症し、約1週間にわたり発生した。通常、NVの平均潜伏時間は24-48時間程度であることから、二次感染の可能性が示唆された。

3.3 欠席状況

全校における平常時の欠席数(平成14年10月28日-11月22日までの18日間の平均)は5.2人で、異常欠席を示す指標値は12.02人であった。平成14年12月11日より指標値を越える欠席が16日まで継続し、指標値を超えた期間は6日間と短くシャープペンシル型でピーク日の欠席率は7.7%であった。13日は当該クラスが学級閉鎖を行ったにも拘わらず、全校の欠席数は15名と指標値を越え、その中には胃腸症状を呈する欠席者もいたことから、当該クラス以外にも感染性胃腸炎の発生があったと考えられる。なお、他の学年での胃腸症状による12日以降の欠席者は計17名であった。図に学校全体及び最も患者が多かった2年2組の欠席状況を示した。

3.4 感染源の推定

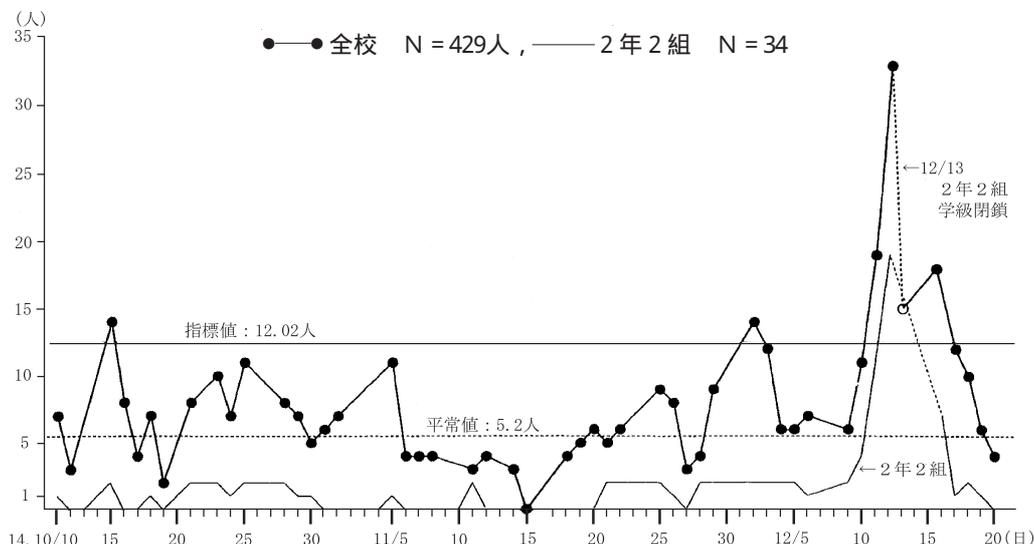
感染症発生動向調査における当該地域の患者定点からの感染性胃腸炎患者報告数は、平成14年の第48週が9.67名、第49週が21.33名、第50週が38.00名で、急激に流行が拡大していることを示しており、その影響で当該学校へウイルスが侵淫したと推定される。著者らは、県内の入院施設においてNVを原因とし飛沫感染が感染経路の主体であった感染性胃腸炎を経験している¹⁾。また、吐物の処理過程において感染拡大したと考えられる院内感染事例も報告されている²⁾ことから、今回の事例もウイルス感染者の一人が9日に教室を含む校内で5回嘔吐した際に、他の生徒が嘔吐物の後始末を手伝いウイルスに接触したり、さらにウイルスが飛散し同級生へ感染が拡大したと推察される。また、他の学年で発症した17名中には、当該クラスと兄弟や姉妹であった者や自宅が隣接して通学が一緒であった者もあり、それらから感染した可能性もある。

3.5 感染性胃腸炎の拡大防止策

本事例は地域で流行した感染性胃腸炎の影響を受けた感染者が、閉鎖されている教室等で嘔吐し、感染が拡大したと推定される感染性胃腸炎の集団事例であったことから、これを元に、保健所・センター・健康対策課・教育庁が連携を取り、集団施設等の関係機関へ「感染性胃腸炎の感染拡大防止について」³⁾の文書を送付し迅速に注意喚起を行った。この情報が、現場では本症に対する具体的なアドバイスとして有益であったと評価されており、今後も集団感染症発生防止に有効と考えられ情報の提供に努める必要がある。

4 まとめ

- (1) 県下で発生した胃腸炎を主症状とする集団かぜにおいて、遺伝子検査によりNorovirusを原因とした感染性胃腸炎の集団発生であることを迅速に明らかにした。
- (2) 学校欠席調査や患者の聞き取り調査結果より、本事例の原因は同地域で流行していた感染性胃腸炎が学内



に持ち込まれ、吐物の処理過程や飛沫により他の生徒に感染し、さらに同胞との接触により感染が拡大したものと考えられた。

- (3) 学校における感染性胃腸炎発生時の対処方法を情報提供することにより、感染拡大防止に寄与できた。

参 考 文 献

- 1) 植木 洋 他：県内の入院施設で発生した感染性胃

腸炎から検出されたN V 遺伝子解析，宮城県保健環境センター年報，19，65 - 68 (2001)

- 2) 井戸田一朗 他：ノーウォーク様ウイルスに起因する，急性胃腸炎の院内集団発生事例について 感染症誌，76(1)32 - 40 (2002)

- 3) 平成15年1月10日付け，健対第878号 「感染性胃腸炎の感染拡大防止について」

県内の牛における腸管出血性大腸菌（EHEC）保有状況

Detection of Entero Hemorrhagic E.coli from Slaughtered Cattle in Miyagi Prefecture.

畠山 敬 山口 友美 佐々木 美江
渡邊 節 斎藤 紀行 秋山 和夫
今野 明日香¹⁾ 小川 今日子²⁾ 千葉 文明²⁾
川向 和雄²⁾

Takashi HATAKEYAMA, Yumi YAMAGUCHI, Mie SASAKI
Setsu WATANABE, Noriyuki SAITO, Kazuo AKIYAMA
Asuka KONNO, Kyoko OGAWA, Fumiaki CHIBA
Kazuo KAWAMUKAI

キーワード：腸管出血性大腸菌，コロニーハイブリダイゼーション

Keywords : Entero hemorrhagic E.coli, Colony Hybridization

宮城県では平成11年に飼育牛から感染したと考えられる幼児の血清型O26による事例が発生した。さらに、平成14年度には市販大腸菌免疫血清に凝集しない血清型の菌に起因する家族内感染が発生した。これらのことから、ヒトEHEC感染症防止対策の基礎研究として、感染源となりうる牛のEHEC保有状況の把握と効率的な分離方法の検討を行い、分離された菌株とヒト感染症株の遺伝子パターンの比較を実施した。

1 はじめに

牛が感染原因と思われる腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は全国的に報告されており、宮城県でも平成11年に飼育牛が感染源と考えられる血清型O26による事例が発生した。また、平成14年度、県内において市販大腸菌免疫血清に凝集しない血清型に起因する家族内感染が発生し注目された。さらに、全国的にも牛肉等の食肉製品を原因とした広域的なEHEC感染症が発生している。

一方、牛はEHEC保菌家畜として、また牛肉製品はEHEC汚染の可能性が高い食品として食品及び食肉衛生検査の監視対象となっている。しかし、厚生労働省への食肉衛生検査所の報告はO157に限られ、その内容も検出件数にとどまりEHEC感染症との関連性や詳細な菌の性状は調査されていない。

これらのことから、ヒトEHEC感染症防止対策には、感染源となりうる家畜（牛）のEHEC保有状況の把握と効率的な分離方法の検討、及び県内で発生するEHEC感染症の原因となった菌株の毒素型と遺伝子パターンを含めた分子疫学解析は重要である。そこで、食肉衛生検査所管轄のと畜場で処理される牛を対象に、EHEC保有状況、分離菌の種類・性状の確認と保有動向を把握し、さらに人から分離した菌株と分子学的に比較を行い、今後

1) 環境生活部生活衛生課

2) 宮城県食肉衛生検査所

のEHEC感染症対策のための基礎的研究とすることを目的とした。

2 材料と方法

2.1 材料

平成12年4月から平成15年3月までにと畜場に搬入された1,327頭の糞便を検体とし食肉衛生検査所でEHECの分離を行った。

2.2 菌の分離および血清型

菌の分離は、糞便を増菌培地に接種し37℃で一晩培養した後、ペロ毒素遺伝子検出用プライマー（Takara社製 primer vt1およびvt2）を用いたPCRを行った（以下、増菌PCR）。遺伝子陽性となった増菌液を寒天培地に塗抹し、以下定法に従って分離同定を行った。また、寒天培地から一度で毒素産生菌が分離困難な場合には、菌の密に生えているエリアを掻き取り、PCRによる毒素遺伝子の確認を実施した。エリア中に遺伝子陽性の菌が存在する場合には、菌の再分離を繰り返し行い単一の菌とした。分離した菌は「デンカ生研」病原性大腸菌免疫血清を用いて血清型を決定した。

2.3 毒素の検出法

分離した菌はCAYE培地2 ml中に接種し、37℃で18-20時間振とう培養後遠心し、上清に存在する毒素をラテックス凝集（RPLA）法で検出した。

2.4 コロニーハイブリダイゼーションによるEHECの分離

前述した1,327頭の牛糞便検体のほかに、新たに103頭の牛糞便検体を採取しコロニーハイブリダイゼーションによるEHECの分離を試みた。コロニーハイブリダイゼーションには増菌PCRで毒素遺伝子陽性となった18検体を供試した。増菌培地はミネラルオイルを重層して半嫌気状態にしたmECブイオンを使用し、検体を接種後44で一晚培養した。増菌PCRでVT遺伝子の存在が確認されたブイオン100μlをmEC寒天培地に塗抹し、37で培養した後コロニーハイブリダイゼーションに供試した。コロニーをハイボンドN+に転写し、水酸化ナトリウムの存在下で菌を破壊して遺伝子を膜に転写固定した。Takara社製のプライマーで増幅した産物(VT1・2)をピオチン化したプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、シグナル陽性コロニーの毒素型および血清型

を確認した。

2.5 パルスフィールド電気泳動 (PFGE)

分離した菌株は、遺伝子抽出後に制限酵素 Not を用いて切断し、Bio-RAD社製 Chef Mapper を用いて定法に従いPFGEを行った。

3 結 果

3.1 EHECの分離成績

牛のEHECの保有状況は、増菌PCR法の陽性頭数が平成13年度は315頭中66頭(検査頭数の21%)、平成14年度が418頭中91頭(検査頭数の22%)と全検査頭数の約20%であった。また、牛糞便からは季節を問わず毒素遺伝子が検出された。しかし、増菌PCR法で遺伝子陽性を示した157頭(平成13年度及び14年度合計)からの菌分離率は約20%(30頭)であった(表1)。

表1 3年間の月別検査頭数とEHEC分離件数

分離月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
H12年度検査頭数	9	46	16	110	114	78	65	24	35	49	24	24	594
分離頭数(株)	0	0	0	0	1	1	0	0	3	0	0	0	5
H13年度検査頭数	0	4	20	62	36	13	0	74	15	25	33	33	315
PCR陽性件数	0	1	10	7	9	2	0	9	6	11	5	6	66
分離頭数(株)	0	1	0	2	1	0	0	4	0	3	2	1	14
H14年度検査頭数	26	20	20	37	39	34	40	46	37	41	40	38	418
PCR陽性件数	0	5	2	3	19	17	13	6	1	14	10	2	91
分離頭数(株)	0	0	0	1	1	0	5	1	0	2	6	0	16
検査頭数合計	35	70	56	209	189	125	105	144	87	115	97	95	1,327
分離頭数(株)	0	1	0	3	3	1	5	5	3	5	8	1	35
分離率(%)	0	1.4	0	1.4	1.6	0.8	4.8	3.5	3	4.3	8.2	1.1	2.64

3.2 分離菌株の血清型

分離された菌の血清型はO26、O157以外にもO161、O165、あるいは市販抗血清で凝集しないO138やOUT(O antigen untyped)も分離された(表2)。

3.3 コロニーハイブリダイゼーションによる分離

今回行ったコロニーハイブリダイゼーションの手技と具体例を図1に示した。これらの方法により、103頭の検体から、増菌PCRが陽性になった18頭(17.5%)にコロニーハイブリダイゼーションを実施した。その結果、5頭(検査頭数の4.9%、PCR陽性頭数の27.8%)の糞便からO15、O119やOUTなど合計22株のEHECが分離された(表3)。

3.4 PFGEによる遺伝子パターンの比較

EHEC感染症患者由来の菌株についてPFGEにより比較検討した結果、平成13年度に分離されたO26患者由来株8株のうち2株(金成町在住者)に同時期に分離した牛由来O26株(栗駒町で飼育)とパターンの類似性が見られた(図2)。

表2 分離した菌の性状

分離年度	血清型	産生毒素
平成12年度	O157:H7	VT1・2
	OUT:HNM	VT2
平成13年度	O26:H11	VT1
	O138:HUT	VT1
	O157:H7	VT1・2
	O161:H11	VT1
	O165:HUT	VT1・2
	OUT:H19	VT1
平成14年度	OUT:HUT	VT1・2
	O157:H7	VT1・2
	O157:H7	VT2
	OUT:HUT	VT1・2
	"	VT1

図1 コロニーハイブリダイゼーションでのEHEC分離チャート
検体をmECブイオンで44 嫌気性培養

増菌PCR陽性：寒天培地に蒔きハイブリダイゼーション

シグナル陽性：該当するコロニーまたはエリアをPCRで確認

PCR陽性：平板培地で純培養の確認と分離

分離株の毒素確認（菌分離）

好気性菌による疑似シグナル

毒素遺伝子陽性シグナル

再分離後

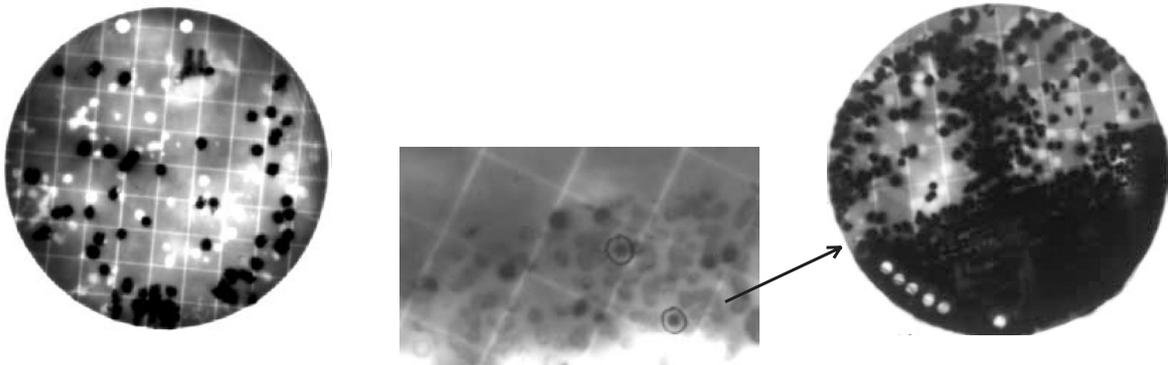
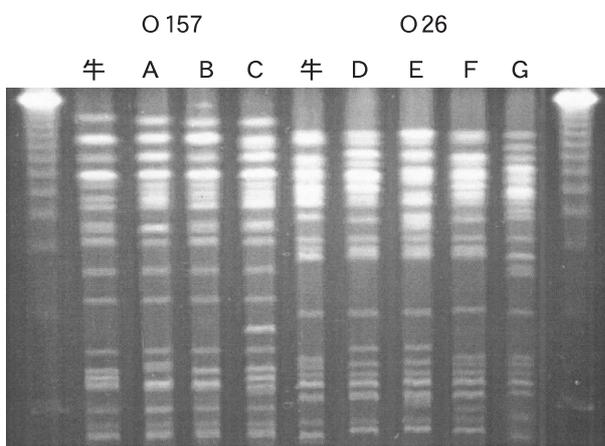


表3 コロニーハイブリダイゼーションにより分離した菌の性状

検体番号	O血清型	産生毒素	同一シャーレからの分離株数	生化学的性状
5	O157	VT2	1	一般大腸菌の性状
26	O119	VT1・2	1	〃
42	O15	VT2	10	〃
48	O119	VT1・2	6	〃
49	O119	VT1・2	4	〃

図2 P F G E による牛由来株と感染症由来株の比較



A～G：感染症由来株

4 考 察

我々はこの調査の中で、平成14年度に起こった家族内感染事例の原因菌であるO138を平成13年度に既に牛から分離し、その保有を確認している。よって、ヒトEHEC感染症防止対策には、感染源となりうる家畜（牛）のEHEC保有状況の把握と、今まで以上に効率的な分離方法の検討を行うことが重要である。

と畜場に搬入された牛糞便からのEHEC遺伝子の検出状況は、初年度である平成12年度が検査頭数の約0.8%であったのに対し、平成13年度は21%、平成14年度が22%と大幅に増加した。これは、特異性の高い検出用プライマーの選択とPCRの基礎的な技術が向上した結果と思われる。また、牛便から毒素遺伝子の検出される時期は、ヒト感染症が多発する夏場のみでなく検査を行ったほとんどすべての期間を通して検出されることから、EHEC

は牛に常在していることが確認された。さらに、EHECの分離成績は、全検査検体1,327頭のうちの35頭（全体の2.6%）であり、これは全国食肉衛生協議会や公衆衛生獣医師協議会等での分離報告とほぼ一致する。しかし、増菌PCR法で遺伝子陽性を示した157頭からの分離率は約20%であった。

このように、増菌PCR法で陽性を示したにもかかわらずEHEC分離率が2割と低値であったことから、分離率を高めるためコロニーハイブリダイゼーション法の応用を試みた。当初、我々はポラードらの考案した遺伝子配列をそのままハイブリダイゼーションに利用し分離を試みたが、毒素遺伝子に対する結合特異性が低いため、検出用としては不適であった。そこで、検出用のプローブをTakara社製プライマーの遺伝子配列とし、大腸菌以外の菌の増殖を排除するため増菌温度を44℃に変更して嫌気性培養を実施したところ、EHECの分離に良好であることが判明した。コロニーハイブリダイゼーションは一度に数千ものコロニーのスクリーニングが可能で血清型を問わないため、この方法の活用はEHECの分離に非常に有効な手段であると思われた。しかし、今回プロトタイプVT2プロダクトを使用して作成したプローブがバリエーションに対して有効か否かは未知である。今後の検討課題としたい。

分離された血清型は、ヒトEHEC感染症の原因の中で最も多く分離されるO157、O26のほかにO15、O119、O138、O161、O165など多様な血清型が存在することが示された。さらに、大腸菌の性状を示しながら通常の市販血清型に凝集しないOOUT（O antigen untyped）も分

離されるなど、牛が保有する大腸菌にはヒトには稀な血清型が多く存在する可能性が考えられた。特にO138は平成14年度に家族内感染の原因菌となったが、免疫血清が市販されていないなど、行政検査を行う上で問題である。

EHEC感染症患者由来の菌株についてPFGEにより比較検討した結果、平成13年度に分離されたO26患者由来株8株のうち1株（金成町在住者）に同時期に分離した牛由来O26株との類似性が見られた。牛の出荷地（栗駒町）及び患者の居住地がともにEHEC患者多発地帯である保健所管内であったことは興味深く、今後とも牛・人の両面から継続調査が必要な地域であると思われた。

5 ま と め

最後に、この調査で、牛はO157、O26以外にも多くのEHECを保有し、その排泄は季節を問わず行われていることが確認された。また、動物由来株・ヒト感染症由来株の遺伝子パターンの相同性は新たな発生疫学的調査の方向性を示したものであると思われる。今後とも、牛保有EHECの追跡を行い、どのようなEHECが人に病原性を有するのか、どのような因子が病原性発揮のための指標となるのかを確認していく必要がある。

参 考 文 献

1. 京都市衛生公害研究所調査研究部門：ハイブリダイゼーション法によるEHECの検出と単離の試み、京都市公害衛生研究所年報 65, p105～108（1999）
2. 1990年度版、食品衛生検査指針、微生物編 p67～107

レジオネラ属菌とアメーバの関連性

Investigation of the Relevance of *Legionella* and Amoebas

佐々木 美江 有田 富和*¹ 畠山 敬
斎藤 紀行 秋山 和夫

Mie SASAKI, Tomikazu ARITA, Takashi HATAKEYAMA
Noriyuki SAITO, Kazuo AKIYAMA

キーワード：レジオネラ，宿主アメーバ

Key Words : *Legionella* , Host Amoeba

温泉施設・旅館の温泉水と浴槽周辺のぬめりを対象にレジオネラ属菌とアメーバの検査を実施したところ，双方とも高率に検出され，特に浴槽水からは宿主アメーバが優勢に確認された。また，アメーバが確認された温泉水や浴槽周辺のぬめりからは60%以上レジオネラ属菌が検出されたことから，レジオネラ属菌とアメーバが深く関与していることが明らかとなった。

1 はじめに

レジオネラ属菌は好気性のグラム陰性桿菌で，アメーバやテトラヒメナなどの原生動物の食胞内に寄生し増殖することが知られている。レジオネラ属菌の宿主アメーバは *Hartmanella* , *Naegleria* , *Acanthamoeba* , *Vannella* など¹⁾，これらのアメーバは環境によって栄養体・シスト(嚢子)のように形態を変化させる。シストは乾燥や熱，薬剤に強く，乾燥状態で1年以上生存することや高濃度の塩素に耐性であること²⁾から，アメーバにレジオネラ属菌が寄生した場合，レジオネラ属菌が死滅する環境でもシスト化したアメーバ内でレジオネラが生存し続ける可能性がある。そこでレジオネラ属菌汚染防止には，アメーバを除去することが必須であり，その前段階としてレジオネラ属菌とアメーバの関連を知ることが重要と考えられる。今回，レジオネラ属菌生息実態調査事業において温泉水とぬめりから検出したレジオネラ属菌とアメーバの関連性について調査し，若干の知見が得られたので報告する。

2 材料及び方法

2.1 材料及び検査項目

レジオネラ属菌生息実態調査を実施した温泉施設・旅館の21施設を対象として，平成13年5月から平成14年12月までに採取した温泉水(注湯口・浴槽)149件および浴槽周辺のぬめり72件を検査材料とした。また，検査項目はレジオネラ属菌，アメーバの検出の他に採水時に残留塩素濃度の測定を実施した。

2.2 検査方法

レジオネラ属菌の分離・同定およびアメーバの分離は昨年と同様に「新版レジオネラ症防止指針」に基づき実施した³⁾。アメーバの分離方法を図1に示した。アメーバの分離に使用した大腸菌塗抹培地は大腸菌を予め60で不活化し，無栄養寒天培地に塗布して作製した。温泉水については，原水または50倍濃縮した1mLを，ぬめりについては原液または10倍希釈した1mLを大腸菌塗抹培地に塗布後30で1～5日培養し，ブランク形成が認められた場合をアメーバ陽性とした。検出された一部のアメーバを微分干渉顕微鏡下(200～400倍)でシスト・仮足・べん毛等の形態観察を行ない，属名の決定をした。



図1 アメーバの検査方法

* 1 現 石巻保健福祉事務所

3 結 果

3.1 検出状況

レジオネラ属菌とアメーバの検出状況を図2及び図3に示した。レジオネラ属菌は温泉水から149件中61件(40.9%),ぬめりからは72件中29件(40.2%)と同程度、検出された。一方、アメーバは温泉水から149件中51件(34.2%)であったのに対し、ぬめりからは72件中36件(50.0%)と半数からアメーバが確認されるなどレジオネラ属菌と同様にアメーバは高率に確認された。

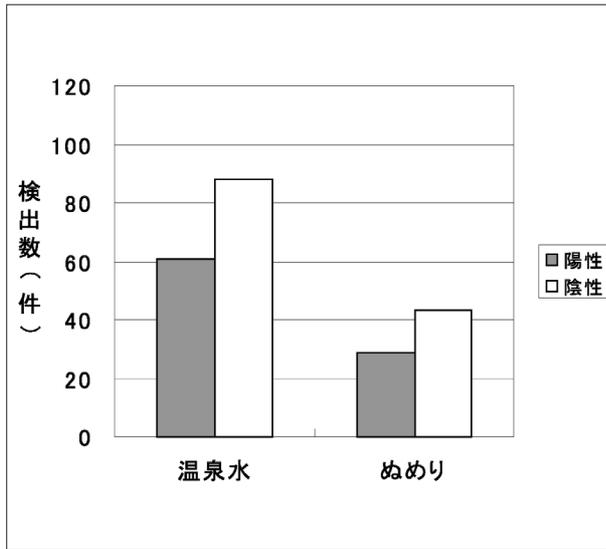


図2 レジオネラ属菌検出状況

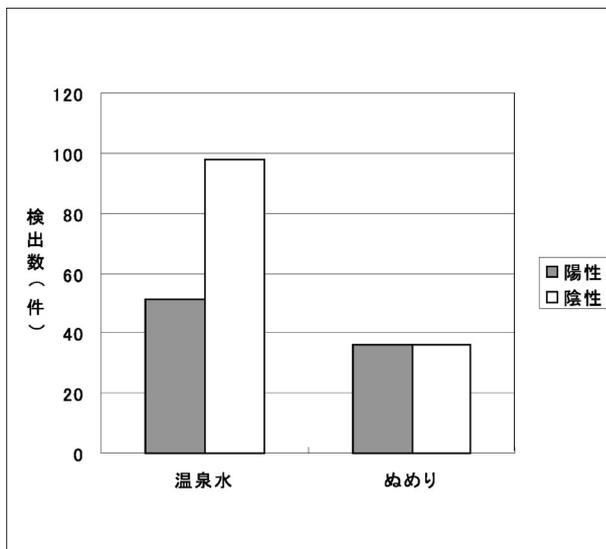


図3 アメーバ検出状況

3.2 レジオネラ属菌とアメーバの関連

温泉水及びぬめりにおけるアメーバ生息の有無とレジオネラ属菌の検出状況を比較した(図4,5)。温泉水からレジオネラ属菌は、アメーバが確認された51件中36件(70.6%)から検出されたのに対し、アメーバが確認出来なかった温泉水からは98件中25件(25.5%)にとどま

り、アメーバが生息する浴槽からは高率にレジオネラ属菌が検出された。

また、同様にぬめりでのレジオネラ属菌は、アメーバが確認された場合、36件中23件(63.9%)、確認されなかった場合、36件中6件(16.7%)であった。

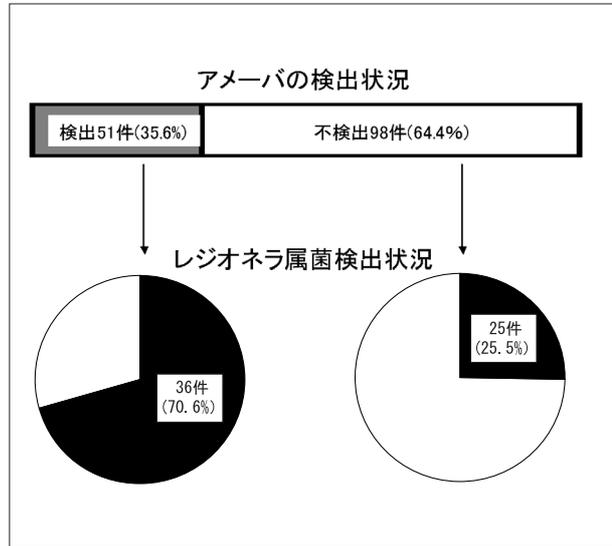


図4 レジオネラ属菌とアメーバの関連性 (浴槽水：149件)

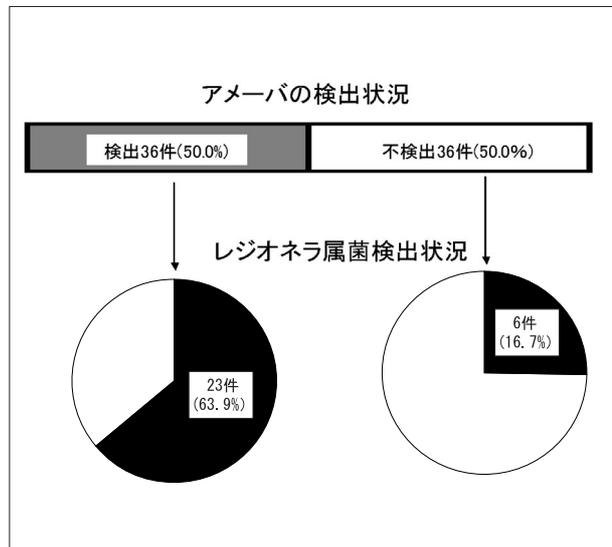


図5 レジオネラ属菌とアメーバの関連性 (ぬめり：72件)

3.3 残留塩素濃度とアメーバ及びレジオネラ属菌の検出状況

確認された一部のアメーバの種類及びレジオネラ属菌、残留塩素濃度を表1に示した。

同定したアメーバはレジオネラ属菌の宿主となる *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Hartmanella* と、温水環境中に広く生息する *Platyamoeba* であった。また、残留塩素濃度とアメーバの種類を比較すると、0.1mg/L未満の浴槽水

ではレジオネラ属菌の菌数やアメーバの種類，検出数に差はみられなかったが，残留塩素濃度が0.2mg/L以上で宿主アメーバである*Acanthamoeba*が1件検出された。

表1 残留塩素濃度とアメーバ及びレジオネラ属菌の検出状況

残留塩素濃度 (mg/L)	アメーバの種類	検出数	レジオネラ属菌 (CFU/100mL)
0.1未満	<i>Hartmanella</i>	4	50 ~ 430
	<i>Acanthamoeba</i>	4	0 ~ 390
	<i>Naegleria</i>	7	0 ~ 1,260
	<i>Platyamoeba</i>	4	20 ~ 160
0.1~0.2未満	<i>Acanthamoeba</i>	1	0
0.2以上	<i>Acanthamoeba</i>	1	0

4 考 察

平成11年4月に施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」でレジオネラ症は全数届出対象疾患の4類感染症となった。施行前の昭和45年から平成4年（1979~1992）までの14年間の患者数が86例に対し⁴⁾，感染症法施行から平成14年12月（2002）までの患者数は465例と増えている⁵⁾。

また近年，温泉・公衆浴場を感染源としたレジオネラ症の集団感染例が相次いで報告され，平成14年宮城県では循環式入浴施設を感染源とする患者295名（うち7名死亡）に達する事例報告もあり，社会的関心が一層高くなっている。現在まで宮城県内での集団発生は報告されていないが，感染源不明のレジオネラ症による1例の死亡が報告されていることから⁶⁾，レジオネラ症に対する防止対策は急務といえる。

今回，レジオネラ属菌がアメーバ食胞内で大量に増殖するという報告⁷⁾から温泉水とぬめりからのアメーバの生息状況調査を実施したところ，40~50%にアメーバの生息を確認した。更にアメーバが確認された温泉水・ぬめりからのレジオネラ属菌検出率は約60%に達し，アメーバが確認されなかった両者からのレジオネラ属菌の検出率は20%程度と大きな差が認められた。また，確認されたアメーバ種はレジオネラ属菌の宿主とされる種が優勢に同定されていることより，温泉施設内でのレジオネラ属菌の増殖や生存には，アメーバが重要な関与をしていることが明らかになった。

一方，アメーバに感染したレジオネラ属菌は，高濃度の遊離塩素でシスト化したアメーバの体内で休止状態となり，塩素濃度を低下させることによって再び活動をするという実験報告²⁾があり，今回の調査で残留塩素濃度0.2mg/Lの温泉水にも*Acanthamoeba*が生息していたことから，塩素濃度を保持することのみでレジオネラ属菌の汚染を完全に防止すること不可能である。

以上の成績から温泉施設等におけるレジオネラ属菌の汚染防止には，温泉水あるいはぬめりに含まれるアメーバの除去が重要であると考えられる。

5 ま と め

- (1) 温泉水・ぬめりからレジオネラ属菌とアメーバが高率に検出された。
- (2) レジオネラ属菌の増殖には，アメーバが関与していることが確認された。
- (3) 温泉水からは宿主アメーバである*Naegleria*，*Acanthamoeba*，*Hartmanella*が検出された。
- (4) レジオネラ属菌の汚染防止には，温泉水あるいはぬめりに含まれるアメーバの除去が必要であることが考えられた。

6 謝 辞

本調査を実施するにあたり生活衛生課環境衛生班，大崎保健所環境公害班，仙南保健所環境公害班の担当職員の方々に多大なるご協力を賜り深く感謝します。

参考文献及び資料

- (1) 財団法人ビル管理教育センター発行：新版レジオネラ防止指針
- (2) Kilvington S et al : Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* 68, 519 - 525 (1990)
- (3) 佐々木美江他：宮城県内の温泉施設におけるレジオネラ属菌実態調査（第1報），宮城県保健環境センター年報19，62 - 64（2001）
- (4) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報Vol. 21，9（2000）
- (5) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報Vol. 24，2（2003）
- (6) 宮城県感染症情報センター：宮城県感染症発生動向調査情報，第29週（2003）
- (7) 遠藤卓郎他：レジオネラ汚染とその対策（2003）

核酸増幅副生成物(ピロリン酸)の検出法を利用した食中毒菌の迅速検査

Rapidly Identification of Food-poisoning Bacteria by Detection of Pyrophosphate

齋藤 紀行 秋山 和夫 遠藤 美砂子*
丸山 昇*Noriyuki SAITO, Kazuo AKIYAMA, Misako TAGIRI-ENDO
Noboru MARUYAMA

キーワード：PCR法，ピロリン酸，食中毒菌

Keyword : PCR Method, Pyrophosphate, Food-Poisoning Bacteria

食中毒菌の迅速診断法としてPCR法が広く用いられているが、経済性あるいは安全性の理由から食品加工業者などの現場にはほとんど導入されていない。

PCRの終末点の判定法を核酸増幅副産物のピロリン酸に着目し、新たな呈色法によるピロリン酸測定法を開発した。食中毒菌の検出法の応用を考え、市販の食中毒菌鑑別用プライマーを用いて食中毒菌関連菌に対してPCRを行い、反応終末点を従来の電気泳動法及び新たに開発したピロリン酸測定法とで判定した結果、ピロリン酸測定法は電気泳動法と同等の感度で反応終末点が判定でき、食品加工現場での応用の可能性が示された。

1 はじめに

微生物の特定遺伝子を増幅するPCR法は、細菌検査の迅速な検出法として日常検査に広く用いられている。PCR法は、微生物等のDNAをテンプレートとしサーマルサイクラーを用いて核酸増幅反応を行い、生成された特異DNA断片(アンプリコン)を電気泳動・染色で検出し、病原菌の有無を判定する検査法である。PCR法に用いるサーマルサイクラーは高価で、アンプリコンの染色に発ガン性物質のエチジウムブロマイドを用い、さらに染色されたバンドの検出に紫外線を用いる。これらの理由から、食品中の微生物を迅速に検出する必要がある食品加工業者などの現場にはほとんど導入されていない。

そこで、PCRに変わるものとして、安価な機器で、簡便かつ安全に食中毒菌の存在が検査できるシステムの開発が求められている。

近年、核酸増幅の反応終末点の判定をアンプリコンの検出に変わり副産物の2リン酸であるピロリン酸を測定する方法が注目されている。わが国においては、核酸増幅を定温で行ないピロリン酸をマグネシウム塩として検出するLAM P法が実用に向けて検証が進められている¹⁻³⁾。

遠藤は、ピロリン酸を酵素反応を利用して測定する方法の導入を考え、新たな呈色法によるピロリン酸測定法(ピロリン酸法)を開発した⁴⁾。

今回、我々は7種類の市販食中毒菌鑑別用プライマー

* 産業技術総合センター

を用い、各々の特異遺伝子を保有している食中毒菌及び特異遺伝子を保有していない環境あるいは臨床分離菌についてPCRを行い、反応後を核酸増幅産物を泳動法で、副産物のピロリン酸を新たに開発したピロリン酸法で測定しピロリン酸の有効性について比較検討したので報告する。

2 材料と方法

2.1 材料

(1) 供試菌

臨床あるいは環境より分離した大腸菌(*Escherichia coli*)3株、腸管出血性大腸菌(*Enterohemorrhagic E. coli*)5株、腸管侵入性大腸菌(*Enteroinvasive E. coli*)1株、エンテロバクター(*Enterobacter cloacae*)1株、クレブシエラ(*Klebsiella oxytoca*)2株、シトロバクター(*Citrobacter freundii*)2株、セラチア(*Serratia marcescens*)1株、エルシニア(*Yersinia pseudotuberculosis*)1株、プロテウス(*Proteus mirabilis*)1株、プロビデンシア(*Providencia rettgeri*)1株、サルモネラ(*Salmonella spp*)7株、赤痢菌(*Shigella flexneri*)2株、腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)tdf(+)1株、腸炎ビブリオtdf(-)3株、ビブリオ・バルニフィカス(*Vibrio vulnificus*)1株、ナグビブリオ(*Vibrio cholerae non-O1*)1株、ウエルシュ菌(*Clostridium perfergens*)enterotoxin(+)3株、ウエルシュ菌enterotoxin(-)3株、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)enterotoxinA(-)1株、黄色ブドウ球菌enterotoxin(-)3

株の20菌種42菌株を供試菌株とした。供試菌のうち各プライマーに対応する特異遺伝子の保有が確認されている菌株を陽性株、特異遺伝子を保有しないことが確認されている菌株を陰性株とした。

(2) 食中毒菌用プライマー

サルモネラ菌invA遺伝子検出用 (SIN), 腸炎ピブリオ耐熱性溶血毒遺伝子検出用 (VPD), 腸管出血性大腸菌VT遺伝子検出用 (EVC), 赤痢菌及び腸管侵入性大腸菌invE遺伝子検出用 (INV), 赤痢菌及び腸管侵入性大腸菌ipaH遺伝子検出用 (IPA), サルモネラ菌エンテロトキシン遺伝子検出用 (STN), ウエルシュ菌毒素遺伝子検出用 (CPE) 及び黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA遺伝子検出用 (SEA) の7種類の市販プライマー (Takara Bio社製) を使用した。各々のプライマーを陽性対象菌, 増幅DNAの大きさとともに表1に示した。

表1 プライマーの種類と陽性対象菌

プライマー	略号	陽性対象菌	増幅DNA (bp)
サルモネラ菌エンテロトキシン遺伝子	STN	サルモネラ菌	264
腸炎ピブリオ耐熱性溶血毒遺伝子	VPD	tdf(+) 腸炎ピブリオ	251
ウエルシュ菌毒素遺伝子	CPE	エンテロトキシン(+) ウエルシュ菌	456
腸管出血性大腸菌VT遺伝子	EVC	腸管出血性大腸菌	171
赤痢菌及び腸管侵入性大腸菌(EIEC)invE遺伝子	INV	赤痢菌, 腸管侵入性大腸菌	293
赤痢菌及び腸管侵入性大腸菌(EIEC)ipaH遺伝子	IPA	赤痢菌, 腸管侵入性大腸菌	242
黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA遺伝子	SEA	エンテロトキシンA(+) 黄色ブドウ球菌	423

(3) PCR 試薬

PCRにはDNAポリメラーゼ及び4種の塩基が含有されたPCR Beads Tube (Ready-To-Go: Amersham Pharmacia Biotech社製) を使用した。

(4) ピロリン酸測定用試薬

0.4U/mlキサンチンオキシダーゼ (XOD: ロッシュ社製) 及び20mMイノシン酸を含む100mMトリス - 塩酸緩衝液 (pH7.6) を調整し, これを試薬1とした。100U/mlヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPR: シグマ社製250U) 及び4mMのパラヨードニトロテトラゾリウムバイオレットを含む100mMトリス - 塩酸緩衝液 (pH7.6) を調整し, これを試薬2とした。

2.2 方法

(1) 菌の調整

各供試菌を適切な液体培地で1晩培養後遠心し, 沈渣に滅菌蒸留水を加え再浮遊させ, 95℃で6分加熱, 更に10,000rpmで1分間遠心した上清をPCR用テンプレートとした。検出感度測定にはサルモネラ菌 (*Salmonella Enteritidis*) を1晩培養後, 生菌数を算出し, 更に10倍階段希釈した後, 各々の濃度の菌液を熱処理してDNAテン

プレートとした。

(2) DNA増幅

DNA増幅のためのPCRはReady-To-Goチューブ1本に滅菌水 (22µl), 各プライマー (アンチ0.25µl センス0.25µl) および各菌株のDNAテンプレート (2.5µl) を加え, サーマルサイクラー (ABI社) を用い市販プライマーの仕様書に準じた条件でPCRを実施した。1検体につき2本のReady-To-Goチューブを使用した。

(3) 電気泳動によるアンプリコンの確認

PCR終了後, 各検体の5µlを2.5%アガロースゲルで電気泳動を行い泳動後, アガロースゲルをエチジウムブロマイドで処理した後, 紫外線で各々のアンプリコンを確認し写真撮影を行った。

(4) ピロリン酸測定

PCR後, 各検体に試薬1を5µl添加し60℃で1分間加温振とう, さらに試薬2を20µl加え, 60℃で10分間加温振とうした後, 1検体2本のPCRチューブの反応液を合わせ, そこから90µlをマイクロプレートリーダー用のプレートに分注し吸光度 (490nm / 630nm) を測定した。吸光度0.04以上では目視による呈色の判定が可能であった。このことより, 吸光度が0.04未満をピロリン酸法陰性 (呈色陰性) 0.04以上をピロリン酸法陽性 (呈色陽性) とした。

(5) 検体の判定

陽性株及び陰性株をそれぞれのプライマーでPCRを行い電気泳動法で特定のアンプリコンが検出された検体を泳動法陽性, 検出されなかった検体を泳動法陰性とした。陰性株のうち泳動法で特定位置以外にバンドが観察される泳動法陰性検体で, ピロリン酸法で呈色するもの (目視で確認可: 吸光度0.04以上) を疑陽性とした。

3 結果

3.1 泳動法とピロリン酸法

表1に示した7種類のプライマーを用い, 特定遺伝子の保有が確認されている菌株 (陽性株) 39, 保有しないことが確認されている菌株 (陰性株) 121についてPCRを行い反応終了後, 電気泳動法によるアンプリコンの検出と呈色反応によるピロリン酸測定を各々について行い, 結果を表2に示した。

表2 食中毒菌の泳動法及びピロリン酸法によるPCR判定

プライマー	検体数	遺伝子保有株			遺伝子非保有株		
		泳動陽性	呈色陽性	呈色陰性	泳動陽性	呈色陽性	呈色陰性
STN	29	12	12	0	17	5	12
VPD	34	9	9	0	25	8	17
CPE	23	7	7	0	16	1	15
EVC	16	5	5	0	11	0	11
INV	16	2	2	0	14	2	12
IPA	16	2	2	0	14	0	14
SEA	26	2	2	0	24	0	24
計	160	39	39	0	121	16	105

陽性株の全ては泳動法及びピロリン酸法で陽性を示した。陰性株は泳動法では全て陰性と判定されるが、この中にピロリン酸法で呈色陽性を示す疑陽性株がSTN, VPD, CPE及びINVプライマーを用いた場合に認められた。VPDでPCRを行った後、その反応液におけるアンプリコンは電気泳動・染色後、画像として、またピロリン酸は呈色反応で測定した吸光度を棒グラフとして、図1に示した。レーン3, 8, 9がtdh(+)腸炎ビブリオで、泳動法では251bpに特異バンドが観察され呈色反応でも吸光度が0.04以上を示し、明らかに陽性と判定できる。レーン1, 2, 4, 5, 6, 10の6菌株は耐熱性溶血毒遺伝子を保有しないエルシニア, プロビデンシア及びtdh(-)腸炎ビブリオで、特異バンド以外の領域に多数のバンドが認められ、泳動法では明らかに陰性と判定できる。しかしピロリン酸法による呈色反応では吸光度が0.04以上を示し陽性と判定され、これが疑陽性の菌株である。

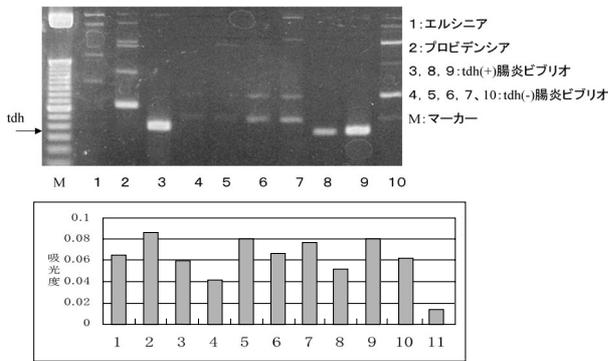


図1 VPDによる電気泳動画像とピロリン酸呈色

3.2 ピロリン酸法による食中毒菌等の鑑別

食中毒菌及びその他の菌20種について7種類のプライマーでPCRを行い、反応終末点の判定を泳動法及びピロリン酸法とで比較した。泳動法で特異バンドが認められピロリン酸法でも陽性を示すものを+, また両方法で陰性となったものを-, 疑陽性となったものを*で表わし、表3に示した。EVC, IPA及びSEAを用いた場合、ピロリン酸法では各々の遺伝子を保有する菌株のみが陽性を示した。しかし、それ以外のプライマーを用いた場合には疑陽性を示す菌株が観察された。VPDでエルシニア, プロビデンシア及びtdh(-)腸炎ビブリオが、STNでシトロバクター, エルシニアプロビデンシアおよびtdh(-)腸炎ビブリオが、INVでクレブシエラ, シトロバクター, エルシニア, プロテウス, プロビデンシアおよびtdh(-)腸炎ビブリオが、CPEでtdh(-)腸炎ビブリオがそれぞれ疑陽性を示した。

表3 ピロリン酸法による判定

菌種	プライマー						
	STN	VPD	CPE	EVC	INV	IPA	SEA
大腸菌	-	-	-	-	-	-	-
腸管出血性大腸菌	-	-	-	+	-	-	-
腸管侵入性大腸菌	-	-	-	-	+	+	-
エンテロバクター	-	-	-	-	-	-	-
クレブシエラ	-	-	-	-	-	-	-
シトロバクター	-	-	-	-	-	-	-
セラチア	-	-	-	-	-	-	-
エルシニア	*	*	-	-	*	-	-
プロテウス	*	-	-	-	-	-	-
プロビデンシア	*	*	-	-	-	-	-
サルモネラ	+	-	-	-	-	-	-
赤痢菌	-	-	-	-	+	+	-
tdh(-)腸炎ビブリオ	*	*	*	-	-	-	-
tdh(-)腸炎ビブリオ	-	+	-	-	-	-	-
ナグビブリオ	-	-	-	-	-	-	-
ビブリオ・パルニフィカス	-	*	-	-	-	-	-
エンテロトキシン(-)エルシ菌	NT	-	NT	NT	NT	NT	-
エンテロトキシン(-)エルシ菌	-	-	+	-	-	-	-
エンテロトキシンB・黄色ブドウ球菌	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-
エンテロトキシンB・黄色ブドウ球菌	-	-	-	-	-	-	+

+ : 陽性 - : 陰性 * : 疑陽性 NT : 測定せず

3.3 ピロリン酸法による検出感度

サルモネラ菌 (Salmonella Enteritidis) を $1.7 \times 10^8 \sim 10^0$ cells/ml まで10倍9段階の各濃度に希釈調整し、熱処理後テンプレート検体とした。STNを用い、増幅数を35回及び40回の各サイクル数でPCRを実施し、反応終了後、各々についてアンプリコンを泳動法で、ピロリン酸を呈色法で測定し、結果を図2に示した。

35サイクルでは 1.7×10^6 cell/ml以上の菌量でピロリン酸法での呈色が陽性に、また泳動法でも陽性を示した。40サイクルでは 1.7×10^4 cell/ml以上の濃度で両方法とも陽性を示した。

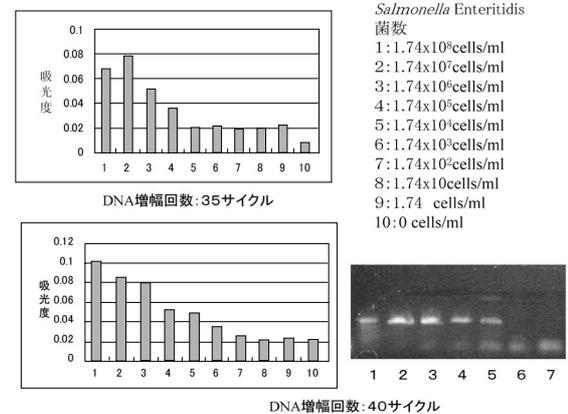


図2 菌数変化によるSTNでの電気泳動画像とピロリン酸呈色

次に 1.7×10^8 cells/mlの濃度に調整し熱処理したサルモネラ菌 (Salmonella Enteritidis) をテンプレートとしSTNでPCRを行った。DNA増幅数を10, 15, 20, 25, 30及び35回で反応を終了させ後、各々についてアンプリコンとピロリン酸を測定し、結果を図3に示した。増幅数が10~20回では両方法とも陰性であったが、25回以上では泳動法、ピロリン酸法とも陽性を示した。また同様の実験を菌量 1.7×10^5 cells/mlで行った場合でも、25回以上の増幅で両方法とも陽性を示した。

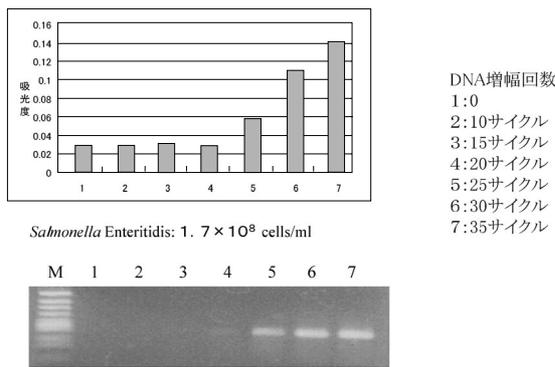


図3 増幅回数可変によるSTNでの電気泳動画像とピロリン酸呈色

4 考 察

PCR法において、反応の終末点は増幅されるアンプリコンを検出して判定する。しかし、PCR法では特異遺伝子が増幅されると共にピロリン酸が生成されることから、反応の終末点をピロリン酸の測定でも可能である。遠藤は、酵素を利用した新たなピロリン酸の測定法を開発した。そこで、7種類の食中毒菌病原遺伝子鑑別用プライマーを用い120種の食中毒菌等についてPCRを実施し、反応終末点を新たに開発したピロリン酸の測定法で判定し、その結果を通常用いる電気泳動法による判定と比較した。

検出対象とした特異遺伝子を保有する陽性菌株では、ピロリン酸法の判定結果は泳動法の結果と全く同じであった。一方、遺伝子を保有しない陰性菌株は、泳動法では全てが陰性であるが、ピロリン酸法ではVPD、STN及びCPE用のプライマーを用いた場合に疑陽性を示す菌株が認められた。特に、tdh(-)腸炎ピブリオは3種類いずれのプライマーにも非特異的に反応し、泳動法では非特異バンドを認めるものの、特定位置にバンドはなく陰性と判定はされるが、ピロリン酸法による呈色では陽性と判定された。しかし、このようなピロリン酸法で陰性株が陽性と判定される擬陽性はより特異性の高いプライマーを用いることで防止できると思われる。

次に食中毒菌の検出感度についての検討を $1.7 \times 10^8 \sim 10^0$ cells/mlの各濃度に調整したサルモネラ菌をテンプレートとしSTNプライマーでPCRを行い泳動法とピロ

リン酸法で判定を行った。その結果、泳動法での検出限界は 1.7×10^5 cells/mlで、また、ピロリン酸法でも同じ菌濃度以上で吸光度が0.04以上を示した。すなわち、この菌量が泳動法及びピロリン酸法での検出限界と思われる。検出限界の菌量をPCR反応チューブ当たりの菌量に換算すると 4.3×10 cellsであった。さらに、DNA増幅回数について比較した場合でもピロリン酸法と泳動法とでは同じ増幅回数以上で陽性と認められ、ピロリン酸法は泳動法と同程度の検出感度であることが示された。通常のPCR法ではアンプリコンの検出に発ガン物質・紫外線を用いるがピロリン酸法ではこれらを用いないことから泳動法より安全な方法であると考えられる。

最近、日本で開発されたLAMP法はDNA増幅を定温で行い、生成する大量のピロリン酸をピロリン酸マグネシウム塩に変え、濁りとして検出する方法である。LAMP法は、特異性の高い4種のプライマーを用いていることが大きな特徴で、増幅されるDNAの大きさは単一のサイズでない。このため、電気泳動では多数のバンドが観察され、生成DNAの特異性は泳動で容易に確認できず、また、生成DNAを直接シーケンス解析できない。一方、ピロリン酸法は呈色反応に用いる酵素、基質について検討すればLAMP法にも応用できる可能性もある。核酸増幅で生成されるDNAは単一であることから、直接シーケンス解析できる。

以上のことから、新たに開発したピロリン酸法はDNA増幅の終末点測定が安全かつ迅速に判定ができ、食品中の食中毒菌の鑑別に充分応用できると考えられた。

5 参 考 文 献

- 1) 納富継宣, 長谷哲: 次世代の遺伝子増幅法, 化学と工業, 第54巻 第6号, 674 - 676, 2001
- 2) Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, et al.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res., 28 : e 63, 2000
- 3) Nagamine, K., K. Watanabe : Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. Clinical Chemistry, 47 : 1742 - 1743, 2001
- 4) M. T. Endo: A colorimetric assay for inorganic pyrophosphate that is also useful for measuring product accumulation in polymerase chain reaction : Analytical Biochemistry 315, 170 - 174, 2003

ネコカリシウイルスを用いたマガキの浄化試験

The Depuration of *Feline calicivirus F4* by the Oysters, *Crassostrea gigas*

山本 紀彦 植木 洋 伊藤 大介*¹
文谷 俊雄*¹ 後藤 郁男 佐藤 千鶴子*²
渡邊 節 秋山 和夫

Norihiko YAMAKI, Yo UEKI, Daisuke ITOU
Toshio BUNYA, Ikuo GOTO, Chizuko SATO
Setsu WATANABE, Kazuo AKIYAMA

キーワード：小型球形ウイルス，ネコカリシウイルス，マガキ，取込試験，浄化試験

Key Words：Small Round Structured Virus, *Feline calicivirus F4*, Oysters, Investigation test, Depuration test

小型球形ウイルス (Small Round Structured Virus: SRSV) は培養細胞での増殖が確認されていない。そこでSRSVに替わる指標としてネコカリシウイルス (*Feline calicivirus F4*: FCV F4) を用いてマガキへの取込試験ならびに浄化試験を実施した。海水およびマガキのウイルス量は、ブラック法で行った。その結果、マガキのウイルス取込は、ウイルスとの接触開始1時間後に最も高いウイルス量を示し、その後、減少した。浄化試験では、砂ろ過海水で浄化開始72時間後、マガキで浄化96時間後でFCV F4が検出されないことが明らかになった。

1 はじめに

SRSVは、食中毒病因物質の一つとして知られており、生カキなどの二枚貝が推定原因食品¹⁾²⁾になる事例が多く食品衛生上問題となっている。宮城県を初めとするカキ生産県では、安全なカキを提供するために養殖カキのSRSV汚染防止やSRSVによって汚染された養殖カキの浄化対策に取り組んでいる。これまで、この一環の研究としてSRSVが培養細胞での増殖が不可能であることから、ポリオウイルスで浄化方法を検討した報告³⁾がある。

今回、SRSVと同じカリシウイルス科に属し培養可能で、しかも形態や紫外線、塩素等に対する抵抗性が類似しているFCV F4を用いて、海水中での挙動とマガキへの取込試験ならびに浄化試験を行ったので報告する。

2 材 料

2.1 供試ウイルス

1.90 × 10⁹ PFU/mlのFCV F4をCrandell's feline kidney cells (CrFK)に接種後、37℃, 48時間, CO₂インキュベーターで培養し、ウイルス量が10⁸ PFU/ml以上のFCV F4培養液をプールし、-80℃に保存し用いた。

2.2 マガキおよび海水

宮城県内のA湾内で2年間養殖されたマガキを宮城県水産研究開発センターで泥や付着物を殻から除去後、飼育水槽に入れ流水状態で2日間飼育し試験材料とした。なお、マガキの飼育、取込試験および浄化試験には砂ろ過海水を使用し、FCV F4に汚染されていないことを確認のうえ、試験に用いた。

3 方 法

取込試験および浄化試験は宮城県水産研究開発センター飼育棟で実施した。

3.1 取込試験 (図1)

取込試験は、2002年11月26日から30日まで5日間実施した。180 Lの砂ろ過海水が入った水槽1.80 × 10⁷個の植物プランクトン (*Chaetoceros gracilis*: Cg) を加え、ウイルス培養液1.95 × 10⁹ PFU/mlを2.4 L添加し、1時間後にマガキ60個体を入れた。水温は、養殖カキからSRSVの検出率が高くなる時期の海水温を想定し10℃に保ち、エアレーションを行いながら120時間取込を実施した。検体は経時的(0, 1, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120時間後)に海水1 Lとマガキ5個体を採取した。

なお、Cgは、実験室内での培養系も確立されている利点があることから用いた。Cgの添加量は、1985年に水産

* 1 宮城県水産研究開発センター

* 2 宮城県がんセンター

研究開発センターが実施した養殖海域の植物プランクトンの調査結果に基づいて決定し、水槽内を海域環境に近づけるため、24時間毎に加えた。

3.2 浄化試験 (図 1)

浄化試験は2003年3月16日から22日までの7日間実施した。マガキへのFCV F4の取込みは、上述の取込試験に従った。すなわち、水槽に180 Lの砂ろ過海水に 1.80×10^7 個のCgと 2.60×10^9 PFU/mlのウイルス培養液を4.2 L加え、1時間後にマガキを入れ、エアレーションを行

いながら水温を10 に保ち、12時間取込を行った。検体は経時的(0, 1, 6, 12時間後)に海水1 Lとマガキ5個体を採取した。浄化はFCV F4で12時間汚染したマガキを、180 Lの砂ろ過海水が入った新しい水槽に移し行った。砂ろ過海水の流量は、毎分1 Lに設定した。なお、水温は10 に保ちエアレーションも併行した。浄化の確認は、経時的(1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120時間後)に水槽の海水1 Lと浄化中のマガキ5個体を採取し、それぞれの検体からFCV F4を定量した。

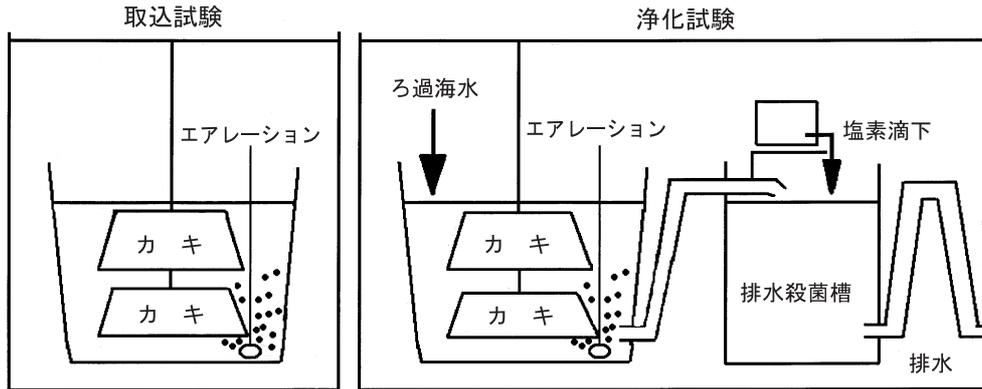


図 1 試験模式図

3.3 ウイルス濃縮法

採取した海水はPolyethylene Glycolを最終濃度が10%になるように加え、4 1 晩攪拌後10,000rpm30分間遠心し、沈渣をDW500 μ lで再浮遊し検体とした。また、マガキは個々に中腸腺を摘出し、-80 に1晩保存後、70 に暖めたDWを等量加え竹串で軽く破碎した。その後、10,000rpm20分間遠心した上清をさらに40,000rpm 2時間超遠心し、沈渣をDW500 μ lで再浮遊した。

3.4 プラック法⁴⁾

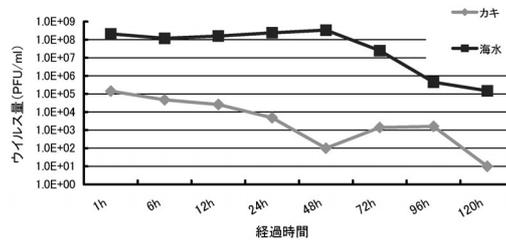
6穴プラスチックプレートで単層培養したCrFKに、採取した検体から抽出したFCV F4を2% -Globulin free Fetal Bovine Serumで10倍段階希釈の系列を作り、各希釈系列あたり100 μ lをそれぞれ2穴の細胞に接種し、37、90分、CO₂インキュベーターで吸着させた。その後メチルセルロースを3ml重層して37、48時間、CO₂インキュベーターで培養したのち、10%中性緩衝ホルマリン液で室温3時間固定後、メチレンブルーで染色し、プラック数を算定した。

4 結果及び考察

4.1 取込試験

経時的に採取した海水及びマガキのFCV F4の定量結果を図2に示した。海水では、1時間後 2.10×10^8 PFU/ml、6時間後 1.20×10^8 PFU/ml、48時間後 3.40×10^8 PFU/mlとほぼ同じウイルス量で推移した。72時間後には 2.50×10^7 PFU/mlとなり、120時間では 1.50×10^5 PFU/mlまで減少した。

次に、マガキ中腸腺での経時的FCV F4取込量は、各段階で採取した5個体の個々について定量し、その平均値で示した。取込開始1時間後には 1.44×10^5 PFU/mlと最も高いウイルス量であったが、6時間後 4.76×10^4 PFU/ml、12時間後 2.62×10^4 PFU/mlと緩やかに減少し、120時間後には 1.0×10^1 PFU/mlまでになった。この間、48時間後には一時 1.00×10^2 PFU/mlまで急激に下降したのち、72時間後には 1.40×10^3 PFU/mlまでに増加した。この原因は不明であるが、海水に白濁が観察されたことから殻表面やマガキの排泄物由来の微生物が関与した可能性も考えられた。



個体No.	経過時間							
	1h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	120h
1	2.50E+03	2.00E+04	5.00E+04	1.00E+02	5.00E+02	0.00E+00	2.50E+03	0.00E+00
2	0.00E+00	2.90E+04	7.00E+03	2.00E+01	0.00E+00	5.50E+03	5.00E+02	0.00E+00
3	2.00E+05	1.90E+04	3.60E+04	1.00E+03	0.00E+00	1.50E+03	2.00E+03	5.00E+01
4	4.70E+05	1.50E+05	1.50E+04	2.30E+04	0.00E+00	0.00E+00	1.50E+03	0.00E+00
5	4.70E+04	2.00E+04	2.30E+04	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.50E+03	0.00E+00
AVE	1.44E+05	4.76E+04	2.62E+04	4.82E+03	1.00E+02	1.40E+03	1.60E+03	1.00E+01
海水	2.10E+08	1.20E+08	1.60E+08	2.40E+08	3.40E+08	2.50E+07	4.50E+05	1.50E+05

図 2 取込試験におけるFCV F4の経時的変化

今回の取込試験は、カキの出荷の最盛期でかつSRSVの汚染頻度が高くなる時期の海水温に近い10℃で行った。また、マガキがSRSVで汚染される養殖海域の環境には、多数の植物プランクトンが生息していること、さらに、海水中でのウイルスの状態についての報告⁵⁾⁷⁾は少ないが、一般的に、ウイルス粒子が海水中に単一で浮遊していることは少なく、プランクトンなどと凝集塊を形成している可能性が疑われていることから、マガキの餌となるCgを24時間毎に添加して行った。その結果FCV F4は、海水中で長時間にわたり検出されていること、かつ、マガキ中腸腺には短時間で取り込まれることが明らかになった。

しかし、養殖海域におけるマガキのSRSVによる単一暴露は考えられず、冬期には常時ウイルスの汚染を受けている可能性が高いことから、今後、低濃度ウイルス量を用いた取込試験や再現性試験を行う必要がある。

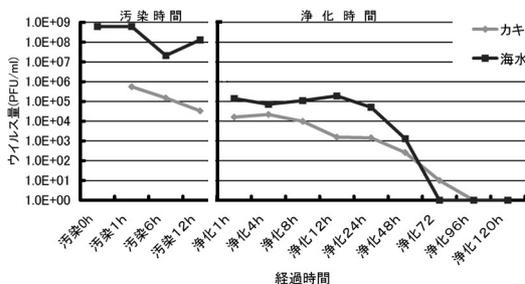
4.2 浄化試験

取込ならびに浄化試験の結果について図3に示した。マガキのウイルス量については、取込試験と同様に中腸腺5個の平均値で示した。取込試験での成績及び今井ら⁶⁾によるカキが餌を取り込んでから20時間で排泄を始めるとの知見を参考に12時間の取込で浄化試験を実施した。

なお、取込段階での海水のウイルス量は、マガキを入れる直前の0時間では 6.20×10^8 PFU/mlであり、取込開始12時間後には、 1.30×10^8 PFU/mlであった。また、マガキでは取込12時間後 3.32×10^4 PFU/mlであった。

カキ中腸腺におけるウイルス量は、浄化開始1時間後から8時間後まで 10^4 PFU/mlであったが、それ以降、時間の経過と共に減少し、48時間後には 2.60×10^2 PFU/ml、72時間後に 1.00×10^1 PFU/mlとなり、96時間後にウイルスは検出されなかった。

一方、海水においては、浄化開始1時間後 1.40×10^5 PFU/ml、4時間後 7.20×10^4 PFU/mlと24時間後まで 10^4 から 10^5 PFU/mlで推移し、浄化48時間後に 1.30×10^3 PFU/mlと減少、72時間後には検出されなかった。



経過時間	汚染0h	汚染1h	汚染6h	汚染12h					
カキ	0.0E+00	5.54E+05	1.51E+05	3.32E+04					
海水	6.2E+08	6.2E+08	2.1E+07	1.3E+08					
経過時間	浄化1h	浄化4h	浄化8h	浄化12h	浄化24h	浄化48h	浄化72h	浄化96h	浄化120h
カキ	1.62E+04	2.19E+04	9.80E+03	1.57E+03	1.45E+03	2.60E+02	1.00E+01	0.0E+00	0.0E+00
海水	1.4E+05	7.2E+04	1.1E+05	1.9E+05	5.1E+04	1.3E+03	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00

図3 浄化試験におけるFCV F4の経時的変化

中ら³⁾が行ったポリオウイルスを用いた浄化試験では、取込を48時間で行った場合は浄化開始6時間で浄化され、2週間にわたり取込みを行った場合は、長時間カキ体内から浄化されなかったと報告されている。

今回のFCV F4を用いた方法では、一度の取込で浄化を行ったにも拘わらず、72時間以上の浄化時間を要した。これが、FCV F4の性質に由来する現象なのか、今後、さらに回数を重ねて検討する必要がある。

5 まとめ

今回の取込試験および浄化試験では、FCV F4がSRSVの代替ウイルスとして有用であることが明らかとなった。これらの試験は、最終的にSRSVの浄化を前提に実施しており、今後は本ウイルスを用いて取込状態の再現性、より養殖環境に近い条件を想定し、取込や浄化方法について検討を加え、SRSVの浄化に有用な方法を構築していきたいと考えている。

6 謝辞

本試験を行うにあたり、貴重なFCV F4を分与していただいた、東京大学大学院獣医微生物学研究室 遠矢幸伸先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) 藤田満他: 食品衛生研究, 49(4), 123-130, 1999
- 2) 永安聖二他: Rep.Pub.Hlth.kochi, 47, 41-45, 2001
- 3) 中正純他: 食品衛生研究, 50(8), 97-103, 2000
- 4) S.Bidawid.et al: Journal of Virological Methods, 107, 163-167, 2003
- 5) Y.Yosida.et al: Ann.Rep.Tokyo.Metr.Res.Lab.P.H., 39, 49-53, 1988
- 6) 今井丈夫: 浅海完全養殖, 85-189, 1981, 恒星社厚生閣, 東京
- 7) 西香南子他: 三重県保健環境研究部年報, 46(3), 2001

輸入野菜・果実中の残留農薬及び県内産りんご，日本なしの無登録農薬残留実態

Investigation of Pesticides Residue in Imported Fruit and Vegetables, and Unregistered Pesticides Residue in Apples and Pears

氏家 愛子 長船 達也 曾根 美千代
大江 浩*1

Aiko UJIIE, Tatsuya OSAFUNE, Michiyo SONE
Hiroshi OOE

キーワード：残留農薬，無登録農薬，輸入野菜，カプタホール，
シヘキサチン，1-ナフチル酢酸

Key Word : Pesticides Residue, Unregistered Pesticides Residue, Imported Vegetables,
Captafol, Cyhexatin, NAA

中国産冷凍ほうれん草に基準値以上のクロルピリホスの残留が検出され，厚生労働省の検査等の対応が強化される中，その後も輸入生鮮・冷凍野菜の残留農薬基準値違反が相次いだ。県内に流通する輸入野菜について買い上げ調査を実施したところ，約30種類の農薬が検出され，その約半数が有機リン系及びピレスロイド系の殺虫剤であった。中でも，中国産生姜に0.24ppmのBHC（生姜に基準設定はないが，基準設定がある49作物の基準値は0.2ppm）が，中国産ライチに0.09ppmのメタミドホスが（基準値：0.1ppm）検出された。

また，無登録農薬については，ダイホルタン，プリクトラン，ナフサクの県内での使用が明らかになったため，生産農家の出荷前及び県内流通品のりんご及び日本なしの残留農薬分析を実施した。この結果，調査した全ての検体でダイホルタン，プリクトラン，ナフサクは検出されなかった。

1 はじめに

輸入野菜中の残留農薬については，中国産冷凍ほうれん草に基準値以上のクロルピリホスの検出が相次ぎ，厚生労働省の検査及び廃棄命令等の対応が強化された。2000年の民間食品分析センターの調査では，種々の輸入野菜だけではなくベビーフードやファストフードなどの加工品でも検出されたことを報告している¹⁾。当所においても，行政検査で実施した冷凍ほうれん草に，基準値未満のピレスロイド系殺虫剤シベルメトリンが検出された。表1に示す全国の検疫所における輸入品違反データ²⁾のとおり，中国産を始めとする輸入野菜等の違反はその後とも継続していたため，宮城県内に流通する輸入野菜・果実中の残留農薬濃度の実態把握を目的として，市場での買い上げによる調査を実施した。また，無登録農薬使用については，山形県産ラ・フランスにダイホルタンが検出されたことを契機に全国的な問題に波及し，14年8月には宮城県でも表2に示す無登録農薬の購入・使用農家が確認された。このような状況に速やかに対応するため，8月下旬～9月上旬に県内生産農家のりんご・日本なし及び市場流通品のりんご・日本なしの残留無登録農薬について検査を実施した。また，残留無登録農薬のナフサクについては，分析方法を検討したので結果と併せて報告する。

*1 現 環境生活部生活衛生課

表1 輸入野菜等の残留農薬違反件数

2002.6～2003.3

農薬名	件数	生産国	品名
1 エトプロホス	1	韓国	パプリカ
2 クロルピリホス	110	中国，タイ，韓国 台湾，フィリピン アメリカ	冷凍：ほうれん草，春菊，ニラ，枝豆他 生鮮：レモングラス，メボウキ，しそ，せり， セロリ他
3 ジクロルボス	4	中国，韓国	パプリカ，松茸
4 パラチオンメチル	4	タイ，中国	セロリ，コブミカン他
5 ビリミホスメチル	2	ドイツ，アメリカ	ライ麦，ポップコーン
6 フェニトロチオン	1	オーストラリア	とうもろこし
7 マラチオン	3	オーストラリア， インド	ブルーベリー，うるち精米
8 シベルメトリン	42	中国，タイ，韓国	さやえんどう，ケール他
9 フェンバレート	20	中国，アメリカ	しそ，さやえんどう他
10 ヘルメトリン	5	アメリカ	ほうれん草
11 ダミノジット	13	中国	落花生

出典：仙台検疫所ホームページから抜粋

表2 宮城県内で購入・使用のあった無登録農薬

商品名	シヘキサチン	1-ナフチル酢酸	カプタホール	ダミノジット	アバメクチン
	プリクトラン	ナフサク ヒオモン	ダイホルタン	ビーサイン アラ	アビド
登録年	1972年	1964年	1964年	1965年	なし
失効年	1987年	1976年	1989年	1989年(花OK)	
用途	殺虫剤 殺ダニ剤	成長調整剤	殺菌剤	成長調整剤	殺虫剤 防ダニ剤
魚毒性	C	A	C	A	
ADI (mg/kg/d)	設定できず		設定できず	設定できず	
残留基準	N D	なし	N D	N D	なし
検出限界	0.02ppm		0.01ppm	0.1ppm	
発ガン性					

国内では，PCNB，PCP等，全部で10種類

2 方 法

2.1 調査対象品目及び対象農薬

輸入野菜・果実中の残留農薬調査は、表3に示す15検体について、GC/MSによる78種の農薬一斉分析を行った。無登録農薬残留調査は、生産農家及び市場流通品のりんご26検体、日本なし8検体について、カプタホール(ダイホルタン)、シヘキサチン(プリクトラン)及び1-ナフチル酢酸(ナフサク)の分析を行った。

2.2 分析方法

2.2.1 装置

GC : HP5890, FPD検出器

LC : 島津Class LC 10, ポストカラム用ポンプ, 蛍光検出器

GC / MS : HP6890 / HP5973

カラム : GC用 ; HP Ultra (25m x 0.2mm φ 33 μm)

GC / MS用 ; HP 5MS (30m x 0.25mm φ 25 μm)

LC用 ; TSKgel ODS - 80Ts (15cm x 4.6mm), 東ソー(株)製

2.2.2 試薬等

農薬標準品 : 残留農薬試験用

抽出用有機溶媒 : 残留農薬分析用300

HPLC移動相用有機溶媒 : HPLC用

塩化ナトリウム : 残留農薬分析用

リン酸, 炭酸ナトリウム, 水酸化カリウム, 硫酸, : 試薬特級

0.5mol - リン酸二水素テトラブチルアンモニウム溶液 : HPLC用

エチルマグネシウムブロミド : 東京化成工業(株)製

スペリクリンENVI-Carb : SUPELCO製

2.2.3 試料液調整等

輸入残留農薬分析は、試料20gをアセトニトリル抽出、塩析、Bond Elut SAX/PSA精製後、GC/MSにより標準添加法で定量を行った。枝豆等の色素の多い検体は、図1に示すとおり、色素を除去する目的でEnvicarb 2gを試料に添加しトルエン/アセトン(30/70)で抽出を行った。

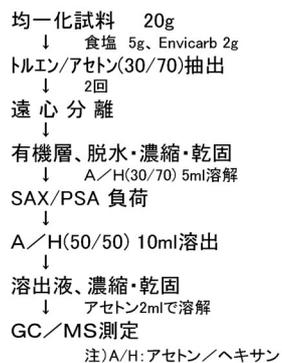


図1 輸入野菜等分析方法 (枝豆等色素の多い野菜)

表3 輸入野菜・果実検査対象品目

		製 品 名	生 産 地
生 鮮 野 菜 ・ 果 実		し ろ ね ぎ	中 国
		バ ブ リ カ	韓 国
		に ん に く の 芽	中 国
		は み う り	中 国
		し ょ う が A	中 国
		し ょ う が B	中 国
水 煮		アメリカンチェリー	ア メ リ カ
		細切りたけのこ	タ イ
冷 凍		た け の こ	中 国
		い ん げ ん	台 湾
		茶 豆	台 湾
		枝 豆	台 湾
		ラ イ チ	中 国
		ラ ス ベ リ ー	カ ナ ダ
	ブ ル ー ベ リ ー	ア メ リ カ	

また、無登録農薬のカプタホール及びシヘキサチンは公定法³⁾に準じて定量を行った。1-ナフチル酢酸は志賀⁴⁾らの方法に準じて抽出したが、HPLC条件については、志賀らの方法ではリテンションタイムが非常に早いところに出てしまい、りんご等の妨害成分と重なるため定量ができなかった。そこでHPLC条件の検討を行い、移動相にイオンペア試薬を用いた0.5%リン酸/メタノールのグラジュエント分析により、図2に示す方法で定量を行った。1-ナフチル酢酸のクロマトグラムを図3に示す。

2.3 標準添加回収率

各検体に各農薬定量下限値の5倍量の標準品を添加し、回収試験を行った結果を図4に示す。輸入野菜等の回収率は、分析対象と同じマトリックス抽出液で標準混合溶液を希釈調整した1点検量線でも求めた。この結果、概ね、60~120%の回収率が得られたが、アセフェート、キノメチオネートは全検体で、また、アミトラズ、チオメトン、メタミドホス、シハロトリンも多くの検体で回収率が許容範囲外であったため定量ができなかった。中でも、生姜はマトリックスによる妨害が大きく、一斉分析法では約60種の農薬のみ定量可能であった。

無登録農薬の回収率は、カプタホールが平均120%、シヘキサチンが平均95%、1-ナフチル酢酸が平均85%であった。カプタホールは、標準溶液をマトリックスではなくアセトンで希釈調整したため、マトリックスによる

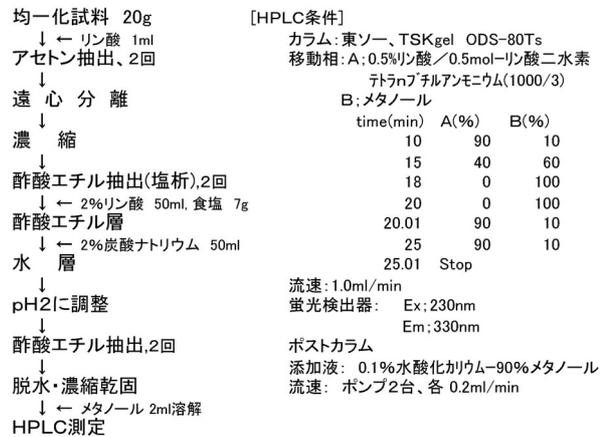


図2 1-ナフチル酢酸の分析方法

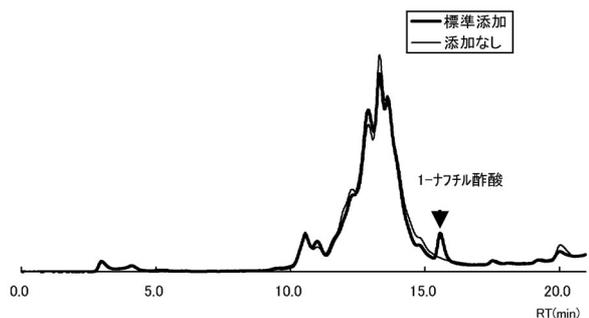


図3 1-ナフチル酢酸のクロマトグラム(りんご)

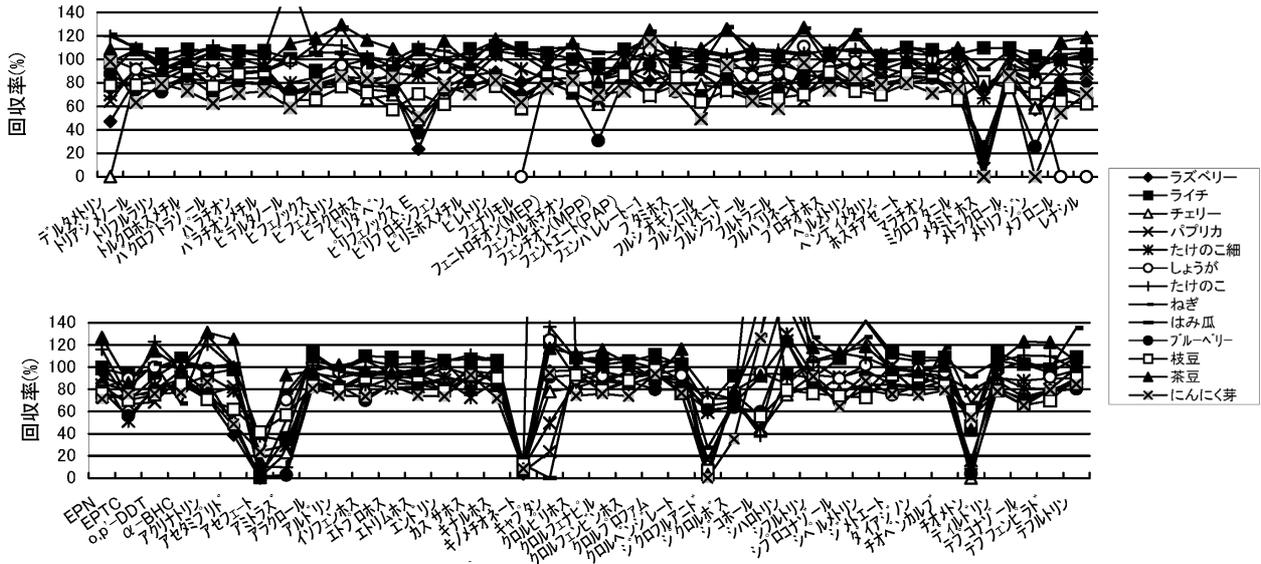


図4 輸入野菜等の標準添加回収率

増感作用により120%と高めの回収率が出たものと考えられる。

3 結果

3.1 輸入野菜・果実中の残留農薬

定量下限値以上検出された農薬を品目別に図5に示す。10種類の農薬のうち、殺菌剤のフルジオキシニルを除く9種の農薬は全て殺虫剤であり、クロルピリホス等有機リン系4種、シベルメトリン等ピレスロイド系3種、BHC等塩素系2種であった。BHCは、日本での登録は1971年に抹消されているが、土壤中の残留性が大で、発癌性、環境ホルモン作用が疑われている農薬⁵⁾である。BHCは中国産生姜に0.24ppm検出されたが、食品衛生法の成分規格基準に、生姜のBHC残留基準値は設定されていない。従って、違反ではないものの、白菜等49作物のBHC基準値はいずれも0.2ppmであり、これらの基準値と同程度の濃度であった。また、メタミドホスは、日本では無登録の農薬であるが、登録農薬のアセフェートの代謝物として検出されるため、食品衛生法で残留基準が設定されている。メタミドホスも基準違反ではないが、中国産ライチ及び台湾産茶豆に0.09ppm(残留基準値:ライチ; 0.1ppm, 茶豆; 設定なし)検出された。また、図中の他8農薬は、基準値に比べ1/800~1/10と低い濃度であったが、ジメトエート及びジコホールの2農薬には発癌性が、クロルピリホス等5農薬には環境ホルモン作用が疑われている⁵⁾。

次に、表4に、定量下限値未満ではあるが、GC/MSで定量イオン・確認イオンが検出された農薬一覧を示す。DDT等14種の殺虫剤、ミクロブタニル等5種の殺菌剤、アラクロール等4種の除草剤、合計23種の農薬が定量下限値未満で微量検出・同定された。図5の定量された農薬と合わせると30種類の農薬が検出されており、殺虫剤

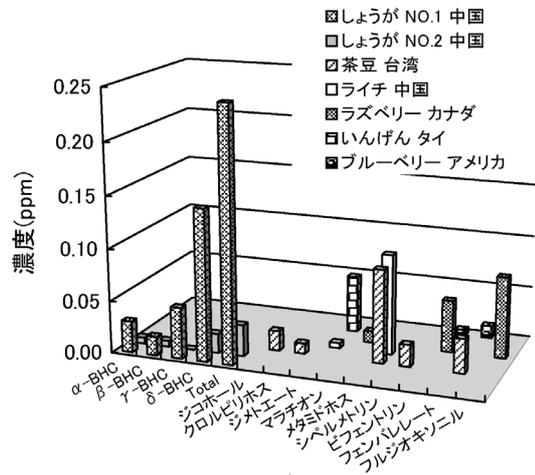


図5 検出農薬

が20種類、殺菌剤が6種類、除草剤が4種類で全体の2/3を殺虫剤が占めている。

また、微量ながら検出農薬の種類の多い作物は、中国産生姜(8農薬)、台湾産茶豆(9農薬)、アメリカ産ブルーベリー(13農薬)、カナダ産ラズベリー(5農薬)であった。生鮮野菜のにんにくの芽及びはみ瓜、タケノコ水煮、冷凍枝豆には残留農薬は検出されなかった。

3.2 りんご・日本なし中の残留無登録農薬

りんご及び日本なし中の無登録農薬分析結果を表5に示す。

カプタホール(ダイホルタン)は、りんご等の黒星病等の殺菌剤、シヘキサチン(プリクトラン)はりんご、日本なし等のハダニ類に対する殺ダニ剤、1-ナフチル酢酸(ナフサク)は、りんご、日本なし等の落果防止剤として使用された。今回、生産農家の出荷前のりんご及び日本なしについて、シヘキサチン、1-ナフチル酢酸の残留濃度の検査を行ったが、対象26検体全てに検出され

なかった。また、市場流通品の他県産を含めたりんご及び日本なしの買い上げ調査でも、対象8検体にカプタホール、シヘキサチンは検出されなかった。

4 ま と め

- 1) 県内市場流通品の輸入野菜・果実中に残留する農薬を検査した結果、残留基準値を超過したものはなかった。しかし、中国産生姜にBHCが0.24ppm、中国産ライチにメタミドホスが0.09ppm(基準値:0.1ppm)検出された。
- 2) 輸入野菜・果実に微量ながら検出された農薬は30種類

類であり、その2/3は有機リン系及びピレスロイド系を主とした殺虫剤であった。

- 3) 1-ナフチル酢酸は、移動相にイオンペア試薬(0.5mol-リン酸二水素テトラブチルアンモニウム溶液)を用いた0.5%-リン酸/メタノールのHPLCグラジュエント分析で、マトリックスによる妨害を受けずに定量することができた。
- 4) 無登録農薬カプタホール、シヘキサチン、1-ナフチル酢酸は、購入使用した生産農家のりんご及び日本なしの26検体、及び市場流通品のりんご、梨の8検体全てに検出されなかった。

表4 輸入野菜・果実中の検出農薬(定量下限値未満)

用途	種類	品名 生産国 農薬名	生 鮮 野 菜				冷 凍 野 菜 ・ 果 実						定 量 下 限 値 (ppm)	
			しょうが		パプリカ	しるねぎ	茶 豆	ライチ	ラベリズ	いんげん	アメリカン チェリー	ブルニ		
			1	2										
殺虫剤(16)	Py	シハロトリン												0.01
	Py	シベルメトリン												0.02
	Py	ピフェントリン												0.01
	P	アセフェート												0.05
	P	キナルホス												0.01
	P	ジメトエート												0.01
	P	ダイアジノン												0.01
	P	パラチオン												0.01
	P	ピリミホスメチル												0.01
	P	フェントロチオン												0.01
	P	プロチオホス												0.01
	N	ピリプロキシフェン												0.05
	Cl	o,p'-DDT												0.005
	Cl	p,p'-DDD												0.005
	Cl	p,p'-DDE												0.005
	N	テブフェンピラド												0.02
殺菌剤(5)	P	トルクロホスメチル												0.02
	N	フェナリモル												0.02
	N	フルトラニル												0.025
	N	ミクロブタニル												0.02
	Cl	キャプタン												0.005
除草剤(4)	N	アラクロール												0.005
	N	チオベンカルブ												0.02
	N	ペンディメタリン												0.005
	N	メトラクロール												0.005

Cl: 塩素系農薬 P: リン系農薬 N: 窒素系農薬 Py: ピレスロイド系農薬

表5 無登録農薬分析結果

種類	品目	シヘキサチン		1-ナフチル酢酸		カプタホール	
		りんご	日本なし	りんご	日本なし	りんご	日本なし
		生産地					
生産農家	A 町			ND(2)	ND(3)		
	B 町	ND(3)		ND(9)			
	C 町			ND(6)			
	D 市	ND(2)	ND(1)				
流通品	宮城県産	ND(2)	ND(1)			ND(2)	ND(1)
	山形県産	ND(2)				ND(2)	
	福島県産		ND(2)				ND(2)
	茨城県産		ND(1)				ND(1)
検査数	4	4	17	3	4	4	
検査合計	9	5	17	3	4	4	

()内数値は、検体数。

参 考 文 献

- 1) (財)みやぎ・環境とくらしネットワーク他: シンポジウム「食の安全を問う」講演要旨集, p8, 平成14年11月27日
- 2) 仙台検疫所ホームページ <http://www1.odn.ne.jp/sendai-keneki/>, 輸入食品, 違反事例情報
- 3) 食品衛生小六法, 平成15年度版, p653, p691, 新日本法規(2002)
- 4) 志賀直史ほか, 日本農薬学会誌, 1, p231-234(1976)
- 5) 植村振作ほか著: 農薬毒性の辞典改訂版, 三省堂(2002)

遺伝子組換え食品検知法の検討

A Study of Detection Method of Recombinant DNA in Genetically Modified Foods

曽根 美千代 高橋 紀世子 大江 浩¹

Michiyo SONE, Kiseko TAKAHASHI, Hiroshi OOE

キーワード：遺伝子組換え食品，定性PCR，DNA抽出，加工食品

Key Words : Genetically Modified Foods , Qualitative PCR , DNAextraction , Processed Foods

大豆及びその加工品，じゃがいも加工品を対象に前処理及びDNA抽出方法等について検討を行った。その結果，PCR実施時ミネラルオイルを重層することにより，片栗粉を除く全検体から安定して内在遺伝子を検出できた。加工品から抽出されたDNAの電気泳動結果から，シリカゲル膜法はCTAB法に比べDNA抽出量が少ないが，短鎖域DNAの抽出割合は少なく，PCRによる目的のDNA配列の検出に有利であると思われた。

1 はじめに

平成13年4月より，食品衛生法上安全性未審査の遺伝子組換え食品及びこれを用いた食品の輸入・販売が禁止，安全性審査済みの5品目（大豆，とうもろこし，じゃがいも，菜種，綿実）については表示が義務づけられている。国では，公定法として平成13年3月に厚生労働省通知¹⁾及び平成13年4月に(独)農林水産消費技術センターの「JAS分析試験ハンドブック」²⁾を示し，それぞれ順次改訂を行っている。

渡邉ら³⁾は，平成13年度に本県県内流通加工品のモニタリング検査を開始するとともに，大豆粉末，豆腐，トウモロコシ粉末及びスナック菓子を対象に定性PCR法による遺伝子組換え食品の検査について検討を行い，DNA抽出におけるシリカゲル膜法の有用性やスナック菓子の前処理におけるエーテル洗浄効果を報告した。

そこで今年度は，大豆及びその加工品，じゃがいも加工品を対象に試料の前処理とDNA抽出量の関係，DNA抽出液の電気泳動像の解析やPCRのパラッキ原因等基礎的な検討を行ったので報告する。

2 分析試料および試薬・機器

2.1 試料

- ・大豆1件及び大豆加工品17件（豆腐13件，凍り豆腐1件，きな粉1件，黒豆きな粉1件，大豆缶詰1件）
- ・じゃがいも加工品15件（片栗粉1件，マッシュポテト3件，スナック菓子（ポテトチップ含む）11件）
- ・遺伝子組換え大豆（ラウンドアップレディ）混入大豆粉末（平成13年度厚生科学研究試料）

* 1 現 生活衛生課

2.2 試薬

（抽出用）

- ・CTAB法：分子生物学用および試薬特級
- ・シリカゲル膜法：DNeasy plant mini kit（以下mini kit）（Quiagen）DNeasy plant maxi kit（以下Maxi kit）（Quiagen）（PCR用）
- ・Ampli Taq Gold&10×Gold buffer with dNTP（Applied Biosystems）
- ・大豆プライマー 対照用：Le1-n02 検出用：RRS - 01 確認用：P35S - 1
- ・ジャガイモプライマー 対照用：Pss 検出用：New leaf Y 検出用 確認用：Pvy-cp遺伝子検出用（各プライマーともニッポンジーン）（電気泳動用）
- ・アガロースS，エチジウムブロミド溶液（各々ニッポンジーン）
- ・DNAマーカー：50 Ladder（インビトロジェン），-Hind（BioLabs）
- ・その他試薬特級

2.3 機器

- ・サーマルサイクラー：ABI 9700（Applied Biosystems）
- ・電気泳動装置：Mupid - 21（アドバンス）

3 方法

3.1 前処理

大豆および凍り豆腐はグラインダーで粉末状に破碎後，一部をふるいにかけて，48mesh以上，48～100mesh，100～150meshの各々の粒径ごとに分取した。

豆腐は流水で軽く洗浄後ビニール袋に入れ手で均一に

押しつぶし、未処理、遠心分離後上清除去、滅菌ミリQ水で1回洗浄後上清除去、滅菌ミリQ水で2回洗浄後上清除去、凍結後遠心分離上清除去、凍結後滅菌ミリQ水で1回洗浄後上清除去、凍結後滅菌ミリQ水で2回洗浄後上清除去の7種類の前処理を行った。

大豆缶詰はフードカッターでペースト状にした。マッシュポテト、スナック菓子はビニール袋に入れ木槌で破碎した。スナック菓子の一部は、フードミキサーで破碎し、その一部を滅菌ミリQ水で洗浄後上清を除去した。きなこ、黒豆きなこ、片栗粉についてはそのまま使用した。

3.2 DNA抽出

公定法で使用する15ml、50mlチューブでの操作は作業効率が悪く、また現在所有する遠心機では十分な遠心力を与えられない。そこで試料採取量及び使用する試薬量等をスケールダウンし、その後の分離液も全量使用するなど、全行程を2mlマイクロチューブで実施できるようにマニュアルを変更した(図1)。なお、DNA抽出は1試料につき2点並行して実施した。

DNA濃度及びDNA純度の算出については、公定法に準じた。

3.3 PCR

PCR反応液は、PCR緩衝液をPCR Gold緩衝液に、MgCl₂の濃度を3.0mMから1.5mMに変更し、反応条件、その他については公定法に準じた。

大豆及びその加工品については、ラウンドアップレディ大豆を対象とし、検出用プライマーとしてRRS-01、確認用プライマーとしてP35S-1を用いた。ジャガイモ

加工品についてはNew leaf Yジャガイモを対象とし、プライマーは公定法に準じた。

3.4 電気泳動

PCR後、TBE緩衝液と3%アガロースゲルを用いて100V定電圧で電気泳動を行い、エチジウムブロミド液で染色し、その後蒸留水で軽く洗浄し、トランスイルミネーターにゲルをのせ、ポラロイドカメラによりDNAを確認した。DNAマーカーは50 Ladder(インビトロジェン)を用いた。

また、抽出したDNA原液について、TBE緩衝液と0.8%アガロースゲルを用い100V定電圧で電気泳動を行い、エチジウムブロミド液で染色し、その後蒸留水で軽く洗浄し、トランスイルミネーターにゲルをのせ、ポラロイドカメラによりDNAパターンを確認した⁴⁾。DNAマーカーは-Hind (BioLabs)を用いた。

4 結果及び考察

4.1 PCRのバラツキ

同じ試料を用いた繰り返し実験において、内在遺伝子の電気泳動像の検出バンドの濃淡が大きく変動する傾向が見られた(図2左)。PCR後のチューブを詳細に観察すると、チューブ内壁に微細な水滴が多数見られた。本法では反応液量が25µlと微量なため極少量の水分の蒸発がPCR増幅に影響し、バラツキの原因になったものと思われる。また、使用するPCRチューブの構造がメーカーにより微妙に違うためヒートブロックへの密着性が異なり、PCR増幅に影響したことも考えられた。

< CTAB法 >



< シリカゲル膜法(大豆およびその加工品) >



< シリカゲル膜法(ジャガイモ加工品) >

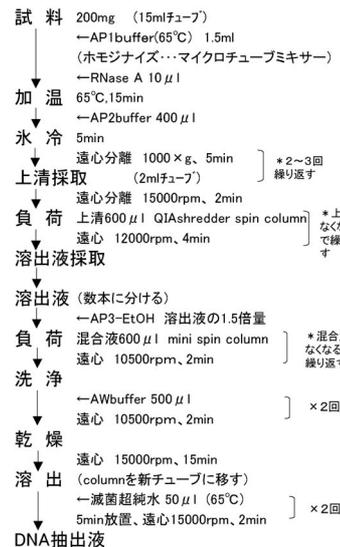


図1 DNA抽出法

このような水分蒸発を防止するために従来よりミネラルオイルを重層する方法がある。使用したサーマルサイクラーは上蓋も加熱するタイプであるため、通常ミネラルオイル重層は必要ないと考えられたが、今回、水分の蒸発が認められたことから、ミネラルオイル重層を適用したところPCR増幅が改善され、同一検体による電気泳動像の濃淡のバラツキもなくなった(図2右)。これにより、DNAが抽出された全検体について内在遺伝子の確認を安定して行うことができた。

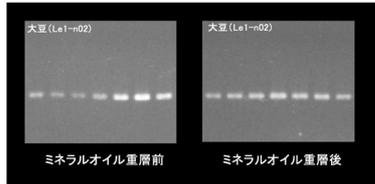


図2 PCRのバラツキの改善

なお、ゲルを電気泳動後エチジウムブロミド液で染色した後に蒸留水で洗浄することにより、染色液が除かれ明瞭な泳動像が得られた。

4.2 前処理

4.2.1 試料の粒径とDNA抽出量

国の通知によるELISA法では、試料の粉碎を粒径100mesh以下としているが、PCR法ではDNA抽出における試料粒径等の詳細な記述はない。効率よく抽出するためには粒径を小さくすることが有利と考え、試料の粒径とDNA抽出量について検討した。

ふるいを掛けないものを100%として粒径ごとのDNA抽出量を比較した(図3-1)。図から、CTAB法では大豆の粒径が小さくなるにつれ抽出量が120~130%と増加した。しかし、シリカゲル膜(mini kit)法では、48~

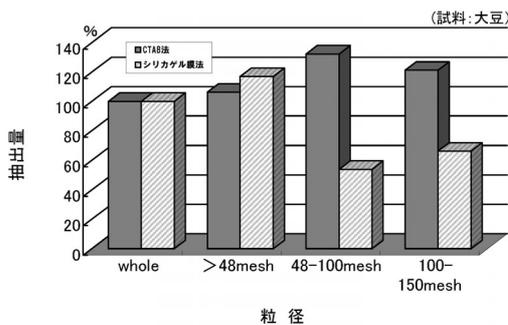


図3-1 DNA抽出量①(抽出法別)

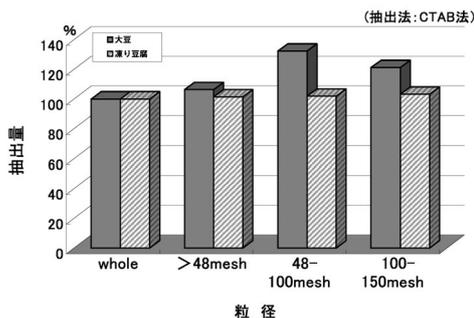


図3-2 DNA抽出量②(製品別)

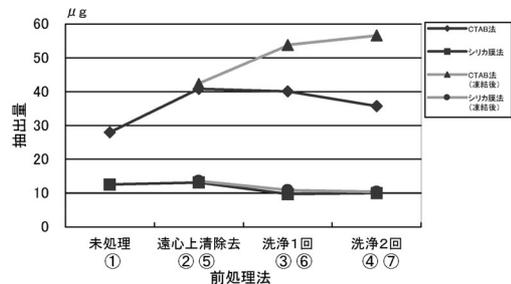
100mesh以下の粒径で60%前後に減少した。シリカゲル膜法の場合、この粒径の試料はAP3/EtOHの添加でゲル化し、ミニカラムに負荷した際、カラム上部にゲルが残り、シリカゲル膜まで抽出液が到達できないため、結果としてシリカゲル膜への吸着量が少なかったものと考えられた。

一方、加工品(凍り豆腐)については、CTAB法では粒径による差はなかった。これは、一度豆乳に加工されたものは均一化されており影響を受けないためと考えられた(図3-2)。従って、粉碎は48mesh程度で十分に抽出が可能であると考えられる。

4.2.2 豆腐の洗浄効果

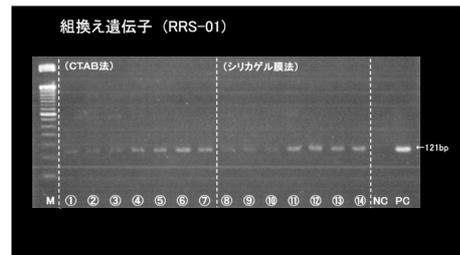
PCRに影響を与える恐れのある「にがり」等を除去するため、前処理として豆腐を押しつぶした後の洗浄(3.1に示す7種類)について検討した。図4には、それぞれ洗浄後のCTAB法、シリカゲル膜法によるDNA抽出量を示した。CTAB法では、未処理が最も少なく、洗浄遠心でより幾分増加したものの、凍結遠心、凍結洗浄遠心では明らかにDNA抽出量が増加した。これは凍結後の遠心で水分がより多く除去されたため、見かけ上DNA抽出量が増加したものと思われた。

一方、シリカゲル膜法では約10µgで洗浄による差がなかった。また、抽出されたDNAに対して行われたPCRの結果は、両方法とも2回以上洗浄したもの(図5の ~)で組換え遺伝子の電気泳動像が明瞭となった。



①未処理 ②遠心分離後上清除去 ③滅菌ミリQ水で1回洗浄後上清除去 ④滅菌ミリQ水で2回洗浄後上清除去 ⑤凍結後遠心分離上清除去 ⑥凍結後滅菌ミリQ水で1回洗浄後上清除去 ⑦凍結後滅菌ミリQ水で2回洗浄後上清除去

図4 豆腐の前処理別DNA抽出量



M: maker ① CTAB法未処理 ② CTAB法遠心上清除去 ③ CTAB法2回洗浄上清除去 ④ CTAB法2回洗浄上清除去 ⑤ CTAB法凍結遠心上清除去 ⑥ CTAB法凍結1回洗浄上清除去 ⑦ CTAB法凍結2回洗浄上清除去 ⑧ シリカゲル膜法未処理 ⑨ シリカゲル膜法遠心上清除去 ⑩ シリカゲル膜法1回洗浄上清除去 ⑪ シリカゲル膜法2回洗浄上清除去 ⑫ シリカゲル膜法凍結遠心上清除去 ⑬ シリカゲル膜法凍結1回洗浄上清除去 ⑭ シリカゲル膜法凍結2回洗浄上清除去 NC: Negative control PC: Positive control

図5 豆腐の前処理別PCR結果

また、豆腐の製造工程で「にがり」として使用されるMg及びCa濃度を測定したが、両抽出法ともDNA抽出液中のMg濃度は1 ppm以下(表1)であり、PCR時に添加するMgCl₂の濃度に比べ無視できるものであると考えられた。

表1 豆腐洗液等のMgCa濃度

	Mg(ppm)	Ca(ppm)
豆腐浸漬液	155	246
遠心後上清液	101	132
1回洗浄上清液	101	127
2回洗浄上清液	36	36
CTAB法抽出液	< 1	4
シリカゲル膜法抽出液	< 1	6

4.2.3 その他の加工品

片栗粉は、加温操作の過程で糊状になり、十分なDNAの抽出ができなかった。スナック菓子は、油分については加温の際分離されるため除去でき、また洗浄、フードミキサーによる粉碎の前処理による差は見られなかったが、前処理の検討に使用したスナック菓子が塩分のみ使用していたことと豆腐の洗浄効果から考えると、添加物が多いものについては湯洗浄等が必要だと思われる。

4.3 加工品から抽出されたDNA(抽出量と電気泳動像)

大豆および大豆加工品、じゃがいも加工品のDNA抽出量を表2に示した。片栗粉を除き、試料採取等のスケールダウンを検討した方法でもDNAは十分量抽出でき、DNA純度も1.55~2.11と満足する結果が得られた。また、抽出方法の違いによるDNA抽出量は、きな粉類を除きCTAB法のほうがシリカゲル膜法に比べ2~10倍多かった。

大豆加工品のDNA抽出原液の電気泳動像を図6に示す。

加工品の製品による違いを比較すると、CTAB法及びシリカゲル膜法でほぼ同様な傾向が見られる。すなわち、加工されていない大豆はDNAの断片化は見られず長鎖側に太い一本のバンドとして確認できる。また、高温高压で加工されるきな粉や大豆缶詰はDNAが小さく断片化し短鎖側に短いスメア状の泳動像として確認できる。一方、70~100 程度で加熱加工される豆腐は凍り豆腐やきな粉、黒豆きな粉、大豆缶詰に比べDNAの断片化は少なく、比較的長鎖側のスメア状の泳動像が得られる。このように、DNA抽出原液の電気泳動像の違いにより加工品のDNA断片化(分解)の程度が推定でき、抽出されたDNAの評価指標の一つになるものと思われる。また、これらの加熱加工によるDNAの断片化は松岡らの納豆で検討した報告⁵⁾と同様の結果であった。

一方、抽出法による電気泳動像の違いについて比較すると、豆腐と黒豆きな粉については、CTAB法で長鎖域から短鎖域まで広範囲に分布しているのに対し、同試料

のシリカゲル膜法では、短鎖域、長鎖域それぞれで狭い範囲に分布しており、明らかに異なる。また、凍り豆腐と大豆缶詰については、分析に供したDNA量の違いが大きく明確ではないが、豆腐等と同様にシリカゲル膜法で短鎖域及び長鎖域のDNAの割合が少ないように見える。

従って、細かく断片化した短鎖域のDNAの割合はシリカゲル膜法よりCTAB法で多いと考えられ、相対的に標的配列域のDNA濃度が低くなると思われる。また、テンプレートとして使用するDNAは10ng/μlに濃度調整するため、短鎖域を含んだ抽出量の多さは相対的に希釈率を高め、目的の組換え遺伝子のPCRにうまく反映されにくいものと考えられる。以上のことから、DNA抽出法としてはシリカゲル膜法がより適していると考えられる。

図7は、シリカゲル膜法で抽出した加工品のPCR後の内在遺伝子の電気泳動像であるが、片栗粉を除く全検体で内在遺伝子が確認できた。

表2 大豆及び各加工品からのDNA抽出量

	CTAB法		シリカゲル膜法	
	抽出量(μg)	純度	抽出量(μg)	純度
大豆(50mg)	9.6~23	1.78~1.94		
大豆(200mg)	28~84	1.89~2.00	4.9~13	1.82~2.11
豆腐	13~36	1.78~1.92	5.0~11	1.78~1.93
凍り豆腐	110~180	1.72~1.90	24~51	1.89~1.92
きな粉	11~29	1.83~1.90	24~28	1.82~1.83
黒豆きな粉	22	1.88	18~20	1.8
大豆缶詰	38~43	1.92	2.3~2.6	1.55~1.86
片栗粉			0~0.3	1.67~6.00
マッシュポテト			1.2~2.4	1.88~2.10
スナック菓子			1.6~7.7	1.72~1.89

(サンプル量200mg)

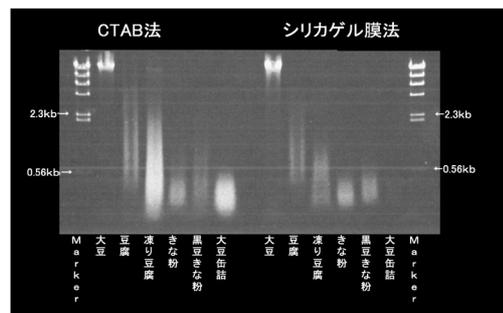


図6 DNA抽出原液の電気泳動像

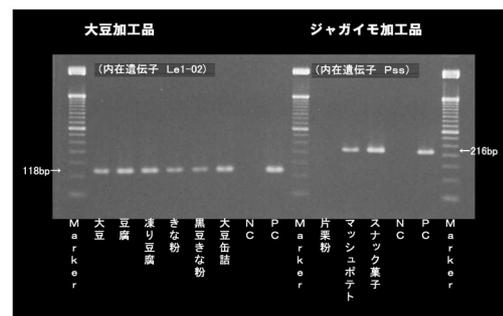


図7 各加工品の内在遺伝子のPCR結果

4.4 定性PCR検知感度の確認

既知濃度の遺伝子組換え大豆混入大豆粉末を使用し、定性PCRの検知感度を確認した。採取量を公定法の1/10量としたが、抽出液をミニカラムへ全量負荷することにより0.5%濃度まで検出できた。試料を48mesh前後に破碎し十分混和することにより、サンプリング量のスケールダウンは可能だと思われる。

4.5 流通品の実態調査

検討した結果を基に市販の大豆加工品10件(豆腐10件)、じゃがいも加工品10件(マッシュポテト2件、スナック菓子8件)について流通品の試買検査を実施した。豆腐4検体から安全性審査済の大豆の組換え遺伝子RRSを検出した(表3)。その後の調査で、これらの製品は分別生産流通管理された外国産の大豆を使用していることがわかり、分別生産流通管理を実施しても非意図的混入はさけられないことが分かった。

また、ジャガイモ加工品については安全性未審査の組換え遺伝子New leaf Yは検出されなかった。

表3 豆腐の組換え遺伝子の検査結果
(対象組換え遺伝子: RRS)

	判定結果	表 示	国産大豆 使 用	外 国 産 大豆使用
豆腐1	陽 性			
豆腐2	陰 性			
豆腐3	陽 性			
豆腐4	陰 性			
豆腐5	陰 性			
豆腐6	陰 性			
豆腐7	陽 性			
豆腐8	陰 性			
豆腐9	陽 性	*		
豆腐10	陰 性			

: 遺伝子組換え大豆使用せず
 * : 非遺伝子組換え大豆100%
 : 使用している

5 ま と め

- 1) ミネラルオイルの重層により、PCR増幅が改善され、DNAが抽出された全検体から内在遺伝子の確認が可能となった。
- 2) シリカゲル膜法ではDNAの抽出量は少ないが、短鎖域が相対的に抽出されにくいいため、PCRによるDNAの目的配列の検出が容易になる。これは他の豆加工品にも適用できるものと思われる。また、DNA原液の電気泳動により、加工品のDNA抽出液の断片化(分解)の程度が推定できる。
- 3) 組換え遺伝子を検出した豆腐4検体は、輸入大豆を使用しており、分別生産流通管理を実施しても遺伝子組換え大豆の非意図的混入はさけられないことが分かった。表示の妥当性を検討する上にも定量PCRによる分析が必要であると思われる。

(参 考 文 献)

- 1) 平成13年3月27日食発第110号厚生労働省通知「組換えDNA技術応用食品の検査法について」(平成15年6月18日最終改訂)
- 2) (独)農林水産消費技術センター: JAS分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」(平成14年6月20日最終改訂)
- 3) 渡邊節他: 宮城県保健環境センター年報 20, 59~63 (2002)
- 4) 農林交流センター: 第79・82回農林交流センターワークショップ「遺伝子組換え体の検知技術 農産物・食品からの定性・定量的検知法」
- 5) 松岡猛他: 食衛誌. Vol 40, 2 149~157(1999)

生活環境中における揮発性有機化合物の季節変動調査及び簡易モデルを用いた室内空気浄化法の検討

Investigation of VOC Seasonal Variation in Living Condition and Examination of The Indoor Air Purification Method which Used Simple Model

長船 達也 氏家 愛子 赤間 仁
大江 浩*

Tatsuya OSAFUNE, Aiko UJIIE, Hitoshi AKAMA,
Hiroshi OOE

キーワード：揮発性有機化合物，室内空気汚染，季節変動，浄化法，壁紙

Key Words : Volatile Organic Compound, Indoor Air Pollution, Seasonal Variation, Purification Method, Wallpaper

ホルムアルデヒド，アセトアルデヒド及びVOCの季節変動の把握を目的に，県内の新築住宅について夏季及び冬季に調査を行ったところ，汚染物質の濃度は季節変動による影響よりも，むしろ住まい方に影響されることが分かった。また，簡易モデルを用いて室内空気の浄化法を検討したところ，汚染物質を把握した上で適切な壁紙を選択し，使い捨てで貼る・敷くことも簡便かつ効果的な室内空気浄化法の一つになり得ることが分かった。

1 はじめに

近年，住宅の高気密化にともない，建材・内装材から放出されるホルムアルデヒドやその他の揮発性有機化合物（VOC）による健康被害，いわゆる「シックハウス症候群」が社会問題となっている。この様なことから厚生労働省では，対策の一環として平成9年よりホルムアルデヒドを始め，順次VOCの指針値を設定している（現在13物質）。また国土交通省では，平成12年に住宅の品質確保の促進に関する法律を施行し，低ホルムアルデヒド規格材の使用等による室内空気汚染防止対策を推進している。そこで低ホルムアルデヒド建材で施工された県内の新築住宅について，昨年度は環境化学部により入居前・後のホルムアルデヒド，アセトアルデヒド及びVOC濃度の実態調査が行われた¹⁾。

また室内空気汚染は，温度の影響を受けやすく季節によって差があると考えられるため²⁻³⁾，本年度はホルムアルデヒド，アセトアルデヒド及びVOCの季節変動の把握を目的に，引き続き4棟の住宅について夏季及び冬季に調査を行った。これと並行し，シックハウス対策の一助となるような室内空気の浄化法を検討するため，簡易モデルを用いて⁴⁾，ホルムアルデヒド等の除去能を有する各種壁紙でのVOC除去効果を比較したので報告する。

2 方 法

2.1 生活環境中における揮発性有機化合物の季節変動調査

2.1.1 調査対象住宅及び調査時期

調査対象住宅：平成13～14年新築住宅4棟

夏季調査：平成14年7～8月，冬季調査：同年11～12月

2.1.2 調査対象物質

ホルムアルデヒド，アセトアルデヒド，VOC41物質

表1 VOC調査対象物質一覧

脂肪族炭化水素	ヘキサン，ヘプタン，オクタン，ノナン，デカン，ウンデカン，ドデカン，トリデカン，テトラデカン，ペンタデカン，ヘキサデカン 2,4-ジメチルペンタン 2,4-トリメチルペンタン
芳香族炭化水素	ベンゼン，トルエン，エチルベンゼン，m,p-キシレン，p-キシレン，スチレン，1,3,5-トリメチルベンゼン，1,2,4-トリメチルベンゼン，1,2,3-トリメチルベンゼン，1,2,4,5-テトラメチルベンゼン
テルペン類	-ピネン，リモネン
ハロゲン類	トリクロロエチレン，テトラクロロエチレン，クロロホルム，1,1,1-トリクロロエタン，1,2-ジクロロエタン，1,2-ジクロロプロパン，p-ジクロロベンゼン，四塩化炭素，クロロジプロモメタン
エステル類	酢酸エチル，酢酸ブチル
ケトン類	メチルエチルケトン，メチルイソブチルケトン
アルコール類	ブタノール
アルデヒド類	ノナール，デカール

2.1.2 調査方法

2.1.2.1 アンケート調査

物質濃度との関連性を調べるため，建築物等情報，採取状況，居住者情報についてのアンケート調査を行った。

2.1.2.2 ホルムアルデヒド・アセトアルデヒド調査

オゾンスクラバーを接続した捕集管（Waters社製Sep-Pak XpoSurアルデヒドサンプラー）により，室内空気を約100mL/minの流速で24時間連続ポンプ吸引した。採取後の捕集管をアセトニトリルで溶出し，5 mLにメスアップした後，HPLCで定性・定量を行った。定量値は，20 における空気中濃度（ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）に換算した。なお，HPLC分析条件を（表2）に示す。

* 現 生活衛生課

表2 HPLC分析条件

カラム：GLサイエンス製ZORBAX Bonus-PR 4.6mm i.d. x 250mm			
カラム温度：40			
測定波長：360nm			
流速：1.0ml/min			
移動相：A - 精製水, B - CH ₃ CN			
クラジユエント：	A	B	
0min	80%	20%	
10min	40%	60%	
15min	40%	60%	
15.01min	80%	20%	
20min	80%	20%	

2.1.2.3 VOC調査

捕集管（柴田科学製活性炭チューブ）により、室内空気を約100mL/minの流速で24時間連続ポンプ吸引した。採取後の捕集管から活性炭を取り出し、1mLの二硫化炭素で抽出し、内部標準物質トルエン-d₈を添加（100ppb相当）した後、GC/MSで定性・定量を行った。定量値は、20における空気中濃度（μg/m³）に換算した。なお、GC/MS分析条件を（表3）に示す。

表3 GC/MS分析条件

カラム：J&W DB - 1 0.25mm i.d. x 60m（膜厚1 μm）	
昇温条件：40（7min）10 /min 280（2min）	
試料注入法：スプリットレス	
試料注入量：2 μl	
注入口温度：250	
インターフェイス温度：280	
検出法：SIM	

2.2 簡易モデルを用いた室内空気浄化法の検討

2.2.1 検討素材

活性炭含有壁紙、尿素含有壁紙、二酸化チタン含有壁紙（表4）

表4 検討壁紙一覧

種類	活性炭含有紙	尿素含有紙	二酸化チタン含有紙
質量 (g/m ²)	110	180	105
厚さ (mm)	0.36	0.40	0.28
配合率 (%)	70	10	二酸化チタン・無機脱臭剤：50 活性炭：10
外観 (色)	黒色	白色	灰色
除去効果確認物質 ^{*1}	トルエン、酢酸 硫化水素	ホルムアルデヒド	アセトアルデヒド
主な除去原理	多孔質による物質吸着	尿素による化学吸着	光触媒による分解

* 1：メーカーによる効果確認³⁾

2.2.2 検討対象物質

真空ビン内での気化が困難であった9物質（ノナール、ウンデカン、1,2,4,5-テトラメチルベンゼン、デカナル、ドデカン、トリデカン、テトラデカン、ペンタデカン、ヘキサデカン）を除くVOC32物質 - 脂肪族炭化水素7種、芳香族炭化水素9種、テルペン類2種、ハロゲン類9種、エステル類2種、ケトン類2種、アルコール類1種 -

2.2.3 検討方法

テドラバッグに5cm x 5cmの大きさに切った3種類の壁紙（活性炭含有・尿素含有・二酸化チタン含有）をそれぞれ封入し隔離した。なお使用した壁紙は、裏面をアルミ箔で覆い、表面のみで評価することとした。次に、活性炭で浄化した空気を50L注入し、真空ビンで気化させたVOC混合標準ガスを添加（Totalで約1000 μg/m³）した。静置平衡化の後、隔離した壁紙を開放し試験をスタートした。そして、一定時間毎に活性炭チューブにより内部空気を全量捕集し、GC/MSで定性・定量を行った。定量結果から残存率を算出し、除去効果を比較した。

3 結果

3.1 生活環境中における揮発性有機化合物の季節変動調査

3.1.1 アンケート結果

今回調査対象とした4棟の内訳は以下のとおりであった（表5）

表5 調査対象住宅情報一覧

	A邸	B邸	C邸	D邸
入居日	H13.10	H13.12.7	H14.1月上旬	H14.3.1
測定日	夏季 H14.7.25 冬季 H14.12.4	H14.7.31 H14.12.2	H14.7.22 H14.11.27	H14.8.1 H14.12.5
構造	木造従来	2 x 4	木造従来	鉄骨プレハブ
換気システム	あり	あり	なし	あり
測定場所・広さ	居間26畳	居間22.5畳	居間12畳	居間17畳
冷房器具	エアコン	エアコン、 扇風機	エアコン、 扇風機	扇風機
暖房器具	石油セントラル ヒーティング 蓄熱パネル	電気蓄熱暖房	石油ファン ヒーター	石油ファン ヒーター
新規購入家具		ベビーベッド、 加湿器 (11月上旬)		ピアノ (11月中旬)

3.1.2 調査結果（図1）

木造従来工法のA、C邸からは、夏季にテルペン類の - ピネンが高濃度で検出されたが、冬季には減少していた（A邸：287 31, C邸：301 68 μg/m³）

C邸において、夏季にハロゲン類のp - ジクロロベンゼンが指針値240 μg/m³を超えていたが、これは居間のローテーブルの引き出し内に防虫剤があったためと考えた。しかし冬季には減少していた（305 107 μg/m³）

冬季の暖房器具に開放式石油ファンヒーターを使用したC、D邸では、灯油由来の脂肪族炭化水素類が夏季に比し高濃度を示した。その値は換気システムの内

いC邸の方が高かった（C邸：56 184，D邸：21 45 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）

D邸において，芳香族炭化水素のエチルベンゼン，キシレン，アルデヒド類のノナナルが夏季に比冬季に高濃度を示したが，これは購入したピアノの影響（塗料や防腐剤）によるものと考えた（エチルベンゼン：20 73，キシレン：23 54，ノナナル：0.64 12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）

また，テルペン類のリモネンについても冬季に高濃度を示したが，これはミカンの摂食によるものと考えた（3.2 31 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）

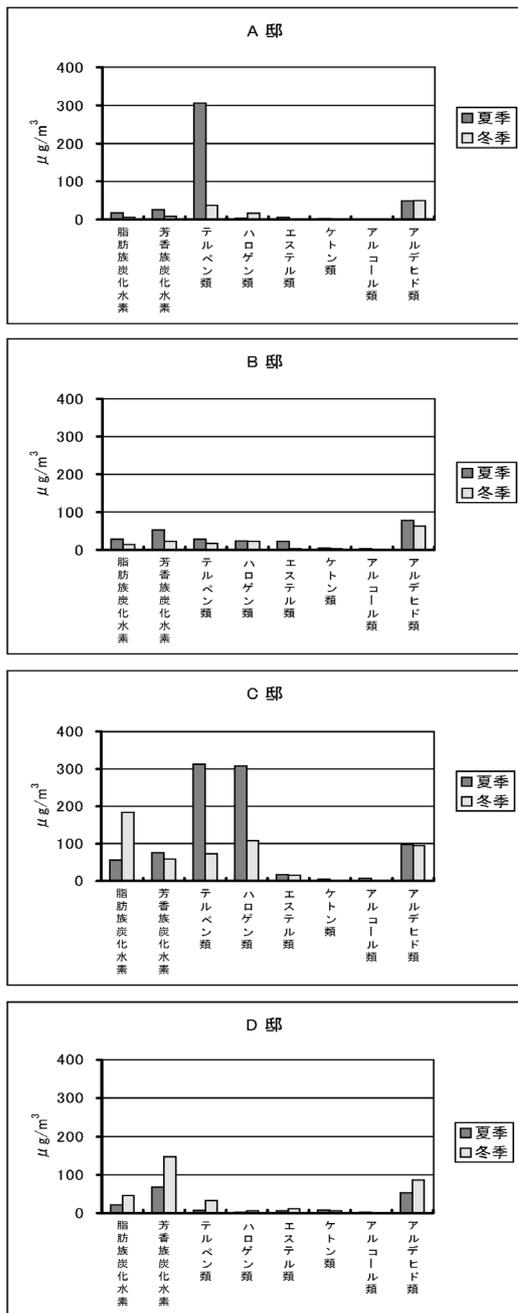


図1 夏季・冬季調査結果

(ホルム・アセトアルデヒドはアルデヒド類に含む)

3.2 簡易モデルを用いた室内空気浄化法の検討

3.2.1 検討結果

① 活性炭含有壁紙

物質によって残存率に若干の違いはあったが，各物質群 3時間で60～80%，6時間で20～30%，24時間で数%の残存率であり，強力な除去効果が確認できた（図2）。

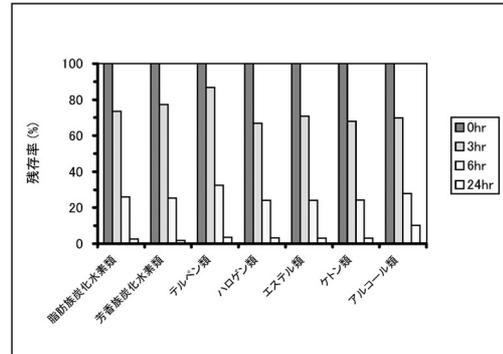


図2 活性炭含有紙VOC除去結果

② 尿素含有壁紙

除去効果は確認できなかった。

③ 二酸化チタン含有壁紙

はじめに蛍光灯下で試験を行ったが，光触媒による除去効果は確認できなかった。次にUV照射下での効果を確認するため，同時に非照射下での試験（活性炭をも含む）を行い比較したが，UV照射・非照射間で差はなく，光触媒を介した効果は見られなかった（図3）。

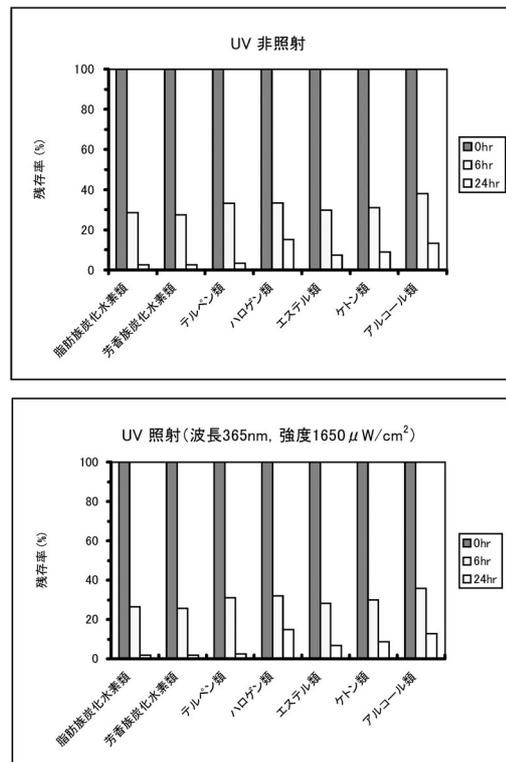
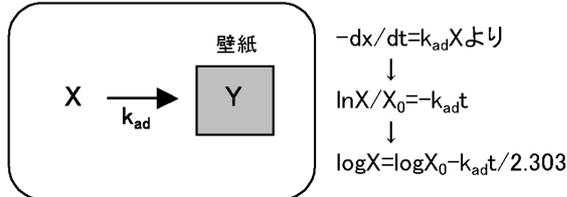


図3 二酸化チタン含有紙VOC除去結果

3.2.2 モデルフィッティング

本試験で使用した活性炭含有紙のVOC除去効果の数値化を試みた。本試験は閉鎖系であり、また壁紙に吸着した物質の脱離を無視し、大きな温度変動がなかったもの(本試験中の平均温度:22)と仮定し、薬物動態で汎用される1-コンパートメントモデルを適用した(図4)。

テドラーバッグ内



X:残存量, Y:吸着量, k_{ad} :吸着速度定数

図4 1-コンパートメントモデル

捕集した各物質の絶対量 (ng) の常用対数値を Y 軸に、測定時間を X 軸にとりプロットをすると、良好な回帰直線が得られた (R^2 値 0.95 以上 [ブタノール:0.89 を除く])。この直線の傾きから吸着速度定数 K_{ad} を算出し、また K_{ad} 値から各物質の半減期 $t_{1/2}$ を算出した (表6)。

表6 パラメーター一覧 (平均±標準偏差)

	k_{ad} (hr^{-1})	$t_{1/2}$ (hr)
脂肪族炭素水素	0.157 ± 0.022	4.51 ± 0.67
芳香族炭化水素	0.168 ± 0.018	4.16 ± 0.44
テルペン類	0.142 ± 0.011	4.89 ± 0.38
ハロゲン類	0.142 ± 0.015	4.94 ± 0.47
エステル類	0.146 ± 0.019	4.77 ± 0.62
ケトン類	0.152 ± 0.039	4.73 ± 1.23
アルコール類	0.089	7.78

k_{ad} : 吸着速度定数
 $t_{1/2}$: 半減期

4 考察

4.1 生活環境中における揮発性有機化合物の季節変動調査

今回の調査では、一部の物質を除き夏季に高濃度を示すものが多く見られたが、前回の環境化学部による入居後調査(2~3月)からの推移(図5)を見れば、ほとんどの物質は経時的に減少傾向にあった。一方、石油ファンヒーターの使用や防虫剤の使用、家具(ピアノ)の購入等で特定の物質濃度が上昇していた。以上より入居後の新築住宅における汚染物質の濃度は、季節変動の影響よりも、むしろ住まい方に影響されることが分かった。また、換気システムを持たない住宅では、持つ住宅に比べ、汚染物質の残存度合いが高くなっていることも分かった。

したがって室内空気汚染を防止するためには、原因の特定と排除が基本であるが、併せて頻繁な換気等による空気の浄化が重要であると考えられる。

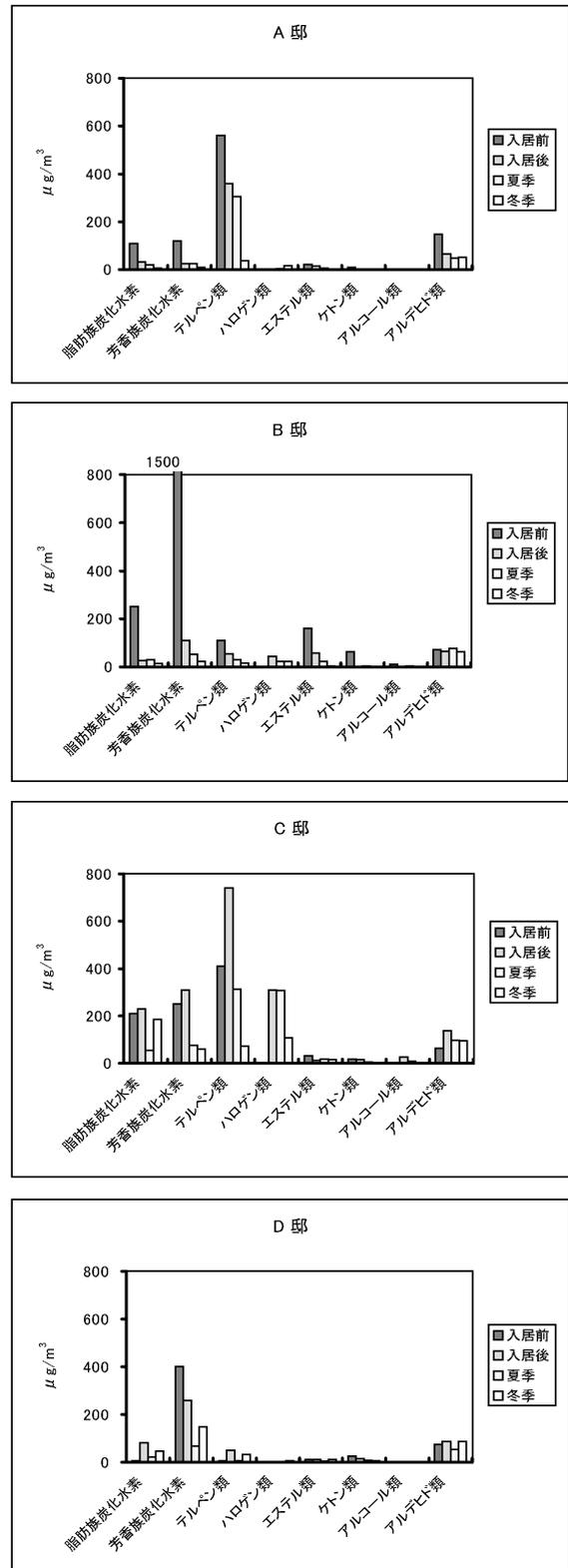


図5 室内濃度経時推移

4.2 簡易モデルを用いた室内空気浄化法の検討

今回検討した壁紙のうち、活性炭含有紙はVOCを物理的に吸着するため、各物質に対してほぼ同等の除去効果を示した。反面、物質の吸着飽和や高温下での脱離が予想される。一方、尿素や二酸化チタン含有紙は、物質の脱離の心配はないが、低級アルデヒド特有の高反応性を利用した吸着・分解（尿素のアミノ基及び二酸化チタンの光触媒によって生じたラジカルやスーパーアニオンによる反応（図6））であるため、反応性の低いVOCの除去効果は期待できないと考えた。

したがって、汚染物質を把握した上で適切な壁紙を選択し、使い捨てで貼る・敷くことも簡便かつ効果的な室内空気浄化法の一つになり得ると考える。

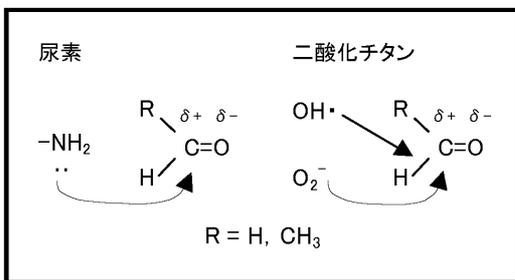


図6 低級アルデヒドとの化学吸着・分解反応

5 ま と め

- 1) 件数は少ないが、一年を通して新築住宅の室内空気汚染を調査したことで汚染源の特定が可能となり、本調査がシックハウス相談に対しての有益な資料になり得るものと考ええる。
- 2) ベイクアウトの実施や換気システムの導入、空気清浄機の購入等、相当量の労力・費用の負担を伴わなくとも、目的に応じた壁紙を選択し貼る・敷くことで、汚染物質の除去が簡便かつ効率的にできることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) 佐々木ひとえ 高橋正弘 他：生活環境中におけるホルムアルデヒドの挙動に関する調査，宮城県保健環境センター年報，20，93 - 97（2002）
- 2) 洲村弘志 熊谷洋 北山光正 他：室内環境における揮発性有機化合物濃度の測定，山口県環境保健研究センター業報，22，32 - 37（2001）
- 3) 吉田俊明 安藤剛 松永一朗：住居内空気中ホルムアルデヒドおよび揮発性有機化合物濃度の季節変動，大阪府立公衆衛生研究所研究報告，39，31 - 47（2001）
- 4) 村田一英 佐竹健太 野平佳紀：環境汚染物質の浄化に関する研究，埼玉県工業技術センター研究報告書，2，188 - 190（1999）
- 5) 安積濾紙株式会社ホームページ

BOD 植種液の培養方法の検討

Studies on Culture Condition of BOD Inoculum

齋藤 善則 柳 茂 佐藤 好克
高橋 正弘*

Yoshinori SAITO, Shigeru YANAGI, Yoshikatsu SATO
Masahiro TAKAHASHI

キーワード：植種培養液，MLSS，合成培地，無負荷培養

Key Words：Inoculum Culture，MLSS，Synthetic medium，Non-load Culture

JIS K 0102によればBOD測定時の植種液には、河川水、下水の上澄液と共に試験室内で試料に馴らした微生物を培養した上澄液も含まれている。河川水等は入手の困難さ、水質の不安定性が常に問題となり、植種液の安定供給、及び水質の安定のためには、試料に適応した微生物を増殖させて、常時手元にあることが最も好ましい。

そこで、今回植種培養液の維持管理について、微生物の餌となる合成培地の保存性、最適組成、そして培養液の至適水温、MLSS濃度、さらに長期休暇に対応する無負荷培養実験等の検討を行った。

その結果、合成培地の保存性については140 ℃で2時間容器を加熱して用いることにより腐敗を防止できた。培地組成ではpH安定のためには、リン酸塩がある程度過剰に含まれている必要があった。また、植種培養液の日常管理においては、上澄液のBODをあまり下げすぎないようなMLSS管理が必要であった。水温は5 ℃～25 ℃の範囲内で安定した培養が可能であった。長期休暇時を想定した無負荷培養実験では間欠曝気、連続攪拌と冷蔵庫保存を検討したが、冷蔵庫保存のものが汚泥の崩壊が少なく最も良好であった。

1 はじめに

一般に、河川水等の環境水を除きBODを測定する場合、希釈水に植種液を添加して測定する。この植種液には、JIS K 0102によれば、河川水、下水の上澄液、土壌抽出液、さらに培養液として試験室内で試料に馴らした微生物を培養した上澄液がある。しかし、河川水等はBOD測定に適したものを選択して使用しなければならず、入手の困難さ、水質の不安定性が常に問題となる。植種液の安定供給、及び水質の安定のためには、試料に適応した微生物を増殖させて、常時手元にあることが最も好ましい。

そこで、今回植種培養液の維持管理について、回分式培養方法を用いて、合成培地組成、MLSS管理、及び長期休暇時を想定した無負荷培養実験等種々の検討を行ったので報告する。

2 実験装置及び実験方法

2.1 実験装置の概要

日常の培養には塩化ビニル製の図 - 1 に示す培養槽に、はじめに種汚泥として下水処理場の活性汚泥を1 L入れて水道水で6 Lとして曝気を開始した。そして、回分式

* 現 原子力センター

培養方法により、朝30分曝気を止め、上澄液を3 L引き抜き、合成培地を40ml加えて元の水位まで水道水を満たし曝気を開始する操作を毎日繰り返した。

また、無負荷培養実験は2 Lのポリ容器に培養液を1.5 L入れて、表 - 1 に示す方法で検討した。Run1, 2は図 - 2 の接続方法で12日間の無負荷培養を行った。その後さらに全てのRunを連続曝気に戻して、合成培地を日常の培養と同様の比率で加えて、2週間培養を続けた。なお、通気は図 - 2 の接続方法で水洗した空気を用いて行い、曝気後の排気は活性炭で脱臭した。

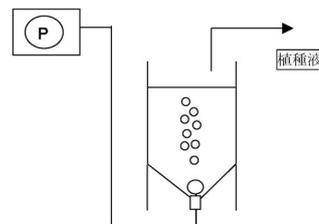


図 - 1 回分式培養槽

金魚用エアポンプ タイマーセット ⇄ エア洗浄 ⇄ 間欠曝気槽 ヒーターで保温 ⇄ 活性炭脱臭

図 - 2 Run1, 2の接続方法

表-1 無負荷培養実験

	培養方法	培養温度()
Run 1	間欠曝気(2時間曝気22時間停止)	20~30
Run 2	間欠曝気(1時間曝気11時間停止)	20~30
Run 3	スターラーによる連続攪拌	20~30
Run 4	冷蔵庫保存	4

培養液量 : 1,500ml MLSS : 9,500mg/L

2.2 合成培地の保存性及び組成の検討

スクリーキャップ付きガラスビンを恒温槽で140℃、2時間加熱し、余熱のあるうちに40~50℃の作りたての合成培地を注ぎ入れ、室温まで冷ましてから冷蔵庫に保存した。この方法で合成培地1Lを使い切るまで変質は認められなかった。なお、合成培地は1Lのビーカーに約900mlの精製水を入れ、試薬を添加してホットプレート上で沸騰させないように加熱溶解し、中和後に1Lとした。

合成培地はJISの植種液使用基準への適合状況、及び硝化作用によるpHの低下状況を見ながら、適宜組成の検討を行った。表-2に示す5種類の組成について、最低でも1ヶ月間の培養を継続して良否を判定した。

表-2 合成培地の組成

試薬名	pH: 7.2 添加量: g				
	培地-I	培地-II	培地-III	培地-IV	培地-V
リン酸-カリウム	12	12	4	8	12
グルコース	10	40	40	40	40
ペプトン	30	40	35	35	35
L-グルタミン酸	-	-	5	5	5
水酸化ナトリウム	3.8	3.8	3.0	3.8	4.8

2.3 培養液の水温、MLSS及びpHの影響

1年間以上、回分式培養方法を継続して、培養液への水温の影響を調べた。また、MLSSは低温時には高めに維持し、15℃以上の時は2000~4000mg/Lに維持した。

培養液の曝気停止直前、停止30分後、水位復元曝気直後、培地添加直後、曝気開始1時間後のpHを測定し、合成培地添加前後のpH、亜硝酸性窒素、及び硝酸性窒素の変動を調べた。

2.4 無負荷培養実験

回分式培養方法で培養した溶液を4分して、表-1に示す方法でRun 1~4に各1.5L使用した。Run 1~3はラインヒーターにて20~30℃に保温した。Run 1は2時間曝気22時間停止の1日1サイクルの繰り返し、Run 2は1時間曝気11時間停止の1日2サイクルの繰り返し、Run 3はスターラーによる連続攪拌を行った。Run 4は4℃の冷蔵庫に保存した。これを12日間続けた後に、さらにRun 1~4の連続曝気を開始し、翌日から合成培地を10ml添加して、回分式培養方法に戻して沈降性(SV30)、pH、及びBODの変動を調べた。

3 結果及び考察

3.1 合成培地組成による水質変化

合成培地組成を表-2に示す5種類に変化させて培養を行った。培地-Iではグルコースが10g、ペプトンが30gと少ないためBODが低く、窒素の比率が高いことから消化菌が増殖しやすく、特に休日明けの月曜日に低pHになりやすかった。

培地-IIではpHは安定しているが上澄液のBODが1mg/L程度になるとJISの植種液使用基準を満足しにくくなる傾向が見られたが、BODが10mg/L程度なら図-3に示すとおりBOD:210±10mg/Lの基準を満足した。そこで、ペプトンの一部を植種液使用基準確認溶液に含まれるL-グルタミン酸に変えた培地-III~Vを検討した。

また、活性汚泥が正常に生育するために必要な栄養バランスは、一般にBOD:N:P=100:5:1以上と言われているが、このバランスを満たす濃度にPの添加量を減らした培地-IIIにおいても、培地-IIと同様に休日明けの月曜日にpHの低下傾向が見られた。P濃度を培地-IIの2倍にした培地-IVでもこの傾向は変わらなかった。

培地-VはP濃度を培地-IIまで戻して、さらにL-グルタミン酸を添加したことでJISの植種液使用基準を満足しやすくなるかどうかを検討した。図-4に示すとおり、その効果はあまり見られず、培地-IIとほぼ同程度であった。なお、硝化菌抑制のためアリルチオ尿素を添加したものはBODが170mg/Lと無添加のものよりやや低かった。

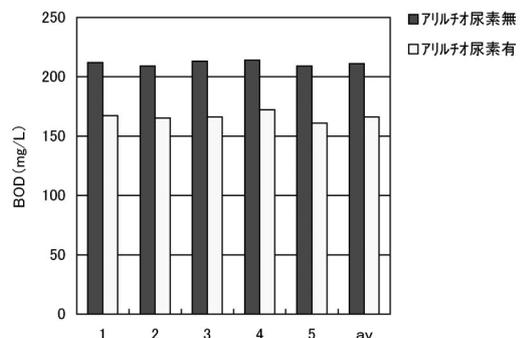


図-3 培地-IIによるグルコースグルタミン酸混合液のBOD

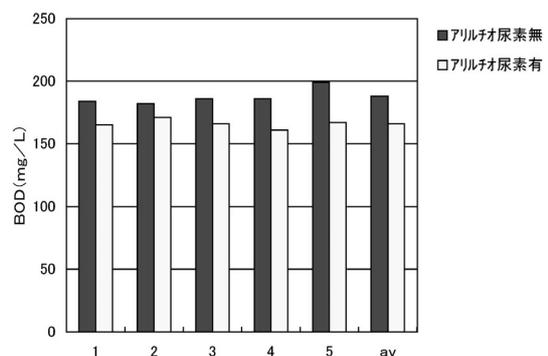


図-4 培地-Vによるグルコースグルタミン酸混合液のBOD

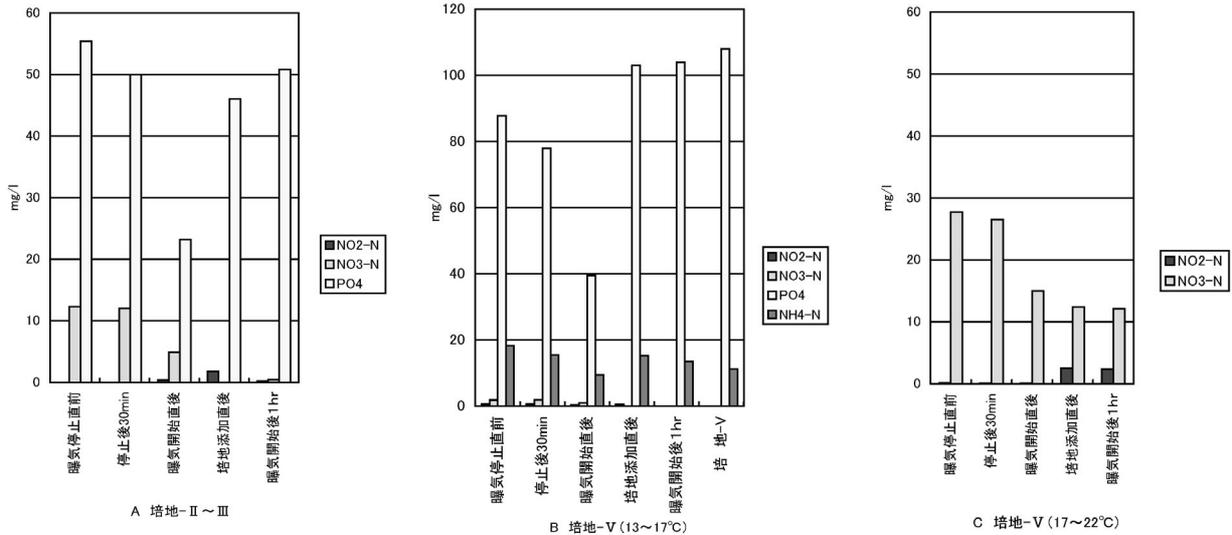


図-5 合成培地添加前後の窒素濃度

3.2 培養液の水温, MLSS及びpHの変化

培養液の水温は11月の5 が最低(以降20 に保温)で, 8月の25 が最高であったが, この範囲では培養に問題はなく, むしろ高温時に汚泥の引き抜きを頻繁に行い, MLSSの管理で消化菌の増殖を抑制する必要があった。高温時にはMLSSを2000mg/L程度に抑えた方がpHの低下を防ぐことができた。図-5に示すとおり, 曝気停止直前に比べ, 培地添加直後に亜硝酸性窒素が高くなり, 硝酸性窒素が低くなる傾向が見られた。図-5のAは培地- から培地- に変えて3日目のもの。また, 同じ培地- でMLSS(4000mg/L)がほぼ同じ場合(図-5のB, C), 水温の高い方が硝酸性窒素の濃度が高くなりやすく, 休日明けの月曜日にpH6を下回る値を示すこともあった。

合成培地添加前後のpHの変化は図-6に示すとおり, 培地添加直後に低くなる傾向が見られた。これはイオンクロマトグラフで酢酸を確認したことから有機酸生成によるものと推察された。

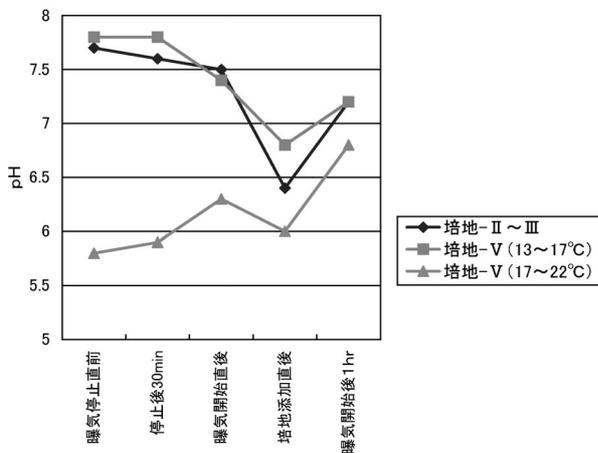


図-6 培地添加前後のpH変化

3.3 無負荷培養実験

Run 1 ~ 4のSV30を図-7に示す。Run 3を除き, SV30は無負荷培養終了直後の70台から徐々に低下し60まで推移したが, その後の3日間の空曝気によりやや上昇する傾向を示し, 汚泥崩壊による濁りも増加した。Run 3は無負荷培養終了直後から他に比べ濁りが認められ, 沈降性の回復も悪かった。

上澄液引き抜き量とpHの変化を図-8に示す。無負荷培養終了後, いずれのRunでも合成培地添加の回分式培養方法に戻しても, pHの回復は認められなかった。また, 3日間の空曝気でさらに硝化菌が活発化してpHが低下した。このことから, 硝化菌の増殖によるpHの低下防止対策には, MLSSの適正管理しか方法は無いものと思われた。それはこの実験の終了後, 培養液を4倍に希釈して回分式培養槽に戻してMLSS 2000mg/Lで, 平常の培養を続けたところ, 3日目でpHが中性に回復したことにより確認できた。

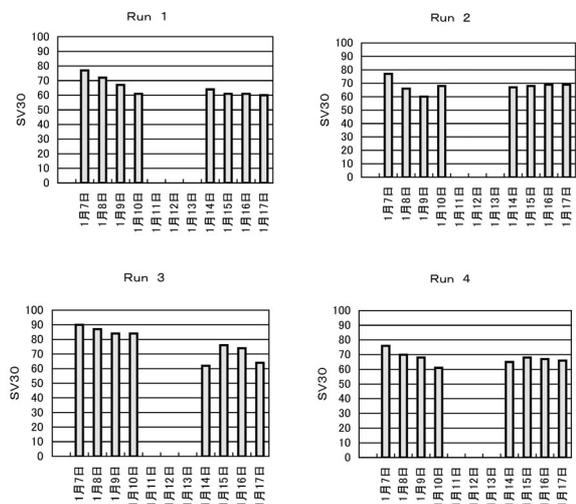


図-7 SV30の変化

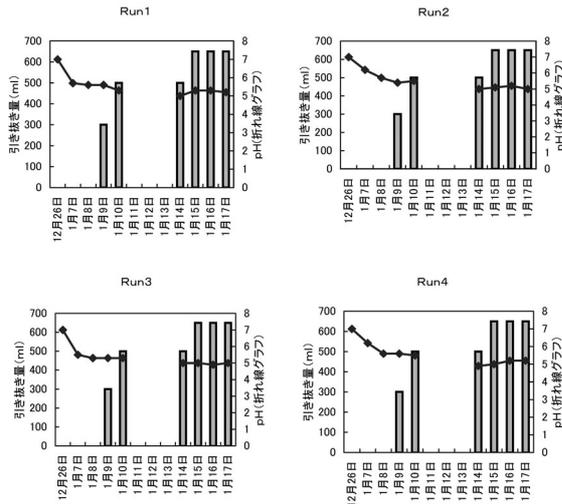


図-8 上澄液引き抜き量とpHの変化

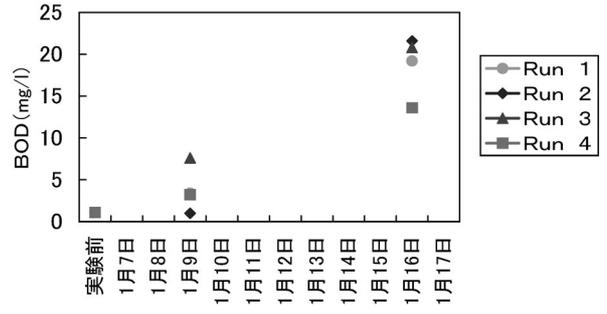


図-9 無負荷培養後の上澄液BOD

無負荷培養後の上澄液BODの推移を図-9に示す。培地添加開始3日目(1月9日)ではRun3が7mg/Lと最も高かったが、その後の3日間(1月11~13日)の空曝気後では、Run1~3が20mg/Lを超える値まで悪化したのに対し、Run4は13mg/Lと最も低い値を示した。この結果から、冷蔵庫保存は培養液の活性低下が少なく、特別な装置も必要なく、最も省エネルギーな方法であることがわかった。

4 ま と め

今回の検討の結果、下記のことが明らかになった。

- 1) 合成培地の保存性については140 ℃、2時間加熱したガラスビンを用い、40~50 ℃の合成培地を注ぎ入れることにより、腐敗を防止できた。
- 2) 合成培地の組成を5種類検討したが、従来から使用していた培地 - が良好であった。
- 3) 回分式培養方法により、水温は5 ℃から25 ℃の範囲内で安定した培養が可能であった。
- 4) 植種培養液の日常管理には上澄液BODをあまり下げすぎないことと、硝化菌の増殖を抑えるMLSS管理が必要であった。
- 5) 長期休暇時を想定した無負荷培養実験では2週間程度なら冷蔵庫保存が汚泥の崩壊も少なく、最も良好であった。

参 考 文 献

- 1) 工場排水試験方法：1998，日本規格協会，p49~54
- 2) 桜井敏郎他：活性汚泥法と維持管理，産業用水調査会，p40~60

ダイオキシン類調査結果に関する精査作業

Scrutiny Process on Dioxins Results of Survey

中村 朋之 清野 陽子*¹ 鈴木 滋
加藤 謙一 高橋 正弘*²

Tomoyuki NAKAMURA, Yoko KIYONO, Shigeru SUZUKI
Ken-ichi KATO, Masahiro TAKAHASHI

キーワード：精査作業，ダイオキシン類，調査結果

Key Words : Scrutiny process , Dioxins , Results of survey

1 はじめに

ダイオキシン類対策特別措置法が平成12年1月から施行されたことを受け、都道府県知事に各種環境媒体における常時監視の義務が課せられ、宮城県においても年間約120検体の分析を民間分析機関に委託している。ダイオキシン類の分析は、超微量の物質を多数の異性体に分離、同定しなければならず、加えて前処理等の複雑な操作と高分解能質量分析計（HR-GC/MS）等を利用する高度な技術が必要とされることから、確実な精度管理の遂行が極めて重要¹⁾²⁾³⁾⁴⁾である。このため、環境省ではダイオキシン類の環境測定に係る精度管理指針⁵⁾並びにダイオキシン類の環境測定を外部に委託する場合の信頼性の確保に関する指針⁶⁾を定め、精度管理の更なる向上を図ってきた。こうした指針に沿い、当県では民間分析機関からの報告について精査作業を平成12年より実施しており、より信頼性の高い分析結果を得られるよう努めている。

今回過去3年にわたり実施してきた結果を基に実際に経験した事例を交えながら、精査作業に関する一連の手順について紹介する。

2 方法

精査に関する手順について図1に示す。始めにある種媒体の一連の分析について試料における検出下限、定量下限値を満足しているか否かをS/Nにより確認し、同時にブランク値の評価を行う。いずれの項目に関して問題が無いと判断した後は、先山ら⁷⁾の報告に基づきエクセルファイルを用いて作成したダイオキシン類異性体組成判別シート中に報告されたデータ群を入力し、異常値または特異的なデータを有すると判断された測定結果を抽出する。個々に抽出されたデータについては、分析委託機関に提出を求めた資料、すなわちGCインジェクションリスト、ロックマスの変動を併記したマスクロマトグラム、回収率一覧表等を基に更なるデータの精査を実施する。各項目を満足出来ない結果が生じた場合は、再測定、再分析等を課した。

3 結果及び考察

一連の作業において観察された主な事例について紹介する。

3.1 質量分析計の感度不足

試料における検出下限、定量下限値を満足していない事例について紹介する。媒体は地下水試料である。図2中の矢印で示した異性体の報告された検出下限、定量下限値はそれぞれ0.03pg/L、0.11pg/Lである。この異性体の報告値は、定量下限値を上回る0.22pg/Lであったが図中より明かにS/Nは3未満であり、報告書に明記されている下限値を全く満足していなかった。こうした事例は本地下水における一連の分析において相当数見受けられたため、HR-GC/MSの再調整を実施させた後、最低濃度

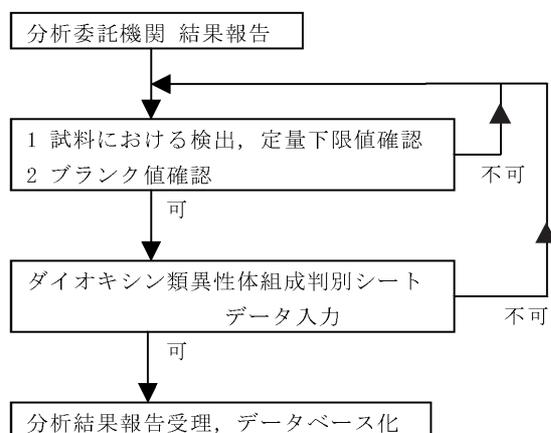


図1 ダイオキシン類調査結果精査手順

* 1 現 宮城県立循環器・呼吸器病センター

* 2 現 宮城県原子力センター

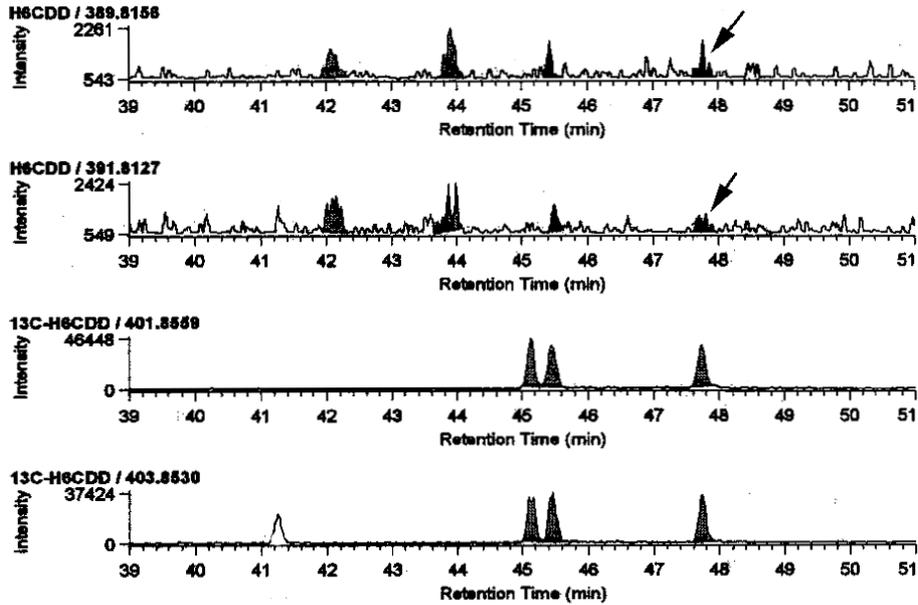


図2 HR-GC/MS感度不足例

表1 Co-PCBにおける高ブランク値検出例

化合物名	IUPAC	実測濃度 (pg/L)	試料における	
			定量下限 (pg/L)	検出下限 (pg/L)
3,4,4,5-TeCB	# 81	N.D.	0.11	0.03
3,3',4,4'-TeCB	# 77	0.42	0.06	0.02
3,3',4,4',5-PeCB	# 126	N.D.	0.05	0.02
3,3',4,4',5,5'-HxCB	# 169	N.D.	0.04	0.01
2',3,4,4',5-PeCB	# 123	0.23	0.03	0.01
2',3,4,4',5-PeCB	# 118	13	0.03	0.009
2,3,3',4,4'-PeCB	# 105	4.2	0.11	0.03
2,3,4,4',5-PeCB	# 114	0.52	0.05	0.02
2,3',4,4',5,5'-HxCB	# 167	0.52	0.04	0.01
2,3,3',4,4',5-HxCB	# 156	1.2	0.03	0.008
2,3,3',4,4',5'-HxCB	# 157	0.31	0.04	0.01
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	# 189	0.06	0.04	0.01
2,2',3,4,4',5,5'-H7CB	# 180	3.2	0.03	0.01
2,2',3,3',4,4',5-H7CB	# 170	1.7	0.03	0.008

表2 Co-PCBにおける特異な検出事例

化合物名	IUPAC	実測濃度 (pg/L)	試料における	
			定量下限 (pg/L)	検出下限 (pg/L)
3,4,4,5-TeCB	# 81	0.15	0.11	0.03
3,3',4,4'-TeCB	# 77	0.37	0.06	0.02
3,3',4,4',5-PeCB	# 126	0.05	0.05	0.02
3,3',4,4',5,5'-HxCB	# 169	0.02	0.04	0.01
2',3,4,4',5-PeCB	# 123	N.D.	0.03	0.01
2',3,4,4',5-PeCB	# 118	N.D.	0.03	0.009
2,3,3',4,4'-PeCB	# 105	N.D.	0.11	0.03
2,3,4,4',5-PeCB	# 114	N.D.	0.05	0.02
2,3',4,4',5,5'-HxCB	# 167	N.D.	0.04	0.01
2,3,3',4,4',5-HxCB	# 156	N.D.	0.03	0.008
2,3,3',4,4',5'-HxCB	# 157	N.D.	0.04	0.01
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	# 189	0.01	0.04	0.01
2,2',3,4,4',5,5'-H7CB	# 180	N.D.	0.03	0.01
2,2',3,3',4,4',5-H7CB	# 170	N.D.	0.03	0.008

の感度を保証できることを確認し再測定を課した。本事例については、HR-GC/MS測定の際に最低濃度の検出による確認を怠ったことによるものであった。

3.2 高ブランク値

コプラナー PCB (Co-PCB) において異常に高いブランク値が観測された事例を紹介する。媒体は地下水試料である。Co-PCBについて報告された試料における検出下限、定量下限値はそれぞれ0.008~0.03, 0.03~0.11pg/Lであったのに対し、報告された操作ブランク値は表1のようにかなりの高値であり、最大で定量下限値の400倍近いブランク値を示した異性体も存在した。このため表2に示したようにモノオルソ体が殆ど検出されずノンオル

ソ体が主に検出される異常な事態が生じた。図3に示したマスクロマトグラムからは、一連の全ての試料についてカネクロール由来と推測される類似したバックグラウンドが観察され、本事例は実験室内におけるコンタミネーションによるものと推察された。

3.3 同定作業の誤認

同属体分布を各試料についてグラフ化した資料の提出により異常が発覚した事例である。試料媒体は土壌である。その際に観察された同族体分布グラフとマスクロマトグラムの一例を並記して図4に示す。同族体分布図からは5塩素化ダイオキシンがN.D.となっている。しかしながら当県の一般的土壌及び底質における同族体分布の特

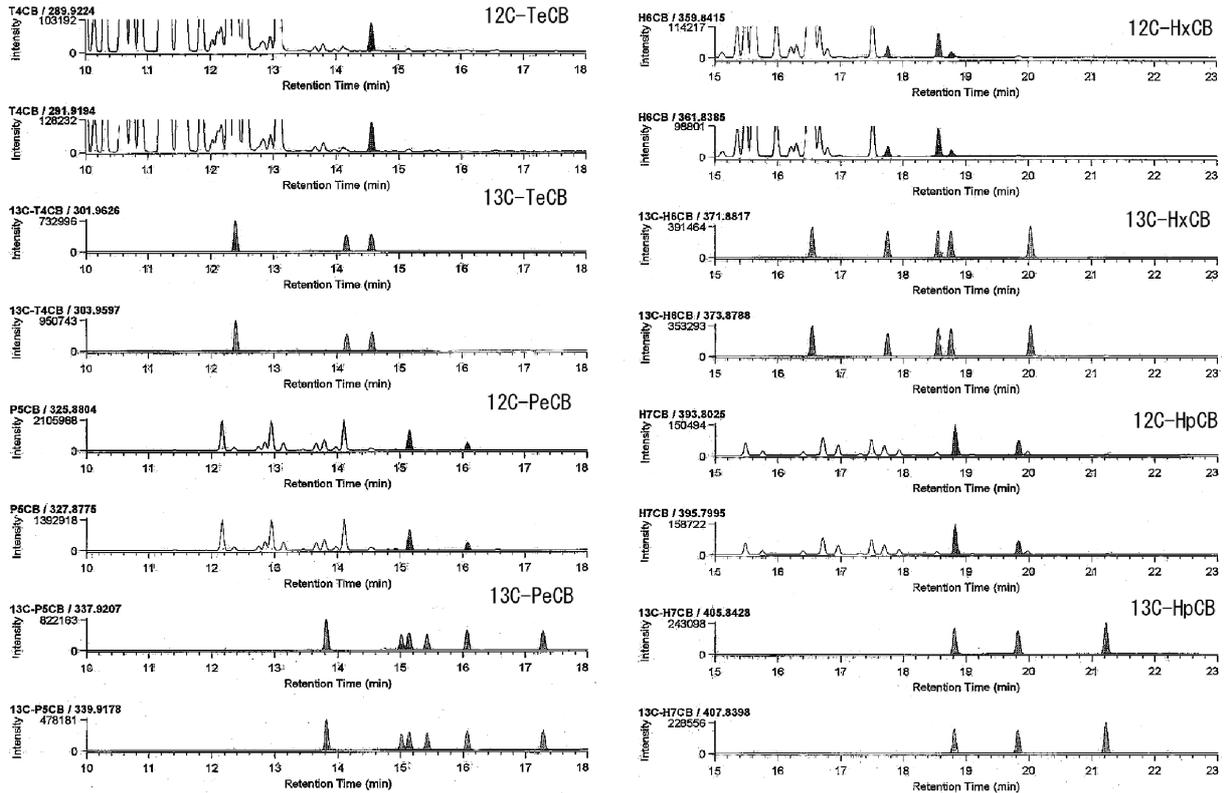


図3 高ブランク観測例

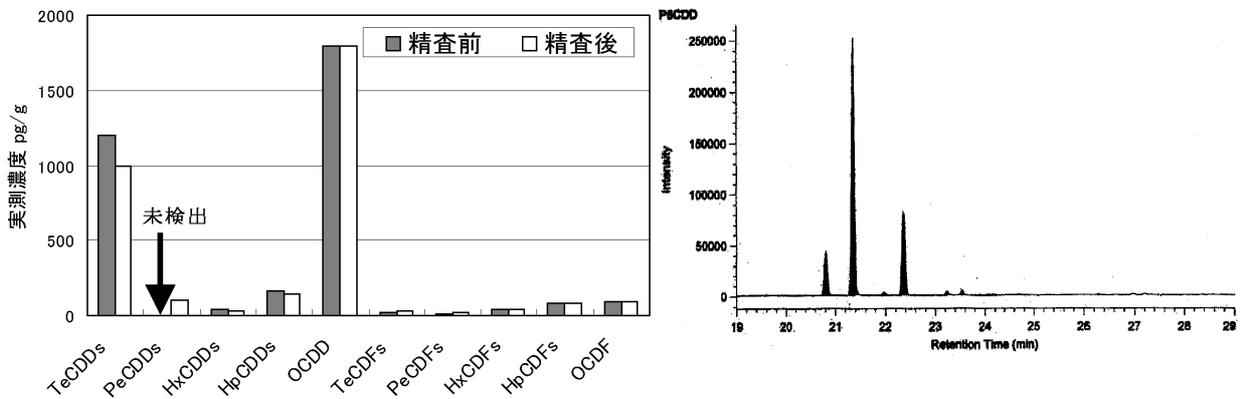


図4 同定ミス例

徴はCNP生成時の不純物とされる4及び5塩素化ダイオキシンが検出されることが一般的であるため、マスクロマトグラムを確認したところ、完全な同定ミスであることが判明した。これは自動化同定ソフトにおけるパラメーター設定のミスであり報告する際の確認作業不足によるものであった。

4 まとめ

今回示した事例については、ダイオキシン類分析について一連の内容を熟知した者が分析結果の精査を行った結果判明したものである。序論で記述したとおり、ダイオキシン類の分析は煩雑さ故に高度な技術並びに操作に関する理解が要求されるため、試料の採取から分析、測

定、報告まで一貫した細心の注意が必要である。また分析全般に精通した人間による一連の操作に関する管理も非常に重要である。今後もこれまでに得たノウハウを体系化しつつ、より効率化された精査作業の確立をはかり、精度の保証された分析結果の収集にあたりたい。

5 謝 辞

一連の精査作業を実施するにあたり、御指導並びに御助言を頂きました国立環境研究所橋本俊次主任研究員に深く謝意を表します。またエクセルファイルによる判定基準を作成するにあたり、ロジックの一部を提供して頂きました岐阜県保健環境科学研究所村瀬秀也専門研究員に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 伊藤裕康：第29回日本環境化学会講演会予稿集，pp25 - 32 (2000)
- 2) 伊藤裕康ら：第30，31回日本環境化学会講演会予稿集，pp45 - 54 (2000)
- 3) 柏平伸幸：ぶんせき，10，506 - 512 (2001)
- 4) 堀江祐三：資源環境対策，38，85 - 92 (2002)
- 5) 環境省：ダイオキシン類の環境測定に係る精度管理指針 (2000)
- 6) 環境省：ダイオキシン類の環境測定を外部に委託する場合の信頼性の確保に関する指針 (2001)
- 7) 先山孝則ら：第9回環境化学討論会講演要旨集，p 234 - 235 (2000)

大気汚染物質の走行測定システムについて

Driving measurement system of air pollutant

宮城 英徳 佐藤 信俊 中村 栄一
鈴木 康民

Hidenori MIYAGI, Nobutoshi SATO, Ei-ichi NAKAMURA
Yasutami SUZUKI

キーワード：走行測定，自動車排出ガス，窒素酸化物

Key Words : Air pollutant, Driving measurement system

従来，固定式で使用していた大気汚染測定装置を乗用車に搭載し，測定しながら走行するシステムを製作し，走行測定することにより，市街地の上り坂や，トンネル内の高濃度窒素酸化物汚染状況やこれらの道路における窓開口時走行中の車内における暴露状況などについて確認した。

1 はじめに

本県では，県内の主要道路近傍に設置されている10局の自動車排出ガス自動測定局において，大気汚染物質の測定監視を実施するとともにこれらの測定地点以外の地域については，大気移動測定車を用いて，測定を実施している。しかし，移動測定車の測定装置は大掛かりなものであり，駐車スペースや専用商用電源の確保など，設置場所の選定に制約が生じている。

そこで大気環境監視の一環として簡易かつ任意の場所で測定を可能にするために測定器を乗用車等に搭載し，移動しながら測定するシステムを検討，試作するとともに路上での走行測定を実施したので報告する。

測定器の消費電力は起動時に最大になるが（メーカー仕様最大500W），その後は20W程度となることを確認した。今回使用したUPSは通常使用時（商用電源接続時）は充電しながら放電するタイプのものであり，商用電源を切るとUPS内蔵バッテリー保護機能により，一定電圧まで放電するとUPS電源も落ちる構造となっていた。この電圧は11.0Vであったため，市販のテスターにて電圧を測りながら測定器を稼働させることで，測定中に電源が落ちるのを防ぐことが可能となった。また，UPSに接続するバッテリーを大容量化することで，2台までの測定器接続で2時間の稼働を可能とした。

2 装置

- 電源部 UPS（無停電電源装置）
PICO 2 - 600 C 600VA 450W（GSEE）
- 自動車用鉛蓄電池（バッテリー）
DB50 20CA（日本電池株式会社）
- 測定器 環境大気測定用窒素酸化物計
CLAD - 1000（島津）
- その他 GPS
ハンディ GPS PCGA-GPS 3 VH（ソニー）

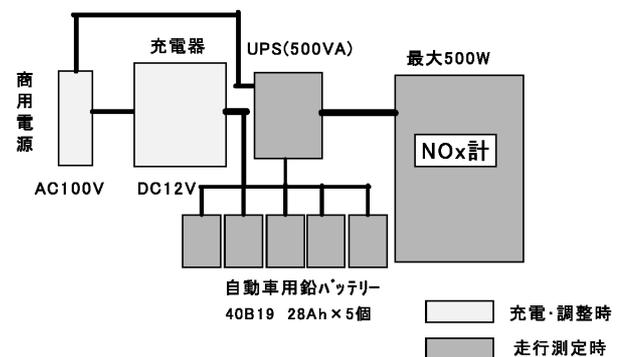


図1 走行測定用電源系

3 結果

3-1 電源システム

まず精密機器である測定器を安定動作させる電源システムの構築として，測定器の稼働時の電力消費量について確認した。商用電源を使用せずに測定器を充電済みのUPSに接続して起動させると一瞬の起動で電源が落ちる。

3-2 測定器の応答時間

実測定時は走行中に測定器の試料採取からデータ出力までの経過時間（応答時間）によりリアルタイムのデータが得られないと考えられるため，測定器の試料ガスに対する応答時間を確認した。濃度の異なる4種類のNO

ガスとゼロガスを10リットルのテドラバッグに取り、試料吸入から結果が出るまでの時間と濃度変化を調べたところグラフに示すとおり、応答時間は15秒から30秒であった。

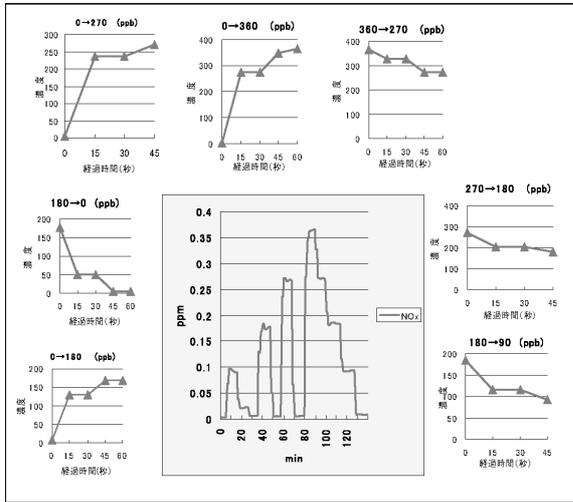


図2 測定器の試料に対する応答時間

3-3 実走行測定結果

実際に乗用車に電源及び測定器を搭載し、走行測定を行った。

(1) 主要道路における実測定結果

車の少ない団地内の道路においてはNOxとして平均で20~30ppbであったのに対し、片側2車線の市内環状線の登坂道路では500~600ppb、自動車専用道路のトンネル内においては、1000ppbを超える値が検出された。



図3 実走行測定経路及び測定値

表1 主な実走行時の道路別NOx濃度

道路	NOx平均値 (ppb)	風向風速	備考
宮城野区安養寺付近	20~30	W.1 5m/s (鶴ヶ谷)	
北環状線南中山	500~600	NW.1 .1m/s (中山)	登り坂
仙台西道路青葉山トンネル内	1200~1300	W.0 9m/s (国設仙台)	

(2) 運転席窓の開閉による車内NOx暴露状況

測定器を2台接続し、車内と車外のNOxを測定しながら、運転席側の窓を開閉して車内のNOx暴露状況を確認したところ、図4に示すとおり窓を開けた状態では車内に一旦取り込まれたNOxは車外に排出されにくい傾向にある等の結果が得られた。

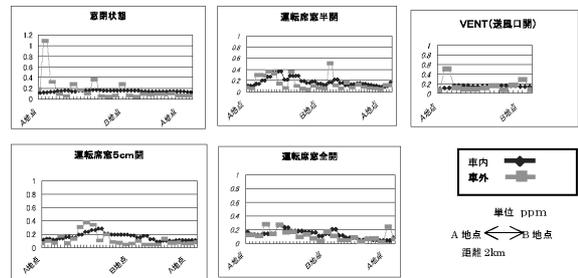


図4 車の車内及び車外におけるNOx動向 (運転席窓開閉時の車内排気ガス暴露状況)

4 今後の対応

今回報告した大気汚染物質の走行測定については、今後も改良を加えるとともに、県内さまざまな道路条件や気象条件下において測定を実施してデータの解析手法を検討し、本県の自動車交通公害の対策等に繋がりたいと考える。

宮城県における大気環境中の多環芳香族炭化水素類の調査結果

Survey of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Ambient Air at Miyagi Prefecture

木戸 一博 佐久間 隆 小泉 俊一
北村 洋子 佐藤 信俊 鈴木 康民

Kazuhiro KIDO, Takashi SAKUMA, Syun-ichi KOIZUMI
Yoko KITAMURA, Nobutoshi SATO, Yasutami SUZUKI

キーワード：多環芳香族炭化水素類 (PAHs), 大気汚染, 浮遊粉塵

Key Words : Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Air Pollution ,
Particulate Matter

宮城県内 4 地点において平成13,14年度の 2 ヶ年間にわたり,芳香環数が 2 環から 6 環の多環芳香族炭化水素類 (PAHs)濃度を測定したところ,各地点とも 4 環以上のPAHsが検出され,2環 3 環のPAHsはほとんど検出されなかった。この原因として今回採取法として用いた石英ろ紙採取法では 2 環 3 環のPAHsが捕集できない可能性が考えられた。また,4 地点ともにPAHs濃度には季節変動がみられ夏に低く,秋季冬季に高くなる傾向がみられた。4 地点における 4 環以上のPAHs成分の挙動は測定地点に係らずほぼ一致しており,各成分間で良い相関が認められた。4 地点のPAHs成分の構成割合は名取が 4 環の割合が大きく他の 3 地点に比べ自動車排ガスの影響がより大きいことが示唆された。

1 はじめに

ベンゾ(a)ピレン (B(a)P)を代表とするPAHsは化石燃料等の燃焼過程で不完全燃焼により生成することが知られている。PAHsの多くは発がん性や変異原性が認められ,また内分泌攪乱物質である疑いが持たれている。B(a)Pは大気汚染防止法の有害大気汚染物質の中で優先取り組み物質に指定されており,宮城県では平成10年度より県内 4 地点においてモニタリングを実施している。さらに,平成13年度からは芳香環が 2 環から 6 環の15種類のPAHsを加え,合計16種類のPAHsについてモニタリングを開始している。今回は宮城県内の大気環境中における16種のPAHsの汚染状況についてその汚染の特徴などについて考察を行なったので報告する。

表 1 EPA610多環芳香族炭化水素16物質

No.	PAHs	濃度	No.	PAHs	濃度
1	Naphthalene	20ppm	9	Benzo(a)anthracene	2 ppm
2	Acenaphthylene	40ppm	10	Chrysene	2 ppm
3	Acenaphthene	20ppm	11	Benzo(b)fluoranthene	4 ppm
4	Fluorene	4 ppm	12	Benzo(k)fluoranthene	2 ppm
5	Phenanthrene	2 ppm	13	Benzo(a)pyrene	2 ppm
6	Anthracene	2 ppm	14	Dibenzo(a,h)anthracene	4 ppm
7	Fluoranthene	4 ppm	15	Benzo(g,h,i)perylene	4 ppm
8	Pyrene	2 ppm	16	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	2 ppm

表 2 調査地点の概要

調査地点	地点分類	備考
大河原町	一般環境	仙南保健福祉事務所屋上
名取市	道路沿道	名取自動車排出ガス測定局
塩釜市	発生源周辺	塩釜一般環境大気測定局
古川市	一般環境	古川一般環境大気測定局

2 方法

2.1 分析対象物質

今回分析対象としたPAHs16種を表 1 に示した。

2.2 分析対象試料

2.2.1 調査地点

県内 4 地点で,その概要を表 2 及び図 1 に示した。

2.2.2 調査期間, 調査頻度

平成13年 4 月から平成15年 1 月までの22 ヶ月間,月に 1 回24時間サンプリングを実施した。

2.2.3 試料の採取及び前処理方

試料の採取および前処理は,環境省の「有害大気汚染



図 1 調査地点

物質測定マニュアル」に準じて行った。すなわち、ハイボリュームエアサンプラーを用いて石英繊維ろ紙（ADVANTEC社製、QR-100）上に700L/minで大気を吸引し、24時間連続採取を行った。粉じん採取後、恒温恒湿で乾燥し速やかに粉じん量の測定を実施した。このろ紙の適量を細かく刻んで、共栓付遠心沈殿管に入れジクロロメタンを10ml加え、超音波発生装置内で15分間超音波をかけた後、1夜放置する。上澄み液1～3mlを分取し窒素気流中で溶媒の大半を揮散させた後1mlのアセトニトリルに再溶解し試験溶液とする。

検量線用の標準液はスベルコEPA610芳香族炭化水素混合標準液（表1）を希釈し、濃度として1～100ng/mlに調整したものをを用いた。

2.2.4 選択イオン検出法（SIM）分析条件

1) 装置

質量分析装置：HP5973質量分析計

ガスクロマトグラフ：HP6890

2) 条件

GCカラム：HP-5MS 5%Phenyl Methyl Silicone

i.d. 0.25mm, 30m, 0.25μm film

カラム温度：60（2min hold）（20 /min）180

（2min hold）（4 /min）230

（10 /min）300（10min hold）

注入口温度：230

注入方法：スプリットレス

キャリアガス：Heガス8 2psi

イオン源温度：230

インターフェイス温度：300

イオン化電圧：70eV

イオン化電流：300μA

モニターイオン：SIMによる定量はそれぞれのPAHの分子イオンをモニターイオンとして用いた。

3) 検出限界値と定量下限値

表3にGC/MS定量における検出限界と定量下限値を表3に示した。

表3 定量下限と検出下限 (ng/m³)

No.	PAHs	検出下限値	定量下限値
1	Naphthalene	0.12	0.41
2	Acenaphthene	0.12	0.41
3	Acenaphthylene	0.10	0.34
4	Fluorene	0.08	0.27
5	Phenanthrene	0.12	0.39
6	Anthracene	0.16	0.53
7	Pyrene	0.07	0.24
8	Fluoranthene	0.12	0.39
9	Chrysene	0.12	0.40
10	Benz(a)anthracene	0.07	0.23
11	Benzo(a)pyrene	0.09	0.29
12	Benzo(k)fluoranthene	0.09	0.29
13	Benzo(b)fluoranthene	0.06	0.20
14	Benzo(ghi)perylene	0.14	0.47
15	Dibenzo(a,h)anthracene	0.13	0.42
16	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0.11	0.37

3 結果と考察

3.1 県内4地点のPAHs測定結果

県内4地点の測定結果を表4に示した。今回調査した16種類のPAHsのうち、No.1は2環、No.2～6は3環、No.7～10は4環、No.11～14は5環、No.15～16は6環の芳

表4 PAHの年間平均値

(ng/m³)

No.	PAHs	名取市		大河原町		古川市		塩釜市	
		H13	H14	H13	H14	H13	H14	H13	H14
1	Naphthalene	-	0.13	0.11	-	-	-	-	-
2	Acenaphthene	-	0.10	-	-	-	-	-	-
3	Acenaphthylene	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Fluorene	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Phenanthrene	-	0.18	-	0.13	-	-	-	0.13
6	Anthracene	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Pyrene	0.20	0.34	0.12	0.16	0.11	0.09	0.09	0.14
8	Fluoranthene	0.75	1.82	0.35	0.67	0.35	0.34	0.28	0.52
9	Chrysene	0.44	0.64	0.20	0.31	0.23	0.17	0.15	0.34
10	Benz(a)anthracene	1.06	1.01	0.58	0.58	0.76	0.36	0.49	0.66
11	Benzo(a)pyrene	0.42	0.70	0.28	0.47	0.37	0.37	0.26	0.62
12	Benzo(k)fluoranthene	0.16	0.25	0.08	0.17	0.10	0.12	0.09	0.22
13	Benzo(b)fluoranthene	1.32	1.75	0.80	0.97	0.95	0.60	0.67	1.23
14	Benzo(ghi)perylene	-	-	-	-	-	-	-	0.16
15	Dibenzo(a,h)anthracene	1.84	2.76	1.31	2.16	1.71	1.64	1.17	3.05
16	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0.43	0.70	0.24	0.44	0.33	0.30	0.23	0.54
	PAHs	6.61	10.4	4.08	6.07	4.92	4.00	3.43	7.47

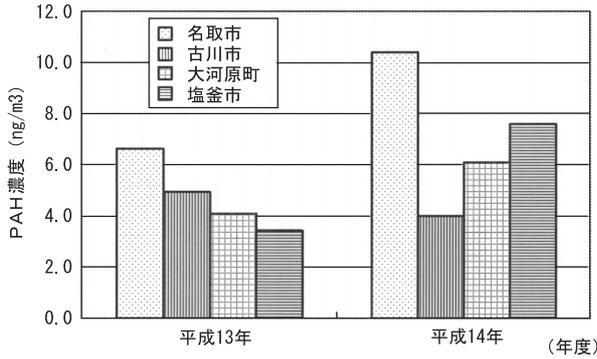


図2 年度別PAHs濃度

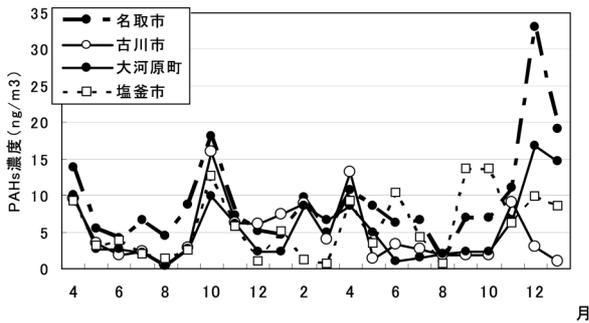


図3 PAHs濃度の経月変化

香環を有する化合物であるが、調査結果は4地点とも2環から3環のPAHsが検出されず、4環から6環のPAHsが検出された。これは2環3環のPAHは大気環境中ではガス状で存在するといわれており¹⁾、今回の石英ろ紙採取法では捕集できなかった可能性がある。

3.2 地点別総PAH濃度

各測定地点での総PAHs濃度を図2に示した。各年度とも道路沿道の名取が最も総PAH濃度が高いことがわかった。この総PAHs濃度の月変動を折れ線グラフにして図3示した。4地点とも8月が最も低く、概ね秋から冬にかけて高くなる傾向がうかがえた。

この原因としては従来から言われている、大気安定度に加えて、冬季は暖房によるPAHs発生の増加が考えられること。さらに春から夏にかけては日射による分解が生じること。また、温度上昇により、PAHsがろ紙から揮散するなどの要因によることが考えられた。

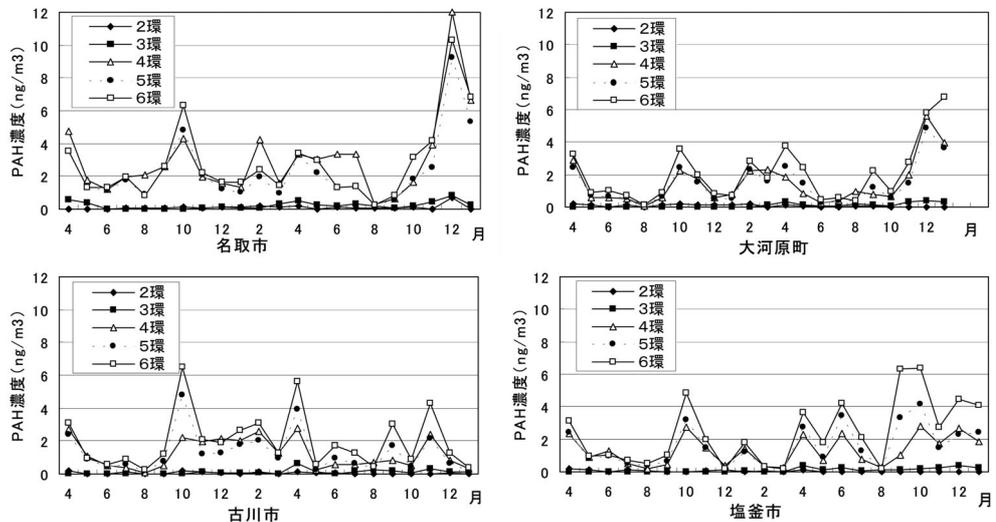


図5 PAHs成分の経月変化

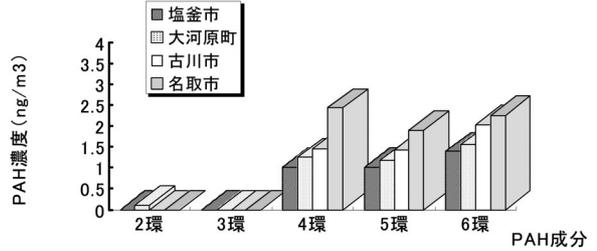


図4.1 PAHs成分の年平均値 (H13)

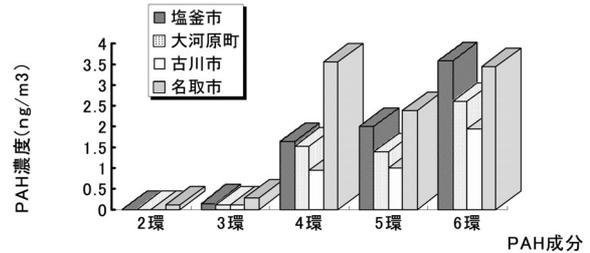


図4.2 PAHs成分の年平均値 (H14)

3.3 PAHsの構成

PAHsは発生源により成分の構成が異なり、ディーゼル排ガスは芳香環が3環4環のものが多く、逆に焼却炉などから排出される排ガスは5環6環の化合物が多い傾向にあるとの報告がある²⁾。図4に平成13年度と14年度のPAHs濃度の年平均値を芳香環数に分けて示した。平成13年度は道路沿道名取は4環が最も高く、他の3地点は6環のPAHsが最も高くなるという結果となった。平成14年度も同様の結果が得られ測定地点によってPAHsの構成が異なることがわかった。

3.4 PAH成分の経月変化

PAHsの構成が測定地点や測定年度で異なることがわかったので、PAHs成分が月毎にどのように変化するかを折れ線グラフにして表した(図5)。これを見ると、4環以上のPAHs成分の挙動は測定地点に係らずほぼ一

致しており、相関性が高いことが伺えた。

3.5 PAH成分の相関

PAHs成分の経月変化で4環以上のPAHs成分の挙動は測定地点に係らずほぼ一致しており、相関性が高いことが伺えたので、4地点毎にPAHs成分間の相関を求めた。相関はNDであった2環3環と6環のベンゾ(a)アントラセンを除いた4環以上のPAH間で求めた。結果を表5に示した。PAHsの各成分間には互いに良い相関が認められることが従来より報告されている³⁻⁴⁾。今回の調査でもPAHs成分間には非常に良い相関があることが確認された。

3.6 PAHの構成割合

4環以上のPAHs成分の挙動は測定地点に係らずほぼ一致しており、更に相関性も高いことから、年度ごとに測定地点のPAHsの構成比でみた(図6)。これをみると4地点ともPAHsの構成割合がほぼ同じであることがわかった。ただ名取が4環の割合が他の3地点に比べると多くなっており、自動車排気ガスの影響がより大きいことが示唆された。

4 ま と め

県内4地点のPAHs濃度を測定したところ、各地点とも4環以上の化合物が検出され、2

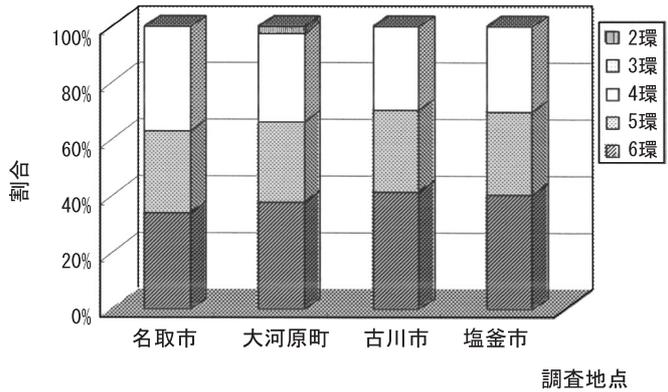


図6.1 PAHs成分比(H13)

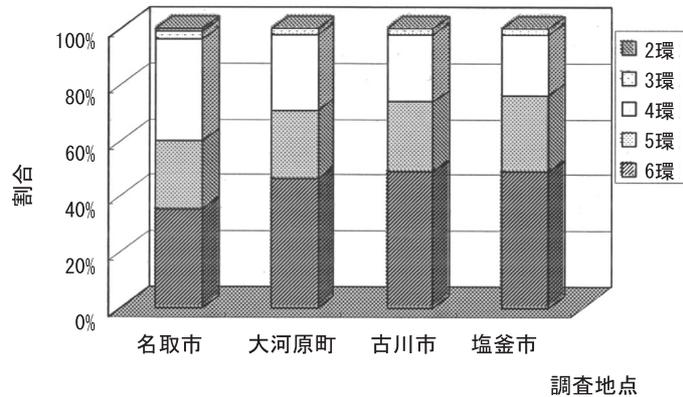


図6.2 PAHs成分比(H14)

表5 PAH間の相関

名取 件数 = 22									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 Pyrene	1								
2 Fluoranthene	0.974**	1							
3 Chrysene	0.886**	0.892**	1						
4 Benz(a)anthracene	0.787**	0.715**	0.906**	1					
5 Benzo[a]pyrene	0.867**	0.859**	0.959**	0.903**	1				
6 Benzo[k]fluoranthene	0.875**	0.866**	0.948**	0.869**	0.971**	1			
7 Benzo[b]fluoranthene	0.851**	0.845**	0.979**	0.917**	0.959**	0.953**	1		
8 Benzo[ghi]perylene	0.820**	0.805**	0.947**	0.896**	0.974**	0.939**	0.966**	1	
9 Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.828**	0.830**	0.953**	0.874**	0.984**	0.951**	0.960**	0.985**	1
	*p<0.05		**p<0.01						

古川 件数 = 22									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 Pyrene	1								
2 Fluoranthene	0.989**	1							
3 Chrysene	0.825**	0.844**	1						
4 Benz(a)anthracene	0.813**	0.775**	0.899**	1					
5 Benzo[a]pyrene	0.699**	0.730**	0.844**	0.720**	1				
6 Benzo[k]fluoranthene	0.735**	0.789**	0.780**	0.559**	0.877**	1			
7 Benzo[b]fluoranthene	0.612**	0.625**	0.871**	0.806**	0.938**	0.737**	1		
8 Benzo[ghi]perylene	0.694**	0.728**	0.883**	0.742**	0.973**	0.860**	0.944**	1	
9 Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.651**	0.685**	0.896**	0.759**	0.956**	0.830**	0.957**	0.990**	1
	*p<0.05		**p<0.01						

大河原 件数 = 22									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 Pyrene	1								
2 Fluoranthene	0.914**	1							
3 Chrysene	0.794**	0.928**	1						
4 Benz(a)anthracene	0.863**	0.867**	0.923**	1					
5 Benzo[a]pyrene	0.840**	0.911**	0.906**	0.909**	1				
6 Benzo[k]fluoranthene	0.728**	0.891**	0.925**	0.823**	0.937**	1			
7 Benzo[b]fluoranthene	0.834**	0.907**	0.945**	0.959**	0.948**	0.881**	1		
8 Benzo[ghi]perylene	0.806**	0.906**	0.855**	0.836**	0.943**	0.867**	0.933**	1	
9 Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.759**	0.919**	0.901**	0.820**	0.912**	0.886**	0.931**	0.976**	1
	*p<0.05		**p<0.01						

塩釜 件数 = 22									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 Pyrene	1								
2 Fluoranthene	0.976**	1							
3 Chrysene	0.614**	0.747**	1						
4 Benz(a)anthracene	0.778**	0.825**	0.869**	1					
5 Benzo[a]pyrene	0.681**	0.791**	0.888**	0.854**	1				
6 Benzo[k]fluoranthene	0.537**	0.675**	0.830**	0.667**	0.921**	1			
7 Benzo[b]fluoranthene	0.619**	0.733**	0.900**	0.847**	0.929**	0.805**	1		
8 Benzo[ghi]perylene	0.579**	0.714**	0.874**	0.770**	0.946**	0.876**	0.943**	1	
9 Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.567**	0.691**	0.841**	0.765**	0.931**	0.835**	0.939**	0.979**	1
	*p<0.05		**p<0.01						

環3環のPAHsはほとんど検出されなかった。この原因として今回採取法として用いた石英ろ紙採取法では2環3環のPAHsが捕集できない可能性が考えられた。また、4地点ともにPAHs濃度には季節変動がみられ夏に低く、秋季冬季に高くなる傾向がみられた。4地点における4環以上のPAH成分の挙動は測定地点に係らずほぼ一致しており、各成分間で良い相関が認められた。4地点のPAH成分の構成割合は名取が4環の割合が大きく、他の3地点に比べ自動車排ガスの影響がより大きいことが示唆された。

5 参 考 文 献

- 1) 吉岡等：環境大気における多環芳香族炭化水素の濃度と推移（第4報）. 東京都環境科学研究所年報（1996）
- 2) 小田等：多環芳香族炭化水素のプロファイルによる粉じんの発生源特性の評価．環境化学討論会講演要旨集．Vol 8（1999）
- 3) 小田等：相対保持時間指標を用いるキャピラリーガスクロマトグラフィー/質量分析法による大気粉じん中の多環芳香族炭化水素の分析．BUNSEKI KAGAKU Vol 45．No.9（1996）
- 4) 安藤等：川崎市における大気中揮発性有機化合物の調査．川崎市公害研究所年報．Vol 25（1999）

交通騒音評価管理システムの実証的検討について －類型化の妥当性－

The Substantiate of Estimation and Management System on Roadside Noise - The Validity of Classification -

菊地 英男 高橋 誠幸 鈴木 康民

Hideo KIKUCHI, Seiko TAKAHASHI, Yasutami SUZUKI

キーワード：環境騒音，沿道騒音，等価騒音レベル，評価管理システム，類型化

Key Words：Environmental Noise，Roadside Noise， L_{Aeq} ，Estimate and Management System，Classification

環境騒音の測定・評価については「騒音に係る環境基準の評価マニュアル」に基づき行うこととなっている。この評価マニュアルによると、幹線交通を担う道路について、道路端から50mの区域内に存在する住宅を評価対象とし、道路に面する地域に係る環境基準の達成状況を把握することになっている。本県においては、平成12年度から13年度にかけて地理情報システム（GIS）を用いた、交通騒音評価管理システムを構築した。このシステムにより求めた評価値が、地域の騒音レベルの実態を反映したものであるか否か時間区分毎に検討した結果、 L_{Aeq} について予測値と実測値の相関係数が $R=0.7$ 以上とよい相関が得られたが、 L_{Aeq} が低くなるほど両者のレベル差が大きくなり、予測値が高くなる傾向があった。また、類型化の妥当性については、道路交通センサスにより交通量を観測していない地点を除くと、予測値と実測値のレベル差の標準偏差は3dB程度であり地域の実態を反映しているものと思われた。

1 目 的

平成10年9月に「騒音に係る環境基準」が改訂され、評価手法が従来の中央値（ L_{50} ）から、等価騒音レベル（ L_{Aeq} ）に変更になり、翌年4月から施行されている。

また、平成12年4月には環境庁（現環境省）から技術的助言として「騒音に係る環境基準の評価マニュアル」が示され、これに基づき環境騒音の測定・評価を行うことになっている。このマニュアルによると、幹線交通を担う道路については、道路端から50mの区域内に存在する住居を評価対象とし、道路に面する地域に係る環境基準の達成状況の把握を行うことになっている。

このため、本県では平成12年度から平成13年度にかけて地理情報システム（GIS）を用いた、交通騒音評価管理システム（以下「評価管理システム」という。）を構築した。このシステムにより求めた評価値が、地域の騒音レベルの実態を反映したものでなければ適切な評価がなされず、騒音低減対策が効率的に行えない等が考えられるため、当該システムの精度等について検討する必要がある。

2 調 査 方 法

主要幹線道路における道路交通騒音の評価を、道路端から50mの範囲について面的に行うため、当該評価シス

テムでは対象とする評価区間について、道路構造、交通量、指定最高速度等のパラメータにより類型化している。その類型化が実態を反映したものであるか否かについて妥当性を検討するため、代表的な分類を選定して、道路沿道における等価騒音レベル（以下「 L_{Aeq} 」という。）等を10分間隔で24時間連続測定した。

測定は、積分型騒音計（リオン^株製、NL-06）を三脚に取り付け、対象とする道路交通騒音を測定できる民家の庭に高さ約1.5mで設置し、24時間後に回収した。この時、積分型騒音計の設定は、動特性をFast、周波数補正回路をA特性とした。

3 調査対象評価区間の状況

本県内における主要幹線道路沿道について304評価区間を設け36類型に分類している。今回はその内、類型2、6、24、33の4つの類型を調査対象とし、現地調査により測定可能であった区間、及び委託業務である「平成14年度自動車交通騒音実態調査」から今回の調査対象とした類型内のデータを抽出した結果、類型2が13区間、類型6が2区間、類型24が13区間、類型33が17区間の計45評価区間が検討の対象となった。

表1に対象とした評価区間の概要を示す。類型2と6は4車線、他は2車線であり、指定最高速度は20～50km/h

であった。路面については、ほとんどが一般のアスファルト舗装で排水性舗装が6区間あった。交通センサスによる時間区分毎の12時間交通量を基に、大型車を4.47倍（音響エネルギーとして小型車と等価換算した）し、全て小型車とした場合の12時間換算交通量は、昼間で689台～81,755台、夜間で122台～43,292台、又、大型車混入率は昼間4.3%～41.6%、夜間3.2%～50.9%であった。

4 調査測定結果及び考察

4.1 排水性舗装の効果

今回の調査において、排水性舗装が5区間あった類型2を対象としてその低減効果について検討した。一般舗装と排水性舗装について評価区間毎及び時間区分毎に L_{Aeq} の予測値（式(1)による）を求め、舗装の種類毎に平均

表1 調査対象とした評価区間の状況

類型	評価区間	速度	換算交通量		大型混入率		舗装区分	
			昼間	夜間	昼間	夜間		
2	4066-1	50	41,731	12,802	14.5	15.9	一般	
	34023-1	50	41,731	12,802	14.5	15.9	一般	
	31035-1	50	36,845	13,489	8.6	7.8	排水性	
	1036-1	50	33,894	12,670	9.9	9.0	一般	
	1019-2	50	32,446	19,327	21.6	38.7	一般	
	1018-1	50	41,977	28,666	21.2	37.5	一般	
	1017-1	50	37,423	24,775	17.5	30.6	排水性	
	1017-2	50	81,783	43,292	18.4	27.1	一般	
	34019-1	50	58,052	17,942	18.0	19.8	排水性	
	4019-1	50	46,608	17,859	13.3	15.1	一般	
	4019-2	50	46,608	17,859	13.3	15.1	排水性	
	1008-1	50	52,099	26,176	23.2	35.2	一般	
	1007-1	50	41,501	27,429	25.2	50.9	排水性	
	6	4022-1	50	13,000	4,009	16.0	17.6	一般
		6145-1	50	8,735	1,838	6.1	5.2	一般
1038-2		40	14,288	5,259	7.3	6.2	一般	
4012-1		30	14,256	4,394	21.1	23.1	一般	
4124-1		40	11,855	3,599	7.6	8.5	一般	
46040-1		30	9,840	2,972	7.7	8.3	一般	
4025-1		40	10,316	3,187	11.7	13.1	一般	
4134-1		40	14,909	4,033	9.8	8.9	一般	
24	6012-1	40	15,078	3,815	10.1	4.5	一般	
	46043-2	30	14,495	3,688	9.0	4.1	一般	
	46039-1	30	14,495	3,688	9.0	4.1	一般	
	4028-1	40	11,185	3,030	8.5	7.7	一般	
	31015-1	30	10,852	4,730	6.3	5.8	一般	
	6013-1	40	11,935	3,419	18.0	30.0	一般	
	6023-2	40	14,657	3,062	11.6	9.9	一般	
	46013-1	20	1,464	361	6.7	10.6	排水性	
	46029-1	40	1,551	401	7.3	12.0	一般	
	6040-1	40	1,551	336	7.3	7.0	一般	
33	66059-1	40	2,344	513	9.1	9.3	一般	
	46034-1	40	2,227	502	41.6	46.1	一般	
	66068-1	30	1,182	264	9.0	9.6	一般	
	4093-1	40	1,750	518	5.8	5.8	一般	
	4093-2	40	1,750	518	5.8	5.8	一般	
	46032-1	40	2,254	476	9.7	8.8	一般	
	46017-1	20	1,464	382	6.7	3.2	一般	
	1122-1	40	941	356	14.8	14.9	一般	
	46016-1	40	1,464	382	6.7	3.2	一般	
	4082-1	40	2,122	636	7.5	8.3	一般	
64079-1	40	1,419	369	4.3	3.7	一般		
66091-1	40	910	163	6.1	5.1	一般		
6096-1	40	1,464	304	6.7	6.0	一般		
66055-1	40	689	122	4.9	3.7	一般		

値を算出した結果を表2に示す。

一般舗装における予測値と実測値の差は L_{Aeq} 平均値で昼間1.1dB、夜間0.3dBであった。これに対して、排水性舗装の予測値と実測値の差は L_{Aeq} 平均値で昼間2.7dB、夜間1.8dBであった。このことから、一般舗装と排水性舗装の L_{Aeq} 平均値の差を見ると、昼間1.6dB、夜間1.5dBとなっており、時間区分に関係なく約1.5dBの低減効果があるものと思われる。

一般に、排水性舗装の効果は、敷設後半年以内では3dB程度であり、経年的に騒音低減効果が悪化し、40ヶ月程度で効果が期待できなくなる¹⁾とされていることから、今回対象とした区間は平均的に約2年程度経過しているものと思慮される。

ただし、測定地点が少ないこともあり、交通量との関係等明確でない部分があることから今後データの蓄積が必要と思われる。

表2 L_{Aeq} の予測値と実測値の差の平均値等

項目	一般舗装		排水性舗装	
	昼間	夜間	昼間	夜間
L_{Aeq} 平均値	1.1	0.3	2.7	1.8
標準偏差	1.9	2.7	3.1	2.6
n	8	8	5	5

注：nを除き、単位はdBである。

4.2 実測値と予測値の関係

今回検討の対象とした45区間について、実測値と予測値の関係を見るために、全区間の予測値を算出した。予測値の算出方法については、道路交通騒音予測モデル“ASJ Model 1998”²⁾を用いた。

一般道路では多くの信号交差点によって、自動車が加減速を伴っており、通常60km/h以下の低速走行であり、一定速度で走行しているように見えても、車両によっては使用するギヤ位置が異なっている可能性が大であることから、ここでは、自動車が非定常走行状態であるとし、式(1)により予測値を算出した。

$$L_{Aeq,T} = A - 10 \log_{10} l + 10 \log_{10} N_T + 10 \log_{10} (3.6 / 2 T) \dots (1)$$

ここで、A：回帰係数（大型車89.8，小型車82.3）

$L_{Aeq,T}$ ：等価騒音レベル（dB(A)）

l：車線中心からの距離（m）

N_T ：交通量（台）

T：対象とする時間（秒）

この式を用いて得られた時間区分毎の L_{Aeq} 予測値のうち、4.1で検討した結果から、排水性舗装については一般舗装と区別して考える必要がある。このため、ここでは一般舗装区間を対象として予測値と実測値の関係を求めた結果を表3に示す。その結果、昼間の L_{Aeq} は予測値68.0dB、実測値66.1dBと約2dB予測値が高い、夜間について

は予測値62.7dB, 実測値59.3dBと約3.5dB予測値が高かった。

また、標準偏差について見ると、昼間は予測値と実測値とも4.7~4.9dBとはほぼ同じであるが、夜間は予測値5.6dBに対し実測値が7.8dBと実測値が約2dB大きかった。このことは、昼間についてはレベル範囲を予測値が実測値を良く説明しているが、夜間については実測値のレベル範囲を説明しきれていないことを表しているものと思われる。なお、相関係数を見ると昼間の相関係数は $R = 0.710$ 、夜間は $R = 0.818$ と昼間より夜間の相関係数が高くなっている。

次に、時間区分毎に予測値と実測値の関係を図1及び図2に示す。この図から、 L_{Aeq} は昼間75dB, 夜間70dB付近を境に L_{Aeq} が小さくなるほど予測値と実測値の差が大きくなる傾向があることが判る。

なお、交通センサス対象道路では一部交通量の観測を行わない区間があり、その区間については他の区間において観測した値を用いて推定している。この場合は実際の交通量を反映していない可能性があるため、これらの区間を除いて、時間区分毎に L_{Aeq} 平均値の実測値と予測値の関係を求めた結果を表4に示す。その結果、 L_{Aeq} 平均値については、昼間の予測値が68.5dB, 実測値が67.1dB, 夜間の予測値が63.3dB, 実測値が60.7dBと予測値と実測値の差が昼間で1.4dB, 夜間で2.6dBの差であり、特に夜間が約1dB改善されている。標準偏差は大きく変化がなかったが、予測値と実測値の相関係数が昼間夜間とも0.1程度改善されている。

表3 時間区分毎の標準偏差等 (排水性舗装区間を除く)

項目	昼間		夜間	
	予測	実測	予測	実測
L_{Aeq} 平均値	68.0	66.1	62.7	59.3
標準偏差	4.7	4.9	5.6	7.8
データ数	39	39	39	39
相関係数	0.710		0.818	

注：データ数と相関係数以外の単位はdBである。

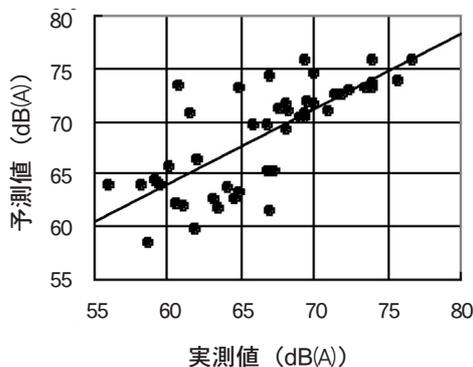


図1 実測値と予測値の関係 (昼間)
(排水性舗装除外)

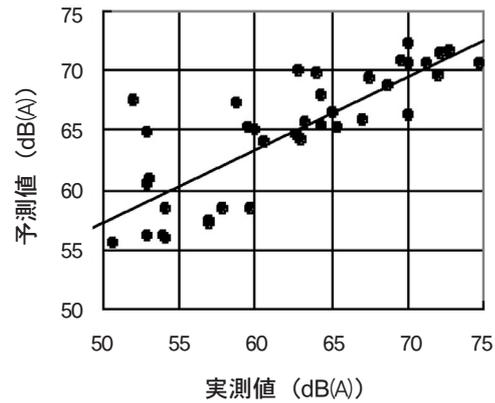


図2 実測値と予測値の関係 (夜間)
(排水性舗装除外)

次に、時間区分毎に予測値と実測値の関係を図3及び図4に示す。図1及び図2と比較すると、全体にばらつきが小さくなり、予測値と実測値が若干近づいて来るが、 L_{Aeq} が小さくなるほど、推定値と実測値のレベル差が大きくなる傾向は同じである。

表4 時間区分毎の標準偏差等
(排水性舗装及び交通量未観測区間を除く)

項目	昼間		夜間	
	予測	実測	予測	実測
L_{Aeq} 平均値	68.5	67.1	63.3	60.7
標準偏差	4.8	4.8	5.7	7.6
データ数	33	33	33	33
相関係数	0.802		0.894	

注：データ数と相関係数以外の単位はdBである。

ここで、 L_{Aeq} が小さいほど実測値に対し予測値が大きくなる原因としては、予測式のパラメータである交通量が、交通センサス調査の場合は昼間7:00~19:00, 夜間19:00~7:00を対象としているのに対し、環境基準における時間区分は昼間6:00~22:00, 夜間22:00~6:00となっており、対象とする時間区分が異なり、特に夜間については、環境基準における夜間の交通量を充分反映しておらず過大に見積っている可能性が示唆される。

4.3 類型化の妥当性の検討

次に、類型化の妥当性を検討するために、各類型について時間区分ごとの L_{Aeq} の実測値と予測値のレベル差を表5に示す。

初めに排水性舗装及び交通量未観測区間を含めて検討する、4車線である類型2と類型6については、実測値と予測値のレベル差の平均値は、予測値の方に0.7~2.5dBずれており、標準偏差は1.3~2.5dB程度であった。2車線である類型24と類型33については、レベル差の平均値が予測値のほうに1.6~5.3dBずれており、標準偏差は3.4~5.1dBと4車線よりバラツキの大きいことが判った。

表5 予測値と実測値のレベル差の標準偏差等

車線数	類型	項目	時間区分	
			昼間	夜間
4車線	2	L _{Aeq} 平均値	2.5	1.7
		標準偏差	2.3	2.5
		データ数	13	13
	6	L _{Aeq} 平均値	0.7	1.1
		標準偏差	1.9	1.3
		データ数	2	2
2車線	24	L _{Aeq} 平均値	4.8	5.2
		標準偏差	3.7	5.1
		データ数	13	13
	33	L _{Aeq} 平均値	1.6	5.3
		標準偏差	3.4	4.0
		データ数	17	17

注：平均値の単位はdBである。

次に、調査対象とした地点のうち、類型24と類型33については、交通センサで交通量を観測せずに推定している地点があり、実態を反映しているとはいえないことから、これらの区間を除いて再度比較した結果を表6に示す。

類型24ではレベル差の平均値が昼間で1.2dB、夜間で1.6dB小さくなり、予測値とのレベル差が1dB程度改善されている。又、類型33のレベル差の平均値は昼間、夜間と

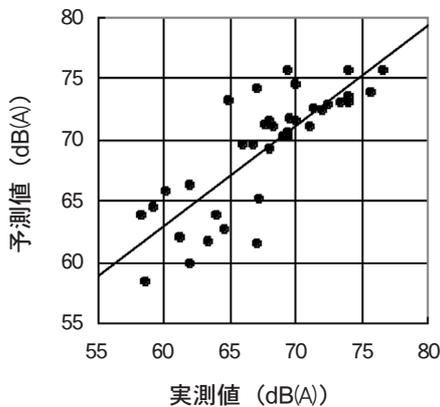


図3 実測値と予測値の関係（昼間）
(排水性舗装、交通量未観測区間除外)

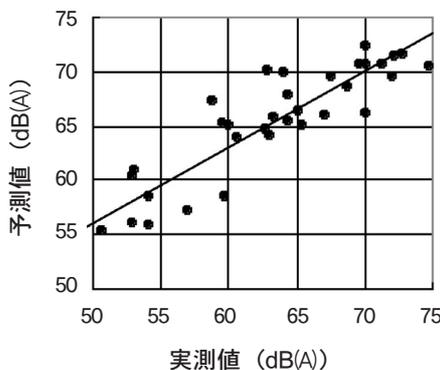


図4 実測値と予測値の関係（夜間）
(排水性舗装、交通量未観測区間除外)

もほとんど変わらないが、夜間の標準偏差が約2.6dBと1.4dB改善されている。

この結果、今回検討対象とした4類型については、類型内の実測値と予測値の差の標準偏差が3dB程度であり、予測値は実測値を反映しているものと思われる。

なお、本県において構築した評価管理システムによる環境騒音の面的評価は予測式を用いて行われているため、各評価区間の交通量が実態を反映したものであれば、予測値は実測値を充分反映するものと思われる。

表6 予測値と実測値のレベル差の標準偏差等
(交通量未観測区間除く)

車線数	類型	項目	時間区分	
			昼間	夜間
2車線	24	L _{Aeq} 平均値	3.6	3.6
		標準偏差	2.6	3.6
		データ数	11	11
	33	L _{Aeq} 平均値	1.2	5.0
		標準偏差	3.3	2.6
		データ数	11	11

注：平均値の単位はdBである。

5 まとめ

測定調査を行った評価区間のうち、4車線における排水性舗装と一般舗装の時間区分毎のL_{Aeq}を比較したところL_{Aeq}平均値で約1.5dBの騒音低減効果が見られたが、詳細に検討するためには今後データの蓄積が必要と思われる。

対象評価区間における、時間区分毎のL_{Aeq}の予測値と実測値の関係については、昼間、夜間とも相関係数R=0.7以上であり良い相関があるといえるが、L_{Aeq}が低いほど両者のレベル差が大きくなり、予測値が高くなる傾向があった。これは、交通センサと環境基準で対象とする時間区分が異なっており、特に夜間における時間区分が大きく異なるためと思われる。

最後に、当該システムの類型化の妥当性については、4つのタイプの道路端におけるL_{Aeq}の予測値と実測値の標準偏差を比較したところ、1.3dB～5.1dBであった。ただし、交通センサにより交通量を観測していない地点を除外して検討した結果では、標準偏差が3dB程度であることから、評価区間内の予測値は実測値を反映しているものと思われる。ここで、交通量を観測していない区間について、実態を反映した交通量の推定を行うことにより類型化の妥当性が確認された。

参考文献等

- 1) (財)日本自動車研究所 シンポジウム「道路交通騒音低減のための総合的取り組み」2002.11.6
- 2) (社)日本音響学会 道路交通騒音の新たな予測法“ASJ Model 1998”日本音響学会第10回音響技術セミナー 1999.6.22 (仙台)

豚舎臭気のおゾン脱臭実態調査

Investigation on Deodorization of Pigsty using Ozone

新垣 康秀 小野 研一 鈴木 康民

Yasuhide ARAGAKI, Kenichi ONO, Yasutami SUZUKI

キーワード：豚舎，オゾン，脱臭，臭気排出強度

Key Words : Pigsty , Ozone , Deodorization , Odor Emission Rate

豚舎から発生する臭気をオゾンを用いて脱臭を行っている2施設について脱臭効果等を調査した。1施設から脱臭処理前の臭気を採取して処理後と比較したが、オゾンによる脱臭効果は確認できなかった。また、2施設とも、オゾンによって悪臭苦情が発生しないレベル(臭気排出強度 10^5 未満(m^3/min))まで脱臭することは困難であることが推察された。

1 はじめに

本県における畜産農業に関する悪臭苦情は、例年サービス業について多い件数を占めている。しかし、畜産農業で脱臭設備を有している事業場は殆どなく、多くの事業場では糞尿処理、給餌、消臭剤の散布等の工夫により悪臭の発生を抑制している。

近年、県内の養豚業者の中には、豚舎等から発生する臭気に対しオゾンを用いて脱臭する事業者が多くなってきているが、その効果については殆ど検証されていない。今回、オゾンを用いて脱臭を行っている豚舎2施設について脱臭効果等を調査した。

2 方法

2.1 調査期間

平成13年7月～平成14年10月

2.2 調査対象施設

オゾンガス及びオゾン水脱臭を実施しているA施設(離乳豚舎)、オゾンガス脱臭のみ実施しているB施設(同一棟に子豚と母豚を飼養)の計2施設を選定した。

表1にその概要を示す。

豚舎形態は2施設とも密閉式であり、飼養頭数はA施設が平均で子豚約3,450頭、B施設が子豚1,400頭、母豚320頭であった。飼育密度はA施設が平均 0.90 (頭/ m^2)、B施設が 0.66 (頭/ m^2)でA施設の方が高くなっていった。

豚舎の清掃状況は両施設とも良好であり、また、除糞方式は糞尿を分離し、糞のみスクレーパーで1日3～4回豚舎から掻きだす方式を両施設とも採っていた。

脱臭対策としては、A施設はオゾン発生機で発生させたオゾンブロアで連続的に豚舎内の排気ダクト入口付近に送気(オゾンガス濃度約4ppm)するとともに、オ

ゾン水(オゾンバブリングした水、水中オゾン濃度約 $0.5\text{mg}/\ell$)を間欠的に豚舎内でミスト状に噴霧していた。なお、オゾンガス濃度は排気ダクト出口で「日本産業衛生学会許容濃度委員会」で定められた労働環境における抑制濃度である 0.1ppm を目標に調整していた。

B施設は、オゾン発生機で発生させたオゾンブロアで連続的に豚舎通路及び反応室(機械室を代用)に送気(オゾンガス濃度約2～4ppm)しており、排気ダクト出口で $0.05\sim 0.1\text{ppm}$ の範囲内で調整していた。

表1 豚舎概要

項目 \ 施設名	A 施設	B 施設
豚舎形態	密閉式	密閉式
豚舎面積 (m^2)	1,275	1,920
飼養頭数 (頭)	子豚2,835～ 3,640 (3,453)	子豚1,400 母豚 320
飼育密度 (頭/ m^2) ¹⁾	0.74～0.95 (0.90)	0.66
清掃状況	良好	良好
除糞方式	スクレーパー	スクレーパー
脱臭方式	オゾンガス、オゾン水脱臭	オゾンガス脱臭

1) 母豚25頭、肥育豚1頭、子豚1/3頭で計算(高原康光他:臭気排出強度による養豚農家の悪臭発生量評価,臭気の研究,32,(3),23(2001)から引用)

2.3 測定方法

豚舎の排気ダクト出口等において、試料ガスをフレックスポンプ（近江オドエアサーピス^(株)製DC型）を用いてアルミコーティング製バッグ（同社製Flek-Sampler20D）及びテドラーバッグに採取し、臭気指数（五点比較式臭袋法及び三点比較式臭袋法）、トリメチルアミン、硫黄系悪臭4物質及び低級脂肪酸4物質を宮城県公害防止条例及び悪臭防止法に定める方法に準じて測定した。また、アンモニア及びオゾン濃度については、検知管（^(株)ガステック製）で測定した。

3 結果及び考察

3.1 臭気等測定結果

表2に臭気等測定結果の総括表を示す。

A施設においては、6月から11月にかけて5回測定した。

オゾンガス及びオゾン水処理後の臭気指数（五点比較式臭袋法）は18～24の範囲にあり、参考値として示す宮城県公害防止条例の悪臭に係る換気口の規制基準（臭気指数25）を全て満足していた。

しかし、臭気排出強度（OER）は $10^5 \sim 10^6$ （ $\text{m}^3\text{N}/\text{min}$ ）のレベルにあり、重田¹⁾の示した経験則に当てはめると、「現在、小規模の公害が起こっているか、その可能性を内在している。」に該当した。また、図1に示すように、臭気排出強度（OER）及び排ガス量は、夏季に比べて気温の低い秋季に低い傾向が見られた。

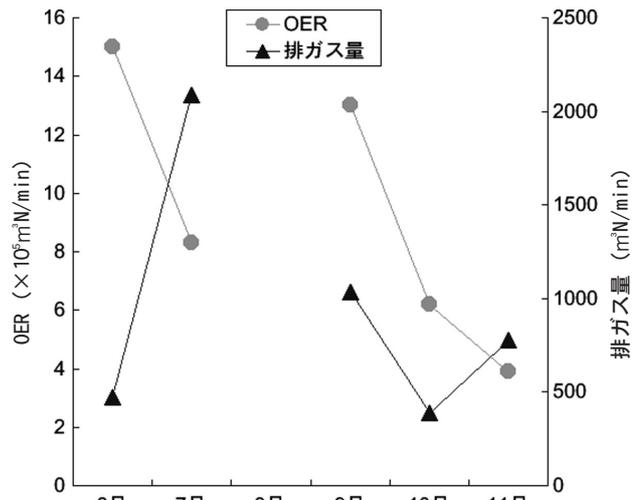


図1 臭気排出強度及び排ガス量の推移

B施設においては、7月から9月にかけて3回測定した。

オゾンガス処理後の臭気指数（五点比較式臭袋法）は24～31の範囲にあり、参考値として示す換気口の規制基準（臭気指数25）を満足していたのは1回のみであった。また、臭気排出強度は $10^6 \sim 10^7$ （ $\text{m}^3\text{N}/\text{min}$ ）のレベルにあり、上記のA施設より臭気の発生量は多くなっていった。

なお、当該施設ではオゾンガス処理前の臭気が採取できたので処理後と比較したところ、オゾンガスによる脱臭効果は確認できなかった。

表2 臭気等測定結果総括表

項目	A施設（オゾンガス、オゾン水処理後） (n = 5)		B施設（オゾンガス処理後） (n = 3)		B施設（オゾンガス処理前） (n = 3)	
		閾希釈倍数 ¹⁾		閾希釈倍数 ¹⁾		閾希釈倍数 ¹⁾
温度 ()	22～35 (27)	-	26～30 (28)	-	25～30 (28)	-
臭気指数 (五点比較式臭袋法)	18～24 (21)	-	24～31 (27)	-	23～30 (27)	-
臭気指数 (三点比較式臭袋法)	26～35 (30)	-	35～43 (38)	-	31～37 (34)	-
アンモニア (ppm)	1.5～12.5 (6.7)	15～125 (67)	8.0～17.5 (14.2)	80～175 (142)	16.5～17.5 (17.0)	165～175 (170)
硫化水素 (ppm)	<0.001～0.017 (0.003)	<2～34 (7)	0.099～0.140 (0.116)	198～280 (233)	0.297～0.335 (0.316)	594～670 (632)
メチルメルカプタン (ppm)	<0.001～0.018 (0.004)	<10～180 (36)	<0.001～0.055 (0.033)	<10～550 (327)	0.040～0.077 (0.058)	400～770 (585)
硫化メチル (ppm)	<0.001～0.015 (0.003)	<10～150 (30)	<0.001～0.079 (0.037)	<10～790 (373)	0.026～0.044 (0.035)	260～440 (350)
二硫化メチル (ppm)	<0.001～0.003 (<0.001)	<3～10 (<3)	<0.001～0.038 (0.013)	<3～127 (42)	<0.001～0.004 (0.002)	<3～13 (7)
トリメチルアミン (ppm)	<0.0005～0.0306 (0.0072)	<5～306 (72)	0.0215～0.0714 (0.0394)	215～714 (394)	0.0173～0.0610 (0.0392)	173～610 (392)
プロピオン酸 (ppm)	<0.0005～0.0159 (0.0084)	<1～8 (4)	<0.0005～0.0167 (0.0066)	<1～8 (3)	<0.0005～0.0011 (0.0006)	<1
ノルマル酪酸 (ppm)	<0.0005～0.0244 (0.0090)	<7～349 (128)	<0.0005～0.0204 (0.0072)	<7～291 (103)	<0.0005～0.0014 (0.0007)	<7～20 (10)
ノルマル吉草酸 (ppm)	<0.0005～0.0078 (0.0022)	<5～78 (22)	<0.0005～0.0031 (0.0010)	<5～31 (10)	<0.0005	<5
イソ吉草酸 (ppm)	<0.0005～0.0100 (0.0026)	<10～200 (51)	<0.0005～0.0027 (0.0009)	<10～54 (18)	<0.0005～0.0006 (<0.0005)	<10～12 (<10)
オゾン (ppm)	0.01～0.15 (0.09)	-	<0.01～0.1 (0.05)	-	-	-
臭気排出強度 ²⁾ ($\times 10^5 \text{ m}^3\text{N}/\text{min}$)	3.9～15 (9.3)	-	20～190 (79)	-	-	-

注) 項目の欄は最小～最大(平均)を示す

1) 検出濃度 / 閾値濃度 (臭気強度1に相当)

2) 臭気濃度 \times 排ガス量 ($\text{m}^3\text{N}/\text{min}$)

松永ら²⁾は硫黄系悪臭物質を例にとり、オゾンガスでこれらの物質を酸化分解するには、数分から数百分の接触時間（オゾンガス濃度 1 ppmで硫黄系悪臭物質濃度 1 ppmが半減するまでの接触時間は、硫化水素 9分、メチルメルカプタン及び二硫化メチル220分、硫化メチル20～120分）が必要であることを報告しており、当該施設の接触時間を計算したところ20秒前後（オゾンガスを送気する通路及び反応室の容積及び排ガス量から計算）しかないので、臭気物質が殆ど酸化分解されなかったものと推察された。

3.2 悪臭原因物質の推定

表 2 に示してあるオゾン処理後の閾希釈倍数の平均値の総和からアンモニア、硫黄系悪臭物質、トリメチルアミン及び低級脂肪酸に分類し、施設別の悪臭物質の寄与割合を示したのが図 2 である。

A施設においてはノルマル酪酸等の低級脂肪酸、B施設においては硫化メチル等の硫黄系悪臭物質の寄与割合が高くなっていた。

4 ま と め

(1) A施設の臭気指数（五点比較式臭袋法）は、参考値として示す宮城県公害防止条例の悪臭に係る換気口の規制基準（臭気指数25）を全て満足していた。しかし、臭気排出強度は小規模の悪臭苦情が発生するレベルであった。

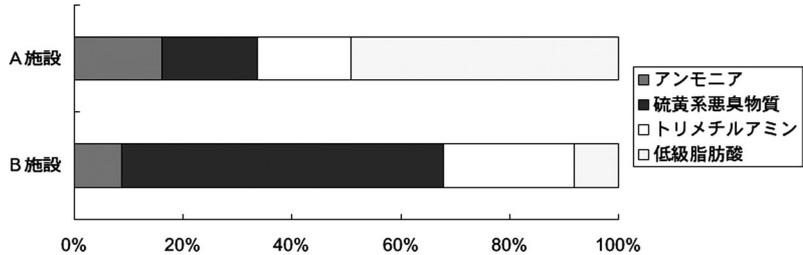


図 2 閾希釈倍数による悪臭物質の寄与割合

- (2) B施設においては、オゾンガス処理前の臭気と処理後の臭気を比較したが、脱臭効果は確認できなかった。この原因としては、臭気物質とオゾンガスとの接触時間が短すぎるためと推察された。
- (3) 今回調査したオゾン脱臭を用いた施設では、悪臭苦情が発生しないレベル（臭気排出強度 10^5 (m^3 N/min) 未満)まで脱臭することは困難であることが推察された。
- (4) 今後の悪臭対策としては、オゾンガスと臭気ガスとの接触時間をできるだけ長くする方法（反応室を新たに増設する。夏季には豚舎を空冷して換気量を減らすなど）が対策の一つとして考えられた。

参 考 文 献

- 1) 重田芳広：TOERと悪臭公害の起こり具合，大気汚染研究，10，497～502（1975）
- 2) 松永直利他：乾式オゾン脱臭装置と適用例，臭気の研究，33，(4)，20～25（2002）

LC/MSによる河川水中のアルキルフェノール類の分析法の検討

A Study on the Determination of Alkylphenols in River Water by LC/MS

阿部 公恵 渡部 正弘 三沢 松子
阿部 時男*

Kimie ABE, Masahiro WATANABE, Matsuko MISAWA
Tokio ABE

キーワード：アルキルフェノール類，LC/MS，フラグメンター電圧，河川水，
外因性内分泌攪乱化学物質

Key Words : Alkylphenols , LC/MS , Fragmentor Voltage , River Water ,
Endocrine Disrupters

内分泌攪乱作用が確認されているアルキルフェノール類を対象としてLC/MSによる分析法の検討を行った。その結果、夾雑物の多い環境試料について、フラグメンター電圧を上げることにより生じたフラグメントイオンをモニターイオンにすることにより目的物質を検出することが可能になった。また、本分析法を用いて県内2河川の実態調査を行った。

1 はじめに

アルキルフェノール類は、界面活性剤であるアルキルフェノールエトキシレート¹⁾の分解生成物であり、環境中に広く存在していることが知られている¹⁾。その中で、ノニルフェノールや4-tert-オクチルフェノールは、魚類に対する内分泌攪乱作用を有することが確認されている²⁾ことから、それらの濃度を把握し、環境中での挙動を明らかにすることは重要である。「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」(1998年環境庁策定)ではGC/MSによる分析法が示されているが、十分な感度が得られないことや誘導体化を必要とすることなど操作が煩雑である。そこで、今回選択性及び検出感度に優れているLC/MSを用いた分析法を検討し、良好な結果が得られたので報告する。また、この方法を用いた県内2河川の実態調査結果も併せて報告する。

2 方法

2.1 分析対象物質

環境省が示した「環境ホルモン戦略SPEED'98」にアルキルフェノール類としてリストアップされている4-tert-ブチルフェノール、4-n-ペンチルフェノール、4-n-ヘキシルフェノール、4-n-ヘプチルフェノール、4-tert-オクチルフェノール、4-n-オクチルフェノール及び4-ノニルフェノール(mix)の7物質を対象とした。対象物質ごとのモニターイオンを表1に示した。

* 現 宮城県下水道公社

表1 対象物質

化合物名	モニターイオン	
4-tert-butylphenol	149	
4-n-pentylphenol	163	
4-n-hexylphenol	177	106
4-n-heptylphenol	191	
4-tert-octylphenol	205	
4-n-octylphenol	205	
4-nonylphenol (mix)	219	133

2.2 試薬

標準品は、関東化学製の各標準品及びアルキルフェノール混合標準液を用いた。アセトニトリル及びメタノールは関東化学製のHPLC測定用、アセトンは関東化学製の残留農薬試験用、塩酸は関東化学製の有害金属測定用を用いた。また、精製水は日本ミリポア製純水製造装置より採取した水を用いた。固相カートリッジはWaters社製のOasisHLB GLASSカートリッジ6cc/200mgを用いた。

2.3 前処理法

前処理法は、米久保らの方法に準じた³⁾。あらかじめアセトニトリル3ml、メタノール3ml、超純水3mlで洗浄及びコンディショニングしたOasisHLB GLASSカートリッジに10%塩酸でpH3.0に調整した試料水500mlを10ml/分で通水する。通水後、5%メタノール水溶液3mlで洗浄し、3分間吸引乾燥する。アセトニトリル6mlで

溶出させ、窒素気流吹き付けで約0.5mlまで濃縮し超純水を加えて1mlとする。

2.4 装置及び分析条件

高速液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)はAgilent社製Agilent 1100 Series LC/MSD, 分析カラムはWaters社製X Terra™ MS C18(内径2.1mm×長さ150mm, 膜厚3.5µm), 移動相はメタノール/水系を使用した。イオン化法はESIの負イオンモード(Negative Mode), 定量はSIM法で行った。測定条件を表2に示した。

表2 LC/MS条件

HPLC	カラム	X Terra™C18 (内径2.1mm×長さ150mm, 膜厚3.5µm)
	移動相	A: 水 B: メタノール
	グラジエント	B: 70%から90%(6分間) B: 90%から100%(7分間) 2分間保持
	流速	0.2ml/分
	カラム温度	40
	注入量	10 µl
MS	イオン化法	ESI, Negative Mode
	ネブライザー及び圧力	N ₂ 50psi
	キャピラリー-電圧	5000V
	乾燥ガス, 流量及び温度	N ₂ , 10 l/分, 350
	フラグメンター電圧	150V, 200V

3 結果

3.1 標準液のSIMクロマトグラム

図1に標準液(25 µg/l)を分析した時のSIMクロマトグラムを示した。モニターイオンは, すべての物質で擬分子イオン[M-H]とした。

3.2 フラグメンター電圧の検討

フラグメンター電圧について最適化を行ったところ, 擬分子イオン[M-H]のピーク強度が最大であったのは150Vであった。しかし, 河川水では, フラグメンター電圧を150Vにした場合, 4-ノニルフェノールと4-n-ヘキシルフェノールの位置に妨害ピークがあり, 擬分子イオンでは定量できなかった。そこで, LC条件を変えずにフ

ラグメンター電圧を200Vにすることにより生じたフラグメントイオンをモニターイオンにした結果, 目的物質のピークから妨害ピークを取り除くことができた(図2, 3)。さらに, この条件で既知濃度の検体を擬分子イオン及びフラグメントイオンをそれぞれモニターイオンとして定量したところその濃度はほぼ一致した。

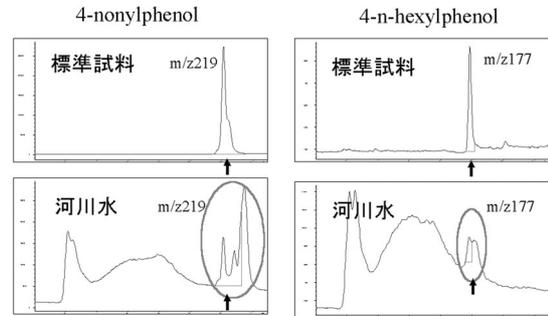


図2 フラグメンター電圧150VのSIMクロマトグラム

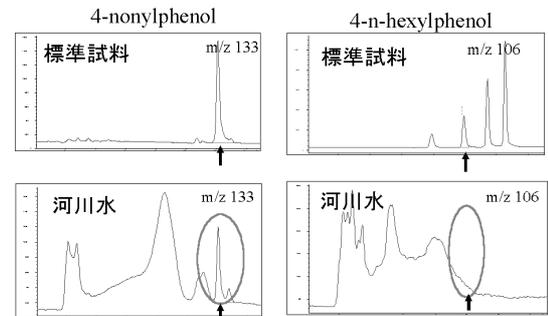


図3 フラグメンター電圧200VのSIMクロマトグラム

3.3 検量線, 検出下限値, 定量下限値及び添加回収試験

検量線を5 µg/lから100 µg/l(4-ノニルフェノールは10 µg/lから1000 µg/l)の範囲で絶対検量法により作成したところ, すべての化合物で良好な結果(R² > 0.999)が得られた(図4)。

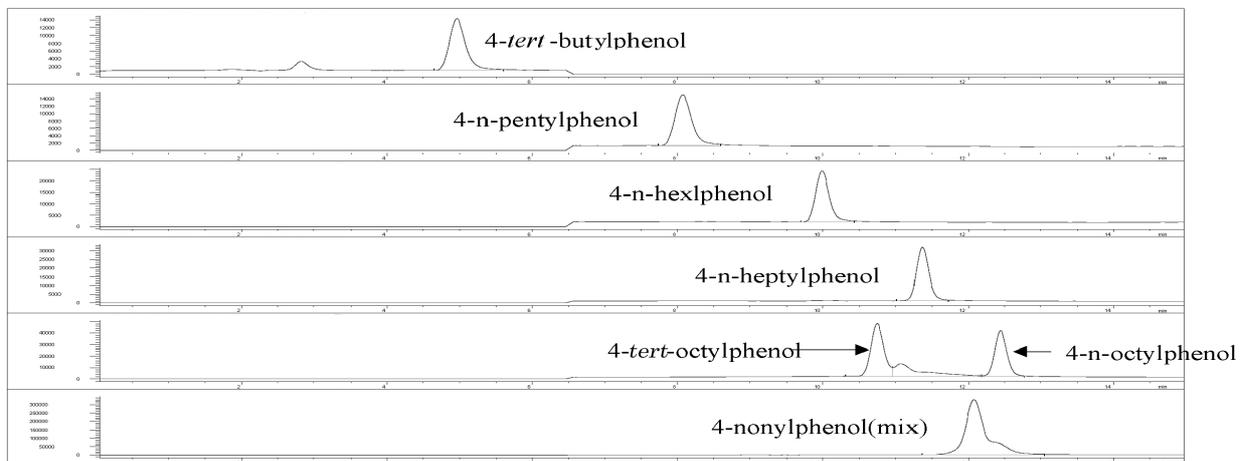


図1 LC/MS SIM クロマトグラム (25µg/l)

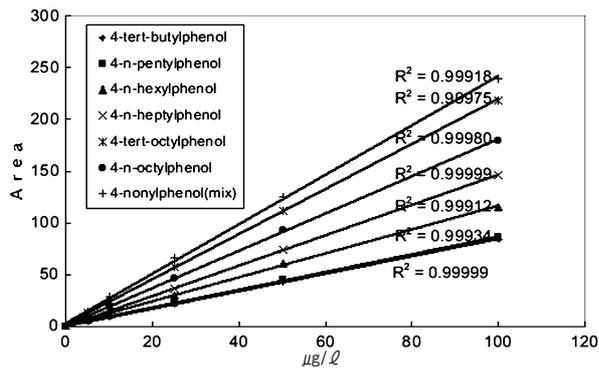


図4 検量線

表3 装置の検出下限値及び定量下限値

単位: µg/l

化合物名	平均値	標準偏差	CV (%)	検出下限 3	定量下限 10
4-tert-butylphenol	5.03	0.0640	1.3	0.192	0.64
4-n-pentylphenol	4.96	0.0843	1.7	0.253	0.84
4-n-hexylphenol	4.87	0.2797	5.7	0.839	2.80
4-n-heptylphenol	4.91	0.1676	3.4	0.503	1.68
4-tert-octylphenol	4.87	0.1424	2.9	0.427	1.42
4-n-octylphenol	4.50	0.2955	6.6	0.887	2.96
4-nonylphenol(mix)	6.09	0.4720	7.7	1.416	4.72

n = 5 (注入量10 µl)

表4 添加回収試験

単位: µg/l

化合物名	平均値	回収率 (%)
4-tert-butylphenol	24.8	99.2
4-n-pentylphenol	23.7	94.8
4-n-hexylphenol	23.3	93.2
4-n-heptylphenol	20.8	83.2
4-tert-octylphenol	28.8	115.2
4-n-octylphenol	15.6	62.4
4-nonylphenol (mix)	189.8	75.9

n=3

また、装置の検出下限値は0.192~1.416 µg/l、定量下限値は0.64~4.72 µg/lと低く、変動係数もすべて10%以下と良好な値を示した(表3)

測定対象物質を25 µg/l(4-ノニルフェノールは、250 µg/l)になるように添加し、添加回収試験を行ったところ、添加回収率は、4-n-オクチルフェノールの62.4%を除き75.9%から115.2%と概ね良好であった(表4)。なお4-n-オクチルフェノールの添加回収率については、今後さらに検討する必要がある。

3.4 河川水の調査

平成13年度の調査でノニルフェノールが検出された吉田川及び増田川の2河川について、流域ごと及び時間帯ごとに調査を行なった。その結果を表5に示す。

吉田川では、すべての地点でアルキルフェノール類は、検出されなかった。

増田川では、4-ノニルフェノールが、中流(舟橋)の午後に0.08 µg/l、下流(柚の木橋)の午前に0.04 µg/l、午後に0.03 µg/l検出されたが、環境省が提示している魚類に対する予測無影響濃度の0.608 µg/l²⁾を下回った。また、4-ノニルフェノール以外のアルキルフェノール類は、検出されなかった。

なお、時間帯ごとの大きな差は認められなかった。

4 まとめ

アルキルフェノール類についてLC/MSによる分析法の検討を行った結果、簡便で高感度な分析法を確立することができた。さらに、本法を河川水に適用したところ、LC条件を変えずフラグメンター電圧を上げることにより生じたフラグメントイオンをモニターイオンにした結果、目的物質のピークから妨害ピークを取り除くことができた。

また、河川水の調査を行った結果、増田川において4-ノニルフェノールが検出されたが、魚類に対する予測無影響濃度の0.608 µg/l²⁾を下回った。

今後はこの方法を用い、他の公共用水域についても汚染状況を明らかにするとともに、アルキルフェノール類による汚染の原因物質であるアルキルフェノールエトキ

表5 河川水調査結果

単位: µg/l

化合物名	吉田川						増田川					
	二子屋橋(上流)		悟溪寺橋(中流)		二子屋橋(下流)		河原前橋(上流)		舟橋(中流)		柚子橋(下流)	
	11:03	14:10	10:40	13:45	9:51	13:10	11:30	14:45	10:41	14:15	10:17	13:55
4-tert-butylphenol	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
4-n-pentylphenol	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
4-n-hexylphenol	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
4-n-heptylphenol	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
4-tert-octylphenol	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
4-n-octylphenol	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
4-nonylphenol(mix)	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	0.08	0.04	0.03

(平成14年11月25日採水)

シレートの挙動も把握する必要がある。

参 考 文 献

- 1) 水環境学会「水環境と洗剤研究委員会」編：非イオン界面活性剤と水環境，51，技報堂出版（2000）
- 2) 環境省総合環境政策局環境保健部：ノニルフェノールが魚毒に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告（2001）
- 3) 米久保 淳他：分析化学，48，6，571 - 577（1999）

宮城県における海産巻貝類のインポセックスと体内有機スズ濃度

Current Status of Imposex and Tissue Concentrations of Organotin Compounds in Marine Gastropods from Miyagi Prefecture, JAPAN

三沢 松子 阿部 郁子 佐久間 隆
氏家 愛子 阿部 時男*

Matsuko MISAWA, Ikuko ABE, Takashi SAKUMA,
Aiko UJIIE, Tokio ABE*

キーワード：インポセックス，有機スズ化合物，イボニシ，
外因性内分泌攪乱化学物質

Key Words : Imposex, Organotin Compounds, *Thais clavigera*, Endocrine Disruptors

外因性内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の生態影響の実態把握を行うため、県内の代表的な湾内・沿岸海域におけるイボニシ（*Thais clavigera*）等海産巻貝類への影響調査を実施し、3年前の調査と比較したところ、一部の地点で正常な雌個体が確認されたが、有機スズ化合物原則使用禁止に伴うインポセックス現象の明らかな低減は認められず、継続的な生物影響がうかがわれた。さらに、イボニシ体内の有機スズ化合物について分析を行った結果、インポセックスが発現している雌個体中のトリブチルスズ（TBT）濃度とペニス長とに正の相関が認められた。

1 はじめに

化学物質の野生生物に対する環境ホルモン作用が証明された実例として巻貝類のインポセックスがある。この現象は、船底防汚塗料や漁網防汚剤として1960年代半ばから使用されてきた有機スズ化合物が水圏環境中に溶出することにより引き起こされるとされたものと考えられている。

本県では、有機スズ化合物の汚染状況の実態把握を目的として、平成11年度に県内の代表的な湾内及び沿岸海域におけるイボニシ等海産巻貝類への影響調査を実施したところ、調査した全地点でインポセックス個体が確認された¹⁾。

平成14年度には、3年経過後の状況把握を行うための調査を実施し前回との比較を行った。さらに、イボニシ

体内の有機スズ化合物濃度について分析を行ったので、その結果を併せて報告する。

2 方法

2.1 試料の採集

(1) 採集時期及び方法

平成14年6月中旬から下旬に、大潮の干潮時に船の上から採集を行った。

なお、採取した試料は、観察時点まで凍結保存（-20℃）した。

(2) 採集地点

松島湾、女川湾、気仙沼湾の湾内及び周辺沿岸域の19地点（図1）で行った。

地点の設定にあたっては、前回調査時の対象地点

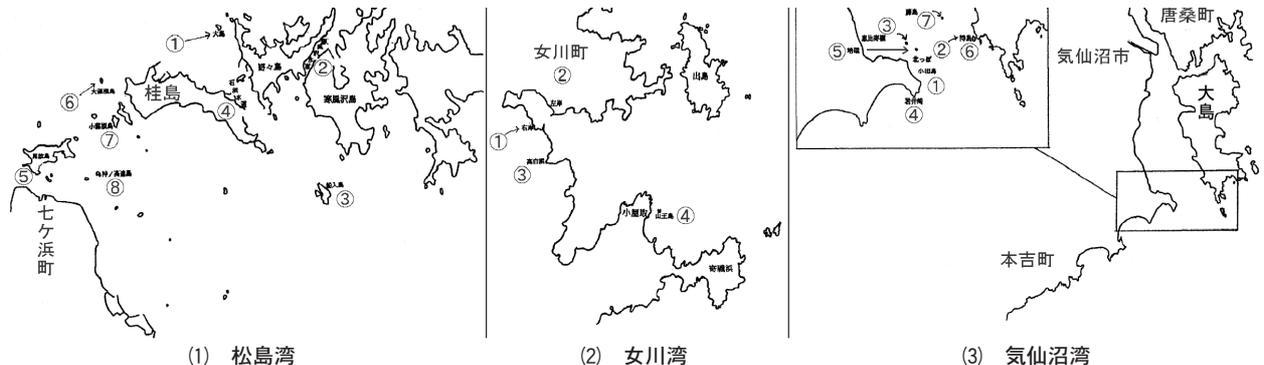


図1 採集地点

* 現 財団法人宮城県下水道公社

その他新たにイボニシの生息が確認される地点とした。

2.2 形態観察

各地点から採集した貝の殻高、殻径、重量を計測し、軟体部を殻から取り出した後、軟体部重量を測り、雌雄特有の生殖器官を観察して雌雄の識別（第一次判別）を行うとともに、雄の個体ではペニスの形状や長さ、輸精管の発達状況を、雌の個体についてはペニスの有無、輸卵管末端開口部の閉塞状況、変質卵囊塊の有無等からインボセックスの有無の判定（第二次判別）を行った。

2.3 各種指標の算出

さらに、インボセックスの発生率、RPL Index（：相対ペニス長指数 = 「雌平均ペニス長 / 雄平均ペニス長」 × 100）やimposex grade（ = 殻高とペニス長の比率、輸卵管末端開口部の閉塞状況、変質卵囊塊の有無により ~ に分類：表1）を算出した。

表1 imposex gradeによる分類

grade	規定内容
I	ペニスの長さが殻高の1/4未満の個体
II	ペニスの長さが殻高の1/4以上の個体
III	I又はIIのうち、輸卵管末端開口部が閉塞している個体
IV	I・II・IIIにかかわらず、変質卵囊塊を有する個体

2.4 有機スズ化合物濃度分析

まず上記2.1で解剖観察した後、個別に凍結保存した雌個体軟体部試料を、採集地点ごとに殻高やimposex gradeの似たものをまとめてコンポジット試料とした。ここで、imposex gradeの判定が不能なもの、個体数が少なかったimposex gradeの個体については、今回除外した。

次に、当センター生活化学部の有機スズ化合物分析に係る標準作業書に準じて、各々をホモジネートし、試料約5gを抽出・精製、エチル化後、GC-FPDによりジブチルスズ(DBT)、トリブチルスズ(TBT)及びトリフェニルスズ(TPT)の分析・定量を行った。

3 結果及び考察

3.1 インボセックス発生率、RPL Index及びimposex gradeの構成

今回調査した19地点のうち、イボニシは16地点、チヂミボラは3地点、レイシガイは3地点で採集した。女川湾の湾奥部3地点では、前回同様イボニシは確認できなかった。各採集地点での結果を表2及び表3に示す。インボセックスの発生率は、調査海域を拡げたものの、前回同様ほぼ100%と高い値であったが、今回の調査では松島湾や女川湾のより外洋側の地点において正常な雌の個

表2 各採集地点におけるimposexの発生率とRPL Index

水域	No	種名 地点	調査総数	数	イボニシ			RPL Index ¹⁾ (%)	
					正常数	imposex数	発生率 ¹⁾ imposex/全数		
松島湾	1	野々島大島	20	9		11	11/11 (9/9)	18.8	(23.7)
	2	寒風沢岸壁	20	12		8	8/8 (9/9)	27.4	(23.6)
	3	船入島	20	9	1	10	10/11 (6/6)	8.1	(3.1)
	4	桂島石浜岸壁	20	8		12	12/12 (10/10)	32.5	(37.0)
	5	馬放島	20	13		7	7/7 (9/9)	30.5	(43.5)
	6	大藻根島	20	10		10	10/10 (10/10)	25.3	(47.8)
	7	小藻根島	20	10		10	10/10	22.5	
	8	沖の高遠島	10	7		3	3/3	46.0	
		合計	150	78	1	71	71/72 (53/53)	26.4	(30.1)
気仙沼湾	1	小田島	20	9		11	11/11 (13/13)	27.8	(41.0)
	2	北っぼ	6	3		3	3/3 (3/3)	30.6	(25.2)
	3	恵比寿棚	20	10		10	10/10 (6/6)	44.2	(59.5)
	4	岩井崎	20	8		12	12/12 (9/9)	19.5	(17.3)
	5	培磯	20	9		11	11/11	43.3	
	6	大島待島	20	13		7	7/7	24.9	
	7	藤島	20	9		11	11/11	44.3	
		合計	126	61	0	65	65/65 (31/31)	33.5	(35.2)
女川湾	4	山王島	20	7	3	10	10/13	7.6	
		合計	20	7	3	10	10/13	7.6	
水域	No	種名 地点	調査総数	数	チヂミボラ			RPL Index ¹⁾ (%)	
					正常数	imposex数	発生率 ¹⁾ imposex/全数		
女川湾	1	女川湾右岸	20	8	5	7	7/12 (21/32)	21.6	(14.3)
	2	女川湾左岸	20	3	4	13	13/17 (16/17)	26.2	(18.1)
	3	高白浜	20	9	7	4	4/11 (15/18)	13.4	(16.2)
		合計	60	20	16	24	24/40 (52/67)	20.4	(16.2)
水域	No	種名 地点	調査総数	数	レイシガイ			RPL Index ¹⁾ (%)	
					正常数	imposex数	発生率 ¹⁾ imposex/全数		
気仙沼湾	1	小田島	20	10		10	10/10 (25/25)	13.5	(28.1)
	2	北っぼ	20	8		12	12/12 (11/11)	22.0	(43.8)
	4	岩井崎	20	12	3	5	5/8	- ²⁾	
		合計	60	30	3	27	27/30 (36/36)	17.8	(32.9)

注1) ()内はH11調査結果

注2) 岩井崎におけるレイシガイは、インボセックス個体すべてが痕跡(ペニス長0)のため、RPL Indexは算出できなかった。

表3 各採集地点における imposex grade I～IVの構成

水域	No	種名 地点	RPL Index(%)	イ		ボ		ニ		シ		判定不能 ²⁾
				正常数	imposex 数	I	II	III	IV			
松島湾	1	野々島大島	18.8		11	7 (63.6)					4 (36.4)	
	2	寒風沢岸壁	27.4		8	5 (62.5)					3 (37.5)	
	3	船入島	8.1	1	10	9 (90.0)			1 (10.0)			
	4	桂島石浜岸壁	32.5		12	6 (50.0)	2 (16.7)				4 (33.3)	
	5	馬放島	30.5		7	1 (14.3)			5 (71.4)		1 (14.3)	
	6	大藻根島	25.3		10	7 (70.0)			2 (20.0)		1 (10.0)	
	7	小藻根島	22.5		10	9 (90.0)					1 (10.0)	
	8	沖の高遠島	46.0			1 (33.3)					2 (66.7)	
		合計	26.4	1	71	45 (63.4)	2 (2.8)	8 (11.3)	0 (0.0)		16 (22.5)	
気仙沼湾	1	小田島	27.8		11	10 (90.9)					1 (9.1)	
	2	北っぼ	30.6		3	2 (66.7)					1 (33.3)	
	3	恵比寿棚	44.2		10		5 (50.0)		4 (40.0)		1 (10.0)	
	4	岩井崎	19.5		12	10 (83.3)					2 (16.7)	
	5	培磯	43.3		11	3 (27.3)	4 (36.4)		1 (9.1)	1 (9.1)	2 (18.2)	
	6	大島待島	24.9		7	7 (100.0)						
	7	藤島	44.3		11		7 (63.6)	1 (9.1)		1 (9.1)	2 (18.2)	
		合計	33.5	0	65	32 (49.2)	16 (24.6)	6 (9.2)	2 (3.1)		9 (13.8)	
女川湾	4	山王島	7.6	3	10	10 (100.0)						
		合計	7.6	3	10	10 (100.0)						

水域	No	種名 地点	RPL Index(%)	チ		ヂ		ミ		ボ		ラ		判定不能 ²⁾
				正常数	imposex 数	I	II	III	IV					
女川湾	1	女川湾右岸	21.6	5	7	6 (85.7)	1 (14.3)							
	2	女川湾左岸	26.2	4	13	11 (84.6)	1 (7.7)						1 (7.7)	
	3	高白浜	13.4	7	4	3 (75.0)							1 (25.0)	
		合計	20.4	16	24	20 (83.3)	2 (8.3)						2 (8.3)	

水域	No	種名 地点	RPL Index(%)	レ		イ		シ		ガ		イ		判定不能 ²⁾
				正常数	imposex 数	I	II	III	IV					
気仙沼湾	1	小田島	13.5		10	9 (90.0)							1 (10.0)	
	2	北っぼ	22.0		12	12 (100.0)								
	4	岩井崎	-	3	5	5 (100.0)								
		合計	17.8	3	27									

注1) ()内は%

注2) 判定不能は輸卵管末端開口部の閉塞状況が確認できなかった個体である。

体が見出された。

個体群としての影響の進行度合いを示すRPL Index (%)は、イボニシでは気仙沼湾33.5、松島湾26.4、女川湾7.6となっており、前回に比べ若干減少しているものの大きな変化は見られなかった。女川湾のチヂミボラは20.4、気仙沼湾のレイシガイは11.8であった。湾内分布をみると、湾奥部から離れるに従って数値が減少する傾向が見られ、これもこれまでの知見と同様であった。

各個体の症状の重さを示すimposex gradeによる分類では、イボニシの場合全体としてgrade の割合が大きかったが、RPL Indexが比較的高い地点では以上に分類される割合が大きくなっており、特に気仙沼湾において顕著であった。しかし、松島湾の船入島のように、RPL Indexも低く、個体レベルでもgrade が殆どで正常な雌個体も見られる一方でgrade の個体が見られる例も確認された。チヂミボラ、レイシガイでは以上に分類されるものはみられなかった。

3.2 イボニシ体内の有機スズ濃度

各採集地点別、imposex grade別のコンポジット試料ごとのペニス長の平均と分析結果の関係を表4及び図2～5に示す。測定対象とした3物質のうち、DBTは7.3～26.9ng/g-wet、TBTは<5～30.1ng/g-wet、TPTは<5～25.8ng/g-wetであった。県内のイボニシ体内の有機スズ濃度の分析結果としては、堀口らが本県内の4地点(志津川町荒島、津ノ宮漁港、牡鹿町泊浜及び石巻市新山)で1998年6月に採集したイボニシ試料の体内TBT濃度及びTPT濃度はそれぞれ<5～23.4ng/g-wet及び<5～29.8ng/g-wetであったと報告²⁾しており、今回の結果も同様であったと考えられる。

検出された3物質の濃度と雌インボセックス個体群の平均ペニス長との関係では、TBTでは正の関係が認められたがTPTではやや弱く、DBTでは明確な相関はみられなかった。さらにTBT及びTPTの合計濃度でみると、インボセックス発現個体中には概ね10ng/g以上で検出され

表4 イボニシ中のTBT等濃度測定結果^{注)}

地点名	imposex grade	コンボジット試料内個体数	殻高 (mm)	ペニス長 (mm)	平均ペニス長 (mm)	重量 (g)	うち測定に使用	DBT (ng/g)	TBT (ng/g)	TPT (ng/g)
松島 No.1	I	6	31.6~35.6	3.0~5.0	3.9	10.48	5.24	14.9	11.3	8.4
松島 No.2	I	3	33.0~39.5	5.5~7.0	6.5	5.11	5.11	19.9	16.9	15.9
松島 No.3	I	4	34.1~39.3	1.0~3.5	2.3	9.46	4.73	12.3	5.3	5.4
松島 No.4-1	I	5	34.7~41.0	5.0~9.0	6.5	10.54	5.27	19.4	21.4	12.0
松島 No.4-2	II	2	30.3~39.7	11.0~17.0	14.0	4.11	4.11	17.4	30.1	14.3
松島 No.5	III	5	32.3~39.1	3.0~10.5	7.1	10.39	5.19	26.9	14.6	14.6
松島 No.6-1	I	4	34.4~39.0	5.0~8.5	6.3	9.03	4.51	22.2	17.8	13.2
松島 No.6-2	I	3	43.2~43.4	3.0~9.5	6.0	10.15	5.07	20.7	15.3	19.1
松島 No.6-3	III	2	37.9~42.2	2.5~7.5	5.0	4.94	4.94	17.5	20.1	17.0
松島 No.7	I	7	37.0~37.9	4.5~8.0	6.0	9.50	4.75	20.7	16.1	16.4
気仙沼 No.1	I	5	35.1~40.3	5.5~10.0	7.1	10.10	5.05	15.2	14.5	11.8
気仙沼 No.3-1	II	5	30.0~35.5	8.5~13.0	10.5	10.17	5.08	16.9	23.9	25.8
気仙沼 No.3-2	III	4	28.3~51.4	8.0~11.0	9.8	10.40	5.20	16.7	18.4	17.8
気仙沼 No.4	I	7	29.4~35.5	2.0~7.0	4.7	10.06	5.03	9.8	8.8	-
気仙沼 No.5	II	4	26.4~35.3	8.0~11.0	9.4	5.00	5.00	7.3	26.3	9.3
気仙沼 No.6	I	7	22.6~36.2	3.0~9.0	5.6	9.37	4.68	14.2	15.3	14.7
気仙沼 No.7	II	7	25.9~31.7	7.0~10.5	8.8	9.84	4.92	18.7	20.3	15.7
女川 No.4	I	5	35.0~39.0	1.0~3.0	1.7	15.36	5.12	8.1	<5	<5
気仙沼 No.3	-	7	32.4~37.8	14.5~28.5	22.4	17.17	5.00	21.2	22.4	21.6
気仙沼 No.3 (大型)	-	2	41.7~44.8	26.5~29.5	28.0	8.76	5.00	15.6	11.4	18.5

注) 検出下限値 (0.05 µg/ml) 未満で検出されたものについては、半値 (0.025 µg/ml) で算出

ており、これは体内の有機スズ濃度が湿重量 1 g あたり 10~20ng程度でインボセックス症状が確認されるという文献^{3,4)}と符合する結果となっている。

このことから、メスでの雄性生殖器官の形成にTBTが関与している可能性が大きいことを改めて確認できた。

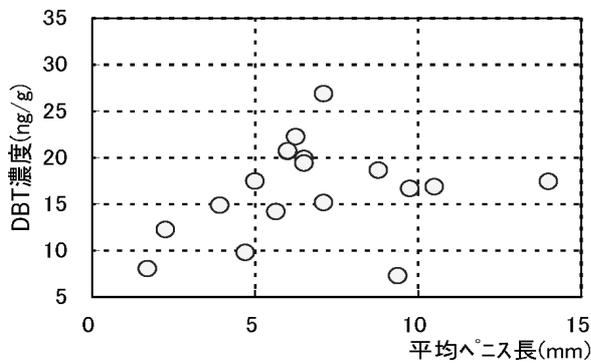


図2 イボニシ♀平均ペニス長とDBT濃度

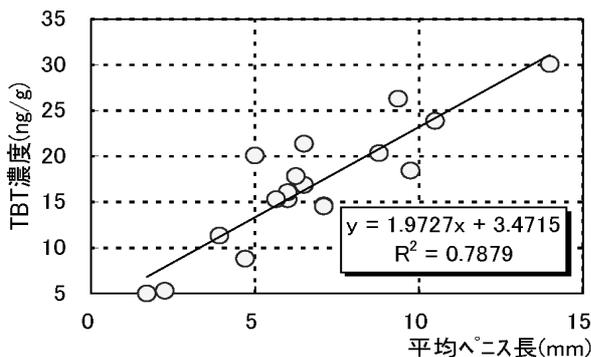


図3 イボニシ♀平均ペニス長とTBT濃度

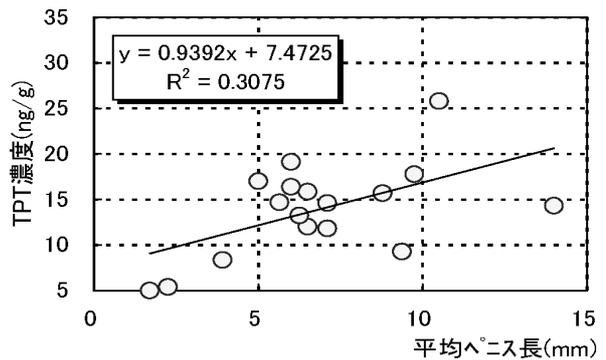


図4 イボニシ♀平均ペニス長とTPT濃度

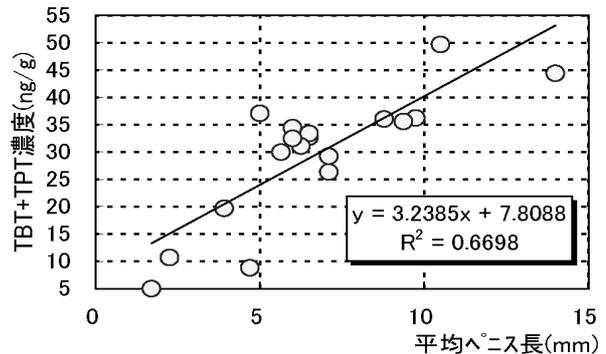


図5 イボニシ♀平均ペニス長と (TBT+TPT) 濃度

3.3 水域別, imposex grade別平均ペニス長と体内TBT濃度

図6に、体内TBT濃度とメスの平均ペニス長との関係を調査水域別に示した。TBT濃度の低い女川湾ではTBT濃度の高い松島湾や気仙沼湾よりペニス長が小さい値を

示していることがわかる。

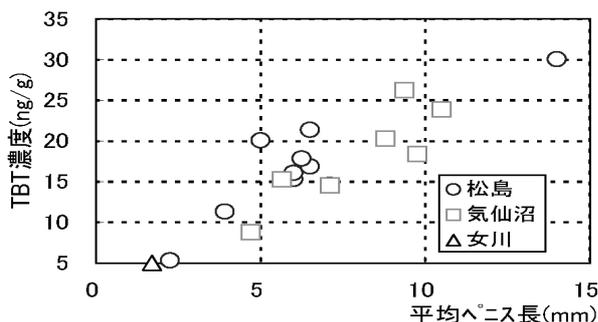


図6 水域別イボニシ♀平均ペニス長とTBT濃度

図7には、imposex grade別に体内TBT濃度とメスの平均ペニス長との関係を示した。imposex grade とはTBT濃度によって明確に区分できる分布を示しているが、

はよりTBT濃度の低いところに分布している傾向を示している。これは、imposex gradeの がペニス長を直接規定因子としていない区分であることや体内有機スズ濃度があるレベル以上になると毒性影響が上回るなどしてペニスが伸びない或いは伸び方が鈍化する可能性を示唆している。

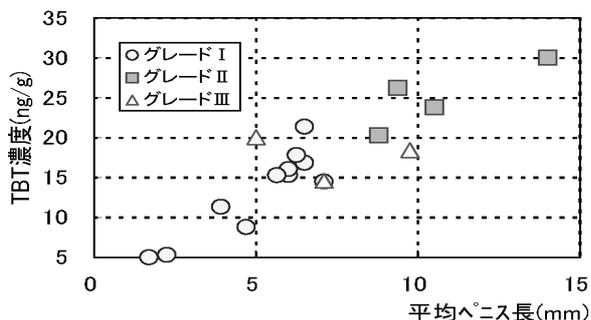


図7 imposex grade別イボニシ♀平均ペニス長とTBT濃度

3.4 イボニシの生活史と生物指標としてのモニタリング対象の選定

図8にイボニシの生活史と成長について示した。

卵 (卵嚢内に160~220個)	2週間
孵出(ベリジャー幼生)	3週間
変態沈着	
その後の成長例 ⁷⁾	
満1年	殻高約12mm
満2年	約18mm
満3年	約21~22mm
満4年	約24~25mm

図8 イボニシの生活史

イボニシは夏期に岩棚の下に多数集まり、一斉に卵嚢を産み付ける。中山らによると、産卵行動への参加は満2年以上でみられる⁷⁾。約2週間でベリジャー幼生として孵出し、その後3週間で変態沈着し底生生活に入る。したがって孵出から沈着までの間は大きな移動性を持つことになり、潮の流れに沿って他水域への流出や他水域からの流入の可能性⁵⁾⁶⁾がある。通常、変態沈着後の大きな移動はないものと考えられるため、イボニシの成体はその環境における物質曝露量を表現しているものと考えられる。

図9に今回観察したイボニシ(雌雄合計)の殻高の分布を示した。気仙沼湾では30mm前後の個体の割合が高く、松島湾では40mm前後にピークがみられる。

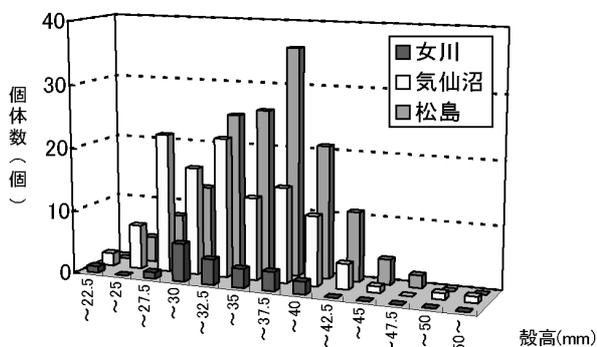


図9 観察イボニシの殻高分布(全体)

イボニシは、初めの成長速度は大きい⁷⁾が次第に鈍化するため、殻高などによる各個体の年齢査定は特に高齢貝では困難⁷⁾であり、また代謝による体内蓄積特性に差がある可能性もあり、調査対象を殻高などで決定する場合は特に注意が必要であると考えられた。したがって、今後同様の調査においては、これまでの30mm前後の殻高個体群を主にした扱いから小型(若齢)個体も対象に加えて実施する必要があると考えられる。

4 まとめ

今回の調査では、一部の地点で正常な雌個体が見られたものの、イボニシのインボセックスは高率で出現しており、生物への影響が継続していることがうかがわれた。環境省の指定化学物質等検討調査によると、仙台湾(実際のサンプリングは松島湾内)のTBT濃度は、図10に示すとおり、水質では検出されなくなっているが、底質中では依然15~25ng/g-dryで推移している状況にあり、要因のひとつとしてこのことが影響している可能性が考えられた。

また、イボニシ体内の有機スズ濃度を分析した結果、インボセックスを発現しているメス個体中のトリブチルスズ濃度とペニス長とに正の相関が認められ、依然として、ペニスを形成させるだけの汚染が存在していること

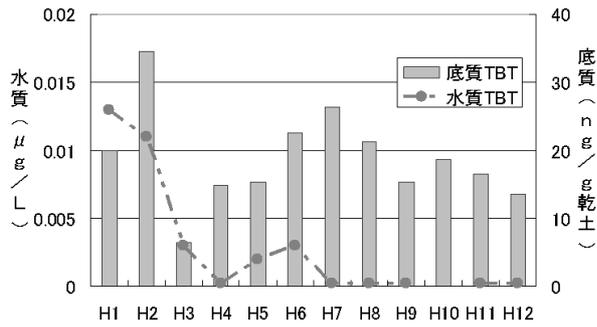


図10 仙台港における水質及び底質中のTBT濃度
(出典：指定化学物質等検討調査(環境省))

が示唆された。

今後、各媒体(水質・底質)における汚染状況の分析とともに、生物指標としてイボニシ等海産巻貝類の生息状況 継続観察に適切な個体サイズ より効果的に化学物質の影響を測定しうる器官(部位)等に関して種々の検討を行いながら、生態影響のモニタリングを継続する必要があるものと考え。

参考文献

- 1) 水谷登志喜ら：宮城県保健環境センター年報，18，p 165 (2000)
- 2) 国立環境研究所ホームページ：研究成果物，地方公共団体公害研究機関と国立環境研究所との共同研究一覧(平成10年度)：
http://www.nies.go.jp/seika/gaiyo/a24_99/2-19-1.html
- 3) 北條祥子：「よくわかる環境ホルモン話」，合同出版，p 70 (1998)
- 4) 堀口敏宏・清水誠：「有機スズ汚染と水生生物影響」第4章 水生生物に対する影響 - 7 貝類及び他の水生生物，恒生社厚生閣，p 111 - 128 (1992)
- 5) 堀口敏宏：「よくわかる環境ホルモン学」第5章 巻貝のメスがオスに性転換，(株)環境新聞社，p 108 (1998)
- 6) 川合真一郎・小山次朗編：「水産学ノート126 水産環境における内分泌攪乱物質」5 貝類，日本水産学会監修，p 54 - 71 (2000)
- 7) 中野大三郎ら：志摩半島におけるイボニシの成長と年齢，鳥羽水族館開館25周年記念誌，p 87 - 92 (1980)

カンピロバクター・コリによる食中毒事例

Food Poisoning by *Campylobacter coli*

名村 真由美 千葉 美子 那須 務*
川野 みち 梅津 幸司 秋山 和夫
鈴木 隆

Mayumi NAMURA , Yoshiko CHIBA , Tsutomu NASU
Michi KAWANO , Koshi UMEZU , Kazuo AKIYAMA
Takashi SUZUKI

キーワード：カンピロバクター・コリ，PCR-RFLP法，食中毒事例

Key Words : *Campylobacter coli* , PCR-RFLP Method , Food Poisoning

平成14年に本県で発生したカンピロバクター・コリによる集団食中毒事例において、*C. jejuni* と *C. coli* の同定に応用したPCR-RFLP法は、カンピロバクターの同定が迅速に判定できる有用な鑑別法であることを確認した。また、PFGEにより分離菌株の遺伝子パターンを比較し、複数のパターンの菌株が検出された。

1 はじめに

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*)及び、*Campylobacter coli* (*C. coli*)は、家畜や鳥類などに広く分布する細菌¹⁾であるが、ヒトには常在せず、主要な食中毒細菌の一つである。

しかしこれらの菌は、他の食中毒原因菌の場合と比べ、検体からの菌分離・同定に時間を要している。これを短縮する目的で、菌種の決定にはしばしば、生化学性状試験より薬剤感受性等を利用した簡便法が用いられてきた²⁾。

平成14年10月に発生した食中毒事件は、*C. coli*による本県で初めて確認できた集団食中毒事例であった。本事例では、菌種の鑑別にPCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法を導入して同定を行った。その結果、この方法は*C. jejuni* と *C. coli* の区別が迅速かつ正確に判定でき、日常の検査に有用であることが確認できたので、その概要について報告する。

2 食中毒事件の概要と検査方法

2.1 事例概要

平成14年10月29日に、S保健所管内の医療機関からカンピロバクターによる食中毒の届け出があった。聞き取り等調査の結果、同月21日に焼き肉屋で食事をした高校生30名中23名が、同月23～25日にかけて下痢や腹痛・発熱などの食中毒症状を呈していた。そのうちの1名が医療機関を受診、検査の結果、便よりカンピロバクターが

* 現 仙南仙塩広域水道事務所

検出され、原因食品究明のため、同一の食事をした摂取者の便、及び拭き取り等の細菌検査を実施した。概要を表1に、発症者の臨床症状を図1に示した。

表1 食中毒事件の概要

摂食日	10月21日
発症日	10月23日～10月25日
摂食者数	30名
発症者数	23名(76.7%)
患者数	1名

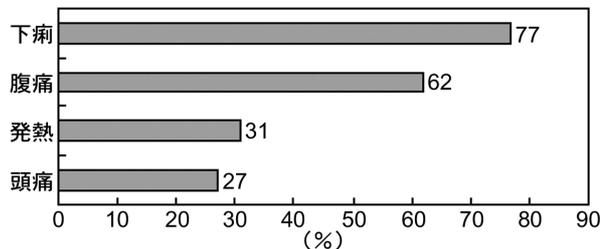


図1 発症者の臨床症状

2.2 細菌検査

細菌検査は発症者便及び非発症者便31件(5名重複)、拭き取り6件、飲料水(水道水含む)9件及び、本件の発症者便から民間検査機関で分離された菌株1株について行った。

検査は、通常の食中毒検査時の方法に従い、直接塗抹培養及び増菌培養で食中毒原因菌の検索を行った。カンピロバクター検査方法を図2に示した。検体をスキロー培地で直接好気培養(42℃), プレストン培地で増菌好気培養(42℃)を行った。スキロー培地上で疑わしいコロニーを釣菌し、血液寒天培地で純培養後、ラテックス法によるカンピロLA(デンカ生研)で属種を決定し、さらに菌種同定のためその他生化学性状試験を行った。

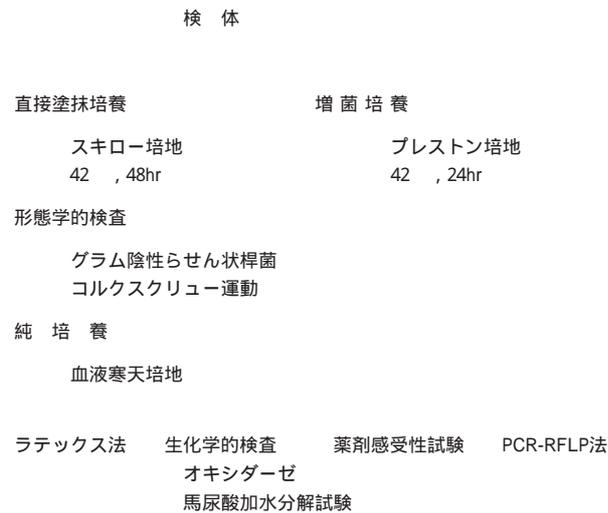


図2 *Campylobacter* 属菌の検査手順

2.3 薬剤感受性試験

分離菌株の薬剤感受性試験は、ナリジクス酸(NA)およびセファロチン(CET)はモノディスク法で、アンピシリン(ABPC),ピペラシン(PIPC),セファゾリン(CEZ),セフトラジウム(CAZ),セファクロル(CCL),フロモキシセフ(FMOX),セフポドキシム(CPDZ),アズトレオナム(AZT),イミペネム(IPM),メロペネム(MEPM),ゲンタミシン(GM),アミカシン(AMK),ミノサイクリン(MINO),ホスホマイシン(FOM),ST合剤(ST),レボフロキサシン(LVFX)の16種類について微量液体希釈法(ドライプレート:栄研化学)で行いMICを求め、結果をNCCLSの基準に準じて感受性(S),中間(I)及び耐性(R)とした。

2.4 PCR-RFLP法

各菌株を滅菌蒸留水にけん濁後、96℃6分加熱し、10,000rpmで遠心した上清をそれぞれ菌株のテンプレートとした。PCRはReady to Go(アムシャム社製)のPCR Beads tubeを用い、サーマルサイクラー(ABI 9700)で反応を行った。PCR終了後、制限酵素Alu Iで1時間処理し、電気泳動及び染色により反応生成物を確認した。

2.5 パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法

各菌株をBHIブイヨンで2晩培養後、加温溶解した1%アガロースゲルを混合し、1×5×8mmの大きさに固化(プラグ)した。プラグをリゾチーム処理した後、制限酵素Sma IでDNA断片処理を行い、更にアガロース

ゲルに埋め込みパルスフィールド法で電気泳動を行った。電気泳動はBIO-RADの装置を使用し、電圧6V/cm,角度120度,1-23sec:18.5hrの条件で行った。泳動後はPCR-RFLP法と同様にDNAのバンドを確認した。

3 結果

便検体26名分について菌検索を行い、15名よりカンピロバクターを検出した(検出率57.7%)(表2)。検体からその他の食中毒菌は検出されなかった。分離したそれぞれの菌株についての生化学性状を検査した結果、馬尿酸加水分解が陰性であり、*C. coli*と推定した。なお、*C. jejuni*及び*C. coli*と比較して表3に示した。

表2 *C. coli*の検出状況

検体	検査件数	検出数
便	26*	15(57.7%)
拭き取り	6	0(0.0%)
飲料水	9	0(0.0%)
計	41	15(36.6%)

*5名の重複除く

表3 *Campylobacter*属菌・分離菌株の生化学性状

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	分離菌株
オキシダーゼ	+	+	+
カタラーゼ	+	+	+
グルコース分解	-	-	-
TTC抵抗性	+	+	+
硫化水素産生性(TSI)	-	-	-
馬尿酸加水分解	+	-	-
酢酸インドキシル加水分解	+	+	+
ナリジクス酸感受性	S	S	S・R
セファロチン感受性	R	R	R

カンピロバクターの特異遺伝子領域の23rRNAをターゲットとし、それぞれの分離菌株および対照とした*C. jejuni*, *C. coli*についてFermerのプライマー³⁾でPCRを行い、更にPCR生成物を制限酵素Alu Iで処理した。各々のPCR生成物及び酵素処理後の検体を電気泳動・染色した結果を図3に示した。PCR生成物は491bpの位置にバンドが認められた。Alu I処理後では、対照の*C. jejuni*は200,160,120bpの3本のバンドが、*C. coli*は290,200bpに2本のバンドが認められた。一方、分離菌株全てが*C. coli*と同じ位置にバンドが認められ、*C. coli*であることが分子生物学的に確認できた。

それぞれの分離菌株について、16薬剤に対する感受性試験結果を表3に示した。全ての菌株はCCL,CPDZ,AZTのセファロスポリン,セフェム系に耐性を示したが、ニューキノロン系のLVFXに対しては耐性を示す菌株,感受性を示す菌株が認められた。また、モノディスク法

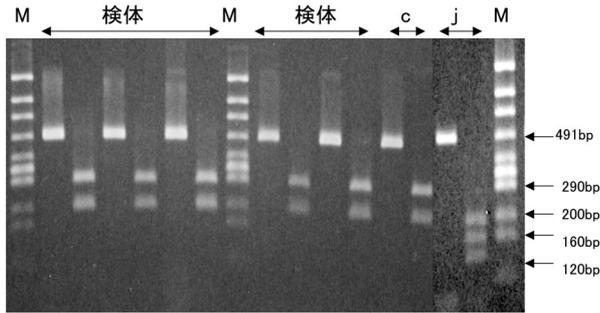


図3 PCR-RFLP画像

Mはマーカー, cは*coli*, jは*jejuni*を示す

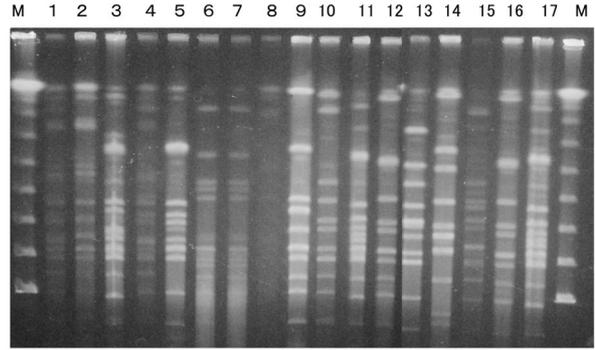


図4 分離菌株のPFGEパターン

表4 薬剤感受性試験

	ABPC	PIPC	CEZ	CAZ	CCL	FMOX	CPDZ	AZT	IPM	MEPM	GM	AMK	MINO	FOM	ST	LVFX
1	S	I	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R
2	S	I	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R
3	S	I	S	I	I	S	R	R	S	S	S	S	I	S	I	S
4	S	I	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	I	R
5	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	I	S	I	S
6	S	S	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
7	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
8	S	I	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	I	S
9	S	I	S	I	I	S	R	R	I	S	S	S	R	S	I	R
10	S	S	S	S	I	S	R	I	S	S	S	S	S	S	I	S
11	S	I	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S
12	S	I	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R
13	S	I	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	I	S	R	R
14	S	I	S	S	R	S	R	I	S	S	S	S	I	S	R	R
15	S	I	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	I	S
16	S	I	S	S	I	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R
17	S	I	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S

S: 感受性, R: 耐性, I: 中間

でもキノロン剤のNAに対して約半数が耐性を示した。このことから, 17菌株は同一の感受性を示す菌株でないことが示唆された。

それぞれの菌株を *Sma* I で行ったPFGE解析の結果の画像を図4に示した。15名から分離した17菌株(重複2菌株)のPFGE画像において1と2, 6と7, 11と17, 12と16はそれぞれ同一パターンを示したが, 17菌株全ての画像は一致せず, 遺伝子型が異なる複数の*C. coli*が混在していることが示された。

4 考 察

今回の食中毒事例で導入したPCR-RFLP法では, *C. jejuni*と*C. coli*の菌種の鑑別が2~3日で同定できることから, 迅速診断法として日常検査に有用であることが確認できた。

*C. jejuni*による食中毒では, 複数の血清型による混合

感染を示す事例が多く報告されている²⁾。本事例は*C. coli*による事例ではあるが, 薬剤感受性及びPFGE解析の結果から, 複数の遺伝子型による混合感染であったと考えられた。

通常, カンピロバクター属菌の同定には日数を要することから, 簡易同定法が日常検査に広く用いられている。特に, *C. jejuni*と*C. coli*の簡易同定法として, NA, CETに対する薬剤感受性及び馬尿酸水解能の有無による鑑別法が行われる。しかし, 近年カンピロバクターの薬剤感受性は変化し, NA耐性の菌株が増加傾向にある。

*C. coli*による本事例を経験し, カンピロバクター食中毒検査について新たな取り組みの必要性が求められ, 今後, カンピロバクター食中毒の検査には, PCR-RFLP法の導入が重要であると思われる。また, 薬剤感受性試験は, 菌種の同定用としてより耐性菌動向の監視に有用であり, 実施すべき検査項目と思われた。

5 謝 辞

本事例に関係しました保健所の皆様に深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 坂崎利一ほか：食水系感染症と細菌性食中毒，中央法規出版（200），p336 - 362
- 2) 荒井富雄ほか：カンピロバクターによる食中毒事例，宮城県保健環境センター年報（1998），p39 - 41
- 3) Fermer .C et al : Specific PCR Identification and Differentiation of the Thermophilic Campylobacters , *Campylobacter jejuni* , *C.coli* , *C.lari* , and *C.upsaliensis* , J.Clin. Microbiol . 37 ,(1999) p3370 - 3373