



—青森の自然と文化—  
活彩あもり

I S S N 0917-1924

# 青森県環境保健センター研究報告

Bulletin  
of  
Aomori Prefectural Institute of Public Health and Environment

No.10 1999

青森県環境保健センター

# は じ め に

昨年の夏は、北日本を中心に30℃を越す真夏日が続き、記録的な猛暑となりました。本県では腸炎ビブリオによる食中毒が多発し、連日新聞テレビ等で報道されたところです。

原因は、食材等の不適切な取扱い、不衛生な施設、及び事業者の衛生思想の欠如等によるものです。

当センターでは、行政の一翼を担う機関としてこれらの諸問題を重く受け止め、関係機関と連携を図りながら、防止対策を強化していかなければならないと考えています。

また、食中毒菌も含めた病原体検査の高度化を図るため、バイオハザード防止施設の整備を計画的に進めており、平成11年度で同施設の整備を終え、平成12年度からはこの施設を利用した調査・研究に着手することとしており、微生物業務の進展が図られるものと考えています。

一方、現在日本では数万もしくはそれ以上の化学物質が流通し、その有害性が未解明であると言われてしています。

これらの化学物質のうち、ダイオキシン類及び環境ホルモンによる環境汚染がクローズアップされています。

当センターにおいてもダイオキシン類の測定体制の整備の必要性については十分認識しており、県民に迅速な環境の情報を提供することを念頭に置きながら、安価で、しかも維持管理の容易な施設の設置について検討しているところです。

ここに、平成10年度の研究報告を年報として取りまとめました。

ご高覧いただければ幸いに存じます。

平成12年2月

青森県環境保健センター

所長 福 彗 寛 二

# 目 次

## I 報 文

- イカ菓子食中毒事件に係るサルモネラ汚染実態の疫学的考察  
対馬 典子 杉山 猛 大友 良光 品川 邦汎…………… 1
- 青森県内におけるクリプトスポリジウム汚染実態調査  
対馬 典子 杉山 猛 佐藤 孝 筒井 理華 大友 良光  
野澤 直史 対馬 和浩…………… 11
- ヘテロデュプレックス法による癌抑制遺伝子p73の変異解析  
武沼 浩子 畑山 一郎…………… 16
- 青森県における疫病の地域集積性と環境因子  
中谷 実 葛西恵里子 清水 友敬 山本 明美 高橋 政教…………… 20
- 十和田湖の透明度に及ぼす魚類の影響 (1995~97)  
三上 一 今 俊夫 工藤 幾代 前田 寿哉 石塚 伸一  
工藤 健 野澤 直史 大久保英樹 中川 恵 伯耆 晶子  
長崎 勝康 水谷 寿…………… 31
- 金属製錬工場周辺地域の粉じん苦情処理におけるCMB法の適用事例  
花石 竜治 早狩 進…………… 45

## II ノ ー ト

- 青森県内におけるレジオネラの汚染実態調査  
筒井 理華 対馬 典子 大友 良光…………… 49
- 食品の食中毒菌汚染実態調査  
筒井 理華 対馬 典子 大友 良光…………… 52
- GPCクリーンアップを用いたカーバメイト系農薬の迅速一斉分析法の検討  
清水 友敬 中谷 実 三浦 啓徳 高橋 政教…………… 55

## III 他誌投稿抄録…………… 59

## IV 学会等発表抄録…………… 61

# CONTENTS

## I **Original Articles**

Epidemiological Study of Salmonella Contaminated Squid Chips Noriko THUSHIMA, Takeshi SUGIYAMA, Yoshimitu OTOMO, and Kunihiko SHINAGAWA .....	1
Surveys of Actual Status of Cryptosporidium Pollution in Aomori Prefecture Noriko TSUSHIMA, Takeshi SUGIYAMA, Rika TSUTSUI, Yoshimitu OTOMO, Naohumi NOZAWA and Kazuhiro TSUSHIMA .....	11
Analysis of Antioncogene Gene <i>p73</i> Mutation by the Heteroduplex Hiroko TAKENUMA and Ichiro HATAYAMA .....	16
Spatial Disease Clustering and Environmental Factors in Aomori Prefecture Minoru NAKAYA, Eriko KASAI, Tomotaka SHIMIZU, Akemi YAMAMOTO and Masanori TAKAHASHI .....	20
Influence of Fish on Transparency in Lake Towada (1995~1997) Hajime MIKAMI, Toshio KON, Ikuyo KUDO, Toshiya MAEDA, Shinichi ISHIZUKA, Ken KUDO, Naohumi NOZAWA, Hideki OKUBO, Noriko TAKAMURA, Megumi NAKAGAWA, Akiko HOUKI, Masayasu NAGASAKI and Hisashi MIZUTANI .....	31
Application of CMB Methods to Management of a Dust Grievance Complained by Inhabitants Around Smelting Factory Districts Ryuji HANAISHI and Susumu HAYAKARI .....	45
<b>II Notes</b>	
Studies on Analytical Methods for N methylcabamate Pesticides GPC Clean-up Tomotaka SHIMIZU, Minoru NAKAYA, Hironori MIURA, Masanori TAHASHI .....	49
Incidence of <i>Legionella</i> Species in Aomori Prefecture Rika TSUTSUI, Noriko TSUSHIMA, Yoshimitu OTOMO .....	52
Survey on Food Poisoning Bacteria in Vegetables and Meat Rika TSUTSUI, Noriko TSUSHIMA, Yoshimitu OTOMO .....	55
<b>III Summaries of Other Publications</b> .....	59
<b>IV Abstracts of Presentation in Society Meeting</b> .....	61

I 報 文

# イカ菓子食中毒事件に係るサルモネラ汚染実態の疫学的考察

対馬 典子 杉山 猛 大友 良光 品川 邦汎<sup>1</sup>

1999年3月、県内の1工場で製造されたイカ菓子による集団食中毒事件が発生した。原因菌は、サルモネラ・オラニエンブルグ(SO)とサルモネラ・チェスター(SC)であり、患者は全国46都道府県の1,505名にのぼった。この事件に関連し、原因食品と製造工場、並びに原料イカ輸入港周辺と工場周辺等の環境について調査を行った。分離菌に関し、生化学的性状、薬剤感受性試験、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR法)による病原遺伝子検索、パルスフィールド・ゲル電気泳動法(PFGE)による遺伝子解析、耐熱性、耐乾燥性、食塩耐性試験等を実施し疫学的考察を試みる一方、本事例と県内の散発サルモネラ症との関連を考察した。その結果、工場の高い汚染が判明すると共に、原料輸入港付近の海面のゴミや海鳥の糞、そして原因工場の下水から、患者、食品由来と同一と思われるSOが分離され、本事件との関連性が示唆された。環境からはSCは分離されなかった。また、分離菌は40℃以下では大幅な減少はなく、乾燥に強く、海水中では長期間生存が可能と考えられた。さらに、散発サルモネラ症の監視が潜在的集団発生の発見に有用である可能性が示唆された。

Key word : *Salmonella* Oranienburg, *Salmonella* Chester, Polymerase chain reaction, Pulsed-field gel electrophoresis, Squid chips

## 1. はじめに

サルモネラは腸内細菌科に属するグラム陰性の桿菌で、芽胞を形成せず、大部分は周毛性の鞭毛を有し、運動性を示す。O抗原およびH抗原の組み合わせにより、約2,000種類の血清型が明らかにされているが、チフス菌、パラチフスA菌などの法定伝染病菌を除く、大部分のサルモネラは食中毒の原因となる<sup>1)</sup>。

本県における散発サルモネラ感染症については1995年から増加傾向にあり、その中でも血清型O9とO7が多い状況である。全体に占める割合はO9が圧倒的ではあるが、1997年からはO7も増加傾向にあり、今年に入ってから急増中であった。その様な状況の中で、川崎市で3月、サルモネラ・オラニエンブルグ(*Salmonella* Oranienburg: 以下、SOと略す)を原因菌とする乾燥イカ菓子による食中毒が発生し、全国各地で続々と患者が確認され、その後、サルモネラ・チェスター(*Salmonella* Chester: 以下、SCと略す)も関与していることが明らかとなった。そして、5月17日の厚生省の最終報告では患者数は1,505人に達した。

このように全国規模で発生し、更にイカ乾製品が原因となって食中毒が発生したことは過去に例を見ない事件であった。

この事件に関し、青森県では「サルモネラ・オラニエンブルグ食中毒事件原因究明検討委員会」を組織して原因究明にあたり、既にその成績は公表されている<sup>2)</sup>。著者らは、細菌学的見地からの原因究明に関与したが、今

回、これに追加して、本県の散発サルモネラ症患者の動向並びに原因菌の諸性質をもとに疫学的考察を行ったのでその概要を報告する。

## 2. 材料と方法

### 2・1 調査材料

原料(凍結イカミミ)の水揚げ場所から出荷までについて、魚市場付近の環境調査、製造施設ふき取り検査、イカ乾燥製品等343検体を採取した(表1)。

表1 調査対象

調査対象	検体数
原料関係(冷凍庫内のイカミミ等)	13
魚市場関係	39
環境関係	50
施設関係	155
従業員	26
回収製品	60
計	343

(1) 器具・機材等の拭き取り検査: 滅菌手袋(井内サニメント手袋)を装着し、5mlのリン酸緩衝生理食塩水(以下、PBSと略)を浸した滅菌ガーゼ(30cm×20cm)で1m<sup>2</sup>前後を丹念にふきとり、ストマッカー用ポリ袋(栄研器材、滅菌ケンサバック)に投入した。

ア. 乾燥面: 適量のリン酸緩衝生理食塩水を散布し、付着乾物は千枚通しで剥離させ拭き取った。

1: 岩手大学農学部

- イ、天上面：釣り竿の先にガーゼを巻き拭き取った。
- (2) 採水：サルモネラ検査用の井戸水原水の採取については、5ℓポリタンクに消毒用アルコールを注入し、採水時に供洗いしてから採水した。一般生菌数及び大腸菌群数検査用の採水には滅菌ポリ容器を用いた。
- (3) 土壌（採泥）：滅菌手袋を用いて100～500gを採取した。
- (4) 海面のゴミ：岸壁に寄せられているものを採取した。
- (5) 海鳥の糞：岸壁等に点在するものを5羽分まとめて拭き取った。
- (6) イヌ・ネコの糞：岸壁近辺の路上にあるものを1個体毎に採取した。

## 2・2 実施期間

原因究明検討委員会が組織される前の4月7～12日に、保健所主体で従業員の検便、井戸水、拭き取りの検査が実施された。

その後、第一回検討委員会を受け環境保健センターにおいて4月28日に第2工場（製造施設の拭き取り等）、第二回検討委員会を受け5月17～22日にかけてイカ水揚げ場の環境、第1・3工場について検査を実施した。

## 2・3 検査項目

サルモネラ菌、サルモネラ菌数、一般生菌数、大腸菌群数、水分活性、薬剤感受性試験、パルスフィールド・ゲル電気泳動法（PFGE）による遺伝子解析（*Bln I*, *Xba I*消化）、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR法）病原性遺伝子検出検査、そして、耐熱性、耐乾燥性、耐塩性等の各種試験検査を行った。

## 2・4 検査方法

### (1) サルモネラ検査（菌分離）

検査材料をBPW（メルク社）にて一次増菌、RVブイヨン（オキソイド社）にて二次増菌し、DHL寒天培地（日本水社）で分離培養した。各検体毎にサルモネラが疑われる集落を20個を限度にサルモネラ診断用免疫血清（デンカ生研社）で凝集反応を実施した。

### (2) サルモネラ菌数測定

イカ乾製品については、10倍希釈液を調製し、MPN5本法あるいはその200μℓをDHL平板上に傾けながら均等に拡散させ、培養するCFU法により算定した。

### (3) 一般生菌数・大腸菌群数

試料10gを秤量後、ストマッカービニール袋に移し9倍量のPBSを加えてストマッカーにて乳化し、9mlのPBSに1ml接種して10倍段階希釈した。

ア 生菌数：井戸水は $10^{-1}$ 、イカ乾製品は $10^{-6}$ 、冷凍イカミミは $10^{-1}$ ～ $10^{-3}$ まで希釈した。

イ 大腸菌群数：イカ乾製品・冷凍イカミミは $10^{-1}$ ～ $10^{-3}$ まで希釈した。なお、井戸水については特

定酵素基質培地法（MMO-MUG法）で定性試験を行った。

上述の各希釈試料液1mlを2枚のシャーレに分注し、生菌数には標準寒天培地、大腸菌群数にはデソキシコレート培地を12ml加えて混釈し、固化させ、さらに6mlを重ねし、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で24～48時間培養後、集落数を測定し菌数を算出した。

### (4) 水分活性

室温放置のイカ乾製品の1g以上を計り取り、それを恒温恒湿内（ $23.5^\circ\text{C}$ , 54.4%）においてハイグロスコープDT型（ロトロニック社）にセットすることにより、平衡状態のもとで発生する相対湿度を測定した。

### (5) 生化学的性状

生化学的性状検査については、市販キット（日本ビオメリュー株式会社）のAPI20E（ $35 \sim 37^\circ\text{C}$ , 18～24時間培養）及びRapiD20E（ $35 \sim 37^\circ\text{C}$ , 4時間培養）を使用し同定した。

### (6) 薬剤感受性試験

12種の薬剤を対象に、ミューラーヒントンII培地（12ドロッパー用）、BBL センシディスクを用い、NCCLS（米国臨床検査標準委員会）の手法<sup>3)</sup>により行った。

使用薬剤は、アンピシリン（ABPC）、クロラムフェニコール（CP）、ストレプトマイシン（SM）、ST合剤（SXT）、テトラサイクリン（TC）、トリメプトプリン（TMP）、シプロフロキサシン（CPFX）、ゲンタマイシン（GM）、カナマイシン（KM）、ナリジクス酸（NA）、セフトオキシム（CTX）、ホスホマイシン（FOM）であった。

### (7) パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）

国立感染症研究所の方法に準じ<sup>4)</sup>、2種類の制限酵素（*Bln I*, *Xba I*）を用い、遺伝子解析を行った。

### (8) PCR法による病原遺伝子検索

分離菌について、市販のプライマー（タカラ社）を用い、侵入性遺伝子およびエンテロトキシン遺伝子を検索した。

### (9) 耐熱性試験

乾製品は $45 \sim 50^\circ\text{C}$ で24時間の乾燥が行われているが、この温度でサルモネラが殺菌され得るかを確認した。

（使用菌株）

A 菌：Salmonella Oranienburg

B 菌：S.Chester

C 菌：S.Enteritidis

D 菌：E.coli

E 菌：検体中に最も多い菌（グラム陰性無芽胞桿菌、未同定）

各菌液を $50^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $4^\circ\text{C}$ に24時間放置して菌数の変化をみた。

#### (10) 耐乾燥性試験

乾製品は室温で4～5ヶ月の賞味期限があることから、前述の耐熱性試験で使用したA～E菌を用い、乾燥状態でのサルモネラ等の生残性を確認した。

各菌株を蒸留水で溶解し、その一定量を滅菌スライドグラスに塗布、乾燥して、50℃、40℃、20℃、4℃に保存し、前2者の温度には24時間、後2者は長期保存後に菌数を測定した。

#### (11) 食塩耐性試験

SOとSCが海域へ流出した場合を考慮し、その食塩耐性を検討した。

耐熱性試験で使用したSO、SC菌を用い、その一定菌数を3%食塩水及び生理的食塩水に接種し、20℃で経日的に菌の生残性をみた。

#### (12) SOとSCの増菌培養による発育数の変化

イカ乾製品からはSOとSCの2菌種が分離されているが、増菌培養により発育（検出）に差が出るものかどうかを検討した。

使用菌株は前述のA、B菌を使用した。

菌数の割合（SO：SC）を9：1、1：1、1：7の割合に調製し、これを一次増菌培養後（BPW）、二次増菌培養（セレナイトシスチンブロス）後、1%イノシトール加BTB寒天平板に塗布して各菌数を測定した。

#### (13) イカ乾製品の重合部位の菌数測定

イカミミは調味後プラスチックの網の上に重ね合わせて乾燥されるため、乾燥しにくい重ね合わせ部位で菌が増殖している可能性が考えられるので確認した。

検体No.1：厚みがある。サルモネラ・オラニエンブルグ（SO）（2,200個/g）、サルモネラ・チェスター（SC）（250個/g）検出。

検体No.2：厚みがある。増菌培養でSO検出。

各検体から2ヶ所約100～200mm<sup>2</sup>切断し、図1のように採取し、菌数を測定した。

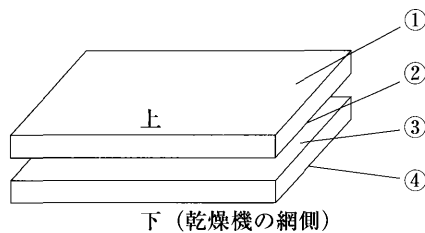


図1 イカ乾製品切断図

### 2・5 「病原微生物検出情報」に基づく、本県の散発サルモネラ症患者数の推移について

「病原微生物検出情報」は国立感染症研究所（旧予防衛生研究所）の事業として、1979年から全国地方衛生研究所の参加の下に実施されている。現在、本県では、環

境保健センター、試験検査課のある3保健所（青森・弘前・八戸）そして県内5病院を対象に、毎月の病原体の集計を行っている。病院については、（社）弘前市医師会成人病検診センター、五所川原市立西北中央病院、青森県立中央病院、むつ総合病院、八戸市立市民病院の五ヶ所に定点を置き毎月の検出病原体の集計を行っている。

今回はこの情報を用いて解析した。

## 3. 結 果

### 3・1 検出状況

表2 検出状況

	検体数	陽性数
原料関係（冷凍イカミミ等）	13	0
魚市場関係	39	0
環境関係	50	4
施設関係	155	43
従業員	26	15
回収製品	60	46
計	343	108

（結果の詳細については、回収製品は表3をそれ以外は表10を参照）

原料、魚市場関係からはサルモネラは不検出であった。環境関係では、海鳥の糞、海面のゴミ、下水からSOが、昆虫類からO7：H-が検出され、施設関係からは、器具・器材のふきとり等よりSO、SC、O7：H-が検出された。また、従業員26名の検便を行った結果、15名からSOが検出されたが、SCは検出されなかった（表2）。

### 3・2 回収した乾燥イカ葉子の検査結果

水分活性については0.448～0.624（平均0.536）であり、病原細菌の発育最低水分活性0.94<sup>5)</sup>を考慮すると流通時における増殖は考えがたい。

なお、サルモネラ菌数、一般生菌数、大腸菌数については表3のとおりである。

表3 乾燥イカ葉子の検査結果

	陽性数/検体数	菌量（個/g）
SO	46/60	50～1.0×10 <sup>4</sup>
SC	5/60	50～2.5×10 <sup>2</sup>
一般生菌数	-	1.5×10 <sup>6</sup> ～6.9×10 <sup>8</sup>
大腸菌群数	-	<300～2.3×10 <sup>5</sup>

### 3・3 生化学的性状

分離サルモネラ菌株は、SO、S. O7：H-、SC、血清



型別不能株であった。上記4種の型においてSC以外の性状は全て同一であった(表4)。SCの他との性状の相違は、リシン脱炭酸性(-)、イノシット分解性であり、サルモネラとして一般的に示される性状ではなかった。

表4 分離サルモネラ菌株の生化学的性状  
(Api20E コードNo.)

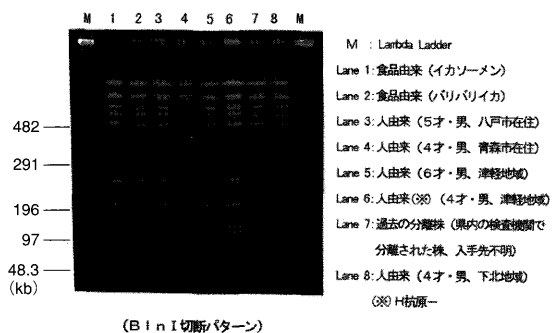
分離菌株	API20E	RapiD20E
S. Oranienburg	6704552	6245250
S. O7:H-	6704552	6245250
S. Chester	2704752	4045250
血清型別不能	6704552	6245250

### 3・4 薬剤感受性試験

使用した12種類の薬剤に対し、すべての菌数が感受性を示した。

### 3・5 PFGE解析

環境、施設、従業員、イカ製品から代表的な分離株を選び、*Bln I*, *Xba I* 消化DNAのPFGEを実施したところ、その泳動像は、SOとO7:H-は同一、及びSCはそれぞれ同一であった(図2, 3参照)。



(*Bln I* 切断パターン)

図2 PFGE fingerprints of SO strains

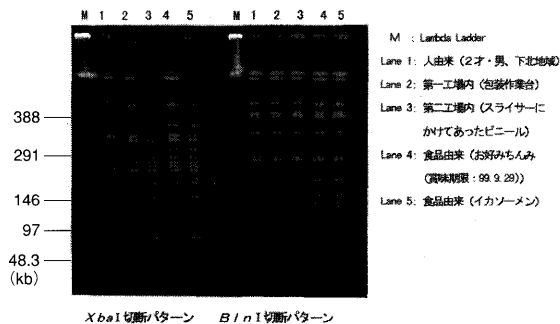


図3 PFGE fingerprints of SC strains

### 3・6 PCR

4種の型について、PCRを実施したところ、4種とも、*inv A* (侵入性遺伝子領域, 378bp), *stn* (エンテロ

トキシン遺伝子領域, 264bp)が増幅され、病原性が証明された。

### 3・7 電子顕微鏡写真

今回分離されたSOの電子顕微鏡写真を図4に示す。

なお、分離株の中には、頻回運動性の強化を行ってもHの型が定まらないものもあり、電子顕微鏡写真をとったところ、図5のように、鞭毛が全く見られず菌体のみであった。しかし、PFGEの結果はSOとO7:H-とは同一であった。

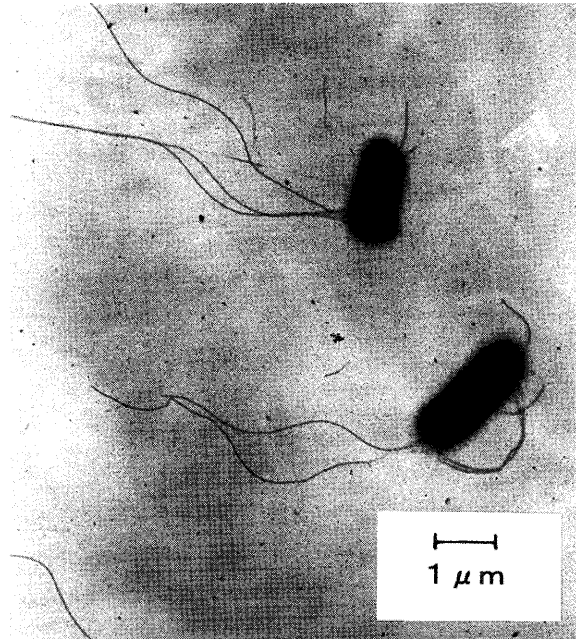


図4 電子顕微鏡像 (*Salmonella Oranienburg*)

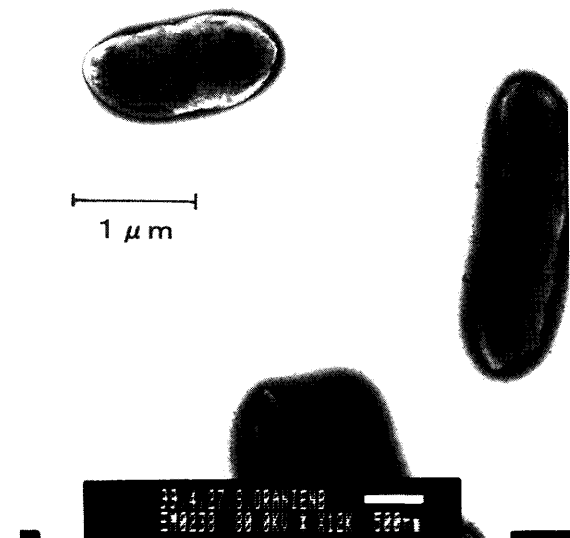


図5 電子顕微鏡像 (O7:H-)

### 3・8 耐熱性試験

50℃では急激な減少をみるが、40℃以下ではさほど減少は認められなかった(図6参照)。

### 3・9 耐乾燥性試験

4℃では、SOについては約1ヶ月、SCについては約3ヶ月は生残することが明らかになった（表5参照）。

### 3・10 SOとSCの食塩耐性

3%食塩水及び生理的食塩水のどちらの条件においても、5ヶ月経過した時点で、菌数の顕著な減少は認めら

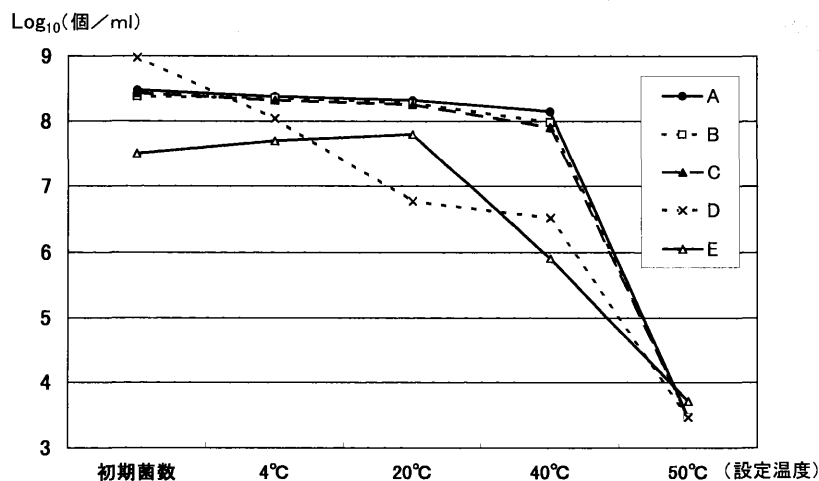


図6 耐熱性試験結果

表5 耐乾燥性試験結果

菌株	接種菌数 (個/スライドグラス)	乾燥後菌数 (個/スライドグラス)	温度	経過							
				24時間	5日目	12日目	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	4ヶ月	
A	7.0×10 <sup>6</sup>	2.0×10 <sup>6</sup>	50℃	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>							
			40℃	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>							
			20℃	7.7 × 10 <sup>5</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>	3.2 × 10 <sup>4</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>				
			4℃	8.7 × 10 <sup>5</sup>	6.4 × 10 <sup>3</sup>	5.9 × 10 <sup>4</sup>	3.4 × 10 <sup>4</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>			
B	4.5 × 10 <sup>6</sup>	1.0 × 10 <sup>6</sup>	50℃	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>							
			40℃	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>							
			20℃	5.4 × 10 <sup>5</sup>	3.7 × 10 <sup>3</sup>	2.0 × 10 <sup>4</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>			
			4℃	6.3 × 10 <sup>5</sup>	1.1 × 10 <sup>5</sup>	5.8 × 10 <sup>4</sup>	4.2 × 10 <sup>5</sup>	5.1 × 10 <sup>4</sup>	7.8 × 10 <sup>3</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>	
C	7.2 × 10 <sup>6</sup>	1.7 × 10 <sup>6</sup>	50℃	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>							
			40℃	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>							
			20℃	8.2 × 10 <sup>4</sup>	5.1 × 10 <sup>3</sup>	6.2 × 10 <sup>3</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>			
			4℃	1.9 × 10 <sup>5</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>	4.3 × 10 <sup>4</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>			
D	2.7 × 10 <sup>6</sup>	欠測	50℃	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>							
			40℃	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>							
			20℃	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>						
			4℃	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>						
E	9.1 × 10 <sup>5</sup>	9.3 × 10 <sup>6</sup>	50℃	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>							
			40℃	1.0 × 10 <sup>5</sup>							
			20℃	5.2 × 10 <sup>5</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>	4.8 × 10 <sup>3</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>			
			4℃	9.3 × 10 <sup>5</sup>	3.2 × 10 <sup>4</sup>	1.4 × 10 <sup>4</sup>	2.5 × 10 <sup>4</sup>	< 5.0 × 10 <sup>4</sup>	< 3.0 × 10 <sup>3</sup>		

れていなかったが、6ヶ月後にして、1/10の減少がみられた（表6参照）。

### 3・11 SOとSC菌の増菌培養による発育数の変化

最初の構成比にかかわらず、二次増菌後は同一菌数となる（表7参照）。

### 3・12 イカ乾製品の重合部位の菌数測定

上部より中部、中部より下部の菌数が多く検出された（表8参照）。

### 3・13 青森県の年別散発サルモネラ症患者数

本県における散発サルモネラ感染症については、血清型O9が1995年から、O7が1997年から増加傾向にあった（図7参照）。

### 3・14 青森県のサルモネラ血清型O4、O7による患者数

今回の事件の原因菌であるサルモネラ・オラニエンブルグ及びチェスターの血清型であるO7とO4について、昨年と今年の月毎の患者数を示した（図8参照）。

1998年と1999年を比較すると、O7については、1999年の6ヶ月分が既に1998年の1年間分を超えており、また、O4については、1998年の1年間分と1999年の6ヶ月分はほぼ同数を示している。

発生状況については、O7は1998年は夏をピークに、冬は下降しているが、1999年は年が明けた途端急増し、3～4月をピークに、5月以降は減少している。O7とO4の関係については、1998年は無関係であるが、1999

表6 SOとSCの食塩耐性試験結果

菌種	初期菌数 (個/ml)	経日的菌数変化 (個/ml)									
		1日目	2日目	5日目	22日目	63日目	90日目	125日目	148日目	182日目	
A(S.O.)	3%	$8.0 \times 10^5$	$6.4 \times 10^5$	$3.9 \times 10^5$	$9.5 \times 10^4$	$4.1 \times 10^4$	$2.1 \times 10^5$	$3.0 \times 10^5$	$3.9 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$1.0 \times 10^4$
	0.85%	$8.0 \times 10^5$	$5.4 \times 10^5$	$4.9 \times 10^5$	$5.7 \times 10^5$	$3.9 \times 10^4$	$3.3 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$	$4.3 \times 10^4$	$< 3.0 \times 10^3$
B(S.C.)	3%	$6.0 \times 10^5$	$4.5 \times 10^5$	$3.7 \times 10^5$	$3.0 \times 10^5$	$5.8 \times 10^4$	$6.6 \times 10^5$	$1.1 \times 10^6$	$8.3 \times 10^4$	$7.1 \times 10^4$	$6.3 \times 10^3$
	0.85%	$6.0 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$	$4.5 \times 10^5$	$7.4 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$	$2.8 \times 10^6$	$1.8 \times 10^6$	$8.7 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	$1.5 \times 10^4$

表7 SOとSCの増菌培養による発育数の変化

S.O : S.C	接種菌数S.O : S.C	一次増菌後の菌数 (個/ml) の比	二次増菌後の菌数 (個/ml) の比
9 : 1	$1.8 \times 10^6 : 2.0 \times 10^5$	$4.4 \times 10^7 : 9.1 \times 10^8$	$6.9 \times 10^7 : 1.5 \times 10^8$
1 : 1	$1.1 \times 10^6 : 1.0 \times 10^6$	$9.1 \times 10^8 : 2.8 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8 : 2.3 \times 10^8$
1 : 7	$2.0 \times 10^5 : 1.4 \times 10^6$	$6.4 \times 10^8 : 3.8 \times 10^8$	$1.6 \times 10^7 : 2.1 \times 10^8$

表8 イカ乾製品の重合部位の菌数測定結果

検体	各部位別の1cm <sup>2</sup> 当たりの菌数			
	①	②	③	④
No. 1 - 1	$8.1 \times 10^2$	$3.0 \times 10^3$	$2.8 \times 10^3$	$5.1 \times 10^4$
No. 1 - 2	$2.8 \times 10^2$	$1.3 \times 10^3$	$9.4 \times 10^2$	$4.7 \times 10^4$
No. 2 - 1	$< 20$	$3.3 \times 10^2$	$2.6 \times 10^4$	$3.7 \times 10^4$
No. 2 - 2	$< 20$	$1.1 \times 10^3$	$2.2 \times 10^3$	$1.6 \times 10^4$

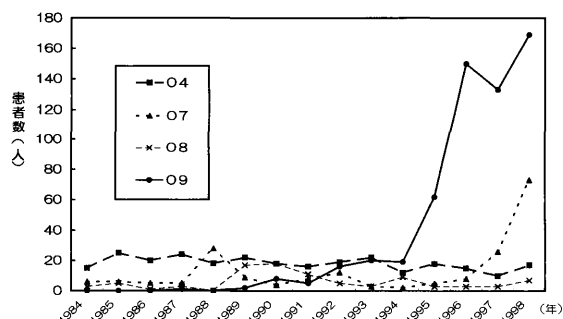


図7 青森県の年別散発サルモネラ症患者数

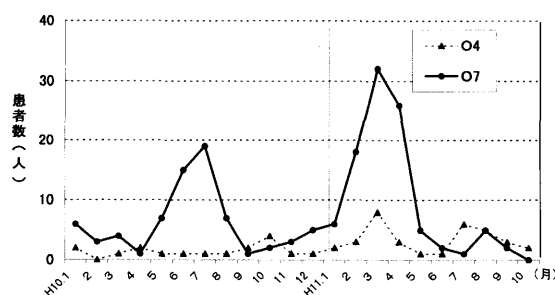


図8 散発サルモネラ症患者数  
(1998年1月～1999年10月)

年についてはO7とO4は連動しているかのように見受けられる。

O7については、1998年のピークも1999年のピークと同様、潜在的集団発生（diffuse outbreak）が疑われる。

### 3・15 H地区で3月に発生した散発事例

本事件が、全国的な拡がりを見せる1ヶ月ほど前に、県内のある地区において、病院からの菌株を同定したもののうち、SO及びSCが幼児から集中的に検出されていた。

1999. 3. 5 *Salmonella* Chester (1株)

3.19 *Salmonella* Oranienburg (3株)

3.25 *Salmonella* Chester (1株)

*Salmonella* Oranienburg (1株)

3. 25の事例は、5才、8才の兄弟からそれぞれ別々に分離されたものであった。

### 3・16 分離O7株の同定（県内医療機関からの収集）

表9 分離O7菌株（1999. 8月末集計）

年	株数	Oranienburg	Infantis	Montevideo	Thompson	その他
93	2			1	1	
94	2					2
95	3		1			1
96	5		1	1	1	2
97	24		3	19	1	1
98	57		2	44	6	5
99	52	46	2	1	1	2
計	145	46	9	66	11	13

このようなことから、O7株（SOの血清型）の同定及び菌株間の分子疫学的解析の実施を目的として、事件の発覚する直前の4月の初めに、県内の医療機関等にO7菌株の提供依頼を行った。収集した株を同定した結果、SOは1999年に入ってから検出されはじめたことが判明した（表9）。また、1997年、1998年のO7は*Salmonella* Montevideoに代表されることも判明した。これはdiffuse outbreakと考えられる。

## 4. 考 察

今回の事件の特徴としては、まず第一に、全国46都道府県1,505名にまで及んだ広域的発生であったことである。この背景には多くの要因のあることが示されているが、細菌学的に見た場合、製品の形態とその中のサルモネラ汚染菌数が大きな役割を果たしていたものと考えられる。イカ乾製品は21品目の商品名となって全国に流通され、各地で喫食されたが、いずれも一度に多量に喫食できるものではなく、しかも汚染菌数が少なかったため、接種菌数が少なく、比較的抵抗性の低い発病者が多かつ

たものと考えられる。このことは、本事件の原因工場の従業員も喫食しているが、発病はせずに単に菌を保有していたにすぎないことからもうかがえる。

第二に、サルモネラ・オラニエンブルグとサルモネラ・チェスターの2菌種が関与していたことである。事件探知後しばらくはSOのみによる事件と考えられていたが、後日、食品検査によりSCも検出され、この2血清型菌が関与した事件であることが明らかになった<sup>6)</sup>。SCの検出が遅れた理由として、一つにはSCがリシン非分解性であり、一般的なサルモネラの性状とは異なっていたこと、二つには両血清型の混合比が異なっており菌分離の際に多数の集落を釣菌しなければならなかったこと等が考えられる。今回はSCよりもSOの検出割合が高く、両者の間に発育特性の差があったのではないかの考えもあるが、上記以外の性状、耐熱性、耐乾燥性、そして3%食塩水中における生残性にも大きな相異は見当たらず、また、両者の混合比を1倍及び10倍の違いにしても24時間培養後にはほぼ同数になることから、サルモネラは原材料への汚染の段階で混合比に違いが見られ、菌数が最大になる以前に発育が停止した可能性が考えられる。

一方、今回の事例では乾燥中にイカ菓子の重合部位でのサルモネラ増殖が疑われたが、一般生菌数は、製品加工前の板イカについて乾燥用網に載せた場合の上部、重合部、そして下部（乾燥網への付着面）の順となっていた。このことは、味付け後の菌数は均等に分散していたが、乾燥段階で、単に上部の菌は下部へ落ちて乾燥し、重合部の菌数がそれほど多くないのは乾燥中の菌増殖があまり旺盛でなかったようにも考えられた。したがって、サルモネラは乾燥工程以前に多く増殖していた可能性も考えられるが、今後の実験を待ちたい。

第三に、これまで食品衛生関係者にも食中毒の原因としての意識はなかった水産乾燥食品が原因となって発生したことが挙げられる。これは、今までの食中毒の常識を覆す事件であった。古来、食品の乾燥は微生物の増殖防止手段として多用されてきたが、今回の様に、病原菌に汚染されたまま乾燥が成立した場合には、その菌種によっては食中毒に至ることが実証されたといえる。今回の基礎実験においてもサルモネラは保存温度が低ければ長時間の生存が可能と考えられた。従って、再発防止のためにも、“乾燥する以前に病原菌を排除する”あるいは“乾燥温度を厳密に調節して病原菌を死滅させる”等の予防策の検討が必要である。また、これまで水産乾燥食品における細菌検査データがあまり多くないため、今後、これらの微生物汚染に関する実態調査が行政的にも必要であると考えられる。

表10 検出状況の詳細

検体名	陽性数/検体数	血清型	検体名	洗浄消毒前 陽性数/検体数	洗浄消毒後 陽性数/検体数	血清型
原料関係			施設関係 (第二工場)			
凍結イカミミ	0/6		(生のイカを扱う工程)			
凍結イカゲソ	0/3		水切りザル	1/1	0/1	SO(1)
凍結イカ	0/2					SO(3)
商業用冷凍庫床	0/2		解凍・調味浸漬タンク	1/1	3/4	S. O7: H-(1)
魚市場関係						(消毒後)
魚市場使用水	0/2		調味液	1/2		SO(1)
場内床面拭き取り	0/6		解凍水	1/1		SO(1)
場内器具等拭き取り	0/17		スライサー		1/3	SO(1), SC(1)
排水溝泥	0/2		器具機材		1/5	SO(1)
岸壁拭き取り	0/6		床・壁等の拭き取り		2/11	SO(2)
岸壁の土・ゴミ	0/6		(乾燥工程)			
環境関係			製品くず	1/1		SO(1)
海鳥の糞		SO(1)	乾燥用アミ	1/1	0/1	SO(1)
(5羽分を1検体)	1/10	血清型別不能(1)	乾燥機拭き取り等		3/15	SO(3)
犬の糞	0/11		床・壁等の拭き取り		2/5	SO(2)
ネコの糞	0/9		台車		0/1	
ネズミ及びネズミ糞	0/2		(カット・包装関係)			
昆虫類	1/12	S. O7: H-(1)	カッター等	2/2	0/6	SO(2)
		SO(1)	作業台等	1/1	0/1	SO(1)
海面のゴミ	1/1	血清型別不能(1)	製品残品	1/1		SO(1), SC(1)
海水	0/3		タオル	1/1		SO(1)
	1/2		床・壁等の拭き取り		0/3	
下水	(陽性は第2工場由来)	SO(1)	(その他)			
施設関係 (第一工場)			排水溝等	2/2	0/10	SO(2)
器具等拭き取り	1/2	SO(1)	使用水	1/1	0/2	SO(1)
作業台	1/1	SO(1), SC(1), S. O7: H-(1)	浄化槽水		1/2	SO(1)
施設内床面拭き取り	3/3	SO(3), SC(1)	器具類拭き取り		2/8	SO(2)
施設内設備拭き取り	0/1		床・壁等の拭き取り	1/1	2/10	SO(3)
流しシンク内面	0/1		土壌等		1/12	SO(1)
トイレノブ	0/1		回収品 (イカゲソ)		2/2	S. O7: H-(2)
使用水	0/1		調味料 (副原料)		0/2	
冷蔵庫ステップ	1/2	SO(1), SC(1)	(注) 血清型: SO (サルモネラ・オラニエンブルグ), SC (サルモネラ・チェスター)			
階段	1/1	SO(1)	S. O7: H- (O7群, 鞭毛無)			
排水溝	0/1					
場外床面拭き取り	0/1					
浄化槽 (消毒前)	0/1					
浄化槽 (消毒後)	0/1					
施設関係 (第二工場)						
器具等拭き取り	0/5					
作業台	0/1					
施設内床面拭き取り	0/4					
施設内設備拭き取り	0/1					
流しシンク内面	0/2					
トイレノブ	0/1					
場外床面拭き取り	0/2					
排水ピット内汚水	0/1					
浄化槽 (消毒前)	1/1	SO(1), S. O7: H-(1)				
浄化槽 (消毒後)	0/1					

第四に、今回の調査で一部の環境材料からSOが検出され感染源との関連が示唆されたが、SCについては環境から分離されず、SOとSCの共通の感染源そして感染経路については不明であった。わが国では海域や漁場付近のサルモネラの分布状況は把握されていないが、今回の実験からも明らかなようにサルモネラは海水中で長期に生存している可能性があることから、河川中のサルモネラが海域に流出することによる汚染が危惧されるとともに、その生態が注目される場所である。

一方、サルモネラ食中毒は、近年、わが国で最も発生数の多いことで知られており、特に鶏卵とその加工食品を原因とするサルモネラ・エンテリティディス（*S. Enteritidis*）由来の食中毒には多大な関心が寄せられている。医療機関等における散発下痢症患者にもこのことを反映する事実が明白であるが、それ以外にも様々な血清型菌が分離されている。そこで、今回の事件発生時の実態の一端を見るために、「病原微生物検出情報」に基づく県内のO7（SOの血清型）の検出状況を調べた結果、本事件の食中毒としての届け出以前に、3月をピークとした発生が認められていた。このように検出情報に基づく患者数の増加が今回の集団発生探知前に認められていたことから、散発サルモネラ患者から分離される菌の血清型の常時監視は、潜在的集団発生（diffuse outbreak）の発見に有用であることがいえる。もしも、川崎市での発生の届け出が無かったとすれば、患者数は更に拡大していたであろうことから、このような事例をいち早く察知して予防するシステムの構築が必要と考えられる。

## 5. ま と め

今回の疫学的検証及び生残性試験から以下のことがわかった。

- (1) 全国的な拡がりを見せた本事件は、SO及びSCの複数菌による感染事例であった。環境からも、生化学的性状、PFGEパターン及び薬剤感受性が人由来菌株と同一のSOが検出されたが、「本調査の実施は発生してから日が経っている」という事や「オラニエンブルグは自然界においては決して珍しい菌種ではない」ということから、汚染源、感染経路については結局のところ特定できなかった。
- (2) SOもSCも50℃では急激に減少するが、40℃以下ではさほど減少しないという、今回、分離された菌株を用いての基礎的検討の結果は、イカ乾製品の製造工程でサルモネラを増殖させる条件（40～45℃程度）で乾燥させていたということを科学的に裏付けるものであった。
- (3) サルモネラは乾燥に強いとはよく言われるものの、4℃ではSOは約1ヶ月、SCは約3ヶ月生残性があるという結果から、商品の賞味期限が長く、購入後、長期保

存されていたことも被害拡大の要因と考えられる。

(4) SOとSCの食塩耐性試験の結果、3%食塩水及び生理的食塩水の両方の条件においても、5ヶ月までは菌数にほとんど変化なく、6ヶ月後にして、1/10減少が見られたという予想をはるかにかけはなれた結果であった。このことから、今回、「海鳥の糞から出された」とはいっても、環境中の詳細な調査はなされていないので、今後、当該菌の分析を明確にするために、海域付近の環境及びその周辺の小動物の調査が必要であると考えられる。

(5) 本事件が川崎市で発生に端を発する直前に、県内の医療機関において、SO及びSCが幼児から集中的に検出されていたことから、散発患者の発見がdiffuse outbreakの可能性を予測するということを考慮すれば、今後、散発事例の常時監視の結果、発生状況によっては、発生の早期からdiffuse outbreakの可能性を考慮して調査を行う必要がある。

なお、データの一部については本年度の日本食品微生物学会学術総会講演会において発表済みである<sup>7)</sup>。

## 謝 辞

本調査における検体採取等については「サルモネラ・オラニエンブルグ食中毒事件原因究明検討委員会」の下、生活衛生課および八戸保健所と共同で実施したものである。

本調査にあたり、貴重な御助言を賜りました国立感染症研究所細菌部 田村和満先生、東京都立衛生研究微生物部細菌第一研究科 柳川義勢先生、並びに御助言をいただいた多くの地方衛生研究所の関係各位に謝意を表します。

また、毎月の病原微生物検出情報の提供をいただいている県内関係医療機関に謝意を表します。

## 文 献

- 1) 三瀬勝利，他：食品中の微生物検査法解説書．第1刷，93-94，講談社，東京，1996.
- 2) サルモネラ・オラニエンブルグ食中毒事件原因究明検討委員会：サルモネラ・オラニエンブルグ食中毒事件原因究明検討委員会報告書．平成11年6月21日
- 3) 米国臨床検査標準委員会（NCCLS）：抗菌薬ディスク感受性テストの実施基準－第3版－日本語版．Order Code M2-A3 ISSN 0273-3099.
- 4) 岡典子，他：青森県内における志賀毒素産生性大腸菌（STEC）による感染症学－1993年～1997年9月－．青森県環境保健センター研究報告，8，1-5，1997.
- 5) 芝崎勲：微生物制御用語事典．初版，136，文教出

- 版, 大阪市, 1985.
- 6) 厚生省生活衛生局食品保健課: サルモネラによる食中毒について. 事務連絡, 平成11年4月30日.
- 7) 対馬典子, 他: イカ菓子食中毒事件に係るサルモネ

ラ汚染実態の疫学的考察. 第20回日本食品微生物学会学術講演要旨集, 43, 1999.

#### Abstract

## Epidemiological Study of *Salmonella* Contamination Involved in Food Poisoning Accidents as a Result of Contaminated Squid Chips

Noriko TSUSHIMA, Takeshi SUGIYAMA, Yoshimitsu OTOMO and Kunihiko SHINAGAWA<sup>1</sup>

In March 1999, a mass food poisoning accident occurred as a result of squid chips produced by a factory in Aomori Prefecture. The causative agents were *Salmonella* Oranienburg (SO) and *S. Chester* (SC); the number of patients stricken totaled 1,505 in 46 prefectures nationwide. With respect to the accident, causal food and its manufacturer were examined as well as the environment of the related factory and the port where the material (squid) was imported. The isolates were tested for biochemical characteristics, drug sensitivities, pathogenic gene searches via the PCR method, gene analysis via pulsed-field gel electrophoresis, heat tolerance, dryness tolerance, and salt tolerance for epidemiological studies. The relationship between this case and other sporadic accidents with *Salmonella* food poisoning was also studied. The results revealed a high level of contamination at the factory concerned and the presence of SO, which is thought to be identical with that isolated from patients and causal food, in trash on the sea surface and the feces of sea birds near the port for importation, and in drainage water from the factory concerned, suggesting an association with the present case. SC was not isolated from the environment. The isolates were viable at up to 40°C, tolerant to dryness, and thought to be able to survive in a seawater environment for a long time. Moreover, the results suggest that monitoring the sporadic occurrence of *Salmonella* food poisoning might be useful for the prediction of diffuse outbreak.

Key word : *Salmonella* Oranienburg, *Salmonella* Chester, Polymerase chain reaction, Pulsed-field gel electrophoresis, Squid chips

# 青森県内におけるクリプトスポリジウム汚染実態調査

対馬 典子 杉山 猛 佐藤 孝 筒井 理華  
 大友 良光 野澤 直史<sup>1</sup> 対馬 和浩<sup>2</sup>

1996年10月に厚生省より「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」が定められたが、この指針を受け、本県においても、1999年1～3月及び8～11月に、青森県内の10浄水場の水道原水及び浄水について、クリプトスポリジウム汚染の実態調査を実施した。その結果、調査期間を通して、クリプトスポリジウムおよびジアルジアは検出されなかった。

Key words : *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, Waterworks

## 1. はじめに

クリプトスポリジウムは人間や哺乳動物の消化管内で増殖し、感染症をもたらすが、塩素処理に耐性を有する原虫であり、水道原水汚染の問題が国際的に注目されてきている。クリプトスポリジウムは、孢子虫類コクシジウム目の寄生性原虫で、宿主はヒト、ウシ等の哺乳動物である。環境中では塩素やオゾンに抵抗性のオーシスト(4～6μm)として存在し、ヒトは数十個の経口摂取後、4～5日ないし10日程度で腹痛を伴う水様性下痢が3日～1週間程度持続し、嘔吐や発熱を伴うこともある。

日本では、1994年8月には神奈川県平塚市<sup>1)</sup>そして1996年6月には埼玉県越生町<sup>2)</sup>での2件の集団発生があったが、越生町における感染症については、我が国で初めての水道水に起因する感染症であり、このことも踏まえて厚生省は、同年10月に「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」を定め<sup>3)</sup>、また、1998年6月には指針の改正を行った<sup>4)</sup>。

この指針を受け、本県においても水源の汚染のおそれを確認し水道水の安全性を確認する目的で、平成11年より汚染実態調査を実施しているのものでその概要を報告する。

## 2. 材料と方法

### 2・1 調査対象

表1及び図1に示す県内10浄水場において水道原水と浄水を各々20ℓ、40ℓ採水するとともに、滅菌ポリビンに100mlの水道原水を採水した。

### 2・2 調査時期

1999年1月～3月(冬期間)と8月～11月(夏期間)に実施した。

表1 調査地点

水道事業体	浄水場	水源名	図1上の番号
青森市	横内	横内川	①
	堤川	堤川	②
弘前市	樋の口	岩木川	③
津軽広域水道企業団	総合	浅瀬石川ダム	④
八戸圏域水道企業団	根城	馬淵川	⑤
	奥入瀬	奥入瀬川	⑥
津軽広域水道企業団	月見野	山田川	⑦
	野末	岩木川	⑧
むつ市(※)	管理センター	小荒川、大荒川	⑨
七戸町	七戸町上水道	作田川	⑩

※ むつ市の管理センターについては、冬期の調査時は、小荒川のみ水源としていた。

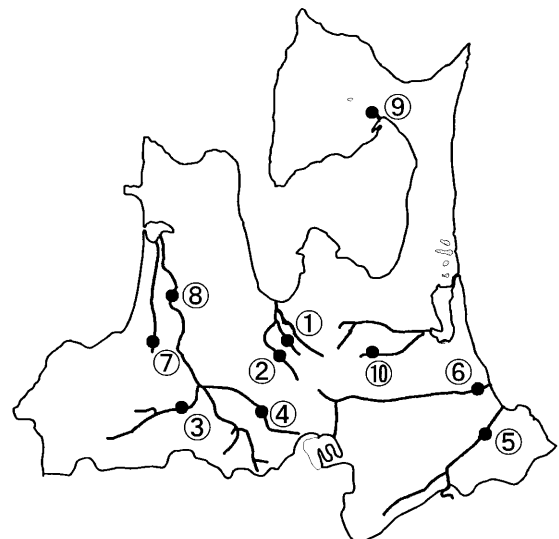


図1 調査地点図

1 : 生活衛生課  
 2 : 八戸保健所



## 2・3 検査項目

原水及び浄水について、クリプトスポリジウム及びジアルジアを検査する一方、原水については水道原水の糞便による汚染の指標として有効とされている大腸菌、糞便性大腸菌群、糞便性連鎖球菌、ウェルシュ菌芽胞<sup>5)</sup>についても検査した。

## 2・4 検査方法

環境中におけるクリプトスポリジウムの有無はオーシストの存在によって知ることができる。1985年以来、水からクリプトスポリジウムのオーシストを特異的に回収、検出するためのさまざまな手法が開発されてきた<sup>6)</sup>。今回は1996年10月に厚生省より定められた暫定対策指針<sup>3, 4)</sup>中に示されたオーシストの検出方法に従って実施した。

### (1) クリプトスポリジウム及びジアルジア

#### (試水の濃縮)

フィルター (ADVANTECMIXED CELLULOSE ESTER, 1.0  $\mu\text{m}$ , 47mm) で吸引ろ過 (浄水20  $\ell$ , 原水10  $\ell$ ) 後、採水容器及びろ過容器をPBS (生食 + Tween80, 以下T+と略) 200mlで洗浄する。更に、精製水 (0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過後の水) 約 500mlで洗浄し、フィルターをピンセットで丸めて遠心管 (使用フィルターの枚数に応じ、15ml又は50ml容量のもの) に入れる。

#### (PBS置換)

アセトン10mlを加え、攪拌し、フィルター溶解後、遠心分離 (3,000rpm, 10min.) しアセトンを少し残してアスピレータで吸引除去して、沈渣にアセトンを加えて、「攪拌、遠心分離、アセトンの吸引除去」する。更に、この操作を2回繰り返す。PBS (T+) を加えて「攪拌、遠心分離、上清の吸引除去」を2回行った後に、10%ホルマリン (10ml程度) で固定する。

#### (シヨ糖遠心沈殿浮遊法)

攪拌、遠心分離、ホルマリンの吸引除去後、PBS (T+) (10ml) を加え、よく攪拌し、濃縮試料 5 mlをポリスチレン遠心管 (15ml) にとる。攪拌 (ボルテックス) し、パスツールピペットでpercollシヨ糖溶液 2.5mlを水層の下に界面を乱さないように注入する。遠心分離 (3,000rpm, 10min) 後、水層、中間層、下層上部をパスツールピペットで別のポリスチレン遠心管に回収する (はじめに中間層を取り、percollシヨ糖溶液 1.5ml程度残す)。再び、残渣に残っているシヨ糖液の5倍以上のPBS (T-) を添加(7.5ml)、よく攪拌し、percollシヨ糖溶液 2.5mlを入れる。遠心分離後、回収液を最初の回収液と合わせ、攪拌する。遠心分離後、上清液の下層部分 (2 ml) を残して上清を吸引除去する。

#### (間接蛍光抗体染色)

PBS (T-) をシャーレに取り、フィルター (CELLULOSE ASSETATE, 25mm, 0.8  $\mu\text{m}$ ) を浮かべ湿潤させ、水になじませる (約1分間)。ろ過器をPBS (T-) で洗浄し、ろ過器にフィルターをのせる。1%BSA (ウシ血清) 約 1~2 mlをろ過面にのせ、ゆっくりと吸引する。

次に、試料 (2 ml) をろ過面にのせ、ゆっくりと吸引し、1%BSA 約 1 mlをろ過面にのせ、ゆっくりと吸引する。10%NGS (ヤギ血清) 約 0.5mlをろ過面にのせ、2~3分待った後、ゆっくりと吸引する。ろ過面にPAR (1次抗体液) 約 0.5mlをのせ、アルミホイル等をかぶせて遮光し、ふたをして約25分間反応させる。PAR を吸引除去後、PBS (T-) 2 ml程度をゆっくり吸引ろ過し、フィルター全面を洗浄する (5回繰り返す)。ろ過面にLR (2次抗体液) 約 0.5mlをのせ、遮光して約25分間反応させ、LRを吸引除去する。PBS 2 ml程度をゆっくり吸引ろ過し、フィルター全面を洗浄 (5回) する。30, 70, 90, 95%エタノール脱水液 (グリセリン5%含) を順に1 ml程度ずつ吸引ろ過し、フィルター全面を脱水する。

なお、蛍光抗体染色については、市販のキット「ハイドロフルオール・コンボ (アゾマックス社製)」を用いた。

#### (プレパラートの作製)

湿潤箱にスライドグラスをセットし、スライドグラス上にDABCO (1, 4-Diazabicyclo [2, 2, 2] Octane) (75  $\mu\text{l}$ ) をのせ、37°C, インキュベート (30min) し、エタノール脱水後のフィルターをのせ、37°Cで20分間、インキュベートする。更に、DABCO (25  $\mu\text{l}$ ) をのせ、カバーグラスをのせる。ピンセットで固定し、四隅にネールエナメルを塗る。

#### (検鏡)

顕微鏡 (ニコン社、落射蛍光、微分干渉装置付 ECLIPSE E800) により観察した。

クリプトスポリジウムのオーシストについては、大きさが直径 3.5~6.5 ( $\mu\text{m}$ ) の類円型で周辺部が濃い青リンゴ色の蛍光を発している個体数 (推定値) を計数した。以上の特徴に加え、1~4個のスプロゾイト、表面の縫合線、残体や顆粒等が確認された個体の数を確定値とした。

ジアルジアのシストについては、大きさが長径11~14 ( $\mu\text{m}$ )、短径7~10 ( $\mu\text{m}$ ) のラグビーボール型で、オーシストと同様に青リンゴ色の蛍光を発している個体数 (推定値) を計数した。以上の特徴に加え、1~4個の核、軸糸、中央小体等が確認された個体の数を確定値とした。

### (2) 大腸菌 (MMO-MUG法)

検水50mlにコリラート50P/A (アスカ純薬社) を加え、

直ちにねじ口栓を強く締め、試験管を上下に激しく振った後、35℃±1℃で24時間培養する。培養後、黄変が認められた試験管について紫外線ランプ（並長366nm）を照射し、培地の蛍光の有無と程度を観察し、判定する。

(3) 糞便性大腸菌群

検水50mlを3倍濃度LB培地（栄研化学）25mlにて培養後、ガス発生を認めたものについて、その1白金耳をEC培地（栄研化学）にて培養し、ガス発生の有無を観察した。

(4) 糞便性連鎖球菌

検水50mlを3倍濃度AC培地（DIFCO）25mlにて培養後、混濁を認めたものについて、その1白金耳を標準濃度AC培地にて培養し、混濁の有無を観察した。混濁の見られたものについては、その1白金耳をブドウ糖寒天平板培地<sup>5)</sup>に塗末培養し、コロニーをブドウ糖ブイヨン培地<sup>5)</sup>に移植し、培養する。混濁を認めたものは、その1白金耳をブドウ糖寒天斜面培地に移植し、培養後、増殖した菌については、グラム染色及びカタラーゼ試験を行い、グラム陽性球菌でカタラーゼ試験陰性のものを

当該菌陽性と判定した。

(5) ウェルシュ菌芽胞

検水を2本の滅菌済試験管に約10mlずつ入れ、75℃の高温水槽に10分間浸して加熱したのち、直ちに氷水に浸して冷やす。その後、検水をパウチに移し替え、ハンドフールド改良寒天培地（栄研化学）15mlを加え、直ちに指でよく揉んで混合する。培地に混入した気泡をパウチの首部に集めて排除し、パウチ首部をシーラーで溶着して封じ、室温で平板上に固める。46±1℃で24時間培養し、直径1～3mmの黒色集落をウェルシュ菌と判定した。

### 3. 結果と考察

#### 3・1 クリプトスポリジウム及びジアルジア

冬期、夏期とも原水及び浄水のクリプトスポリジウム及びジアルジアについては陰性であった。

#### 3・2 細菌検査関係

原水についての細菌関係の結果を表2に示す。

今回は、定性試験のみを行い、今後の参考資料とした。

表2 細菌検査結果（原水のみ）

○冬期

水源名	調査月日	時間	気温 (℃)	水温 (℃)	大腸菌	糞便性大腸菌群	糞便性連鎖球菌	ウェルシュ菌芽胞
横内川	H11.1. 5	10:00	2	4	+	+	-	/
堤川	H11.1. 5	11:00	7	3	-	-	-	/
岩木川	H11.1.18	11:25	8.5	2	+	+	-	/
浅瀬石川ダム	H11.1.18	10:20	20.5	4	+	-	+	/
馬淵川	H11.2. 1	11:25	/	1	+	+	+	/
奥入瀬川	H11.2. 1	10:35	/	3.5	+	+	-	/
山田川	H11.2.15	11:05	/	1.5	+	+	+	-
岩木川	H11.2.15	12:15	/	0.5	+	+	+	+
小荒川	H11.3. 1	13:20	/	2.8	-	-	+	-
作田川	H11.3. 1	10:10	/	2	+	+	-	-

/：測定，検査せず

○夏期

水源名	調査月日	時間	気温 (℃)	水温 (℃)	大腸菌	糞便性大腸菌群	糞便性連鎖球菌	ウェルシュ菌芽胞
横内川	H11.11. 8	9:45	13	8	+	+	-	-
堤川	H11.11. 8	10:25	13	10	-	-	-	-
岩木川	H11. 8.23	10:45	32	24.5	+	+	+	-
浅瀬石川ダム	H11. 8.23	13:00	25.5	11.7	+	+	+	-
馬淵川	H11.10.18	-	18.5	10.5	+	+	-	+
奥入瀬川	H11.10.18	10:55	15	10.3	+	+	+	+
山田川	H11. 9. 6	12:15	24	22	+	+	+	+
岩木川	H11. 9. 6	11:10	25	23	+	+	+	+
小荒川，大荒川	H11. 9.27	13:30	23	17	+	+	+	-
作田川	H11. 9.27	10:20	24	11.5	+	+	-	-

今後は定量試験を行うことにより、汚染の状況を知ることが必要と考えられた。

#### 4. ま と め

1999年に青森県内の10浄水場の水道原水及び浄水について調査を行った結果、クリプトスポリジウム及びジアルジアは陰性であった。

本県ではクリプトスポリジウムによる感染例は公式には今だ報告されていないが、1987年に一戸らにより食中毒様症状患者の糞便から、直径約5 $\mu$ m 球状の抗酸性染色陽性原虫が見い出された症例<sup>7)</sup>の報告がなされている。クリプトスポリジウムは、HIV 感染者等の免疫機能が低下している場合は重症となり、時として致死性となる下痢症をもたらすが、通常の宿主では自然治癒傾向が強く、4、5日～約1週間程度で症状がなくなる。これまで検査体制も不十分で、しかも届出義務も無い感染症であったために、現在までの症例は1986年の国内初の症例<sup>8)</sup>を含め、わずか40数例が確認されているにすぎない<sup>9)</sup>が、これは氷山の一角であるとも考えられる。

今後は、平成11年4月1日より施行の新たな法律「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」(感染症新法)で、全数把握の4類感染症に指定されたため、その感染実態が明らかにされると思われる。また、クリプトスポリジウムの検査方法にはなお改良の余地が残されているため、今後、検査技術の更なる向上を目的とし、回収率等の検討を行っていききたい。また、実施している間接蛍光抗体法以外にも、フローサイトメトリー、免疫磁気ビーズ法、PCR法等の開発中あるいは確立されたさまざまな方法があり、各種検査法の比較検

討等を行っていききたい。

#### 文 献

- 1) 黒木俊郎, 他: 神奈川県内で集団発生した水系感染 *Cryptosporidium* 症. 感染症学雑誌, 702, 132-140, 1996.
- 2) 埼玉県衛生部: クリプトスポリジウムによる集団下痢症-越生町集団下痢症発生事件-報告書. 1997.
- 3) 厚生省生活衛生局: 水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について(通知) 中別添「水道に関するクリプトスポリジウム-シストの検出のための暫定的な試験方法」. 衛生第248号, 1996.
- 4) 厚生省生活衛生局: 水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について(通知). 生衛発第1039号, 1998.
- 5) 日本水道協会: 上水試験方法. 1993年版, 502-517, 厚生省生活衛生局水道環境部監修, 東京, 1993.
- 6) Gordon A. McFeters編: 飲料水の微生物学. 1版, 279-306, 技報堂出版, 東京, 1992.
- 7) 一戸兵部, 他: クリプトスポリジウム感染症31例. 第71回弘前医学会, 4, 636, 1987.
- 8) 鈴木了司, 他: ネフローゼ症候群の1患者のクリプトスポリジウム症. 日熱医学会誌, 14, 13-21, 1986.
- 9) 井関基弘: 水と食品によるクリプトスポリジウムおよびサイクロスポーラの集団感染. 日本食品微生物学会雑誌, 14 (4), 179-185, 1998.

Abstract

## Surveys of Actual Status of *Cryptosporidium* Pollution in Aomori Prefecture

Noriko TSUSHIMA, Takeshi SUGIYAMA, Takashi SATO, Rika TSUTSUI, Yoshimitsu OTOMO,  
Naohumi NOZAWA<sup>1</sup> and Kazuhiro TSUSHIMA<sup>2</sup>

In accordance with the “Guideline for Temporary Countermeasures against *Cryptosporidium* in Tap Water” established by the Ministry of Health and Welfare in October 1996, surveys were conducted to study actual conditions of *Cryptosporidium* pollution in raw water and treated water at 10 water treatment facilities in Aomori Prefecture from January to March and August to November, 1999. No *Cryptosporidium* or *Giardia* species were detected throughout the study periods.

Key words : *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, Waterworks

## ヘテロデュプレックス法による癌抑制遺伝子*p73*の変異解析

武沼 浩子 畑山 一郎

正常ヒト血液細胞の神経芽細胞腫 (neuroblastoma: NB) の候補遺伝子*p73*のexon2を含む482bpについて、ヘテロデュプレックス (heteroduplex: HDX) 法による変異解析を行った。これまでに、PCRで増幅された上記DNAの制限酵素*Sty I*によるRFLP解析から、exon2の第4塩基が対立遺伝子で共にグアニン (G)、アデニン (A) およびヘテロ型の3型に分類されたが、HDXでも第4塩基以外に変異を認めなかった。NBを含む種々の腫瘍細胞でも第4塩基以外には異変は認められず、加えてこの領域にはNB特異的変異は確認されなかった。この結果、NB発生には*p73* exon2を含む482bpの領域は関与していないことを示す。

Key words: Heteroduplex, PCR-SSCP, *p73*, neuroblastoma

### 1. はじめに

神経芽細胞腫 (neuroblastoma: NB) は、神経冠由来の腫瘍であり、副腎と胸腹部交感神経節細胞に多発する小児の悪性固形腫瘍の中で最も多い疾患である。患児のNB細胞では1番染色体短腕36.3領域 (1p36.3) の欠損等が高頻度に観察されており、1p36.3にNBの原因遺伝子が位置していると考えられてきた<sup>1)</sup>。分子生物学的解析から、癌抑制遺伝子*p53*のホモログ*p73*が1p36.3に遺伝子座を持つことが判明し、NBの候補遺伝子として検討されている<sup>2-4)</sup>。最近、Kaghad<sup>2)</sup>は種々の神経芽細胞腫株細胞を用いて、*p73* exon2の第4塩基の変異がNBの発生と関連のあることを指摘した。我々も正常ヒト血液細胞の*p73*遺伝子の変異に関して、PCR産物の*Sty I*による制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism: RFLP) 解析を行い、正常ヒトでは、*p73* exon2の第4塩基がグアニン (G) をホモで持つ主流の型 (wild/wild)、アデニン (A) に変異している型 (variant/variant)、GとAをヘテロで有する型があることを明らかにしたが、NBを含む種々の腫瘍細胞株DNAにおいては上記の型が混在して、腫瘍と*p73*の変異に相関を認めなかった<sup>5)</sup>。しかし、exon2の第4塩基以外の変異に関しては検討しておらず、*p73*のNBへの関与をさらに調べる必要がある。

遺伝子変異のスクリーニングにはこれまで一本鎖高次構造多型 (single strand conformation polymorphism: SSCP) が使用されてきた。SSCPは塩基配列の違いで生ずる一本鎖DNAの高次構造の違いを電気泳動による移動度の差として検出する方法であるが、放射性同位元素を使用するため、特殊な設備や器具を必要とする。また、400bp以上のDNA断片では解析が困難である。それに対して、既知の塩基配列を持つDNAと変異のある未知のDNAを混合し、変性・再生 (二本鎖形成) 時に生ずる

塩基のミスマッチを電気泳動による移動度の差として検出する方法であるヘテロデュプレックス (heteroduplex: HDX) 法は、特殊な試薬や設備を必要とせず、検出幅も200~600bpと広い。そこで今回、HDX法を使用して*p73*遺伝子のexon2の第4塩基以外の領域の変異について検討した。

### 2. 材料及び方法

#### 2.1 試薬

MDEゲル溶液はFMC社から、Sepa Gene DNA抽出キットは三光純薬から、制限酵素*Sty I*はNIPPON GENEから各々購入した。TEMEDはナカライテスク、TBEは和光純薬から入手した。Biomarker、エチジウムブロミド (EtBr) はフナコシから購入した。

#### 2.2 DNAの抽出

ヒト血液細胞DNAは血液ろ紙から既報<sup>5)</sup>の操作により得られた。ヒト神経芽細胞腫IMR-32 (13カ月齢) とNB-1 (2歳齢)、子宮頸癌HeLa細胞、結腸癌Caco-2、喉頭癌Hep#2及び胎児横紋筋腫RDの各種株細胞のDNAはSepa Gene DNA抽出キットにより抽出された。

#### 2.3 PCR-RFLP

*Sty I*を用いたRFLPは既報<sup>5)</sup>に従った。

#### 2.4 HDX法

PCR後の増幅DNA溶液を蒸留水で10倍希釈した5  $\mu$ lを3分間煮沸して、一本鎖に変性した。1分間に1℃の割合で37℃まで徐々に温度を下げて二本鎖DNAに再生し、泳動試料とした。また、未知試料の解析には、既知及び未知のPCR産物を各々に2.5  $\mu$ l混合して、同様に操作したものを用いた。泳動用ゲルには15%尿素を含むMDEゲルを使用した。サイズマーカーとしてBiomarkerを用いた。泳動バッファーにはTBEを用い、1500V (20V/cm) 定電圧で約4時間泳動した。泳動終了後、1  $\mu$

gEtBr/mlで染色し、UVトランスイルミネーター上で写真撮影した。

### 3. 結 果

正常ヒト血液細胞のp73遺伝子のexon2を含む領域をPCRで増幅し、*Sty* Iで消化した。そのパターンを図1に示す。増幅された482bpのDNAのうち、対立遺伝子のexon2の第4塩基が共にGの場合は*Sty* Iで切断されない(lane2, 4; wild/wild)。一方、第4塩基が共にAに変異し376bpと106bpに完全消化を受ける型(lane3, 7, 8; variant/variant)や一部消化されて上記の3本のバンドを示すヘテロ型(lane5, 6; wild/variant)も認められた。

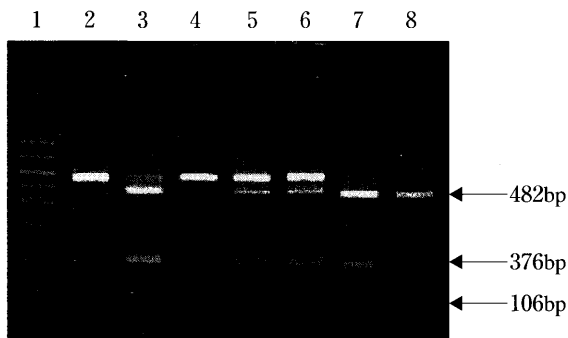


図1 *Sty* IによるRFLP解析

1; サイズマーカー, 2, 4; wild/wild,  
3, 7, 8; variant/variant, 5, 6; wild/variant

上記PCR産物のHDX法による典型的な分離パターンを図2に示す。wild/wildとvariant/variant (lane3と4)の移動度には差は認められなかった。しかし、両者を等量混ぜた場合(lane5)およびwild/variantのサンプル(lane6)を用いた場合には1本のhomoduplex DNAと2本のheteroduplex DNAの計3本のバンドが確認された。

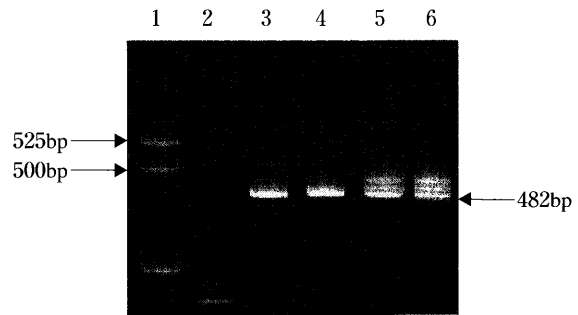


図2 HDX泳動パターン

1; サイズマーカー, 2; コントロール DNA,  
3; wild/wild, 4; variant/variant,  
5; wild/wild+variant/variant, 6; wild/variant

次にwild/wildと確認されたPCR産物に、PCR-RFLPでwild/wildと判定された15サンプルのPCR産物を混ぜてexon2の第4塩基以外にも変異があるかどうか検討した。図3のように、すべてのlaneに1本のバンドが認められ、wild/wildと判定されたPCR産物は同じ塩基配列を持つことが判明した。

また、種々のヒト癌細胞株に関するHDX解析の結果は、図4のようにIMR-32とCaco-2はvariant/variantである

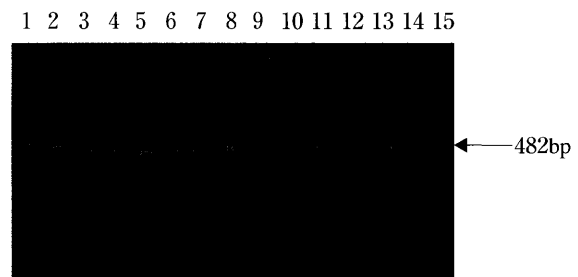


図3 wild/wildタイプを示したPCR産物のHDX  
lane1~15; wild/wild + 未知試料

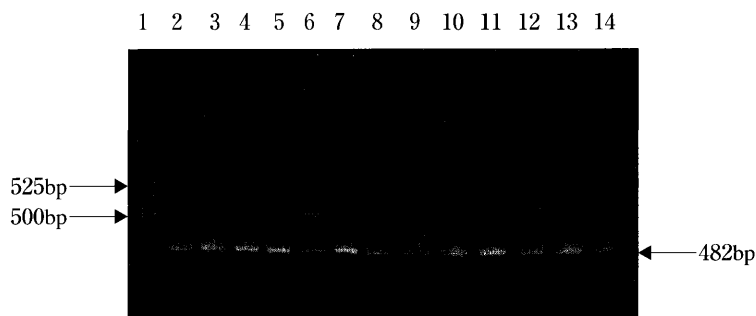


図4 種々の癌細胞p73遺伝子のHDX

1; サイズマーカー, 2; wild/wild, 3; IMR-32, 4; NB-1, 5; HeLa, 6; Hep#2, 7; RD, 8; Caco-2  
9; wild/wild+IMR-32の混合, 10; wild/wild+NB-1の混合, 11; wild/wild+HeLaの混合  
12; wild/wild+Hep#2の混合, 13; wild/wild+RDの混合, 14; wild/wild+Caco-2の混合

一方、NB-1, HeLa, Hep#2, RDはwild/wildであり、*p73*遺伝子のexon2を含む482bpにはNB特異的変異を示さなかった。

同様に、マススクリーニングで発見された2例のNB患者についてもHDXによる*p73*遺伝子の変異解析を行った。患者の血液細胞DNAの*Sty I*によるPCR-RFLPでは、2例共exon2の第4塩基に関してwild/variantのヘテロ型であったが、HDXでも同じ結果が得られた(図5)。また、第4塩基以外には変異は確認できなかった。

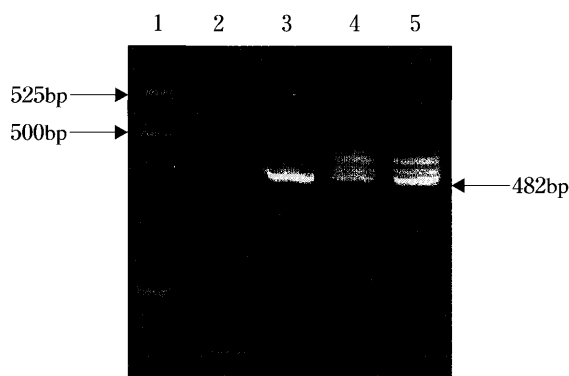


図5 NB患者 *p73*

1; サイズマーカー, 3; wild/wild, 4, 5; NB患者

#### 4. 考 察

正常ヒト血液細胞のNB候補遺伝子*p73*のexon2を含む482bpのPCR産物の変異解析から、第4塩基のG→A変異は確認できなかった。2例のNB患者の血液細胞に関しても同様であった。各種の腫瘍細胞株においてもexon2の第4塩基以外に変異は認められず、さらに、第

4塩基の変異はNB細胞特異的ではなかった。従って、今回の実験からは*p73*がNBの原因遺伝子であるという確証は得られなかったが、*p73*のexon2以外の領域についてのさらに詳細な解析が必要であると思われる。

HDX法は、通常の設備で容易に遺伝子変異を検出できるため、*p73*のみならず種々の遺伝子の変異解析に有効である。例えば、高頻度に変異の認められるウイルスを対象とした食中毒の感染源究明のための手法として極めて有用であると考えられる。

#### 5. ま と め

NBの候補遺伝子*p73*のexon2を含む482bpをHDXにより解析した結果、この領域にはNB特異的塩基変異が認められなかった。*p73*のNB発生への関与については別の遺伝子領域について解析していく必要がある。

#### 文 献

- 1) Brodeur, G. M. et al : Chromosomal aberrations in human neuroblastoma. *Cancer*, 40, 2256-2263, 1977.
- 2) Kaghad, M. et al : Monoallelically expressed gene related to *p53* at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, 90, 809-819, 1997.
- 3) Jost, C. A. et al : *p73* is a human *p53*-related protein that can induce apoptosis. *Nature*, 389, 91-194, 1997.
- 4) Dickman, S. : First *p53* relative may be a new tumor suppressor. *Science*, 277, 1605-1606, 1997.
- 5) 武沼浩子, 他 : ヒト血液細胞における神経芽細胞腫候補遺伝子*p73*の多型解析. 青森県環境保健センター研究報告, 9, 12-15, 1998.

**Abstract**

## **Analysis of Antioncogene Gene *p73* Mutations by the Heteroduplex Method**

Hiroko TAKENUMA and Ichiro HATAYAMA

By the heteroduplex (HDX) method, we analyzed the mutation of the neuroblastoma (NB) candidate gene *p73* using a 482bp DNA fragment of normal human blood cells that included exon 2 of the gene. Earlier, DNA fragments amplified by PCR had been analyzed for RFLP using restriction enzyme *Sty* I ; the fourth bases of exon 2 for both alleles had been found to be both guanine (G) or adenine (A), or one G and other A. The HDX method revealed no mutations other than of the fourth base in normal blood cells. In various types of tumor cells including NB, no mutation were observed at sites other than fourth base ; no NB-specific mutation was found in this region. This result indicates that the DNA region of 482 base pairs that includes exon 2 of gene *p73* is not involved in NB production.

Key words : Heteroduplex, PCR-SSCP, *p73*, neuroblastoma



# 青森県における疾病の地域集積性と環境因子

中谷 実 葛西 恵里子 清水 友敬 山本 明美 高橋 政教

青森県内67市町村の1988年から1997年までの、全死因、全悪性新生物、気管、気管支及び肺の悪性新生物、胃の悪性新生物、肝及び肝内胆管の悪性新生物、脳血管疾患、心疾患（高血圧性を除く）、肺炎の8区分の死因について、男女別で標準化死亡比の経験的ベイズ推定値（EBSMR）を算出し、疾病地図を作成した。Tangoの方法及びKulldorffの方法により疾病の地域集積性の検定を行ったところ、県の東部と西部とで異なる死亡傾向が観察された。また、EBSMRと数種の環境因子との相関・回帰分析について検討した。

key words : disease indices, spatial disease clustering, environmental factors, correlation and regression analyses

## 1. はじめに

近年、新聞紙上を騒がせたダイオキシンや環境ホルモンの問題を皮切りとして、住民の健康に悪影響を与える可能性のある環境因子の存在が強く意識されるようになってきている。こういった生活環境に対する懸念に応えるためには、環境中の諸化学物質を定量し監視するのみならず、その健康への影響を調査、検証してゆく必要がある。特に、原因としての環境要素と、結果としての住民の健康状況とを関連付けて論ずる疫学的研究が、今後求められるところであろう。

本研究では、特定の疾病による死亡状況を、人口規模や年齢分布の異なる市町村間で比較可能な形として数量化し、健康状況の指標の一つとすることを試みた。また、死亡指標と環境因子との関連付けについて検討した。

地域ごとの死亡の頻度を比較する方法としては、かつて年齢調整死亡率（DAR：directly age-adjusted mortality rate）が用いられていたが、非常に誤差が大きいことが知られ、現在では「地域比較の指標としては不適当な指標」であるとされている<sup>1, 2)</sup>。その代わりとして広く用いられているのが標準化死亡比（SMR：standardized mortality ratio）である。SMRは「観察された死亡数」を「標準人口の年齢階級別死亡率をその地域の年齢構成に当てはめた場合に期待される死亡数」で除した比であり、DARよりは人口変動の影響を受けにくい。ただし、このSMRも死亡数が非常に少ない場合、つまり地域集団の人口規模が小さい場合には、誤差の影響を受けることとなる。

人口規模による誤差を補正したのがSMRの経験的ベイズ推定値（EBSMR：empirical Bayes estimate of standardized mortality ratio）であり、市区町村などの少人口の集団についても死亡動態の比較・評価が可能となる。本研究では、1988年から1997年までの死亡統計から、

県内67市町村及び県全体について8区分の疾病の男女別EBSMRを算出し、いくつかの環境因子との相関分析・回帰分析について検討した。また、死亡傾向に地域的な偏りがあるか、そのような地域があるならばそれはどこか、を検証するため、Tangoの方法及びKulldorffの方法を用いて集積性の検定を行った。

## 2. 調査方法

### 2. 1 死亡指標の算出

調査地区は青森県内の67市町村とし、調査対象となる死因はそれぞれ男女別で、全死因（死亡総数）、全悪性新生物 [02100]、気管、気管支及び肺の悪性新生物 [02110]、胃の悪性新生物 [02103]、肝及び胆管の悪性新生物 [02106]、脳血管疾患 [09300]、心疾患（高血圧性を除く） [09200]、肺炎 [10200] とした。[ ] 内の数字は死因簡単分類コードである。標準となる男女別、5歳刻みの年齢階級別の死亡率は1992年の日本全体のものをを用いた。この死亡率は1990年と1995年の国勢調査結果<sup>3)</sup> から補間して求めた。1992年は観察期間とした1988年から1997年までのほぼ重心に相当する。各疾病についての、市町村別、男女別の死亡数（観察死亡数： $d^{obs}$ ）は1988年から1997年までの死亡統計<sup>4)</sup> から集計した。各市町村別、男女別、5歳刻みの年齢階級別の人口は国勢調査結果（1985, 1990, 1995年）<sup>5)</sup> 及び青森県推計人口（1997年）<sup>6)</sup> からの補間値を使用した。期待死亡数（ $d^{exp}$ ）は、

$$d_k^{exp} = \sum_{i,j} n_{ijk} P_{0i}$$

として求めた。ただし男女別で、 $i$ ：年齢階級（5歳刻み）、 $j$ ：年次（1988～1997）、 $k$ ：地域（1～68、県全体と67市町村）、 $n$ ：人口、 $P_0$ ：標準死亡率（1992年日本全体）である。

以上の観察死亡数と期待死亡数のデータから、丹後の方法<sup>7)</sup>により各疾病別、男女別、市町村別にSMRとEBSMRを算出した。また、各市町村の人口重心点として市町村の役場を仮定し、この位置座標<sup>9)</sup>を基に、Tangoの方法<sup>10, 11)</sup>及びKullforffの方法<sup>12)</sup>を用いて疾病の集積性の検定を行った。

## 2. 2 環境因子との比較

市町村別の環境因子として、(1)常住地以外への越境通勤者数/総就労者数<sup>13)</sup>、(2)出稼ぎ者数/総人口、(3)たばこ消費税/総人口<sup>14)</sup>、(4)田面積/総面積<sup>15)</sup>、(5)普通畑面積/総面積、(6)樹園地面積/総面積、(7)牧草地面積/総面積、(8)総畑面積/総面積(=(5)+(6)+(7))、(9)可住地面積/総面積、(10)水産業従事者数/総人口<sup>16)</sup>、(11)農林業従事者数/総人口<sup>17)</sup>、(12)第3次産業従事者数/総人口、(13)道路総延長/総面積、(14)舗装道路延長/道路総延長の14種を用い、各疾病別、男女別、市町村別のEBSMRとの間の相関の度合いを検討した。相関係数の高い因子を多数持つ疾病については、重回帰分析を行い、複数の環境因子で疾病の動態を説明することを試みた。解析にはSPSSを用い、ステップワイズ法にて選択基準はp値0.10とした。また、これとは別に県民食生活調査<sup>18)</sup>から得られた28市町村についての食品・栄養素等の摂取量(エネルギー、蛋白、脂質、糖質、カルシウム、鉄、ビタミンA、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、C、穀物エネルギー比、動物性蛋白質比、エネルギー構成比(蛋白、脂質、糖質)、米類、小麦粉、種実類、芋類、砂糖類、菓子類、油脂類、豆類、果実類、緑黄色野菜、その他野菜類、野菜つけもの、茸類、海藻類、調味嗜好飲料、魚介類、肉類、卵類、乳類、加工食品、その他食品、食塩(全食塩、醤油、味噌、塩、つけもの、その他調味料、魚介加工品、小麦加工品、その他食品)を用いて、EBSMRとの相関を求めた。また、相関係数の大きい因子を用い、ステップワイズ法により、選択基準はp値0.20として重回帰分析を行った。

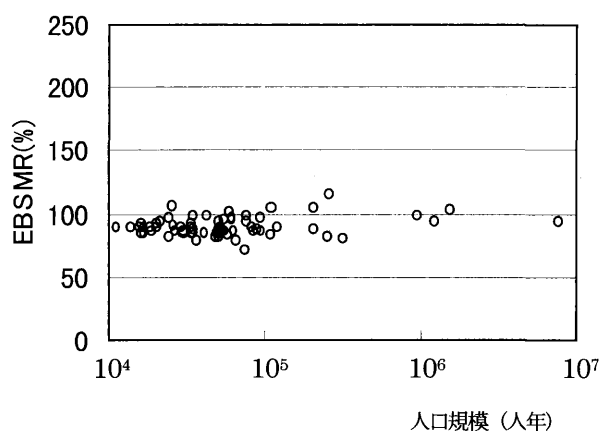
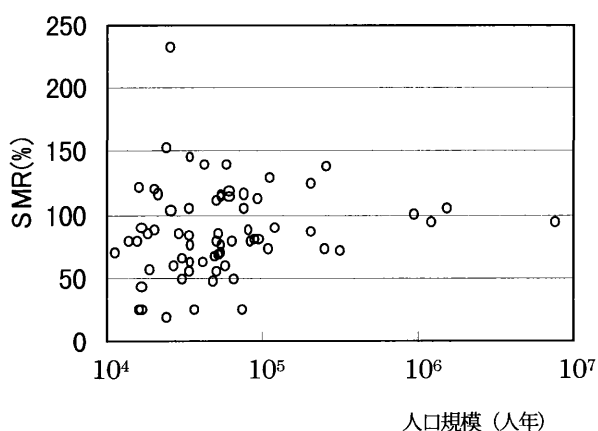


図2 肺ガン(女)のSMR及びEBSMR

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 疾病地図

資料1に各疾病別、男女別、市町村別のEBSMRについての階級地図を示した。標準死亡率として日本全体のものを用いたことにより、図1に示したように県全体のEBSMRは、全国水準とは大きく離れた分布を示した。このため、資料1では県全体の値を階級中心として地図化を行い、10%毎に区切って表示した。集積地図はそれぞれの検定での5%有意水準、1%有意水準を色分けして表記した。

得られた死亡指標の一例として図2に女性の肺ガンによるSMR及びEBSMRを示した。横軸として女性のみの延べ人口、縦軸としてSMRをとった左図では、人口の少ない市町村でSMRが高低に激しく変動している。すなわち、人口の小さいところではわずかな死亡数の変化が見かけ上の死亡比のばらつきを大きくさせていると考えられる。対してEBSMRの場合ではばらつきは抑えられており、値の範囲も17.6~231.2から70.7~114.6までと狭くなっている。今回用いた16のデータセット(疾病8区分×男女)の全てにおいて、上記のようなバイズ推定による中心化傾向が観察された。死亡指標であるSMR

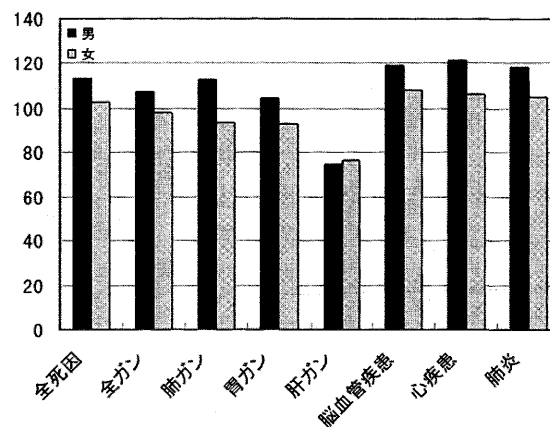


図1 県全体のEBSMR(%, 全国=100)

とEBSMRは、

$$SMR_k = d_k^{obs} / d_k^{exp}, \text{ かつ,}$$

$$EBSMR_k = (\beta + d_k^{obs}) / (a + d_k^{exp}),$$

として算出される。 $a$  及び  $\beta$  は  $d_k^{obs}$  のばらつきに応じて最尤化される推定量であり、前述の68地域について共通の値となる。 $\beta / a$  は調査地域全体の粗死亡比の推定値となり、 $d_k^{exp} \rightarrow 0$  (人口規模小) の場合EBSMRは  $\beta / a$  に近づき、 $d_k^{exp} \rightarrow \infty$  (人口規模大) の場合SMRの値に近づく。EBSMRを用いることで、SMRでの人口規模により死亡指標のばらつきが大きく異なるという不自然な現象が解消され、疾病地図が解釈しやすくなる。

資料1のEBSMRによる疾病地図からは、多くの疾病で県西部・「津軽」地方で高く県東部・「南部」地方で低い、西高東低の傾向が観察された。肝ガンにおいては男女とも全国水準 (EBSMR = 100) と比べ非常に低いEBSMRの値が得られた。また男性の脳血管疾患、心疾患、肺炎においては高い値が観察されている。

### 3. 2 集積性の検定

作成した疾病地図から視覚による主観的判断で疾病の多寡の実態を見積もることはある程度妥当であるが、対策及び詳細な調査が最も必要とされる優先地域を選定するためには、疾病の地域集積性を検討する必要がある。資料1に集積地図として示した2種の検定のうち、Tangoの方法は疾病の集積地域の中心を、Kulldorffの方法は集積地域の広がりを明らかにするものであり、その性質上、有意となって検出される市町村数は異なるが<sup>19)</sup>、集積の疑われる地域は似通っていた。ただし、Kulldorffの方法においては近接地域をまとめて、一つのクラスターとして死亡の多寡を検定するため、例えば全死因(男)では実際には県全体に比べやや高いSMRが観察された南郷村が低い地域とされ、反対に低い相馬村が高い地域とされるなど逆転現象が起こっている。Kulldorffの検定は疾病地図を単純化し、解釈を容易にするが、上記の現象による第1種の過誤、つまり本来の高リスク地域が見逃されてしまう危険性にも留意すべきであろう。

Tangoの方法及びKulldorffの方法で共に集積性が認められた死因と市町村は表1及び表2のとおりであった。死亡率が高いとされた地域は県西部・「津軽」地方のみで占められている。一方、死亡率が低いとされた地域は、2例を除き県東部・「南部」地方に集中している。県の東部と西部ではっきりと異なる死亡傾向が観察されたが、これらの結果は概ねこれまでの知見<sup>20)</sup>と一致している。

### 3. 3 環境因子との比較

超過死亡の原因を解明しようとする試みにおいて、死亡指標と生活環境中の諸因子との間に何らかの関係がないかどうかを検討する際障害となるのは、死亡指標のばら

表1 他の地域に比べ死亡率が高いと認められた地域

死 因	市 町 村
全死因	(男) 弘前市
	(女) 青森市
全悪性新生物	(男) 青森市、弘前市
	(女) 青森市、弘前市
肺悪性新生物	(男) 弘前市
	(女) 五所川原市
胃悪性新生物	(男) 弘前市
	(女) 弘前市
肝悪性新生物	(男) 弘前市
	(女) 弘前市
脳血管疾患	(男) 平賀町
	(女) 青森市、平賀町
肺炎	(男) 青森市、弘前市
	(女) 黒石市

表2 他の地域に比べ死亡率が低いと認められた地域

死 因	市 町 村
全死因	(男) 八戸市
肺悪性新生物	(男) 十和田市
胃悪性新生物	(男) 八戸市
	(女) 八戸市
脳血管疾患	(男) 木造町
心疾患	(女) 弘前市

つきが非常に大きいことである。前述したように、死亡指標としてEBSMRを用いることでSMRの場合に起こるような人口規模に依存したばらつきが抑制され、環境因子との相関分析が可能となることが期待される。

資料2に各EBSMRと各環境因子との相関係数と相関係数が大きいものについての散布図を表示した。正規性の低い変数は対数変換して用いた。環境因子のうち「普通畑面積/総面積」、「樹園地面積/総面積」が強い説明因子となることが予想された。相関係数の大きい因子を多数持つ男性の全ガン、胃ガン、肺炎、女性の全ガン、胃ガン、心疾患、肺炎の各環境因子により重回帰分析を行った。

男女ともに同じ要素がリスク因子として働く、と考えるならば同じ疾病において男女両方で説明因子として抽出された因子に着目することは不自然ではないだろう。資料3に重回帰分析の結果を示した。胃ガンでは「出稼ぎ者数/総人口」と「普通畑面積/総面積」、全ガンでは「出稼ぎ者数/総人口」と「樹園地面積/総面積」、肺炎では「樹園地面積/総面積」が男女共に選択されている。これらの因子は直接に作用する因子そのものではないとしても、作用因子と何らかの結びつきを持っている

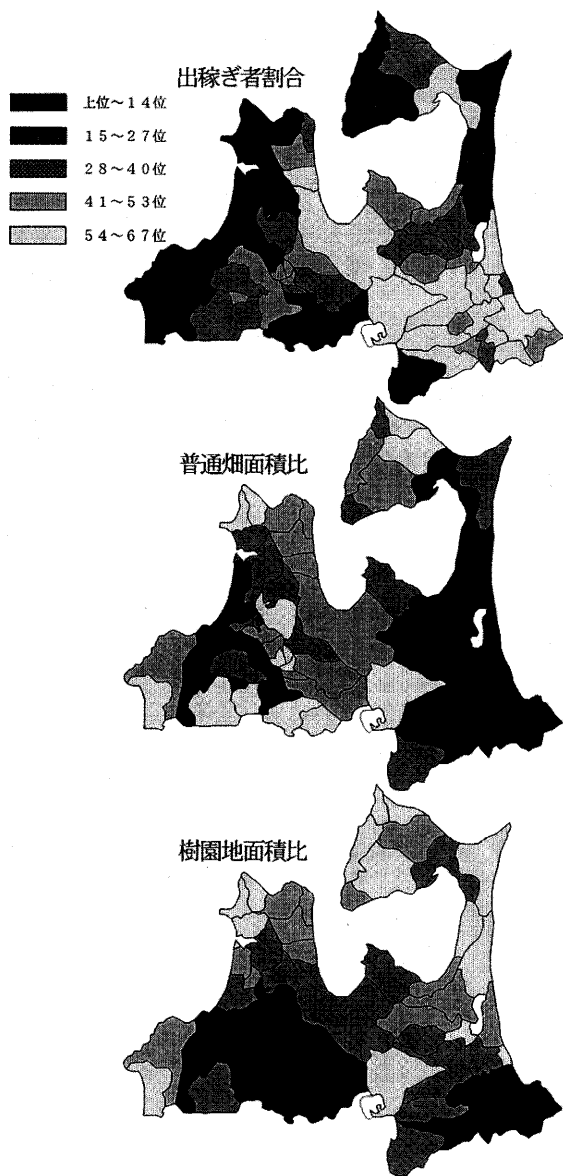


図3 環境因子の階級地図

と考えられる。図3にこれら3種の因子を階級地図として示した。出稼ぎ者割合は、低順位順に注目すると南部地方の市町村に分布が集中している。例外はあるが、普通畑面積比の高いのはやはり南部地方であり、また、樹園地面積比が高いのは津軽地方である。こうしてみると、作用因子との結びつきとは、津軽と南部の地域の特異性を介して起きているもので、ここで抽出された3種の因子は地域特異性の属性の一つではないか、つまり地域個性が交絡因子となっている、という可能性もある。素直な解釈をするならば、「畑」の多い農村での暮らしはストレスがなく胃に負担がかからない、「出稼ぎ」の本人や家族に及ぼす様々な負荷がガンの危険度を高める、「樹園地」特有のリスク例えば農薬散布などがガン

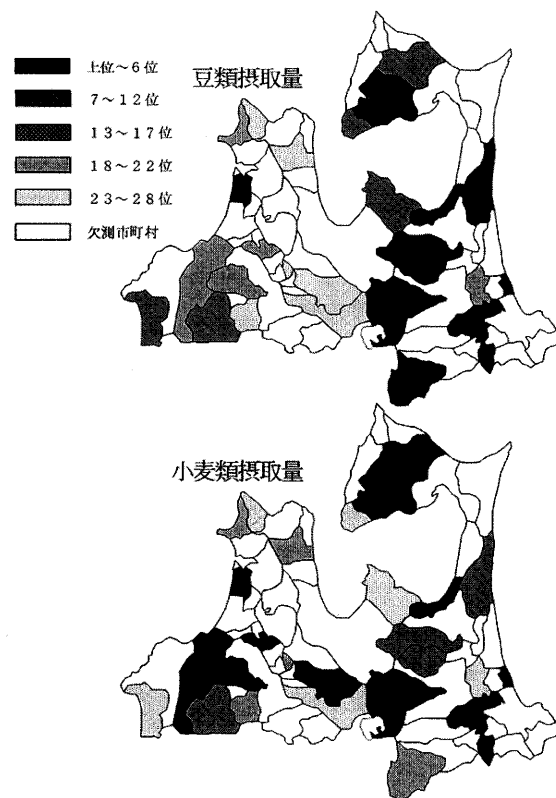


図4 環境因子（食品・栄養素等）の階級地図

や肺炎に影響する、などと読み取ることも出来よう。今回抽出された因子のリスク因子としての可能性は今後の検討課題である。

次に各EBSMRと食品・栄養素摂取量との相関係数を資料4に示した。因子中で相関が強かったのは豆類、小麦加工品の食塩などであった。また、高い相関係数を多数持つ疾病は男性の胃悪性新生物、肺炎などであった。これら説明されやすいと考えられる疾病について重回帰分析を行った。

再び、男女両方で選択された因子に着目すると、胃ガンでは豆類、肺炎では小麦類があげられている。重回帰分析の結果を資料3に示した。この2つの因子についての階級地図を図4に、散布図を図5に示した。散布図を一見すると、豆類消費が増えるにつれ胃ガンのEBSMRが低下している。これはこれまでの知見と合致し、理解し易い<sup>21)</sup>。階級地図から豆類の消費が多いのは主に県東部であることが見て取れ、この分布は前述した津軽と南部の地域特異性に起因している可能性がある。小麦類については、階級地図から津軽と南部の明確な差異は読み取れない。肺炎と小麦類摂取には何らかの因果関係があるのかもしれないが、これからの検討課題である。

以上のように環境因子との相関・回帰分析について検

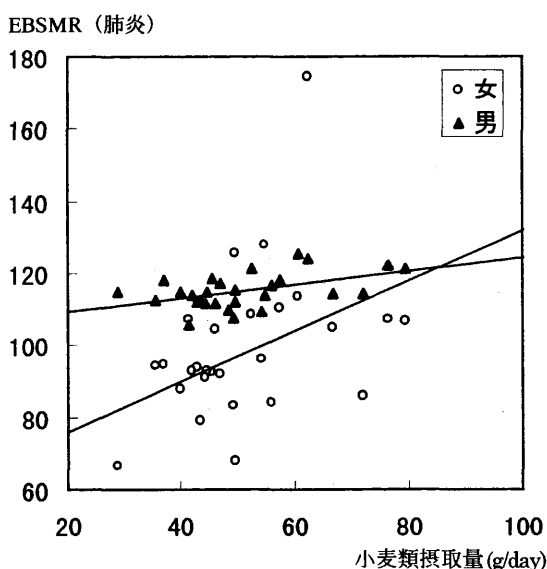
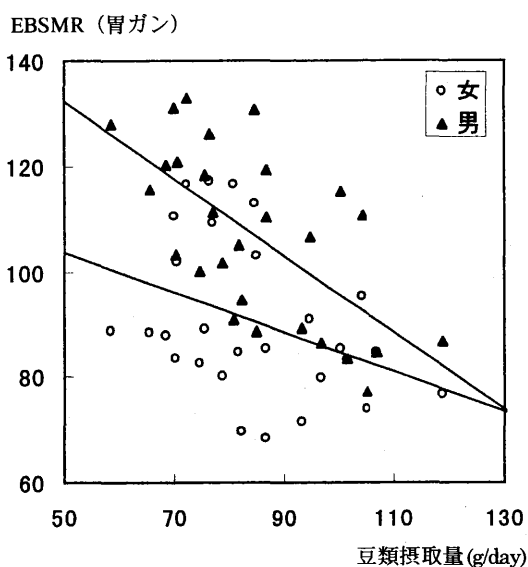


図5 環境因子（食品・栄養素等）の散布図

討したところ、EBSMRはそのまま、又は対数比することにより、正規化されたデータとして十分に相関・回帰分析に活用できる指標であるとの認識が得られた。青森県の死亡状況は地域によって大きく異なり、今回用いた環境因子についても地域差が観察された。今後は多くの疾病での県西部での強い集積性の原因は一体何なのかということに的を絞った調査がなされるべきであろう。環境中の諸化学物質についての調査結果などから、その健康への影響を検証するなどの環境研究が行われることを期待したい。

#### 4. まとめ

- (1) 1988年から1997年までを調査期間とし、8区分の死

因について、青森県内67市町村の男女別標準化死亡比の経験的ベイズ推定値（EBSMR）を算出し、疾病地図を作成した。

- (2) Tangoの方法及びKulldorffの方法により疾病の地域集積性の検定を行ったところ、県の東部と西部とで異なる死亡傾向が観察された。  
 (3) EBSMRと数種の環境因子との相関・重回帰分析について検討し、いくつかの説明因子が抽出された。

#### 5. 謝 辞

本研究は平成11年度国立公衆衛生院特別課程疫学統計コースの課題研究として行われたものであり、御指導頂きました丹後俊郎先生、箕輪眞澄先生、藤田利治先生に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 福富和夫：昭和50年職業別訂正死亡率にみられた異常な値について、日本公衛誌，27，229，1980.
- 2) 福富和夫：死亡指標の意味と性格，日本公衛誌，31，289-295，1984.
- 3) 厚生省大臣官房統計情報部：人口動態統計（平成2年，平成7年）.
- 4) 厚生統計協会：青森県人口動態調査集計結果表，第2表，死亡数 性・年齢（5歳階級）・死因簡単・保健所・市町村別（昭和63～平成9年）.
- 5) 総務庁統計局：国勢調査報告，2（2），02青森県（昭和60年，平成2年，平成7年）.
- 6) 青森県企画部：平成9年 青森県の人口移動（推計人口）.
- 7) 丹後俊郎：死亡指標の経験的ベイズ推定値について－疾病地図への適用－，応用統計学，17（2），81-96，1988.
- 8) 古川俊之，丹後俊郎：新版医学への統計学，142-144，1993.
- 9) 総務庁統計局：日本の市区町村位置情報要覧 平成7年度，24-29.
- 10) T. Tango：An index for cancer clustering, Environmental Health Perspectives, 87, 157-162, 1990.
- 11) T. Tango：Disease mapping and spatial disease clustering-Toward an appropriate interpretation and use of disease indices-, Journal of National Institute of Public Health, 48, 84-93, 1999.
- 12) M. Kulldorff, E. J. Feuer, B. A. Miller, L. S. Freedman：Breast cancer clusters in the northeast United States: A geographic analysis, American Journal of Epidemiology, 146（2）, 161-170, 1997.
- 13) 青森県企画部：あおり社会生活統計指標，平成9

- 年度.
- 14) 青森県総務部地方課：昭和61年度 市町村財政概要.
  - 15) 青森県企画部統計課：昭和62年 青森県統計年鑑.
  - 16) 青森県：第9次漁業センサス結果書.
  - 17) 青森県企画部：1995年農業センサス 青森県結果書.
  - 18) 青森県環境保健部：県民食生活調査報告書（昭和61年，平成3年調査結果）.
  - 19) 今井淳：高知県における疾病の地域集積性について－死亡指標の評価と疾病地図への応用－，平成10年度国立公衆衛生院特別課程疫学統計コース・調査研究報告書，57－，1998.
  - 20) 青森県健康福祉部：青森県健康マップ（平成9年度

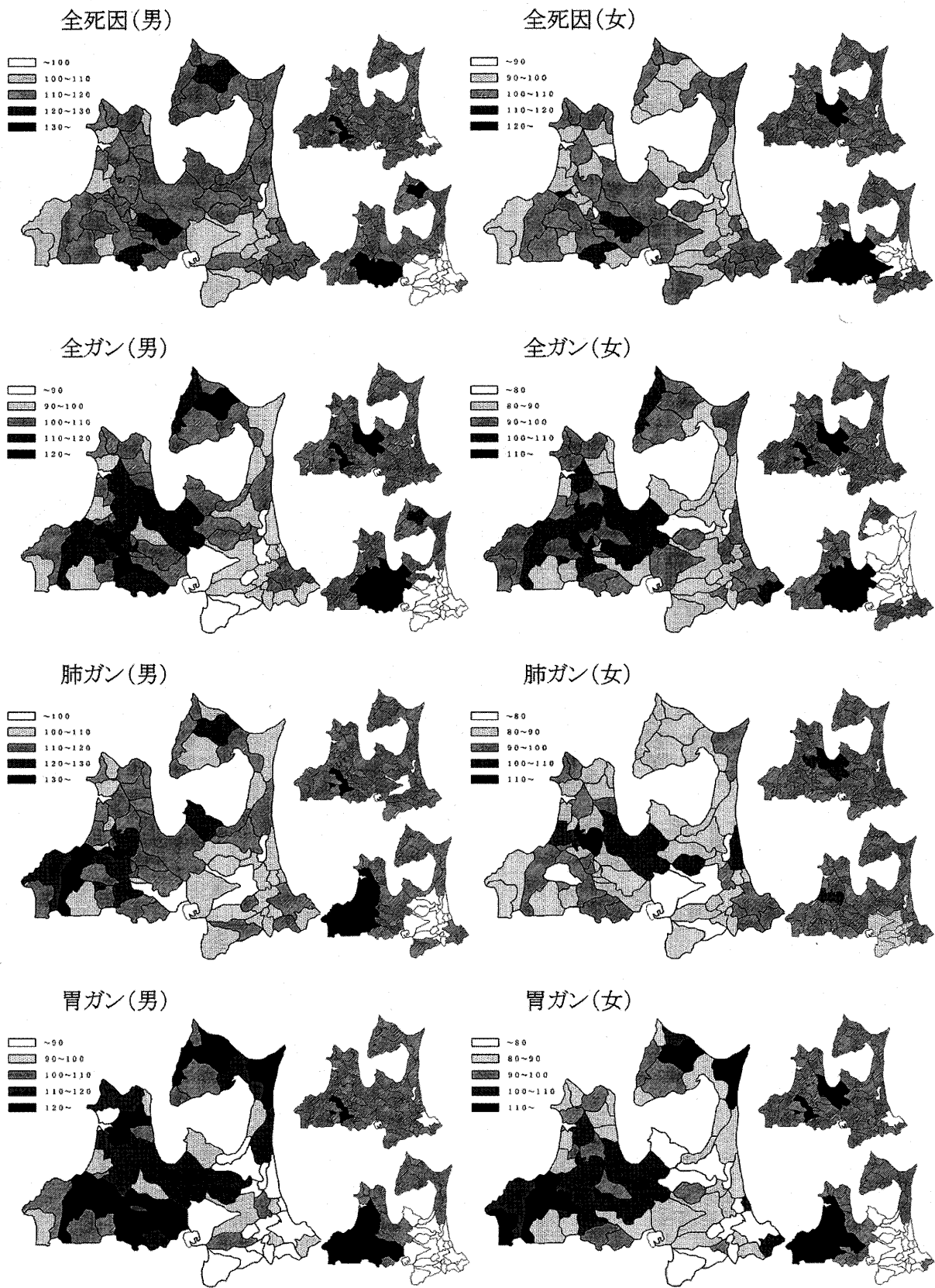
## Abstract

# Spatial Disease Clustering and Environmental Factors in Aomori Prefecture

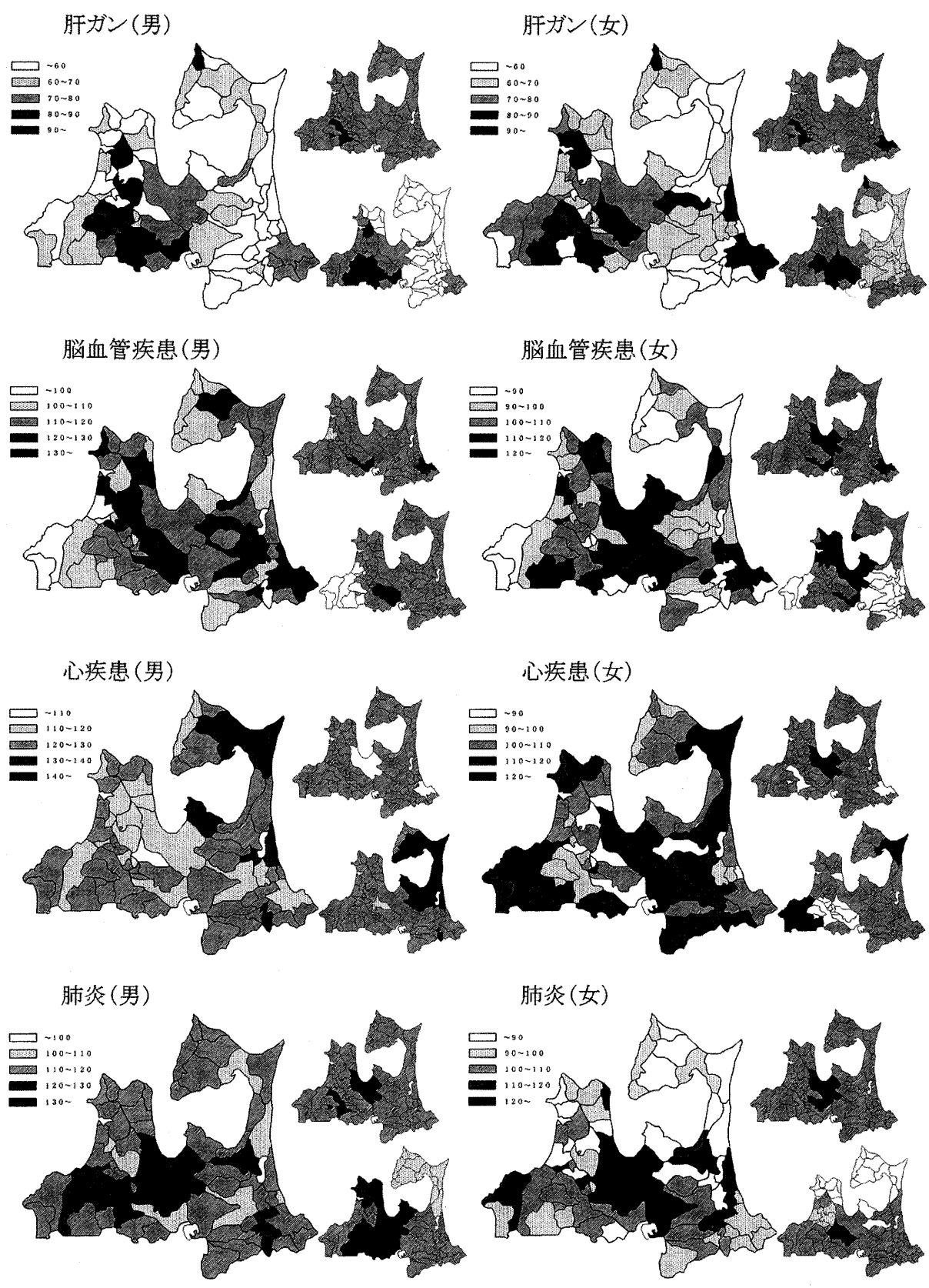
Minoru NAKAYA, Eriko KASAI, Tomotaka SHIMIZU  
Akemi YAMAMOTO and Masanori TAKAHASHI

The researchers calculated empirical Bayes estimates of standardized mortality ratios (EBSMR) for eight groups in terms of causes of deaths, i.e. deaths total, malignant neoplasm total, malignant neoplasm of trachea, bronchus and lungs, malignant neoplasm of stomach, malignant neoplasm of liver and intrahepatic bile duct, cerebrovascular diseases, heart diseases (excluding hypertensive heart diseases), and pneumonia. These data in regard of sex were taken from individuals observed from 1988 to 1997 in 67 municipalities in Aomori Prefecture and were formed into disease maps. The researchers tested the spatial clustering of diseases according to the Tango method and the Kulldorff method and found different trends for deaths in the eastern and western parts of Aomori Prefecture. The researchers also studied the correlation between EBSMR and several environmental factors using regression analyses.

Key word : disease indices, spatial disease clustering, environmental factors, correlation and regression analyses



資料 1-1 EBSMRによる疾病地図 (左図) とTangoの検定 (右上図) 及びKulldorffの検定 (右下図) による集積地図



資料 1 - 2 EBSMRによる疾病地図 (左図) とTangoの検定 (右上図) 及びKulldorffの検定 (右下図) による集積地図



資料2 各疾病のEBSMRの環境因子に対する相関係数

環境因子	全死因		全悪性新生物		肺悪性新生物		胃悪性新生物		肝悪性新生物		脳血管疾患		心疾患		肺炎	
	(男)	(女)	(男)	(女)	(男)*	(女)*	(男)	(女)*	(男)*	(女)*	(男)*	(女)	(男)*	(女)	(男)*	(女)
通勤	0.063	0.164	-0.184	0.052	-0.089	0.080	-0.045	0.067	0.063	-0.107	0.163	0.138	0.094	-0.036	0.234	0.151
出稼*	0.031	0.105	0.283	0.161	0.227	0.110	0.320	0.337	0.023	0.091	-0.183	-0.149	-0.066	0.025	-0.248	-0.243
煙草*	0.172	0.116	0.304	0.322	0.122	0.185	0.097	0.112	0.094	0.106	0.189	-0.105	0.010	-0.006	-0.033	0.076
水田*	-0.071	-0.180	-0.015	0.059	0.099	0.156	-0.001	0.079	0.086	0.046	0.220	0.172	-0.108	-0.311	0.166	0.220
普畑*	-0.202	-0.204	-0.415	-0.232	-0.227	0.006	-0.509	-0.368	-0.262	-0.070	0.069	0.064	0.031	-0.148	0.060	0.032
樹園**	0.226	0.192	0.171	0.223	0.193	0.157	0.115	0.158	0.381	0.123	0.012	0.099	-0.094	-0.046	0.476	0.371
牧草**	-0.051	0.016	-0.244	-0.270	-0.290	-0.109	-0.344	-0.364	-0.063	-0.048	0.019	0.091	0.040	0.120	-0.132	-0.060
総畑	0.161	0.102	0.015	0.188	0.069	0.170	-0.069	0.078	0.201	-0.008	0.067	0.061	0.037	-0.113	0.469	0.245
可住*	-0.018	-0.083	0.021	0.169	0.063	0.248	-0.032	0.058	0.120	0.071	0.172	0.093	-0.098	-0.242	0.251	0.201
水産	-0.060	0.062	0.113	0.106	0.002	-0.017	0.155	0.062	-0.167	-0.021	-0.229	-0.144	0.026	0.044	-0.174	-0.245
農林	-0.103	-0.097	-0.271	-0.323	0.011	-0.147	-0.120	-0.103	-0.020	-0.157	-0.121	0.107	0.006	0.041	0.117	0.095
3次*	0.200	0.189	0.158	0.245	-0.039	0.096	-0.042	-0.013	0.219	0.097	0.176	0.045	0.092	0.040	0.222	0.354
道路*	0.035	-0.025	-0.045	0.188	-0.063	0.161	-0.070	0.015	0.178	0.067	0.256	0.124	-0.168	-0.319	0.324	0.258
舗装	-0.012	0.197	0.255	0.243	0.189	0.228	0.176	0.176	-0.026	0.029	-0.199	-0.004	0.125	0.311	-0.048	0.021

各環境因子の定義

通勤：常驻地以外への越境通勤者数／総就労者数

出稼：出稼者数／総人口

煙草：たばこ消費税／総人口

水田：田面積／総面積

普畑：普通畑面積／総面積

樹園：樹園地面積／総面積

牧草：牧草地面積／総面積

総畑：総畑面積／総面積（＝普畑+樹園+牧草）

可住：可住地面積／総面積

水産：水産業従事者数／総人口

農林：農林業従事者数／総人口

3次：第3次産業従事者数／総人口

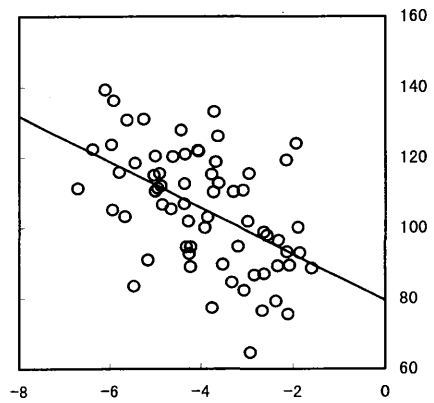
道路：道路総延長／総面積

舗装：舗装道路延長／道路総延長

\*：対数化

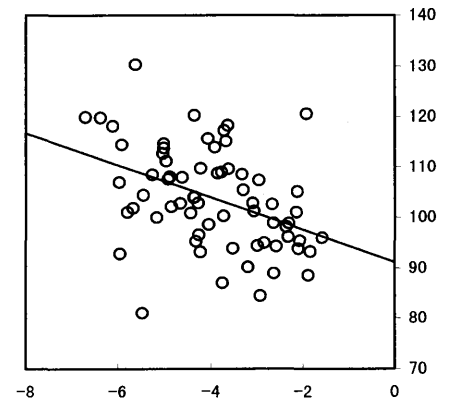
\*\*：0より上の最小値を加えて対数比

EBSMR（男胃ガン）



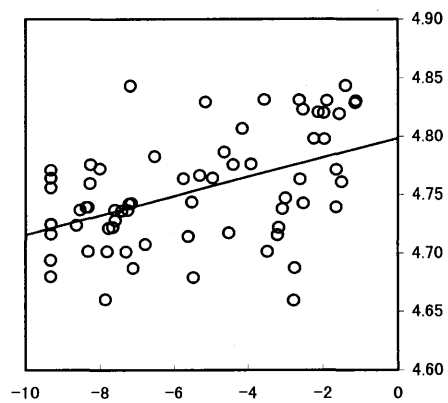
ln（普畑）

EBSMR（男全ガン）



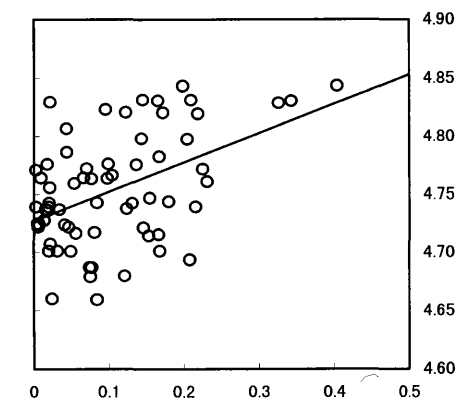
ln（普畑）

ln（EBSMR（男肺炎））



ln（樹園）

ln（EBSMR（男肺炎））

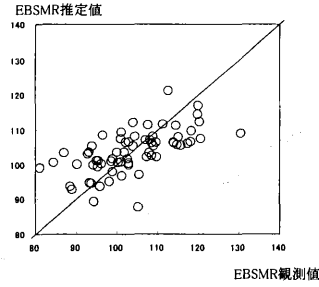


総畑

全ガン(男)

説明変数	標準化回帰係数 $\beta$	p値
出稼	.291	.009
普畑	-.322	.003
樹園	.328	.003
煙草	.385	<.001

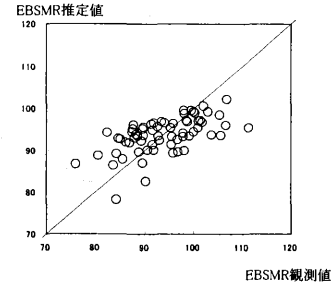
重相関係数 R=.624  
調整済み R<sup>2</sup>=.350



全ガン(女)

説明変数	標準化回帰係数 $\beta$	p値
出稼	.249	.021
樹園	.563	<.001
農林	-.572	<.001

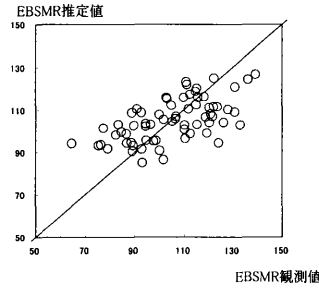
重相関係数 R=.592  
調整済み R<sup>2</sup>=.320



胃ガン(男)

説明変数	標準化回帰係数 $\beta$	p値
出稼	.227	.035
普畑	-.590	<.001
可住	.300	.011

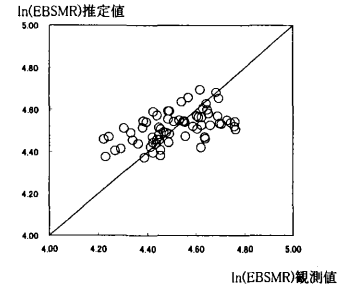
重相関係数 R=.603  
調整済み R<sup>2</sup>=.333



胃ガン(女)

説明変数	標準化回帰係数 $\beta$	p値
出稼	.294	.011
普畑	-.439	<.001
総畑	.340	.006

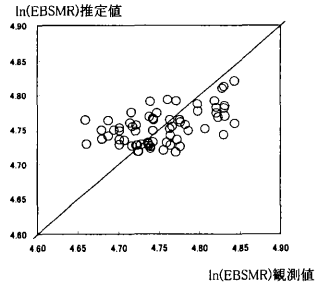
重相関係数 R=.536  
調整済み R<sup>2</sup>=.253



肺炎(男)

説明変数	標準化回帰係数 $\beta$	p値
総畑	.283	.040
樹園	.302	.029

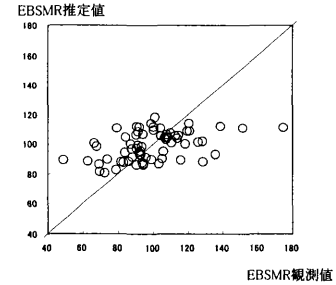
重相関係数 R=.526  
調整済み R<sup>2</sup>=.254



肺炎(女)

説明変数	標準化回帰係数 $\beta$	p値
3次	.275	.020
樹園	.299	.012

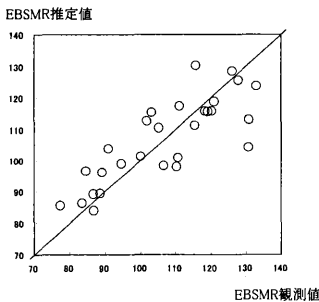
重相関係数 R=.456  
調整済み R<sup>2</sup>=.183



胃ガン(男)

説明変数	標準化回帰係数 $\beta$	p値
豆類	-.453	.003
乳類	-.422	.013
菓子類	.279	.064
穀物エネルギー比	-.361	.043

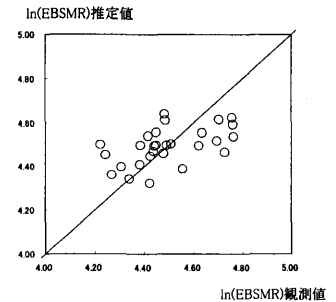
重相関係数 R=.812  
調整済み R<sup>2</sup>=.601



胃ガン(女)

説明変数	標準化回帰係数 $\beta$	p値
豆類	-.332	.063
ビタミンC	.376	.037

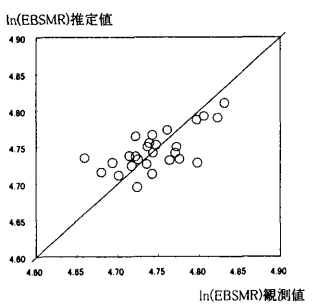
重相関係数 R=.531  
調整済み R<sup>2</sup>=.225



肺炎(男)

説明変数	標準化回帰係数 $\beta$	p値
つけもの	-.447	.009
魚介類	-.361	.033
小麦類	.389	.019

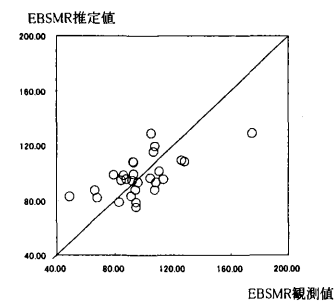
重相関係数 R=.666  
調整済み R<sup>2</sup>=.374



肺炎(女)

説明変数	標準化回帰係数 $\beta$	p値
海藻類	-.304	.075
魚介加工	-.326	.065
品食塩	.330	.057
小麦類	.330	.057

重相関係数 R=.629  
調整済み R<sup>2</sup>=.320



資料3 EBSMRと環境因子の重回帰分析

資料4 各疾病のEBSMRの環境因子(食品・栄養素等)に対する相関係数

環境因子 (栄養素・食品)	全死因		全悪性新生物		肺悪性新生物		胃悪性新生物		肝悪性新生物		脳血管疾患		心疾患		肺炎	
	(男)	(女)	(男)	(女)	(男)*	(女)*	(男)	(女)*	(男)*	(女)*	(男)*	(女)	(男)*	(女)	(男)*	(女)
エネルギー	0.095	0.008	-0.058	-0.072	0.102	-0.032	-0.228	-0.059	-0.320	-0.070	0.013	-0.132	0.136	0.003	-0.169	0.051
蛋白*	0.085	-0.159	0.008	-0.099	-0.014	-0.039	-0.275	-0.118	-0.106	-0.243	-0.031	-0.235	0.247	-0.095	-0.279	-0.097
脂質	0.107	-0.062	0.056	-0.070	0.133	0.146	-0.062	-0.195	-0.360	0.039	0.074	-0.140	0.050	-0.007	-0.017	0.092
糖質	0.204	-0.155	0.186	0.060	0.095	-0.150	0.059	0.266	-0.025	-0.081	0.003	-0.222	0.128	-0.140	-0.137	-0.223
カルシウム	-0.155	-0.186	-0.160	-0.142	-0.086	-0.019	-0.383	-0.189	-0.201	-0.334	-0.079	-0.241	0.117	-0.122	-0.156	-0.080
鉄	-0.037	-0.019	-0.078	-0.042	-0.094	0.031	-0.241	-0.012	-0.300	-0.206	0.001	-0.191	0.074	-0.120	-0.253	0.002
ビタミンA*	-0.239	-0.120	-0.114	0.103	0.039	0.003	-0.236	0.214	-0.136	-0.175	-0.251	-0.325	-0.016	0.056	-0.142	-0.019
ビタミンB1	0.126	-0.022	0.061	-0.088	0.066	0.003	-0.178	-0.068	-0.224	-0.231	0.104	-0.139	0.231	-0.003	-0.279	-0.157
ビタミンB2*	-0.045	-0.267	-0.050	-0.116	-0.084	-0.108	-0.267	-0.126	-0.349	-0.201	-0.119	-0.314	0.185	-0.188	-0.179	-0.023
ビタミンC	0.041	-0.165	0.238	0.110	0.094	0.054	0.273	0.165	0.044	0.020	0.019	-0.153	-0.201	-0.308	-0.277	-0.218
穀物エネルギー比	-0.111	0.185	-0.349	0.020	-0.185	-0.204	-0.324	-0.004	0.039	-0.098	0.011	0.076	0.073	0.096	-0.084	0.036
動物性蛋白質比	0.062	-0.435	0.173	-0.058	-0.109	-0.010	-0.009	-0.121	-0.281	-0.216	0.039	-0.174	0.199	-0.262	-0.260	-0.255
構成比蛋白	-0.031	0.265	-0.001	-0.142	-0.229	-0.084	-0.229	-0.204	-0.230	-0.343	-0.132	-0.156	0.311	-0.048	-0.195	-0.213
構成比脂質*	0.072	-0.117	0.096	-0.054	0.101	0.169	0.041	-0.266	-0.280	0.081	0.060	-0.115	0.031	0.026	0.166	0.107
構成比糖質	-0.087	0.182	-0.108	0.094	-0.030	-0.128	0.017	0.269	0.300	0.011	-0.026	0.124	-0.152	0.006	-0.007	0.014
米類	-0.004	0.031	-0.226	-0.024	-0.059	-0.201	-0.322	0.021	-0.168	-0.129	0.059	-0.020	0.117	-0.034	-0.228	-0.049
小麦粉*	0.381	0.286	0.154	0.121	0.197	-0.187	-0.001	0.110	0.084	0.057	-0.017	-0.246	0.358	0.248	0.441	0.398
種実類*	-0.146	0.040	0.070	0.027	0.060	0.217	0.106	0.085	0.145	0.045	0.120	0.198	-0.348	-0.198	-0.245	-0.140
芋類	0.000	-0.098	0.044	0.075	-0.012	0.011	-0.142	0.140	0.010	-0.106	0.011	-0.358	0.080	-0.036	-0.259	-0.172
砂糖類*	0.210	0.023	0.314	0.243	0.384	0.112	0.226	0.324	0.034	0.131	0.192	0.012	-0.069	0.044	0.068	-0.082
菓子類	0.280	0.275	0.351	0.223	0.387	0.198	0.222	0.248	0.206	0.347	0.028	0.022	-0.161	0.042	0.263	0.267
油脂類*	0.181	-0.105	0.131	0.019	0.075	0.288	0.106	-0.160	-0.325	0.126	0.046	-0.221	0.051	0.137	-0.016	0.040
豆類	-0.161	0.174	-0.351	-0.234	-0.174	0.015	-0.445	-0.378	-0.390	-0.411	-0.206	-0.298	0.365	0.374	-0.057	0.107
果実類	-0.009	-0.080	0.222	-0.155	0.124	0.122	0.216	0.163	0.096	-0.068	-0.186	0.040	-0.025	0.010	-0.156	-0.196
緑黄色野菜	-0.219	-0.032	-0.006	0.185	-0.013	0.202	-0.011	0.244	-0.009	-0.132	-0.028	-0.017	-0.283	-0.279	-0.252	-0.062
その他野菜類	0.062	0.126	0.108	-0.019	-0.055	-0.095	0.156	0.264	0.223	0.033	-0.006	-0.006	-0.135	-0.207	0.014	0.125
野菜つけもの	-0.076	-0.041	-0.137	-0.293	-0.145	-0.289	-0.059	0.000	0.223	0.080	0.037	0.128	-0.071	-0.095	-0.347	-0.140
茸類	-0.055	-0.159	0.249	0.006	0.050	0.136	0.336	0.240	0.304	0.115	0.020	0.026	-0.363	-0.210	-0.330	-0.161
海藻類*	0.064	-0.264	0.278	0.101	0.180	0.041	0.009	0.199	-0.189	-0.257	-0.016	-0.395	0.081	-0.112	-0.122	-0.360
調味嗜好飲料	0.155	-0.227	0.266	-0.171	0.115	0.117	0.231	-0.016	-0.157	0.041	-0.079	-0.028	-0.018	-0.031	-0.175	-0.168
魚介類	0.163	-0.177	0.202	-0.042	-0.016	0.019	-0.024	-0.020	-0.232	-0.148	-0.147	-0.220	0.243	-0.015	-0.324	-0.251
肉類	-0.107	-0.064	-0.131	0.003	0.020	0.025	-0.228	-0.105	-0.235	-0.168	0.306	0.004	-0.066	-0.188	0.107	0.160
卵類*	0.053	-0.101	-0.040	-0.172	0.061	-0.182	-0.014	-0.167	0.156	0.161	0.180	0.084	0.061	-0.128	0.217	0.292
乳類	-0.076	-0.351	-0.116	-0.231	-0.022	-0.104	-0.314	-0.324	-0.297	-0.186	-0.057	-0.167	0.197	-0.178	0.019	-0.019
加工食品*	-0.236	0.031	-0.366	-0.079	-0.242	-0.142	-0.251	-0.136	-0.107	0.023	-0.211	-0.073	0.017	0.086	0.199	0.219
その他食品*	0.415	0.101	0.389	0.152	0.350	0.344	0.385	0.025	-0.028	0.264	0.276	0.280	-0.003	-0.128	0.341	0.045
食塩	0.199	-0.031	0.304	-0.233	0.069	0.182	0.295	-0.077	-0.078	0.073	0.036	0.120	-0.064	-0.062	-0.143	-0.173
醤油	0.173	0.008	0.247	0.099	-0.065	0.246	0.323	-0.007	0.013	0.183	0.039	-0.003	-0.107	-0.294	-0.031	0.069
味噌	0.010	0.107	0.074	-0.139	0.109	-0.001	0.131	-0.027	0.075	0.042	-0.067	-0.029	-0.182	0.175	-0.023	0.035
塩	-0.113	0.120	-0.133	-0.145	-0.080	0.231	-0.128	-0.184	-0.042	-0.080	-0.028	0.256	-0.012	0.183	0.026	-0.097
つけもの	-0.067	-0.073	-0.151	-0.224	-0.153	-0.307	-0.182	-0.160	0.175	-0.009	0.061	0.181	0.034	-0.064	-0.356	-0.128
その他調味料*	0.138	-0.144	0.143	-0.191	0.081	0.232	0.123	-0.169	-0.207	0.055	0.126	0.041	-0.005	-0.011	0.134	-0.175
魚介加工品*	-0.077	-0.396	0.041	-0.297	-0.336	-0.140	-0.016	-0.058	-0.200	-0.275	-0.233	-0.250	0.140	-0.109	-0.442	-0.474
小麦加工品	0.378	0.143	0.354	0.351	0.455	0.182	0.172	0.273	0.025	0.251	-0.102	-0.279	0.212	0.195	0.453	0.336
その他食品*	0.363	0.082	0.436	0.191	0.442	0.213	0.383	0.136	-0.040	0.220	0.284	0.183	-0.061	-0.154	0.262	0.081

\*: 対数化

## 十和田湖の透明度に及ぼす魚類の影響 (1995~97)

三上 一 今 俊夫 工藤 幾代 前田 寿哉  
石塚 伸一 工藤 健 野澤 直史 大久保 英樹  
高村 典子<sup>1</sup> 中川 恵<sup>2</sup> 伯耆 晶子<sup>3</sup> 長崎 勝康<sup>4</sup>  
水谷 寿<sup>5</sup>

十和田湖では1986年以降、CODが環境基準値（A A類型：1 mg/ℓ以下）を超えるとともに、透明度の低下とヒメマス漁獲量の落ち込みが問題となっている。

1995~97年度に十和田湖湖心において水質、プランクトン及び魚類調査を実施した。その結果、1995年4月~1996年6月にワカサギが多く漁獲され、小型の動物プランクトンである枝角類*Bosmina longirostris*、ワムシ類コシブトカメノコウワムシ*Keratella quadrata*などが優占したが、1996年9月以降、ヒメマス漁獲量が多くなり、大型の動物プランクトンである枝角類ハリナガミジンコ*Daphnia longispina*、カイアシ類ヤマヒゲナガケンミジンコ*Acanthodiptomus pacificus*が優占した結果、透明度が上昇するとともにクロロフィル-a量が低下し、trophic cascade効果が認められた。このことから、十和田湖ではヒメマス-Daphnia 優占系を回復し、維持させることが清澄な透明度の回復・保持をもたらすが、ヒメマス個体群の著しい増加直後には、個体群のクラッシュ（崩壊）を引き起こすことから、環境収容力に見合う魚類管理が必要であることが示唆された。

Key words : lake, transparency, fish, ecosystem management & lake restoration.

### 1. はじめに

水界では魚類を頂点として、餌を巡る捕食や競合などによる「食う、食われる」の食物連鎖系が相互に関係し合いながら、生物の群集構造や物質代謝に影響を及ぼしている。

ここで、動物プランクトン食の魚類が動物プランクトン、植物プランクトンの群集構造、水質に及ぼす影響を考えると、魚類はダフニアなどの大型の動物プランクトンを好んで選択的に捕食<sup>1, 2)</sup>するが（size-selective predation）、魚類により捕食する動物プランクトンの大きさは異なることから、魚類の種と存在は優占する動物プランクトンの種と構造に大きな影響を及ぼす。これと同様に、植物プランクトンを餌としている動物プランクトンのサイズ選択的摂取が植物プランクトンの種と現存量が決めることになる。

動物プランクトン食魚がない場合、ダフニアなどの大型の動物プランクトンが優占し、植物プランクトンを食べ尽くすことから、透明度が上昇し、クロロフィル-a量や窒素・燐などが減少するなど、水質に影響を及ぼ

す<sup>3, 4, 5)</sup>ことになる。

十和田湖では、1984年以前はヒメマス漁獲量が多く、大型の動物プランクトンである枝角類*Daphnia longispina*、カイアシ類*Acanthodiptomus pacificus*が優占し、効率良く植物プランクトンを摂食し、透明度が高かったが、1985年以降、ワカサギの出現により、小型の動物プランクトンである枝角類*Bosmina longirostris*、ワムシ類*Keratella quadrata*などが優占し、透明度の低下とヒメマス漁獲量の不振を招いたことを明らかにした<sup>6, 7, 8)</sup>。

これは、高次の栄養段階の生物を抑制し、食物連鎖系を通して、より低次の栄養段階の生物群集を変えるtop-down効果を利用するバイオマニピュレーション（biomanipulation）<sup>9, 10, 11)</sup>に基づく水質改善・保全の可能性を示すものと考えられる。

ここでは、1995~97年度において優占魚種がワカサギからヒメマスへの変化が動物プランクトン、植物プランクトンや透明度をはじめとする水質に及ぼした影響について報告する。

### 2. 調査方法

調査は1995年4月~98年10月で、湖心にてバンドン採水器によりおよそ1月毎に層別採水した（0, 5, 10, 15, 20, 50, 70, 100m）。なお、水深70mでの採水は1995年度のみである。

水温は表層から水深50mまでは1m毎に、1995年度は

1：国立環境研究所

2：環境研究センター

3：奈良女子大学

4：青森県内水面水産試験場

5：秋田県水産振興センター

水深50m～100mにおいては5m毎にサーミスター水温計により測定した。

表1 水質の測定項目及び方法

項目	方法・出典
水温	サッキー板による 海洋観測指針 (気象庁編；1990)
DO	ウインクラー・アジ化ナトリウム変法 JISK0102 (1993)
T-N	紫外線吸光光度法 JISK0102 (1993)
T-P	ペルオキシニ硫酸カリウム分解法 JISK0102 (1993)
粒径別クロロフィル-a	蛍光法
動物プランクトン	バンドン採水器で採水後、 NXXXでろ過し、光学顕 微鏡により計数
植物プランクトン	グルタルアルデヒド固定後、 光学顕微鏡により計数

### 3. 結果と考察

#### 3・1 湖内水質の概要

今回、魚類をはじめとする生き物が水質に及ぼす効果について考察することから、魚類、プランクトンなどの棲息環境に大きな影響を及ぼす湖心における水温とDOの鉛直分布について検討した。

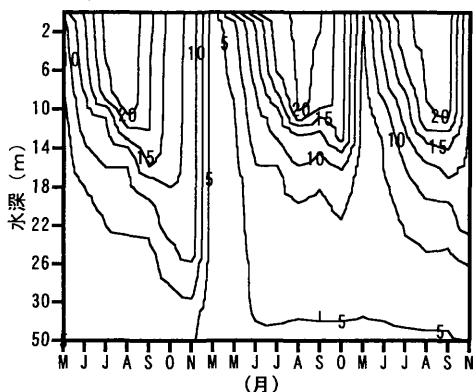


図1 十和田湖湖心における水温の鉛直分布 (1995～1997年)

水温の鉛直分布をみると、平均9.4℃(3.2～22.2:最大～最小、以下同じ)で、5月初旬は表層から下層まで4.0～4.5℃とほぼ均一であるが、気温の上昇とともに水温躍層が形成され、夏季には水深10～20mで安定した水温躍層が形成された。その後、気温の低下とともに徐々に水温躍層が消失する方向に進むが、11月でも水深25～

30m層において比較的安定した水温躍層が認められた。一方、水深50～100m層では水温4.6～5.3℃とほぼ一定であることから、水深50m以降の深水層では通年を通して水温はほぼ一定であると考えられた(図1)。

DOは平均10.7mg/l(7.9～12.6mg/l)で、水温が低い4、5月が最も高く、月を追うにつれて低下する傾向がみられた。DOの鉛直分布をみると、7～9月の表層から水深10m層ではDOが低くなるが、水深50～70m層では大きな変化がないようである。一方、水深100m層では8月以降、DOが低下し、表層部と下層部ではDOの挙動に差がみられた(図2)。

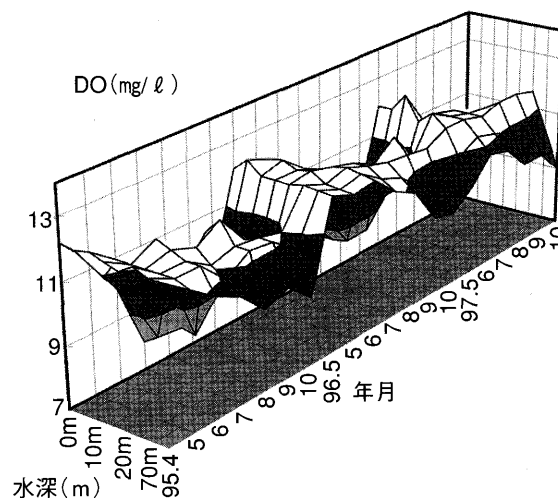


図2 十和田湖湖心におけるDOの鉛直分布 (1995～1997年)

DO飽和率は平均96.1%(72.0%～117%)で、水深0～50m層では概ね90%以上で、ほぼ飽和～過飽和状態にあるが、安定した水温躍層が形成される夏季には水深100m層でのDO飽和率は70%台になり、DOの低下が認められた。

DOは水生植物や植物プランクトンの光合成作用による有機物の合成と酸素放出量及び動物・植物プランクトン、バクテリアの呼吸作用や上層から沈降する遺骸や有機物の分解作用による酸素消費量の大きさを示している。

水温躍層が形成される夏季には表層部から酸素の供給がない深水層では呼吸や分解作用が卓越し、汚濁が進行した湖では、時には無酸素状態になることがしばしば観測されていること<sup>12)</sup>から下層部におけるDOは湖の栄養度と関連するとともに、底生生物の棲息に大きな影響を及ぼす<sup>13)</sup>。

十和田湖のような水深が深く、植物プランクトンや有機物が少ない貧栄養湖では安定した水温躍層が形成され

る夏季でも、深水層では呼吸や分解作用による酸素消費量が少ないことが知られている。

十和田湖では夏季でもDO飽和率は70%を下回ることがないことから、DOの鉛直分布は貧栄養湖の特徴を示しているものと考えられる。

今後の水質汚濁の進行状況を事前に把握するうえで、下層部を含めたDOの鉛直分布の水質モニタリングが必要である。

### 3・2 漁獲量

十和田湖に棲息する魚類はおよそ15種ほどであるが、主な魚種はヒメマスとワカサギである。

ここで、1995～97年における大川岱、休屋、宇樽部の3集荷場での漁獲高をみると、ヒメマスの漁獲量は95、96年はおおよそ5トンと不漁であったが、96年9月以降、ヒメマス漁獲量が増加しはじめ、97年は15トンと豊漁であった。

一方、ワカサギは95、96年はおおよそ25トンと比較的豊漁であったが、97年は8トンと不漁となり、ヒメマスとワカサギの漁獲量は97年では逆転した<sup>14)</sup>。

なお、ヒメマス漁獲は4～11月に、ワカサギ漁獲は4～6月に行われている(図3)。

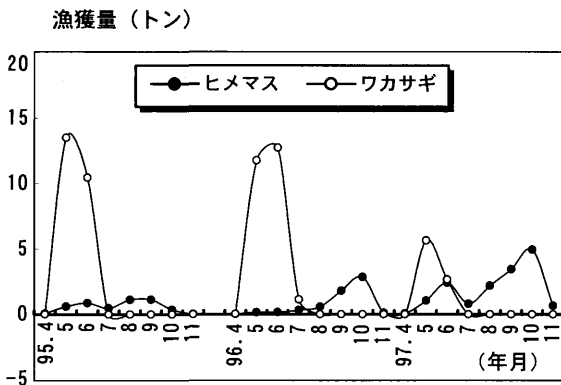


図3 十和田湖におけるヒメマスとワカサギの漁獲量 (1995～1997年)

### 3・3 透明度

透明度は平均9.0m(7.0～14.5m)であった。年度別の透明度の平均をみると、95、96年は8.3m、97年は11.1mとなり、97年には顕著な透明度の上昇がみられた。特に、97年7月には14.5mが観測され、近年としては最も高い透明度であった(図4)。

### 3・5 動物プランクトン

出現した動物プランクトンは、

枝角類3種(8.8%：出現率、以下同じ)

ワムシ類17種(88.1%)

カイアシ類5種(3.1%)

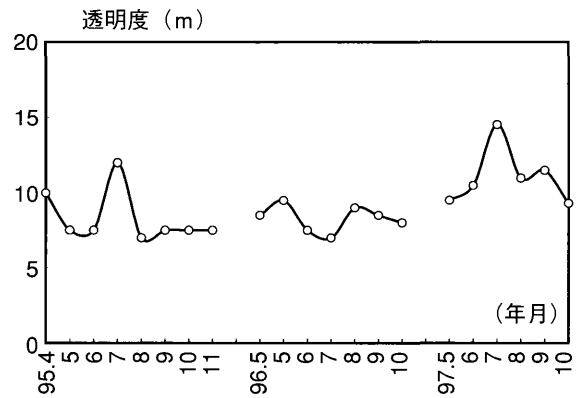


図4 十和田湖湖心における透明度の経月変化 (1995～1997年)

で、計25種であった。

主な動物プランクトンをみると、ワムシ類はハネウデワムシ *Polyarthra* spp (77.9%), *K. quadrata* (9.7%), 枝角類は *B. longirostris* (8.4%), カイアシ類はノープリウス幼生(1.9%)で、これら4種で全個体数密度の98%を占め、いずれも小型の動物プランクトンであった。

今回の調査で特徴的なことは従来のプランクトンネットの垂直曳きではあまり出現していない *Polyarthra* spp が最も多く出現していた。この要因として今回の採水はバンドン採水器により行っているが、同時にプランクトンネットによる水深50mからの垂直曳きと比較すると、バンドン採水器では *Polyarthra* spp が多数認められるにもかかわらずプランクトンネット曳きでは殆ど認められないことから、運動性に富む *Polyarthra* spp はプランクトンネット曳きでは逃げ、捕集されることが考えられることから採取法の差に注意が必要である。

ここで、1995～1997年の主な動物プランクトンの鉛直分布をみると、ワムシ類では *Polyarthra* spp は平均115個/ℓ(0～1,511個/ℓ)で、従来のプランクトンネット曳きの調査ではあまり検出されなかったが、本調査では出現個体数も著しく多く、出現期間も3～4月と長いことから今後の動向が注目される。1995～1997年の出現状況をみると、1995～96年に多く出現し、97年には減少している。季節変動をみると、4、5月には殆ど認められないが、6月以降に徐々に殖え、7月以降に急激に殖えるようである。

*K. quadrata* は平均11.1個/ℓ(0～139個/ℓ)で、95年は春～夏季に、96年は夏～秋季に多く出現し、97年6、7月に僅かに出現したほか、殆ど出現しなかった。

枝角類では *B. longirostris* は平均9.95個/ℓ(0～159個/ℓ)で、*K. quadrata* より1月ほど遅れて多く出現するようになるが、個体数、出現パターンともに *K.*

quadrataに似た挙動を示すようである。

*B. longirostris*と同じ枝角類でヒメマスの主要な餌と考えられている大型の動物プランクトンである*D. longispina*は平均0.24個/ℓ (0~8.59個/ℓ)で、95年に出現していなかったが、ヒメマス漁獲量が多くなりはじめた1996年9月、10月に出現しはじめ、97年7月以降多く出現した。

同じく、ヒメマスの主要な餌と考えられている大型の動物プランクトンであるカイアシ類*A. pacificus*、ケンミジンコ等のカイアシ類の幼体であるノウプリウス幼生は平均2.37個/ℓ (0~24.5個/ℓ)、コペポーダ幼生は平均1.05個/ℓ (0~24.7個/ℓ)で、*A. pacificus*と同様に97年には出現数が多かった (図5 a~f)。

1995~1997年における動物プランクトンの出現状況とヒメマス、ワカサギの漁獲量の関係を見ると、ヒメマス漁獲量が多くなりはじめた1996年9月を境に小型の動物プランクトン群から大型の動物プランクトン群に大きく変化している。

ここで、優占魚種がワカサギからヒメマスへの変化が動物プランクトン群集に及ぼす影響を考えると、ヒメマス、ワカサギともに動物プランクトンを餌にしているが、ヒメマスは大型の動物プランクトンを、ワカサギは小型の動物プランクトンを餌にしており、食性が異なっている。

ワカサギは春に産卵・ふ化し、翌年に成魚となる1年魚であることから、ワカサギ漁獲量は前年のワカサギの産卵・ふ化と棲息状況を反映していることになる。

1995~97年のワカサギ漁獲量を見ると、97年の漁獲量が96年の漁獲量のおよそ1/3に落ち込んでいる。このことから、94年、95年の春にはワカサギの産卵・ふ化が多く、ワカサギの成長が良かったため、ワカサギの動物プランクトンへの捕食圧が強まり、動物プランクトンの小型化を招いたと考えられる。一方、96年の春にはワカサギの産卵・ふ化が少なかったこと、或いは、生育が不良で、96年の夏以降のワカサギ生息数が少なく、ワカサギの動物プランクトン、特に、大型の動物プランクトン及びその幼生に対する捕食圧が少なくなった結果、大型の動物プランクトンが増え、これがヒメマス漁獲量の増大にも結びついたと思われる。

### 3・6 植物プランクトン

出現した植物プランクトンは、

- 藍藻網：4属5種
- クリプト綱：1属1種
- 黄金藻綱：9属11種
- 黄緑藻綱：2属2種
- 珪藻綱：10属19種
- 渦鞭毛藻綱：2属3種

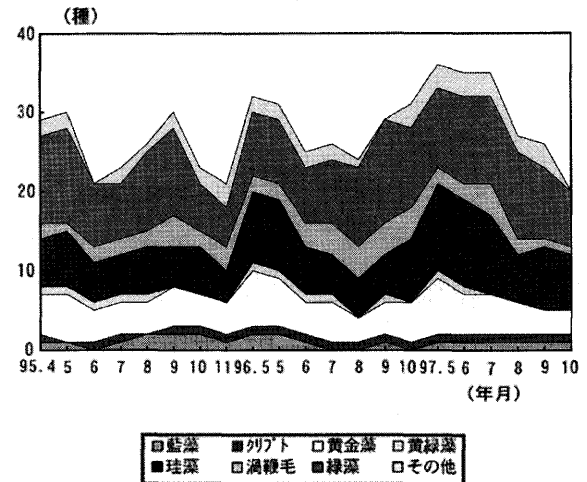


図6 十和田湖湖心において出現した植物プランクトンの種類 (1995~1997年)

#### 緑藻網：21属28種

で、7綱49属69種が認められ、その他に同定不能な球形細胞をした植物プランクトンや鞭毛藻類が出現していた。

種別にみると、緑藻網が最も多く、これに珪藻網、黄金藻網が続き、春季に多く、夏季に少なく、秋季には再び多くなるという変動パターンを示すようである (図6)。

主な植物プランクトンの出現状況を細胞数に着目してみると、藍藻網1種、珪藻網3種、緑藻網の3種であった。

細胞数でみる、藍藻網*Aphanocapsa elachista*が最も多くおよそ65%で、これに緑藻網*Leocytis planktonica*が続き、主に出現した7種の植物プランクトンで全細胞数の94%以上を占めていた。これらの植物プランクトンは寒天質に覆われるか、群体を形成し、動物プランクトンに摂食・消化されにくい大型の植物プランクトンである (表2)。

これらの植物プランクトンの出現状況をみると、優占種は年度によって異なるが、いずれも春季に優占し、その出現期間は長くてもおよそ2~3月であった (図7 a~f)。

ここで、1995~97年の主な動物プランクトンと植物プランクトンの出現状況をみると、1995年と1996年の両年は出現した植物プランクトンの種が異なるが、4~6月に群体を形成する大型の植物プランクトンが優占した後、これに遅れて5~6月に小型の動物プランクトンであるワムシ類、*B. longirostris*が優占し、7月頃には群体を形成する大型の植物プランクトンが消滅するという変動パターンを示していた。一方、1997年の春季には1995

表2 十和田湖湖心において出現した主な植物プランクトン (1995~1997年)

区分	植物プランクトン名	(%)
藍藻網	アフアノカブサ	64.99
	<i>Aphanocapsa elachista</i>	
珪藻網	オビケイソウ	6.53
	<i>Fragilaria capucina v. gracilis</i>	
	オビケイソウ	6.48
	<i>Fragilaria tenera</i>	
緑藻網	ホシガタケイソウ	2.98
	<i>Asterionella formosa</i>	(15.99)
	グロエオキステイス	9.57
	<i>Gleocytis planktonica</i>	
	コリエルラ	2.06
	<i>Koliella elongata</i>	
	クワノミモ	1.72
	<i>Pandorina morum</i>	(13.35)

年, 1996年と同様に群体を形成する大型の植物プランクトンが優占するが, その出現細胞数が著しく減少するとともに, 大型の動物プランクトンが優占していた。

1995~1997年の3ヵ年では優占魚種がワカサギからヒメマスに大きく変化したことによる動物プランクトンと植物プランクトン群集構造の変化をみると, 動物プランクトン群集構造は大きく変化したが, 植物プランクトン群集構造・構成種には大きな変化がなく, 春季に優占する植物プランクトン種を規定している要因は摂取者である動物プランクトンよりも, 融雪水や春季循環期に湧昇

する窒素・磷などの栄養塩類や水温, 気温など季節的な要因が大きいようである (表3)。これを確認するためには冬期間の水質, プランクトン調査が必要であろう。

### 3・7 クロロフィル a

植物プランクトン現存量の指標であるクロロフィル a を粒径別にみると, 各々の平均は

全植物プランクトンのクロロフィル a 量:

1.01  $\mu\text{g}/\ell$  (0.07~3.21  $\mu\text{g}/\ell$ )

10  $\mu\text{m}$ 以上の植物プランクトンのクロロフィル a 量:

0.32  $\mu\text{g}/\ell$  (0.01~1.47  $\mu\text{g}/\ell$ )

2~10  $\mu\text{m}$ の植物プランクトンのクロロフィル a 量:

0.34  $\mu\text{g}/\ell$  (0.01~1.29  $\mu\text{g}/\ell$ )

2  $\mu\text{m}$ 以下の植物プランクトンのクロロフィル a 量:

0.35  $\mu\text{g}/\ell$  (0.01~1.70  $\mu\text{g}/\ell$ )

で, 各々異なるサイズの植物プランクトンに由来するクロロフィル a 量は棲息する植物プランクトン群集に関する重要な情報となり得ること<sup>15)</sup>が示唆された。

粒径別クロロフィル a 量の季節変動をみると, 95, 96年は4~5月初旬には10  $\mu\text{m}$ 以下に区分されるナノ・ピコ植物プランクトンのクロロフィル a 量が多いが, 5月末~6月末までの調査では10  $\mu\text{m}$ 以上の大型の植物プランクトンに由来するクロロフィル a 量が多くなるとともに, この時期にクロロフィル a 量が最も高くなるようである。その後, 7月以降は徐々に10  $\mu\text{m}$ 以上の大型の植物プランクトンに由来するクロロフィル a 量が減少するとともに, 2  $\mu\text{m}$ 以下のピコ植物プランクトンのクロロフィル a 量が多くなり, 特に, 9月以降にその傾向が顕著に認められた。

表3 十和田湖湖心における主な動・植物プランクトンの出現状況 (1995~1997年)

プランクトン名	年月		95.							96.				97.								
	4	5	6	7	8	9	10	11	5	5	6	7	8	9	10	5	6	7	8	9	10	
植物プランクトン																						
アフアノカブサ									○	◎	○					○	○					
ホシガタケイソウ	◎								◎	◎	○						○					
オビケイソウ (F.cap)	◎	◎									○	○	○									
オビケイソウ (F.ten)	○	◎	◎	○							○	○				○	○	○				
クワノミモ	○	◎	◎										○	○	○	○						
コリエルラ										◎	◎					○	○					
グロエオキステイス	◎	◎	○	○																		○
動物プランクトン																						
コシブトカメノコウムシ	○	◎																				○
ハネウデワムシ				○	◎	◎	○						○	○								
ゾウミジンコ					○	◎	○						◎	◎								
ハリナガミジンコ																○						○ ◎
ヤマヒゲナガケンミジンコ																					○ ◎ ◎	
ノープリウス幼生																		○	○	◎	◎	◎
コベポーダ幼生																					○ ◎ ◎	

注) ◎: 多く出現 ○: 比較的多く出現



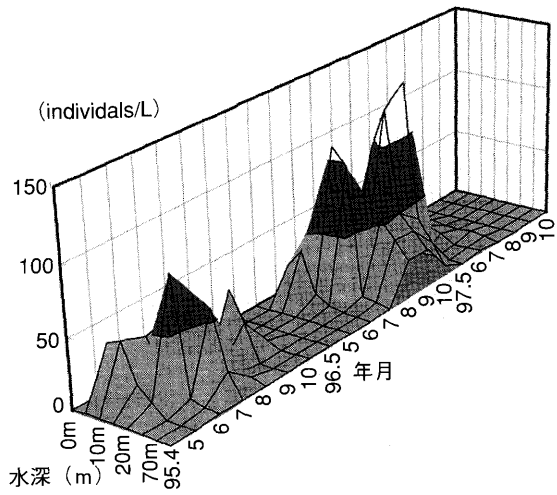


図5-a コシブトカメノコウラムシ  
(*Keratella quadrata*) の鉛直分布

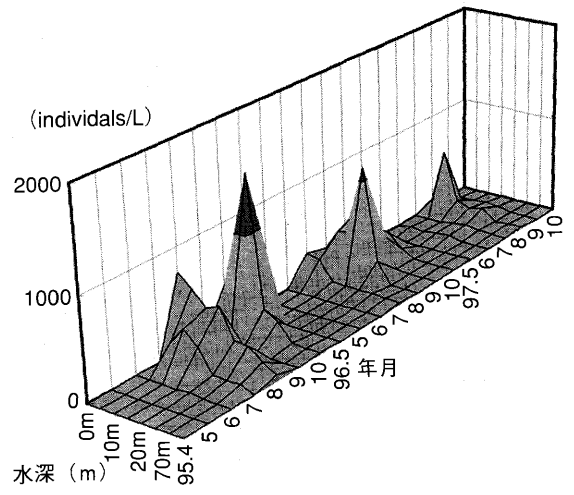


図5-b ハネウデワムシ  
(*Polyarthra* spp.) の鉛直分布

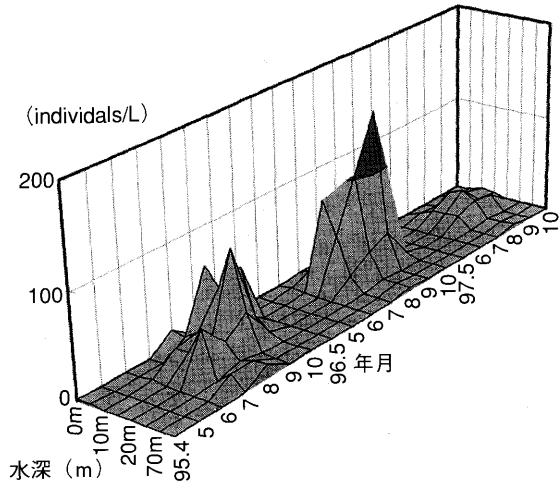


図5-c ゾウミジンコ  
(*Bosmina longirostris*) の鉛直分布

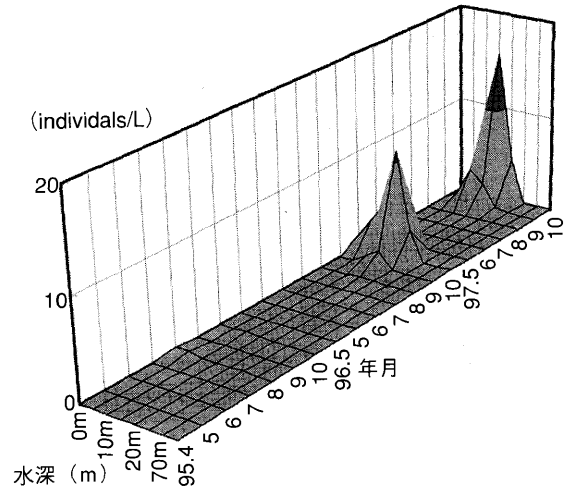


図5-d ハリナガミジンコ  
(*Daphnia longispina*) の鉛直分布

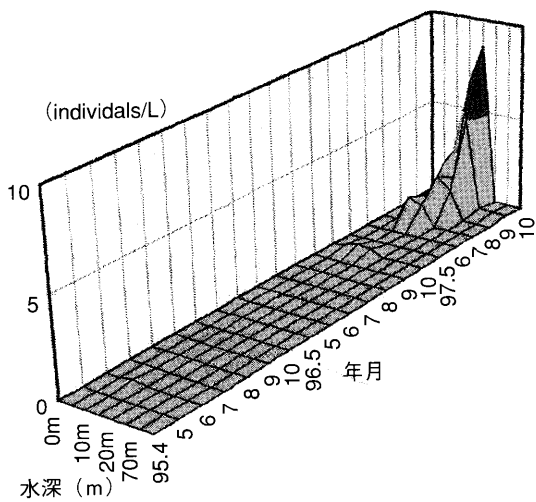


図5-e ヤマヒゲナガケンミジンコ  
(*Acanthodiptmus pacificus*) の鉛直分布

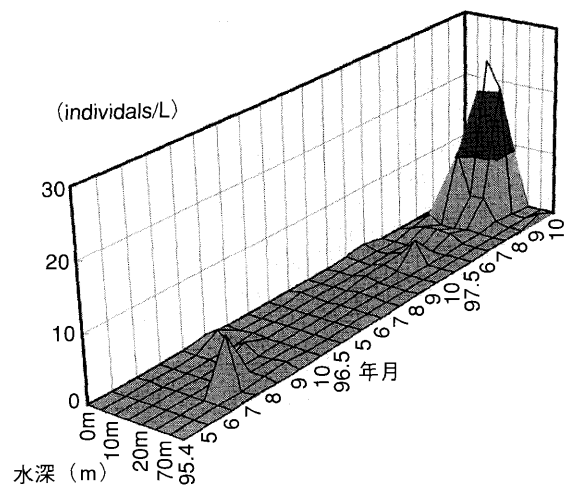


図5-f コペポーダ幼生  
(*copepoda larva*) の鉛直分布

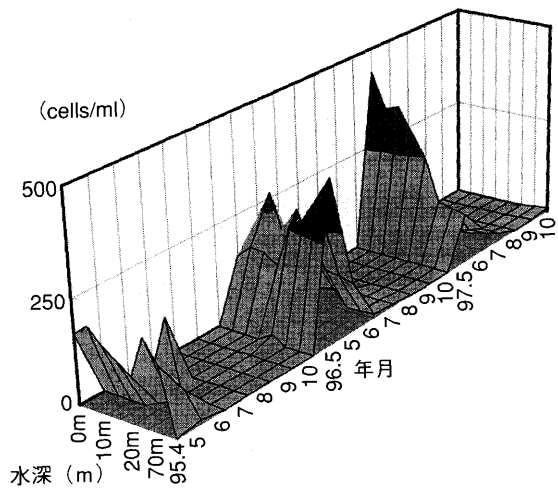


図7-a ホシガタケイソウ  
(*Asterionella formosa*) の鉛直分布

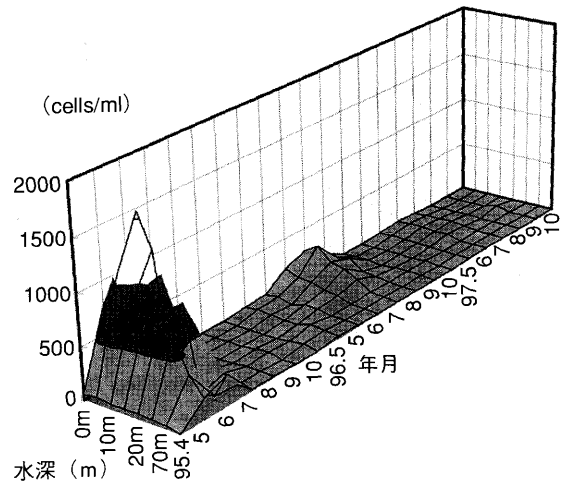


図7-b オビケイソウ  
(*Fragilaria capucina v. gracilis*) の鉛直分布

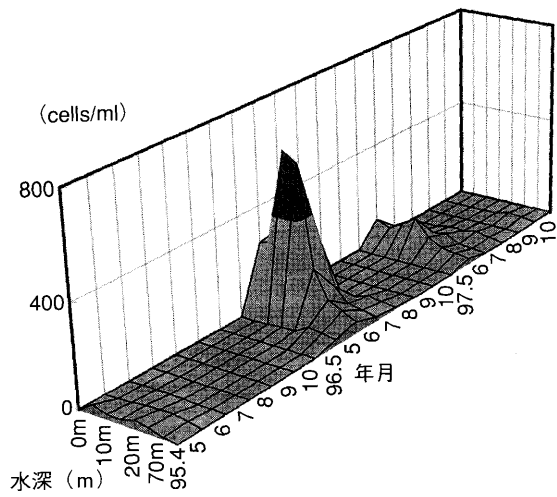


図7-c コリエルラ  
(*Koliella elongata*) の鉛直分布

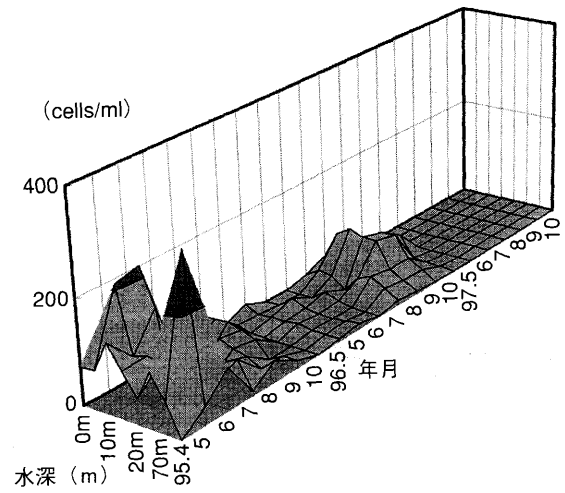


図7-d クワノミモ  
(*Pandorina morum*) の鉛直分布

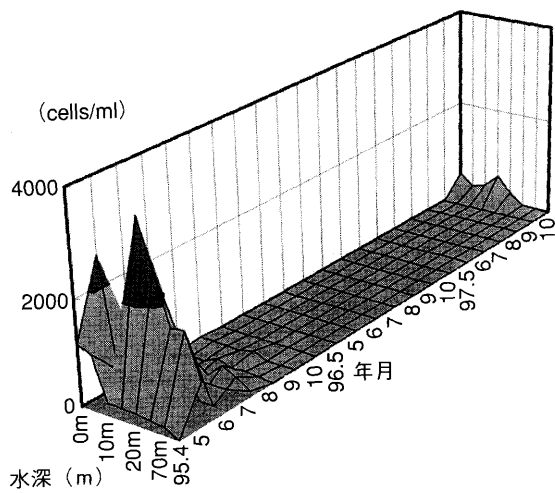


図7-e グロエオキステイス  
(*Gleocystis planktonica*) の鉛直分布

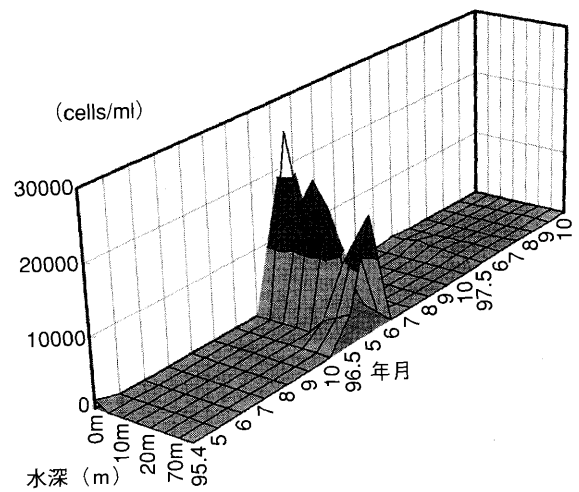
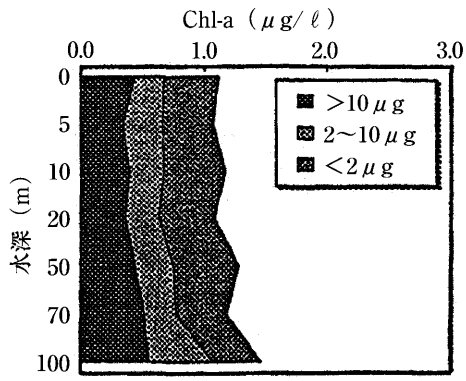
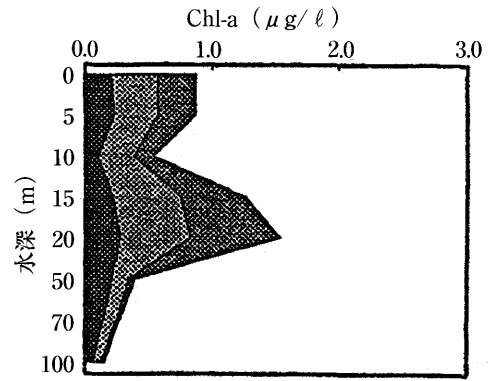


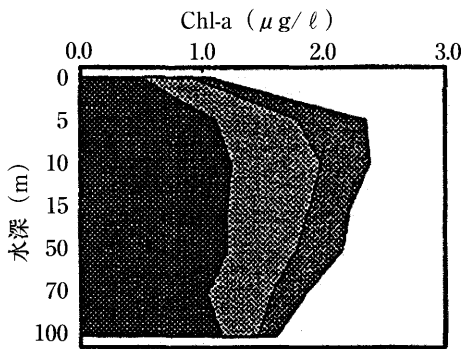
図7-f アフアノカプサ  
(*Aphanocapsa elachista*) の鉛直分布



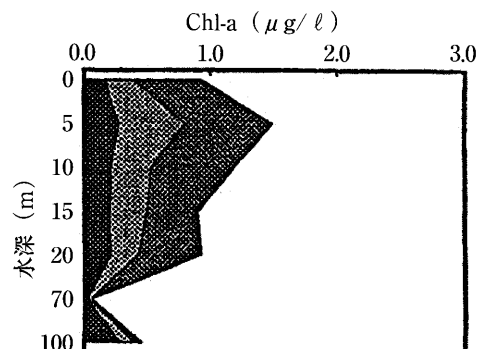
1995.4.25



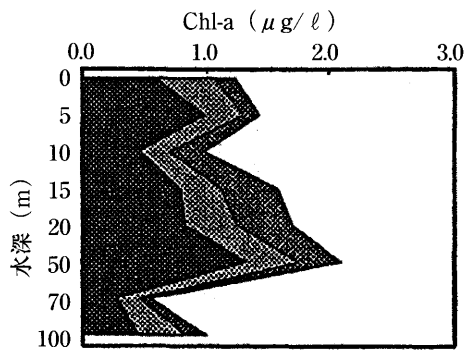
1995.8.31



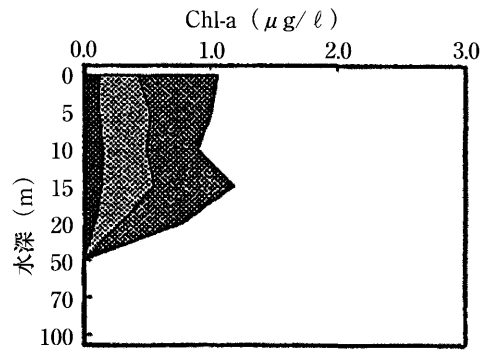
1995.5.29



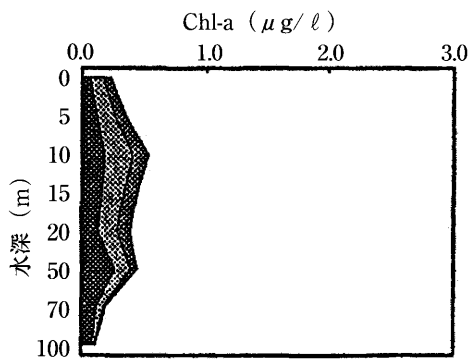
1995.9.29



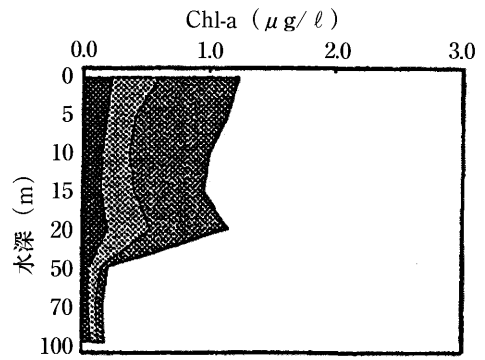
1995.6.28



1995.10.30



1995.7.26



1995.11.6

図8 - a 十和田湖湖心における粒径別クロロフィル-aの鉛直分布 (1995年)

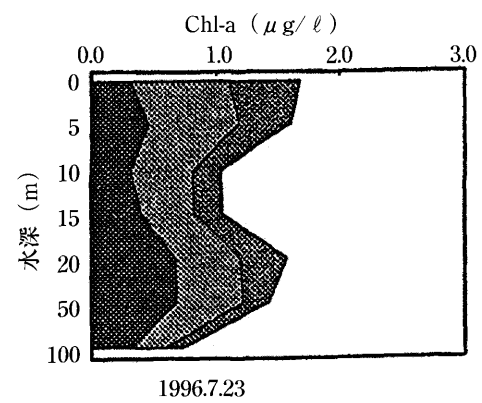
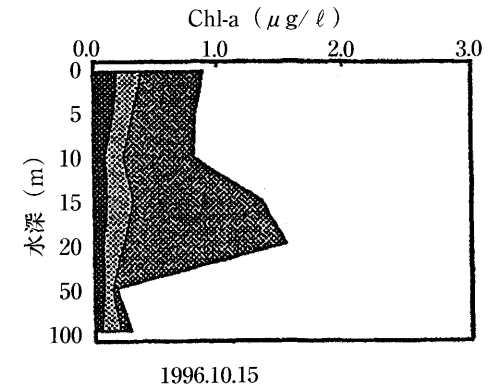
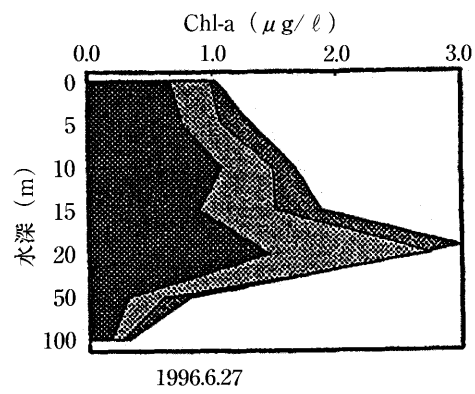
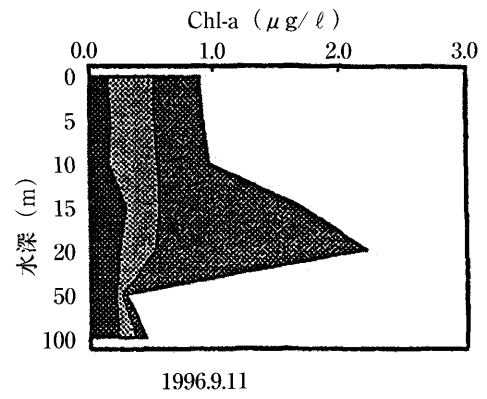
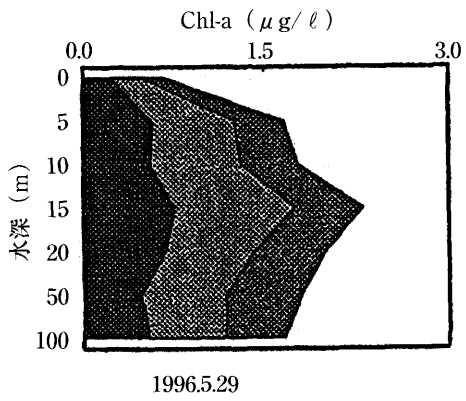
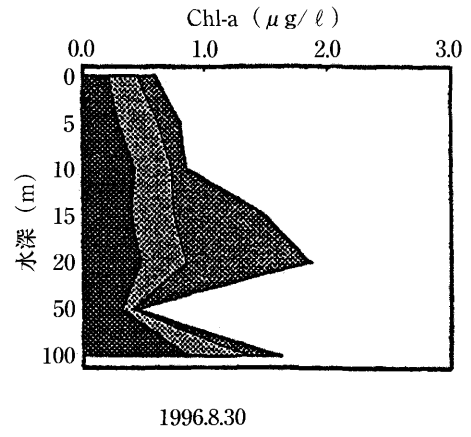
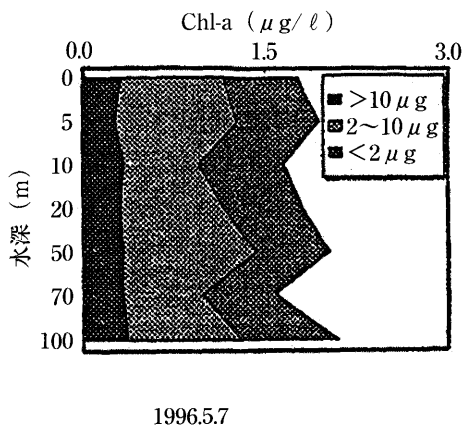


図8 - b 十和田湖湖心における粒径別クロロフィル - a の鉛直分布 (1996年)

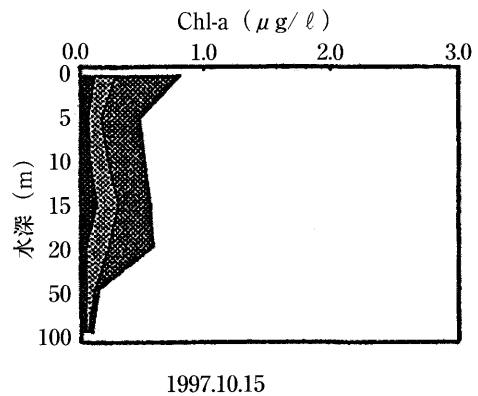
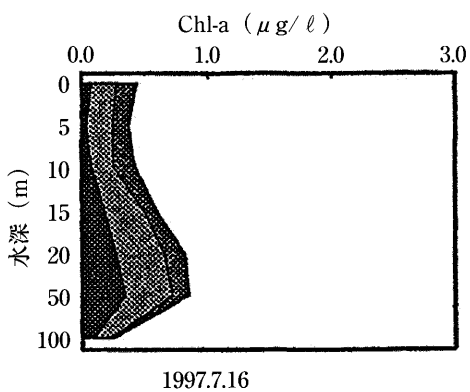
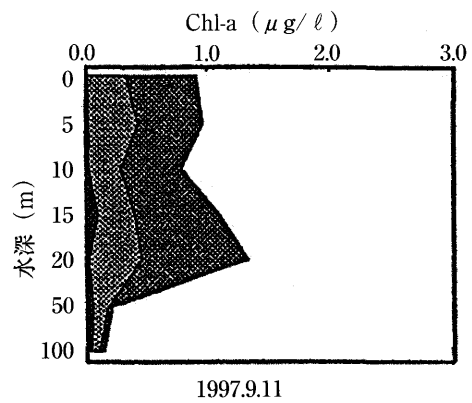
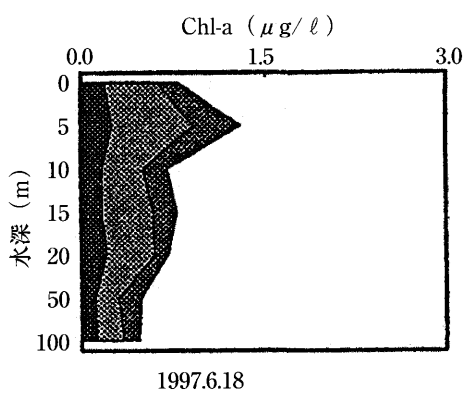
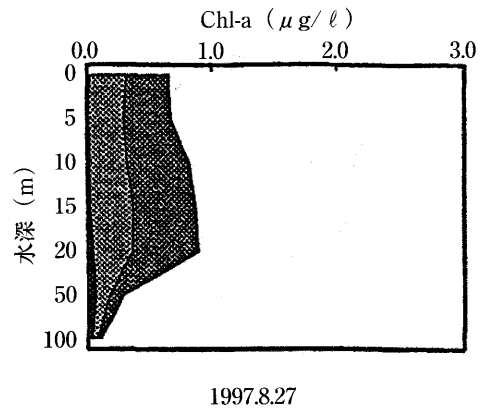
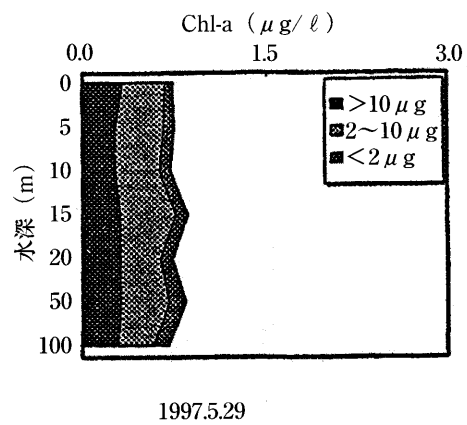


図8 - b 十和田湖湖心における粒径別クロロフィル - a の鉛直分布 (1996年)

一方、97年は10 $\mu$ m以上の大型の植物プランクトンに由来するクロロフィルー a 量が全期間を通じて少なく、95、96年は異なる粒径分布を示していた(図8-a, b, c)。

透明度は植物プランクトン現存量に依存し、97年には透明度の顕著な上昇が認められたことから、透明度のほぼ2倍の水深といわれる有光層(0~20m)における粒径別のクロロフィルー a 量について検討した。

96年9月以降に大型の動物プランクトンが出現したことにより、10 $\mu$ m以上の大型の植物プランクトンに由来するクロロフィルー a 量の減少が著しかった(図9)。これは大型の動物プランクトンが群体を形成するような大型の植物プランクトンを効率良く捕食したことを物語っており、このことが透明度の上昇を引き起こしたものと考えられた。

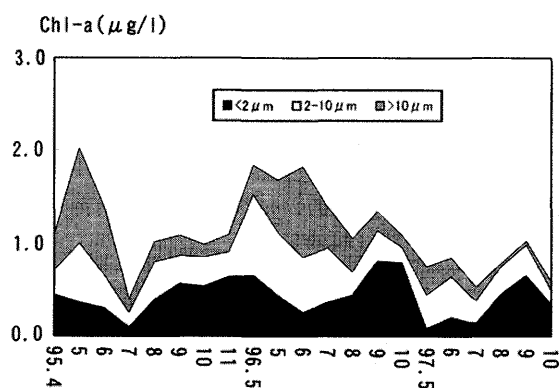


図9 十和田湖湖心の有光層における粒径別クロロフィルー a 量の経月変化(1995~1997年)

また、十和田湖における透明度の上昇にはユスリカの浮上期にヒメマスが餌として捕食した結果、捕食を免れた大型の動物プランクトンが増殖し、植物プランクトンを摂食したことによる間接的な効果が観測<sup>16)</sup>されており、十和田湖の透明度と生物群集との関係は底生生物の影響も考慮する必要がある。

### 3・8 クロロフィルー a とCOD、T-N及びT-Pの関係

クロロフィルー a 量は植物プランクトン現存量の指標の一つで、湖の有機物汚濁の指標であるCODや栄養塩類である窒素・磷と密接に関連している。

1997年には透明度の上昇とクロロフィルー a が減少したことから、有光層でのクロロフィルー a 量とこれらの関係について検討した。

1995~1996年と1997年におけるクロロフィルー a、COD、T-N及びT-Pを平均値で見ると、COD、T-Nは減少しなかったが、T-P、クロロフィルー a

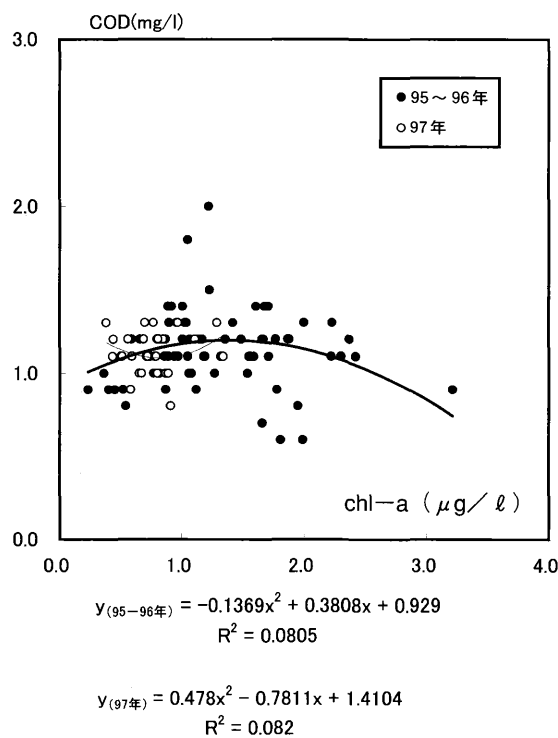


図10 十和田湖湖心の有光層におけるクロロフィルー a とCODの関係(1995~1997年)

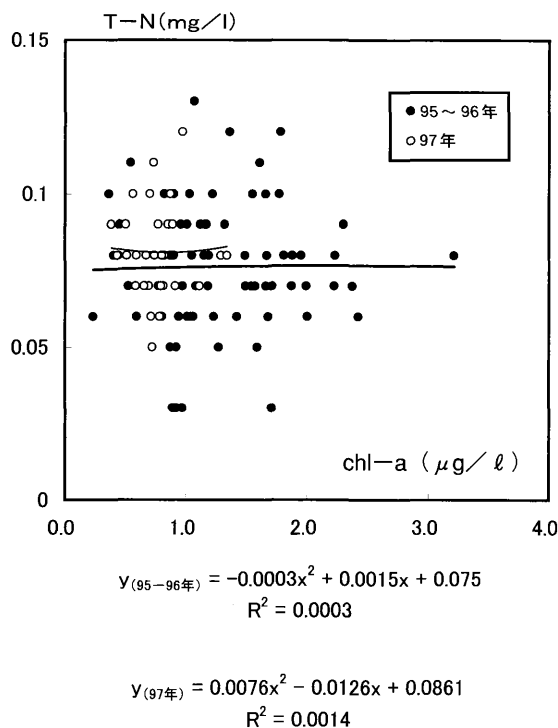


図11 十和田湖湖心の有光層におけるクロロフィルー a とT-Nの関係(1995~1997年)

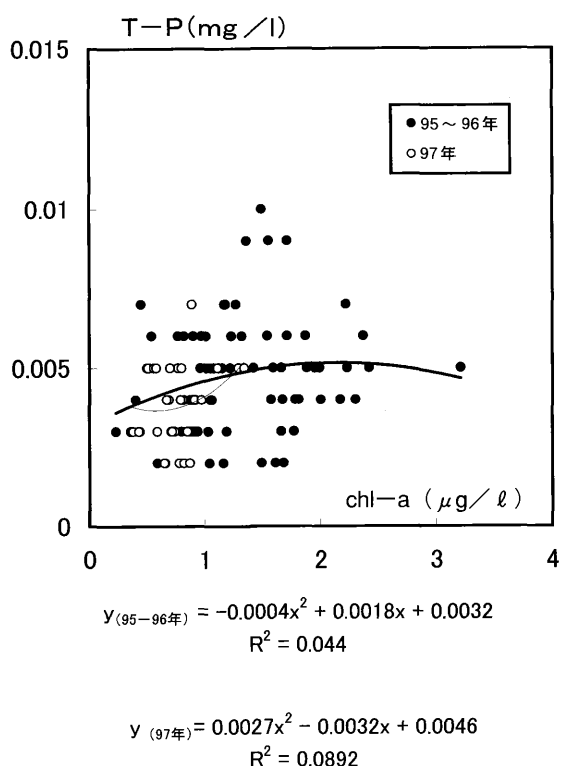


図12 十和田湖湖心の有光層におけるクロロフィル a とT-Pの関係 (1995~1997年)

量は1%の有意差で減少した(表4; 図10~12)。これは、十和田湖ではAGP試験, M-BOD試験では多くの場合、磷が増殖の制限因子になっていることから(未発表), 磷の制限下で増殖した植物プランクトンが大型の動物プランクトンに接食され、更に、大型の動物プランクトンを捕食したヒメマスが漁獲された結果、磷の減少をもたらした<sup>17)</sup>ものと考えられた。

表4 十和田湖湖心における95~96年と97年のCOD, T-N及びT-Pクロロフィル a の概要

項目	平均 (最小~最大)	n	SD
COD	1.2 (0.6~2.0)	73	0.226
(mg/l)	1.1 (0.8~1.3)	30	0.123
T-N	0.08 (0.03~0.13)	73	0.021
(mg/l)	0.08 (0.05~0.12)	30	0.015
T-P	0.005 (0.002~0.010)	73	0.0017
(mg/l)	0.004 (0.002~0.007)	30	0.0012
Chl-a	1.28 (0.23~3.21)	73	0.555
(µm/l)	0.75 (0.38~1.34)	30	0.225

上段: 95~96年, 下段: 97年

このことは、十和田湖では磷の増加が水質汚濁を招いたものと考えられることから、水質改善・保全を進める

うえで、河川などからの流入負荷量の削減とともに、十和田湖では漁獲による磷の湖外への除去が有効であることを示唆している。一方、著しい磷の減少は植物プランクトンに由来する一次生産量の減少をもたらした、これが食物連鎖系を通して、最終的にはヒメマス漁獲量の低下を招く可能性があることから、磷を巡る収支バランスの把握が今後の重要な課題である。

以上から1995~1997年において十和田湖ではワカサギからヒメマスへと優占魚種が変化したことにより、大型の動物プランクトンが優占した結果、透明度の上昇とクロロフィル a 量, T-Pの減少を引き起こし、トロフィックカスケード効果が認められた。

このことは十和田湖の水質改善・保全にはワカサギの駆除などにより大型の動物プランクトンを回復・維持させる魚類管理が重要であることを示唆するものである。一方、これまでの長期モニタリングではヒメマス, ワカサギの著しい増加直後には個体群のクラッシュ(崩壊)を引き起こしていることから、十和田湖の環境収容力に見合う魚類生産量を見積もる必要があり、ワカサギ棲息下ではワカサギ漁獲量は20トン、ヒメマス漁獲量はおおよそ49トン、ヒメマス親魚 8,000尾、ヒメマス放流尾数は160~200万尾と算出された<sup>18, 19)</sup>。

#### 4.まとめ

十和田湖では1986年以降、CODが環境基準値(AA類型: 1mg/l以下)を超えて以来、透明度の低下とヒメマス漁獲量の落ち込みが問題となっている。この要因を明らかにするため1995年4月~1997年10月に湖心において、おおよそ1回/月の頻度で水質、動・植物プランクトン及び魚類調査を行い、以下の結果を得た。

- (1) 水温は4~5月初旬では表層から下層まではほぼ一様であるが、夏季には水深10~20mにおいて安定した水温躍層が形成され、その後、気温の低下とともに水温躍層が徐々に消滅する方向に進むが、11月でも比較的安定した水温躍層が認められた。
- (2) DOの鉛直分布は水深100m層でDO飽和率は70%台に低下した。
- (3) 1995~1996年はワカサギ漁獲量が多く、1997年にはヒメマス漁獲量が多かった。
- (4) ヒメマスからワカサギへ優占魚種が変化したことにより、透明度の上昇とT-P及びクロロフィル a が減少し、トロフィックカスケード効果が認められた。
- (5) クロロフィル a 量の減少にもかかわらず、CODは減少しなかったことから、CODの構成成分と由来を明らかにすることが必要である。
- (6) ワカサギ漁獲量が多かった1995~1996年は小型の動物プランクトンであるワムシ類, *B. longirostris*が優占

- し、ヒメマス漁獲量が多かった1997年には大型の動物プランクトンである*D. longispina*, *A. pacificus*が優占した。
- (7) 春季には群体を形成する大型の植物プランクトンが優占したが、出現する植物プランクトンの種類は季節的な要因により決定されているものと考えられた。
- (8) 粒径別クロロフィル-a量をみると、1995～1996年の春季に大型の植物プランクトンに由来する10 $\mu$ m以上のクロロフィル-a量が、1997年には小型の植物プランクトンに由来する2 $\mu$ m以下のクロロフィル-a量が卓越し、植物プランクトンの出現状況を反映していた。
- (9) 十和田湖の水質改善・保全には十和田湖の環境収容力に見合うヒメマス-Daphnia系を優占される魚類管理が必要である。

## 文 献

- 1) Horne. A. J., et al : Limnology. p.270-272, McGraw-Hill, Inc., New York, 1994.
- 2) 西野 麻知子：沖合生態系の異変に伴う食物連鎖構造の解析-コアユの多い年と少ない年の比較, 滋賀県立琵琶湖研究所報告, 15, 54-61, 1997.
- 3) 西条 八束, 他編：メソコムス-湖沼生態系の解析, 名古屋大学出版会, 愛知, 1993.
- 4) 福島 武彦, 他：屋外実験池を用いたラン藻類優占到及ぼす魚の影響に関する研究, 水環境学会誌, 21 (8), 520-529, 1998.
- 5) POST, J. R., et al : The impact of planktivorous fish on the structure of a plankton community. *Freshwater Biology*, 17, 79-89, 1987.
- 6) Takamura, N., et al : Did a drastic change in the fish species from kokane to pond smelt decrease the secchi disc transparency in the oligotrophic Lake Towada, Japan? *Arch. Hydrobiol.* 144, 3, 283-304, 1999.
- 7) 三上 一, 他：十和田湖における透明度と生物群集の変遷, 青森県環境保健センター研究報告, 8, 15-26, 1997.
- 8) 青森県：平成7～9年度十和田湖水死汚濁機構解明調査報告書. 平成10年11月.
- 9) 花里 幸孝：特集 バイオマニピュレーションによる水環境の保全-バイオマニピュレーションの概念, *水環境学会誌*, 22 (1), 2-7, 1999.
- 10) 花里 幸孝：ミジンコ-その生態と湖沼環境問題, 名古屋大学出版会, 愛知, 1998.
- 11) Shapiro. J. : Biomanipulation : the next phase-making it stable. *Hydrobiologia* 200/201 : 13, 1990.
- 12) 木内 浩一, 他：手賀沼における水温, DOの連続測定, 平成8年度千葉県水質保全研究所年報, 105-114, 1997.
- 13) 大高 明史, 他：十和田湖の底生動物相. 国立環境研究所研究報告 R-146-'99-十和田湖の生態系管理に向けて, 55-71, 国立環境研究所, 1999.
- 14) 長崎 勝康, 他：十和田湖資源対策調査結果 (1998年), 国立環境研究所研究報告 R-146-'99-十和田湖の生態系管理に向けて, 126-13, 国立環境研究所, 1999.
- 15) Hino. S., et al : Limnological characteristics and vertical distribution of phytoplankton in oligotrophic Lake Akan-Panke. *Jpn. J. Limnol.*, 59, 263-279, 1998.
- 16) 牧野 渡, 他：ユスリカのサナギが十和田湖の透明度に与える間接効果, 第64回日本陸水学会彦根大会講演要旨集, p.155, 1999.
- 17) Mazumder, A. : Phosphorus-chlorophyll relationships under contrasting herbivory and thermal stratification : predictions and patterns. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. 51. 390-400, 1994. c water bodies in the Netherlands. *Hydrobiological Bulletin* 20 (1/2) : 165-172, 1986.
- 18) 鈴木 俊哉, 他：十和田湖におけるヒメマスおよびワカサギの個体群動態, 国立環境研究所研究報告 R-146-'99-十和田湖の生態系管理に向けて, 27-35, 国立環境研究所, 1999.
- 19) 帰山 雅秀：十和田湖のヒメマス資源管理, 国立環境研究所研究報告 R-146-'99-十和田湖の生態系管理に向けて, 36-40, 国立環境研究所, 1999.



Abstract

## Influence of Fish on Transparency in Lake Towada (1995~1997)

Hajime MIKAMI, Toshio KON, Ikuyo KUDO, Toshiya MAEDA, Shinichi ISHIZAKA,  
Ken KUDO, Naohumi NOZAWA, Hideki OKUBO, Noriko TAKAMURA<sup>1</sup>,  
Megumi NAKAGAWA<sup>2</sup>, Akiko HOUKI<sup>3</sup>, Masayasu NAGASAKI<sup>4</sup> and Hisashi MIZUTANI<sup>5</sup>

In Lake Towada, the chemical oxygen demand (COD) value has been exceeding the environmental standard (Class AA : no more than 1 mg/l) since 1986, and the reduced transparency and the reduced catch of kokanee have become a problem.

The researchers conducted studies of water quality, plankton, and fish at a central site in Lake Towada from 1995-97. According to the results, the pond smelt was caught plentifully and some species of small zooplankton such as cladocerans, *Bosmina longirostris* and rotifers, *Keratella quadrata* have predominated from April 1995 to June 1996. Since September 1996, in contrast, the catch of kokanee has increased and large species of zooplankton such as cladocerans, *Daphnia longispina* and copepods, *Acanthodiptomus pacificus* have predominated. This resulted in increased transparency and decreased chlorophyll-a concentration, creating a trophic cascade effect. These results suggest that although the restoration and maintenance of the kokanee-Daphnia dominant system allow the recovery and retention of clear transparency, fish population management must coincide with the environmental capacity since an excessive increase in kokanee populations may cause a sharp crash in other populations.

Key words : lake, transparency, fish, ecosystem management & lake restoration.

# 金属製錬工場周辺地域の粉じん苦情処理における CMB法の適用事例

花石 竜治 早狩 進

八戸市内の金属製錬工場周辺地域で申し立てられた粉じん苦情の処理にあたって、2種類の最小自乗法を用いたCMB法を適用した。用いたCMB計算法は、測定値の誤差を考慮しない簡単な最小自乗法と、環境および発生源のデータの誤差を考慮できる有効分散最小自乗法である。実際の計算は、表計算ソフトExcelのVBAマクロをプログラミングして行った。CMB法は、どちらの方法を用いても、実際に発生源であった工場集塵機ダストの寄与率を、ほかのダストと比べ、抜きん出て高く評価した。ダストの種類にまで言及して発生源を推定できたのはCMB法ならではのであった。CMB法による発生源寄与推定を気象データと併せて業者に提示し、業者はダストの飛散を認め、粉じん飛散防止処置をして苦情は解決された。以上のことから、CMB法は工場周辺地域の粉じん苦情の処理に威力を発揮するものと結論された。

Key words : CMB, Excel VBA macro, dust

## 1. はじめに

ケミカルマスバランス (CMB) 法は、環境試料中の化学種の組成と発生源に由来する試料の化学組成とから、環境汚染における発生源の寄与を求めるものである。今回、八戸市内の金属製錬工場周辺地域での粉じん苦情処理に適用したので、その事例を報告する。

## 2. 粉じん苦情の概要

苦情は、平成11年3月22日朝に申し立てられた。内容は「朝起きたら自動車の上に茶色い粉が付着している」というものであった。申し立て者によれば、その粉じんは21日の夜から22日の朝にかけて付着したとのことであった。その家族からは、近隣の墓地にも同じような粉じんが堆積しているとの情報があった。当所で調査したところ、粉じんの飛散地域はある程度の広がりを持っており、したがって工場などに由来するものと考えられた。21日の夜から22日の朝までの風向きから判断して発生源と考えられる金属製錬工場 (A社およびB社) に操業状況の異状の有無を尋ねたが、両社とも通常の操業状態であった。図1に粉じん飛散地域と、工場の位置関係を示す。

## 3. 試料の採取および分析

飛散した粉じんは、苦情申し立て者の近隣の墓地から採取した。また、発生源と考えられる工場として、粉じん飛散地域から南東方向のA社、北東方向のB社、および北にあるC社を選び、集塵機ダストを採取した。

粉じんおよびダストは灰化せずに、数10mgないし100mg程度をとり、塩酸・過酸化水素分解を施し、抽出液の

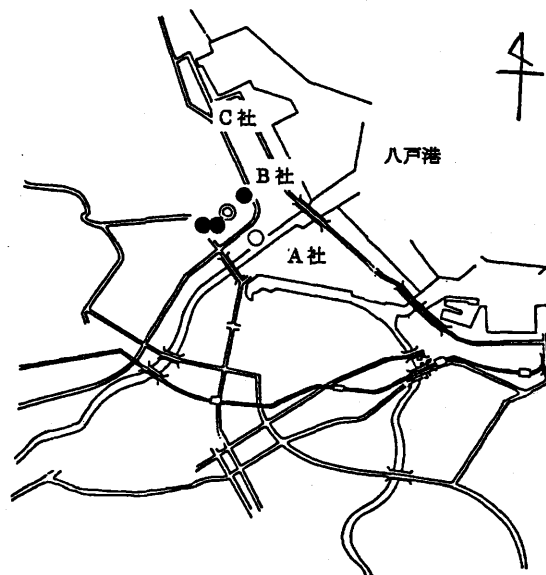


図1 A社、B社およびC社と粉じんが飛散した地域

- 粉じん飛散が確認された場所
- 苦情申し立て者自宅
- 墓地

フレイム原子吸光分析を行って、重金属 (Ni, Fe, Pb, Zn, Cd, MnおよびCu) の抽出量を定量した。また、測定値の標準偏差は、ブランクとして用いた (2 + 98) 硝酸の繰り返し測定に関する標準偏差を用いて算出した。

## 4. CMB法による発生源の解明

### 4. 1 最小自乗法を用いたCMB法

CMB法の計算方法には、指標元素法、線形計画法、

最小自乗法，有効分散最小自乗法などがある<sup>1-2)</sup>。最小自乗法は，寄与の算出論理が残差平方和が最小となる必要十分条件であり，多くの元素を考慮できるという長所がある。そこで苦情処理にあたっては，まず，簡易な，測定値の誤差を考慮しない最小自乗法により計算を行った<sup>3)</sup>。すなわち，次の式で定義される $\chi^2$ を最小にする発生源寄与を求めた：

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{\left[ C_i - \sum_{j=1}^p a_{ij} S_j \right]^2}{C_i^2} \quad (1)$$

ここで， $C_i$ は環境試料中の化学種 $i$ の濃度， $a_{ij}$ は発生源 $j$ の試料中の化学種 $i$ の濃度， $S_j$ は発生源 $j$ の寄与である。 $n$ は化学種の数であり， $p$ は発生源の数である。(1)を最小にする解 $S_j$ は

$$\frac{\partial \chi^2}{\partial S_j} = 0 \quad (j=1,2,\dots,p) \quad (2)$$

なる連立一次方程式（正規方程式）を解くことにより得られる。正規方程式は，対称行列をヤコビ法により対角

化して解いた。計算は，Excel上でVBAマクロを組んで行った。

表1に計算結果を示す。表1の計算結果では，A社2およびB社2というダストの寄与が負になっている。これは発生源として選んだセットのなかに，化学組成が過度に類似している組合せがあるために出てきたものであり，類似した組成を持つことは多重共線性と言われている。

粉じんが飛散した地域は，当所のこれまでの調査結果から，清浄地域に比べて，降下ばいじん中のZn，PbおよびCdの含有量が高いことがわかっている<sup>4)</sup>。一方，粉じんの中のこれらの元素の含有量は低かった。そこで，次に，苦情に関係しないと考えられるこれらの元素のうち，PbおよびCdをCMB計算で除外してみた。CMB法では，発生源の数は化学種の数以下でなければならないので，Zn，PbおよびCdの発生源と考えられる非鉄金属製錬工場C社を外して，CMB計算を行った。その結果を表2に示す。

以上の表1および表2の結果から，A社1の工場ダストの寄与が一番高く，したがって，これが粉じんとして飛散した可能性が高いことが判明した。

表1 最小自乗法を用いたCMB法による発生源の寄与率の推定

元素	発生源 (mg/kg)					環境濃度 (mg/kg)		C/O (%)
	A社1	A社2	B社1	B社2	C社	測定値 (O)	予測値 (C)	
Ni	15100	12100	110	82	54	10900	10802	99
Fe	146000	85100	136000	138000	13600	114000	103617	91
Pb	282	4770	28300	21500	258000	183	183	100
Zn	1470	22300	365000	273000	388000	459	458	100
Cb	59	388	567	376	569	7	7	100
Mn	2780	2330	11700	9890	312	1720	1843	107
Cu	52	57	2260	1630	1020	55	56	102
寄与	0.8242	-0.1358	0.1222	-0.1580	0.0021			
寄与率 (%)	126	-21	19	-24	0			

表2 最小自乗法を用いたCMB法による発生源の寄与率の推定 (Pb, CdおよびC社を除外)

元素	発生源 (mg/kg)				環境濃度 (mg/kg)		C/O (%)
	A社1	A社2	B社1	B社2	測定値 (O)	予測値 (C)	
Ni	15100	12100	110	82	10900	11117	102
Fe	146000	85100	136000	138000	114000	102350	90
Zn	1470	22300	365000	273000	459	459	100
Mn	2780	2330	11700	9890	1720	1825	106
Cu	52	57	2260	1630	55	55	101
寄与	0.7928	-0.0705	0.1614	-0.2126			
寄与率 (%)	118	-11	24	-32			

#### 4. 2 有効分散最小自乗法を用いたCMB法

以上で用いたCMB法には問題点があった。まず、①測定値の誤差が考慮されておらず、最小自乗法の重み付けがすべての発生源と化学種にわたって一様になされている、ということである。表1および表2にあげた化学種のなかには、定量下限値が高いものもあれば、低いものもあり、発生源データも、発生源によってデータのばらつきに差がある。そしてつぎに、②共線性の強い発生源を自動的に除去する機能がない、ということである。最小自乗法を用いると、共線性により、物理的に意味のない負の寄与が出てくる。従来、CMB計算では、負の寄与が現れたら、その発生源を除外し、さらにCMB計算を行ってみるのが常道であった。そして最後に、③どの発生源、化学種の組合せを選ぶかの客観的基準が全くない、ということである。発生源や化学種の取捨選択は、従来、CMB法で試行錯誤で行われてきた重要な過程である。こういったことから、測定値の誤差を考慮し、それにより化学種や発生源に統計的な重み付けができる有効分散最小自乗法を試みた<sup>1-2)</sup>。この方法は以下に示す $x^2$ を最小にする発生源の寄与 $S_j$ を求める：

$$x^2 = \sum_{i=1}^n \frac{\left[ C_i - \sum_{j=1}^p a_{ij} S_j \right]^2}{\sigma_{C_i}^2 + \sum_{j=1}^p \sigma_{a_{ij}}^2 S_j^2} \equiv \sum_{i=1}^n \frac{\left[ C_i - \sum_{j=1}^p a_{ij} S_j \right]^2}{V_{eff, i}} \quad (3)$$

ここで、 $\sigma_{C_i}$ 、 $\sigma_{a_{ij}}$ はそれぞれ $C_i$ 、 $a_{ij}$ の測定に伴う誤差の標準偏差である。実際には、 $S_j$ は、次の行列を繰返し計算することによって求める：

$$S = ({}^tAVA)^{-1}{}^tAVC \quad (4)$$

ここでAは要素が $a_{ij}$ の行列、Vは対角要素が $V_{eff, i}^{-1}$ の対角行列、Cは要素が $C_i$ のベクトル、Sは要素が $S_j$ のベク

トルである。 ${}^tX$ は行列Xの転置行列の意味である。

有効分散最小自乗法の計算プログラムは既に作成され、CMB8としてソースコードも公開されている<sup>5)</sup>。CMB8には、発生源の選択を自動的に最適化する機能もあるが、欠点もある。すなわち、①環境中の粉じん濃度として議論しているため、粉じんに含まれる化学種の濃度そのものからは計算できない。したがって、今回の苦情処理のように、粉じんそのものが与えられた場合には適用できないということになる。また、②入力ファイルが特定のテキストファイルであり、その作成が面倒である、といったこともある。そこで、われわれは、今回、CMB8をExcel VBAマクロに移植することにより、Excel上での視覚的処理を可能にした。この詳細は別の機会に述べる<sup>6)</sup>。

表3に、全発生源を用いて計算した結果、負の寄与を与える発生源を自動的に除去した結果、および相関係数を最大化する発生源の組合せを求めた結果を示す。表に示されているとおり、有効分散最小自乗法を用いたCMB計算を行っても、A社1のダストが抜きん出て最も高い寄与率を与えることがわかった。

#### 5. 苦情の解決

一方、粉じんが飛散したと考えられる21日夜から22日朝までの風向は、飛散地域では南東の風であった。この気象データとCMB計算による結果から、A社の工場ダスト1が発生源と考えられる旨を、A社に説明した。A社は再度、工場内を点検した結果、集塵ダストを炉に戻す過程で点検口が開いている箇所を発見し、そこからのダストの飛散を認めた。A社は、ダストが飛散したと考えられる箇所を密閉するという対策を講じ、苦情は解決された。気象データからは、A社が発生源であったらしいということは推定可能であるが、A社工場のどこの

表3 有効分散最小自乗法を用いたCMB法による発生源の寄与率の推定

元 素	発生源 (mg/kg)					環境濃度
	A社1	A社2	B社1	B社2	C社	測定値 (O)
N i	15100	12100	110	82	54	10900
F e	146000	85100	136000	138000	13600	114000
P b	282	4770	28300	21500	258000	153
Z n	1470	22300	365000	273000	388000	459
C d	59	388	567	376	569	7
M n	2780	2330	11700	9890	312	1720
C u	52	57	2260	1630	1020	55
寄与率 (%)						
全国発生源による推定	137	-26	37	-48	0	
負の寄与の発生源除去	100					
相関係数最大ケース	137	-26	37	-48	0	

ダストが発生源なのかは全く情報が得られない。今回、われわれは発生源をA社ダスト1と推定したが、ダストの種類にまでに言及できたのはCMB法ならではであった。

## 6. 結 論

八戸市内の金属製錬工場周辺地域で粉じん苦情が申し立てられ、飛散した粉じんと、周辺工場から採取した集塵機ダストの分析を行った。分析結果に、CMB法を適用し、発生源の解明に努めた。CMB計算は、Excel VBAマクロプログラミングにより、簡単な最小自乗法と有効分散最小自乗法を行った。その結果、粉じんの発生源が、工場としてのみならず、ダストの種類まで特定され、CMB法は苦情処理に威力を発揮した。今後は、最小自乗法以外のCMB計算方法も検討しながら、八戸地域における降下ばいじんや浮遊粉じん中の重金属の発生源解明に適用したいと考えている。なお、CMB8を移植したExcelマクロは、原著者の了解を得て、以下のホームページにアップロード済みであり、ここからダウンロードして使用可能である：

ドして使用可能である：

[http://www.jomon.ne.jp/~ hayakari/index.html](http://www.jomon.ne.jp/~hayakari/index.html)

## 文 献

- 1) 浮遊粒子状物質対策検討会：浮遊粒子状物質汚染予測マニュアル，初版，267-269，東洋館出版社，東京，1997.
- 2) Henry, R. C. et al. : Review of receptor model fundamentals, *Atmos. Environ.*, **18**, 1507-1515, 1984.
- 3) 環境庁大気保全局：スパイクタイヤによる浮遊粉じん中の各成分濃度等測定方法指針，1983.
- 4) 工藤隆治他：八戸市内の降下ばいじん（2）－不溶性重金属について－，青森県環境保健センター研究報告，**2**，105-110，1991.
- 5) CMB8のftpサイト：ftp://eafs.dri.edu/cmb80
- 6) 花石竜治他：CMB計算用Excelマクロの紹介，第26回環境保全・公害防止研究発表会講演要旨集，p56，1999.

## Abstract

# Application of CMB Methods to Management of a Dust Grievance Complained by Inhabitants Around Smelting Factory Districts

Ryuji HANAISHI and Susumu HAYAKARI

In the course of management of a grievance on a dust scattered around smelting factory districts in Hachinohe-city, two kinds of CMB methods were applied to the source estimation. One was the most simple least square method that did not take into consideration of the errors in the measurement of metal contents. The other was the effective variance least square method that considered measurement errors of both ambient and source profiles. In the actual calculation, Excel VBA macros were coded for the CMB apportionment. By the use of both of two CMB methods, a distinguished contribution of a factory dust was obtained. The dust was collected in a dust separator of the factory that turned out to be the actual source. The CMB methods estimated not only the factory but also the type of the dust. The grievance came to a settlement since the factory protected against scattering of the dust after we indicated the CMB result as well as data of weather conditions. The CMB apportionment is concluded to exercise the power over management of the grievance on the dust flied around factory districts.

Key words : CMB, Excel VBA macro, dust

II ノ ー ト

# 青森県内におけるレジオネラの汚染実態調査

筒井 理華 対馬 典子 大友 良光

## Incidence of Legionella Species in Aomori Prefecture

レジオネラ感染症 (Legionellosis) の予防を目的に1997年8月から1998年10月にかけて青森県内の特定建築物及び病院又は老人施設の冷却搭水と給湯水それぞれ54, 30検体, そして旅館または公衆浴場の温泉水36検体の合計120検体についてレジオネラ (*Legionella*) の汚染実態調査を行った。検査は酸処理法で行い, 分離菌については市販の血清型別その他, PCR法 (polymerase chain reaction) を用いて属レベル並びに*L. pneumophila*の同定を行った。その結果, 特定建築物の冷却搭水59検体中19検体 (35.2%), 病院又は老人施設の冷却搭水18検体中3検体 (16.7%), 温泉旅館又は公衆浴場の温泉水等36検体中9検体 (25.0%) からレジオネラが分離された。給湯水からは分離されなかった。分離菌の血清型は, 冷却搭水由来では*L. pneumophila* 1群が19株, 6群が1株, *L. bozemanii*と*L. micdadei*各1株, 温泉水等からは*L. pneumophila* 1群が1株, 3群3株, 4群2株, 5群4株, 6群が1株, そして, *L. spp.*が2株であった。

Key words : *Legionella. spp.*, Cooling tower water, Circulatory filter bath, Pneumonia type, Infectious disease

### 1. はじめに

レジオネラ (*Legionella*) は1976年7月下旬から8月上旬にかけて米国のペンシルバニア州フィラデルフィアで開催された在郷小軍人集会で発生した肺炎患者から初めて分離された菌である。このとき分離された菌は*L. pneumophila*と命名されたが, その後多くの血清型あるいは菌種が確認され, 1998年現在では43菌種にのぼり, このうち22菌種がヒトへの病原性が報告されている<sup>1, 2)</sup>。レジオネラはグラム陰性無芽胞桿菌であり, 発育にはL-システイン, L-メチオニンなどのアミノ酸と微量の鉄が必須であり, 発育至適温度は36°C前後, 発育至適pHは6.90±0.01である。また, 細菌や藻類の代謝産物を利用し, アメーバ等の細菌捕食性原生動物に寄生して増殖することが知られている。

本菌による感染症は2~10日の潜伏期後, 高熱, 咳, 悪寒, 頭痛, 胸痛, 筋肉痛が突然発症し, 48時間以内に重体になる「在郷軍人病」と呼ばれる「肺炎型」と, 1~2日の潜伏期後, 悪寒, 筋肉痛, 倦怠感, 頭痛で発病し, 6~12時間以内に悪寒を伴った発熱が出現する予後の良い自然治癒性の「ポンティアック熱型」および不顕性感染に大別される<sup>3)</sup>。欧米では冷却搭水が原因の事例が散見されるが, わが国では1981年に最初の1症例が報告され, その後, 温泉やサウナ風呂での感染者および1大学病院小児科病棟の新生児の感染が明らかとなる一方, 最近では, いわゆる24時間風呂における本菌の高い汚染実態が明らかになり, 本菌による感染症予防の機運が

高まっている<sup>4)</sup>。

今回は, 県生活衛生課の依頼を受けて, 1997年から1998年にかけて特定建築物の冷却搭水等のレジオネラの汚染実態調査を行ったのでその概要を報告する。

### 2. 材料と方法

1997年8月から1998年11月にわたり, 青森県内の特定建築物および老人施設の冷却搭水54施設, 給湯水30施設, 旅館又は公衆浴場の温泉水36施設の合計120施設について検査を行った。検体の採取は各施設の所轄保健所が行った。

検査法は厚生省生活衛生局監修「レジオネラ症防止指針」による他, 遺伝子学的手法も用いた<sup>5)</sup> (図1)。まず, 検水200mlを冷却遠心し (6000rpm 30分), 上清を除去して沈渣に1mlの精製水を加えて200倍濃縮液とした。次に, この濃縮液に同量 (1ml) の0.2M HCl・KCl緩衝液 (pH2.2) を加え, 25°Cで4分間酸処理を行い, その処理液100μlをWYO<sub>a</sub>寒天培地 (栄研社) に塗布して, 37°Cで3~7日間培養した。レジオネラと思われるコロニー (灰白色湿潤集落) を鈎菌し, B-CYE<sub>a</sub>寒天培地 (栄研社) と5%ヒツジ血液寒天培地 (栄研社) に塗布し, 後者に発育しない菌を市販の抗血清を用いて, 凝集反応により菌種を同定した<sup>6, 7)</sup>。同定できないものは, ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR法) によりレジオネラ属と*L. pneumophila*の確認を行った<sup>8)</sup>。PCRに用いたプライマーは表1のとおりである。

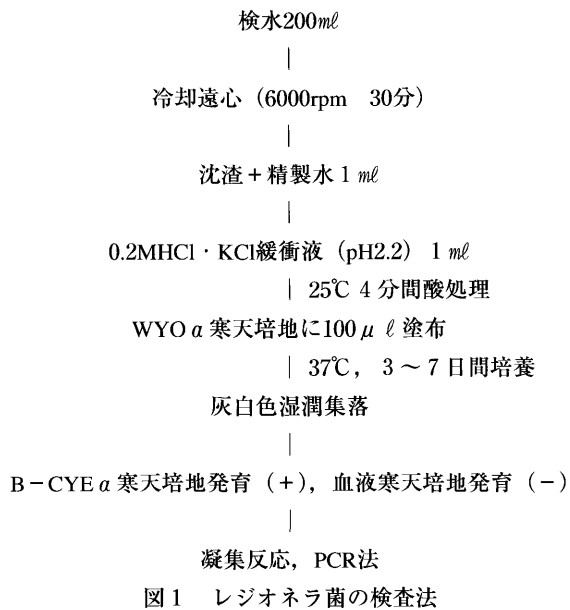


表1 *Legionella* spp.検出・同定用のDNAプライマーの塩基配列

LPプライマー: (Stranbach, et al.)	
LPA 5'	-GTCATGAGGAATCTCGCTG-3'
LPB 5'	-CTGGCTTCTTCCAGCTTCA-3'
増幅塩基数	800bp
検出対象	<i>L. pneumophila</i> chromosome DNA
LEGプライマー: (Yamamoto, et al.)	
LEG 448A 5'	-GAGGGTTGATAGGGTAAGAGC-3'
LEG 854B 5'	-CGGTCAACTTATCGCGTTTGCT-3'
増幅塩基数	400bp
検出対象	genus <i>Legionella</i> 16S ribosomal DNA
山本啓之: 日本臨床, 50, 394-399, 1992	

### 3. 結 果

#### 3. 1 レジオネラの検出率

青森県内の1997年, 1998年における冷却搭水, 温泉水, 給湯水等と施設別の検出率を表2に示した。冷却搭水は, 特定建築物からの検出率はそれぞれ41.7%, 22.2%で, 病院又は老人施設は1998年のみ16.7%で, 給湯水からは検出されなかった。温泉旅館や公衆浴場の温泉水等からはそれぞれ25.0%, 25.0%であった(表2)。

#### 3. 2 レジオネラ検出状況

「レジオネラ症防止指針」には検出菌数の意義付けが具体的な数値によって示されており, これを基に今回の成績を示すと, 「望ましい範囲」にあるものは, 1997年は全検体の78.2%, 1998年は91.8%であり, 「要観察範囲」はそれぞれ7.7%, 4.1%, 「要注意範囲」は14.1%, 4.1%であり, 「要緊急処置範囲」は認められなかった(表3)。

表2 検水・施設別のレジオネラ菌検出率

		冷却搭水	温泉水	給湯水
特定建築物	1997	41.7(15/36)		0
	1998	22.2(4/18)		0
病院又は老人施設	1997	0		0
	1998	16.7(3/18)	0	0
温泉旅館又は公衆浴場	1997		25.0(3/12)	
	1998		25.0(6/24)	
検体数	1997	36検体	12検体	30検体
	1998	18検体	24検体	7検体

数字は%, ( )内は陽性検体数/検体数

表3 レジオネラ検出状況

レジオネラ症防止指針の基準	レジオネラ生菌数 (CFU/d l)	検体数 ( )内は%
望ましい範囲	1997	<1×10 <sup>2</sup> 61 (78.2)
	1998	45 (91.8)
要観察範囲	1997	1×10 <sup>2</sup> ~ 6 (7.7)
	1998	<1×10 <sup>3</sup> 2 (4.1)
要注意範囲	1997	1×10 <sup>3</sup> ~ 11 (14.1)
	1998	<1×10 <sup>5</sup> 1 (4.1)
要緊急処置範囲	1997	1×10 <sup>5</sup> ≤ 0
	1998	0
合 計	1997	78 (100)
	1998	49 (100)

( )内は%

#### 3. 3 検出されたレジオネラの菌種

分離レジオネラの菌種と菌株数は表4に示した。1997年は冷却搭水から*L. pneumophila* 1群が14株 (93.3%), 6群が1株, 温泉水等から*L. pneumophila* 1群1株, 3群2株, 4群1株, 5群1株, その他のレジオネラ1株, そして給湯水からは検出されなかった。

1998度は, 冷却搭水から*L. pneumophila* 1群が5株 (71.4%), 前年未検出の*L. bozemanii*, *L. micdadei*もそれぞれ1株検出され, 温泉水からは, *L. pneumophila* 3群, 4群, 6群, その他のレジオネラ各1株, 5群3株が検出された。給湯水からは検出されなかった。

### 4. 考 察

レジオネラは自然界の土壌や湖沼, 河川などの淡水に広く生息しているが, 一旦, 貯水槽, 貯湯槽, 給湯機, 循環式温浴槽, 水冷式冷却搭などの人工水環境に入り込まれた場合には, 自然界よりも菌数が多くなる。国内のレジオネラ生息調査における検出率は, 空調冷却搭水が1986年から1996年まで13.0%~91.0%, 24時間風呂浴槽水では72.5%あるいは83.5%, 温泉浴槽水では62.2%と



表4 分離されたレジオネラの菌種と菌検数

		冷却搭水	温泉水等	給湯水
<i>L.pneumophila</i>	1997	14 (93.3)	1 (16.7)	0
	1998	5 (71.4)	0	0
1群	1997	0	0	0
	1998	0	0	0
2群	1997	0	2 (33.4)	0
	1998	0	1 (14.3)	0
3群	1997	0	1 (16.7)	0
	1998	0	1 (14.3)	0
4群	1997	0	1 (16.7)	0
	1998	0	3 (42.8)	0
5群	1997	1 (14.3)	0	0
	1998	0	1 (14.3)	0
6群	1997	0	0	0
	1998	1 (14.3)	0	0
<i>L.bozemanii</i>	1997	0	0	0
	1998	1 (14.3)	0	0
<i>L.micdadei</i>	1997	0	0	0
	1998	1 (14.3)	0	0
<i>L.gormanii</i>	1997	0	0	0
	1998	0	0	0
<i>L.dumoffii</i>	1997	0	0	0
	1998	0	0	0
その他の レジオネラ	1997	0	1 (16.7)	0
	1998	0	1 (14.3)	0
合計	1997	15 (41.7)	6 (25.0)	0
	1998	7 (38.9)	7 (25.0)	0

( )内は%

いずれも高率な汚染を示している。この高い汚染率にもかかわらず、国内ではヒトの感染事例はまれで、しかも感染者の多くが高齢者、乳幼児、あるいは何らかの基礎疾患を有しているため、日和見感染症の様相を呈し、一般の健康成人での感染は考えにくいと思われる。

今回の調査で初めて本県におけるレジオネラ汚染の一端が明らかになった。幸いなことに、本県ではヒトからのレジオネラ分離は報告されていないが、今後ともレジ

オネラの生息状況並びに感染動向に注意を払うと共に、高齢者施設や病院等、易感染者の多い施設においては人工水環境からのレジオネラ防除に努める必要があると思われる。

## 5. ま と め

1997年から1998年にかけて特定建築物の冷却搭水等のレジオネラの汚染実態調査を行った。その結果、冷却搭水は、特定建築物からの検出率は32.0%で、病院又は老人施設からは1998年のみ16.7%で、給湯水からは検出されなかった。温泉旅館や公衆浴場の温泉水からは25.0%であった。本県ではヒトからのレジオネラ分離は報告されていないが、今後ともレジオネラの生息状況並びに感染動向に注意を払うと共に、高齢者施設や病院等、易感染者の多い施設においては人工水環境からのレジオネラ防除に努める必要があると思われる。

## 文 献

- 1) 藪内英子：レジオネラ属菌の菌種最近の情報。臨床と微生物，25，11-16，1998
- 2) 宮本比呂志，他：レジオネラ属菌の菌種・菌株による病原性の差異。臨床と微生物，25，17-23，1998
- 3) 小出道夫，他：レジオネラ症。臨床検査，42，523-528，1998
- 4) 宮良高雄，他：レジオネラ症の現状，医学のあゆみ，185，273-276，1998
- 5) 財団法人ビル管理教育センター（厚生省企画課監修）：「レジオネラ防止指針」。初版，1-52，東京，1994
- 6) 杉山明，他：レジオネラ症。三重県衛研年報，42，45-51，1996
- 7) 藪内英子：Legionella pneumophilaとその類似菌の検査法。検査と技術，8，779-785，1980
- 8) 山本啓之：PCR法によるLegionella属最近の検出・同定。日本臨症特別号，50，394-399，1992

## 食品の食中毒菌汚染実態調査

筒井 理華 対馬 典子 大友 良光

### Survey on Food Poisoning Bacteria in Vegetables and meat

病原菌汚染食品を排除し、細菌性食中毒の未然防止対策を図るため、厚生省の研究事業の一環として行われている全国的な事業に参加し、食品の食中毒汚染実態調査を実施した。青森県内の有機栽培、水耕栽培により主として生食に供されている野菜10品目100検体、食肉関係としてはレバー24検体、ミンチ肉26検体の合計150検体について、腸管出血性大腸菌O157、大腸菌 (*E. coli*)、サルモネラ (*Salmonella*) の3項目について検査した。その結果、*E. coli*は野菜と食肉それぞれ11検体 (7.3%)、49検体 (32.7%) から検出されたが、腸管出血性大腸菌血清型O157は検出されなかった。サルモネラは血清型*S. Typhimurium*がミンチ肉から1検体検出された。これら汚染が明らかになった食品については生産から販売までの徹底した微生物汚染防止が必要と考えられた。

Key words : Tainted food, STEC O157, *E. coli*, *Salmonella*, Immune magnetic beads method

#### 1. はじめに

1998年、厚生省は病原性菌汚染食品を排除し、細菌性食中毒の未然防止対策を図るため、研究事業の一環として、全国の中央卸市場を管轄する都道府県中20自治体 (北海道、札幌市、青森県、岩手県、千葉県、千葉市、東京都、神奈川県、川崎市、横浜市、大阪府、大阪市、奈良県、山口県、徳島県、香川県、福岡県、北九州市、福岡市、沖縄県) を選定し、これらの地域の衛生研究所を検査機関として食品の食中毒汚染実態調査を実施することとなり、本県では当センターが県生活衛生課からの検査依頼業務として実施した。

#### 2. 方 法

##### 2. 1 検体の種類と数

1998年8月から12月にわたり、野菜10品目100検体、食肉2品目50検体の合計150検体を採取した。野菜については、青森県内で有機栽培あるいは水耕栽培により生産され、主として生食に供されているものを対象とした。その種類は、ダイコン10検体、ニンジン10検体、キャベツ10検体、ネギ10検体、レタス10検体、キュウリ10検体、トマト10検体、タマネギ10検体、カイワレ10検体、サニーレタス4検体、三つ葉3検体、サラダ菜1検体、クレソン1検体、ひまわり菜1検体であった。食肉はミンチ肉26検体、生食用と称して販売されている牛レバー24検体であった。以上の検体について、腸管出血性大腸菌O157、*E. coli*、*Salmonella*の3項目の検査を行った。

##### 2. 2 検査方法

腸管出血性大腸菌O157については、「腸管出血性大腸菌O157の検査法について」(平成9年7月4日衛食第207号、衛乳第199号厚生省生活衛生局食品保健課長、乳肉衛生課長通知)に基づいて実施した。ノボピオシン加mEC225ml (極東) に検体25gを加え、15秒間ストマッカー処理して、35℃18時間培養し、直接CT-SMAC (日水) とBCM培地 (栄研社) に塗抹する方法と、免疫磁気ビーズ法 (培養液1ml使用、ベリダス) を行ってから培地に塗抹する方法で行った。それぞれ2種類の培地に塗抹後、35℃20~24時間培養し、典型的集落をTSI斜面 (栄研社)、CLIG斜面 (極東)、HI寒天平板 (DIFCO) 等で鑑別同定後、O157凝集反応による血清型別を行った (図1)。

次に、*E. coli*については、ノボピオシン加mEC225mlに検体25gを接種し、35℃18時間培養した。その増菌した培養液1mlをダーラム管入りEC培地 (栄研社) 10mlに接種し、44.5℃で20~24時間培養後、ガスの発生の有無により判定した (図1)。

*Salmonella*については、BPW (関東化学) 225mlに検体25gを加え、36℃で20~24時間培養後、その0.5mlをRVブイヨン (関東化学) 10mlに接種し、42℃で20~24時間培養した。菌分離は免疫磁気ビーズ法 (ダイアヤトロン) により集菌後行った。まず、チューブに培養液10mlと免疫磁気ビーズ30μlを加え、ゆっくり回転させながら10分間反応させ、反応後、チューブを磁気スタンドにセットして5分間磁気ビーズを管壁に集めた後、磁気スタン

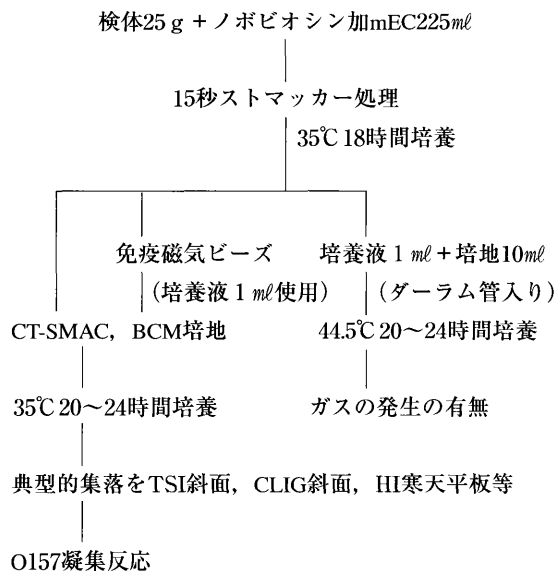


図1 腸管出血性大腸菌O157及びE. coli検査法

ドにセットしたまま上澄を除去し、ビーズキット付属品の洗浄緩衝液10mlを加えて懸濁液を作製した。これを2種類の培地(MLCB関東化学, BGS関東化学)に塗抹後、36°Cで18時間培養した。培養後、典型的集落をTSI斜面, LIM高層(関東化学), HI寒天平板等で鑑別同定後、血清型別するなど従来の方法で同定した。また、典型的集落ではないがサルモネラが疑われた場合には生化学的試験を行った(図2)。



図2 Salmonella検査法

### 3. 結 果

野菜100検体中11検体(キュウリ1, レタス2, ニンジン2, ダイコン1, サニーレタス3, カイワレ1, ひまわり菜1検体)からE. coliが検出された。

食肉50検体中E. coliが49検体(レバー24, ミンチ肉25)から, Salmonellaが1検体(ミンチ肉)からS. Typhimurium検出された。腸管出血性大腸菌O157は全て陰性であつ

表1 青森県の野菜・食肉からの菌検査成績

検体の種類	検体数	O157	E. coli	Salmonella
<b>野 菜</b>				
ダイコン	10	0	1	0
ニンジン	10	0	2	0
キャベツ	10	0	0	0
ネギ	10	0	0	0
レタス	10	0	2	0
キュウリ	10	0	1	0
トマト	10	0	0	0
タマネギ	10	0	0	0
カイワレ	10	0	1	0
サニーレタス	4	0	3	0
三つ葉	3	0	0	0
サラダ菜	1	0	0	0
クレソン	1	0	0	0
ひまわり菜	1	0	1	0
<b>食 肉</b>				
ミンチ肉	26	0	25	1
レバー	24	0	24	0
合計	150	0	60	1

数字は陽性検体数

た(表1)。

### 4. 考 察

今回の調査ではいずれの検体からも腸管出血性大腸菌血清型O157は検出されなかったが、主に生食に供される野菜の11検体(7.3%),そして原材料の食肉の49検体(32.7%)から大腸菌(E. coli)が検出された。先にまとめられた全国的な検査成績<sup>1)</sup>でも全検体数2,947検体中大腸菌は、野菜が756検体(25.7%)及び食肉が610検体(20.7%)と高い汚染が認められ、食肉2検体から腸管出血性大腸菌血清型O157も検出されている。また、サルモネラについての全国調査成績では、野菜4検体(0.1%)及び食肉45検体(1.5%)から多種類の血清型菌が検出されている。本県ではミンチ肉1検体からサルモネラS. Typhimuriumが検出されている。これら原材料の汚染が直接食中毒に結びつくわけではないが、食品として提供する際には、野菜にあつては十分な洗浄による除菌あるいは菌の増殖防止を徹底するとともに、食肉においては十分な加熱処理が必要であることを示している。また、これらの汚染食品からの他の食品への相互汚染防止にも努める必要がある。特に、S. Typhimuriumが検出された食肉については、販売店における品質管理あるいはその出荷先における衛生管理の徹底が求められる。

近年、腸管出血性大腸菌血清型O157による感染症の

発生、あるいはサルモネラ食中毒の急増に伴い、それらの原因食品の原材料として使用される処理工程中に殺菌や滅菌工程を持たない生野菜及び食肉の細菌汚染が問題となっている。今回は全国的規模の調査の一環として本調査を行ったが、今後、様々な食品について各種の病原微生物汚染実態を調査し、食中毒防止の資料にする必要があると考えている。

## 5. ま と め

厚生省の「食品の食中毒菌汚染実態調査」の一環として、主として生食に供される野菜や、食肉について、それぞれ、腸管出血性大腸菌O157, *E. coli*, *Salmonella*の3項目の検査を行い、それについて考察した結果、次の

ようなことが判明した。

- ① *E. coli*は、野菜100検体中1検体から、食肉50検体中49検体から検出された。
- ② *Salmonella*はミンチ肉1検体から検出された。
- ③ 腸管出血性大腸菌O157は不検出であった。
- ④ 汚染が判明した食品の生産から販売までの衛生管理の必要性が考察された。

## 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課：平成10年度食品中の食中毒汚染実態調査報告について。  
平成10年3月31日

# GPCクリーンアップを用いたカーバメート系農薬の 迅速一斉分析法の検討

清水 友敬 中谷 実 三浦 啓徳 高橋 政教

## Studies on Analytical Methods for N-methyl-carbamate Pesticides GPC Clean-up

食品衛生法改正に伴う規制対象農薬および農産物の増加に対応するため、窒素系・有機リン系・有機塩素系・ピレスロイド系等の残留農薬分析について、抽出からクリーンアップまでの操作を一本化しGPC（ゲル浸透クロマトグラフ）クリーンアップを用いることで、操作の簡略化が図られた。これに対し、カーバメート系農薬については、近年その有害性が指摘されているジクロロメタン分配を試験方法として用いている。そこで、カーバメート系農薬についてもGPCクリーンアップ法の適用について検討を行なった。その結果、りんご、長いも、玄米において6種のカーバメート系農薬について多成分スクリーニング法として十分適用できるものであった。

Key words : gel permeation chromatography, simultaneous analysis, N-methyl-carbonate

### 1. はじめに

農薬の規格基準が平成4年以降順次改正され、現在では130種類以上の農産物について約200種類の農薬が設定されている。

このような多くの農薬を検査するためには簡易で迅速な多成分一斉分析法が必要である。窒素系・有機リン系・有機塩素系・ピレスロイド系農薬については、農薬の系統毎に異なっている抽出法を一本化しGPC（ゲル浸透クロマトグラフ）クリーンアップを用いることで、操作の簡略化をはかっている<sup>1-5)</sup>。

これに対し、カーバメート系農薬については、近年その有害性が指摘されているジクロロメタン分配によるクリーンアップ法を用いている。

そこで、カーバメート系農薬についてもGPCクリーンアップによる前処理法が適用可能かどうか検討を行なった。その結果、若干の知見を得たので報告する。

### 2. 方 法

#### 2・1 試 料

玄米、りんご、長いもの3種類を用いた。

#### 2・2 試 薬

##### (1) 農薬標準品

オキサミル、アルジカルブ、ベンダイオカルブ、エチオフェンカルブ、カルバリル、フェノブカルブ、メチオカルブ：和光純薬(株)の残留農薬試験用

##### (2) 農薬標準溶液

各農薬について1000ppmアセトニトリル溶液を調製し、これらを標準原液とした。検量線用標準溶液は、各農薬の濃度が0.05ppm, 0.1ppm, 0.5ppm, 1.0ppmになるように混合し、アセトニトリルで希釈して調整した。

また、添加回収試験には、1.0ppm検量線用標準溶液を使用し、その1mlを添加した。

##### (3) 各種有機溶剤：和光純薬(株)の残留農薬試験用

##### (4) 無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム：和光純薬(株)の残留農薬試験用

##### (5) 水酸化ナトリウム、ホウ酸：和光純薬(株)のアミノ酸自動分析用

##### (6) o-フタルアルデヒド (OPA)：和光純薬(株)の生化学用

##### (7) β-メルカプトプロピオン酸：和光純薬(株)

##### (8) ろ過助剤 (セライト545)：和光純薬(株)

##### (9) 多孔性ケイソウ土カラム：バリアン社製ケムエルー ト (CE1020) 容量20ml

#### 2・3 装 置

##### (1) GPC装置

島津製作所(株)製 LC-10A

検出器：UV検出器 SPD-10AV

カラム：Shodex社製 CLN Pak EV-2000

##### (2) 高速液体クロマトグラフ

島津製作所(株)製 LC-10A

検出器：蛍光検出器 RF-10A  
 化学反応槽：CRB-6A  
 カラム：Shodex社製 RS Pak CARB-413

## 2・4 試料溶液の調整法

図1に分析のフローを示した。

### (1) 抽出法

均一化した20gをとりアセトン・酢酸エチル・n-ヘキサン（以下ヘキサン）（2：9：9）混液を100ml加えバイオトロンで1分間ホモジナイズした後、無水硫酸ナトリウム80gを加え3分間ホモジナイズし、セライト4gを積層したロートで吸引ろ過し、抽出液とした。残留物を同液60mlで洗浄し抽出液にあわせ、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、窒素気流下で乾固した。これをアセトン・シクロヘキサン（1：3）混液で3mlに定容し、遠心分離を行ない上澄液を得た。

なお、玄米についてはCPCカラムへの負担を避けるために試料10gを用い、蒸留水10mlを加えて2時間放置してから同様の抽出操作を行なった。

### (2) GPCによるクリンアップ操作

上記上澄液2.5mlをGPCカラムに注入し、溶出溶媒はアセトン・シクロヘキサン（1：3）混液を用い、流量は4ml/minとした。最初の溶出液60mlを廃棄し、次の溶出液90mlを分取した。

分取した溶液はロータリーエバポレーターで減圧濃縮し窒素気流下で乾固した後、2mlに溶解して0.45μmメンブランフィルターでろ過した後、HPLC分析を行なった。

## 2・5 HPLC条件<sup>6)</sup>

カラム温度：40℃  
 検出器：蛍光（励起波長340nm，蛍光波長450nm）  
 試料溶液注入量：10μl  
 移動相：アセトニトリル，水  
 グラジェント条件：表1による  
 移動相流量：0.8ml/min  
 反応液Ⅰ：0.05M NaOH  
 反応液Ⅱ：（NaOH 0.363g + ホウ酸6.676g）/水800ml + OPA30mg/アセトニトリル100ml + β-メルカプトプロピオン酸22μl  
 反応液流量：各0.4ml/min  
 反応槽温度：90℃

表1 HPLCのグラジェント条件

時間 (min)	アセトニトリル	水
5.0	20	80
10.0	40	60
35.0	40	60
35.5	20	80

試料20g（玄米10g）

（玄米については水10mlを加えて2時間放置）  
 アセトン・酢酸エチル・ヘキサン（2：9：9）  
 100ml  
 1分間ホモジナイズ  
 無水硫酸ナトリウム80g  
 3分間ホモジナイズ

吸引ろ過：残留物をアセトン・酢酸エチル・ヘキサン（2：9：9）60mlで洗浄

ろ液  
 濃縮  
 アセトン・シクロヘキサン（1：3）で3mlに定容  
 遠心分離（3000rpm，5分間）

GPCカラム（2.5ml注入）

アセトン・シクロヘキサン（1：3）溶出液60ml廃棄  
 アセトン・シクロヘキサン（1：3）溶出液90ml分取  
 溶媒除去（窒素ガス）  
 アセトニトリル2mlに溶解  
 メンブランフィルター（0.45μm）

HPLC

図1 カーバメート系農薬一斉分析法

## 3. 結果及び考察

### 3・1 試験方法の検討

#### (1) GPC溶出条件の検討

溶出溶媒はアセトン・ヘキサン（1：3）混液を用い、その流量を4ml/minとしてカーバメート系農薬について溶出試験を行なった。その結果を表2に示す。各農家とも60mlから100mlの画分で溶出した。主な妨害物質である油は60mlまで溶出しており、60～150mlまでは特に妨害物質の溶出はなかった。また、窒素系，有機リン系，有機塩素系，ピレスロイド系農薬の場合、60～150mlの範囲で分取している。将来的には他の農薬を含めた一斉分析法についても考えており、60～150mlの画分を分取することにした。

#### (2) 脱水方法の検討

カーバメート系以外の農薬では脱水にケイソウ土カラムを用いている。そこで、まずカーバメート系農薬へのケイソウ土カラムの適用について検討を行なった。蒸留水20mlに1.0ppm標準溶液1ml，塩化ナトリウム6gを加え10分間放置した後，酢酸エチルで溶出し，50ml毎の

表2 GPC溶出試験結果

農 薬 名	溶出画分 (ml)
オ キ サ ミ ル	70~100
ア ル ジ カ ル プ	70~ 90
ベンダイオカルブ	70~100
エチオフェンカルブ	70~ 90
カ リ バ リ ル	80~100
フェノブカルブ	60~ 80
メ チ オ カ ル プ	70~ 90

農薬溶出量を求めた。その結果を表3に示す。オキサミル、ベンダイオカルブ、カルバリル、フェノブカルブは50ml画分までにはほぼ溶出し終えたが、アルジカルブ、エチオフェンカルブ、メチオカルブの3種類はほとんど溶出しなかった。また、オキサミルの回収率は166%と高く、ケイソウ土カラムからなんらかの妨害物質が溶出したと考えられる

そこで脱水方法として無水硫酸ナトリウム<sup>7)</sup>を使用することにした。今回検討した農産物の中で一番水分含有量が多いりんご20gに50~150gの無水硫酸ナトリウムを加え、使用量を検討した。その結果、80gで十分な脱水を行なうことができた。

### (3) 抽出溶媒の検討

無水硫酸ナトリウムを脱水に使用するので、抽出溶媒

は疎水性溶媒であるヘキサン、酢酸エチルを用いることにした。また、HPLCの移動相はアセトニトリル・水(37:63)混液を使用した。それ以外の条件は図1と同様である。検体は今回使用した農産物の中で最も妨害物質の少ない長いもを用いた。各溶媒で抽出した結果を表4に示す。ヘキサン及び酢酸エチルで抽出したところ、各農薬とも回収率は51%未満であった。そこで親水性溶媒であるアセトン<sup>7)</sup>を加えることにした。アセトン・ヘキサン・酢酸エチル(2:9:9)混液で抽出したところ、妨害ピークが重なりオキサミルの回収率が少し高かったが、エチオフェンカルブを除く6種類について十分な回収率が得られた。エチオフェンカルブの回収率が低いのは、抽出・ホモジナイズ時に酸化したことが原因であると考えられる。

### (4) HPLC条件の検討

アセトニトリル・水(37:63)混液をHPLCの移動相として用いた場合、オキサミルのピークに妨害ピークが重なりオキサミルの回収率が120%以上となった。そこで移動相について検討した結果、2・5のHPLC条件における移動相組成を用いることで妨害ピークとの重なりが見られなくなった。

### 3・2 添加回収試験

りんご、長いも、玄米に1.0ppm標準溶液1mlを加え、図1に示す方法により操作し各農薬の添加回収率を求め

表3 ケイソウ土カラム溶出試験結果

農 薬 名	溶出画分 (ml)				合計 (%)
	50	100	150	200	
オ キ サ ミ ル	160.0	6.0	0.0	0.0	166.0
ア ル ジ カ ル プ	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ベンダイオカルブ	95.6	5.8	0.0	0.0	101.4
エチオフェンカルブ	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
カ ル バ リ ル	106.8	6.0	0.0	0.0	112.8
フェノブカルブ	88.7	3.6	0.0	0.0	92.3
メ チ オ カ ル プ	5.9	0.0	0.0	0.0	5.9

表4 各抽出溶媒を用いた場合の、長いもにおける添加回収率

農 薬 名	回 収 率 (%)		
	酢酸エチル	ヘキサン	アセトン・酢酸エチル・ヘキサン(2:9:9)
オ キ サ ミ ル	0.0	30.3	126.2
ア ル ジ カ ル プ	37.2	35.4	79.1
ベンダイオカルブ	47.3	50.5	83.9
エチオフェンカルブ	9.0	16.9	37.4
カ ル バ リ ル	44.9	49.4	82.5
フェリブカルブ	40.2	50.4	79.5
メ チ オ カ ル プ	47.9	48.9	81.0

表5 カーバメート系農薬の、実試料における添加回収率

農薬名	回収率 (%)		
	りんご	長いも	玄米
オキミサル	96.0	84.1	86.2
アルジカルブ	84.3	74.3	86.1
ベンダイオカルブ	97.0	82.4	92.9
エチオフェンカルブ	0.0	14.8	15.9
カルバリル	113.1	86.7	89.5
フェノブカルブ	95.7	75.8	87.2
メチオカルブ	95.6	102.1	89.2

た。結果を表5に示す。りんご、長いも、玄米ともエチオフェンカルブの回収率は低く20%未満であったが、それ以外の6種類の農薬については70%以上の高い回収率が得られた。

本法による定量下限値は、各農薬ともりんご、長いもで0.006ppm、玄米で0.012ppmであり、エチオフェンカルブを除く6種類のカーバメート系農薬(オキサミル、アルジカルブ、ベンダイオカルブ、カルバリル、フェノブカルブ、メチオカルブ)については、日常分析に用いる多成分一斉分析法として十分有用な方法であると考えられる。

今後は、他の農薬(窒素系、有機リン系、有機塩素系、ピレスロイド系農薬)を含めた多成分一斉分析法について検討する予定である。また、定量下限値はジクロメタン分配による方法では0.005ppmであるが、本法では玄米について0.012ppmとなっており、検出感度の向上が必要である。

#### 4. ま と め

- (1) 食品衛生法で残留基準が告示された7種類のカーバメート系農薬についてGPCクリーンアップを用いた多成分一斉分析法の検討を行なった。
- (2) GPCクリーンアップを用いることで、近年有害性が指摘されているジクロメタンを用いた分配操作を行なう必要がなくなった。

- (3) りんご、長いも、玄米を用い、本法による添加回収試験を行なった結果、エチオフェンカルブを除くカーバメート系農薬6種類(オキサミル、アルジカルブ、ベンダイオカルブ、カルバリル、フェノブカルブ、メチオカルブ)について、70%以上の回収率が得られた。
- (4) 以上の結果から、GPCクリーンアップを用いた本法は日常分析に用いる多成分一斉分析法として十分適用可能であると考えられる。
- (5) 今後は、他の農薬(窒素系、有機リン系、有機塩素系、ピレスロイド系農薬)を含めた多成分一斉分析法について検討する予定である。また、従来法に比べ玄米の定量下限値が低いので、検出感度の向上が必要である。

#### 5. 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局長通知：残留農薬分析法，衛化第43号，平成9年4月8日。
- 2) 古川章子，他：GPCクリーンアップ法を用いた食品中の残留農薬分析法の検討，青森県環境保健センター研究報告，6，35-45，1995。
- 3) 古川章子，他：GPCクリーンアップ法を用いた食品中の残留農薬分析法の検討(2)，青森県環境保健センター研究報告，7，14-20，1996。
- 4) 小川正彦，他：ゲル浸透クロマトグラフ(GPC)を用いた農産物中の残留農薬迅速一斉分析法，三重県衛生研究所年報，41，93-108，1995。
- 5) 残留農薬迅速分析法開発検討委員会：残留農薬迅速一斉分析法の解説，食品衛生研究，47，27-41，1997。
- 6) 農薬残留分析法研究班：農薬残留分析法，686-687，1995。
- 7) 小川正彦，他：GPC及びGC/MS-SIMを用いた残留農薬の迅速一斉分析，食品衛生学雑誌，Vol.38，48-61，1997。



### Ⅲ 他誌投稿抄録

## 他誌投稿抄録

### Farewell to bacterimia caused by endoscopic injection-effectiveness of a new injection catheter with a covered tip.

Y. Uno<sup>1</sup>, A. Munakata<sup>1</sup>, Y. Ohtomo : Gastrointestinal Endosc, 47 (6), 523-525, 1998.

内視鏡注射による患部あるいは吸引液の細菌汚染を防ぐため、注射針の先端をゴムでカバーした器具 (Clicio needle) を考案した。本器具と従来の器具を用い10例の臨床試験を行い、使用済みの針部における大腸菌及び一般生菌数を測定した結果、本器具は従来のものに比し高率に細菌汚染を防ぐことが出来た。

1 : 弘前大学医学部第一内科

### 鶏卵が関与したサルモネラ食中毒と疫学 竹内正子<sup>1</sup>, 原田邦弘<sup>2</sup>, 小田桐和枝<sup>2</sup>, 大西良雄<sup>2</sup>, 竹内重正<sup>2</sup>, 大友良光 : 食品衛生研究, 48, (10), 59-67, 1998.

1996年3月と4月に発生した2件のサルモネラ・インフアンティスおよび1例のサルモネラ・エンテリティディス集団食中毒に関連し、その感染源調査により、原因施設の農場まで確認することが出来た。

1 : 八戸保健所

2 : 十和田食肉衛生検査所

### *Yersinia pseudotuberculosis*感染症集団発生 大友良光 : 平成9年度厚生省科学特別研究「地衛研の連携による危機的健康被害の予知及び対応システムに関する研究」, 大阪府立衛生研究所発行・編集, 167-170, 1998.

1991年6月5日、青森県上北郡野辺地町で学校給食を原因とする推定患者数732名*Yersinia pseudotuberculosis*血清型5a菌による集団感染症が発生した。これに関連し、地研、行政、そして国研との連携の状況、また事例の教訓、今後の課題・問題点について検討した。

### 地方衛生研究所と国立試験研究機関との共同研究の推進に関する意見・提言 大友良光 : 平成9年度厚生科学特別研究「地方衛生研究所と国立衛生研究機関との機能分担・機能連携の在り方に関する研究」, 群馬県衛生環境研究所編集・発行, 43-44, 1998.

地方衛生研究所研究員の教育研修の促進による人的交流を促進し、地方衛生研究所の研究者が共同研究に専念できるような業務環境の整備のもとに、テーマごとに双方の研究者の一時的な人事交流による共同研究が必要と

思われる。

腸炎エルシニア血清型O8菌感染症の予防に関する研究 大友良光, 八柳潤<sup>1</sup>, 荒井富雄<sup>2</sup>, 村山尚子<sup>3</sup> : 平成9年度厚生科学特別研究「複数の県・市からなる地方の広域的保健衛生活動における県・市相互間強調体制の確立とその中における地方衛生研究所の役割に関するモデル研究」, 山形県衛生研究所編集・発行, 13-15, 1998.

エルシニア感染のうち特に腸炎エルシニア (*Yersinia enterocolitica*) 血清型O8感染症の予防を目的に、国内における分離状況及び分離菌の病原性を検討した。これまで国内では青森県の津軽地区に見られていたが、本調査により東北地方の秋田県、山形県、福島県にも患者が見られることが判明した。感染源はすべて不明であった。

1 : 秋田県衛生科学研究所

2 : 宮城県保健環境センター

3 : 山形県衛生研究所

### Identification of glutathione S-transferase p-1 and p-2 as the class pi from dominantly expressed in mouse hepatic adenomas. K. Ookawa<sup>1</sup>, H. Nakano<sup>1</sup>, I. Kakizaki<sup>1</sup>, I. Hatayama, H. Kano<sup>1</sup>, J. Kimura<sup>1</sup>, M. Hayakari<sup>1</sup>, T. Takahata<sup>1</sup>, K. Satoh<sup>1</sup> and S. Tsuchida<sup>1</sup> : Jpn. J. Cancer Res., 89, 641-648, 1998.

マウスの肝前癌病変における2つのPiクラス glutathione S-transferase (GST p-1とp-2) の遺伝子発現をnoerhern hybridizationとRT-PCRで調べた。P-1の発現が正常マウス肝では主体であったが、雄が雌の約10倍高かった。雄の前癌病変ではp-1は減少するのに対し、雌では増加するため、雌雄の前癌病変におけるp-1の発現量は同程度になった。この結果は、正常組織における遺伝子発現の性差は発癌過程において消失していくことを示唆する。

1 : 弘前大学医学部第二生化学

### A novel KIT gene missense mutation in a Japanese family with Piebaldism K. Nomura<sup>1</sup>, T. Narita<sup>2</sup> and I. Hatayama : J. Invest. Dermatol., 111, 337-338, 1998.

遺伝性Piebaldismの原因遺伝子であるKITの制限酵素 Pma CIを用いたPCR-RFLPおよびPCR sequencingから8447番目の塩基A→C transitionを持つ家系を見つけた。この変異はコドン847のスレオニンからプロリンへの置換であり、この部位におけるKIT遺伝子の突然変異は初

めての報告である。

- 1：青森県立中央病院皮膚科
- 2：むつ総合病院病理部

## IV 学会等発表抄録

## 学会等発表抄録

**Expression and function of pi class glutathione transferase in mouse neoplastic lesions.** S. Tsuchida<sup>1</sup>, H. Nakano<sup>1</sup>, K. Ookawa<sup>1</sup>, I. Kakizaki<sup>1</sup>, I. Hatayama, T. Takahata<sup>1</sup>, J. Kimura<sup>1</sup>, M. Hayakari<sup>1</sup> and K. Satoh<sup>1</sup>: 第2回弘前国際医学フォーラム・分子医学シンポジウム, 弘前市, 1998, 7, 7.

(要旨省略: 本誌他誌投稿「Identification of glutathione S-transferase p-1 and p-2 as the class pi form dominantly expressed in mouse hepatic adenomas」参照)

1: 弘前大学医学部第二生化学

**A novel KIT gene missense mutation in a Japanese family with Piebaldism.** K. Nomura<sup>1</sup>, T. Kaneko<sup>1</sup>, M. Shiraiishi<sup>1</sup>, T. Narita<sup>2</sup> and I. Hatayama: 第2回弘前国際医学フォーラム・分子医学シンポジウム, 弘前市, 1998, 7, 7.

(要旨省略: 本誌他誌投稿「A novel KIT gene missense mutation in a Japanese family with Piebaldism」参照)

1: 青森県立中央病院皮膚科

2: むつ総合病院病理部

**Phenobarbitalのマウス肝c-JUN誘導に対するclofibrateの抑制作用** 畑山一郎, 三浦啓徳, 佐藤公彦<sup>1</sup>, 土田成紀<sup>1</sup>: 第57回日本癌学会, 横浜市, 1998, 9, 30-10, 2.

c-JUNとperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR)は蛋白間の結合により相互の転写活性を抑制しあうことがin vitroで示されているが生体では検討されていない。我々は, phenobarbital (PB)によりマウス肝にc-JUNが, また, PPARのリガンドであるclofibrate投与によりPPARを介したenoyl CoA hydratase (ECH)が誘導されることを明らかにしてきた。そこで, PBとclofibrateの同時投与により, c-JUNとECHの発現が相殺されるかどうか調べた結果, 両者共に著明な発現抑制がみられた。このことは, 生体内でもc-JUNとPPARは蛋白間の結合により相互の転写活性を抑制しあうことを示す。

1: 弘前大学医学部第二生化学

**ラット肝GST-P陽性のシングルセル, ミニフォーカスの発現に先行する生化学反応の検討** 佐藤公彦<sup>1</sup>, 早狩誠<sup>1</sup>, 高畑武功<sup>1</sup>, 熊野高行<sup>1</sup>, 土田成紀<sup>1</sup>, 畑山一

郎: 第57回日本癌学会, 横浜市, 1998, 9, 30-10, 2.

発癌剤投与によりラット肝に早期に出現するGST-P陽性細胞はinitiated cellと想定されているが, その出現に先行する生体内反応を検討した。発癌剤投与4時間でミクロゾームの著しい損傷とGSHの速やかな減少を認めた。この結果から, 発癌剤によるアクロレインや4-HNEのような不飽和アルデヒドの発現に伴ってその除去に係わるGST-Pが誘導されるものと考えられる。

1: 弘前大学医学部第二生化学

**SRSVによる食中毒下痢症の疫学的検討** 佐藤 孝, 下山純子<sup>1</sup>, 三上稔之, 畑山一郎: 第18回青森感染症研究会, 弘前市, 1988, 8, 8.

1997年5月30日付で食品衛生法の一部が改正され, 食中毒の原因病原体としてSRSVが追加された。本県においてのそれ以後の集団発生は, 1997年12月末, 年が明けた1月, 2月と続けて3事例発生しそれに伴い電子顕微鏡法(以下電顕法), Nested PCR法(以下PCR法)による検査を行ったところ電顕法では, SRSV粒子が1, 2事例目の29検体中4検体から, PCR法では, 高率にウイルス遺伝子が検出された事から集団発生事例の原因病原体であることが分かった。また3事例目の非発症者でウイルス保有者のウイルス排泄追跡調査をPCR法により行ったところ4日間はウイルスを保有していることを確認した。

1: 県立つくしが丘病院

**青森県における小型球形構造ウイルスが原因の食中毒.** 佐藤 孝, 三上稔之, 畑山一郎: 第2回青森県保健医療・福祉・環境研究発表会, 青森市, 1999, 1, 28-29.

1997年5月30日付で食品衛生法の一部が改正され, 食中毒の原因病原体としてSRSVが追加された。それ以後の集団発生は3事例発生し, それに伴い電子顕微鏡法(以下電顕法), Nested PCR法(以下PCR法)による検査を行ったところ, 電顕法ではSRSV粒子が1, 2例目の29検体中4検体から, PCR法ではウイルス遺伝子が平均検出率73%と高率に検出され, 集団発生事例の原因病原体であることが分かった。3事例目の非発症者でウイルス保有者のウイルス排泄追跡調査をPCR法により行ったところ, 4日間はウイルスを保有していることを確認した。また3事例目で検出されたSRSV遺伝子をSSCP法によって解析したところ, 同一のウイルスであることが示唆された。

PCR法によるツツガ虫リケッチア遺伝子の検出 下山純子<sup>1</sup>, 佐藤 孝, 三上稔之: 第2回青森県保健医療・福祉・環境研究発表会, 青森市, 1999, 1, 28-29.

PCR法を用いて, ツツガ虫リケッチア遺伝子の検出を試みたところ, 急性期すなわち抗体産出前にツツガ虫リケッチア遺伝子の検出が可能であった。一方, 抗体産出後の回復期検体からは遺伝子が検出されなかった。よってPCR法では, ツツガ虫リケッチア遺伝子を直接検出することができ, しかもIP法より早期のツツガ虫リケッチア感染の診断が可能と思われた。またIP法における標準株3株間には交差反応があるため, 型別が困難であったがPCR法を用いることにより株の特定が可能であることが強く示唆された。

1: 県立つくしが丘病院

ヒト血液細胞の癌抑制遺伝子*p73*の遺伝子多型 武沼浩子, 石川和子, 下山純子<sup>1</sup>, 畑山一郎: 第2回青森県保健医療・福祉・環境研究発表会, 青森市, 1999, 1, 28-29.

近年, 神経芽細胞腫の候補遺伝子として*p73*遺伝子が報告された。そこで, マスクリーニング用新生児血液紙を用い, *p73*遺伝子のエクソン2についてRFLPを行い, 変異について検討した結果, G4/C14の例は61%, G4/C14とA4/T14からなる例は35%, そしてA4/T14の例は4%であった。ヒト神経芽細胞腫IMR-32でもA4/T14への変異が認められた。これらの結果は, 神経芽細胞腫の成因に*p73*エクソン2のG4/C14→A4/T14変異が関わっていることを示唆した。

1: つくしが丘病院

青森県内におけるレジオネラ属菌の汚染実態調査について 筒井理華, 対馬典子, 大友良光: 第2回青森県保健医療・福祉・環境研究発表会, 1999. 1. 28-29.

レジオネラ症は欧米では冷却塔水が原因の事例が散見されるが, わが国では1981年に最初の1症例が報告され, その後, 温泉やサウナ風呂での感染者および1大学病院小児科病棟の新生児の感染が明らかとなる一方, 最近では, いわゆる24時間風呂における本菌の高い汚染実態が明らかになったため, 平成9~10年度にかけて特定建築物の冷却塔水等のレジオネラ汚染実態調査を行った。結果は「レジオネラ症防止指針」により, 「望ましい範囲」にあるものが85.0%, 「要観察範囲」が5.9%, 「要注意範囲」が9.1%であった。分離レジオネラの菌種は, 冷却塔水からは*L. pneumophila* 1群19株(82.4%), 6群, *L. bozemanii*, *L. micdadei*がそれぞれ1株, 温泉水からは

*pneumophila* 1群1株, 3群3株, 4群2株, 5群4株, 6群1株, その他のレジオネラ2株が検出された。今回の調査で初めて本県におけるレジオネラ汚染の一端が明らかになったが, 本県ではヒトからのレジオネラ分離は報告されていない。

青森県内における志賀毒素産生性大腸菌(STEC)による感染症学 対馬典子, 野呂キョウ<sup>1</sup>, 筒井理華, 大友良光: 第3回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム, 東京都, 1998, 7, 1-2.

1993年から1997年9月までに青森県内で発生した志賀毒素産生性大腸菌(STEC)感染症の発生状況をまとめる一方, 分離33菌株の血清型別, PCR法による志賀毒素遺伝子(*stx 1*, *stx 2*)と大腸粘膜のA/E障害関連遺伝子(*eae A*)の検出および一部の菌株についてパルスフィールドゲル電気泳動法(PEGE)による解析を行った。その結果, STEC感染例は8月前後をピークに年々増加傾向にあり, 最近では高齢者にも見られる。血清型は, O157:H7/HNMが26株と多く, 最近ではO26:H11(4株), O103:H2(2株), O121:H19(1株)と多様化している。O157は*stx 1*と*stx 2*両方保有が23株, *stx 2*単独保有が3株, O26は3株が*stx 1*単独, 1株が両方保有, O103は2株が*stx 1*単独, O121は*stx 2*単独を保有していた。*eae A*は全ての菌株が保有していた。平成9年8月に, 同一地域で同時期に発生した2事例のPFGE解析でイエバエの媒介が示唆された。

1: 青森保健所

志賀毒素産生性大腸菌(STEC)の感染経路調査で分離された菌株の分子疫学解析 対馬典子, 筒井理華, 大友良光: 第52回日本細菌学会東北支部総会, 山形市, 1998. 8. 20-21.

1997年8月中旬, 県内の同一地域で2件の*stx 1*, *stx 2*遺伝子保有O157:H7 1感染事例が相次いで発生し, 当該菌が分離された。

事例1と事例2の家との距離は直線にして350m程度, 両事例の発症時間がほとんど同じ, そして, 事例1の患者では家畜を飼育していることから関連性が疑われたため, 敷地内の家畜便とハエからの分離を試みたところ, 糞便とハエから当該菌が分離された。そこで, 遺伝子学的にヒト由来株と家畜便, ハエ由来株の関連を検討する目的で, *Xba I*消化DNAのパルスフィールドゲル電気泳動パターンを比較検討した。

DNA解析の結果, ほとんど類似のパターンを示し, また, 両世帯に共通する食品は無いことから, その感染

源は家畜便であり、食物との間をイエバエが媒介した可能性の高いことが示唆された。

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の感染経路調査で分離された菌株の分子疫学解析 対馬典子, 筒井理華, 大友良光: 第18回青森感染症研究会, 弘前市, 1998, 8, 8. (本誌学会等発表抄録“第52回日本細菌学会東北支部総会”参照)

青森県における過去15年間のインフルエンザウイルスの動向 三上稔之, 佐藤 孝, 下山純子: 第2回青森県保健医療・福祉・環境研究発表会, 青森市, 1998, 1, 28-29.

青森県における15年間のインフルエンザは、集団発生状況からみると早い発生が1984年10月15日で、一番遅いのが1991年2月2日の発生であった。また休校、学級閉鎖、短縮授業等の措置を行った学校数、り患者数からは小規模流行が1993年の15校、1,354人で、大規模流行は1994年の346校、49,707人であった。1982年から1990年の9年間はAソ連 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) 型, A香港 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) 型, B型の三つの型が2年間隔で定期的に流行していた。しかし、1990年以降は一つの型が2年から3年以上連続して出現し、それに別の型が加わった混合流行がみられた。その混合流行から常にA香港 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) 型が検出されている状況にある。ウイルス分離成績は、年により検体数は違うが平均分離率が29%であった。ワクチン株と青森分離株との交叉性では古い分離株では最近のワクチン株と交叉が認められず、また、最近の分離株では古いワクチン株と交叉が認められなかった。

魚介類の不揮発性腐敗アミン類の生成について 木村淳子, 中谷実, 三浦啓徳, 高橋政教: 第2回青森県保健医療・福祉・環境研究会発表会, 青森市, 1999, 1, 28-29.

アレルギー様食中毒原因としてヒスタミンが知られている。ヒスタミンの摂取量が少ない場合でもカダベリンなどの不揮発性腐敗アミン類 (NVDA) が共存していることにより食中毒様症状を引き起こすとされている。また、腐敗に伴うNVDAの生成量や生成パターンが食品の種類によって異なることが報告されている。アレルギー様食中毒を誘発したチリ産あわびの原因検索のためNVDAの検査を行い、さらに青森県内魚介類について腐敗の進行によるpHの変動およびNVDAの生成パターンの検討を行った。

二枚貝中のマウス致死成分・イェソトキシン分析法の検討 中谷 実, 今井美代子, 三浦啓徳, 高橋政教: 第2回青森県保健医療・福祉・環境研究発表会, 青森市, 1999, 1, 28-29.

公定法により下痢性貝毒として検出され、下痢原性の無いことが知られているイェソトキシンの微量分析法について検討した。定量下限値を0.1 μg/g (中腸腺当たり) とした分析が可能になり、平成9年度から平成10年度にかけて採捕した陸奥湾産ホタテガイ24検体及び県外産ホタテガイ2検体からイェソトキシンを検出した。

標準溶液の精度について 清水友敬, 三浦啓徳, 高橋政教: 第2回青森県保健医療・福祉・環境研究発表会, 青森市, 1999, 1, 28-29.

平成9年4月からGLPが導入され、精度管理の実施が義務付けられた。これに対し、全国化学技術協議会等でも農業を対象とした調査を行っている。このような機関で行われている調査は試験操作全般についての解析が主であるが、定量の際に物差しとなる標準品及び標準原液の調整・管理も重要な問題である。そこで、地研北海道・東北・新潟支部の各機関でクロスチェックを行なった。また、標準溶液への温度による影響についても調査を行なった。

下痢性貝毒におけるELISA法の検討 今井美代子, 中谷実, 三浦啓徳, 高橋政教: 第2回青森県保健医療・福祉・環境研究発表会, 青森市, 1999, 1, 28-29.

陸奥湾産のホタテガイは、夏季に下痢性貝毒により毒化することが知られている。これは、下痢性貝毒化合物を海洋中のプランクトンの一種である渦鞭毛藻類が産生し、これを餌とした二枚貝が体内、主に中腸腺に蓄積するため、この貝を食べた人間が下痢を主症状とした食中毒を起こすものである。このため本県では、可食部当たりの毒力が0.05MU/gを超えて毒化が認められると、中腸腺、いわゆるウロを取り外して出荷する自主規制を行っている。現行の貝毒検査法はマウスを使用することなど問題点が多く、そのため、規制されるべき下痢性貝毒のみを検査する方法の開発が求められている。当所では、今年度下痢性貝毒成分であるオカダ酸群のみと反応するキットによる検査を行い、その検査精度等について検証を行い、公定法との整合性も得られる結果を得た。

十和田湖湖心における動物プランクトンの鉛直分布と漁獲高の関係—1995～97年度調査結果から— 三上

一, 工藤幾代, 野澤直史<sup>1</sup>, 前田寿哉, 石塚伸一<sup>2</sup>, 工藤 健<sup>3</sup>, 大久保英樹<sup>4</sup>, 高村典子<sup>5</sup>, 中川 恵<sup>6</sup>, 長崎勝康<sup>7</sup>, 水谷 寿<sup>8</sup>: 第63回日本陸水学会, 松本市, 1998, 9, 20-23.

十和田湖湖心において1995年4月~97年10月に, 月1回の頻度で動物プランクトン調査を実施した。

その結果, 出現した動物プランクトンはワムシ類17種, 枝角類3種, カイアシ類5種, 計25種であった。主な動物プランクトンの出現状況をみると, ワカサギ漁獲量が多かった1995~1996年度は小型の動物プランクトンであるワムシ類, 枝角類ゾウミジンコが優占したが, ヒメマス漁獲量が多くなった96年以降, 大型の動物プランクトンであるハリナガミジンコ, ヤマヒゲナガケンミジンコが優占しており, 十和田湖では動物プランクトンは魚によるtop-down効果を強く受けていた。

- 1: 生活衛生課
- 2: 環境政策課
- 3: 五所川原保健所
- 4: 青森県警察本部
- 5: 国立環境研修所
- 6: 環境研究センター
- 7: 水産増殖センター
- 8: 秋田県水産振興センター

十和田湖の透明度に及ぼす魚類の影響 三上 一, 高村典子<sup>1</sup>, 中川 恵<sup>2</sup>, 伯耆晶子<sup>3</sup>: 第33回日本水環境学会, 仙台市, 1999, 3, 16-18.

十和田湖では1986年以降, CODが環境基準値(AA類型: 1 mg/l以下)を超え, 透明度り低下とヒメマス漁獲量の不振が問題となっている。1995~97年度の調査では, 優占魚種がワカサギからヒメマスに代わることにより, 小型の動物プランクトンであるゾウミジンコ, ワムシ類から大型の動物プランクトンであるハリナガミジンコ, ヤマヒゲナガケンミジンコに代わり, 透明度の上昇とクロロフィル-a量の低下し, トロフィックカスケード効果が認められた。

- 1: 国立環境研究所
- 2: 環境研究センター
- 3: 奈良女子大学

湖沼の現状と保全について—十和田湖の生態系管理について 三上 一, 工藤精一, 松尾 章, 工藤幾代, 野澤直史, 前田寿哉, 高村典子<sup>1</sup>, 中川 恵<sup>2</sup>, 伯耆晶子<sup>3</sup>: 第3回全国公害研水環境シンポジウム, 仙台市, 1999, 3, 16.

十和田湖の水質改善・保全のために, (1) 水産部門との連携, (2) 環境収容力の把握, (3) 沿岸帯・底質の役割の解明, (4) 新たなモニタリング体制の構築などが必要である。また, 今後, 具体的な対策を行うには行政, 地元住民との連携が必要で, そのためには仮想評価法(CVM)による社会, 経済学的なアプローチも必要になる。

- 1: 国立環境研究所
- 2: 環境研究センター
- 3: 奈良女子大学

十和田湖における生態系管理の取り組みについて 三上 一, 松尾 章, 工藤幾代, 野澤直史, 前田寿哉, 片野 登<sup>1</sup>, 長崎勝康<sup>2</sup>, 水谷 寿<sup>3</sup>, 伯耆晶子<sup>4</sup>, 中川 恵<sup>5</sup>, 高村典子<sup>6</sup>: 第14回全国環境・公害研究交流シンポジウム, つくば市, 1999, 2, 17-18.

1995年度より国立環境研究所などと十和田湖の水質及び生態系に係る共同研究を実施している。共同研究から十和田湖において「良好な水質と安定したヒメマス漁獲量」の双方を満足するためには, 大型の動物プランクトンであるハリナガミジンコ, ヤマヒゲナガケンミジンコを優占させる魚類管理と河川などの流入負荷量削減が必要であると考えられた。

- 1: 秋田県環境技術センター
- 2: 青森県水産増殖センター
- 3: 秋田県水産振興センター
- 4: 奈良女子大学
- 5: 環境研究センター
- 6: 国立環境研究所

**Influences of changes in the zooplankton community on water quality, phytoplankton and microbial components in a oligotrophic Lake in Japan.** N. Takamura<sup>1</sup>, H. Mikami, A. Hoki<sup>2</sup> and M. Nakagawa<sup>3</sup>.

Int. Assoc. Thero. & Appl. Limnol. 27th Congr. Dublin, Ireland, August 1998.

1995~1997年に十和田湖湖心において水質・生物調査を行った。その結果, ワカサギ-Bosmina優占系からヒメマス-Daphnia優占系に変化することにより, トップダウン効果により大型の動物プランクトンが優占したことにより, 透明度の上昇とクロロフィル-a量が減少し, トロフィックカスケード効果が認められた。

- 1: 国立環境研究所
- 2: 奈良女子大学
- 3: 環境研究センター



**Structure of macroinvertebrate community in the littoral zone of Lake Towada, Japan.** H. Kato<sup>1</sup>, N. Takamura<sup>1</sup>, and H. Mikami. The 9th International Symposium on River and Lake Environments, Huashan, China, October, 1998.

十和田湖和井内及び鉛山の沿岸域において底生動物調査を実施した。その結果、十和田湖の底生動物はユスリカ幼虫と貧毛類から成り、汀腺付近で最も現存量が高くなるとともに、魚類の捕食の影響を受けていた。

1：国立環境研究所

堤川水系における泡の生成機構解析（Ⅱ）—泡の構成成分— 野澤直史<sup>1</sup>，三上 一：第2回青森県保健医療・福祉・環境研究発表会，青森市，1999, 1, 28-29. (青森県環境保健センター研究報告，9，31-35, 1998参照)

1：生活衛生課

八甲田における水蒸気及び降水中のトリチウム調査 佐々木 守，木村秀樹，工藤英嗣<sup>1</sup>，工藤俊明：第7回「アクチノイド・長半減期核種」国際委員会，ソルトレイクシティ，1998, 9, 21.

八甲田連邦の田茂菴岳山頂付近において大気中湿分と降水に含まれるトリチウムの調査を行った。その結果、大気中湿分、降水中のトリチウム濃度は同様の変動パターンを示しており、春から夏にかけて高くなる傾向を示した。「原子燃料サイクル施設に係る環境放射線等調査」で実施している青森市及び六ヶ所村の調査結果で八甲田山頂に比べ全体的に低いのが、同様の変動パターンを示した。このことから、成層圏で生成されるトリチウムは春に対流圏へ多く流入し、流入したトリチウムが、高所から低所へ比較的トリチウムレベルの低い水蒸気に希釈されながら拡散している様子がうかがわれる。また環境保健センター八戸公害事務所の早狩らは、八甲田山頂において、トリチウムと同様に成層圏が起源とされるオゾンの測定を行っており、トリチウムとオゾンの結果を比較したところ正の相関が見られた。

1：原子力安全対策課

編 集 委 員

今 俊 夫 和 田 秀 夫 木 村 淳 子  
三 上 浩 二 齋 藤 輝 夫 佐 藤 孝  
竹ヶ原 仁 木 立 健 慈

---

## 青森県環境保健センター研究報告

(平成10年度)

平成12年2月発行

編 集 〒030-8566 青森市東造道1-1-1  
発 行 青 森 県 環 境 保 健 セ ン タ ー  
所 長 福 彗 寛 二  
電 話 (017) 736-5411  
F A X (017) 736-5419

---

(環境保護の為、再生紙を使用しています。)