

(4) 調査研究結果報告会(要旨)

平成14年度・所内調査研究結果報告会の資料集から、本年報の調査研究及び他誌には未発表の内容についてその要旨を掲載しました。

1	環境ホルモン等化学物質に関する調査研究	
	大気中環境ホルモン等化学物質調査……………	81
	雄コイのビテロジェニン濃度の測定調査……………	83
2	農産物中の残留農薬等に関する研究	
	遺伝子組換え農産物等の分析法の検討……………	86
3	温泉に関する研究	
	大分県内の温泉中のラジウムエマナチオン（ラドン）測定……………	87
4	感染症の動態及び疫学に関する総合研究	
	RFLP法を用いた感染源の追跡調査及び県内の結核菌動向調査……………	88
	ツツガムシの疫学的解析……………	89
	食中毒細菌の疫学解析に関する調査研究……………	91

1 環境ホルモン等化学物質に関する調査研究

—大気中環境ホルモン等化学物質調査(ベンゾ [a] ピレン類の追跡調査)—

藤野卓見

要 旨

昨年度に引き続き、大分市内の大分土木事務所におけるベンゾ [a] ピレン類を調査した結果、その濃度範囲は、ベンゾ [k] フルオランテンが0.53～7.91ng/m³、ベンゾ [a] ピレンが0.54～9.97ng/m³、ベンゾ [ghi] ペリレンが0.50～4.90ng/m³であった。環境省の平成10年度環境ホルモン緊急全国一斉調査結果によると、ベンゾ [k] フルオランテンが<0.015～1.4ng/m³、ベンゾ [a] ピレンが<0.021～2.4ng/m³、ベンゾ [ghi] ペリレンが<0.043～4.8ng/m³であった。以上のことから、今回の結果は全国的な調査結果と比較して高い濃度であった。

1 目的

平成14年1月に、大分土木事務所ではベンゾ [a] ピレン類、フタル酸エステル類、農薬類を対象とした大気中環境ホルモン等化学物質調査を実施したところ、ベンゾ [a] ピレン類が高い濃度で検出された。一般に、大気中のベンゾ [a] ピレン類の濃度は冬季に上昇傾向を示すが、風向等も考慮に入れ、高い濃度の出現が、この季節特有の現象なのかを確認するため、再度、今年度追跡調査を実施したものである。

2 方法

調査期間 平成15年1月20日～24日
 〃 1月27日～31日
 調査場所 大分土木事務所 屋上
 調査項目 ベンゾ [k] フルオランテン、ベンゾ [a] ピレン、ベンゾ [ghi] ペリレン
 採取方法 石英繊維ろ紙捕集法、10L/分×24時間
 約15m³捕集
 分析方法 液体クロマトグラフ法 (蛍光検出器法)

3 結果

調査結果は次表のとおりである。

表 ベンゾ [a] ピレン類調査結果 単位 ng/m³

番号	調査期間	ベンゾ [k] フルオランテン	ベンゾ [a] ピレン	ベンゾ [ghi] ペリレン
1	1月20～21日	7.91	9.97	4.90
2	21～22日	0.53	0.54	0.50
3	22～23日	1.17	1.32	0.81
4	23～24日	3.87	4.58	2.33
5	27～28日	5.06	6.33	3.23
6	28～29日	3.36	3.95	2.25
7	29～30日	3.56	4.17	2.39
8	30～31日	1.50	1.73	1.00

4 まとめ

- ・高濃度のベンゾ [a] ピレン類が検出された。しかも、冬季は日常的に検出される可能性が高い。
- ・濃度と風配図とは関連性がかなり強い。
- ・ベンゾ [a] ピレン類3物質間の濃度の相関性が高く、その濃度比がほぼ一定なことから、発生源は同一性が高いと考えられる。

5 考察

今回の調査で、大分土木事務所周辺では、冬季にベンゾ [a] ピレン類の高濃度出現の可能性が高いことがわかった。風上側も含め、適切に調査地点を配置すれば、さらに発生源が明瞭になってくるものと考えられる。

なお、図1に大気中ベンゾ [a] ピレン類の濃度の変化を、図2には調査期間中の風配図 (三佐小学校観測局) を示す。図1及び図2より、風向によってはベンゾ [a] ピレン類が高い濃度で検出されることがわかった。

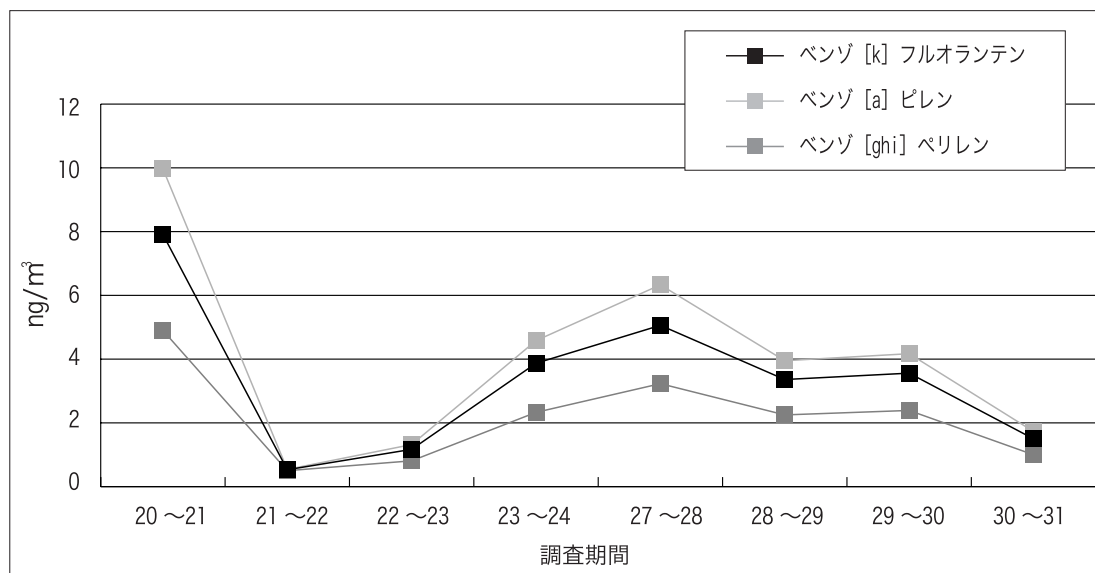


図1 大気中ベンゾ [a] ピレン類の濃度の変化

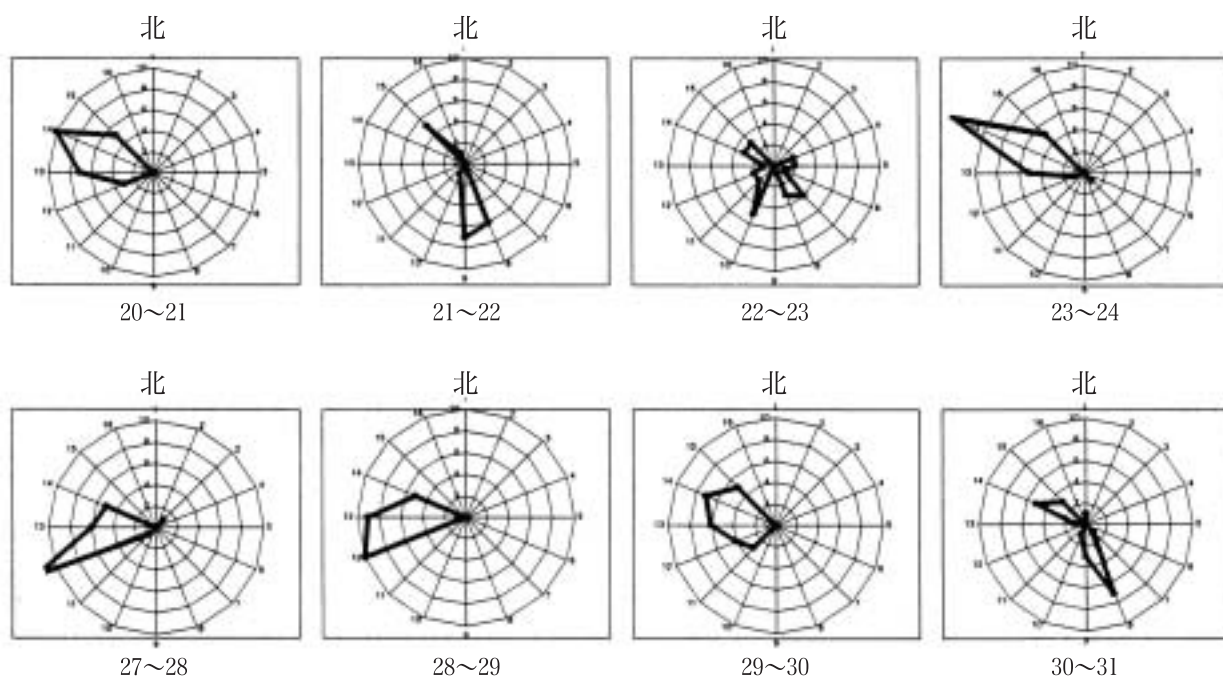


図2 調査期間中の風配図 (三佐小学校観測局)

一雄コイのビテロジェニン濃度の測定調査一

小野利文、景平真明*¹

要 旨

大分川小野鶴橋及び賀来橋周辺で採捕したコイ17匹中、雄コイ8匹の血清中のビテロジェニン濃度、精巣の肉眼による外観観察及び顕微鏡による組織学的観察を行ったところ、一部のコイでビテロジェニン濃度が若干高い値であったが、精巣の肉眼による外観観察及び顕微鏡による組織学的観察についてはすべて異常なかった。

若干高い値のビテロジェニン濃度が検出されたのは、3匹とも同一日に採捕されていることから、おそらく河川中のエストラジオール等の女性ホルモンにより、一時的に影響を受けたものであると思われる。

1 目的

県内河川において、環境ホルモンに暴露されたコイの状況を把握するため、コイを採捕し、性比、雄コイのビテロジェニン濃度の測定及び精巣の肉眼による外観観察及び顕微鏡による組織学的観察を実施し、今後の環境ホルモン対策の基礎資料を得る。

2 方法

(1) 性比

腹部を解剖し、生殖腺を観察することにより、雌雄を判別する。

(2) ビテロジェニン濃度の測定

雄コイの尾部血管から血液を採取し、遠心分離により血清を取り出し、冷凍保存し、ビテロジェニン検出キットにより、ビテロジェニン濃度を測定する。

(3) 精巣の形態調査

・肉眼による外観観察

精巣を取り出し、精巣の変形、変色、こぶ状及びひも状等の有無を観察する。

・顕微鏡による組織学的観察

精巣を取り出し、ホルマリンで保存し、脱水、パラフィンに包埋し、薄切りし、スライドグラスに貼り付け後、ヘマトキシリン、エオシンの二重染色を行い、精巣の生殖細胞の発達状況、構造、組織の変性及び精巣卵の有無等を顕微鏡(接眼レンズ10倍、対物レンズ10~20倍)により観察する。

3 結果

(1) 性比

採捕したコイ17匹中、雄コイが8匹、雌コイが9匹であった。

(2) ビテロジェニン濃度の測定

何らかの外的要因により、ビテロジェニンが雄体内で生成されたと考えられる100ng/ml以上検出されたコイが8匹中3匹であった。

(3) 精巣の形態調査

国土交通省で平成10年度から13年度に実施した事例によると、一部に次のような正常な精巣とは形態的、組織学的に異なる精巣を持つ雄コイがみられた。

- ・外見的に萎縮した部位がみられ、組織学的に機能不明の細胞の増殖が認められる。
- ・外見的に異常は認められないが、組織学的に卵母細胞(精巣卵)が認められる。
- ・外見的に萎縮した部位がみられ、組織学的に機能不明の体細胞の増殖及び卵母細胞(精巣卵)が認められる。
- ・外見的に硬い瘤状の部位がみられ、組織学的に繊維芽細胞の増殖が認められる。

肉眼による外観観察及び顕微鏡による組織学的観察を行ったところ、上記のような正常な精巣とは異なる精巣を持つ雄コイはみられなかった。

*¹海洋水産研究センター内水面研究所

4 考察

(1) 性比について

採捕数が少ないものの、採捕したコイ17匹中、雄コイが8匹、雌コイが9匹で性比のバランスはとれているものと思われる。

(2) ビテロジェニン濃度の測定について

100ng/ml以上の検体が8匹中3匹から検出されており、その割合が国土交通省が実施した参考例1の事例より高いが、濃度が高い3匹は、同一日(8月21日)に採捕されていることから、おそらく一時的に河川水中のエストラジオール等の女性ホルモンの影響により、ビテロジェニンの濃度が高くなったものと思われる。

(3) 精巢の肉眼観察及び組織学的観察について

肉眼による外観観察は、すべて異常はなく、また、顕微鏡による組織学的観察は、すべて異常はなかったが、採捕数が少ないため、今後は多くのコイを採捕し調査する必要があると思われる。また、全国的な事例は参考例2のとおりである。

5 謝辞

本調査を進めるにあたり、県立病院中央検査部辻浩一部長に精巢のプレパラートの作成をしていただき、また、顕微鏡による組織学的観察は東京都環境科学研究所和波一夫主任にご指導していただいたことについて厚く謝意を表します。

表1 大分川小野鶴橋及び賀来橋周辺において採捕したコイの調査結果について

採捕数	採捕年月日	性別	全長 (mm)	体長 (mm)	体重 (g)	生殖腺重量 (g)
1	14.6.24	雄	503	400	1565	78
2	14.6.24	雄	544	425	1999	55
3	14.6.24	雄	598	476	2646	42
4	14.7.25	雌	442	351	1257	30
5	14.7.25	雌	506	410	1736	86
6	14.7.25	雄	448	351	1337	68
7	14.7.25	雌	482	391	1560	9
8	14.7.25	雌	407	320	910	3
9	14.7.25	雄	494	392	1530	50
10	14.7.25	雌	508	414	1765	62
11	14.7.25	雌	495	406	1534	23
12	14.7.25	雌	453	358	1338	38
13	14.8.21	雄	430	342	976	17
14	14.8.21	雌	590	466	2778	128
15	14.8.21	雄	482	570	1442	110
16	14.8.21	雌	510	405	1885	127
17	14.8.21	雄	494	391	1564	95

表2 雄コイの血清中のビテロジェニン濃度測定結果

ビテロジェニン濃度		
100ng/ml未満	100ng/ml以上1000ng/ml未満	1000ng/ml以上
5匹 (62.5%)	3匹 (37.5%)	0 (0%)

参考例1 平成13年度に採捕したコイの血清中のビテロジェニン濃度測定結果

実施機関：国土交通省

調査地点		ビテロジェニン濃度	
		100ng/ml未満	100ng/ml以上
阿武隈川	須賀川	6匹 (60.0%)	4匹 (40.0%)
	阿武隈川	17匹 (100%)	
	岩沼	8匹 (80.0%)	2匹 (20.0%)
綾瀬川	内匠橋	11匹 (61.1%)	7匹 (38.9%)
多摩川	多摩川原堰	6匹 (60.0%)	4匹 (40.0%)
	田園調布堰	5匹 (62.5%)	3匹 (37.5%)
筑後川	三隈大橋	10匹 (76.9%)	3匹 (23.1%)
	瀬の下	9匹 (100%)	

参考例2 平成10~13年度に採捕したコイの精巣観察結果

実施機関：国土交通省

調査年度	ビテロジェニン濃度	
	正常	異常
平成10年度	50匹 (92.6%)	4匹 (7.4%)
平成11年度	94匹 (87.9%)	13匹 (12.1%)
平成12年度	76匹 (84.4%)	14匹 (15.6%)
平成13年度	85匹 (89.5%)	10匹 (10.5%)

調査地点は、参考例1と同じ。

2 農産物中の残留農薬等に関する研究

—遺伝子組換え農産物等の分析法の検討—

岡本盛義、二宮孝代

要 旨

遺伝子組換え農産物等の分析法を確立するため、大豆を検体とした DNA 抽出精製法の検討及び 100bp DNA Ladder (キット) による電気泳動法の検討を行った。

1 目的

遺伝子組み換え農産物の輸入の増加により、食品中に混入される状況にあるが、遺伝子組換え農産物の安全性については不明な点が多く、消費者の関心が高いことから分析法を検討し、分析開始時のスムーズな移行に備える。

2 方法

分析方法として準用される JAS 分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 基礎操作編」により、大豆を試料として DNA の抽出精製及び 100bp DNA Ladder を試料として電気泳動を行った。

3 結果

大豆からの DNA 抽出は、最終的に滅菌水に溶解するため収量の確認ができなかった。

100bp DNA Ladder を試料として電気泳動を行ったが、2% アガロースのゲルによりバンドを確認した。

4 考察

組み換え DNA 技術応用食品に関しては、平成 13 年 4 月 1 日から食品衛生法に基づく安全性審査が始まり、これに関連して検査方法が農産物 (加工品) の種類ごとに定められており、その概要は、下記 (参考) のとおりである。

今回、定性 PCR 法を前提として、抽出法と電気泳動法を行った。

大豆の磨砕は乳鉢で行ったが、固くて困難であったため、ミルカッターの利用や、水に晒して柔らかくして行う方法について検討したい。電気泳動法はアガロース濃度により変動し、2% で明確なバンドを確認した。PCR 法については今後検討するが、市販の GMO キットを用いる方法と必要なプライマーを購入する方法とがある。前者は高額であり、後者の場合、試料 (陽性) の入手が課題となる。

(参考)

組換え DNA 技術応用食品の検査方法

- 1 検体採取方法
- 2 安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査
検査方法としてラテラルフロー法や定性 PCR 法が定められ、対象農産物はトウモロコシ (CBH351)、パパイア (55-1)、New leaf Y ジャガイモ (加工品を含む) が挙げられている。
また、DNA 抽出精製法として CTAB 法、シリカゲル膜タイプキット法及びシリカベースレジソタイプキット法の 3 種類が示されている。
- 3 安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査
方法として、大豆は ELISA 法と定量 PCR 法が、トウモロコシは定量 PCR 法が示されている。

3 温泉に関する研究

—大分県内の温泉中のラジウムエマナチオン(ラドン)測定—

牧 克年

要 旨

大分県内の温(鉱)泉46ヶ所のラジウムエマナチオン(以下ラドン)の測定を行った。微量のラドンを3ヶ所で検出したが、いずれも温(鉱)泉の限界値及び療養泉の限界値を超えることはなかった。

1 目的

この頃の温泉ブームで、温泉に限らず公衆浴場においてもラドンを謳い文句にした施設が見受けられる。環境省は、平成14年4月からの温泉分析機関の登録制度導入に際してはラドン測定を義務づけている。

県内のラドンについては、昭和58年に別府市内の噴気ガスを測定した報告がある。また、昭和32年に温泉水のラドンを測定したと記録にはあるが、測定結果は見あたらない。京都大学、大分大学の話では、県内にはラドン温泉は存在しないとされており、その検証もかねて県内温(鉱)泉のラドン測定を行う。

2 方法

(1) ラドンの測定

昭和60年に購入したカナダ製(国際電子工業から購入)のラドン測定器を使用した。同測定器は、平成14年3月に国際電子工業(株)にて動作確認を行った。

- ・ラドン検出器 RD-200
- ・ラドン捕集器 RDU-200

(2) 温泉法によるラジウムエマナチオン(ラドン)

の限界値

- ・温(鉱)泉の限界値
20×10⁻¹⁰ キュリー単位
- ・療養泉の限界値
30×10⁻¹⁰ キュリー単位

3 結果

県内温(鉱)泉46ヶ所を調査した結果、3ヶ所でラドンが検出されたが、温泉法による限界値を超えたものはなかった。その他の地点では、ラドンは検出されなかった。

(1) ラドンが検出された地点

- ・別府市古市 2.0×10⁻¹⁰ キュリー単位
- ・別府市亀川 1.2×10⁻¹⁰ キュリー単位
- ・湯布院町下湯平 1.0×10⁻¹⁰ キュリー単位

(2) ラドンが検出されなかった地点

- ・別府市(上記を除く) 14ヶ所
- ・直入町 5ヶ所
- ・湯布院町(上記を除く) 11ヶ所
- ・久住町 2ヶ所
- ・九重町 7ヶ所
- ・臼杵市 2ヶ所
- ・天瀬町 1ヶ所
- ・日田市 1ヶ所

4 考察

今回の調査結果は、県内には温泉法上のラドン温泉は存在しないとする従来からの考えを裏付けるものである。

4 感染症の動態及び疫学に関する総合研究

— RFLP法を用いた感染源の追跡調査及び県内の結核菌動向調査—

緒方喜久代

要 旨

2002年度に県内の医療機関及び県・市保健所において喀痰等から分離され、当所に搬入された抗酸菌93株のうち結核菌と同定されたものは89株であった。そのうち、疫学調査から集団発生が疑われた事例は6事例であった。

また、搬入された抗酸菌93株については、ストックTBによる方法とマイクロバンクを用いた -80°C 凍結による方法で保存・管理した。

1 目的

結核菌による集団発生も過去にいくつか報告されているが、食中毒事件などのように同時多発しない限り散発例として見過ごされ、感染源の特定に至っていない。現在、IS6110を指標とした遺伝子学的解析手法 Restriction Fragment Length Polymorphism 法(以下、RFLP法という)が感染源調査にもっとも有効な手段であるとされている。この方法を用いて感染源の追跡調査及び県内の結核菌の動向を調査することにより疫学的な解析手法の強化を図り、罹患率の低下に貢献する。

また、県内の医療機関及び保健所等の協力を得て、当該機関で分離された結核菌の収集・保存を行い、長期的な結核菌の動向を把握し、拡大防止のための資料を提供する。

2 方法

材料：2002年4月から2003年1月までの間、県内の医療機関及び県・市保健所において喀痰等から分離された抗酸菌93株について検討を行った。

方法：入手した93株について、PNB培地での発育テストやナイアシンテスト、DDH マイコバクテリア“極東”、PCR法を用い、抗酸菌の同定を行った。RFLP法は、第17回日本細菌学会技術講習会テキスト¹⁾に記載された手法により行った。また、結核菌株の保存に

は、ストックTBによる方法とマイクロバンクを用いた -80°C 凍結による方法を用いた。

3 結果及び考察

上記の方法において、喀痰由来の抗酸菌93株中89株が結核菌と同定された。疫学調査から集団発生が疑われた6事例のうち、2事例についてはRFLP法により得られたDNAパターンから集団発生の可能性が示唆された。

RFLP法を行うことにより、一見、同一感染事例のように見られる中にも感染源の異なるものが混在していることが判明したという事例報告もあり、RFLP法を用いて結核事例を検討することは、感染様式の解明だけでなく、疫学調査やその後の対策に有用な情報となる。しかしながら、RFLP法については迅速性に欠ける、パターンの類型化が困難である等の問題点も指摘されており、今後、解析ソフトを用いたDNAパターンの解析やDNA遺伝子解析に汎用されているパルスフィールド・ゲル電気泳動法(以下、PFGE法という)を用いた解析等についても検討を行う必要があると考える。

4 参考文献

- 1) 高橋光良：RFLP分析を用いた結核菌の分子疫学、日本細菌学雑誌, 53, 662-668

一つつつが虫病の疫学的解析

小河正雄、吉用省三、小野哲郎

要 旨

一つつつが虫病患者の血液12件について一つつつが虫病病原体の遺伝子学的な検索を行ったところ、8件(66.6%)から病原体遺伝子を検出した。検出遺伝子を用いて病原体の血清型別を行ったところKawasaki型、Kuroki型であった。

1 目的

一つつつが虫病は毎年20名前後の患者が11月から12月にかけて県内で報告される。国内で検出される主な一つつつが虫病病原体の血清型はKarp、Kato、Gilliam、Kawasaki、Kurokiの5型がある。県内で流行している一つつつが虫病病原体の血清型を明らかにし、それを媒介するツツガムシの種類を推定し、一つつつが虫病予防対策の資料とする。

2 方法

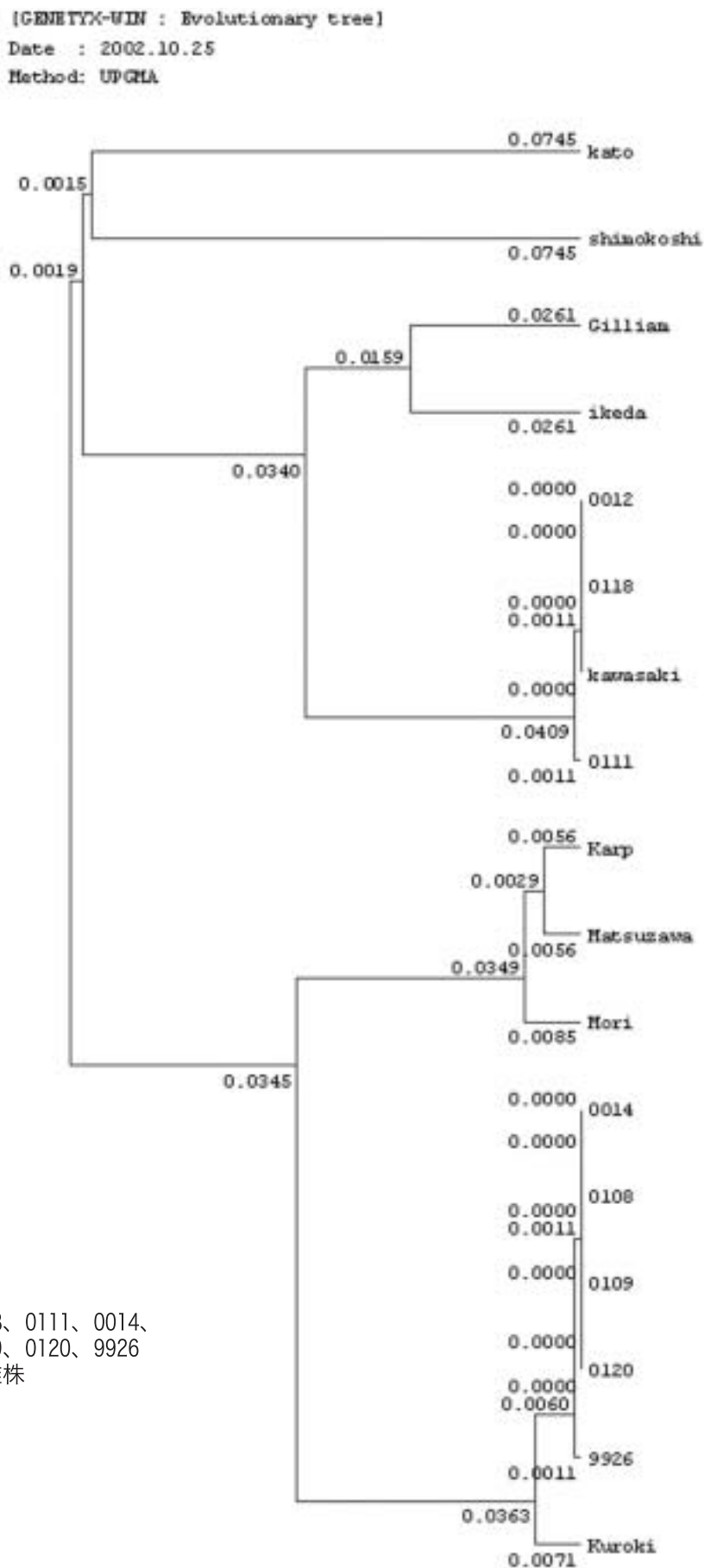
保存していた2001年の患者血液12件について、フェノールクロロホルム法でDNAを抽出し、PCR法で一つつつが虫病リケッチア遺伝子の検索を行った。検出率を上げるために、a'/b'のプライマーと10/11のプライマー2種類を用いた。増幅した遺伝子を用いてRFLP法及びシーケンス法でリケッチアの血清型を行った。

3 結果

a'/b'のプライマーを用いて12件中7件、10/11のプライマーを用いて12件中5件の一つつつが虫病リケッチア遺伝子を検出した。合計すると12件中8件からリケッチア遺伝子を検出した。検出したリケッチア遺伝子の血清型は、Kuroki型が5件、Kawasaki型が3件であった。10/11のプライマーで増幅したPCR産物8件についてシーケンスを行ったところ、RFLP法と一致した。(図1)

4 考察

遺伝子検出率を向上させるためPCR法で2種類のプライマーを使用したところ、検出率が向上した。従来から用いていたa'/b'のプライマーのほうが検出率が高かった。リケッチアの血清型は、Kuroki型、Kawasaki型の2種類で、本県のヒトから分離されるリケッチアの血清型は、従来と同一であった。Kuroki型、Kawasaki型はタテツツガムシが媒介すると言われており、本県の一つつつが虫病の主な媒介ダニはタテツツガムシであることが推定された。タテツツガムシの分布する地域での感染予防対策が重要である。



注 : 0012、0118、0111、0014、
 0108、0109、0120、9926
 は患者分離株

図1 つつが虫病リケッチアの分子系統樹

一食中毒細菌の疫学解析に関する調査研究一

成松浩志、緒方喜久代、鷺見悦子、帆足喜久雄

要 旨

平成14年度に分離された散発下痢症由来 VTEC O157及び集団発生事例由来O26等について、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を用いた遺伝子解析を実施した。

その結果、散発下痢症由来O157のうち4株は、平成13年に全国的に発生した和風キムチ食中毒由来株と同一の PFGE パターンを示したが、疫学調査から共通の原因を究明することはできなかった。集団発生由来O26は発生集団内においては同一の PFGE パターンを示したが、散発下痢症由来O26 からこれと同一パターンを示すものは分離されなかった。

これらの結果は、VTEC を原因とする散発下痢症では共通の菌株や汚染食品というよりも、さまざまなタイプの菌株や多様な感染源が介在していることを示唆している。

1 目的

食中毒起因菌の疫学解析によって、原因食品の特定並びに感染経路を解明し、感染防止対策を図り、県民の健康保持に寄与する。

2 方法

平成14年度に散発下痢症事例から分離された VTEC O157 : H7 19株、O26 : H11 4株、集団発生事例から分離されたO26 : H11 15株について、菌株から抽出したDNAを制限酵素 XbaI で切断後、Bio-Rad 社製 CHEF DR III を使用して PFGE (泳動条件 : 4 ~ 8s 11hrs, 8 ~ 50s 9hrs) を実施し、泳動パターンを調べた。

同一パターンを示した事例については、患者居住地管轄保健所が疫学調査を実施した。

3 結果

- 1) O157の家族内発生2事例は、個々の家族内において同一の PFGE パターンを示した。
- 2) O157散発事例中4株(4例)は、平成13年に全国的に発生した和風キムチ食中毒由来株と同一 PFGE パターンを示したが、共通の摂取食品や各患者間の関連は認められず、原因を特定できなかった。
- 3) 集団発生由来O26は発生集団内において同一の PFGE パターンを示したが、他の散発下痢症4事例由来O26でこれと同一パターンを示すものはなかった。

4 考察

同一家族内や同一集団内の食中毒事例で分離された菌株が同一の PFGE パターンを示した場合、疫学調査の結果を基に共通の感染源を究明することができるが、個々の散発事例においては分離菌株が同一の PFGE パターンを示したからといって、感染源が共通であるとは断定できない。同一の PFGE パターンを示すO157散発事例は疫学調査の裏付けがない限り、原因が共通の汚染食品と考えるより、同一パターンを示す菌株が広く蔓延していると考えほうが妥当なのかもしれない。PFGE パターンだけに依存して判断することなく、他の疫学マーカーの検査や保健所の疫学調査と有機的に組合せて的確に判断するシステムを今後構築する必要がある。

一方、PFGE は煩雑で日数がかかり、判定に習熟を要し1回当たりの検体数にも制限がある検査法であり、迅速な行政対応が困難である。今後、PFGE の簡略・迅速化を図るか、他に適切な疫学マーカーの検査法を開発するべきと考える。