

も、個人々の感受性に左右されることが、今回の研究において再確認され、微量化学物質によるシックハウス症候群には遺伝的な「成り易さ」「成り難さ」が存在するというを示唆している。そのような意味においても職業選択・職場に置ける適材適所が存在するといえる。平成 16 年の研究では、これらの遺伝子発現・多型性と症状・臨床検査との関連性を検討したいと考えている。

## E 結 論

有害化学物質の取り扱い作業員に対して、化学物質の感受性を検討することは、有害化学物質による健康障害を未然に防ぐ新しい予防的処置として今後検討する必要がある。

## F 健康危険情報

有害化学物質取り扱い作業員においては、個々の化学物質に対する感受性に対して配慮を行うべきである。

## G 本研究に関連した研究発表

1)坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲：化学物質過敏症の見方・考え方(1)—環境化学物質感受性のジェネティクスとエピジェネティクス—、神経眼科、20(3)：350-354、2003

2)坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲：化学物質過敏症の見方・考え方(2)—神経内分泌免疫学からみた化学物質過敏症—、神経眼科、20(4)：457-460、2003

3)坂部 貢：環境化学物質の免疫毒、科学、74(1)：50-52、2003

4)坂部 貢：シックハウス症候群と化学物質過敏症—オーバービュー—、アレルギー・免疫、10(12)：15-19、2003

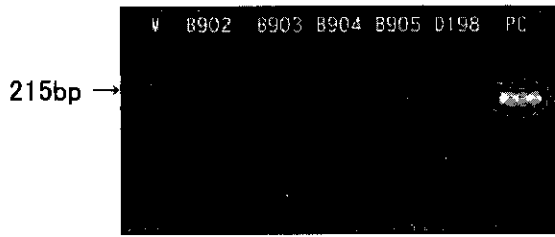
5)坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲：化学物質過敏症の治療と対策、アレルギー科、16(2)：163-165、2003

6)石川 哲、坂部 貢、宮田幹夫、鈴木幸男：Sick house syndrome、呼吸器科、4(4)：363-368、2003

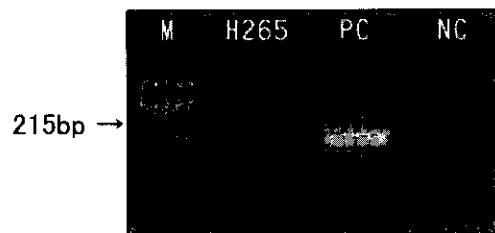
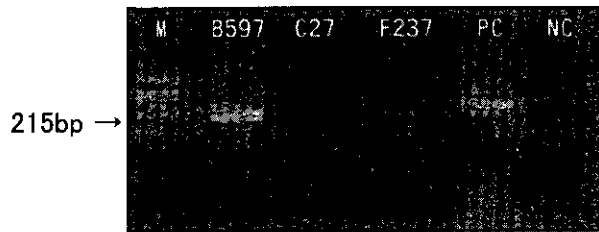
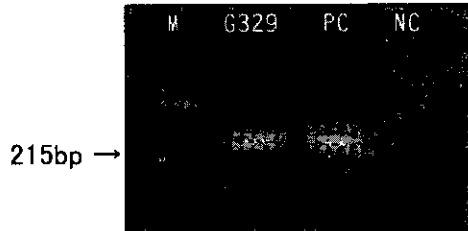
## H 知的財産の出願・登録状況

特許出願：「環境コントロールユニット (ECU) を用いた微量有害化学物質過敏性反応の診断・治療システム」出願者：石川哲、宮田幹夫、坂部貢、辻好美、William Rea

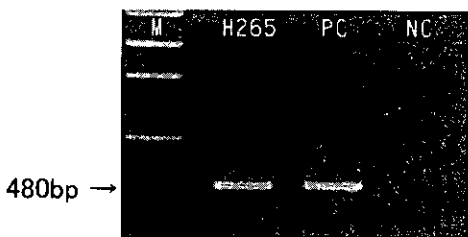
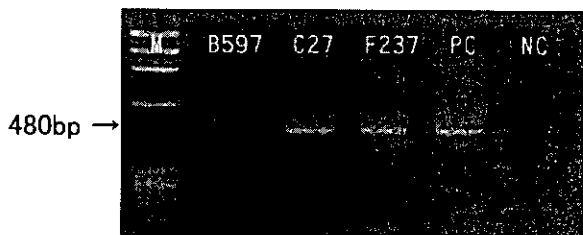
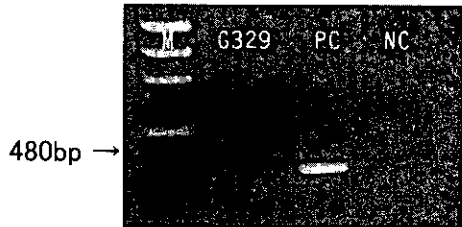
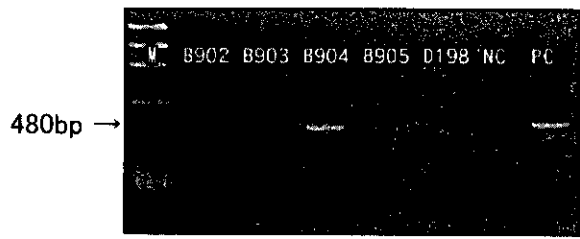
**GSTM1(GST- $\mu$ )**



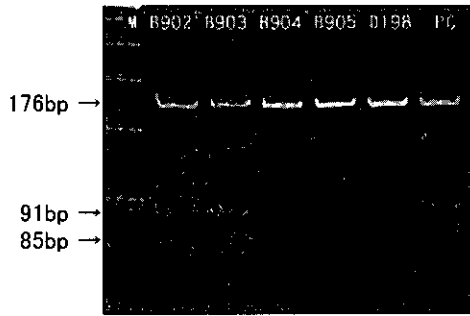
PC:positive control  
NC:negative control  
M:bp marker



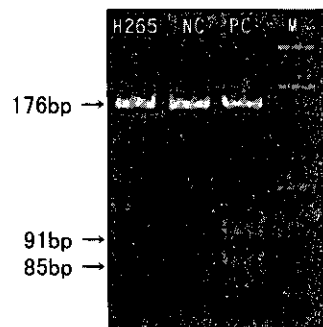
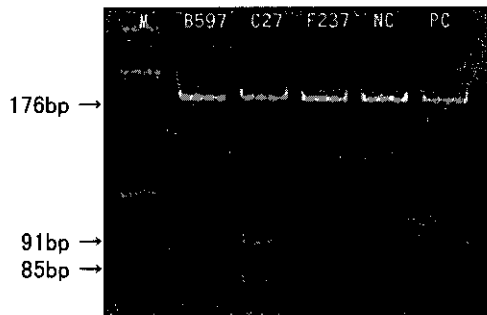
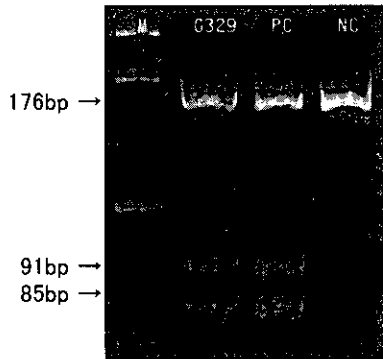
GSTT1(GST- $\theta$ )



GSTP1(GST- $\pi$ )



Ile/Ile	176bp
Ile/Val	176bp, 91bp, 85bp
Val/Val	91bp, 85bp



## 騒音職場従事者の音環境に関する研究 —4kHz dip とそれ以外の聴力型との比較—

研究協力者 橋本大門、佐野 肇、岡本牧人（北里大学医学部耳鼻咽喉科学教室）  
西田 陽（新キャタピラ三菱健康管理室）

### 研究要旨：

騒音職場従事者で 4kHz dip 群と 4kHz dip 以外の群について、職場環境以外で両群の違いをきたす要因があるか検討を行った。アンケート調査を行い検討を行った項目は、1) 就業年数の影響、2) テレビ及びラジオの視聴の影響、3) 騒音を伴った趣味の影響、4) 音楽の趣味の影響、5) 既往症の影響、6) 嗜好品の影響、7) 家族歴の影響である。検討の結果、4kHz dip 群と 4kHz dip 以外の群でこれらの項目に有意差を認めなかった。

今後の研究課題として、職場の音環境の違いと聴力の関係、難聴遺伝子の検索について挙げた。

### A 研究目的

われわれは 2002 年度の労働安全衛生総合研究事業における騒音職場従事者の聴覚に関する研究の中で、以下の様に報告した（図 1）。

1. 騒音職場従事者には、4kHz dip 群（以下、dip 群）と 4kHz dip 以外の聴力型を呈する群（以下、非 dip 群）が存在した。
2. dip 群と非 dip 群の 4kHz の聴力は同程度であった。
3. 非 dip 群の方が 250Hz から 2kHz および 8kHz では有意に悪かった。

今回は両群の違いをきたす要因が職場環境以外にあるのか、両群の背景に関して検討した。

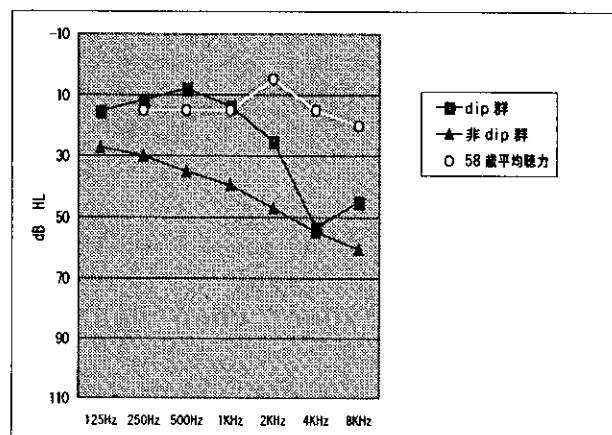


図 1

### B 研究対象と方法

対象は、騒音職場従事者で 2001 年 1 月～2002 年 12 月の 2 年間に北里大学病院耳鼻咽喉科に聴力検査の依頼のあった男性患者のうち、協力を得られた 24 例 45 耳（dip 群：7 例 12 耳、年齢 58.0 ± 8.90、非 dip 群：17 例 33 耳、年齢 58.8 ± 3.24）とした。両群の年齢について F 検定を行った。p < 0.05 を有意差ありと評価した。p = 0.738 で有意差を認めなかった。

オーディオグラムは Rion 社製 Audiometer AA-71 を用いて、125Hz、250Hz、500Hz、1kHz、2kHz、4kHz、8kHz の 7 周波数を測定した。聴力型の分類は、神崎らが定めた聴力像の分類に従い、dip 群は 250Hz から 4kHz までの 1 周波数の両力レベルが隣接する周波数の聴力レベルより 20dB 以上上昇するもの。非 dip 群はそれ以外のものとした。

方法は患者へアンケート用紙を送付し、その結果を集計した。1) 就業年数の影響、2) テレビ及びラジオの視聴の影響、3) 騒音を伴った趣味の影響、4) 音楽の趣味の影響、5) 既往症の影響、6) 嗜好品の影響、7) 家族歴の影響についてまとめた。

(倫理面への配慮)

今回の調査で得られたデータを解析する際に患者個人情報(氏名、住所など)は削除した。従ってこれ以上の倫理的配慮は必要ないと考えた。

## C 研究結果

### 1) 就業年数の影響

騒音職場の就業年数(他施設での就業を含む)は、dip群で $31.2 \pm 10.62$ 、非dip群で $36.2 \pm 8.93$ であった。t検定を行い( $p < 0.05$ )、有意差を認めなかった( $p = 0.348$ )。

### 2) TV及びラジオの視聴の影響

TVとラジオの視聴の有無でそれぞれ検討した。アンケート結果では一日あたりの視聴時間は、両群ともTVは2~4時間、ラジオは30分~1時間程度であった。TV視聴ありと回答したのがdip群で6例、非dip群では17例であった。 $\chi^2$ 検定を行い( $p < 0.05$ )、有意差を認めなかった( $p = 0.639$ )。ラジオ視聴ありと回答したのがdip群で1例、非dip群では6例であった。 $\chi^2$ 検定を行い( $p < 0.05$ )、有意差を認めなかった( $p = 0.592$ )。

### 3) 騒音を伴った趣味の影響

アンケートでは、パチンコ、カラオケ、居酒屋通い、キャバレー通い、射撃、剣道の有無について質問をした(複数回答あり)。これらの項目以外に、バイクと回答したものがあつた。これら騒音を伴った趣味の有無について検討した。趣味ありと回答したのがdip群で3例、非dip群では11例であった。 $\chi^2$ 検定を行い( $p < 0.05$ )、有意差を認めなかった( $p = 0.595$ )。

### 4) 音楽の趣味の影響

音楽をよく聴くか聴かないかで検討した。両群あわせると、音楽のジャンルでは演歌が6例、ロックが1例であった。場所は自宅や自家用車内で聴くことが多く、設置されたスピーカーから聴いていた。一日あたり3時間程度聴いていた。よく聴くと回答したのがdip群で3例、非dip群では4例であった。 $\chi^2$ 検定を行い( $p < 0.05$ )、有意差を認めなかった( $p = 0.650$ )。

### 5) 既往症の影響

既往症は高血圧9例、狭心症2例、高脂血症、糖尿病、不整脈、逆流性食道炎がそれぞれ1例ず

つであった(複数回答あり)。高血圧と狭心症、高脂血症、糖尿病、不整脈をあわせて成人病とした。高血圧ありと回答したのがdip群で2例、非dip群では7例であった。 $\chi^2$ 検定を行い( $p < 0.05$ )、有意差を認めなかった( $p = 0.610$ )。成人病ありと回答したのがdip群で2例、非dip群では8例であった。 $\chi^2$ 検定を行い( $p < 0.05$ )、有意差を認めなかった( $p = 0.704$ )。

### 6) 嗜好品の影響

喫煙と飲酒の有無について検討した。喫煙ありと回答したのがdip群で7例、非dip群では13例であった。 $\chi^2$ 検定を行い( $p < 0.05$ )、有意差を認めなかった( $p = 0.421$ )。飲酒ありと回答したのがdip群で7例、非dip群では14例であった。 $\chi^2$ 検定を行い( $p < 0.05$ )、有意差を認めなかった( $p = 0.610$ )。

### 7) 家族歴の影響

家族内の難聴者の有無について検討した。アンケートでは両親と祖父祖母の難聴の有無について質問した。難聴ありと回答したのがdip群で0例、非dip群では3例であった。 $\chi^2$ 検定を行い( $p < 0.05$ )、有意差を認めなかった( $p = 0.610$ )。

## D 考察

今回の検討ではdip群と非dip群の間で、職場環境以外の背景には違いを認めなかった。今回は諸事情により省略せざるを得なかったが、同一職場内で対照者(難聴のない者)を設定し、今回と同様にアンケート調査を行う予定である。また、今後は職場での音環境について詳細に検討してゆく。具体的には職場の騒音レベルと就業年数の関連、耳栓使用の有無との関連である。その他、難聴遺伝子の検索(インフォームドコンセントの得られた者について)を行う予定である。

## E 結論

dip群と非dip群の間で、職場環境以外の背景には違いを認めなかった。

## F 健康危険情報

なし

G 研究発表

なし

H 知的財産権の出願・登録状況

(1)特許取得

なし

(2)実用新案登録

なし

(3)その他

なし

## 職域の健康障害における作業因子の一つである微生物の寄与と予防に 関する評価方法の検討

分担研究者 産業医科大学・微生物学教室・教授・谷口初美

### 研究要旨：

昨年度に引き続き、健康障害に寄与する作業因子の一つとしての環境微生物叢を数、種類において網羅的に検出し評価する方法を確立する研究を行なっている。昨年度用いた硫化水素ガスが発生した不法投棄現場の土壌に加え、硫化水素ガス等の有毒ガス発生が懸念される一般廃棄物処分場（福岡県）、海面埋立処分場（大阪府）及び対照土壌として産業医科大学構内の土壌をそれぞれ深度別にサンプリングした。土壌の理化学的検査と、14 年度に確立した微生物学的検査及び遺伝子工学的な検査を行ない、遺伝子工学的な手法の汎用性について検証を行った。また大量の 16S rDNA の塩基配列情報を基に微生物叢を迅速に解析する為のデータベース及び解析システムの構築も行なった。理化学検査結果からは、対照土壌では硫化水素ガス発生と密接な関わりをもつと考えられる鉄や、硫酸イオンの含有量に深度による偏りは認められなかったが、不法投棄現場や廃棄物処分場では立地条件や深さ方向で大きな偏りがあることが明らかになった。蛍光染色法による菌数計測結果からほとんどのサンプルで  $10^8 \sim 10^9 / \text{g}$  の菌数が認められたが、一般廃棄物処分場の焼却灰の層では  $10^6 / \text{g}$  以下で極端に菌数が少なかった。好気培養可能な菌の割合は、染色法で得られた菌数の 0.1%～10%であり、場所や深度により大きく異なった。14 年度に考案した土壌サンプルから PCR 阻害物質の影響を受けない高純度 DNA の抽出方法及び Real Time PCR 法による全菌数計測は、本年度実施した 16 の土壌サンプルに対し 15 サンプルで適用可能であった。遺伝学的手法が様々な土壌サンプルに対し広い汎用性があることが示唆された。

### A 研究目的

研究目的は、職域の健康障害に寄与する作業因子の一つである微生物の検査方法の確立である。健康障害に寄与する作業因子の一つとして環境微生物が注目されている。しかし環境微生物の評価方法がない。そこで職域における環境微生物叢を数、種類において網羅的に検出し、評価する方法を確立することを目的とした。しかし、これまで環境中の微生物を網羅的に検出する方法が無かった理由として次の 2 点が考えられる。第 1 点は“生きているが培養できない菌（viable but non-culturable；VBNC）”の存在である。これは分子遺伝学的方法を駆使することにより克服可能である。第 2 点は“検査手法が適正であるか否かを検証する事ができる因果関係の明瞭な環境サンプルが得られ難い”という事である。しかしこの

点で、有毒ガス発生が問題になっている土壌サンプルは有用であると考えられる。廃棄物処分場等で問題になっている硫化水素ガスや、メタンガスなどの発生は微生物の代謝産物であることが従来の研究で既に明らかである。そこで有毒ガス発生の起きている土壌と起きていない土壌の微生物叢を比較することにより、検査方法の精度を検証する事ができる。以上、廃棄物処分場の土壌の微生物叢の分子遺伝学的手法による検出法の確立は、単に有毒ガス発生に伴う微生物叢の変動の情報を提供し、労働災害防止に供するだけにとどまらず、これまで困難であった環境微生物叢の網羅的検出方法の構築を可能にすると思われる。つまりこの方法は土壌のみならず、空气中、水中などの環境微生物叢一般に応用可能なバイオ評価の方法を提供するものになる。そこで職域一般におけるバイオ



評価システムの構築に貢献するものとして、課題の“職域における作業因子の寄与と予防”に関して、生物学的側面からの評価方法を提供するものである。

## B 研究方法

### (1) 土壌のサンプリング

土壌サンプルは、有毒ガス発生とは無縁の対照土壌、近年硫化水素ガス発生が認められた不法投棄現場、及び廃棄物処分場を選定した。サンプリングの方法は、不法投棄現場、廃棄物処分場では現場職員の協力の元、重機（パワーショベル等）による掘削、対照土壌に関しては手動掘削機（ハンドオーガ）で採取した（表 1）。得られた土壌サンプルはビニルバックに密閉し、可能な限り 4°C で保存した。

### (2) 理化学的検査

これらの土壌の理化学検査を福岡県保健環境研究所と共同で行った。理化学試験として、溶出試験を行った。溶出試験については、昭和 48 年環境庁告示第 13 号に基づき、廃棄物と水を重量体積比 1:10 となるように混合し、振とう機で 6 時間振とうした後、孔径 1 $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過して検液として用いた。

### (3) 土壌細菌の計測

#### a) 好気培養法（平板希釈法）

サンプリングで得られた生土 0.3g を 1ml の無菌水中に加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間振とうした。振とう後さらに超音波洗浄装置で 2 分間超音波処理を行った。この溶液を一次希釈（希釈倍率 10）とし、よく攪拌した後、順次希釈系列水を作成した（8 次希釈：10<sup>8</sup>まで）。

環境微生物用培地（平板培地）上に希釈水を複数枚に塗抹する。コロニー数が 20-200 のものを計測し平均を出す。コロニーの平均数に、その希釈倍数を掛けて生土当たりのコロニー形成数（cfu）を計測した。

#### b) 蛍光染色法

(1)-a と同様に土壌希釈液を調製する。希釈液を

1ml 取りフィルター（ヌクレポア 0.2 $\mu$ m 孔径）ろ過後、バッファー（0.1M phosphate buffer pH8.5, 5% NaCl, 0.5mMEDTA2Na）を加える。EtBr 水溶液を 150 $\mu$ l（終濃度 100 $\mu$ g/l）加え、室温で 10 分間放置後、吸引ろ過し、ろ過滅菌水 3ml でフィルターを洗浄する。フィルターを無蛍光オイルで封入し落射型蛍光顕微鏡で菌数を計測した。

### (4) 土壌からの高純度 DNA の調製

#### ①粗 DNA 溶液の調製

DNA 抽出溶液組成：50mM : EDTA、100 mM : Tris-HCl (pH8.0)。

サンプル 0.3 g を 2.5 ml エッペンドルフチューブに入れ、上記 DNA 抽出溶液 0.9 ml を加えボルテックスで懸濁させ、40 $\mu$ l のリゾチーム溶液（100mg/ml）及び 60 $\mu$ l の SDS 溶液（30%）を加える。回転振盪機で一時間室温で緩やかに振とうさせる。遠心分離（15000rpm、3分）後、上清を別のチューブに移し、フェノール 25:クロロホルム 24:イソアミルアルコール 1 の混合溶液を 0.6 ml 加え、よく攪拌し 15000 rpm、5分、20°C で遠心分離する。この操作を 3 回繰り返す。上清をマイクロコン PCR（ミリポア社）で約 30 $\mu$ l に濃縮し、これを粗 DNA 溶液とした。

#### ②アガロースゲル電気泳動法を用いた精製

濃縮した粗 DNA 溶液を 1%アガロースゲル電気泳動後、SYBR Green I（TAKARA 社製）で染色し、染色された高分子 DNA のバンドをカッターナイフで切り出した。得られたゲル片から CENTRILUTOR（amicon 社製）を用いて DNA の抽出精製を行った。フィルター上にトラップされた DNA を遠心機（1000g 15分）で 70 $\mu$ l に濃縮後、マイクロチューブに移し、精製標品とした。

#### ③菌体破壊率

上記の DNA 抽出操作の前後の一部溶液を採取し、その希釈液を用いて EtBr 蛍光染色による菌数計測を行なった。DNA 抽出操作の前後の菌数から菌体破壊率を算出した。[100- (DNA 抽出操作後の菌数/DNA 抽出操作前の菌数×100)]

#### ④DNA の定量

分光光度計 (ベックマン社製) を用い精製 DNA 溶液の 260nm 及び 280nm の吸収を測定した。260nm/280nm の値で純度検定、260nm の吸収から DNA 量を推定した。[1.0OD (260nm)  $\approx$  50  $\mu$ g/ml DNA]

#### (5) Real Time PCR 法による菌数の計測

ABI PRISM 7000 (アプライドバイオシステムズ社) を用いた。細菌の 16S rDNA の保存領域から選定した増幅産物サイズ約 180bp のプライマーセット及び SYBR Green PCR master mix (アプライドバイオシステムズ社) を用い、以下の反応条件で PCR 反応を行なった。

PCR 反応溶液 ;

テンプレート溶液	1 $\mu$ l
プライマー-F	0.25 $\mu$ l
プライマー-R	0.25 $\mu$ l
精製水	11.5 $\mu$ l
<u>CyberGreen Prem</u>	<u>12.5 <math>\mu</math>l</u>
Total	25 $\mu$ l

PCR 反応条件;

変性温度 95°C (15sec)、アニーリング及び伸長反応温度 60°C (1 min) の 40 サイクルで行った。

菌数既知の大腸菌懸濁液 (JM109 ; 3.3  $\times$  10<sup>9</sup>cells/ml) から抽出精製した DNA の 10 倍希釈系列を作成し、検量線に用いた。

#### (6) ダイレクト PCR による土壌中の菌叢解析

16SrDNA の PCR  $\rightarrow$  大腸菌でのクローニング  $\rightarrow$  シーケンシング  $\rightarrow$  解析

PCR 反応 ; プライマー : universal

(フォワード) 細菌(大腸菌の 341-357)

5'-GCCCTACGGGAGGCAGCAG-3'

(リバース) 全生物 (907-926)

5'-CCGTCAATTCCTTT (A/G) AGTTT-3'

反応条件 ; 96°C : 4 分 [96°C : 30 秒 60°C : 30 秒 75°C : 1 分]  $\times$  (20) 75°C : 10 分 4°C

大腸菌でのクローニング ;

TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen 社) を使用。

16SrDNA 断片がクローニングされたと考えられる白コロニーを選ぶ。96-well プレートを用いて培養し、グリセロールストックを行う。

日立計測器サービス株式会社委託でシークエンスを行った。

### C 研究結果

#### (1) 土壌のサンプリング

不法投棄現場一ヶ所、一般廃棄物処分場 2 ヶ所、対照土壌一ヶ所、近隣の土壌と深度別に 16 の土壌サンプルを採取した。各々の土壌の特色について表 1 に示す。

#### (2) 理化学的検査

サンプリングした土壌の理化学検査結果を表 2 に示す。pH は対照土壌 (FS) と不法投棄現場土壌 (FK) では 6.9~8.7 の範囲であったが、廃棄物処分場土壌 (FO、OA) では、焼却灰が含まれる層で pH10 以上のアルカリ性を示した。電気伝導率は対照土壌が最も低く、不法投棄現場土壌、廃棄物処分場土壌の順で高くなった。有害重金属(カドミウム、鉛、クロム、水銀、砒素、セレン)等は全てのサンプルで検出限界以下の濃度であった。鉄イオンは対照土壌では深度による差は小さいが、汚染土壌では深度が深くなるに伴い減少する傾向が見られた。硫酸イオンは FS、FK、OA では深度の深いところで高くなる傾向が見られ、不法投棄現場 (FK) で最も高い濃度 (334mg/ml) が検出された。しかしながら海面埋立処分場である OA では逆に深度が浅いところで硫酸イオン濃度が高く、深くなるに伴い減少した。

#### (3) 土壌細菌の計測

各土壌サンプルの培養法による菌数計測結果を表 3 に示す。対照土壌では表層の土壌 (FS1) で最も高く (2.1  $\times$  10<sup>7</sup> cells/g)、0.5m よりも深いところでは深度に関係なく約 1/10 の菌数であった。不法投棄現場の土壌 (FK) では深いところで菌数が増える傾向が見られた。廃棄物処分場土壌 (FO) は表層 (FO2) と最下層 (FO4) は、対照土壌と同様の傾向が見られたが、焼却飛灰の層 (FO3) は 3.5  $\times$  10<sup>2</sup> cells/g と他のサンプルと比

較しても極端に菌数が少なかった。海面埋立処分場(OA)では深度に関わらず $10^6$ cells/g以下で他のサンプルよりも菌数が少なかった。

蛍光染色法による菌数計測結果(表3)では、ほとんどのサンプルで $10^7$ ~ $10^9$ cells/g計測された。深さや、サンプル地点による顕著な違いは見られなかった。しかしながら、好気培養で最も菌数の少なかったFO3(焼却飛灰の層)は、蛍光染色法でも検出限界以下であった。

#### (4) 土壌からの高純度DNAの調製

DNA抽出操作に伴う菌体破壊率は、66.5~96.3%の範囲であった。FK及びOAでは全て90%以上の破壊率が得られ、FS及びFOでは若干低い値となったが、80%前後の破壊率が得られた(表4)。

0.3gの土壌サンプルから0.5~8.7 $\mu$ gのDNAを得た。各土壌から得られたDNA溶液にはPCR反応に阻害を及ぼす物質の混入は認められなかった。

#### (5) Real Time PCR法による菌数の計測

大腸菌のDNAの希釈系列を基に検量線を作成した。 $3.3 \times 10^9$ ~ $3.3 \times 10^5$ cells/mlの間で相関計数0.998であり、十分な定量に用いる検量線が得られた。Real Time PCR法による全菌数の計測結果を表3に示す。Real Time PCR法では大腸菌に換算して $10^7$ ~ $10^9$ cells/gが計測された。

#### (6) ダイレクトPCRによる土壌中の菌叢解析

約600bpの16S rDNAのダイレクトPCRによる増幅断片を形質転換した大腸菌8256(FS;2304、FK;2016、FO;1632、OA;2304)クローンを日立計測器サービス株式会社に送付した。FSで1839、FKで1633、FOで1254、OAで2004、合計6730のシークエンスが得られ、シークエンス成功率は約82%であった。この塩基配列データを菌叢解析システムで解析した。菌種の階層分類結果を表5に示す。各々のサンプルで門(Phylum)のレベルでは6~13、綱(Class)では12~20、目(Order)では27~45、科(Family)で41~77、属(Genus)で65~129が検出された。Bergeys

Manualに登録されている23門のうち14門、及び32綱のうち22綱が検出されており幅広い菌叢を反映する結果となった。検出された綱のレベルの菌数を表6に示す。どのサンプルにおいても主に*Proteobacteria*、*Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Actinobacteria*に属する菌種が多く検出された。未分類菌種(BLAST検索で相同性が80%未満)と考えられるものは対照土壌で多く、汚染土壌においては、表層の土壌で多く検出された。各サンプルのPhylum別の検出率を図1に示す。対照土壌では、深度による相対的な分布に大きな差異はみとめられなかったが、汚染土壌では表層と深層で異なるパターンを示した。各土壌サンプルで検出された硫黄循環に関与する細菌群の割合を表7に示す。対照土壌では硫酸酸化細菌と硫酸還元菌が深度に関係なくバランスよく分布していた。不法投棄現場(FK)の土壌では深いところで硫酸酸化細菌及び硫酸還元菌の割合が高くなる傾向が見られた。廃棄物処分場でも同様の傾向が見られたが、最深部(FO4)では硫酸還元菌が硫酸酸化細菌を大きく上回った。海面埋立処分場では、表層で硫酸還元菌が多く、逆に深いところで硫酸酸化細菌が多くなり深度によってそのバランスが大きく偏っていた。対照土壌と不法投棄現場では $\delta$  *Proteobacteria*に属する硫酸還元菌が多く検出されたが、廃棄物処分場及び海面埋立処分場では*Clostridia*綱に分類される*Desulfotomaculum*等が主に検出された。

#### D 考察

種類の異なる16の土壌サンプルについて理化学検査を行なった結果。硫化水素ガス発生に関与すると考えられる硫酸イオンは不法投棄現場や廃棄物処分場等の潜在的にガス発生が懸念される土壌で多いことが明らかになった。しかしながら汚染土壌においてもサンプルによっては表層に多いものと深いところ多いものとの違いが見られ、場所や立地条件により異なることが明らかになった。好気培養法で検出された菌数は、蛍光染色法で検出された菌数の12%以下であった。特に海面埋立処分場(OA)では $10^5$ ~ $10^3$ で顕著であった。蛍光染色法で計測される菌数に対する培養法での計

測結果は場所によっても大きく異なることが明らかになった。DNA抽出にともなう菌体破壊率は、菌数が極端に少ない焼却灰のサンプル(FO3)では菌数が測定出来ないことや、菌体破壊率が70%に満たないサンプル(FO1)があるなどの改良すべき課題も明らかになったが、16サンプル中11ヶ所で約80%以上であり、理化学性状の異なる様々な土壌サンプルから偏りの少ない微生物叢全体のDNAを回収出来たと考えられる。このDNAを鋳型としたリアルタイムPCR法で計測した菌数は15サンプルにおいて蛍光染色法とほぼ同等の値を示し、新しい菌数計測法としての有用性が示唆された。また、リアルタイムPCR法で計測された菌数は蛍光染色法より若干少ない値となったが、これは土壌中に生息する細菌の16SrDNAコピー数が検量線に用いた大腸菌(7コピー)よりも少ない可能性を示唆していると考えられる。さらに、深い土壌ではその差が大きくなることから深い土壌に生息する細菌は表層の細菌よりもコピー数が少ないと考えられた。

16S rDNA塩基配列に基づく菌叢解析の結果、門のレベルで比較すると対照土壌(FS)及び不法投棄現場(FK)のサンプルでは何れの深度においても*Proteobacteria*が約半数を占めていた。FSでは深くなるにともない*Bacteroidetes*の割合が増加したが、FKでは深度別の相違はほとんど見られなかった。FOでは表層で*Bacteroidetes*が多く、最下層では*Firmicutes*が最も多く分布していた。OAでは深度の浅いところでは*Firmicutes*が最も多く分布しており他のサンプルと異なった。しかしながら、深度が深くなるに従い*Proteobacteria*の割合が増加し3.0mではFS及びFKと類似した分布になった。綱のレベルで比較すると、どのサンプルでも深度別にその分布が異なった。特に*Proteobacteria*門に属する綱の分布が大きく異なり土壌の性状を微生物叢から推し量るには、綱以下のレベルでの比較が必要であると考えられた。硫化水素ガス発生に関わる硫酸化細菌及び硫酸還元菌について比較すると、対照土壌では、深度に関係なく硫酸還元菌及び硫酸化細菌がバランスよく分布していることが明らかになった。しかしながら、廃棄物処分場では深度

の浅いところで硫酸還元菌、深いところでは硫酸化細菌が多く検出されそのバランスは大きく偏っていた。また、対照土壌で検出された硫酸還元菌は*Proteobacteria*門に属する菌種がほとんどであるが、廃棄物処分場で検出された硫酸還元菌は*Firmicutes*門に属する*Desulfotomaculum*が多かった。処分場における硫化水素ガス発生にこれらの菌叢の違いが関与している可能性が示唆された。

理化学検査結果及び、微生物叢を比較することは、硫化水素ガス発生のメカニズムを考察する上で非常に有益な情報を提供するものと思われるが、今後様々なサンプルを調査し、データの蓄積が必要である。

## E 結論

昨年度確立した細菌叢解析手法を理化学成分の異なる様々な土壌に試みた。その結果、幅広い汎用性を有しており、約一ヶ月を要する従来の培養法より迅速に且つ網羅的な解析が可能であることが明らかになった。さらに、複数の汚染土壌、処分場の土壌、及び健全な土壌の菌叢解析結果から硫化水素ガス発生に深く関与すると考えられる生物学的な知見を得ることが出来た。土壌から得られた菌叢解析結果を基に、土壌細菌叢解析用のDNAチップの作成に取りかかっている。

DNAマイクロアレイ法を確立すると共に更に多くのサンプルを収集し、理化学的検査及び16S rRNA遺伝子の配列に基づく遺伝学的な菌叢の調査が必要である。

## F 健康危険情報

## G 研究発表

論文

Hinoue, M., Fukuda, K., Wan, Y., Yamauchi, K., Ogawa, H., Taniguchi, H.: An Effective DNA Extraction Method from Industrial Waste Contaminated Soils. · Journal of Occupational Health · 2004 · 26 · 13-21

学会発表

水野康平、福田和正、谷口初美：好気培養による不法投棄現場土壌の細菌叢解析・第 56 回日本細菌学会九州支部総会、宮崎、2003

堀川和美、濱崎光宏、高橋浩司、世良暢之、谷口初美：不法投棄現場土壌中の硫酸還元菌について・第 56 回日本細菌学会九州支部総会、宮崎、2003

濱崎光宏、堀川和美、高橋浩司、世良暢之、谷口初美：不法投棄現場の土壌から検出された硫酸還元菌とメタン生成菌の 16S rDNA による菌種の同定・第 56 回日本細菌学会九州支部総会、宮崎、2003

福田和正、樋上光雄、王岩、小川みどり、宮本比呂志、谷口初美：遺伝学的手法による不法投棄現場土壌の細菌叢解析・第 56 回日本細菌学会九州支部総会、宮崎、2003

## H 知的財産権の出願・登録状況

### (1) 特許取得

廃棄物処分場土壌からの高純度 DNA 抽出法  
(出願済み)

リアルタイム PCR を用いた土壌中の菌数計測法

(出願準備中)

### (2) 実用新案登録

### (3) その他

表 1 実験に用いた土壌サンプル

採取場所	サンプル名	採取日	深さ (m)	採取方法	特徴
不法投棄現場	FK-1	2002. 9. 14	0~0.3	スコップ	近隣の山土
	FK-2	〃	0~0.3	スコップ	産業廃棄物
	FK-3	〃	1.5	重機	産業廃棄物
	FK-4	〃	3.0	重機	産業廃棄物
一般廃棄物処分場 (山間部)	FO-1	2003. 2. 25	0~0.2	スコップ	近隣の山土
	FO-2	〃	0~0.2	スコップ	覆土
	FO-3	〃	3.0	重機	焼却灰 (飛灰)
	FO-4	〃	5.0	重機	不燃ゴミ
対照土壌	FS-1	2003. 8. 5	0.0	スコップ	大学構内の土
	FS-2	〃	0.3	ハンドオーガ	〃
	FS-3	〃	1.5	ハンドオーガ	〃
	FS-4	〃	3.0	ハンドオーガ	〃
海面埋立処分場 (海辺)	OA-1	2003. 9. 17	0.0	スコップ	覆土
	OA-2	〃	0.5	重機	焼却灰及び土
	OA-3	〃	1.5	重機	焼却灰及び土
	OA-4	〃	3.0	重機	焼却灰及び土

表 2 理化学検査結果

項目	単位	FS-1	FS-2	FS-3	FS-4	FK1	FK2	FK3	FK4	FO-1	FO-2	FO-3	FO-4	OA-1	OA-2	OA-3	OA-4
		表土	0.3m	1.5m	3m	山土	覆土	1.5m	3.0m	山土	覆土	3.0m	5.0m	表土	0.3m	1.5m	3m
pH	-	8.4	7.2	8.7	8.7	7	6.9	8.1	8.1	7.6	8.3	12.6	8.6	7.1	10.6	11.1	11.2
電気伝導率	mS/m	11.2	1.12	13.6	15.4	0.65	2.13	69.3	76.9	2.7	12.4	1090	459	166	129	165	130
全窒素	mg/l	1.7	0.6	1.0	1.3	0.09	< 0.05	0.27	0.44	0.9	0.6	6.4	5.6	0.9	1.2	1.5	0.8
カドミウム	mg/l	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
鉛	mg/l	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0.042	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005
六価クロム	mg/l	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04
総水銀	mg/l	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005
砒素	mg/l	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0.006	< 0.005	< 0.005	< 0.005
セレン	mg/l	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002
鉄	mg/l	0.29	0.46	0.89	0.85	1.4	0.13	< 0.03	< 0.03	0.86	0.31	< 0.03	0.03	0.18	0.028	0.016	0.020
マンガン	mg/l	< 0.005	0.012	0.006	0.005	0.032	0.1	0.54	1	0.075	< 0.005	< 0.005	0.032	0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005
銅	mg/l	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0.31	0.034	< 0.005	0.037	0.059	0.076
亜鉛	mg/l	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	-	-	-	-	0.008	0.007	0.063	0.014	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
ナトリウムイオン	mg/l	0.1	0.8	4.7	5.5	0.9	1.4	21.5	12.1	1.8	5.1	666	399	235	77.1	92.1	64.3
カリウムイオン	mg/l	2.5	0.2	1.8	2.1	0.3	0.6	2.3	2.8	2.3	3.1	586	336	21.0	56.6	85.7	63.9
マグネシウムイオン	mg/l	1.8	0.2	1.7	3.0	< 0.1	0.2	4.5	4.9	< 0.1	1.7	< 2	1.8	12.3	< 0.1	< 0.1	< 0.1
カルシウムイオン	mg/l	9.3	2.3	9.8	12.7	0.4	1.3	93.6	119	0.3	10.7	577	221	54.8	108	117	94
塩化物イオン	mg/l	0.6	0.5	0.3	0.5	< 0.1	0.6	7.1	7.8	2.5	6.6	2400	1440	435	333	464	282
硫酸イオン	mg/l	2.1	1.0	19.2	24.4	0.7	5.1	285	334	0.5	6.7	< 2	55.1	206	105	39.1	63.0

表3 菌数計測結果

	好気培養 (CFU/g)	蛍光染色 (cells/g)	リアルタイムPCR (cells/g)
FS 1	$2.1 \times 10^7$	$(3.4 \pm 1.6) \times 10^8$	$(2.0 \pm 0.9) \times 10^8$
FS 2	$2.9 \times 10^6$	$(1.5 \pm 0.7) \times 10^8$	$(1.5 \pm 1.1) \times 10^8$
FS 3	$6.1 \times 10^6$	$(5.1 \pm 0.5) \times 10^8$	$(4.3 \pm 3.4) \times 10^8$
FS 4	$3.9 \times 10^6$	$(1.1 \pm 0.4) \times 10^8$	$(2.6 \pm 1.1) \times 10^8$
FK 1	$(5.5 \pm 0.1) \times 10^8$	$(1.7 \pm 1.6) \times 10^8$	$(1.5 \pm 0.7) \times 10^8$
FK 2	$(8.1 \pm 0.9) \times 10^8$	$(5.2 \pm 2.3) \times 10^8$	$(3.5 \pm 0.1) \times 10^8$
FK 3	$(2.9 \pm 0.4) \times 10^8$	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^8$	$(4.3 \pm 0.7) \times 10^8$
FK 4	$(2.7 \pm 0.1) \times 10^8$	$(2.3 \pm 0.2) \times 10^8$	$(3.0 \pm 0.3) \times 10^8$
F01	$(4.8 \pm 0.7) \times 10^8$	$(4.2 \pm 2.7) \times 10^8$	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^8$
F02	$(2.4 \pm 0.3) \times 10^8$	$(3.4 \pm 2.6) \times 10^8$	$(9.8 \pm 2.4) \times 10^8$
F03	$(3.5 \pm 0.4) \times 10^8$	$< 1.2 \times 10^6$	未実施
F04	$(4.3 \pm 0.4) \times 10^8$	$(6.1 \pm 2.4) \times 10^8$	$(7.1 \pm 0.1) \times 10^8$
OA1	$(9.4 \pm 4.5) \times 10^8$	$(4.1 \pm 1.1) \times 10^8$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^8$
OA2	$(1.5 \pm 1.5) \times 10^8$	$(9.0 \pm 0.8) \times 10^8$	$(3.9 \pm 3.6) \times 10^8$
OA3	$(8.8 \pm 3.5) \times 10^8$	$(5.7 \pm 2.3) \times 10^8$	$(2.9 \pm 3.8) \times 10^8$
OA4	$(2.6 \pm 1.6) \times 10^8$	$(3.4 \pm 0.5) \times 10^8$	$(1.8 \pm 0.8) \times 10^8$

表4 菌体破壊率及びDNAの定量結果

	DNA抽出前 (cells/g)	DNA抽出後 (cells/g)	菌体破壊率 (%)	DNA抽出 ( $\mu\text{g/g} \pm$ )
FS 1	$(3.4 \pm 1.6) \times 10^8$	$(2.2 \pm 0.4) \times 10^8$	$92.5 \pm 3.6$	$8.67 \pm 0.37$
FS 2	$(1.5 \pm 0.7) \times 10^8$	$(3.1 \pm 1.1) \times 10^7$	$77.3 \pm 10.4$	$1.73 \pm 1.10$
FS 3	$(5.1 \pm 0.5) \times 10^7$	$(1.1 \pm 0.4) \times 10^7$	$78.6 \pm 5.4$	$0.67 \pm 0.10$
FS 4	$(1.1 \pm 0.4) \times 10^8$	$(1.8 \pm 0.7) \times 10^7$	$83.6 \pm 5.5$	$1.13 \pm 0.67$
FK 1	$(1.7 \pm 1.6) \times 10^8$	$(7.7 \pm 2.8) \times 10^7$	$93.4 \pm 3.3$	$4.10 \pm 0.17$
FK 2	$(5.2 \pm 2.3) \times 10^8$	$(1.9 \pm 1.0) \times 10^7$	$95.5 \pm 3.0$	$1.83 \pm 0.37$
FK 3	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^8$	$(6.9 \pm 1.3) \times 10^7$	$96.0 \pm 1.0$	$3.47 \pm 1.23$
FK 4	$(2.3 \pm 0.2) \times 10^8$	$(8.3 \pm 2.4) \times 10^7$	$96.3 \pm 1.3$	$3.77 \pm 1.93$
F01	$(4.2 \pm 2.7) \times 10^8$	$(1.2 \pm 0.5) \times 10^8$	$66.5 \pm 8.8$	$4.33 \pm 0.60$
F02	$(3.4 \pm 2.6) \times 10^8$	$(8.1 \pm 4.3) \times 10^7$	$72.4 \pm 9.8$	$3.30 \pm 0.37$
F03	$< 1.2 \times 10^6$		未実施	未実施
F04	$(6.1 \pm 2.4) \times 10^8$	$(7.6 \pm 2.2) \times 10^7$	$84.2 \pm 12.6$	$0.80 \pm 0.23$
OA1	$(4.1 \pm 1.1) \times 10^8$	$(9.5 \pm 3.5) \times 10^7$	$93.4 \pm 3.3$	$1.40 \pm 0.65$
OA2	$(9.0 \pm 0.8) \times 10^8$	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^8$	$95.5 \pm 3.0$	$0.67 \pm 0.16$
OA3	$(5.7 \pm 2.3) \times 10^8$	$(6.8 \pm 0.9) \times 10^7$	$96.0 \pm 1.0$	$0.50 \pm 0.19$
OA4	$(3.4 \pm 0.5) \times 10^8$	$(8.4 \pm 2.3) \times 10^7$	$96.3 \pm 1.3$	$0.76 \pm 0.57$

表5 菌種の階層分類結果

	サンプル	門(phylum)	綱(class)	目(order)	科(family)	属(genus)	種(species)
対象土壌	FS1	10	16	36	66	106	166
	FS2	13	18	45	77	129	212
	FS3	10	15	39	68	117	200
	FS4	7	12	31	58	87	139
不法投棄現場	FK1	8	15	33	60	82	127
	FK2	9	14	35	60	107	178
	FK3	7	12	27	41	85	145
	FK4	8	16	29	44	76	127
廃棄物処分場	F01	7	12	27	42	65	106
	F02	9	13	30	44	77	126
	F04	6	12	28	50	67	110
海面埋立処分場	OA1	9	17	37	67	118	195
	OA2	8	13	36	52	89	124
	OA3	13	20	39	73	119	170
	OA4	6	13	29	47	92	144
Bergey's Manual※		25(2)	40(8)	89(12)	203(21)	941(69)	5224(217)

※ ; Bergey's Manual に登録されている総数  
 ()内は検出されたArchaea数を示す

表6 綱(Class)レベルの菌数分布

Phylum	Class	対照土壌				不法投棄現場				廃棄物処分場			海面埋立処分場			
		FS1	FS2	FS3	FS4	FK1	FK2	FK3	FK4	F01	F02	F04	OA1	OA2	OA3	OA4
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	45	64	38	29	49	71	65	29	42	41	51	68	42	32	80
	Betaproteobacteria	83	86	66	143	22	83	139	106	51	51	18	30	109	51	24
	Gammaproteobacteria	46	34	37	59	46	45	66	22	28	31	53	15	27	51	174
	Deltaproteobacteria	50	61	72	26	20	35	22	59	14	17	6	11	1	22	6
	Epsilonproteobacteria	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	4	0	5	1
Firmicutes	Mollicutes	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	26	40	3	0
	Bacilli	8	2	9	4	57	3	0	4	0	1	55	16	11	33	1
	Clostridia	11	6	26	8	6	8	4	6	2	0	77	161	78	32	6
Deinococcus-Thermus	Deinococci	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	16	5	4	0
Nitrospirae	Nitrospira	0	0	6	0	1	17	0	0	0	8	0	1	0	1	0
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	1	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0
Bacteroidetes	Flavobacteria	6	2	17	15	3	2	26	2	15	13	3	7	23	5	44
	Sphingobacteria	35	19	57	27	22	13	42	48	62	178	2	42	42	28	55
	Bacteroides	2	0	0	0	3	0	2	43	2	0	2	1	0	0	0
Acidobacteria	Acidobacteria	13	4	13	1	0	5	2	3	1	5	0	0	0	1	0
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	0	1	3	4	3	4	0	0	5	6	0	0	0	0	0
Chloroflexi	Chloroflexi	1	5	3	0	3	9	3	3	0	7	7	10	2	2	3
Deferribacteres	Deferribacteres	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Thermomicrobia	Thermomicrobia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Actinobacteria	Actinobacteria	23	50	32	22	77	85	18	6	81	15	16	52	18	125	71
Planctomycetes	Planctomycetacia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Spirochaetes	Spirochaetes	0	1	0	0	1	2	1	16	3	0	0	18	6	3	0
	Unclassified	86	132	103	139	30	112	23	25	178	56	37	40	102	70	43
	TOTAL	410	469	482	478	344	494	413	381	484	431	339	518	506	471	509



表7 各土壌サンプルにおける硫黄循環に関与する細菌群の分布

	(対照土壌)				(不法投棄現場)			
	FS 1	FS 2	FS 3	FS 4	FK1	FK2	FK3	FK4
解析したクローン数	410	469	482	478	344	494	413	381
<b>硫黄酸化細菌の数 (%)</b>	<b>18(4.4)</b>	<b>8(1.7)</b>	<b>19(3.9)</b>	<b>16(3.3)</b>	<b>4(1.2)</b>	<b>7(1.4)</b>	<b>64(15.5)</b>	<b>37(9.7)</b>
無色硫黄細菌 <i>Hydrogenophilaceae</i>	8(2.0)	7(1.5)	3(0.6)	14(2.9)	1	3(0.6)	63(15.3)	35(4.7)
紅色硫黄細菌 <i>Chromatiaceae</i>	7(1.7)	1(0.2)	3(0.6)	0	1	1(0.2)	1(0.2)	0
<i>Ectothiorhodospiraceae</i>	3(0.7)	0	13(2.7)	2(0.4)	2	3(0.6)	0	2(0.5)
緑色硫黄細菌 <i>Chlorobiaceae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>硫酸還元菌の数 (%)</b>	<b>28(6.8)</b>	<b>11(2.3)</b>	<b>30(6.2)</b>	<b>10(2.0)</b>	<b>4(1.2)</b>	<b>9(2.0)</b>	<b>6(1.5)</b>	<b>35(9.2)</b>
<i>δ Proteobacteria Desulfonatronumaceae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Desulfovibrionaceae</i>	8(2.0)	0	9(1.9)	3(0.6)	1	5(1.0)	1(0.5)	1(0.3)
<i>Desulfobacteraceae</i>	18(4.4)	8(1.7)	19(3.9)	4(0.8)	3	3(0.6)	0	34(8.9)
<i>Desulfobulbaceae</i>	1(0.2)	3(0.6)	1(0.2)	1(0.2)	0	0	4	0
<i>Desulfoarculaceae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridia Peptococcaceae</i>	1(0.2)	0	1(0.2)	2(0.4)	0	1(0.4)	1(0.2)	0
<i>Clostridiaceae</i>	3(0.7)	1(0.2)	8(1.7)	0	3(0.9)	4(0.8)	3(0.7)	4(1.0)
	(廃棄物処分場)			(海面埋立処分場)				
	F01	F02	F04	OA1	OA2	OA3	OA4	
解析したクローン数	484	431	339	518	506	471	509	
<b>硫黄酸化細菌の数 (%)</b>	<b>18(3.3)</b>	<b>9(2.1)</b>	<b>29(8.6)</b>	<b>3(0.6)</b>	<b>8(1.6)</b>	<b>12(2.5)</b>	<b>29(5.7)</b>	
無色硫黄細菌 <i>Hydrogenophilaceae</i>	1(0.2)	2(0.5)	13(3.8)	2(0.4)	2(0.4)	6(1.3)	10(2.0)	
紅色硫黄細菌 <i>Chromatiaceae</i>	6(1.2)	4(1.0)	7(2.1)	1(0.2)	5(1.0)	0	1(0.2)	
<i>Ectothiorhodospiraceae</i>	9(1.9)	3(0.7)	9(2.7)	0	1(0.2)	4(0.8)	18(3.5)	
緑色硫黄細菌 <i>Chlorobiaceae</i>	0	0	0	0	0	2(0.4)	0	
<b>硫酸還元菌の数 (%)</b>	<b>4(0.8)</b>	<b>4(1.0)</b>	<b>15(13.3)</b>	<b>15(2.9)</b>	<b>2(0.4)</b>	<b>8(1.2)</b>	<b>0</b>	
<i>δ Proteobacteria Desulfonatronumaceae</i>	0	0	0	3(0.6)	0	0	0	
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0	0	1(0.3)	0	0	0	0	
<i>Desulfobacteraceae</i>	2(0.4)	3(0.7)	0	1(0.2)	0	2(0.4)	0	
<i>Desulfobulbaceae</i>	0	0	1(0.3)	1(0.2)	0	0	0	
<i>Desulfoarculaceae</i>	1(0.2)	1(0.2)	0	0	0	1(0.2)	0	
<i>Clostridia Peptococcaceae</i>	1(0.2)	0	43(12.7)	10(1.9)	2(0.4)	3(0.6)	0	
<i>Clostridiaceae</i>	1(0.2)	0	13(3.8)	12(2.3)	28(5.5)	20(4.2)	2(0.4)	

FK  
(不法投棄現場土壌)

FO  
(埋立処分場)

OA  
(海面埋立処分場)

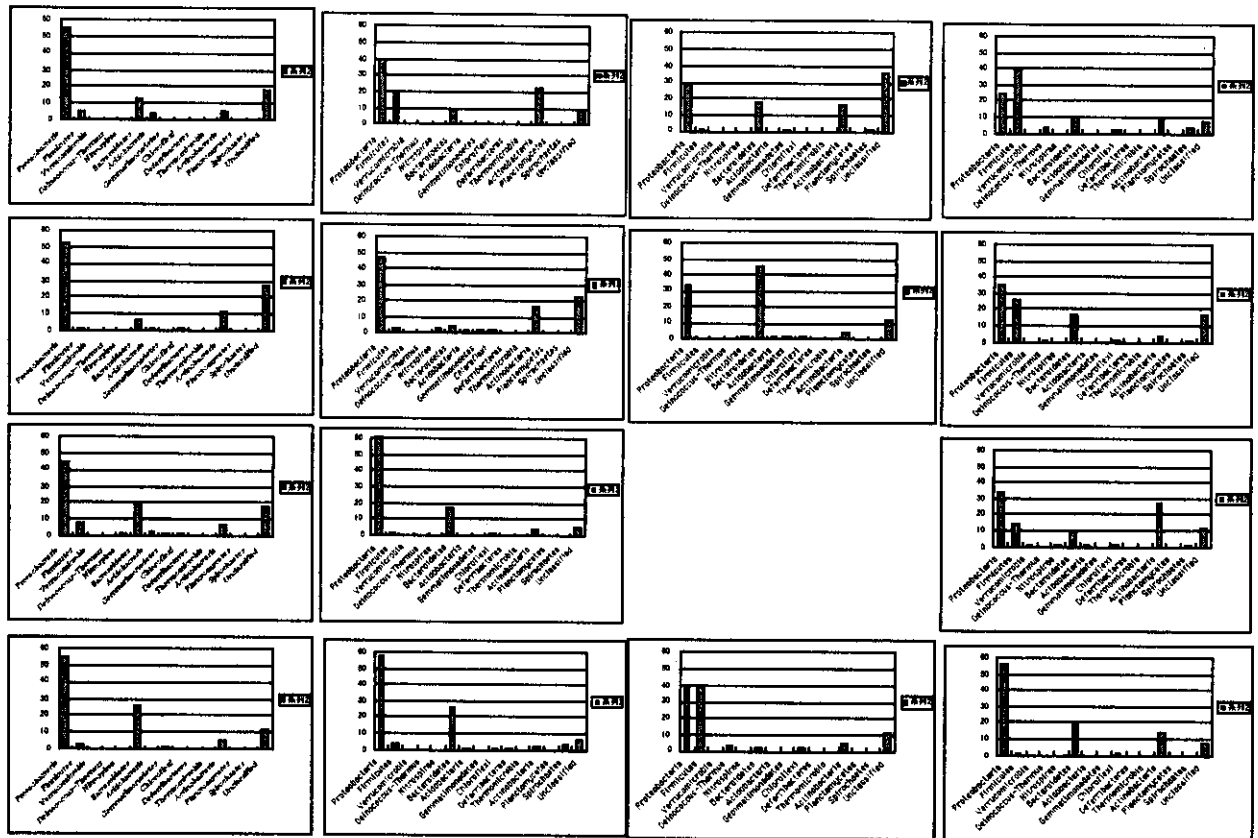


図1 各土壌サンプルにおける Phylum レベルでの分布