

- 眼科、20(3) : 350-354、2003
- 8) 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
- 9) 坂部 貢 : 環境化学物質の免疫毒、科学、74(1) : 50-52、2003
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 坂部 貢、"内分泌攪乱物質の免疫系への影響"、最新医学、57(2) : 32-29、2002
- 15) 坂部 貢、"シックハウス症候群"、水環境学会誌、25(2) : 87-90、2002
- 16) 宮田幹夫、坂部 貢、松井孝子、遠乗秀樹、石川 哲、"多種類化学物質過敏症患者に二重盲検試験と瞳孔"、神経眼科、19(2) : 155-161、2002
- 17) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲、角田和彦、"シックハウス症候群と脳循環"、神経眼科、19(2) : 162-168、2002
- 18) 坂部 貢、宮田幹夫、石川 哲 "シックハウス症候群の診断と治療の実状"、建築雑誌、117(1491) : 12-14、2002
- 19) 坂部 貢、"居住環境と健康障害—シックハウス症候群を中心として"、化学と教育、50(11) : 777-779、2002
- 20) 坂部 貢、吉田貴彦、香山不二雄、"微量環境化学物質と胸腺の微細構造"、Immunotox Letter、7(2) : 3-4、2002
- 21) Y. Fujita, T. Kakuta, M. Asano, J. Itoh, K. Sakabe, T. Tokimasa, A. Saito, "Evaluation of Na⁺ active transport and morphological changes for bioartificial renal cell device using Madin-Darby canine kidney cells", Tissue Eng, 8(1):13-24, 2002
- 22) M. Ojima, H. Tonori, T. Sato, K. Sakabe, M. Miyata, S. Ishikawa, Y. Aizawa, "Odor perception in patients with multiple chemical sensitivity", Tohoku J. Exp. Med., 198, 163-173, 2002

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、両群の違いをきたす要因があるか検討を行った。アンケート調査の結果をもとに検討した。検討した項目は、1) 耳栓着用の有無による影響、2) 喫煙・飲酒の影響、3) 既往症の影響、4) 家族歴の影響、5) 音楽の趣味の影響、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統計学的な有意差を認めなかった。

今回の検討で耳栓を着用したにもかかわらず難聴をきたしてしまっただけの人がいると分かった。そこで、実際に用いられている耳栓を使って、その遮蔽効果を測定した。その結果、耳栓の入れ方次第で、遮蔽効果が大きく変化することが分かった。

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。

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。また、実際に A 社で使用されている耳栓の遮蔽効果を測定した。

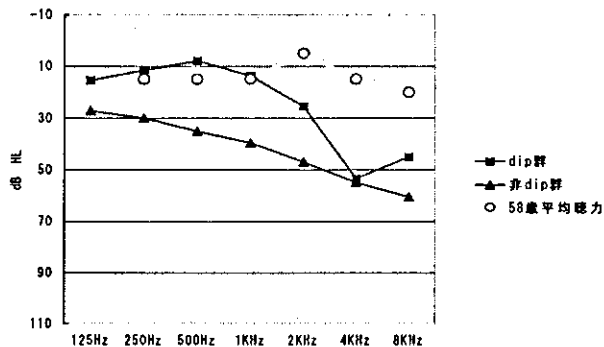


図 1

B. 研究方法、研究対象

研究方法はアンケート調査で行った。騒音職場を有する A 社の社員のうち、協力を得られ、次の項目に該当した者 100 名へアンケートを配布した（実際に用いたアンケートを参考資料として掲載する）。

1. 特殊健康診断の対象である者。
2. 通常健康診断で難聴を指摘された者。
3. 現在は騒音職場に従事していない者。

アンケートを配付した 100 名に標準純音聴力検査を行った。標準純音聴力検査は北里大学病院所属の臨床検査技師に測定を依頼し、500 Hz、1k Hz、2k Hz、4k Hz、8k Hz の 5 周波数を測定した。測定結果をもとに 100 名を聴力型の違いから dip 群、非 dip 群、対照群に分類した。聴力型の分類は、dip 群は 500 Hz から 4k Hz までの 1 周波数の聴力レベルが隣接する周波数の聴力レベルより 20dB 以上上昇するものとした。非 dip 群はそれ以外の年齢非相応な聴力レベルのものとした。対照群は年齢相応な聴力レベルのものとした。

dip 群、非 dip 群、対照群の 3 群で以下の条件を満たすものを研究対象とした。

1. 50～60 歳代の男性。

2. 騒音職場従事者の経験あり。
3. 聴力レベルの左右差が1周波数で10dB以内。
4. 聴力レベルの左右差が2周波数の合計で15dB以内。
5. 騒音性難聴以外の感音難聴の既往がない。
6. A社以外の騒音職場従事経験なし。

研究対象はdip群13例、非dip群20例、対照群6例となった。

A社では興研式10型耳栓(図2)、DECIDAMP(図3)という名称の耳栓が使用されている。両者ともJIS第一級該当品で、大きさはフリーサイズである。耳栓着用を義務づけられた社員は、どちらかを選択して使用していた。

今回の遮蔽効果の測定にあたっては、被験者AとBが耳栓を装着した状態と、耳栓をはずした状態で純音聴力検査を行った。



図2

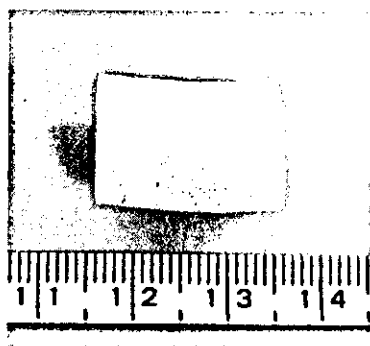


図3

(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する。

C. 研究結果

アンケート結果

1) 耳栓着用の頻度

dip群では、「常に着用」が8例、「時々着用」が4例、「全然着用せず」が1例であった。非dip群では、「常に着用」が15例、「時々着用」が4例、「全然着用せず」が1例であった。対照群では、「常に着用」が6例、「時々着用」と「全然着用せず」が0例であった。クラスカル・ワーリス検定を行い、統計学的有意差を認めなかった($p=0.22$)。

2) 耳栓を着用しなかった年数

耳栓を着用せずに仕事をした年数は、dip群が 8.39 ± 11.33 、非dip群が 6.6 ± 8.82 、対照群が 2.33 ± 5.72 であった。クラスカル・ワーリス検定を行い、統計学的有意差を認めなかった($p=0.37$)。

3) 喫煙歴

Brinkman indexは、dip群では 621 ± 376 、非dip群では 488 ± 188 、対照群では 487 ± 421 であった。分散分析を行い、統計学的有意差を認めなかった($p=0.59$)。

4) 飲酒歴

飲酒の頻度は、dip群では、「毎日」が5例、「ほぼ毎日」が3例、「週に数回」が1例、「機会飲酒」が2例、「なし」が2例であった。非dip群では、「毎日」が5例、「ほぼ毎日」が5例、「週に数回」が6例、「機会飲酒」が1例、「なし」が3例であった。対照群では、「毎日」が0例、「ほぼ毎日」が3例、「週に数回」が1例、「機会飲酒」が1例、「なし」が1例であった。クラスカル・ワーリス検定を行い、統計学的有意差を認めなかった($p=0.60$)。

飲酒の年数は、dip群が 30.08 ± 14.77 、非dip群が 27.79 ± 13.83 、対照群が 31.83 ± 16.61 であった。クラスカル・ワーリス検定を行い、統計学的有意差を認めなかった($p=0.58$)。

5) 既往歴

dip 群は、「高血圧」が 6 例、「糖尿病」が 2 例、「既往症なし」が 5 例であった。非 dip 群は、「高血圧」が 6 例、「糖尿病」が 2 例、「高脂血症」が 1 例、「既往症なし」が 12 例であった。対照群は「糖尿病」が 1 例、「既往症なし」が 5 例であった。各群間で既往症の「あり」、「なし」について χ^2 検定を行い、統計学的有意差を認めなかった ($p=0.17$)。

6) 家族歴

dip 群、非 dip 群、対照群、いずれの群においても家族内に難聴の発生は認めなかった。

7) 音楽の趣味

dip 群は「音楽の趣味あり」が 5 例、「音楽の趣味なし」が 8 例であった。非 dip 群は「音楽の趣味あり」が 6 例、「音楽の趣味なし」が 14 例であった。対照群は「音楽の趣味あり」が 3 例、「音楽の趣味なし」が 3 例であった。

遮蔽効果の測定 (図 4)

耳栓をはずした状態を「裸耳」と表示した。DECIDAMP の方は、外耳道に入っている長さで分け、表示した。また、実際に公表されている 2 つの耳栓の遮蔽効果を参考値として表示した。

被験者 A の場合、興研式 10 型耳栓は参考値とほぼ同じ値であった。DECIDAMP は 12mm の方が、全く入れていない方 0mm に比べて 125~1000Hz の周波数域において高い遮蔽効果を認めた。しかし、いずれも参考値と比べ 20dB は低い値になった。

被験者 B の場合、興研式 10 型耳栓は参考値とほぼ同じ値で、被験者 A の場合と変わらない結果であった。DECIDAMP は被験者 A よりも深く入れることができた。DECIDAMP の場合は参考値と比べ 10~15dB ほど低い値であったが、被験者 A よりも高い遮蔽効果を得られていた。

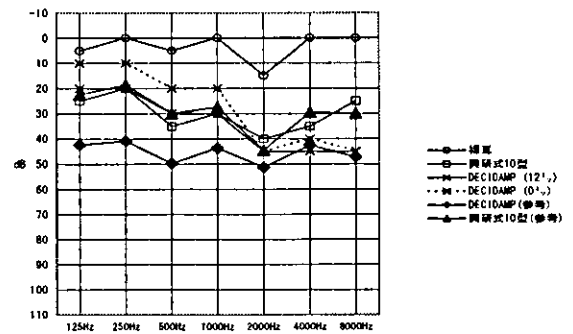


図 4 (被験者 A)

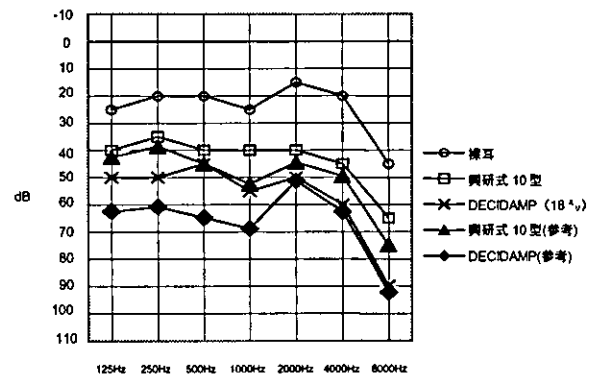


図 4 (被験者 B)

D. 考察

今回の検討では dip 群、非 dip 群の違いを来す要因を見いだすことはなかった。

今回の検討で、騒音性難聴を起こしている者が多いということが分かった。常に耳栓を着用していた社員は 39 例中 29 例 (74.4%) おり、耳栓着用率は決して低くはない。むしろ、耳栓着用率は高く、作業管理は整っていると見える。それにもかかわらず、社員 39 例中 33 例 (84.6%) に騒音性難聴を認めたことは問題である。遮蔽効果の測定結果から、耳栓の装着の仕方により、その遮蔽効果が大きく異なることが分かった。以上から、耳栓を着用しているにも関わらず騒音性難聴を来した原因は、防音保護具である耳栓は着用しているが、効果的な着用をしていないからだと考える。

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

騒音職場従事者の音環境に関するアンケート調査

このアンケートは、騒音性難聴という病気が職場の音環境以外にも影響を受けているかどうかを研究するためのものです。職場の音環境以外とは具体的にはどのようなことかという、生活における音、嗜好歴、家族歴、既往歴などです。

その為、騒音職場のある新キャタピラ三菱社でアンケート調査を行うことになりました。しかし、結果の解析には、騒音職場での作業経験のある方や難聴のある方だけでなく、作業経験や難聴のない方に対してもこのアンケート調査を行う必要があります。そこで、お手数ではありますが、下記の記入上の注意点を御読みいただき、ご記入下さいますようお願いいたします。

なお、このアンケート結果を会社へ知らせることはありません。

記入上の注意点

1. このページの、お名前・生年月日にご記入下さい。
2. 質問は全部でQ1～Q11まであります。Q1から順番にお答え下さい。
3. お答えは、下線の箇所にご記入下さるか、該当項目に○印をつけて下さい。
4. 記入欄に入りきらない場合は余白に記載して下さいてもかまいません。
5. お答えによっては、とばす質問もあります。

お名前 _____ 生年月日 西暦 _____ 年 _____ 月 _____ 日
(記入漏れの確認のみに使用し、それ以外の目的に使うことはありません)

Q1 新キャタピラ-三菱社での勤務年数と勤務内容についてお伺いします。
勤務内容は事務職、技術職、管理職、現場勤務から選り○印をつけて下さい。
勤務内容に変更のあった方は、年齢ごとに勤務内容を選んで下さい。

(騒音の暴露を伴った仕事の場合には現場勤務に○印をつけて下さい)

_____歳から_____歳まで 事務職・技術職・管理職・現場勤務 を担当

_____歳から_____歳まで 事務職・技術職・管理職・現場勤務 を担当

Q2 Q1で現場勤務に○印をつけた方だけお答え下さい。

勤務中は耳栓を着用していましたか？ 常に着用・時々着用・全然着用せず

耳栓を着用していた年数は？ _____歳から_____歳まで

Q3 新キャタピラ三菱社以外で勤務経験があり、しかもそれが騒音の暴露を伴った仕事（または、耳栓着用が義務であった仕事）の方だけお答え下さい。

勤務年数は？ _____歳から_____歳まで

勤務中は耳栓を着用していましたか？ 常に着用・時々着用・全然着用せず

耳栓を着用していた年数は？ _____歳から_____歳まで

Q4 家族（父、母、祖父、祖母）の難聴の有無について「あり」か「なし」に○印をつけて下さい。

父の難聴：あり・なし、 母の難聴：あり・なし

父方の祖父の難聴：あり・なし、 父方の祖母の難聴：あり・なし

母方の祖父の難聴：あり・なし、 父方の祖母の難聴：あり・なし

Q5 喫煙したことのある方だけお答え下さい。（本数は平均を記載して下さい）

_____歳から_____歳まで 一日喫煙本数_____本

Q6 飲酒歴についてお答え下さい。飲酒の機会に関する質問は○印をつけて下さい。
飲酒の量に関する質問では、ビール 500ml、もしくは日本酒三合など具体的な飲酒量を記載して下さい。

飲酒の機会はどの程度ですか？ 毎日・ほぼ毎日・週に数回・機会飲酒・なし

_____歳から_____歳まで 飲酒の量 _____

Q7 音楽をよく聴きますか？「はい」か「いいえ」に○印をつけて下さい。

はい・いいえ

Q8 Q7で「はい」に○印をつけた方だけお答え下さい。場所、形態、種類について該当箇所に○印をつけて下さい。

場所：コンサート会場・自宅・マイカー内・電車やバスの中
その他（具体的に_____）

形態：スピーカー・ヘッドホン（耳にあてるタイプ）・イヤホン（耳の中に入れるタイプ）・その他（具体的に_____）

種類：ロック・ジャズ・クラシック・ポップス・演歌
その他（具体的に_____）

Q9 Q7で「はい」に○印をつけた方だけお答え下さい。

音楽を聴く機会はどの程度ですか？ 毎日・ほぼ毎日・週に数回・
一回につき何時間聴きますか？ _____時間

Q10 趣味や娯楽でよく利用する項目がありましたらご記入下さい。

パチンコ : _____歳から_____歳まで、一週間に____日、一日に____時間
カラオケ : _____歳から_____歳まで、一週間に____日、一日に____時間
キャバレー : _____歳から_____歳まで、一週間に____日、一日に____時間
居酒屋 : _____歳から_____歳まで、一週間に____日、一日に____時間
射撃 : _____歳から_____歳まで、一週間に____日、一日に____時間
剣道 : _____歳から_____歳まで、一週間に____日、一日に____時間
バイク : _____歳から_____歳まで、一週間に____日、一日に____時間

Q11 既往歴（今までにかかった病気や、今かかっている病気）と常用薬（現在使用中の薬だけでかまいません）についてお答え下さい。既往歴は該当する項目すべてに○印をつけて下さい。常用薬は薬品名と使用年数をご記入下さい。

既往歴：突発性難聴・メニエール病・慢性中耳炎・真珠腫性中耳炎・耳硬化症
高血圧・狭心症・心筋梗塞・糖尿病・高脂血症・脳梗塞
その他（_____）

常用薬：薬品名____、_____歳から_____歳まで
薬品名____、_____歳から_____歳まで
薬品名____、_____歳から_____歳まで
薬品名____、_____歳から_____歳まで

質問は以上で終了です。ご協力ありがとうございました。

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 谷口 初美 産業医科大学・微生物学教室・教授

研究要旨：

近年、廃棄物処分場で高濃度の硫化水素ガスが発生し、処分場業務従事者が中毒死するという労災事故が多発している。硫化水素ガス発生には微生物の代謝が大きく関与していると考えられているが、環境における微生物叢の挙動を評価する方法がないため、微生物の関与を正確に把握することができない現状である。

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は、廃棄物処分場の危険度予測及び安定化の状況を生物学的観点から評価するために重要であると考えらる。本研究で構築した遺伝子工学的な手法による環境サンプルの微生物叢解析手法を様々な土壌サンプルを対象に実施したところ、幅広い汎用性があることが明らかになった。また、汚染土壌及び非汚染土壌から調製した 16S rDNA の部分断片を保有する約 1 万クローンについて解析結果を得ることが出来た。階層分類の結果、21 の土壌サンプルから 16 門 (phylum)、23 綱 (class)、63 目 (order)、146 科 (family)、415 属 (genus)、822 種 (species) が検出され、幅広く菌叢を網羅した結果が得られた。また、菌叢解析結果から、非汚染土壌と潜在的に硫化水素ガス発生の可能性を有している汚染土壌は、硫酸還元菌とイオウ酸化細菌の全菌数における割合、及び両菌種の存在バランスで特徴付けられることが示唆された。硫化水素ガス発生に関する菌叢解析手法にとどまらず、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の解析手法として幅広く利用出来ると考えられた。

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。たとえばシックハウス症候群でも病原性、非病原性にかかわらず微生物の数が有害要因の一つである。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は労働衛生対策上重要であると考え。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は無かった。その大きな理由として次の 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性である。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サンプルが無い” という事である。確かにこれは環境微生物を対象とする検査方法を確立する上で困難な点である。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。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。このように、廃棄物処分場における微生物叢の分子遺伝学的手法による微生物叢の検出法の確立は、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のみでなく、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

するものと思われる。つまりこの方法は土壌のみならず、空気中、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。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。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℃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、含有量試験及び成分分析を行った。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1μm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：10⁸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の物を選び平均を出す。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0.2μm孔径）でろ過後、バッファー（0.1M phosphate buffer pH8.5、5% NaCl、0.5mMEDTA2Na）を加える。EtBr水溶液を150μl（終濃度100μg/l）に加え、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、100mM：Tris-HCl（pH8.0）。

サンプル0.3gを2.5mlエッペンドルフチューブに入れ、上記DNA抽出溶液0.9mlを加えボルテックスで懸濁させ、40μlのリゾチム溶液（100mg/ml）及び60μlのSDS溶液（30%）を加える。回転震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0.6mlに加え、よく攪拌し15000rpm、5分、20℃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30μl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70μl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)]

粗 DNA 溶液の濃縮

④ DNA 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。[1.0 OD (260nm) ≒ 50 µg/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副産物サイズ約 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 µl
プライマー-F	0.25 µl
プライマー-R	0.25 µl
精製水	11.5 µl
<u>CyberGreen Premix</u>	<u>12.5 µl</u>
Total	25 µl

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 (1min) の 40 サイクルで行った。

菌数既知の大腸菌懸濁液 (JM109 ; 3.3 × 10⁹ 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

16S rDNA の PCR → 大腸菌でのクローニング → シーケンシング → 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'-CCTACGGGAGGCAGCAG-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] × (20) 75°C : 10 分 4°C

大腸菌でのクローニング ;

TOPO TA Cloning Kit (インビトロジェン社) を使用。16S rDNA 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ケンスを行った。

(7) 16S rDNA 塩基配列に基づく菌叢解析

細菌の分類の基準となる各菌種の基準株の 16S rDNA (4,386 件) のみを収集し、相同性検索用のデータベースを新たに作成した。

Phred による波形クオリティー ; moving average window size 10、シーケンスの 5' 末端の quality value (QV) が 10、3' 末端を 30 で設定し、高精度な波形領域が 400bp 以下のデータについては削除した。また、Phred による波形クオリティーチェックをクリアしたデータは、PCR 反応に用いたプライマー (universal) の配列でトリミングを行ない、ベクターとプライマーの配列を削除した。

BLAST 検索 ; Phred による波形クオリティーチェック及びプライマー配列でトリミングが成功したシーケンスは、上記の 16S ribosomal DNA シーケンス DB を対象に BLAST 検索を行なった。Overlap length が 400bp 以上で matching% が 80% 以上の相同性が得られた配列と、この条件を満たさない配列に分けた。Matching% が 80% 以下のデータについては Unclassified とした。

データの集計 ; 投入した塩基配列に対して BLAST 検索で最も高い相同性を示した配列の GeneBank ID から Taxonomy ID を取得した。Taxonomy DB から、その生物種の階層分類表 (門、綱、目、科、属、種) を作成し、集計結果を Excel ファイルで出力した。

このシステムを日立ソフト社の遺伝子解析ソフト

ト DNASIS Space に組み込んで解析を行った。シーケンサーから得られた波形データを大量 (2000 件まで) に入力すると波形のクオリティチェック、ベクタートリミング、BLAST サーチ、階層分類表作成まで全自動で行なうことが可能になった。得られた塩基配列を本解析システムを用い解析を行なった。

C. 研究結果

(1) 土壌のサンプリング

非汚染土壌として、大学構内の土壌と畑の土壌、汚染土壌として不法投棄現場一ヶ所、一般廃棄物処分場 1 ヶ所、海面埋立処分場 2 ヶ所、近隣の土壌と深度別に 24 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, OI) 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、FO 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 (334 mg/ml) が検出された。しかしながら海面埋立処分場である OA、OI 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) 微生物学的検査

各土壌サンプルの菌数計測結果を表 3 に示す。

24 の土壌サンプルの内 21 サンプルから DNA を精製することが出来た。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。平均で 80% 前後の破壊率が得られた (表 4)。

この DNA を鋳型とした PCR を行い、16S rDNA 塩基配列に基づく菌叢解析を行った。

新規に構築した菌叢解析システムのシーケンス精度検定をパスした約 600bp の 16S rDNA 断片を形質転換した大腸菌 9461 (FS ; 1867, IT ; 1498, FK ; 1630, FO ; 1221, OA ; 1940, OI ; 1305) クローンについて解析結果を得た。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 6~14、綱 (Class) では 11~21、目 (Order) では 24~39、科 (Family) で 40~76、属 (Genus) で 58~137 が検出された (表 5)。

各々の土壌の解析結果を以下に示す。

大学構内の土壌 (FS)

表層の土壌 (FS1) で 10^7 cells/g が好気培養法で検出され、最も菌数が多かった。蛍光染色法では、好気培養法の 8~160 倍の菌数が計測され、各サンプルごとの菌数の割合に相関は認められなかった。蛍光染色法と Real time PCR 法の結果を比較すると、FS1~FS4 ではほぼ同等の菌数が検出された (表 3)。

菌叢解析の結果、各々の深度で 7~9 門が分類され、FS サンプル全体で 11 門が検出された (表 5)。門のレベルで解析した結果、深度に関わらず非常に類似した菌叢パターンがみられた (図 1)。どの深度においても *Proteobacteria* に分類される菌種が約 50% を占めていた。*Bacteroidetes*、*Actinobacteria*、及び *Firmicutes* が *Proteobacteria* について検出され、*Bacteroidetes* は深度が深くなるに従い割合が増す傾向がみられたが、その他は深度による増減傾向は認められなかった。未知菌種と考えられる (解析結果が Unclassified) クローンは各々のサンプルで 100 クローン前後 (全体の約 20~30%) 検出され、これらの菌種の分類及び機能について調べる必要がある。硫化水素ガス発生に関与する硫酸還元菌とイオウ酸化細菌の検出率の割合に着目して解析した (表 6)。硫酸還元菌は硫酸イオンを硫化水素に還元し、イオウ酸化細菌は硫化水素を硫酸イオンに酸化するという逆の役割がある。イオウ酸化細菌としては無色硫

黄酸化細菌及び紅色硫黄酸化細菌が検出されたが、緑色硫黄酸化細菌は検出されなかった。硫酸還元菌は、芽胞を形成しない δ -*Proteobacteria* に分類される菌種が多く検出された。FS ではどの深さにおいても、両菌種ともに 2~7% で同程度であり顕著な偏りは見られなかった。

畑土壌 (IT)

表層の土壌 (IT1) で 10^7 cells/g が好気培養法で検出され、深度の深い土壌 (IT2~IT4) の約 10 倍の菌数であった。蛍光染色法でも深度が深くなるに従い菌数が減少する傾向がみられたが、いずれのサンプルでも好気培養法の約 100 倍の菌数が計測された。IT2 は好気培養法で 10^6 cells/g、蛍光染色法で 10^8 cells/g の菌が検出されたにも関わらず DNA が抽出出来なかった為、Real time PCR 法による菌数計測は実施出来なかった。IT3 及び IT4 の Real time PCR 法による菌数計測では、蛍光染色法の約 1/4 の菌数が計測された。しかしながら IT1 では 1/20 と検出菌数が比較的少なかった (表 3)。

IT1 で 8、IT3 で 9、IT4 で 9 門が検出され、属レベルでも各々 82、100、107 属が検出され、深度が深くなるに多様性が広がる傾向が見られた (表 5)。門のレベルで解析した結果、FS サンプル同様深度に関わらず非常に類似した菌叢パターンがみられた (図 2)。最も優勢を示したのは *Proteobacteria* 門であった。しかしながら FS サンプルとは異なり、深度が深くなるに従いその割合が増加した。表層の IT1 の 28% の検出率に対し、最深部の IT4 では約 2 倍の 60% を占めた。*Actinobacteria* が *Proteobacteria* について優勢を示したが、その他の門は 5% 未満であった。FS サンプルでは第 2 優占種が *Bacteroidetes* であり、門のレベルでも菌叢の差異が明確になった (図 2)。未知菌種は表層で約 40% 検出されたが、深度が深くなるに従い減少し、IT4 では約 15% に激減した。

IT1、3 は非常に類似した菌叢パターンであったが、それらと比較して最深部の IT4 では α -*Proteobacteria* 及び β -*Proteobacteria* が顕著に多く、この 2 門で全体の 50% を占めていた。 α -

Proteobacteria では *Rhizobiales* 目に分類される菌種が多く、特に *Rhodospseudomonas* 属菌が 38 クローン検出された。本菌は硫黄を還元力として利用出来ない光合成細菌で、主に日光の当たる嫌気的な環境に分布する。しかしながら検出された IT4 は地下 3m の土壌であり、光りの届く環境ではない。環境中での微生物の生理作用には未知の多様性がある可能性が示唆された。いずれの IT サンプルからも *Gemmatimonadetes* 門の *Gemmatimonas* 属の菌種が 8~20 クローン検出された。本菌は近年、16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析から、いかなる既存菌株とも配列相同性が極めて低く、「門」という細菌系統内の最高分類階級レベルで他者と隔たっていることが明らかとなった菌である。土壌中にはこのような未知の菌種が数多く手付かずで残っていることが推察された。特に IT1 は未分類菌種が多く、新菌種を探索する為の有用なサンプルと考えられた。

硫酸還元菌とイオウ酸化細菌の検出率は FS サンプル同様に低く (1.0~3.5%)、また深度に関係なく大きな偏りは見られなかった。この傾向は、硫化水素ガス発生とは無縁な土壌の特徴として位置付けられる可能性が示唆された (表 6)。

不法投棄現場土壌 (FK)

不法投棄現場近隣の山土 (FK1)、及び不法投棄現場の表層土壌 (FK2) の好気培養で検出された菌数は 10^6 cells/g のオーダーで、深度の深い FK3、FK4 より一桁少ない結果となった。蛍光染色法の結果は FK2 (10^8 cells/g) 以外は約 10^9 cells/g で、好気培養の 100~1000 倍の菌数が検出された。一方 Real time PCR 法では蛍光染色法の 1/15 から 1/4 の菌数が計測された。蛍光染色法と Real time PCR 法による各サンプルの菌数の割合は同様の傾向を示したが、好気培養法の結果は深度が深いサンプルで菌数が増える傾向がみられ、他の方法と異なった (表 3)。

門のレベルで解析した結果、FK1 は *Proteobacteria*、次に *Firmicutes*、*Actinobacteria* の順で検出率が高く、多様性に富んだ菌叢がうかがわれた。FK2 では、未分類菌が 30% を占め、は FS2 と良く似

たパターンを示した(図3)。一方深度の深いFK3とFK4では*Bacteroidetes*の割合が高く、FK1とFK2とは大きく異なった。また深度による未分類菌の割合には変化は認められなかった。FK3とFK4の綱の分布は門のレベルと同様非常に良く似ていた。他のサンプルと比較するとFS4のサンプルと近似で、 β -*Proteobacteria*が優占種であった。硫酸還元菌とイオウ酸化細菌の検出率はFK1とFK2、FK3とFK4で大きく異なった(表6)。FK1とFK2では両菌種の検出率は1.0~1.8%と低く、対照土壌であるFS及びITサンプルと同程度であった。しかしながら深度の深いFK3ではイオウ酸化細菌と類似のクローンが63個検出され、その検出率は15.2%と高頻度であった。FK4では、硫酸還元菌とイオウ酸化細菌がそれぞれ18及び35クローン検出された。この不法投棄現場の土壌は、硫化水素ガスが問題となって約1年後に土壌をサンプリングした。土壌を採取した時は、硫化水素ガスの発生はほとんど沈静化しており、この菌叢はイオウの循環が活性化しつつある状況を反影している可能性がある。硫酸還元菌の菌種は対照土壌と同様に δ -*Proteobacteria*綱に属する菌種が検出されたが、イオウ酸化細菌は β -*Proteobacteria*綱*Hydrogenophilales*目に分類される無色硫黄酸化細菌の*Thiobacillus*属菌が大量に検出され、対照土壌と異なった。この*Thiobacillus*属菌は偏性好気性菌であり、IT4検出された*Rhodopseudomonas*属菌と同様、嫌気度が高いと考えられる深度の深い環境中での生理状態に関する興味深い知見が得られた。

管理型廃棄物処分場土壌(FO)

好気培養の結果は、FO1(近隣の山土)とFO2(覆土)で 10^7 cells/g、最深部の不燃ゴミの層であるFO4からは 10^6 cells/g検出されたが、焼却灰の層であるFO3では 10^2 cells/gと極端に検出菌数が少なかった。FO3サンプルは蛍光染色法の検出限界以下の菌数と推察され、またDNAの抽出が不可能であったためReal time PCR法による菌数計測は出来なかった。FO1、FO2及びFO4は蛍光染色法及びReal time PCR法で、いずれも

10^8 cells/g前後の菌数が計測された。また蛍光染色法とReal time PCR法の菌数の差は3~8倍であった。深度の深いFO4サンプルでその差が最大となった(表3)。菌叢解析の結果、FO1で7、FO2で8、FO4で6門が検出された。属レベルでも各々88、90、71属が検出され、他のサンプルと比較して検出された菌種の数が最も少なく多様性に乏しいサンプルと考えられた(表5)。近傍の山土であるFO1では*Proteobacteria*門(30%)、*Bacteroidetes*門(18%)、*Firmicutes*門(7%)の順で検出された。FO1と同様に表層の土壌であるFO2は、*Bacteroidetes*門(44%)、*Proteobacteria*門(33%)が優勢を示し、FO1と異なった。FO4では*Firmicutes*門(40%)と*Proteobacteria*門(38%)が優占種として検出され、FOサンプルは門のレベルでそれぞれ異なる菌叢を呈していた。未分類菌はFO1で最も多く検出された。FO4は*Clostridia*、*Bacilli*といった*Firmicutes*門に分類される芽胞形成菌を含む菌種が多く、他のサンプルと顕著な違いが認められた。属レベルでは、*Bacilli*綱の*Bacillus*属、*Clostridia*綱の*Clostridium*及び*Desulfotomaculum*属の菌種が高い割合を占めていた。

硫酸還元菌とイオウ酸化細菌の検出率は表層土壌(FO1とFO2)と深度の深い廃棄物の層(FO4)で大きく異なった(表6)。FO1とFO2では両菌種の検出率は0.9~4.0%と低く、対照土壌であるFS及びITサンプルと同程度であった。また、両サンプルでイオウ酸化細菌の検出率が硫酸還元菌を大きく上回っていた。FO4ではイオウ酸化細菌と硫酸還元菌のバランスは取れているが、その検出率は18%(イオウ酸化細菌)、13.2%(硫酸還元菌)と高頻度であった。また、FS、IT及びFKのサンプルで検出された硫酸還元菌はほとんど芽胞を形成しない*Proteobacteria*門に属する菌種であったが、FO4では、*Firmicutes*門に分類される芽胞形成能を有する*Desulfotomaculum*属の菌種が高頻度(42クローン; 12.6%)で検出された(表6)。硫酸還元菌は環境中に広く分布する細菌であるが、廃棄物処分場等で硫化水素ガス発生に関与する主な菌種は、*Firmicutes*門に分類され

る *Desulfotomaculum* 属等の芽胞形成能を有する菌種である可能性が示唆された。

海面埋立処分場の土壌 (OA)

好気培養法と蛍光染色法による菌数計測結果は他の土壌と比較して非常に大きな差異が見られた。覆土である OA1 と最つとも深い OA4 では好気培養法の約 1000 倍の菌数が蛍光染色法で検出された。特に OA2 及び OA3 では共に約 100000 倍の違いが有った。蛍光染色法と Real time PCR 法の比較では、最深部の OA4 で 19 倍の差異がみられたものの、その他のサンプルでは 2~4 倍の範囲に収まった (表 3)。

門レベルでの菌叢解析の結果、他のサンプルに見られない顕著な特徴が認められた (図 5)。覆土である OA1 では *Firmicutes* 門の検出率が 1.5% と低く、*Proteobacteria* 門が 57% で優占種であったが、深度に依存して *Proteobacteria* 門の割合が減少し、逆に *Firmicutes* 門が増加した。最深部の OA4 では、*Firmicutes* 門が 42% で *Proteobacteria* 門 (24%) を上回った。その他の門としては *Bacteroidetes* 門と *Actinobacteria* 門が比較的高頻度に検出されたが、深度に依存した増減は認められなかった。深度に依存して増加した *Firmicutes* 門の菌種はほとんど *Clostridia* 綱に属する菌種であった。最深部の OA4 では *Clostridium*、*Tindallia* 属菌がそれぞれ 50、59 クローン検出された。これらの菌種は芽胞を形成する菌種で、これらの増加が顕著であった。

硫酸還元菌とイオウ酸化細菌の検出率は他のサンプルと大きく異なった (表 6)。表層の OA1 では硫酸還元菌は全く検出されなかったが、イオウ酸化細菌は 66 クローン検出された。深度が深くなるに従い 0.5m の OA2 ではイオウ酸化細菌と硫酸還元菌の検出クローン数は 16:6、1.5m の OA3 では 16:3、最深部 3.0m の OA4 では 6:13 と逆転した。つまり、表層ではイオウ酸化細菌が多いが、深いところでは硫酸還元菌が多いことが明らかになった。また、硫酸還元菌の種類は FO4 と同様、*Firmicutes* 門に分類される芽胞形成能を有する *Desulfotomaculum* 属の菌種が多く検出され

た (表 6)。

海面埋立処分場の土壌 (OI)

OA とは場所が異なるが、同じ海面埋立処分場の土壌である OI についても OA と類似した傾向が見られた。好気培養法で検出される菌数が深度が深まるに従い減少する傾向は特に顕著であった。蛍光染色法と Real time PCR 法の比較でも、深度に従い菌数の差が大きくなる傾向が見られた。OI4 では、畑土壌の IT2 と同様に蛍光染色法で有る程度 (10^8 cells/g) の菌数が検出されたにも関わらず DNA が抽出出来ず、Real time PCR 法での菌数計測は出来なかった (表 3)。

覆土である OI1 では OA1 と同様 *Proteobacteria* 門が 55% で優占種であり、ついで *Bacteroidetes* 門が 13% 検出され、良く似た菌叢パターンであった。深度依存性は OA ほど顕著ではなかったが、OI2 と OI3 では *Proteobacteria* 門の割合が減少し、逆に *Firmicutes* 門が増加した。OI1 及び OI2 で検出された *Firmicutes* 門の菌種はほとんど *Clostridia* 綱に属する菌種であったが、OA と異なり *Tindallia* 属菌の検出数は少なかった。

硫酸還元菌とイオウ酸化細菌の検出率は、覆土の OI1 ではイオウ酸化細菌と硫酸還元菌の検出クローン数は 26:0、0.5m の OI2 では 4:28、1.5m の OI3 では 17:13 であり、OA サンプルと同様に深度によってバランスが大きく偏っていた。硫酸還元菌の種類は OA と同様、*Firmicutes* 門に分類される芽胞形成能を有する菌種が多かったが、*Desulfotomaculum* 属と類縁の *Desulfosporosinus* 属の菌種が多く検出された (表 6)。

D. 考 察

土壌中には $10^7 \sim 10^9$ cells/g の菌が分布していることが蛍光染色法及び Real-time PCR 法によって明らかになった。この膨大な菌数を含むサンプルを対象に遺伝子工学の手法を用いて菌叢を解析する為には、相応しいクローン数の解析が必要である。今回構築した解析システムではシーケンサーから得られる塩基配列の波形データを大量に一括入力することで、門 (phylum)、綱 (class)、

目 (order)、科 (family)、属 (genus)、種 (species) までの生物学的階層分類が可能となり、分類されたクローンの階層ごとの集計までが全自動で出来るようになった。16S ribosomal DNA のデータベースの整備や、相同性解析方法の検討等、改良すべき部分もあるが今後サンプルを大量に処理する為には有用な手段になると考えられた。

本解析システムで約 1 万クローンについて解析結果を得ることが出来た。階層分類の結果、今回用いたサンプルから 16 門、23 綱、63 目、146 科、415 属が検出された (表 1)。Bergey's Manual に記載されている各々の階層の種数は、23 門、32 綱、77 目、182 科、872 属であり、門、綱で約 70%、目、科で約 80%、属でも約 40%を網羅した結果となった。この結果は、本研究で用いた遺伝子工学的手法が、サンプル中の特定の菌種だけを取り上げて解析しているのではなく、偏りの少ない全菌叢を反映した解析結果を提供していることを示唆している。今回、対照土壌 (非汚染土壌) 2 箇所 (FS、IT)、不法投棄現場 1 箇所 (FK)、一般廃棄物処分場 1 箇所 (FO)、海面埋立処分場 2 箇所 (OA、OI) と異なる性状の土壌サンプルを対象として実験を行なったが、各階層で検出される種の数には大きな差異は認められなかった。校庭の土や畑の非汚染土壌であっても、pH や塩濃度が極めて高い廃棄物処分場であっても同程度に多様性のある菌叢を有していることが明らかになった。また、多様性については、深度による影響もほとんど認められなかった。

イオウ循環に関与すると考えられる菌種について解析した結果、対象土壌の特徴の一つとして、硫酸還元菌とイオウ酸化細菌の割合が低いことが挙げられる。今回用いた FS と IT のサンプルでは両菌種は 1.0~6.1%の範囲であった。汚染土壌である不法投棄現場の深度の深いサンプル (FK4) や、廃棄物処分場の廃棄物層 (FO4) では、硫酸還元菌とイオウ酸化細菌のバランスは取れていたが約 10~20%検出され、非汚染土壌よりも顕著に高い割合であった。海面埋立処分場の OA4、OI2、では硫酸還元菌とイオウ酸化細菌のバランスが大きく偏り、硫酸還元菌が高頻度で検出された。硫

化水素ガス発生の観点から考察すると、非汚染土壌と潜在的に硫化水素ガス発生の可能性を有している汚染土壌とでは、硫酸還元菌とイオウ酸化細菌の全菌数における割合、及び両菌種の存在バランスで特徴付けられると考えられた。

対照土壌 (非汚染土壌) である FS、IT の土壌と不法投棄現場 (FK) の土壌からは *Desulfovibrio*、*Desulfofrigus*、*Desulfobulbus* 属等の δ -*Proteobacteria* 綱の硫酸還元菌が主に検出された。不法投棄現場は、本来自然の土壌に汚染物質が投棄された場所である。不法投棄現場で起きた硫化水素ガスの大量発生は、自然の土壌に一般的に分布している *Desulfovibrio* 属等の菌種が、不法投棄による環境変化によって異常増殖を起こしたことに起因すると推察された。一方、廃棄物処分場では、*Firmicutes* 門に分類される *Desulfotomaculum* 属や *Desulfosporosinus* 属等の芽胞形成能を有する菌種が多く、 δ -*Proteobacteria* 綱の硫酸還元菌はほとんど検出されなかった。これは、廃棄物処分場に埋められている焼却灰の影響であると考えられた。焼却灰は pH や塩濃度が極めて高く、焼却灰が混入した土壌は一般的な土壌とは理化学的性状を大きく異にする。この特殊な環境で生存可能な菌種、つまり、芽胞を形成し、過酷な環境に耐えうる菌種が残ったと考えられた。OA2、OA3、OA4、OI2、OI3 では、*Firmicutes* 門に分類される *Clostridium* 等の有芽胞菌が高頻度で検出されており、この考察を支持する結果となった。これらのことから、不法投棄現場と廃棄物処分場では、硫化水素ガス発生に関わる硫酸還元菌の種類が異なることが示唆された。

様々な土壌サンプルの菌叢を各階層別に解析すると、門のレベルでもその菌叢の違いを有る程度反影することが明らかになった。非汚染土壌では、深度による菌叢パターン変化は少ないが、汚染土壌では、近隣の土や覆土等と大きな菌叢の変化があった。また、綱以下のレベルで解析すると、門の菌叢パターンが類似していても、そこに検出された菌種が異なり、その土壌を特徴付ける菌叢を見ることができた。今回はイオウ循環に関わる菌種に着目した解析を行なったが、水素、炭素、及

び窒素循環に関与する菌種について解析を行なうことも可能である(図7)。ほとんどの細菌は、環境中で物質循環に何らかの関わりを持って生存していると考えられる。しかしながら、それら全てを培養法で検出し、解析するのは極めて困難である。今回、遺伝子工学的手法で検出した硫酸還元菌やイオウ酸化細菌の中には培養が困難な菌種も含まれているが、本手法ではそれらの菌種も全菌叢の一部として網羅していた。硫化水素ガス発生に関する菌叢解析手法にとどまらず、環境サンプルの解析手法として幅広く利用出来ると考えられた。

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壤に試みた。その結果、幅広い汎用性を有しており、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、複数の汚染土壤、処分場の土壤、及び健全な土壤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。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

論文

谷口初美、福田和正、王岩、山内和紀、市原剛志、水野康平、石松維世、世良暢之、濱崎光宏、高橋浩司、堀川和美・土壤細菌叢評価法の構築—廃棄物処分場の硫化水素ガス発生対策のため—・J. UOEH・2004・26(3)・349-367

Hinoue M.・Fukuda K.・Wan Y.・Yamauchi K.・Ogawa H.・Taniguchi H.・An effective method for extracting DNA from contaminated soil due to industrial waste.・J. UOEH・2004・26(1)・13-21

Fukuda K.・Wan Y.・Hinoue M.・Yamauchi K.・Taniguchi H.・The cultivation-independent

approach for determining microbial flora in contaminated soil・Modern Landfill Technology and Management (Proceedings of the Third Asian-Pacific Landfill Symposium in Kitakyushu 2004)・2004・728-731

Mizuno K.・Gitahi K.・Fujii A.・Shiraishi A.・Fukuda K.・Taniguchi H.・Analysis of bacterial community structure in illegally dumped industrial waste・Modern Landfill Technology and Management (Proceedings of the Third Asian-Pacific Landfill Symposium in Kitakyushu 2004)・2004・417-421

学会発表

福田和正、王岩、小川みどり、宮本比呂志、谷口初美：汚染及び非汚染土壤の細菌叢解析・第57回日本細菌学会九州支部総会、福岡、2004.9.3

堀川和美、濱崎光宏、高橋浩司、世良暢之、谷口初美：不法投棄現場土壤中の硫酸還元菌について・第57回日本細菌学会九州支部総会、福岡、2004.9.3

王岩、福田和正、樋上光雄、山内和紀、小川みどり、宮本比呂志、谷口初美：産業医科大学の土壤の深度別細菌叢・第77回日本細菌学会総会、大阪、2004.4.3

樋上光雄、王岩、福田和正、山内和紀、小川みどり、宮本比呂志、谷口初美：畑土壌における深度別細菌叢評価・第77回日本細菌学会総会、大阪、2004.4.3

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壤の細菌叢解析・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：不法投棄現場土壤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)
- (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
大学構内の土壌	FS1	2003/8/5	0.0	スコップ	非汚染土壌
	FS2	〃	0.3	ハンドオーガ	〃
	FS3	〃	1.5	ハンドオーガ	〃
	FS4	〃	3.0	ハンドオーガ	〃
畑土壌	IT1	2003/5/27	0.3	スコップ	非汚染土壌
	IT2	〃	1.0	ハンドオーガ	〃
	IT3	〃	2.0	ハンドオーガ	〃
	IT4	〃	3.0	ハンドオーガ	〃
不法投棄現場 (山間部)	FK1	2002/9/14	0? 0.3	スコップ	近隣の山土
	FK2	〃	0? 0.3	スコップ	産業廃棄物
	FK3	〃	1.5	重機	産業廃棄物
	FK4	〃	3.0	重機	産業廃棄物
一般廃棄物処分場 (山間部)	F01	2003/2/25	0? 0.2	スコップ	近隣の山土
	F02	〃	0? 0.2	スコップ	覆土
	F03	〃	3.0	重機	焼却灰 (飛灰)
	F04	〃	5.0	重機	不燃ゴミ
海面埋立処分場 (海辺)	OA1	2003/9/17	0.0	スコップ	覆土
	OA2	〃	0.5	重機	焼却灰及び土
	OA3	〃	1.5	重機	焼却灰及び土
	OA4	〃	3.0	重機	焼却灰及び土
海面埋立処分場 (海辺)	OI1	2003/9/18	0.0	スコップ	覆土
	OI2	〃	0.5	重機	焼却灰及び土
	OI3	〃	1.5	重機	焼却灰及び土
	OI4	〃	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	IT-1	IT-2	IT-3	IT-4	FO-1	FO-2	FO-3	FO-4
		表土	0.3m	1.5m	3m	表土	1m	2m	3m	山土	覆土	3.0m	5.0m
pH	?	8.4	7.2	8.7	8.7	6.3	6.5	6.4	6.4	7.6	8.3	12.6	8.6
電気伝導率	nS/m	11.2	1.12	13.6	15.4	6.27	11.0	3.02	2.45	2.7	12.4	1090	459
全窒素	mg/l	1.7	0.6	1.0	1.3	0.4	1.5	0.2	0.3	0.9	0.6	6.4	5.6
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
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
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
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
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
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
鉄	mg/l	0.29	0.46	0.89	0.85	0.033	0.066	0.20	0.19	0.86	0.31	< 0.03	0.03
マンガン	mg/l	< 0.005	0.012	0.006	0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0.014	0.075	< 0.005	< 0.005	0.032
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
亜鉛	mg/l	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0.014	0.017	0.009	0.007	0.008	0.007	0.063	0.014
ナトリウムイオン	mg/l	0.1	0.8	4.7	5.5	1.1	1.1	1.5	1.6	1.8	5.1	666	399
カリウムイオン	mg/l	2.5	0.2	1.8	2.1	2.9	1.4	0.1	0.2	2.3	3.1	586	336
マグネシウムイオン	mg/l	1.8	0.2	1.7	3.0	0.8	1.8	0.7	0.5	< 0.1	1.7	< 2	1.8
カルシウムイオン	mg/l	9.3	2.3	9.8	12.7	5.2	10.9	3.6	2.8	0.3	10.7	577	221
塩化物イオン	mg/l	0.6	0.5	0.3	0.5	0.7	1.8	0.8	0.8	2.5	6.6	2400	1440
硫酸イオン	mg/l	2.1	1.0	19.2	24.4	19.9	36.2	9.4	7.0	0.5	6.7	< 2	55.1

項目	単位	FO-1	FO-2	FO-3	FO-4	OA-1	OA-2	OA-3	OA-4	OI-1	OI-2	OI-3	OI-4
		山土	覆土	3.0m	5.0m	表土	0.3m	1.5m	3m	表土	0.3m	1.5m	3m
pH	?	7.6	8.3	12.6	8.6	7.1	10.6	11.1	11.2	9.4	11.1	10.3	10.9
電気伝導率	nS/m	2.7	12.4	1090	459	166	129	165	130	112	51.1	198	222
全窒素	mg/l	0.9	0.6	6.4	5.6	0.9	1.2	1.5	0.8	1.4	0.9	5.9	6.2
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	0.010	0.001
鉛	mg/l	< 0.005	< 0.005	0.042	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0.012	0.019
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
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
砒素	mg/l	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0.006	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 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
鉄	mg/l	0.86	0.31	< 0.03	0.03	0.18	0.028	0.016	0.020	0.048	0.037	0.048	0.022
マンガン	mg/l	0.075	< 0.005	< 0.005	0.032	0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005
銅	mg/l	< 0.005	< 0.005	0.31	0.034	< 0.005	0.037	0.059	0.076	0.066	0.042	0.77	0.44
亜鉛	mg/l	0.008	0.007	0.063	0.014	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
ナトリウムイオン	mg/l	1.8	5.1	666	399	235	77.1	92.1	64.3	52.7	20.9	157	198
カリウムイオン	mg/l	2.3	3.1	586	336	21.0	56.6	85.7	63.9	27.9	15	82.7	102
マグネシウムイオン	mg/l	< 0.1	1.7	< 2	1.8	12.3	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.3	< 0.1	< 0.1	< 0.1
カルシウムイオン	mg/l	0.3	10.7	577	221	54.8	108	117	94	134	39.8	170	153
塩化物イオン	mg/l	2.5	6.6	2400	1440	435	333	464	282	158	31.7	645	704
硫酸イオン	mg/l	0.5	6.7	< 2	55.1	206	105	39.1	63.0	325	83.0	26.6	28.9

表3 各種計測手法による土壌中の菌数計測結果

		好気培養 (CFU/g)	蛍光染色 (Cells/g)	Real-time PCR (E. coli換算菌数/g)
大学構内の土壌	FS1	2.1×10^7	$3.4 \pm 1.6 \times 10^9$	$2.0 \pm 0.9 \times 10^9$
	FS2	2.9×10^6	$1.5 \pm 0.7 \times 10^8$	$1.5 \pm 1.1 \times 10^8$
	FS3	6.1×10^6	$5.1 \pm 0.5 \times 10^7$	$4.3 \pm 3.4 \times 10^7$
	FS4	3.9×10^6	$1.1 \pm 0.4 \times 10^8$	$2.6 \pm 1.1 \times 10^7$
畑土壌	IT1	$1.9 \pm 0.4 \times 10^7$	$9.6 \pm 1.4 \times 10^8$	$4.8 \pm 0.1 \times 10^7$
	IT2	$2.8 \pm 1.2 \times 10^6$	$1.6 \pm 0.6 \times 10^8$	未実施
	IT3	$1.9 \pm 1.0 \times 10^6$	$8.3 \pm 5.1 \times 10^7$	$2.6 \pm 0.4 \times 10^7$
	IT4	$1.2 \pm 0.1 \times 10^6$	$8.7 \pm 4.2 \times 10^7$	$1.9 \pm 1.0 \times 10^7$
不法投棄現場	FK1	$5.5 \pm 0.1 \times 10^6$	$1.7 \pm 1.6 \times 10^9$	$1.5 \pm 0.7 \times 10^8$
	FK2	$8.1 \pm 0.9 \times 10^6$	$5.2 \pm 2.3 \times 10^8$	$3.5 \pm 0.1 \times 10^7$
	FK3	$2.9 \pm 0.4 \times 10^7$	$1.7 \pm 0.2 \times 10^9$	$4.3 \pm 0.7 \times 10^8$
	FK4	$2.7 \pm 0.1 \times 10^7$	$2.3 \pm 0.2 \times 10^9$	$3.0 \pm 0.3 \times 10^8$
管理型処分場	FO1	$4.8 \pm 0.7 \times 10^7$	$4.2 \pm 2.7 \times 10^8$	$1.2 \pm 0.2 \times 10^8$
	FO2	$2.4 \pm 0.3 \times 10^7$	$3.4 \pm 2.6 \times 10^8$	$9.8 \pm 2.4 \times 10^7$
	FO3	$3.5 \pm 0.4 \times 10^2$	$< 1.2 \times 10^6$	未実施
	FO4	$4.3 \pm 0.4 \times 10^6$	$6.1 \pm 2.4 \times 10^8$	$7.1 \pm 0.1 \times 10^7$
海面埋立処分場	OA1	$(9.4 \pm 4.5) \times 10^5$	$4.1 \pm 1.1 \times 10^8$	$1.1 \pm 0.3 \times 10^8$
	OA2	$(1.5 \pm 1.5) \times 10^4$	$9.0 \pm 0.8 \times 10^8$	$4.0 \pm 3.8 \times 10^8$
	OA3	$(8.8 \pm 3.5) \times 10^3$	$5.7 \pm 2.3 \times 10^8$	$2.9 \pm 3.9 \times 10^8$
	OA4	$(2.6 \pm 1.6) \times 10^5$	$3.4 \pm 0.5 \times 10^8$	$1.8 \pm 0.6 \times 10^7$
海面埋立処分場	OI1	$(9.2 \pm 2.4) \times 10^5$	$5.5 \pm 2.1 \times 10^8$	$1.5 \pm 0.1 \times 10^8$
	OI2	$(4.4 \pm 0.4) \times 10^4$	$3.1 \pm 1.2 \times 10^8$	$4.0 \pm 2.1 \times 10^7$
	OI3	$(3.6 \pm 2.0) \times 10^3$	$4.4 \pm 3.3 \times 10^8$	$4.3 \pm 0.9 \times 10^7$
	OI4	$(1.7 \pm 0.7) \times 10^2$	$5.9 \pm 2.2 \times 10^8$	未実施