

b211

ISSN 1340-2676

岐阜県保健環境研究所報

第 6 号
平成 10 年

Report of Gifu Prefectural Institute
of Health and Environmental Sciences
No.6, 1998

岐阜県保健環境研究所

Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences

岐阜県保健環境研究所報

第 6 号
平成 10 年

Report of Gifu Prefectural Institute
of Health and Environmental Sciences
No.6, 1998

岐阜県保健環境研究所

Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences

目 次

<資 料>

- 伊自良湖周辺土壌のpH及び交換性アルミニウム 1
野村泰之, 角田 寛, 加藤邦夫
- カテキンによるキヌレニナーゼ, キヌレニン-3-ヒドキシラーゼ活性阻害 6
今井準三
- 模擬処分場における埋立廃棄物の安定化に関する調査 13
安田 裕, 原 信行, 寺尾 宏, 西垣康広, 島田 忠, 藤吉加一, 乙部貞夫
- 浄化槽におけるサルモネラ菌および腸管出血性大腸菌O157の挙動 19
南部敏博, 所 光男
- 岐阜県におけるQ熱リケッチアの血清疫学調査 22
野田伸司, 猿渡正子, 所 光男
- ヒノキオイルを配合した温泉モデル浴用剤の試作研究 25
坂井至通
- 岐阜県内で発生したヒスタミン中毒を疑う事例について 31
国島 幸, 奥村直尊, 中屋謙一, 清水義則, 市橋 正, 岩田康夫, 山川 隆

<他誌掲載論文> 38

<学 会 報 告> 40

CONTENTS

<REPORTS>

- Acidity and Exchangeable Aluminium of Soil around Ijira Pond 1
Yasuyuki NOMURA, Hiroshi SUMIDA, Kunio KATO
- Inhibition of Kynureninase and Kynurenine-3-hydroxylase by Catechins 6
Junzo IMAI
- Investigation on Stabilization of the Experimental Landfill
for Industrial Waste 13
Yutaka YASUDA, Nobuyuki HARA, Hiroshi TERAO, Yasuhiro NISHIGAKI,
Tadashi SHIMADA, Kaichi FUJIYOSHI, Sadao OTOBE
- Behavior of *Salmonella enteritidis* or *Escherichia coli* O157
in Small Wastewater Treatment Plant 19
Toshihiro NAMBU, Mitsuo TOKORO
- Seroepidemiological Study of *Coxiella burnetii* in Gifu Prefecture 22
Nobuji NODA, Seiko SAWATARI, Mitsuo TOKORO
- Study on the Trial Combination of Hinoki Oil
for the Bath Medicines Modelled by Hot Springs 25
Yoshimichi SAKAI
- Case Studies on Food Poisoning Symptoms by Histamine in Gifu Prefecture 31
Miyuki KUNISHIMA, Naotaka OKUMURA, Ken-ichi NAKAYA, Yoshinori SHIMIZU,
Tadashi ICHIHASHI, Yasuo IWATA, Takashi YAMAKAWA

<PUBLICATIONS> 38

<PRESENTATIONS> 40

伊自良湖周辺土壌のpH及び交換性アルミニウム

野村 泰之, 角田 寛, 加藤 邦夫

要 旨

岐阜市の北約15 kmに位置する伊自良湖周辺で、昭和63年度から平成9年度までの10年間、環境庁の委託で酸性雨総合モニタリング調査(雨水, 湖水, 土壌, 山林の植生)を実施した。このうち、土壌のpH及び交換性アルミニウムのデータを取りまとめた。

地点毎のpHの通年平均値は、表層で4.2~4.5, 次層で4.5~4.8の範囲であった。表層と次層を比較すると、いずれの地点も表層が平均値で0.3低かった。5地点の全平均値の経年変化は、表層・次層とも低下傾向であった。地点毎の交換性アルミニウムの通年平均値は、表層で10.47~13.75 me/100g, 次層で4.62~8.81 me/100gの範囲であった。表層と次層を比較すると、いずれの地点も表層が高かった。5地点の全平均値の経年変化は、表層では漸増傾向にあったが、次層はおおむね横ばい傾向であった。pHと交換性アルミニウムの関係を見ると、pHの低い地点では交換性アルミニウムが高く、同一地点では表層の方が次層よりpHが低く交換性アルミニウムは高かった。

キーワード: 土壌, pH, 交換性アルミニウム, 酸性雨

1 はじめに

昭和63年度から平成9年度まで(1988~1997)の10年間、環境庁の委託で岐阜県山県郡伊自良村長滝に位置する伊自良湖周辺を対象として、酸性雨総合モニタリング調査^{1,2)}(雨水, 湖水, 土壌, 山林の植生)を実施した。このうち、土壌のpH及び交換性アルミニウムのデータを取りまとめたので報告する。

2 伊自良湖周辺地域の概要

伊自良湖は、図1に示すように、岐阜市の北約15 kmに位置し、周囲約4 km, 面積約0.1 km², 貯水量約50万トンの農業用水用人造湖である。伊自良湖周辺は、標高約110mで周囲は約300~600mの山々に囲まれた谷間で、桧や杉の植林地帯と赤松や雑木林の地域が入り組んでいる。

自然景観に恵まれているため、キャンプ場などの施設があるが、特に目立った水質汚濁の発生源はない。また、南部には岐阜市等の大気汚染源の集中地域があるが、ある程度の距離を保っており、他には大気汚染の発生源はほとんどない地域である。

当地域の降水量は、酸性雨調査のための装置で採取した雨量から年間降水量を算出すると、1,800~3,000

mm程度で、岐阜市内の年間約2,000 mm(岐阜地方気象台の平年値1,933.7 mm)よりやや多い。

この付近の地質は、古生代二疊紀に属し、チャート及び粘板岩からなり、土壌は褐色森林土である。

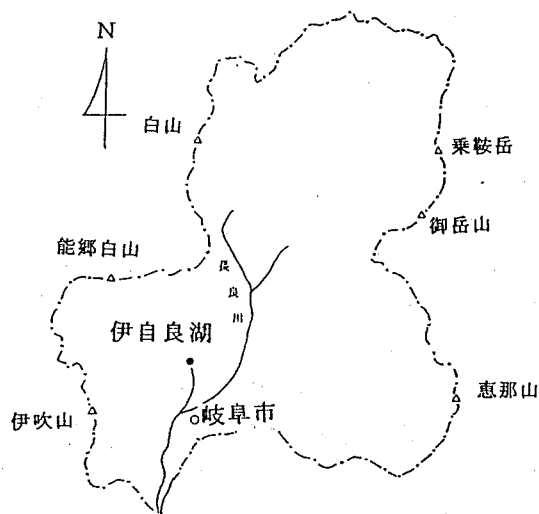


図1 伊自良湖の位置

3 調査方法

3.1 調査地点

伊自良湖周辺で、昭和63年度に選定した50調査地点のうち、継続調査を行ったNo.37, No.38, No.41, No.46及びNo.49の5地点(図2)を対象とした。

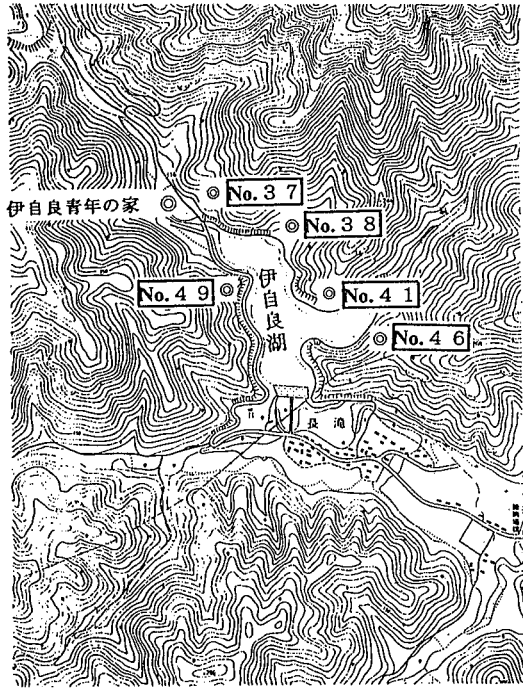


図2 調査地点の位置

3.2 試料採取と取扱い方法

土壌は、毎年秋(10~11月の間)に、A0層(落葉落枝のたい積層)を除いた表層、次層を区分して採取し、未風化物、礫等の混入があれば、現地でこれらを除去した。また、分析は採取した土壌を目開き2mmの篩で粒度を調製した後実施した。

測定地点の検体数は、初年度は1地点1検体であったが、次年度以降は1地点につき数メートルずつ離れた5ポイントで採取したので、5検体の分析結果の平均値を地点毎のデータとした。なお、土壌の採取場所は、毎年杭により確認した。

なお、pHに供する試料の扱いは、前の5年は風乾土としたが、後の5年は未風乾土とした。また、試料/水比は、2~4年目は20g/100gとしたが、他の6年は20g/50gとした。

3.3 分析方法

pHの分析方法は、図3に示す手順に従い、ガラス電極法により測定した。

交換性アルミニウムは、図4に示す手順により測定し、含水率で補正した。

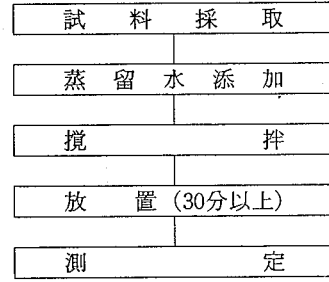
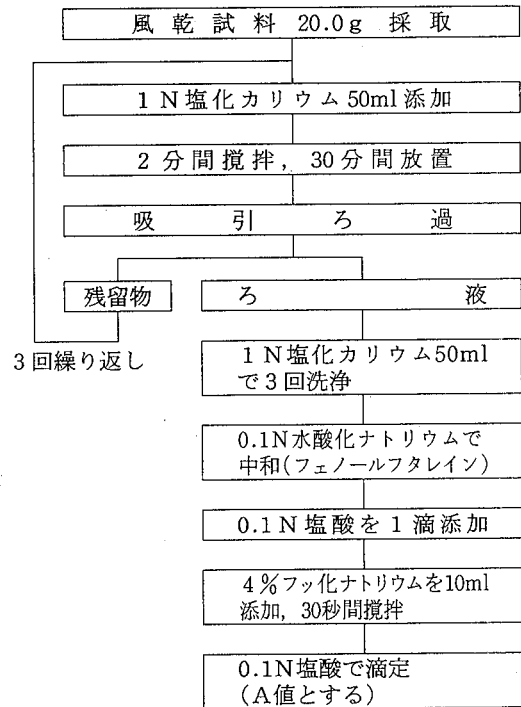


図3 pHの分析手順



3回のA値の合計をΣAとする
交換性アルミニウム(me/乾土100g)=A1とする

$$A1 = \Sigma A \text{ 値} \times 0.1 \times \frac{100}{20} \times \text{含水率}$$

図4 交換性アルミニウムの分析手順³⁾

4 調査結果と考察

4.1 土壌のpH

pHの調査結果を表1に、毎年、の平均値の経年変化を図5に示した。

地点毎のpHの通年平均値は、No.37とNo.49地点で表層が4.2、次層が4.5と最も低く、No.38地点で表層が4.5、次層が4.8で最も高かった。地点毎・年度毎にpHを見ると、表層ではNo.49地点の平成8年度が3.9と最も低く、次層ではNo.37地点の平成5年度が4.1と最も低かった。

表層と次層のpHを比較すると、各地点の通年平均値で0.3、地点毎・年度毎でも0.1~0.8表層が低かつ

た.

5地点の平均値を経年的にみると、表層次層とも類似の変化をしており、平成1年、5年がやや低い傾向があり、昭和63年と平成8年がやや高い傾向があった。全データのそろった平成2~4年(風乾土を分析)と、平成5~9年(未風乾土を分析)の各々の平均値を比較すると、表層は4.4~4.5(平均値4.4)が4.1~4.3(平均値4.2)、次層は4.6~4.8(平均値4.7)が4.5~4.7(平均値4.6)になっていた。未風乾土と風乾

土のpHについては、未風乾土の方が0.04~0.08低くなることを確認している(5.42→5.50, 4.74→4.78, 5.77→5.83)が、その分を差し引いてもpHの低下傾向は明らかであった。なお、地点別のpHについても同様に低下する傾向であった。

関連して、伊自良湖北に位置する「伊自良青年の家」の敷地内で、ろ過式雨水採取器を用いて半月毎に採雨し、雨水pHを調査したので、参考までにその年平均値を表2に示した。

表1 pHの調査結果

地点	年	S63	H1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均値
37	表層	—	—	4.5	4.4	4.3	4.0	4.1	4.0	4.5	4.1	4.2
	次層	4.8	—	4.7	4.6	4.5	4.1	4.3	4.3	4.7	4.5	4.5
38	表層	—	—	4.8	4.6	4.7	—	4.5	4.1	4.3	4.2	4.5
	次層	5.0	—	5.0	4.8	4.8	—	4.7	4.6	4.7	4.6	4.8
41	表層	—	—	4.6	4.5	4.6	4.2	4.5	4.4	4.4	4.3	4.4
	次層	4.9	—	4.9	4.8	4.8	4.5	4.6	4.6	4.8	4.6	4.7
46	表層	4.6	4.2	4.3	4.2	4.2	—	4.2	4.2	4.4	4.0	4.3
	次層	—	4.6	4.7	4.6	4.5	—	4.5	4.4	4.7	4.4	4.6
49	表層	4.4	—	4.2	4.2	4.1	—	4.2	4.1	3.9	4.1	4.2
	次層	—	—	4.6	4.6	4.5	—	4.4	4.4	4.7	4.5	4.5
平均値	表層	4.5	4.2	4.5	4.4	4.4	4.1	4.3	4.2	4.3	4.1	4.3
	次層	4.9	4.6	4.8	4.7	4.6	4.3	4.5	4.5	4.7	4.5	4.6
検体数		1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
試料の形態		風乾土					未風乾土					
試料/水比		20g/50g		20g/100g			20g/50g					

表2 雨水pHの調査結果

年度	S63	H1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	4.74	4.73	4.69	4.68	4.74	4.66	4.71	4.65	4.49	4.60
検体数	24/年									

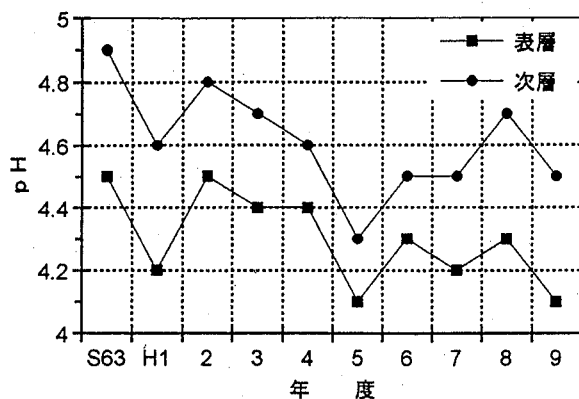


図5 pHの経年変化

4.2 交換性アルミニウム

交換性アルミニウムの調査結果を表3に、その平均値の変化を図6に示した。

地点毎の交換性アルミニウムの通年平均値は、No.49地点で表層が13.75 me/100g、次層が8.81 me/100gと最も高く、No.38地点で表層が10.47 me/100g、次層が4.62 me/100gと最も低かった。

表層と次層を比較すると、いずれの地点も表層が高かった。

経年的には、全データのそろった平成2~4年の平均値と、平成6~9年の平均値を比較すると、表層は

10.41~10.93 me/100 g (平均値 10.74 me/100 g) が 11.04~12.94 me/100 g (平均値 12.11 me/100 g) でありやや増加傾向, 次層は 6.32~8.01 me/100 g (平均値 7.07 me/100 g) が 6.36~7.47 me/100 g (平均値 6.74 me/100 g) で概ね横ばいであった。この傾向は, 地点別に見てもおおむね同様であった。

4.3 pHと交換性アルミニウム

pHと交換性アルミニウムの関連を見ると次のとおりであった。

pHの最も低いNo.49地点の交換性アルミニウムが最も高く, pHの最も高いNo.38地点の交換性アルミニウムが最も低かった。

どの地点においても, pHは次層より表層で低く, 交換性アルミニウムは次層より表層で高かった。

pHは経年的に低下傾向(表層, 次層とも)であったが, 交換性アルミニウムは増加傾向(表層)であった。著者らは, 異なる土壌についてpHと交換性アルミニウムの関係を検討し, pHの低い土壌で交換性アルミニウムが高い傾向にあるとの結果を得ている⁴⁾が, 今回同一場所の土壌での経年変化においても同様の傾向(pHが低下すると交換性アルミニウムが増加する)が認められた。

これらの結果から, 土壌pHの低下は交換性アルミニウムの増加に関与しており, アルミニウムは植物に対する有害性, カルシウムやリンの吸収阻害等悪影響が懸念される⁵⁾ため, 今後とも土壌pHのモニタリングを継続して実施する必要がある。

表3 交換性アルミニウムの経年変化

(me/100g)

地点	年	S63	H1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均値
37	表層	—	—	9.81	11.61	10.49	—	10.98	12.56	11.34	13.51	11.47
	次層	6.10	—	6.66	6.74	7.69	—	7.05	6.99	6.73	7.93	6.99
38	表層	—	—	8.08	8.73	9.09	—	9.40	13.66	12.67	11.65	10.47
	次層	5.23	—	4.33	4.24	5.21	—	5.12	4.29	4.67	3.88	4.62
41	表層	—	—	9.92	9.81	9.83	—	10.93	11.94	12.62	9.22	10.61
	次層	6.82	—	6.74	6.51	6.99	—	7.81	6.74	6.39	5.42	6.68
46	表層	9.80	9.80	11.11	10.95	10.13	—	11.11	11.95	12.20	12.09	11.02
	次層	—	9.61	7.54	6.87	8.58	—	7.35	7.12	6.96	6.62	7.58
49	表層	13.92	—	13.14	13.36	15.10	—	12.80	14.59	12.29	14.78	13.75
	次層	—	—	9.13	7.23	11.56	—	10.01	7.45	8.33	7.96	8.81
平均値	表層	11.86	9.80	10.41	10.89	10.93	—	11.04	12.94	12.22	12.25	11.37
	次層	6.05	9.61	6.88	6.32	8.01	—	7.47	6.52	6.62	6.36	7.09
検体数		1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

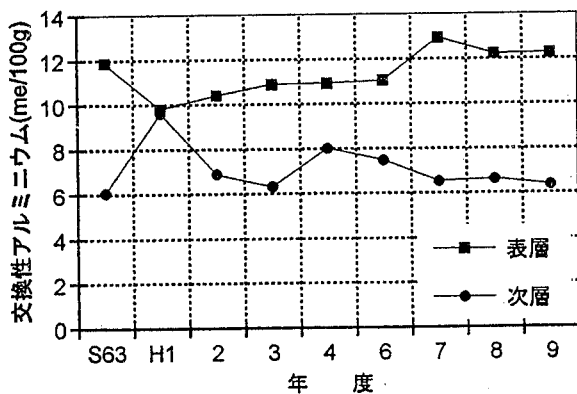


図6 交換性アルミニウムの経年変化

文 献

- 1) 昭和63年~平成9年度環境庁委託業務結果報告書 - 酸性雨による土壌影響調査(総合モニタリング調査)一, 1987~1997, 岐阜県保健環境研究所
- 2) 昭和63年~平成9年度環境庁委託一酸性雨調査研究結果報告書(総合モニタリング調査)一, 1987~1997, 岐阜県保健環境研究所
- 3) 土壌養分測定法委員会編, 土壌養分分析法, 86-94, 養賢堂, 1973
- 4) 岐阜県保健環境研究所報, 4, 17-22, 1996
- 5) 環境庁水質保全局土壌農薬課監修, 酸性雨土壌・植生への影響, 12-18, 公害研究対策センター, 1992

Acidity and Exchangeable Aluminium of Soil around Ijira Pond

Yasuyuki NOMURA, Hiroshi SUMIDA, Kunio KATO

*Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences,
14-12, Yabuta Minami 5 chome, Gifu 500-8384, Japan*

カテキンによるキヌレニナーゼ, キヌレニン -3-ヒドロキシラーゼ活性阻害

今井準三

要 旨

トリプトファン代謝物のキノリン酸は神経毒として働き, キヌレン酸は拮抗的に作用することが知られている. キノリン酸の生成を抑制する天然成分を検索する目的で 47 種類の植物水抽出液について豚肝キヌレニナーゼ, キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼ活性阻害成分の検索を試みた. その結果, タンニン酸が阻害する成分の一つであると推定した. タンニン酸のうち, (-)エピカテキンガラートとや(-)エピガロカテキンガラートが強く阻害することを認めた. これらは, 経口摂取により体内に吸収されることが知られており, キノリン酸の有害作用を緩和する効果が期待されると考えられた. またこれらは, トリプトファン代謝研究や酵素化学的研究に利用できることが期待される.

キーワード: トリプトファン代謝, キノリン酸, カテキン類, キヌレニナーゼ, キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼ

1 はじめに

トリプトファン (Tryp) は人の必須アミノ酸であり, その代謝はキヌレニン (Kyn) 経路とセロトニン経路の二つがある (図1). 一般細胞はKyn経路が主経路であるが, 脳, 神経系ではセロトニン経路が主経路であると考えられている.

Kyn経路ではTrypは六つの酵素的分解過程と一つの非酵素的分解過程を経てキノリン酸 (QA) が生合成される. QAはさらに代謝を受けてニコチン酸となりNADとなると考えられている.

また, セロトニンは神経伝達物質であり, 5-ヒドロキシインドール酢酸となって尿中に排泄される. QAは神経細胞に対する興奮毒性が知られており¹⁾, 神経興奮性アミノ酸レセプターの一つであるN-メチル-D-アスパラギン酸レセプターのアゴニストとして作用することが明らかにされている¹⁾. さらに, 細胞の脂質過酸化を促進するとの説²⁾もある. QAはまたエイズ患者にみられるエイズ痴呆コンプレックスの病態レベルに相関して脳脊髄液中の濃度が高くなることやインフルエンザ脳症患者でも同様に高くなる²⁾ことが知られている. 病態の進行に関与した物質なのか, 単なるマーカーなのか未だ未解明の興味ある物質である.

こうした背景から, QA生成を阻害する物質はこれら疾患の病態進展を防ぐか症状を軽減する可能性が考えられる.

そこで, 今回身近な植物中にQA生合成に関与する二つのキナーゼ, キヌレニナーゼ, キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼ活性を阻害する成分を検索し, カテキン類に阻害作用を認めたので, その概要を報告する.

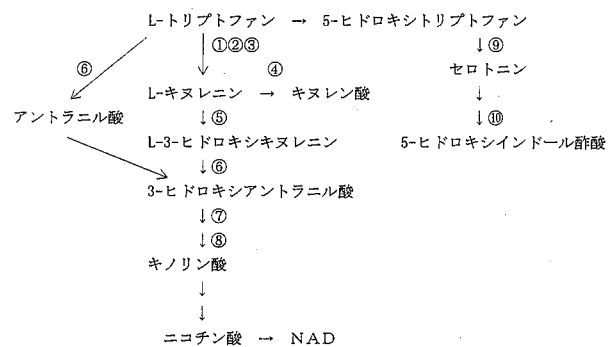


図1 トリプトファン代謝系統図

①インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ, ②トリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ, ③トリプトファンホルミダーゼ, ④キヌレニンアミノトランスフェラーゼ, ⑤キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼ, ⑥キヌレニナーゼ, ⑦3-ヒドロキシアントラニル酸オキシゲナーゼ, ⑧非酵素的, ⑨芳香アミノ酸デカルボキシラーゼ ⑩モノアミノオキシダーゼ

2 材料および方法

2.1 試薬

タンニン酸, リン酸ピリドキサル, L-キヌレニン硫酸塩, アントラニル酸は半井テスク製 (EP), (+)カテキン, (-)エピカテキン, (-)エピカテキンガレート, (-)エピガロカテキンガレートはフナコシ, グルコース-6-リン酸, NADPH, グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ, 3-ヒドロキシキヌレニンはシグマ社製を使用した. その他の試薬はすべて試薬特級を使用した.

2.2 植物水抽出液

アオキ他 47 種の植物 (未乾燥) を細切し, その 10 g に水 90 mL を加え, ミキサーで 2 分間ホモジナイズした. 一部を遠心分離 (3000 rpm, 5 分) し, 上清を得た. 引き続き検索に用いることを原則としたが, やむを得ぬ場合は密栓して -25 °C に保存し, 解凍して使用した.

2.3 粗キヌレニナーゼの調製

常法³⁾ およびWissの方法⁴⁾ に従って調製した. なお, すべての操作は 4 °C 以下または氷冷下で行った. 荒くカットした新鮮な豚肝 100 g に冷アセトン 500 mL を加え, ワーリングブレンダーを用いて破碎した (2 分間). 素早く吸引ろ過し, 冷アセトンで洗浄 (100 mL × 5) し, 続いてエーテル (過酸化フロン) で洗浄 (50 mL × 4), 脱水し, デシケータ (五酸化リン) に入れ, 4 °C に保存した.

上記の操作で作成したアセトン粉末 50 g をとり, 氷冷した 66 mM リン酸緩衝液 (Na, K, リン酸ピリドキサル 5 mg/L, 2-メルカプトエタノール 0.01 % 含有) 1 L を加え, 15 分間激しく攪拌した. 遠心分離 (16,000 × g, 20 分) した上清の 1/4 づつを沸騰水浴中に浸し (激しく攪拌しながら) 素早く 65~66 °C とした後, 別の 68 °C の水浴に移し 3 分間浸した. 素早く氷冷し遠心分離 (16,000 × g, 20 分) した. これを 4 回繰り返して, 上清を合わせ, 得られた上清 835 mL に硫酸アンモニウム 212 g を加え (44 % 飽和) 60 分間激しく攪拌した. 遠心分離 (16,000 × g, 30 分) し, 減圧ろ過した. 得られたろ液 840 mL に硫酸アンモニウム 40 g を加え (52 % 飽和) 60 分間ゆるやかに攪拌した後, 遠心分離 (16,000 × g, 30 分) した. 得られた沈殿に 10 mM リン酸緩衝液 (Na, K, リン酸ピリドキサル, 2-メルカプトエタノール含有) 80 mL を加えて溶解した後, 同緩衝液 6 L に対して 20 時間透析した (Visking tube 24/32, 緩衝液は 5 回交換). 得られた透析後液を凍結乾燥し, 黄色粉末

0.745 g を得た.

2.4 粗キヌレニナーゼ 3-ヒドロキシラーゼの調製

Erickson ら⁵⁾ および Saito ら⁶⁾ の方法に準じて調製した. なお, すべての操作は 4 °C 以下または氷冷下で行った. すべての操作は豚肝 10 g をとり, 氷冷した HEPES 緩衝液 (20 mM HEPES, pH7.0, 10 mM 塩化カリウム, 1 mM EDTA, 0.32 M サッカロース) 100 mL を加え Potter-Elvehjem 型ホモジナイザー (テフロン棒) を用いてホモジナイズした. 遠心分離 (1000 × g, 7 分) を 2 回繰り返して得た上清を遠心分離 (12,000 × g, 20 分) した. 得られた沈殿に HEPES 緩衝液 100 mL を加え懸濁させた後, 遠心分離 (12,000 × g, 20 分) し, 上清を得た. この上清について HEPES 緩衝液 160 mL および 120 mL に懸濁させた後, 同様に遠心分離を繰り返し, 得られたペレット状沈殿に HEPES 緩衝液 16 mL を加えて溶かし, 粗酵素液を得た. これを 0.5~1 mL づつに分注し, -80 °C に保存した.

2.5 キヌレニナーゼ阻害物質の検索法

Tanigawa ら⁷⁾ および Takeuchi ら⁸⁾ の方法に準じて行った. 粗キヌレニナーゼ粉末を 225 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) に懸濁させた (2 mg/mL). リン酸ピリドキサル 2.50 mg を水 2.70 mL に溶かし, さらに水で 20 倍に希釈する (70 nmol/mL). L-キヌレニン硫酸塩 4.2 mg を水 2.6 mL に溶解する (5 μmol/mL). これらを用いて以下のアッセイ系でキヌレニナーゼ活性を測定し, 残存率を算定した.

	S	Sb	T	Tb
225mMトリス緩衝液	0.4mL	0.4mL	0.4mL	0.4mL
リン酸ピリドキサル	0.1	0.1	0.1	0.1
水	0.2	0.3	—	0.1
粗キヌレニナーゼ	0.2	0.2	0.2	0.2
検 索 物 溶 液	—	—	0.2	0.2
キヌレニン硫酸塩	0.1	—	0.1	—

S: 対照, Sb: 対照盲検, T: 検体, Tb: 検体盲検

37 °C, 30 分放置後, 2M塩酸 0.5 mL, 酢酸エチル 4 mL を加え, 3 分振とう後, 遠心分離 (1,100 × g, 5 分) し, 酢酸エチル層を分取し蛍光強度 F (励起 340 nm, 蛍光 400 nm) を測定した.

$$\text{キヌレニナーゼ活性残存率 (\%)} = \frac{F_T - F_{Tb}}{F_S - F_{Sb}} \times 100$$

2.6 キヌレニナーゼ 3-ヒドロキシラーゼ阻害物質の検索

Saitoら⁶⁾の方法に準じて行った。

基質A: グルコース-6-リン酸 2.20 mg, NADPH 1.47 mg, グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ懸濁液 2.6 μLに 200 mM リン酸緩衝液 (K, pH 7.5, 8 mM 塩化マグネシウム含有) 2.20 mL を加えて溶解した。

基質B: L-キヌレニン硫酸塩 1.80 mg を水 0.55 mL に溶解した。

キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼ溶液: 4. で得たもの。

これらを用いて, 以下のアッセイ系によりキヌレニン-3-ヒドロキシラーゼ活性を測定し, 活性残存率を算出した。

	S	Sb	T	Tb
基質 A	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
水	20	30	—	10
検索物溶液	—	—	20	20
基質 B	10	—	10	—
酵素液	20	20	20	20

S: 対照, Sb: 対照盲検, T: 検体, Tb: 検体盲検

37 °C, 30分振とう (約 100 ストローク/分) 後, 0.5M 塩酸 1.0 mL を加え混合した後ろ過 (M.F.) し, ろ液について高速液体クロマトグラフィー⁹⁾により生成した3-ヒドロキシキヌレニン量Aを測定し, 残存率を算出した。

$$\text{キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼ} = \frac{A_T - A_{Tb}}{A_S - A_{Sb}} \times 100$$

活性残存率 (%)

3 結 果

3.1 アントラニル酸の蛍光スペクトルおよび検量線

アントラニル酸の励起極大波長は 340 nm, 蛍光極大波長は 400 nm であった。また, アントラニル酸は 0.144~10.0 μg/mL の間で原点を通る直線が得られた。

3.2 キヌレニナーゼ量および至適反応時間の検討

粗キヌレニナーゼ粉末を 225 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) に懸濁し, 7段階濃度 (0.15~10 mg/mL) について検索法に従って操作し, 生成したアントラニル酸の蛍光強度を求めたところ, この間では原点を通る直線関係があることが認められた。そこで, キヌレニナーゼ量は 5 mg/mL を 0.2mL 用いることとした。アッセイ系のキヌレニナーゼ 100% 値での生成アントラニル酸量は, 1.3 μg/mL であった。

3.3 キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼ量および至適反応時間の検討

キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼの透析後溶液 (蛋白量 10 mg/mL) を HEPES 緩衝液を用いて蛋白量 1 mg/mL まで 5段階希釈し, 6. の検索法に従って操作し, 生成したヒドロキシキヌレニン量を測定したところ, 蛋白量 1~10 mg/mL の間で原点を通る直線関係があることが認められた。そこで, 酵素量として透析後溶液を 20 μL 使用することとした。アッセ

表1 キヌレニナーゼ活性阻害作用

No.	植物名	残存率%	No.	植物名	残存率%	No.	植物名	残存率%
1	アオキ (葉)	33	18	万両 (葉)	34	35	ヒトツバ	81
2	新しょうが (根)	90	19	万両 (実)	88	36	タマネギ	83
3	みょうが (葉)	66	20	ウド (葉)	68	37	渋柿 (葉+実)	10
4	ヤマモモ (葉)	3	21	サンショウ (葉)	17	38	甘柿 (葉)	31
5	つわぶき (葉)	60	22	カボチャ (葉)	68	39	ウメ (実)	87
6	なす	95	23	ナンテン (葉)	25	40	ギボシ (葉)	56
7	きゅうり	94	24	キャラ (葉)	34	41	ネギ	98
8	にんにく	85	25	西洋すみれ (葉)	72	42	トウモロコシ (皮)	93
9	千両 (葉)	39	26	みかん (皮)	63	43	キンモクセイ (葉)	39
10	にんじん	91	27	やまぶき (葉+莖)	51	44	赤しそ (葉)	63
11	ニラ	59	28	バナナ (肉+皮)	96	45	夏ツバキ (葉)	53
12	キャベツ	95	29	茶 (煎茶)	14	46	ツバキ (葉)	70
13	ユキノシタ (葉)	79	30	すずらん (葉)	45	47	シャガ (葉)	77
14	ピーマン (甘長)	99	31	アジサイ (葉)	59	48	コブシ (葉)	48
15	ナルコユリ (葉)	87	32	モッコク (葉)	73	49	塩酸ヒドロキシルアミン	2
16	ウバメガシ (葉)	37	33	イチジク (葉)	25			
17	ヤツデ (葉)	63	34	しいたけ	80			

イ系でのキヌレニン-3-ヒドロキラーゼ100%値での生成ヒドロキシキヌレニン量は2.2μg/mLであった。豚肝のキヌレニン-3-ヒドロキラーゼ活性は、290 nmol/hr/g tissueであった。

反応時間については、5~60分で7段階について検討したところ、5~40分では原点を通る直線関係が認められたので、30分とした。

3.4 キヌレニナーゼ阻害物質の検索

植物抽出液についてのキヌレニナーゼ活性阻害検索結果を表1に示した。48種の植物について検査したが、強く阻害したものはヤマモモ(葉)、茶葉(乾燥)、サンショウ(葉)、渋柿(葉+実)であった。塩酸ヒドロキシラミンは陽性対照¹⁰⁾である。

また、タンニン酸についての検討結果を表2に示した。タンニン酸は強く阻害し、1~10mg/mLではほぼ直線的な用量-反応関係が認められた。なお、生成したアントラニル酸は共存するタンニン酸、粗キヌレニナーゼによって変化を受けないことを確認した。

表2 タンニン酸のキヌレニナーゼ活性阻害作用

タンニン酸量(mg/ml)	キヌレニナーゼ活性残存率(%)
0.5	63
1.0	21
2.5	13
5.0	9

3.5 キヌレニン-3-ヒドロキラーゼ阻害物質の検索

キヌレニン-3-ヒドロキラーゼ活性阻害物質の検索結果を表3および表4に示した。キヌレニン-3-ヒドロキラーゼはキヌレニナーゼを阻害する植物

表3 キヌレニン-3-ヒドロキラーゼ活性阻害作用

被検物質名	キヌレニン-3-ヒドロキラーゼ残存率(%)
アオキ(葉)	14
サンショウ(葉)	9
茶(煎茶)	0
ヤマモモ(葉)	1
タンニン酸(1mg/ml)	0

カテキン類(0.2mg/ml)	
(+)カテキン	99
(-)エピカテキン	93
(-)エピカテキンガレート	75
(-)エピガロイルカテキン	89
(-)エピガロイルカテキンガレート	76

抽出液で同様に強く阻害を受けた。また、タンニン酸1mg/mLでも強く阻害された。なお、生成した3-ヒドロキシキヌレニンは、共存するタンニン酸、酵素液によって変化を受けないことを確認した。

カテキン類は、(-)エピカテキンガレートと(-)エピガロカテキンガレートがほぼ同様な用量-反応傾向で阻害した。

表4 カテキンによるキヌレニン-3-ヒドロキラーゼ活性阻害作用

カテキン名	キヌレニン-3-ヒドロキラーゼ残存率(%)
(+)エピカテキンガレート	
0.25 mg/ml	68
0.50	42
1.0	47
1.5	6
(-)エピガロイルカテキンガレート	
0.25 mg/ml	72
0.50	44
1.0	23
1.5	0

4 考 察

QAは神経毒と考えられており、エイズ痴呆患者の病態と脳脊髄液中濃度が相関することや重度の炎症性感染症で脳脊髄液濃度が高い値を示すことが報告されている²⁾。これは、ウィルス感染や細菌毒素でトリプトファン代謝酵素が誘導される¹¹⁻¹⁴⁾ことと関係があると考えられている。また、QAそのものの毒性なのかもしれない。動物実験では、NMDAレセプターのアゴニストであるQAはてんかん様発作やけいれん発作を引き起こし、アンタゴニストはこれを防止することや老化によって大脳皮質のQA量が増加したという報告¹⁾がある。QA測定がこれらの疾患の病態や治療マーカーとしての有用性に疑いはないと考えられているが、脳内でのQAの極端な上昇が実際に神経細胞の機能障害を起こしているかどうかは、現在では明らかでない²⁾。しかし、QAの生成を抑制することは、これら疾患の病態を改善し、治療法につながる可能性を否定できない。その場合、キヌレニン酸がQAに拮抗的に作用することが知られている¹⁾ことから、フィードバック効果によりキヌレニン酸の増加が期待できる酵素の阻害をターゲットにすることが考えられる¹⁵⁾。そこで、キヌレニンの直近下流のキヌレニン-3-ヒドロキラーゼおよびキヌレニナーゼの阻害物質を検

索した。

人の培養細胞を用いた実験では、インドールアミン-2, 3-ジオキシゲナーゼによるTryp→キヌレニンまでの合成系はほとんどすべての細胞に存在するが、Tryp→QAを生合成できることが証明されているのはマクロファージと肝細胞のみである²⁾。斎藤²⁾は、QA合成能の高い細胞はキヌレニン-3-ヒドロキシラーゼやキヌレニナーゼ活性が強く、生合成能の小さい細胞では、活性が非常に弱いことを明らかにしている。

このことから、肝細胞よりキヌレニナーゼ、キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼを抽出した。今回の実験では、未精製のまま使用したがスクリーニング試験としては使用に耐えるものと考えている。

豚肝のキヌレニナーゼ活性は、3-ヒドロキシキヌレニン→3-ヒドロキシアントラニル酸を触媒する活性がキヌレニン→アントラニル酸を触媒する活性より約60倍高い(K_mL-キヌレニン 7.7×10^{-4} M, K_mL-3-ヒドロキシキヌレニン 1.3×10^{-5} M)⁷⁾ので、3-ヒドロキシキヌレニンを基質として使用した方が感度よく測定できると考えたが、生成する3-ヒドロキシアントラニル酸が不安定のためL-キヌレニンを使用した。キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼにも共通したことであるが、粗酵素であるため、生成したアントラニル酸、3-ヒドロキシキヌレニンがさらに変化を受けて見かけ上低値になった可能性も完全には否定できないが、被検物不添加に対する相対比較であるので、十分評価できると考え、阻害という表現を使用した。

まず植物の水抽出液について検索したが、キヌレニナーゼ活性を強く阻害したものは、ヤマモモ葉、茶葉、サンショウ葉、渋柿であった。これらに共通する水溶性成分としてタンニン想定して以後の実験を進めた。個々の抽出液について、阻害成分を探索したものではない。ヤマモモの乾燥幹皮は漢方の楊梅皮でタンニンを15%程度含有する¹⁶⁾。茶葉は、タンニンを多く含み、その効用の主要成分と考えられており、茶葉(乾物)中には13~15%のタンニンを含む¹⁶⁾。茶に含まれる主要タンニン(カテキン)は、(-)エピカテキン、(-)エピカテキンガレート、(-)エピガロカテキン、(-)エピガロカテキンガレートの4種であり、(-)エピガロカテキンガレート含有量が最も多く、全体の50~60%を占める¹⁷⁾。

試葉のタンニン酸(茶由来)によっても強く阻害され、用量-反応関係が認められた。

キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼ活性については、キヌレニナーゼを阻害した植物の抽出液についての検討したが、キヌレニナーゼと同様傾向で強く阻害を受けた。また、タンニン酸によっても同様に阻害された。前述4種のカテキンのうち(-)エピカテキンガレートと(-)エピガロカテキンガレートの阻害作用が強く、用量-反応関係が認められた。フリーのガロイル基が阻害に関与しているように思われる。他の酵素でガロイル基が多いほど阻害作用が強かったとの報告があるので¹⁸⁾、キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼの場合もガロイル基数と阻害作用が相関するのかもしれない。タンニンは植物に広く分布し、一般的な酵素阻害作用¹⁸⁻²⁰⁾の他に、お茶の持つ抗酸化作用²¹⁾、抗突然変異・抗ガン作用²²⁾、コレステロール低下作用²³⁾、血圧上昇抑制効果²⁴⁾、血小板凝集抑制作用²⁵⁾、抗菌・抗ウィルス効果²⁶⁾などの主成分と考えられている多彩な作用を持つ興味深い成分である。しかし、カテキン類は生体の腸管から吸収され血中に移行するとの報告²⁷⁻²⁸⁾が散見されるが、吸収、代謝については未解明な点も多い。今回タンニン(カテキン)がキヌレニナーゼ、キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼを阻害することが判明したが、in vitroの実験結果であり、in vivoでQA合成阻害作用を発揮するかどうか興味がある。また、Tryp代謝系の他の酵素に対する作用はどうか、優先阻害はどうか、フィードバック効果はどの範囲、程度なのか、なども興味がある。特に、キヌレニン酸がQAに対して拮抗的作用が期待できることを考えると、キヌレニンアミノトランスフェラーゼへの作用がどうかに関心が持たれる。マクロファージ系の細胞がQA合成に重要な役割を演じている可能性が高いと考えられる²⁾ので、タンニンのマクロファージ系細胞への影響についても興味を抱かれる。また、(-)エピカテキンガレートや(-)エピガロカテキンガレートを阻害剤として利用して、キヌレニナーゼ、キヌレニン-3-ヒドロキシラーゼの酵素化学的研究にも役立て得る可能性が考えられる。今までにも、いくつかの阻害剤の報告²⁹⁻³⁰⁾があるが、現在、欧米の製薬会社でキヌレニン代謝調整物質の検索が精力的に進行中²⁾とのことであるので、近い将来市場に出されることと思われる。

謝 辞

豚肝臓の入手にお世話になった岐阜県食肉衛生検査所前田茂樹衛生環境部技術参事兼所長をはじめ職員の方々および当所奥村直尊主任専門研究員に感謝いたし。

ます。

文 献

- 1) Stone T.W., Neuropharmacology of Quinolinic Acid and Kynurenic Acids, *Pharmacol. Rev.*, 45, 309-379, 1993
- 2) 斉藤邦明, エイズ痴呆コンプレックスとその発症機構—キノリン酸合成のメカニズムを中心として—, *臨床病理*, 43, 891-901, 1995
- 3) 笹川泰治, 酵素研究法5 (赤堀四郎編), p. 17-18, 朝倉書店, 1955
- 4) F. Wiss, O. Wiss, Kynureninase from Pig Liver (Ed. H. U. Bergmeyer), *Methods of Enzymatic Analysis* (2nd. Edition) p. 1725, Verlag Chemie International, 1981
- 5) Erickson, J. B., Franagan, E. M., Russo, S., Reinhard, Jr. J. F., A Radiometric Assay for Kynurenine 3-Hydroxylase Based on the Release of $^3\text{H}_2\text{O}$ during Hydroxylation of L-[3,5- ^3H] Kynurenine, *Anal. Biochem.*, 205, 257-262, 1992
- 6) K. Saito, B. J. Quearry, M. Saito, T. S. Nowak, Jr., S. P. Markey, M. P. Heyes, Kynurenine 3-Hydroxylase in Brain: Species Activity Differences and Effect of Gerbil Cerebral Ischemia, *Archives Biochem., Biophysics*, 307, 104-109, 1993
- 7) K. Tanizawa, K. Soda, Purification and Properties of Pig Liver Kynureninase, *J. Biochem.*, 85, 901-906, 1979
- 8) F. Takeuchi, H. Otsuka, Y. Shibata, Purification and Properties of Kynureninase from Rat Liver, *J. Biochem.*, 88, 987-994, 1980
- 9) 今井準三, 伊藤義浩, 後藤喜一, 山口清次, 高速液体クロマトグラフィーによる尿中トリプトファン代謝物の測定, *岐阜県保健環境研究所報*, 2, 8-13, 1994
- 10) Knox, W. E., Liver and Bacterial Kynureninases, *Methods in Enzymol.*, 2, 249-253, 1955
- 11) R. Yoshida, O. Hayaishi, Induction of pulmonary indoleamine-2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 3998-4000, 1978
- 12) R. Yoshida, Y. Urade, M. Tokuda, O. Hayaishi, Induction of indoleamine-2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4084-4086, 1979
- 13) M. P. Heyes, K. Saito, D. Jacobowitz, S. P. Markey, O. Takikawa, J. H. Vickers, Poliovirus induces indoleamine-2,3-dioxygenase and quinolinic acid synthesis in macaque brain, *FASEB J.* 6, 2977-2990, 1992
- 14) K. Saito, A. Lackner, S. P. Markey, M. P. Heyes, Cerebral cortex and lung indoleamine-2,3-dioxygenase activity is increased in type-D retrovirus infected macaques, *Brain Res.*, 540, 353-356, 1991
- 15) R. Carpenedo, A. Chiarugi, P. Russi, G. Lombardi, V. Carla, R. Pellicciari, L. Mattoli, F. Moroni, Inhibitors of kynurenine hydroxylase and kynureninase increase cerebral formation of kynureninate and have sedative and anticonvulsant activities, *Neurosci.*, 61, 237-244, 1994
- 16) 木村康一, 木島正夫, 薬用植物学各論, p. 33, 広川書店, 1958
- 17) 池ヶ谷賢次郎, 茶の科学 (村松敬一郎編), p. 88-89, 朝倉書店, 1995
- 18) M. Nishizawa, T. Yamagishi, T. Ohyama, Inhibitory Effect of Gallotannins on the Respiration of Rat Liver Mitochondria, *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 2150-2152, 1983
- 19) K. Konishi, H. Adachi, N. Ishigaki, Y. Kanamura, I. Adachi, T. Tanaka, I. Nishioka, G. Nonaka, I. Horikoshi, Inhibitory Effects of Tannins on NADH Dehydrogenases of Various Organisms, *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 716-718, 1993
- 20) K. Aoki, K. Nishimura, H. Abe, H. Maruta, H. Sakagami, T. Hatano, T. Okuda, T. Yoshida, Y. Tsai, F. Uchiumi, S. Tamura, Novel Inhibitors of poly (ADP-ribose) glycohydrolase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1158, 251-256, 1993
- 21) 原 征彦, 茶の科学 (村松敬一郎編), p. 124-131, 朝倉書店, 1995
- 22) 中村好志, 富田 勲, 茶の科学 (村松敬一郎編), p. 131-144, 朝倉書店, 1995
- 23) 村松敬一郎, 茶の科学 (村松敬一郎編), p. 154-161, 朝倉書店, 1995
- 24) 原 征彦, 茶の科学 (村松敬一郎編), p. 161-167, 朝倉書店, 1995
- 25) 大森正司, 茶の科学 (村松敬一郎編), p. 167-

- 175, 朝倉書店, 1995
- 26) 並木和子, 茶の科学 (村松敬一郎編), p.175-183, 朝倉書店, 1995
- 27) K.Okushio, N.Matsumoto, T.Kohri, M.Suzuki, F.Nanjo, Y.Hara, Absorption of Tea Catechins into Rat Portal Vein, *Biol.Pharm.Bull.*, 19, 326-329, 1996
- 28) T.Unno, K.Kondo, H.Itakura, T.Takeo, Analysis of (-)-Epigallocatechin Gallate in Human Serum Obtained after Ingesting Green Tea, *Biosci.Biotech.Biochem.*, 60, 2066-2068, 1996
- 29) R.Pellicciari, B.Natalini, G.Costantino, M.R.Mahmoud, L.Mattoli, B.M.Sadeghpour, F.Moroni, A.Chiarugi, R.Carpenedo, Modulation of Kynurenine Pathway in Search for New Neuroprotective Agents, Synthesis and Preliminary Evaluation of (m-Nitrobenzoyl) alanine, a Potent Inhibitor of Kynurenine-3-hydroxylase, *J.Med.Chem.*, 37, 647-655, 1994
- 30) A.Chiarugi, R.Carpenedo, M.T.Morina, L.Mattoli, R.Pellicciari, F.Moroni, Comparison of the Neurochemical and Behavioral Effects Resulting from the Inhibition of Kynurenine Hydroxylase and/or Kynureninase, *J.Neurochem.*, 65, 1176-1183, 1995

Inhibition of Kynureninase and Kynurenine-3-hydroxylase by Catechins

Junzo IMAI

*Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences: 14-12, Yabuta Minami
5 chome, Gifu 500-8384, Japan*

模擬処分場における埋立廃棄物の安定化に関する調査

安田 裕*, 原 信行*, 寺尾 宏*

西垣 康広**, 島田 忠**, 藤吉 加一**, 乙部 貞夫**

要 旨

埋立処分された廃棄物の安定化に関する基礎的な情報を把握するため、小規模な模擬廃棄物処分場を建設し、撤去するまでの28ヵ月間にわたって浸出水量及びその水質、排出ガスの組成等を調査した。また、模擬処分場の撤去に際して、埋立廃棄物を深度別に採取し性状及び溶出試験を実施した。その結果、浸出水量は調査1日前の降雨量に依存していること、埋立後すぐに可燃性ガスの発生が始まること、浸出水中のBOD、COD、TOC、T-N、T-Pは時間の経過とともに濃度が減少すること及びT-N、T-P濃度はBOD、COD、TOCより浸出水量の変化による影響を受けやすいこと等が判明した。また、深度別の埋立廃棄物の溶出試験結果からBOD、COD、TOC、T-N、T-Pは埋立上層で低値であり、下層に向かって高くなっていることが確認された。

キーワード：廃棄物、模擬処分場、浸出水、溶出試験、排出ガス

1 はじめに

近年、住民の廃棄物処理に対する不信感が顕在化しており、新たに廃棄物最終処分場を建設することが困難な状況になっている。不信感を生む要因の一つとして廃棄物に関する科学的な情報が不足しており、住民に対して十分に提供されていないことが上げられる。

そこで、埋立処分された廃棄物の安定化に関する基礎情報を把握するため、小規模な模擬廃棄物処分場を建設し、撤去までの28ヵ月間にわたって①浸出水の排出状況、②排出ガスの組成、③浸出の水質、④埋立物の安定化状況等を調査する機会を得たのでその結果について報告する。

2 模擬処分場の概要

2.1 模擬処分場の建設

図1に示すような模擬処分場を建設した。埋立層の下部には、浸出水の漏出を防ぐため一般的に用いられている遮水シートを使用し、底部には碎石で保護した集水管を設置した。また、模擬処分場の中央部には集水管と連結した構造のガス抜き管を設けた。なお、排水口より流出する浸出水は、全量をピットに集め、随時バキュームカーにより搬出して現場においては排出

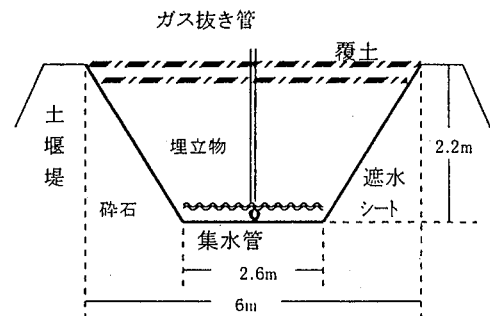


図1 模擬処分場の構造

水を出さない構造とした。

2.2 埋立廃棄物とその性状

埋立廃棄物は、G市下水処理場の脱水汚泥とその焼却灰を容量比で1:1に混合したもの約30 m³を用いた。また、埋立作業は、周辺への臭気拡散を考慮し、できるだけ短期間に埋立てるよう配慮した。埋立て終了後、埋立廃棄物をバックホウで敷きならし、その上部に50 cm程度の覆土を施した。

なお、埋立に用いた混合廃棄物の性状と環境庁告示第13号に基づく溶出試験結果等を表1、表2に示した。

* 岐阜県保健環境研究所，藪田庁舎：500-8384 岐阜市藪田南5丁目14番12号

**岐阜県工業技術センター：501-6064 岐阜県羽島郡笠松町北及47

表1 埋立廃棄物の性状

外観	灰褐色の粉末状
臭気	し尿臭
含水率	48%
強熱減量	18%

表2 埋立廃棄物の成分及び溶出試験結果

項目	成分試験 (mg/kg)	溶出試験 (mg/L)
BOD	—	1,600
COD	—	250
TOC	—	730
T-N	—	200
T-P	—	12
Cl ⁻	—	8
SO ₄ ²⁻	—	320
Cd	2.1	<0.01
Pb	55	0.05
As	8.1	0.02
T-Hg	0.21	<0.0005
Cr(VI)	—	<0.05
T-Cr	91	0.01
Cu	690	0.19
Zn	2,100	0.94
Fe	39,000	8.8
Mn	310	0.36
Ni	42	0.01

3 調査方法

3.1 浸出水の排出量

模擬処分場の排水口より排出される浸出水を容器により受け、浸出水量（1日当たりの排出量に換算して表示）を原則として月2回の頻度で計測した。

3.2 排出ガスの組成

ガス抜き管の上部において可燃性ガスと酸素の濃度

を新コスモス社製 XP-302II型有害ガス測定器で、また、二酸化炭素濃度をガステック社製検知管を用いて原則として月2回の頻度で測定した。

3.3 浸出水の水質

模擬処分場の建設から撤去までの28ヵ月間、排水口において採取した浸出水の水質を原則として毎月1回調査した。調査項目は、pH, SS, COD, BOD, TOC, T-N, T-Pの7項目とCd, Pb, As, T-Hg, Cr(VI), T-Cr, Cu, Zn, Fe, Mn, Niの金属関係11項目であり、JIS-K0102に準拠して測定した。

3.4 埋立廃棄物の安定化状況

模擬処分場の撤去に際して、埋立物を上層より50, 100, 150 cmの位置で採取し、性状試験及び溶出試験（環境庁告示第13号）を実施した。なお、調査項目については表3に示した。

表3 埋立物に関する調査項目

試験区分	調査項目
性状試験	外観、臭気、含水率、強熱減量
溶出試験	pH, BOD, COD, TOC, T-N, T-P Cd, Pb, As, T-Hg, Cr(VI), T-Cr Cu, Zn, Fe, Mn, Ni

4 調査結果及び考察

4.1 降雨量と浸出水量との関係

調査期間内における降雨量¹⁾と浸出水量の推移を図2に示した。浸出水量は、おおむね降雨量の多いときに増大し、天候の安定した時期では少なかった。そ

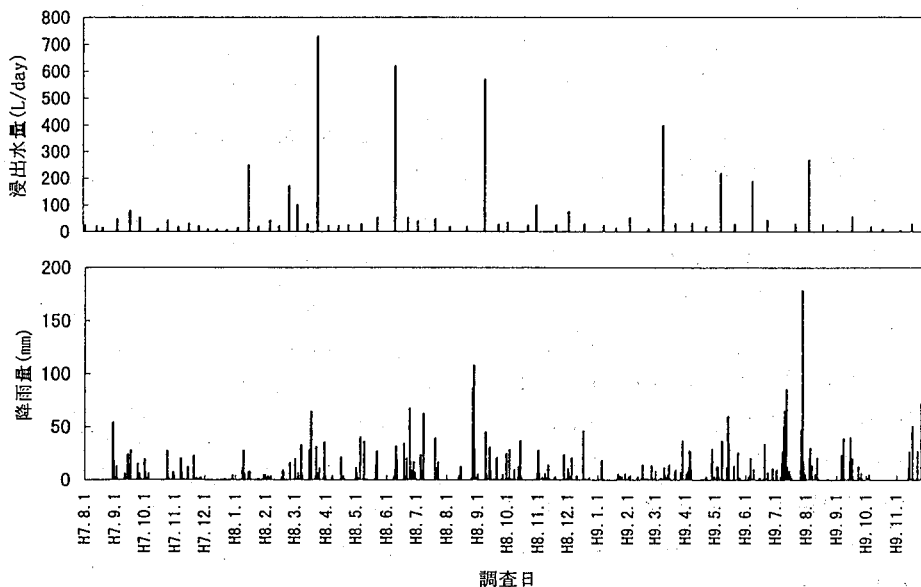


図2 調査期間内における降雨量と浸出水量の推移

ここで、降雨量の推移が浸出水量に及ぼす影響を検討するため、各調査時の浸出水量と調査当日、1日前、2日前、3日前の降雨量との相関について検討した。その結果、表4に示すように浸出水量は、調査1日前の降雨量との間にのみ危険率1%で有意の相関が認められ、調査1日前の降雨量に大きく依存していることが明らかとなった。

次に、降雨後の浸出水量の減少速度を把握するため、降雨開始から3日間連続して浸出水量を調査した。表5に示したように降雨終了直後の浸出水量は、1日経過時には初期値の約16%にまで減少しており、浸出水流出量は比較的速やかに低下することがわかった。

表4 浸出水量と降水量(調査当日, 1~3日前)との相関係数

調査当日	1日前	2日前	3日前
0.189	0.699*	0.040	0.167

*: 危険率1%で有意 (n=63)

表5 降雨直後における浸出水量の推移

調査日時	天候	浸出水量	備考
H7.10.2 10:15	雨のち曇	480 L/日	降雨停止時に調査開始
H7.10.2 13:45	晴時々曇	460 L/日	
H7.10.2 17:05	晴	250 L/日	
H7.10.3 9:40	晴	76 L/日	
H7.10.4 9:40	曇	42 L/日	

注)10/1降雨量 19.5mm、10/2降雨量 8mm

4.2 排出ガス組成の推移

一般に、可燃性ガス(主としてメタン)、二酸化炭

素、酸素は、廃棄物埋立地からの排出ガス中にパーセントのオーダーで観測され、有機物分解過程の指標とされることが多い²⁾。そこで、模擬処分場におけるこれらガス濃度の推移を図3に示した。

酸素濃度は、1~20%の範囲で推移し、おおむね夏期に高く冬期に低くなる傾向であった。二酸化炭素濃度は、0.3~35%の範囲で推移し、酸素濃度の高い夏期には低く、逆に冬期には高い傾向を示した。可燃性ガスは、埋立直後から発生し始め、調査の中期から後期にかけてやや濃度を上昇しつつ変動しながら0.4~7.5%の範囲で推移した。これらの結果から、埋立層内においては、28ヵ月経過時においても有機物の分解が進行中であることが推察された。

4.3 浸出水質の推移

模擬処分場排水口において浸出水を採取し、水質の調査を28ヵ月間にわたって定期的に行った。各調査項目における測定値の最小値~最大値及び濃度推移の傾向を要約して表6に示した。

調査期間中におけるpHは、6.5~8.3、SSは、6~350mg/Lの範囲で変動を繰り返しながら推移し、特に長期的な変化の傾向は示さなかった。

金属類の溶出挙動を概観するとおおむね以下のとおりであった。①Cd, Pb, Cr(VI), T-Crは、調査期間全般を通してほとんど溶出しなかった。②Zn, Fe, Mnは、濃度の変動があるものの調査期間全般を通して溶出が認められた。③As, T-Hg, Cu, Niは、わ

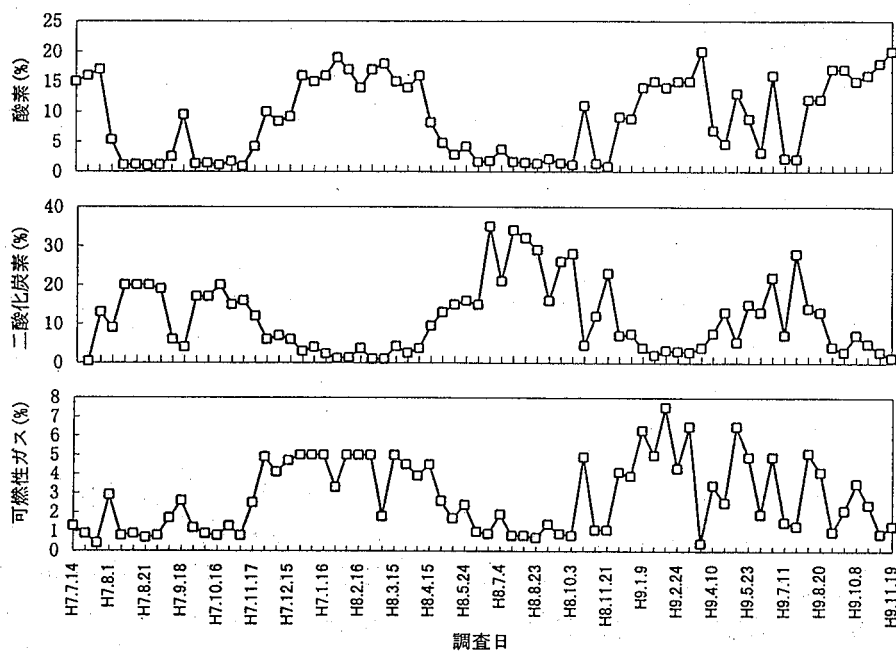


図3 排出ガス中の酸素、二酸化炭素、可燃性ガス濃度の推移

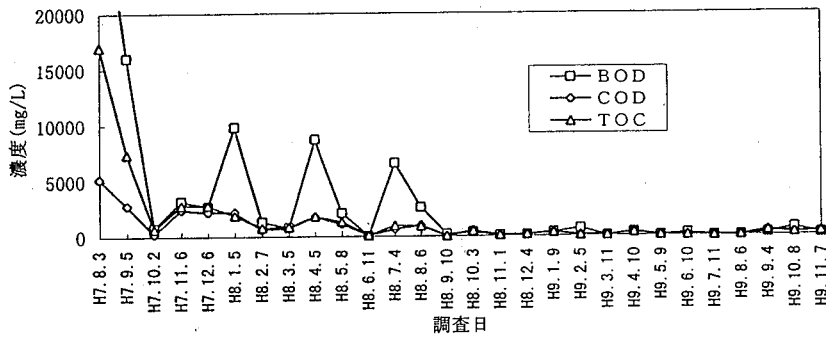


図4 浸出水中のBOD, COD, TOC濃度の推移

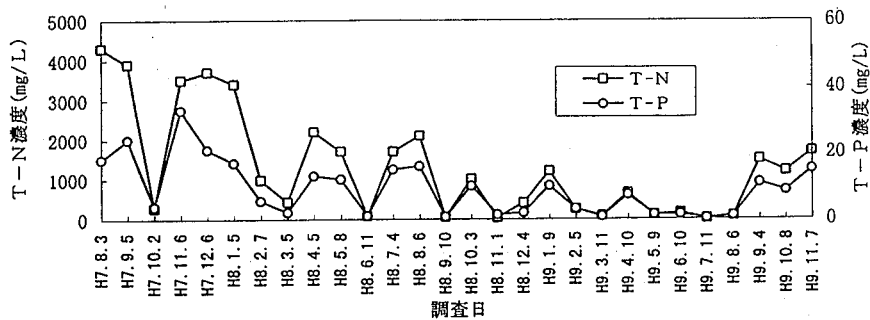


図5 浸出水中のT-N, T-P濃度の推移

表6 浸出水における各調査項目の濃度範囲 (n=29)

項目	最小値～最大値*	濃度推移の傾向
pH	6.5～8.3	変動しながら推移
SS	6～350	変動しながら推移
COD	12～5,200	明らかな減少傾向
BOD	9.6～51,000	明らかな減少傾向
TOC	11～17,000	明らかな減少傾向
T-N	14～4,300	明らかな減少傾向
T-P	0.33～33	明らかな減少傾向
Cd	<0.01～<0.01	検出されず
Pb	<0.01～ 0.03	ほとんど検出されず
As	<0.01～ 0.22	調査初期のみ検出
T-Hg	<0.0005～<0.0005	検出されず
Cr(VI)	<0.05～<0.05	検出されず
T-Cr	<0.01～ 0.03	ほとんど検出されず
Cu	<0.01～ 0.33	変動しながら推移
Zn	<0.01～ 1.2	変動しながら推移
Fe	0.47～ 270	変動しながら推移
Ni	<0.01～ 0.12	変動しながら推移
Mn	0.12～ 52	変動しながら推移

*：最小値～最大値の単位はmg/L (pHを除く)

ずかに溶出が認められたが、調査の後期においてはほとんど溶出が認められなくなった。また、廃棄物埋立地においては、しばしばカルシウムスケールによる集水機能の低下が問題となっていることから、Caについても測定を行った。浸出水中のCa濃度は、17～140 mg/Lの範囲で変動しながら推移した。撤去時(28ヵ月経過時)に集水管出口にわずかな付着物の沈着が認められたため、付着物の一部を採取しX線回折装置に

より分析を行ったところ、カルサイト(炭酸カルシウム)であることが確認された。

次に、有機物の指標とされるBOD, COD, TOC及びT-N, T-P濃度の推移を図4及び図5に示した。浸出水中のBOD, COD, TOCは、時間の経過に従って減少する傾向を示した。これらの濃度推移を概観すると、いずれの項目においても減少が早期に急激に起こっていた。

また、T-NとT-Pについては、それぞれの初期濃度が4,300 mg/L, 18 mg/Lであったが、いずれも時間の経過とともに徐々に減少の傾向を示していた。特徴的なことは、BOD, COD, TOCの場合に比してT-N, T-Pとも減少過程の濃度の変動が大きかったことである。濃度の高いときは浸出水量が少ない時、逆に濃度の低いときは、浸出水量が多い時に対応していたことから、T-N, T-Pの溶出濃度は、BOD, COD, TOCに比して浸出水量変化の影響を受けやすいものと推察された。

4.4 埋立廃棄物層内の有機物等の安定化状況

模擬処分場撤去時に採取した上層, 中層, 下層の埋立廃棄物の性状試験結果及び溶出試験結果を表7及び表8に示した。採取した埋立物の外観はいずれも灰褐色で、上層から下層に向かってし尿臭が強くなっており、含水率, 強熱減量も同様に上層から下層に向かっ

表7 深度別埋立廃棄物の性状試験結果

項目	上層	中層	下層	(埋立前)
外観	灰褐色	灰褐色	灰褐色	灰褐色
臭気	し尿臭	し尿臭	し尿臭	し尿臭
含水率 (%)	59	58	61	48
強熱減量 (%)	8.6	9.3	21	18

表8 深度別埋立廃棄物の溶出試験結果
(mg/L、但しpHを除く)

項目	上層	中層	下層	(埋立前)
pH	7.9	8.4	8.5	6.2
BOD	23	79	260	1,600
COD	36	100	200	250
TOC	67	140	250	730
T-N	33	110	210	200
T-P	3.6	4.7	5.0	12
Cd	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Pb	0.01	<0.01	0.01	0.05
As	<0.01	<0.01	<0.01	0.02
T-Hg	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
Cr(VI)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
T-Cr	<0.01	<0.01	<0.01	0.01
Cu	0.09	0.10	0.19	0.19
Zn	0.16	0.19	0.16	0.94
Fe	2.2	3.5	2.5	8.8
Mn	0.03	0.04	0.03	0.36
Ni	<0.01	0.02	0.03	0.01

て高値となる傾向であった。

溶出試験におけるBOD, COD, TOC, T-N, T-Pの濃度については、いずれの項目も採取深度が深いほど溶出濃度が高くなる傾向が顕著であった。強熱減量の挙動と併せて考慮すると、下層部に比して好気的狀態になりやすい上層部において有機物の分解が促進されたこと及び微細な有機質が埋立層の下層に移行したことなどが原因として推察された。また、最も溶出濃度の高かった埋立物下層の溶出濃度と埋立前廃棄物の溶出濃度を比較すると、いずれの項目も埋立前の値より低値となっており、埋立期間中に有機物の分解、流出等が進行したためと考えられた。

金属類の溶出状況については、Fe, Mn, Cu, Zn, Niの溶出が認められた。しかし、Niを除いた各項目の溶出濃度は、埋立前廃棄物の溶出試験結果よりも低値となっており、埋立期間中における可溶性金属の流出による溶出濃度の低下が推察された。なお、Cd, Pb, As, T-Hg, Cr(VI)の有害金属とT-Crについては、Pbで最大0.01 mg/Lの溶出が認められたほかは溶出が認められなかった。

5 まとめ

埋立処分された廃棄物の安定化に関する基礎情報を把握するため、小規模な模擬処分場を建設し撤去まで

の28ヵ月間について、浸出水の排出状況、排出ガスの組成及び浸出水の水質を定期的に調査した。また、模擬処分場撤去に際して、深度別の埋立廃棄物試料を採取して性状試験及び溶出試験を実施したところ次の知見を得た。

(1) 模擬処分場から排出される浸出水量と調査当日、調査前1～3日目の降雨量との関係について相関分析を行ったところ、浸出水量は、調査1日前の降雨量に大きく依存していることが判明した。また、降雨終了後の浸出水量は、比較的速やかに減少することがわかった。

(2) 可燃性ガスは、埋立後すぐに発生し始め、28ヵ月を経過した調査終了時においても明確な減少傾向は認められなかった。したがって、埋立層内においては、埋立直後から有機物の分解が始まり、28ヵ月経過時においても進行中であることが推察された。

(3) 浸出水質の調査結果において、有機物の指標とされるBOD, COD, TOC及びT-N, T-Pは時間の経過とともに明らかな減少傾向を示した。有害金属類については、AsとPbが調査初期に若干検出されたほかは検出されなかった。Fe, Mn, Znは、調査期間の全般を通して濃度の変動が認められた。

(4) 28ヵ月経過時における深度別埋立物の性状試験及び溶出試験の結果、強熱減量及びBOD, COD, TOC, T-N, T-Pは採取深度が深いほど溶出濃度が顕著に高くなっていた。また、埋立物下層の溶出濃度と埋立前廃棄物の溶出濃度を比較すると、いずれの項目も埋立前の値より低値となっており、埋立期間中に有機物の分解、流出等が進行したためと考えられた。

金属類については、Fe, Mn, Cu, Zn, Niの溶出が認められたが、いずれの溶出濃度も埋立前廃棄物の溶出試験結果よりも低値となっていた。また、有害金属であるCd, Pb, As, T-Hg, Cr(VI)については、ほとんど溶出しなかった。

謝 辞

本研究の実施にあたり、模擬処分場の建設及び撤去に際しては、岐阜県石灰工業協同組合の方々に様々な形で協力をいただきました。また、模擬処分場の維持管理については、(株)粥川商店の皆様方に全面的な協力をいただいたところであり、本紙面を借りて深謝します。

文 献

- 1) 日本気象協会岐阜支部：岐阜県気象月報, 35(7),

1995~37(11), 1997

終処分場安定化監視マニュアル, 1989

2) 環境庁水質保全局企画課廃棄物対策室: 廃棄物最

Investigation on Stabilization of the Experimental Landfill for Industrial Waste

Yutaka YASUDA*, Nobuyuki HARA*, Hiroshi TERAO*

Yasuhiro NISHIGAKI**, Tadashi SHIMADA**, Kaichi FUJIYOSHI**, Sadao OTOBE**

**Gifu Prefectural Insititute of Health and Environmental Sciences: 14-12 Yabuta Minami
5 chome, Gifu 500-8384, Japan*

***Gifu Prefectural Industrial Research Technical Center: 47 Kitaoyobi, Kasamatsu-tyo,
Hashima-gun, Gifu Pref. 501-6064, Japan*

浄化槽におけるサルモネラ菌および腸管出血性大腸菌O157の挙動

南部 敏博*, 所 光男**

要 旨

消化器系病原菌に罹患した患者が浄化槽を使用した場合を想定し、浄化槽内の嫌気性槽および処理水中での細菌の挙動を調査した。指標として用いたサルモネラ菌と腸管出血性大腸菌O157は、浄化槽内の水温により挙動は異なり10℃では48時間放置してもほとんど死滅しなかったが、20、30℃では生残率が小さくなった。しかし、減少率は接種する浄化槽の試験液によって大きくばらついた。これらの結果から、実験に用いた病原細菌は、浄化槽内では完全に死滅せず消毒操作が適切に行われない場合には放流水中に混入する可能性があり、環境汚染を防止するためには消毒が不可欠であることが判明した。

キーワード：浄化槽, サルモネラ菌, 腸管出血性大腸菌O157

1 はじめに

浄化槽の放流水は、環境汚染防止の観点から有機物の低減化を図ることは当然のことながら、微生物学的にも安全でなければならない。大規模な施設においては、維持管理作業の中で消毒操作を確実に制御しているが、一般家庭に設置されている小規模な浄化槽では数カ月に1度しか保守点検が行われていないため、消毒が完全にできているか疑問である。

著者らは、これまで単独浄化槽が廃止されるに伴い今後急増が予想される小型合併処理浄化槽に着目して放流水の消毒操作の現状を把握してきた。その結果、法律どおりの保守点検が行われていれば消毒装置の機能は十分発揮されており、放流水中の残留塩素はほとんどの浄化槽で検出された。ところが、放流水中に残留塩素が検出されても細菌が共存する場合があります。消毒が不完全である浄化槽のあることが判明した¹⁾。一方、消毒槽において処理水に添加される消毒剤の量を調査した結果、その量は水温に影響され、夏期に多く冬期に少なく(13-22 g/m³)、処理水の不連続点に必要な塩素量に比べて非常に少ないことが判明した。さらに、実際に処理水を用いて消毒実験を行った結果、クロラミン生成域では、消毒効果が一律でなく処理水中の浮遊物質やpHなどによって影響されたが、クロラミン減少域あるいは不連続点以降では、少ない塩素

濃度と接触時間で比較的確実に消毒できることが明らかになった²⁾。以上の結果から、消毒を確実に行うためには、塩素要求量を増大させる処理水中のアンモニア性窒素および亜硝酸性窒素濃度を減少させることが必須条件であり、このような維持管理が可能であれば現状の消毒方法においてもその効果が期待できることが示唆された。しかし、すべての浄化槽において窒素を十分硝化させることは不可能であり、現状は前報¹⁾のごとく消毒が不完全で放流されている浄化槽が存在している。

そこで、消化器系病原菌に罹患した患者が浄化槽を使用した場合を想定し、これら病原細菌の浄化槽内あるいは処理水での挙動を実験室的に検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 供試病原細菌

実験には、サルモネラ菌の中で我が国で最も高頻度に分離される*Salmonella enteritidis*および腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157)の臨床分離株を用いた。

供試細菌は、トリプトソイブイオン培地(栄研化学)に接種し、37℃18時間培養を2回継代した後、培地による試験液への有機物持ち込みを無くするため菌液を

*岐阜県保健環境研究所, 藪田庁舎: 500-8384 岐阜市藪田南5丁目14番12号

**岐阜県保健環境研究所, 本庁舎: 500-8226 岐阜市野一色4丁目6番3号

滅菌生理食塩水で2回洗浄して使用した。

2.2 試験液の採水と消長実験

試験液は、使用中の小型合併処理浄化槽（嫌気ろ床接触曝気方式）の嫌気第1槽から嫌気第2槽への移流水（嫌気1槽水）と接触曝気槽から最終沈殿槽に移流した沈殿槽上澄み液（処理水）を採水して使用した。また、これらの試験液の性状を把握するため、下水試験方法³⁾によりBODの分析を行った。

消長実験は、2.2で調整した細菌を試験液に一定量接種し、温度条件（10、20、30℃）が異なる暗所に静置して、細菌数の経時変化を観察した。菌数測定には、*S. enteritidis*はDHL寒天培地（栄研化学）を、*E. coli* O157はCT-SMC培地（セフィキシム、亜テール酸カリウム加 Sorbitol MacConkey agar）（Oxiod）を用いた。

3 結果と考察

ヒトが消化器系病原細菌に感染し発病すると、急性期では糞便中に $10^8 \sim 10^9$ 個/mL程度排出される⁴⁾といわれ、患者が使用した浄化槽は病原細菌で汚染される。浄化槽へ流入した汚水は、最小規模である5人槽の小型合併処理浄化槽では、嫌気濾床第1槽で $1/10^3 \sim 4$ 程度に希釈される。そこで、本報の実験では、サルモネラおよびO157を試験液に 10^6 個/mL程

度接種して消長実験を行った。図-1に実験結果の1例を示すが、両細菌とも嫌気1槽水に添加した場合は、静置温度により減少速度に差異はあったが、細菌数は時間経過と共に減少した。処理水の場合は、細菌数は10℃ではほとんど変化しなかったが、20、30℃では嫌気1槽水と同じように減少した。しかし、これらの細菌はどちらの試験液中でも160時間以上経過後においても完全には死滅しなかった。

また、浄化槽における滞留時間は、浄化槽の容量（容量）や使用人数および使用方法によって異なるが、仮に使用水量を250L/人・日として5人槽を5人で使用すると、嫌気濾床槽第1室では19時間、浄化槽全体では74時間程度となる。しかし、現実には構造基準どおりの人数で使用している浄化槽は少ない⁵⁾ことから、浄化槽での滞留時間は計算より長くなっている。そこで、嫌気1槽水と処理水に細菌を接種し48時間後の生残率とBODの関係をまとめ図-2に示す。10℃に静置した場合、両細菌の生残率はBODに無関係に大きく、細菌の減少はほとんど見られなかった。30℃では、生残率はBODが低いほど小さくなる傾向が見られた。20℃は、10℃同様はっきりした傾向はなかったが、10℃に比べ生残率が小さくなっていた。

浄化槽内の水温は、地域によって異なるが夏期には25℃付近まで上昇し、冬期には10℃付近まで降下す

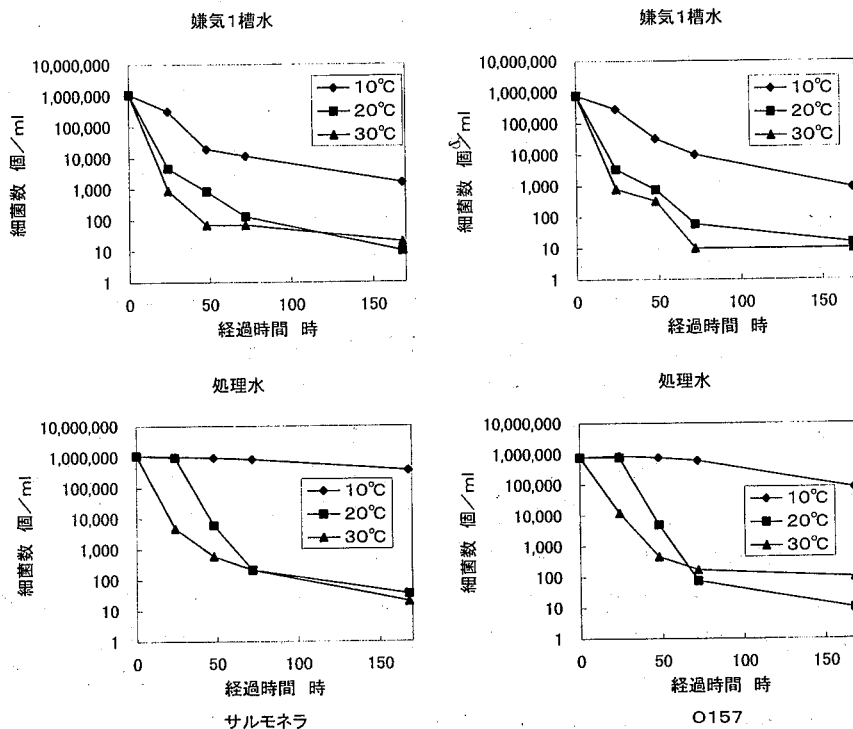


図1 サルモネラおよびO157の経時変化

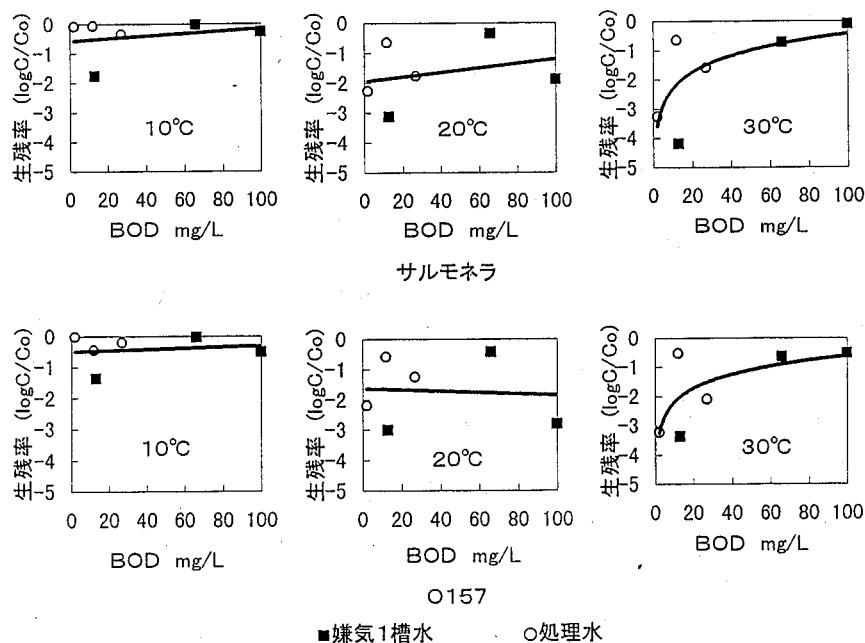


図2 サルモネラおよびO157の生残率とBODの関係

と思われる。また、BODは嫌気槽水は高く、処理水は低い。このような条件を考慮し、これらの細菌が浄化槽に流入した場合の挙動を本報で得られた結果から類推すると、嫌気1槽内では水温が高い夏期にはある程度減少することが考えられるが、冬期はほとんど減少しないと思われる。処理水中では、BODが低いため夏期には減少する可能性はあるが、その他の季節では明らかな減少がないと考えられる。従って、これらの細菌は、消毒操作が適切に行われなければ浄化槽から排出され、環境を汚染することが危惧される。

文 献

1) 南部敏博, 堀尾明宏, 浅野秀昭, 青木堯: 小型合

併処理浄化槽放流水の消毒効果, 日本水処理生物学会誌, 32(3), 173-178, 1996

2) 南部敏博, 浅野秀昭, 後藤淳, 堀尾明宏, 青木堯: 小型合併処理浄化槽放流水の塩素消毒に関する基礎的研究, 第11回全国浄化槽技術研究会講演要旨集, 80-84, 1997

3) 日本下水道協会: 下水試験方法, 1984年版

4) 金子光美: 水の消毒, 371, (財)日本環境整備教育センター, 1997

5) 堀尾明宏, 田中義勝, 小林敦司, 鈴木敏, 青木堯, 南部敏博: 放流水質からみた小型合併処理浄化槽の実態, 月刊浄化槽, No.238, 39-44, 1996

Behavior of *Salmonella enteritidis* or *Escherichia coli* O157 in Small Wastewater Treatment Plant

Toshihiro NAMBU, Mitsuo TOKORO

Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences,
14-12 Yabuta Minami 5 chome, Gifu 500-8384, Japan

岐阜県におけるQ熱リケッチアの血清疫学調査

野田 伸司, 猿渡 正子, 所 光男

要 旨

岐阜県をはじめとして東海地方でQ熱リケッチアの分離やDNAの検出報告が相次ぎ、血清学的にもQ熱の存在が確認されたことから、県内の実態を把握するために血清疫学調査を実施した。

急性Q熱の典型的症状の一つであるインフルエンザ様患者血清の抗体保有率は、健康者血清より高く、上昇する傾向が見られた。健康者血清の保有率は採取された時期による差はなく、30数年以前に採取された血清にも抗体が認められた。

つつが虫病を疑われた血清は保有率、抗体価ともに高い傾向にあった。また、認められた抗体はすべてIgG抗体で、IgM抗体は認められなかった。

キーワード：岐阜県, Q熱, 血清疫学

1. はじめに

国内には存在しないと考えられていたQ熱が、1989年に鹿児島県において第一症例が報告されて以来、関東以西で患者発生の報告がある¹⁾。近県では、静岡県でインフルエンザ様症状の小児の咽頭拭い液やその家族からQ熱リケッチアが分離され²⁾、岐阜県でも平井らが1982年の異形肺炎患者血清から高率なりケッチア分離とDNAの検出を報告している³⁾。

Q熱の宿主動物は家畜、ペット、野生動物、鳥類と広く、ヒトは病原体を含む塵埃を動物と関連する環境から吸入することにより感染すると考えられている^{1,3)}が、これら上気道感染患者の発生はヒトからヒトへの感染経路も否定できない。

このような状況から、岐阜県における感染実態の現状把握と侵入時期の推定を目的として血清疫学調査を実施した。

表1 調査対象血清

群	区 分	採 取 年	例数
1	インフルエンザ様疾患患者血清	1992~1995	234
2	ポリオ検索時の疫学調査用血清 ウイルス検査用血清 健康者血清(献血者)	1962~1964	242
		1970~1974	91
		1983~1984	122
3	つつが虫病検査依頼血清 (つつが虫病は陰性)	1990~1994	85
合 計			774

2. 材料と方法

2.1 被検血清

表1に示す様に774本の血清を3群に分けた。つまり、1群：有症者血清として234本、内訳は1992~1995年にインフルエンザ様患者から採取された血清である。2群：健康者血清455本、内訳は1962~1964年のポリオ流行時に血清疫学用に採取された242本と1970~1974年にウイルス検査用に採取された血清91本そして1983~1984年に採取された献血者血清122本である。3群：つつが虫病検査依頼血清85本、これらは1990~1994年の5年間に当所へ検査依頼のあったうちつつが虫病が否定された血清である。

2.2 調査方法

上記血清を用い、Q熱リケッチアのII相菌を抗原として間接蛍光抗体法で抗体を測定した。

抗原は岐阜大学平井教授より分与を受け、一部はBGM細胞で増殖させたII相菌を部分精製して使用した。間接蛍光抗体法はDAKO社製の標識抗体を使用して常法⁴⁾により行い、1:16以上の抗体価を示した血清を陽性と判定した。陽性の血清は定量を行うとともに、IgG抗体の他にIgM抗体の検出も試みた。

3. 結 果

3.1 各群の年次別抗体保有状況

表2に採取年別の抗体保有率を示した。急性Q熱と同症状を示すインフルエンザ様患者の平均保有率8.1

表2 各血清の採取年別抗体陽性数と陽性率

群	区 分	採取年	検体数	陽性数	陽性率(%)
1	インフルエンザ様疾患患者血清	1992	76	5	6.6
		1993	95	8	8.4
		1994	38	3	7.9
		1995	25	3	12.0
		計	234	19	8.1
2	ポリオ検索時の血清	1962	114	3	2.6
		1963	66	6	9.1
		1964	62	2	3.2
		計	242	11	4.5
	ウイルス検査用血清	1970	21	1	4.8
		1972	15	0	0
		1974	55	2	3.6
		計	91	3	3.3
	献血者血清	1983	85	3	3.5
		1984	37	2	5.4
計		122	5	4.1	
3	つつが虫病検査依頼血清	1990	12	1	8.3
		1991	14	2	14.3
		1992	16	0	0
		1993	26	3	11.5
		1994	17	3	17.6
		計	85	9	10.6

%は健康者の平均保有率 3.3~4.5%より高かった。また、採取年別保有率は上昇する傾向が認められた。

健康者血清では、ポリオ流行時の1960年代とウイルス検査用血清の1970年代、更に献血者由来の1980年代の抗体保有率は3~4%で差は認められなかった。

つつが虫病検査依頼血清の保有率は、抗体の認められない年もあったが、10%を超える年が多く、5年間の平均は10.6%であった。

なお、これらの抗体はいずれもIgG抗体で、IgM抗体は認められなかった。

3.2 陽性血清の抗体価分布

各群の検体由来別抗体価を表3に示した。1群(有症者)、2群(健康者)とも抗体価は低く、有症者血清19例中17例(89%)、および健康者血清19例中

18例(95%)が1:16で、その他では1:32を示した血清がインフルエンザ様患者血清で2例、ポリオ流行時の血清で1例認められたのみであった。

つつが虫病検査依頼血清では、陽性9例中1:16、1:32がそれぞれ3例、5例で1:64を示した血清も1例認められた。

4. 考 察

Q熱感染症の国内症例が報告されて以来、ヒトや家畜を対象として疫学調査が行われている。ヒトの場合、急性型の主症状であるインフルエンザ等の呼吸器疾患患者を対象にされるケースが多い。平井ら³⁾は、呼吸器疾患患者の陽性率を15%と報告し、Nagaokaら²⁾は静岡県の小児のインフルエンザ様患者の陽性率を

表3 陽性血清の抗体価分布

群	区 分	検体数	陽性数	1:16	1:32	1:64
1	インフルエンザ様疾患患者血清	234	19	17	2	
2	ポリオ検索時の血清	242	11	10	1	
	ウイルス検査用血清	91	3	3		
	献血者血清	122	5	5		
3	つつが虫病検査依頼血清	85	9	3	5	1
	合 計	774	47	38	8	1

32.7%と報告している。今回の岐阜県のインフルエンザ様患者血清の陽性率8.1%はこれらに比較すると低くなったが、高くなる傾向も見られることから今後の注意が必要と思われた。

健康者の抗体陽性率は1960年代から殆ど変わらなかった。平井ら³⁾も1990年の陽性率を3.3%と報告しており健康者の保有率は同程度と思われるが、30数年も以前に採取された血清に抗体が認められたことは、存在していないと考えられていたQ熱が相当以前から蔓延していたことになる。当所にはこれ以前に採取された血清の残余はなく更に遡っての調査は不可能で、蔓延年代を推測することはできなかった。

つつが虫病検査依頼血清は陽性率、抗体価ともに他のグループより高い結果が得られた。これらの患者は刺口が認められたことから、ダニを始め何らかの虫の刺傷により発病した可能性が高い。前述したように、ヒトへの感染経路は病原体を含む塵埃の吸入と考えられており、Q熱リケッチアを保有するダニの刺傷による感染か否かは不明であるが、つつが虫病同様のダニ媒介性感染症の調査が実施されればより明らかな結論が導き出されると思われる。

今回の調査で認められた抗体はすべてIgG抗体であった。栄ら⁵⁾も卵黄継代抗原を用いたマイクロ-IF法で愛知県の1997年の呼吸器疾患小児の血清を調査し、高い抗体価と有意上昇があったが、すべてIgG抗体であった、と報告している。岐阜県の血清は凍結融解を何度も繰り返しており、その過程でIgM抗体が消失した可能性は否定できないが、新鮮な血清を用いた愛知県の成績は、診断用抗原と異なる性状のリケッチアの存在を示唆している。

最近、Nodaら⁶⁾は、マダニに共生するQ熱リケッチア類似の微生物を発見した。彼らは健康なヒトや動物からの分離やDNA遺伝子の検出率の多さに比べ、患者発生数の少なさ、抗体価の低さ等から非病原性のリケッチアである可能性を指摘しているが、Q熱の疫学を根本から変える可能性のある報告で今後の展開が期待される。

5. ま と め

- (1) 急性Q熱と同症状を示すインフルエンザ様患者の抗体保有率は健康者血清の抗体保有率より高かった。
- (2) 健康者血清の抗体保有率には変化はなく、30数年以前に採取された血清にも抗体が認められた。
- (3) つつが虫病を疑われた血清は、陽性率、抗体価ともに高い傾向にあった。
- (4) 認められた抗体はすべてIgGで、IgM抗体は認められなかった。

謝 辞

今回の調査にあたり、岐阜大学農学部平井克哉教授には抗原の分与、文献の送付等数々の便宜をいただきました。厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 小田紘, 吉家清貴: Q熱と *Coxiella burnetii*, 日細菌誌, 50,703-715,1995
- 2) Hiromi Nagaoka, Masato Akiyama, Masaaki Sugieda, Tomohiro Nisio, Sousuke Akahane, Hiroshi Hattori, To Ho, Hideto Fukushi, and Katsuya Hirai: Isolation of *Coxiella burnetii* from Children with Influenza-Like Symptoms in Japan: Microbiol. Immunol., 40,147-151,1996
- 3) 平井克哉, 山口剛士, 福士秀人: Q熱(コクシエラ症)の現況, 臨床と微生物, 22,404-411,1995
- 4) 東京大学医科学研究所学友会: 微生物学実習提要, 329-335,1988
- 5) 栄賢司, 山下照夫, 都築秀明, 鈴木康元: 急性呼吸器疾患患者に対するMIF法によるQ熱抗体価測定, 平成9年度希少感染症診断技術研修会, 1998
- 6) Hiroaki Noda, Ulrike G. Munderloh, and Timothy J. Kurtti: Endosymbionts of Ticks and Their Relationship to *Wolbachia* spp. and Tick-Borne Pathogens of Humans and Animals, Appl. Environ. Microbiol., 63,3926-3932,1997

Seroepidemiological Study of *Coxiella burnetii* in Gifu Prefecture

Nobuji NODA, Seiko SAWATARI, Mitsuo TOKORO

Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences
6-3, Noishiki 4 chome, Gifu, 500-8226, Japan

ヒノキオイルを配合した温泉モデル浴用剤の試作研究

坂井 至通

要 旨

動植物から抽出された香り成分に精神的ストレスを緩和する作用のあることが知られ、浴用剤などへの利用が検討されている。本報では岐阜県を代表する4温泉(下呂温泉, 海津温泉, 新穂高温及び平湯温泉)の泉質を参考にヒノキオイルを配合したモデル浴用剤を試作し、入浴時を想定した温度(30-50℃)と時間(10-60分)について揮発するヒノキ成分の動向を検討した。ヒノキ成分の評価はリテンションインデックス法を用いた。温度が高いほど揮発成分量は多くなる傾向にあり、C11, C15, C16に分類される一連の化合物がヒノキの香りの成分と考えられた。また、ヒノキオイルの主成分であるT-カジノール及び α -カジノール(両者でヒノキオイルのほぼ50%の含量)はC17に分類されるが、これらの化合物は不揮発性であった。

キーワード：岐阜県内温泉, モデル浴用剤, ヒノキオイル, リテンションインデックス

1 はじめに

近年、動植物から抽出された香り成分に精神的ストレスを緩和する作用のあることが知られ、リラックス作用を心理的生理的機能の面から解明しようとする試みがなされつつある¹⁻³⁾。ヒノキオイルを利用した各種の製品にも、リラックス効果、リフレッシュ作用、抗菌作用などを付加価値として標榜し多数市販されているが、そのほとんどは、有効成分の表示、用法用量、安全性などを表示した例はなく、その有効性の科学的根拠も明らかになっていないものと思われる。これまで、岐阜県産ヒノキの有効利用を図る目的で、東濃ヒノキの枝葉からヒノキオイルを抽出し、ヒノキの香りの嗜好性調査やその成分について報告した⁴⁾が、今回、岐阜県を代表する温泉4カ所の成分を参考にヒノキオイルを配合したモデル浴用剤を作成し、入浴時において揮発するヒノキ成分の検討を行った。ヒノキ成分は、キャピラリーガスクロマトグラフ法(キャピラリーGC)を用いて測定し、n-アルカン(n-オクタンからn-ドトリアコンタン)の炭素数を指標にしてリテンションタイムの区分を作り、区分内に検出されたピークの総面積値で表すリテンションインデックス法により、揮発性成分の動向を評価した。

2 実験方法

2.1 試料

ヒノキオイルは、和歌山県産ヒノキを原料とした高砂香料工業製を用いた。カジノール標準品は熊本工業大学長濱静男教授より供与されたT-カジノール(m.p. 43-44℃, $[\alpha]_D = +3.59^\circ$)及び α -カジノール(m.p. 74.5-75.0℃, $[\alpha]_D = -47^\circ$)を用いた。リテンションインデックス標準品は、シグマ社製(カタログNo. R8769)で、n-アルカンの炭素数を8から1ずつ増やし、炭素数で32まで(n-オクタン:C₈H₁₈からn-ドトリアコンタン:C₃₂H₆₆)を指標にし、炭素数が5の倍数は2000 $\mu\text{g/mL}$ 溶液、その他は1000 $\mu\text{g/mL}$ 溶液になるようn-アルカンを混合しヘキサソに溶解したものをを用いた。内部標準として用いたp-ヒドロキシ安息香酸ヘプチル及びモデル浴用剤を試作するための塩化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、フッ化ナトリウムは試薬特級を用いた。

2.2 ヒノキの香りの閾値調査

100 mLの共栓付き三角フラスコを各5個5組用意し、それぞれに蒸留水50 mLを入れた。ヒノキオイルの添加を1 μL , 5 μL , 10 μL , 50 μL 及び100 μL

の5段階濃度とし、各組5個のうち2個にそれぞれ添加した。同一濃度毎に40℃の恒温水浴に30分放置し、パネラー7名に(当所職員)、ヒノキオイルの香りがするフラスコを選択してもらった。各組における添加個数はパネラーに知らせないものとした。

2.3 モデルとした温泉成分の組成及びモデル浴用剤の作成

岐阜県下の主要温泉の泉質から代表温泉地として、下呂温泉(アルカリ性単純温泉)、平湯温泉(ナトリウム炭酸水素塩温泉)、海津温泉(ナトリウム塩化物温泉)及び新穂高温泉(単純硫黄温泉)の4ヶ所を選び、その平均的成分量を表1⁵⁾に示した。塩化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、フッ化ナトリウムの組み合わせにより、それぞれのイオン量になるように配合量を近似させ、表2に示したようなモデル処方を作成した。4種のモデル処方により調製した無機塩類の混合物をそれぞれ30g乳鉢に取り、ヒノキオイルのヘキサソル溶液10mL(ヒノキオイル4mL相当量)をかき混ぜながら添加し、乾燥後モデル浴用剤とした。

2.4 ヒノキ成分の測定

ヒノキ成分の分析は、前報⁴⁾と同様にキャピラリーGCにより測定した。ヒノキオイルはその1mLをヘキサソルで100倍に希釈したものに、内部標準溶液(p-ヒドロキシ安息香酸ヘプチル250mgをヘキサソル100mLに溶解)を同量加えて試料溶液とした。また、リテンションインデックス標準品はその1mLをヘキサソルで25倍に希釈し、内部標準溶液を同量加えて試料溶液とした。揮発するヒノキオイルのヘッドスペース法による測定には、気相部5.0mLをガスタイトシリンジで採取し、キャピラリーGCで測定した。

リテンションインデックス値及びピーク面積累積値の算出方法

2.5 リテンションインデックス値及びピーク面積累積値の算出方法

キャピラリーGCにより得られた各ピークのリテンションタイムは、内部標準物質(p-ヒドロキシ安息香酸ヘプチル)のリテンションタイムを基準(100)とし、それぞれのリテンションタイムの補正を行った。リテンションインデックス値(I^T)^{6,7)}は、図1の計算式により、昇温プログラムを用いたときの値を算出した。

また、n-アルカンのリテンションタイムを用い、C10からC25まで(炭素数を指標)の区分を作り、区分内に検出されたピークの面積を総計し、ピーク面積累積値とした。例えば、C10からC11の間のピーク面積累積値は、C11の値として表した。

2.6 ヘッドスペース法による揮発性成分の測定

100mLのバイアル瓶に蒸留水50mLを入れ、ヒノキオイルをそれぞれ0.1, 0.25, 0.5, 1.0及び2.5mLを添加した。恒温水槽の温度を30, 40, 50℃とし、加温時間は10, 20, 30, 60分間とした。それぞれのバイアル瓶の気相5.0mLを取り、キャピラリーGCでヒノキ成分を測定した。また、各モデル浴用剤の7.5mgをバイアル瓶に取り、それぞれに蒸留水50mL、ヒノキオイル0.1mLずつ添加した後、40℃で30分間加温し、ヘッドスペース法により揮発性成分

表1 岐阜県下の泉質別の代表的温泉の成分

温泉名	下呂温泉	平湯温泉	海津温泉	新穂高温泉
泉質	アルカリ性単純温泉	ナトリウム炭酸水素塩温泉	ナトリウム塩化物温泉	単純硫黄温泉
泉温(℃)	60.7	62.6	45	90.5
pH	9.5	6.9	7.3	7.1
組成分量(mg/Kg)				
ナトリウムイオン	129	193	2413	133
カリウムイオン	2	28	55	19
カルシウムイオン	3	143	983	16
マグネシウムイオン	0	54	157	4
鉄イオン	18	0	0	5
塩化物イオン	111	149	5930	159
硫酸イオン	8	146	0	26
炭酸イオン	84	799	165	143
ケイ酸	65	227	28	290
炭酸ガス	0	225	28	290
硫化水素	0	0	0	3.1

表2 モデル処方

試薬/温泉名	下呂温泉	海津温泉	新穂高温泉	平湯温泉
塩化ナトリウム	182	6078	205	—
炭酸水素ナトリウム	117	230	166	457
硫酸ナトリウム	12	—	38	216
塩化カリウム	3.8	104	37	53
塩化カルシウム	8.2	2455	40	357
塩化マグネシウム	—	619	16	211
フッ化ナトリウム	40	—	11	—
合計量	363	9486	513	1294

備考：単位はgで、合計量を40℃の水1000Lに溶かした。pHの調整は行わなかった。

$$I^T = 100 \left[\frac{t_{Ri}^T - t_{Rz}^T}{t_{R(z+1)}^T - t_{Rz}^T} + z \right]$$

I^T = 昇温プログラムGC分析のリテンションデックス
 t_{Ri}^T = サンプルピークのリテンションタイム
 t_{Rz}^T = サンプルピーク直前のn-アルカンのリテンションタイム
 $t_{R(z+1)}^T$ = サンプルピーク直後のn-アルカンのリテンションタイム
 z = サンプルピーク直前のn-アルカンの炭素数

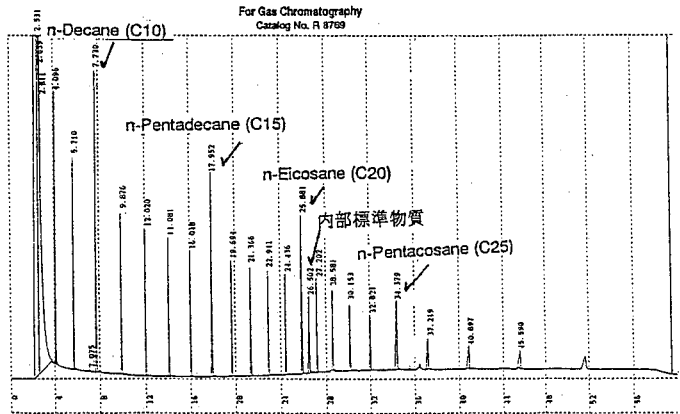


図1 リテンションインデックスのキャピラリーGCクロマトグラム

の測定を行った。

3 結果及び考察

3.1 リテンションインデックスによるヒノキオイル成分の評価

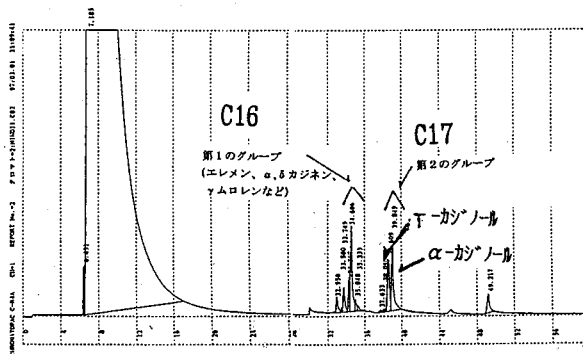
ヒノキオイルをキャピラリーGCで分析した時のクロマトグラムを図2-aに、リテンションインデックス値を図2-bに示した。リテンションタイムが30-37分の第1グループはリテンションインデックス値ではC16に、37-41分の第2グループはC17に相当する2つのピーク群が認められた。C17に認められた主ピークは、 γ -カジノール及び α -カジノールで、これらの構造式を図3に示した。ヒノキオイル中の含量は、 γ -カジノールが27.1%、 α -カジノールが24.8%で、両者でほぼ50%を占めていた。

3.2 ヒノキオイル揮発性成分を指標としたヒノキオイル添加量の検討

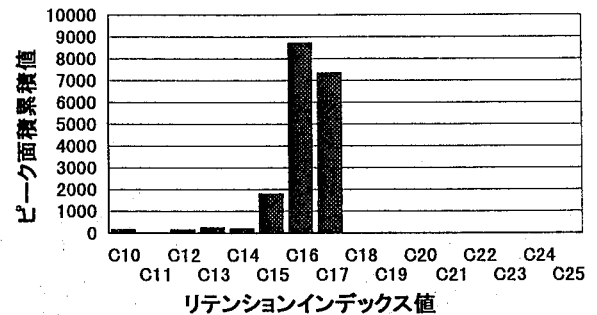
モデル浴用剤へのヒノキオイルの添加量を決めるため、ヘッドスペース法による揮発性成分の測定を行っ

た。加温時間は30分間とし30, 40, 50℃の各温度で、ヒノキオイルをそれぞれ0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 mL添加し、揮発性成分をキャピラリーGCで測定した。その結果をリテンションインデックス値で図4に示した。なおヘッドスペース法により気相を測定する場合は、内部標準物質によるピーク面積の補正は行わなかった。いずれの温度でも成分パターンは類似し、C11, C15及びC16が多く、0.1 mLの添加量で充分目的を達成しているものと考えられた。また、C17はほとんど検出されず、 γ -カジノールや α -カジノールは揮発しないことが分かった。さらにバイアル瓶のシールを開封した時、ヒノキの香りが認められたことから、キャピラリーGCで検出されるC17の成分ではなく、含量は少ないがC11などの揮発性成分がヒノキの香りの重要な要素の一つであることを認めた。これはヒノキオイルのみをバイアル瓶に入れて検討した時、同様の結果を得たことから確認できた。

加温温度と加温時間の検討では、ヒノキオイルの添加量を0.1 mLとし、温度を30, 40, 50℃、時間を



2-a ヒノキオイルのキャピラリーGCクロマトグラム



2-b ヒノキオイル成分のリテンションインデックス

図2 ヒノキオイルのキャピラリーGCクロマトグラム及びリテンションインデックス値

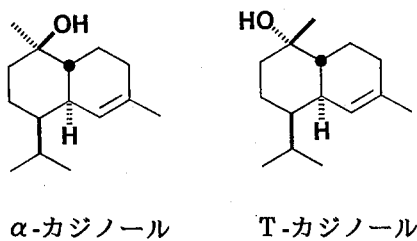


図3 T-カジノール及び α -カジノールの構造式

10-60分とした。その結果を図5に示した。時間の長短による変化はほとんどなく、温度が高いほど揮発成分量は多くなる(50℃は30℃のほぼ4倍)傾向にあった。

3.3 モデル浴用剤別の検討

浴用剤は医薬部外品に分類⁸⁾され、硫酸ナトリウムや炭酸水素ナトリウムなどの無機塩類を主成分とし、疲労回復、あせも、冷え性などに効能効果を有する製剤である。平成10年3月には、浴用剤製造(輸入)承認基準が別途通知され⁹⁾、有効成分の種類、規格及び分量、添加物の種類、剤形、配合量、用法及び用量、効能又は効果などの承認基準が定められた。

岐阜県を代表する温泉地4ヶ所の平均的成分量により塩化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシ

ウム、フッ化ナトリウムを用い処方量を算出した。ケイ酸は水に溶解しないことから、また平湯温泉及び海津温泉の炭酸ガス、及び新穂高温泉の硫化水素は、それぞれ添加しなかった。また、モデル浴用剤は無機塩類の混合物からなり、200Lの浴槽を考慮し投入するモデル浴用剤の量は30gとした。なおpH調整は行わなかった。ヒノキオイルの香りの閾値調査で、水50mLに対するヒノキオイルの添加量が1-5 μ Lでは7人中5人が、10-100 μ Lでは全員が判別できた。従って50mLに対しヒノキオイルの添加量を1 μ Lとした場合、モデル浴用剤(30g/200L)中のヒノキオイル含量は4mL(ヒノキオイルの比重が0.883で3.53mg相当)となる。しかし、バイアル瓶中の1 μ Lのヒノキオイル量は、キャピラリーGCによる測定でC11及びC16の主ピークでも検出限界近くであり正確な測定ができないため、揮発性成分の測定には100倍量の0.1mLを添加とした。

入浴時の温度を40℃、時間を30分と仮定し、モデル浴用剤別にヒノキオイルからの揮発性成分の検討を行った。図6に示したように、海津温泉浴用剤では、低沸点のC10で、新穂高温泉浴用剤ではC12及びC13でピークが検出されなかった。しかし、その他のピークについては、4モデル浴用剤のピーク数及びピーク面積値はほぼ同じであった。なおこれらのピークが

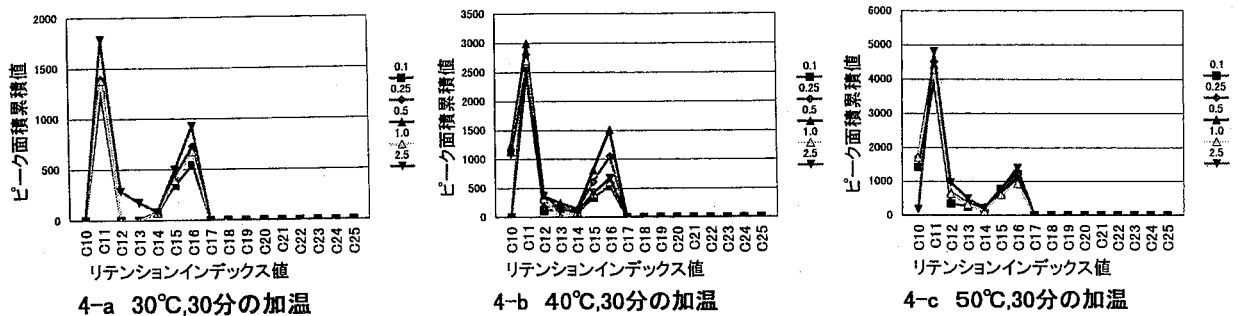


図4 ヒノキオイルの添加量の検討

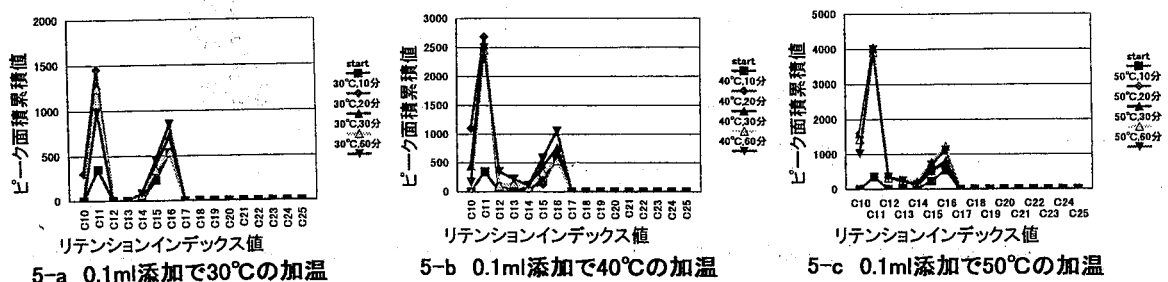
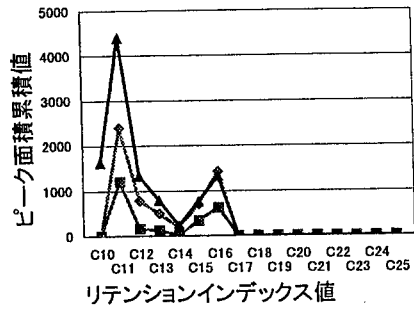
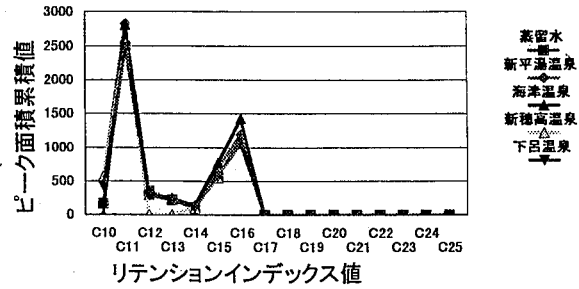


図5 加温温度と時間の検討(ヒノキオイル0.1mL添加)



6-a 0.1mL添加で30分加温



6-b モデル浴用剤別比較
0.1mL添加,40°Cで30分加温

図6 モデル温泉別の比較

検出されなかった原因については明らかでない。

また、いずれのモデル浴用剤も 30 g に対しヒノキオイル 4 mL の添加量 (4 mL / 30 g = 0.133) で検討を行ったが、実際は表 2 に示したように 4 モデル浴用剤ごとに 1000 L 中の合計量が異なっており、それぞれ 200 L に相当する処方量は 30 g を越え、ヒノキオイル添加量 (4 mL) を実質の温泉に近似させて換算すると、下呂温泉浴用剤が 9.7 mL (363 g / 5 * 0.133)、平湯温泉浴用剤が 34.4 mL (1294 g / 5 * 0.133)、海津温泉浴用剤が 252.3 mL (9486 / 5 * 0.133) 及び新穂高温泉が 13.6 mL (513 / 5 * 0.133) となり、今回検討した 4 mL を上回っていた。しかし、各モデル温泉液 1000 mL を調製したとき、海津温泉浴用剤及び平湯温泉浴用剤は完全に溶解せずに無機塩類の沈殿が認められ、また、モデル浴用剤作製に当たり pH 調整を行わなかったため、下呂温泉浴用剤では 36.0 °C で pH 8.41 (実際の温泉では 60.7 °C で pH 9.5)、海津温泉浴用剤では 33.5 °C で pH 7.23 (実際の温泉では 45 °C で pH 7.3)、新穂高温泉浴用剤では 34.1 °C で pH 8.62 (実際の温泉では 90.5 °C で pH 7.1)、平湯温泉浴用剤では 36.0 °C で pH 9.73 (実際の温泉では 62.6 °C で pH 6.9) となりかなりの相異がみられた。今回、温泉分析で得られた無機塩類の量からモデル浴用剤を調製したが、実際の温泉とは pH、温度、その他の微量成分が異なっており完全な再現は困難であった。従ってモデル浴用剤は各 30 g にヒノキオイル 4 mL を添加した処方が適当と思われた。

謝 辞

ヒノキオイルを提供していただいた高砂香料工業 (株) に、また T-カジノール及び α-カジノールを分与していただいた熊本工業大学長濱静男教授に深謝いたします。また、本研究に適切な助言をしていただい

た岐阜県保健環境研究所寺尾 宏主任専門研究員、健康科学担当今井準三部長研究員、生活科学部中屋謙一郎部長並びにパネラーになっていただいた生活科学部員の皆様に感謝いたします。

本研究は、岐阜県科学技術振興センター平成 9 年度ぎふハイテク共同研究「岐阜県産樹木より抽出した成分の利用開発」の研究費の一部により行いました。

文 献

- 1) 筒井末春：ストレス状態と心理医学的アプローチ、97-120、診断と治療社、1988
- 2) 筒井末春、中野弘一：心理医学入門、南山堂、1987
- 3) 山本春義：ストレス教室、1-41、新興医学出版、1996
- 4) 坂井至通：岐阜県産ヒノキ枝葉より得た抽出液の香り評価に関する研究、岐阜県保健研所報第 5 号、1-7、1997
- 5) 寺尾 宏：私信
- 6) Yiliang Sun, Ruiyan Zhang and Qingqing Wang: Programmed-temperature Gas Chromatographic Retention Index, Journal of Chromatography, A, 657, 1-15, 1993
- 7) A. C. Moffat: Use of SE-30 as Stationary phase for the Gas-liquid Chromatography of Drugs, Journal of Chromatography, 113, 69-95, 1975
- 8) 日本公定書協会編集、厚生省薬務局審査課監修：医薬部外品・化粧品製造申請ガイドブック第一版、1-16、薬事日報社、1991
- 9) 厚生省医薬安全局長：平成 10 年 3 月 24 日、医薬発第 293 号、浴用剤製造 (輸入) 承認基準

Study on the Trial Combination of Hinoki Oil for the Bath Medicines Modelled
by Hot Springs

Yoshimichi SAKAI

Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences :
6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500-8226, Japan

岐阜県内で発生したヒスタミン中毒を疑う事例について

国島 幸*, 奥村 直尊*, 中屋 謙一*
清水 義則**, 市橋 正**, 岩田 康夫***, 山川 隆****

要 旨

平成10年1月から5月にかけて岐阜県内においてマグロを原因食品とするヒスタミン中毒様事例が3件続いて発生した。9食品(有症者の実食残品2検体, 検食および原材料等7検体)についてヒスタミンおよびカダベリン, スペルミジン, チラミン, プトレスシンの分析を行った。その結果, 実食残品2検体から390~530 mg/100 gのヒスタミンおよび2.8~5.9 mg/100 gのカダベリンが検出され, ヒスタミンが原因物質と考えられた。一方, 検食および原材料等からはヒスタミンは6.0 mg/100 g以下, カダベリンは0.92 mg/100 g以下, その他のアミン類は検出されず, 本中毒様事例との関連はないと考えられた。

以上の調査結果から, 実食残品の検査の重要性が示唆された。また, ヒスタミン事例の連続発生の原因については不明であるが, 冷蔵および冷凍保存への過信から起きたものと思われる。

キーワード: ヒスタミン, 食中毒, マグロ

1 はじめに

イワシ, マグロ, サバなどの赤身魚やそれらの加工品を摂食したとき, 数分から数時間で発赤やかゆみ, じん麻疹を主症状とするアレルギー様食中毒を起こすことがある。その主要な原因物質はヒスタミンであり, ヒスタミン食中毒と呼ばれている。これは食品中に含まれるヒスタジンと呼ばれるアミノ酸が微生物の脱炭酸酵素の作用によりヒスタミンとなり, 食品中に蓄積したものを摂食することによって起こる¹⁾。また, 主要な原因食品として赤身魚が挙げられるが, これはこれらの食品中にヒスタジンが多量に存在するためである²⁾。

最近10年間, 岐阜県内で同食中毒は発生していなかった³⁾。しかし, 平成10年1月から5月にかけて食中毒および有症苦情を3件経験し, 若干の知見を得たので3事例の詳細とともに報告する。

2 事例概要

3件の食中毒および有症苦情事例の概要は次のとお

りであった。

事例1は平成10年1月に羽島保健所管内で発生し, 食中毒事例として処理された。事業所で出前の魚フライ弁当を摂食したところ, 10分から50分で発症した。主症状は発赤, 頭痛, 動悸であった。摂食者数4名, 有症者数4名, 入院者数3名であった。当該仕出し屋から出前された他の弁当の摂食調査より, 発症者だけが摂食したメバチマグロのフライを原因食品と推定した。

事例2は平成10年2月に高山保健所管内の中学校で発生し, 有症苦情として処理された。学校給食(マグロの照り焼き等)を摂食後30分程度で発症した。主症状は顔面紅潮, 頭痛であった。摂食者数3,227名, 有症者数24名であった。当該給食センターは小学校1校, 中学校2校に給食を提供しているが, 中学校1校でのみ発症者があった。

事例3は平成10年5月に関保健所管内で発生し, 有症苦情として処理された。20日間程度家庭で冷凍保存されていたマグロの刺身を摂食したところ, 約30分

*岐阜県保健環境研究所: 500-8226 岐阜市野一色4丁目6番3号

**羽島保健所: 501-6232 羽島市竹鼻町狐穴川口719-1

***高山保健所: 506-0055 高山市上岡本町7-468 飛騨総合庁舎

****関保健所: 501-3756 美濃市生櫛1612-2 中濃総合庁舎

表1 試験品

試料番号	試料名	試料詳細	事例番号
1	マグロ(生)	原材料	1
2	マグロフライ	残品(店で採取された該当弁当の残品)	1
3	マグロフライ	残品(有症者の実食残品)	1
4	マグロ照り焼き	検食用	2
5	マグロ(生)	原材料(同一仕入れ)	2
6	マグロ(生)	原材料(同一仕入れ)	2
7	マグロ(生)	原材料(同一仕入れ)	2
8	マグロ(生)	原材料(同一仕入れ)	2
9	マグロ(生)	残品(有症者の実食残品)	3

で発症した。主症状は動悸，充血，全身発赤，頭痛であった。摂食者数3名，有症者数3名であった。摂食調査よりマグロの刺身を原因食品と推定した。

3 材料及び方法

3.1 材料

各事例発生時に回収した9検体(事例1から3検体，事例2より5検体，事例3より1検体)を用いた。これらの食品のうち残品は3検体(有症者の実食残品は2検体)であり，その他の6検体は検食および原材料であった。詳細を表1に示した。

3.2 方法

3.2.1 理化学的検査

衛生試験法・注解(1990)に従い，ヒスタミンおよび不揮発性腐敗アミン類の5物質を分析した。ヒスタミン以外の不揮発性腐敗アミン類はヒスタミンの作用を相乗的，相加的に増強することがあり，ヒスタミン

量が少ない場合にもアレルギー様食中毒を起こすことがあるといわれている¹⁾。図1に不揮発性腐敗アミンの生成過程を示した¹⁾。

3.2.1.1 ヒスタミン単独分析

図2のフローチャートに従い試料溶液の調整を行い，試料溶液の5 μLをHPLCに注入した。

HPLC測定条件は次のように行った。ポンプはLC-10AD(島津)，デガッサーはDGU-3A(島津)，カラムオーブンはCTO-10A(島津)，オートインジェクターはSIL-10A(島津)，検出器は蛍光検出器(日本分光FP-210，励起波長350 nm，蛍光波長450 nm)，データ処理機はクロマトパックC-R7A(島津)を使用した。カラムはTSK gel ODS-80TM(4.6×150 mm)を使用した。移動相は0.2 M NaCl溶液・メタノール(1:4)を用い，40℃，流速0.5 ml/minで操作した。

検出限界はヒスタミン0.1 mg/100 gであった。

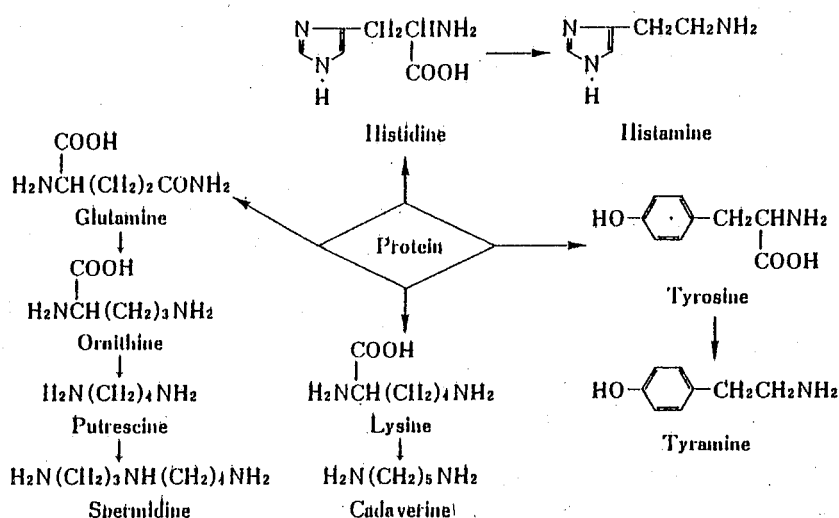


図1 不揮発性腐敗アミンの生成過程
(衛生試験法・注解より引用)

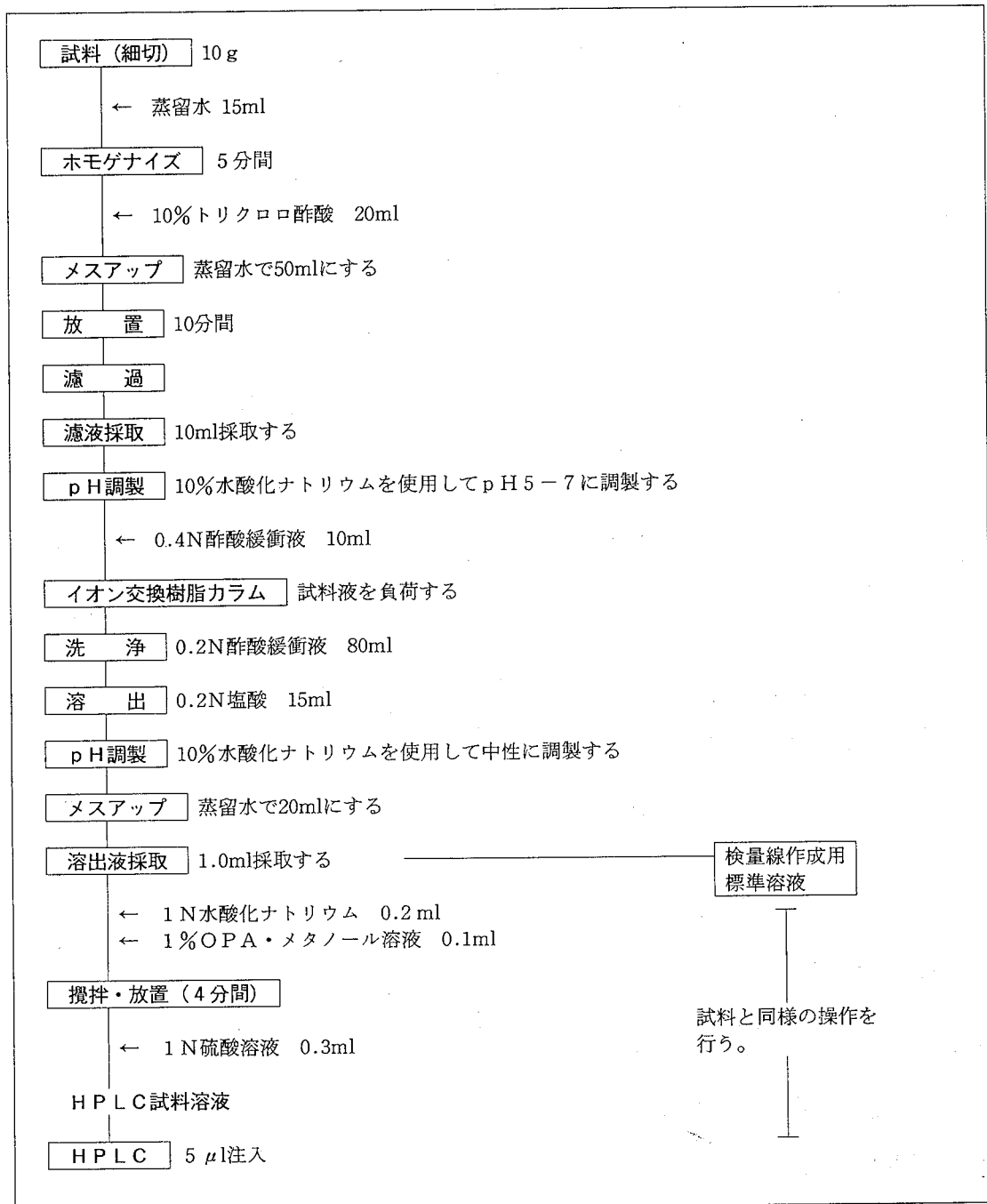


図2 ヒスタミン単独分析フローチャート

3.2.1.2 不揮発性腐敗アミン一斉分析

図3のフローチャートに従い試料溶液の調整を行い、試料溶液の10 µLをHPLCに注入した。

検出波長、移動相の組成や流速条件を除くHPLC測定条件については、3.2.1.1と同様に行った。励起波長325 nm、蛍光波長525 nmを検出波長とし、移動相はアセトニトリル・水(3:2)を用い、40℃、流速1.3 ml/minで操作した。

検出限界はヒスタミン6.0 mg/100 g、チラミン1.0 mg/100 g、スペルミジンおよびプトレスシン0.3

mg/100 g、カダベリン0.2 mg/100 gであった。

ヒスタミンについては単独法の測定結果を採用した。

3.3 微生物学的検査

病原微生物検査必携⁴⁾に従い食中毒菌の検索を行った。

4 結果

各事例の検査結果を表2に示したが、詳細は次のとおりである。なお、いずれの試験品からも既知食中毒菌は検出されなかった。また、代表的なクロマトグラ

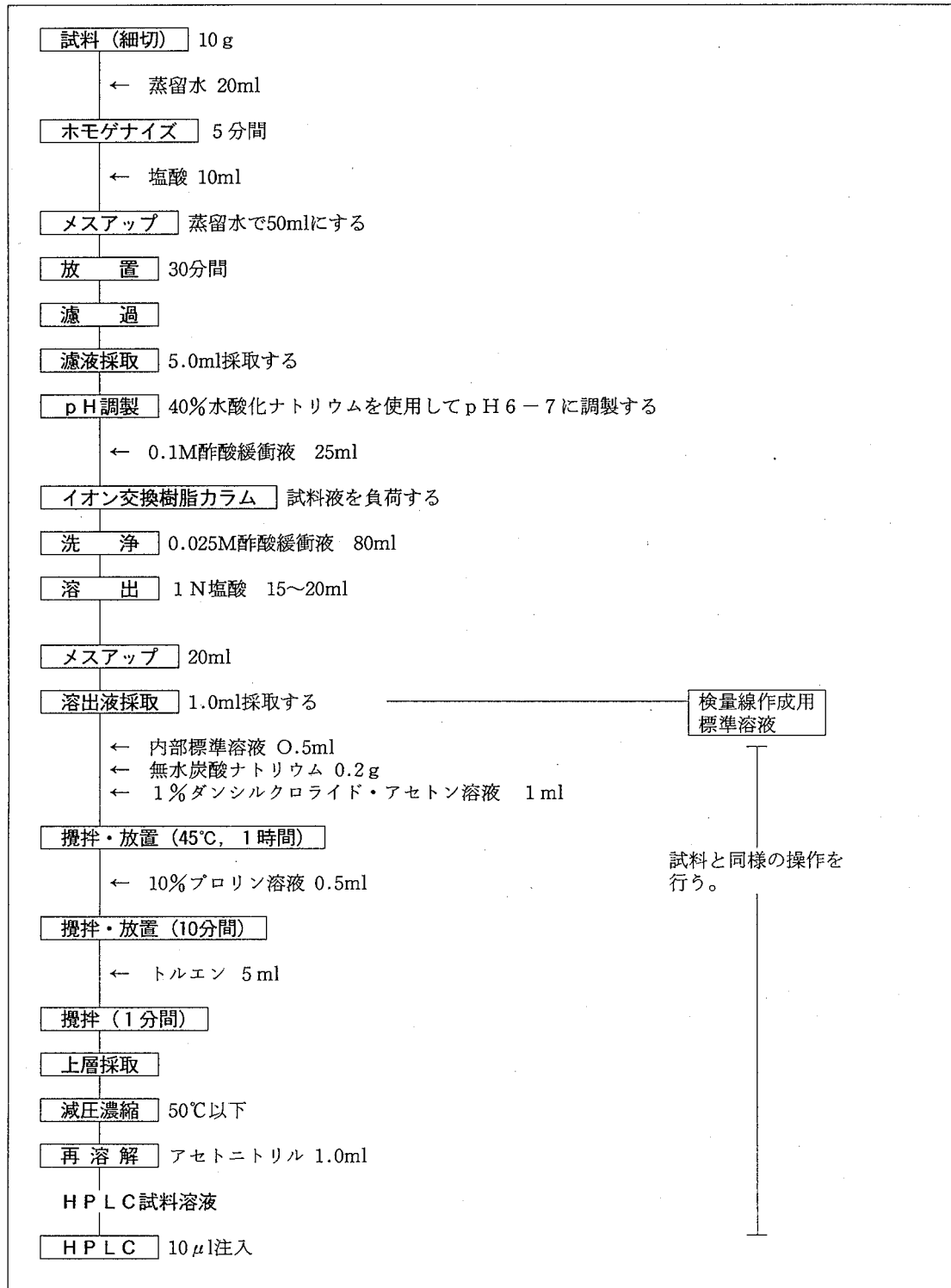


図3 不揮発性腐敗アミン一斉分析フローチャート

ムを図4, 5に示した。

4.1 事例1

試料番号1および2からはヒスタミンが0.32~2.3 mg/100g検出されたが、カダベリン、プトレスシン、チラミンおよびスペルミジンは検出されなかった。これらは店に残っていたマグロフライとその原材料であるが、米国における加工原料魚の取り扱い判断基準が

20 mg/100gであること²⁾を考慮した場合、これらの食品は安全に摂食可能であると考えられた。

一方、試料番号3からはヒスタミン390 mg/100g、カダベリン2.8 mg/100gが検出された。プトレスシン、チラミンおよびスペルミジンは検出されなかった。一般に試料中のヒスタミン濃度が300 mg/100g以上で食中毒を起こすこと⁵⁾から本事例の原因物質はヒ

スタミンであり、原因食品はマグロのフライであると決定された。本事例では有症者の実食残品を分析することによって原因が解明された。

4.2 事例2

試料番号4, 5, 6, 7, 8からヒスタミンは0.21

~6.0 mg / 100 g, カダベリンは不検出~0.92 mg / 100 g 検出された。一方、プトレスシン, チラミンおよびスペルミジンは検出されなかった。事例1の試料番号1, 2の場合と同様、ヒスタミンの含有量は低く判定基準を満足していた。また、ヒスタミン以外の不揮発性腐敗アミンについても通常値の範囲であり相乗効果が考えられるような数値ではなかった。以上のことからこれらの食品は安全に摂食可能であると考えられ、結局、分析値から原因解明をすることはできなかった。本事例で分析できた試料は検食および原材料のみであった。

4.3 事例3

試料番号9からヒスタミン 530 mg / 100 g, カダベリン 5.9 mg / 100 g が検出された。プトレスシン, チラミンおよびスペルミジンは検出されなかった。事例1の試料番号3の場合と同様、食中毒を引き起こすために十分なヒスタミン含有量が検出された。以上の測定結果から当該食品 50 g 程度を摂取したと仮定した場合、中程度の激しさの中毒障害におちいる⁵⁾と推定される。また、食品の腐敗に伴いヒスタミンだけで

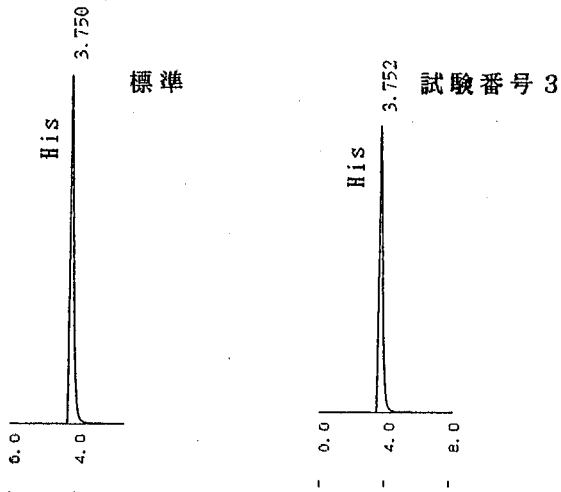


図4 ヒスタミン(His)単独分析法によるクロマトグラム

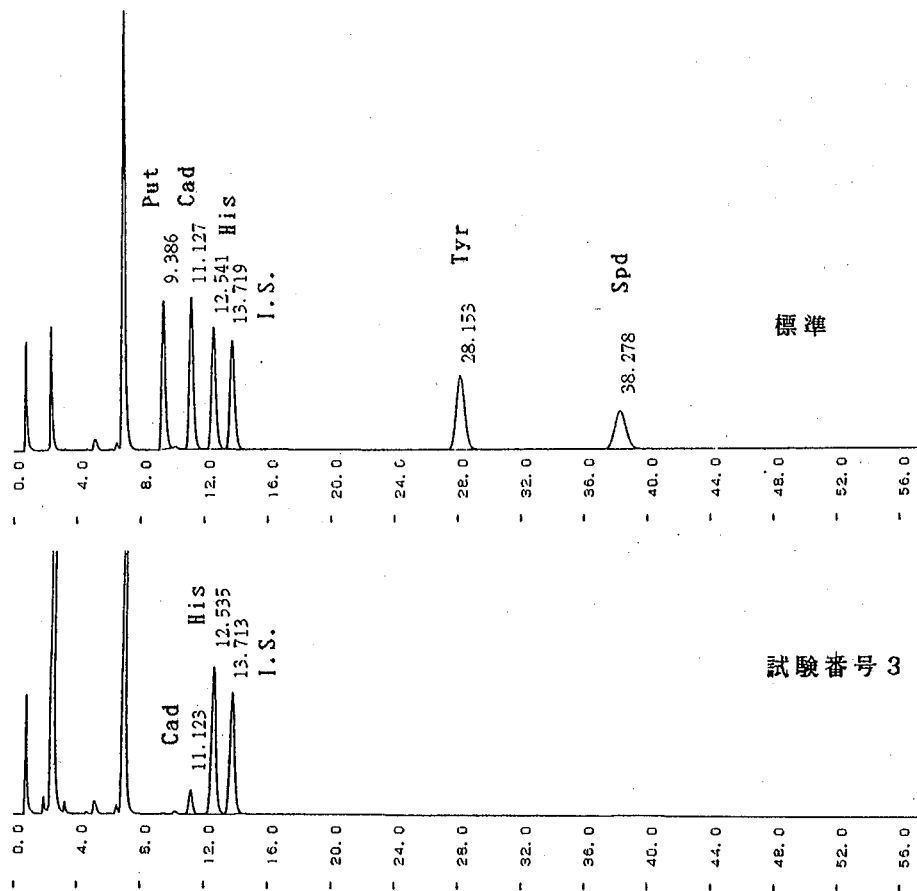


図5 不揮発性腐敗アミン一斉分析法によるクロマトグラム ヒスタミン(His), カダベリン(Cad), プトレスシン(Put), チラミン(Tyr), スペルミジン(Spd), 内部標準(I.S.)

表2 測定結果 (単位: mg/100g)

試料番号	ヒスタミン	カダベリン	プトレスシン	チラミン	スペルミジン
1	0.32	ND	ND	ND	ND
2	2.3	ND	ND	ND	ND
3	390	2.8	ND	ND	ND
4	6.0	ND	ND	ND	ND
5	0.25	ND	ND	ND	ND
6	0.31	ND	ND	ND	ND
7	3.4	0.92	ND	ND	ND
8	0.21	ND	ND	ND	ND
9	530	5.9	ND	ND	ND

ND: 不検出

はなくカダベリンも生成された。本事例では有症者の実食残品1件のみを分析しただけだが、原因食品の決定を行うことができた。

5 考 察

ヒスタミンは通常の食品中に人体に無害の量で含まれている。特にマグロの皮や筋肉中には通常1~4 mg/100gのヒスタミンが含まれているといわれている²⁾。しかし、主に保存温度の管理不足などからヒスタミン生成菌が増殖し、食品中に300 mg/100g以上のヒスタミンが蓄積することがあり、食中毒の原因となるといわれている⁵⁾。

ヒスタミン生成菌として現在までに *Morganella morganii* など15種類が知られているが、奥積の研究²⁾によると、*M. morganii* のような中温細菌より、海産性低温細菌の重要度を指摘している。これらの細菌は20℃付近に発育至適温度を持ち、2.5℃でも発育しヒスタミンを産生する好塩性低温細菌である。このような細菌に汚染された魚は冷蔵保存されていた場合にもヒスタミンが蓄積していく可能性が考えられる。

さらに、ヒスタミンは102℃、3時間、116℃、90分の加熱でも部分的に破壊されるだけであり、非常に熱に安定な物質である⁵⁾。よって事例1や事例3にみられたような食材の加熱および家庭用冷蔵庫での冷凍

保存は本中毒の予防策にはならないものと思われる。食材は短時間に流通および消費することが重要である。

また、今回の3事例の検査結果から有症者の実食残品の検査の重要性が示唆された。原因追究のために、有症事例発生時には実食残品を検査品として確保することが望ましいと思われる。

最後に、一連のヒスタミン関連事例の連続発生の原因については、マグロの捕獲場所および水揚げ港などが各事例ともに不明であったため関連性を見いだすことはできなかった。

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，287-292，金原出版株式会社，1990
- 2) 奥積昌世：海産魚における低温性ヒスタミン生成菌について：日本食品低温保存学会誌，19(1)，30-40，1993
- 3) 岐阜県衛生環境部生活衛生課：岐阜県食中毒事件録（平成元年，平成8年）
- 4) 日本公衆衛生協会：病原微生物検査必携，細菌・真菌検査，第3版，1987
- 5) 浜田輔一，中野重二，雨宮淳三：動物性食品衛生学，254-259，文永堂

Case Studies on Food Poisoning Symptoms by Histamine
in Gifu Prefecture

Miyuki KUNISHIMA*, Naotaka OKUMURA*, Ken-ichi NAKAYA*, Yoshinori SHIMIZU**,
Tadashi ICHIHASHI**, Yasuo IWATA***, Takashi YAMAKAWA****

**Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences : 6-3, Noishiki
4 chome, Gifu 500-8226, Japan*

***Gifu Prefectural Hashima public Health Center : 719-1, Kitsuneana Kawaguchi
Takehana-cho, Hashima 501-6232, Japan*

****Gifu Prefectural Takayama public Health Center : 7-468, KamiokaMoto-cho,
Takayama 506-0055, Japan*

*****Gifu Prefectural Seki public Health Center : 1612-2, Ikushi, Mino 501-3756,
Japan*

<他誌掲載論文>

コクサッキーA群ウイルスの研究 I. 岐阜県におけるコクサッキーA群ウイルス 分離株の血清学的変異について

三輪智恵子

岐阜県保健環境研究所

感染症学雑誌, 72(1), 30-35, 1998

1973～1995年の22年間に、岐阜県で分離されたコクサッキーウイルスA (Cox. A)群の7血清型分離株44株を、各血清型標準株に対する抗血清を使用し中和試験で抗原変異の有無を検討した。その結果、Cox. A2, Cox. A4, Cox. A5, Cox. A8, Cox. A10分離株は、すべて標準株に対する抗血清でよく中和され大きな抗原変異は確認できなかった。

しかし、Cox. A-9分離株では57.1%の株が難中和性で変異がおこっていることが確認できた。

Con. A-16分離株では、1982年分離株は標準株と同様に標準株抗血清でよく中和出来た。しかし、1984年以降の分離株はすべて難中和性に変異していた。そこで、1988年分離株で作製した免疫血清で中和試験を実施した結果、1982年分離株も易中和性でそれ以降分離株と同じようによく中和された。標準株もこの分離株抗血清では、他の分離株の約1/3の中和価であった。したがって、Cox. A-16分離株の同定のためには、分離株に対する抗血清を使用することが必要であることが確認出来た。

コクサッキーA群ウイルスの研究 II. 岐阜県住民のコクサッキーA群ウイルスに対する抗体保有調査 分離株の血清学的変異について

三輪智恵子

岐阜県保健環境研究所

感染症学雑誌, 72(1), 36-39, 1998

岐阜県住民(0～9歳) 147人から1992年12月から1993年2月に採血した血清について、中和試験でコクサッキーA群ウイルスの5種血清型に対する抗体保有状況を調査した。その結果以下のことが明らかになった。

1. 比較的高頻度に分離できるCox. A4, Cox. A10とCox. A16に対する抗体保有率は、45%以上であったが、比較的低頻度でしか分離されないCox. A2も、此等と同一の保有率を示した。しかし、Cox. A8は、分離頻度も低率であったが、抗体保有率も低率であった。
2. 血清型に対する抗体保有率は、県内の地区毎に異なっていた。西濃地区は、Cox. A2, Cox. A8, Cox. A10の抗体保有率が他の地区と比較して最高であった。岐阜地区は、Cox. A4とCox. A16の

抗体保有率が最高であったが, Cox.A8に対する抗体保有率は最低であった。飛騨地区(G)は, Cox.A2とCox.A16の抗体保有率が他地区に比較して最低であった。飛騨地区(T)は, Cox.A4とCox.A10の抗体保有率が他地区に比較して最低であった。

3. 年齢別抗体保有率は, Cox.A2, Cox.A4, Cox.A10はほとんど同一のパターンを示し, 年齢が増加するにしたがって抗体保有率も上昇し, 80~90%の保有率に達した。Cox.A8では年齢とともに上昇したが, 最高保有率は35.5%であった。Cox.A16では, 0~1歳ですでに44%の高い保有率で, 6~7歳で一度下降し再び上昇して86.7%になった。

Survey of human group C rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993

Mitsutaka Kuzuya*, Ritsushi Fujii*, Masako Hamano*, Masao Yamada**,
Kuniko Shinozaki***, Akira Sasagawa****, Sumiyo Hasegawa*****,
Hiroyoshi Kawamoto*****, Kazuo Matsumoto*****, Ayumi Kawamoto*****,
Asao Itagaki*****, Sadayuki Funatsumaru*****, Syozo Urasawa*****

**Department of Microbiology, Okayama Prefectural Institute for Environmental
Science and Public Health, **Department of Virology, Okayama University Medical
School, ***Public Health Laboratory of Chiba Prefecture, ****Niigata Prefectural
Research Laboratory for Health and Environment, *****Toyama Institute of Health,
*****Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences,
*****Fukui Prefectural Institute of Public Health, *****Tottori Prefectural
Public Health Laboratory, *****Shimane Prefectural Institute of Public Health
and Environmental Science, *****Saga Prefectural Institute of Public Health,
*****Department of Hygiene and Epidemiology, Sapporo Medical University*

J. Clin Microbiol, 36, 6-10, 1998

Fecal specimens from patients with acute diarrhea were collected from 10 prefectures in Japan over a 6-month period (November 1992 to April 1993), and the specimens that were negative for human group A rotaviruses were screened for the presence of human group C rotaviruses (CHRVs) by the reverse passive hemagglutination test. Of 784 specimens examined, 53 specimens (6.8%) that were collected in 7 to 10 prefectures were positive for CHRV, indicating that CHRVs are widely distributed across Japan. Most of the CHRV isolates were detected in March and April, and CHRVs mainly prevailed in children age 3 to 8 years. The genome electrophenotypes of eight strains isolated in five individual prefectures were surprisingly similar to each other and were different from those of CHRV strains isolated to date. The outer capsid glycoprotein (VP7) gene homologies of the isolates retrieved in 1993 were subsequently analyzed by the dot hybridization method. As the results, the VP7 genes of the isolates revealed very high levels of homology not only with each other but also with the VP7 gene of the OK118 strain isolated in 1998. These results suggest that a large-scale out-break of CHRV occurred during the winter of 1992 and 1993 in Japan.

<学 会 報 告>

○都市公園における窒素酸化物等の分布について

梶川正勝, 青木 聡, 白木康一, 奥平文雄, 加藤邦夫 (岐阜県保健環境研究所), 高原康光 (岐阜県畜産試験場)

第43回東海公衆衛生学会, 1997年7月, 名古屋市

○環境温度変化が免疫細胞に及ぼす影響

猿渡正子

第43回東海公衆衛生学会, 1997年7月, 名古屋市

○唾液分泌型免疫グロブリンAを用いたストレス及びリラクゼーションの評価

渡邊 豊 (岐阜県保健環境研究所)

大平英樹 (東海女子大・文)

第43回東海公衆衛生学会, 1997年7月, 名古屋市

○S R S Vの検査法

川本尋義

衛生微生物技術協議会第18回研究会, 1997年7月, 別府市

○Food-Borne Gastroenteritis Outbreaks Due to SRSVs in Japan, and Their Identification by RT-PCR

Hiro Yoshi Kawamoto

Symposium of Viral Gastroenteritis, 31th United States-Japan Cooperative Medical Science Program, 1997, 7, Atlanta

○ヒ素による白血球細胞のアポトーシス

赤尾幸博, 溝口裕美, 八木国男 (岐阜県国際バイオ研究所), 大石誠子 (応用生化学研究所), 小島勢二 (名古屋第一赤十字病院小児科), 直江知樹 (名古屋大学医学部難治感染症部)

第1回東海アポトーシス研究会, 1997年8月, 名古屋市

○急性ストレスによる唾液中S-IgAの反応性

大平英樹 (東海女子大・文), 渡邊 豊 (岐阜県保健環境研究所)

第45回日本教育医学会大会, 1997年8月, ソウル

○行動パターンとストレス反応性(2)-非侵略的免疫指標による検討-

足立美奈子, 大平英樹 (東海女子大・文), 渡邊豊 (岐阜県保健環境研究所)

日本心理学会第61回大会, 1997年9月, 兵庫県

○ヒ素による白血球細胞のアポトーシス

赤尾幸博, 溝口裕美, 八木国男 (岐阜県国際バイオ研究所), 大石誠子 (応用生化学研究所), 國小島勢二 (名古屋第一赤十字病院小児科), 直江知樹 (名古屋大学医学部難治感染症部)

第56回日本癌学会, 1997年9月, 京都市

○ヒ素による白血球細胞のアポトーシス

赤尾幸博, 溝口裕美, 八木国男 (岐阜県国際バイオ研究所), 直江知樹 (名古屋大学医学部難治感染症部)

第69回日本生化学会, 1997年9月, 金沢市

○医薬品GMP監視における行政研究職員の役わりについて

坂井至通, 吉田 勲, 各務博人, 今井準三, 鷺見徹

第30回日本薬剤師会学術大会, 1997年10月, 東京

○Histological and Chemical Studies on Phellodendron Barks

Yoshimichi Sakai, Hidenori Shimizu (Gifu Pref. Inst. Environ. Sci.), Kosaburo Nishi (Tukuba Med. Plant Res. Stat.)

International Symposium on Natural Medicines, 1997, 10, Kyoto

○居住環境中のダニアレルゲンに関する実態調査

吉田 勲, 坂井至通, 今井準三, 鷺見 徹, 井口恒男

第30回東海薬剤師学術大会, 1997年10月, 岐阜市

○小型合併処理浄化槽放流水の塩素消毒に関する基礎的研究

南部敏博 (岐阜県保健環境研究所), 浅野秀昭,

後藤 淳, 堀尾明宏, 青木堯 ((財) 岐阜県環境
管理技術センター)

第11回全国浄化槽技術研究集会, 1997年10月, 松江
市

○農業集落排水施設における紫外線消毒と塩素消毒の
効果の比較検討

堀尾明宏, 浅野秀昭, 後藤淳, 堀田典道, 青木堯
((財) 岐阜県環境管理技術センター), 南部敏
博 (岐阜県保健環境研究所)

第11回全国浄化槽技術研究集会, 1997年10月, 松江
市

○母子健康管理への電算活用に関する研究

田中 耕, 児玉文夫, 井口恒男 (岐阜県保健環境
研究所), 大森一恵, 堀部慶子, 栗田孝子 (岐阜
県衛生環境部), 井奈波良一, 岩田弘敏 (岐大・
医・衛生)

第56回日本公衆衛生学会, 1997年10月, 横浜市

○石灰存在下における回収フロンの熱分解

角田寛, 野村泰之 (岐阜県保健環境研究所), 相

藤 茂, 高橋達也, 古田貴之 (上田石灰製造株式
会社: 岐阜県大垣市)

第24回環境保全・公害防止研究発表会, 1997年11月,
那覇市

○感冒剤のHPLC分析を例にした分析法バリデーショ
ンの検討

坂井至通, 吉田 勲, 今井準三, 鷺見 徹, 井口
恒男 (岐阜県保健環境研究所)

第34回全国衛生化学技術協議会年会, 1997年11月,
水戸市

○花粉症様症状保有状況とスギ花粉IgE抗体と総IgE抗
体等との関連

猿渡正子, 井口恒男

平成9年度東海乳酸菌研究会, 1998年2月, 名古屋
市

○総合感冒剤の含量均一性について

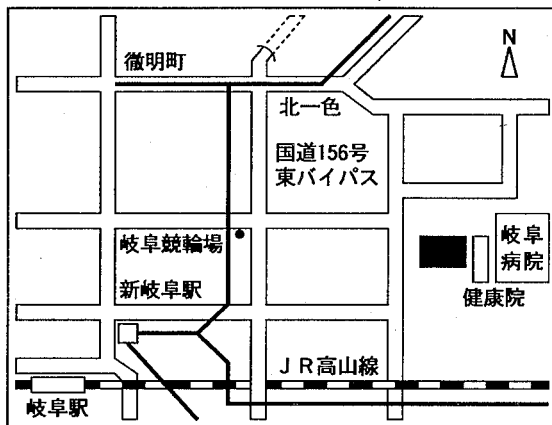
吉田 勲, 坂井至通, 今井準三, 井口恒男

日本薬学会第118年会, 1998年3~4月, 京都市

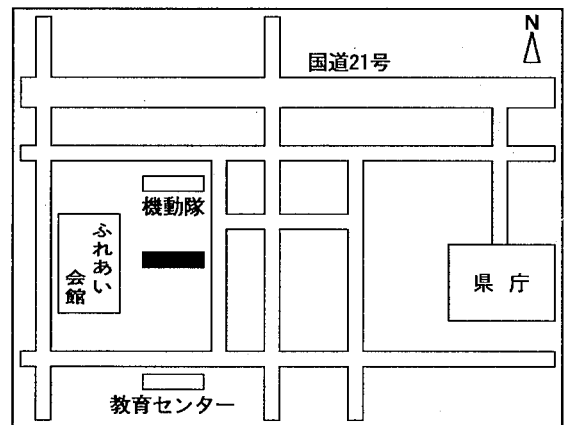
所報第6号編集委員

南部 敏 博 (委員長)	山 岡 一 清
形 見 武 男	田 中 稔 幸
安 田 裕	西 川 治 光

岐阜県保健環境研究所 本庁舎



岐阜県保健環境研究所 藪田庁舎



岐阜県保健環境研究所報

第6号 (平成10年度)

平成10年12月発行

編集発行 岐阜県保健環境研究所 本庁舎

岐阜県保健環境研究所 藪田庁舎

☎500-8226 岐阜市野一色4丁目6番3号

TEL 058(246)1101

FAX 058(246)1104

☎500-8384 岐阜市藪田南5丁目14番12号

TEL 058(274)0111

FAX 058(276)4307

印刷所 三進社印刷所

☎500-8153 岐阜市石長町6丁目5番地

TEL (058)245-3624

FAX (058)248-3352

この所報は、資源の有効利用を図るため再生紙を使用しています。