

# Ⅲ 調査研究

# 鶏肉およびヒト由来 CTX-M 型基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析

石畝 史・永田暁洋・山崎史子・津持文子・望月典郎・山根一和\*<sup>1</sup>・荒川宜親\*<sup>1</sup>

Molecular Epidemiological Analyses of CTX-M-type Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing *Escherichia coli* isolated from Chicken Meats and Sporadic Diarrheal Human Cases

Fubito ISHIGURO, Akihiro NAGATA, Fumiko YAMAZAKI, Fumiko TUJI  
Micho MOCHIZUKI, Kunikazu YAMANE\*<sup>1</sup>, Yoshichika ARAKAWA\*<sup>1</sup>

鶏肉由来 30 株および患者由来 27 株の CTX-M 型基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的性状を比較した。鶏肉由来株の血清型は O78 : H9 および O78 : HUT などが主であったのに対し、糞便由来株で O25 : H4、O1 : H6 および O78 : H9 などであった。両者由来の O78 : H9 の各 1 株、薬剤耐性パターン (4 剤耐性)、CTX-Mtype (CTX-M-55)、系統発生群 (A) および PFGE パターンは類似し、MIC 値では CPR 以外はほぼ一致したことから、両者の関連性に注目すべきと思われた。また、当センターで初めてヒト由来株において CTX-M-15 型、シークエンスタイプ 131、系統発生群が B2、および CPFX 耐性を示す O25 : H4 型株が確認された。

## 1. はじめに

近年、ヒト、家畜および家禽から、基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の分離報告が増加している<sup>1-3)</sup>。ESBL 産生菌は第三世代セファロスポリンに対しても耐性を示すことから、これらが市中および院内感染の原因菌となった場合、広域セファロスポリンによる治療に抵抗性を示すことから、臨床現場でその動向が警戒されている。ESBL には様々な型が存在するが、特にこの数年は Cefotaxime (CTX) や血中半減期間が長い小児科領域などで汎用されている Ceftriaxone (CTRX) に対しても高い耐性を付与する CTX-M 型が主流を占めつつある<sup>4)</sup>。諸外国では同一クローンで病原性を有する CTX-M-15 型の血清型 O25 : H4<sup>5)</sup>が、ヒトから高頻度に分離されていることから公衆衛生学的に注目されている。

ESBL 産生大腸菌への感染源の一つとして鶏肉が重要視されているが<sup>6)</sup>、わが国では鶏肉に関する ESBL 産生大腸菌の調査報告例は少ない。そこで、我々は平成 19 年から 20 年に市販鶏肉から CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌の分離を試み、散发下痢症患者由来の CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌と、分子疫学的性状について比較検討し報告した<sup>7)</sup>。今回の報告は、平成 21 年から 22 年に使用薬剤を若干変更して同様の調査を行ったので、その概要を報告する。

## 2. 方法

### 2. 1 材料

#### 2. 1. 1 供試鶏肉由来株

平成 21 年 4 月から 22 年 9 月に福井市内で購入した国内産鶏肉 66 検体から分離された大腸菌を用いた。鶏肉からの大腸菌の分離は、25 g の鶏肉を 225 mL の mEC 培地で増菌培養 (42°C、20 時間) 後、CTX 6.4 μg/mL 添加 DHL 培地および Ciprofloxacin (CPF) 6.4 μg/mL 添加

DHL 培地を使用し、大腸菌の性状を示した 10 株の生化学的性状を調べた。大腸菌と同定された株の中で異なる性状を示す株について、6 種類の薬剤を用いてスクリーニングを実施した。即ち、CTX、CPF、Nalidixic acid (NA)、Ampicillin (ABPC)、Tetracyclin (TC) および Streptomycin (SM) の 6 種類の薬剤を、別々に 4~8 μg/mL 添加したミュラーヒントン S 培地に菌株を接種し、CTX 耐性株を中心に異なる薬剤耐性パターンを示す株を収集した。

その後、病原大腸菌免疫血清による O および H 血清型別を実施し、O 血清型が判明し、Kirby-Bauer (KB) 法による薬剤感受性試験で CTX に中間の感受性または耐性を示した 71 株を詳しい解析に用いた。

#### 2. 1. 2 供試患者由来株

平成 21 年 3 月から平成 22 年 10 月に、福井県内の医療機関 (主に 3 機関) で散发下痢症患者から分離され、O 血清型が判明し、CTX に中間の感受性または耐性を示した 33 株を用いた。

### 2. 2 方法

#### 2. 2. 1 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は CTX、CPF、NA、ABPC、TC、SM、Sulfisoxazole (Su)、sulfamethoxazole/Trimetoprim (ST)、Gentamicin (GM)、Kanamycin (KM)、Chloramphenicol (CP) および Fosfomycin (FOM) の 12 種類の薬剤感受性試験用ディスク (BBL) を使用し、KB 法により行った。また、CTX に中間の感受性または耐性を示した株に対しては、第三世代セファロスポリンである CTX、CTRX および CAZ、ならびに Fluoroquinolone (FQ) 系薬剤である CPF、Enrofloxacin (ERF) の最小発育阻止濃度 (MIC) を、寒天平板希釈法により測定した<sup>7)</sup>。また、第四世代セファロスポリンである Cefpirome (CPR) は Etest で MIC を測定した。

#### 2. 2. 2 CTX-M の遺伝的型別および系統発生群別

CTX 耐性株が保有する CTX-M 型 β-ラクタマーゼ遺伝子である *bla*<sub>CTX-M</sub> の PCR による group 型別は Shibata ら<sup>8)</sup>、さらに CTX-M の group が判定された鶏肉由来 30 株および患者由来 27 株の計 57 株の *bla*<sub>CTX-M</sub> 型のシークエンス解

\*<sup>1</sup> 国立感染症研究所細菌第二部

析は Dutour ら<sup>9)</sup>、大腸菌の系統発生群の分類は Clermont ら<sup>10)</sup>の方法に準拠した。また、一部の株についてはシーケンスタイプの解析を実施した。

### 2. 2. 3 有意差の検定

CTX、CTR、CAZ、CPR、CPFX および ERFX の MIC 値の鶏肉由来株とヒト由来株間の有意差は、Wilcoxon の順位和検定によって調べた。

### 2. 2. 4 PFGE パターン

O78 について、鶏肉由来 16 株とヒト由来 1 株のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を、制限酵素 *Bln* I を用いて実施した。

## 3. 結果

### 3. 1 血清型および *bla*<sub>CTX-M</sub> group

#### 3. 1. 1 血清型

ESBL 産生菌は鶏肉由来株で 23 検体 (35%) から 30 株確認され、血清型は O78:H9 が 9 株、O78:HUT が 6 株、O25:HNM、O153:HUT などの 15 種類が各 1 株であった (表 1)。ヒト糞便由来株は 27 株確認され、血清型は O25:H4 が 9 株、O1:H6 が 4 株、O86a:H18 が 3 株、O78:H9、O125:HNM などの 6 種類が各 1 株であった。両者からともに確認された血清型は O78:H9 および O25:HNM であった。

#### 3. 1. 2 *bla*<sub>CTX-M</sub> group

CTX-M-1 グループ (以下、G と略す)、CTX-M-2G、CTX-M-8G および CTX-M-9G は、鶏肉由来株ではそれぞれ 21 株、4 株、0 株および 5 株で、ヒト由来株ではそれ

表1 鶏肉およびヒト糞便由来ESBL産生大腸菌のCTX-M型および血清型

由来	CTX-M-group							
	CTX-M-1		CTX-M-2		CTX-M-8		CTX-M-9	
	n	主な血清型	n	血清型	n	血清型	n	主な血清型
鶏肉	21	O78:H9(7) <sup>1)</sup> O78:HUT(6) O8:HNM O91:H28 O103:H51	4	O8:H7 O8:HUT O25:HNM O153:HUT			5	O78:H9(2) O18:H28 O20:H19 O128:HUT
ヒト糞便	3	O25:H4 O78:H9 O146:HUT	2	O111:HUT(2)	2	O1:HUT O125:HNM	20	O25:H4(7) O1:H6(4) O25:HNM(2) O86a:H18(3) O125:H7

1)()内は株数を示す

ぞれ 3 株、2 株、2 株および 20 株であった (表 1)。最も多かった CTX-M-G は鶏肉由来株では CTX-M-1G、ヒト由来株では CTX-M-9G で違いがみられた。

### 3. 2 薬剤感受性試験結果等

#### 3. 2. 1 KB 法による薬剤感受性

鶏肉由来株とヒト由来株の平均薬剤耐性数は、それぞれ 6.8 剤と 5.4 剤であった (表 2~4)。鶏肉由来の血清型 O78 は 1 株が 4 剤耐性を示し、15 株が 7~8 剤に耐性を示した。そこで、O78 以外の 14 株とヒト由来の 27 株の薬剤別耐性率を示すと図 1 のとおりで、TC および CP 以外はほぼ同様の耐性率を示した。一方、ヒト由来株の中に、4 剤耐性の O78:H9 が 1 株確認されている。

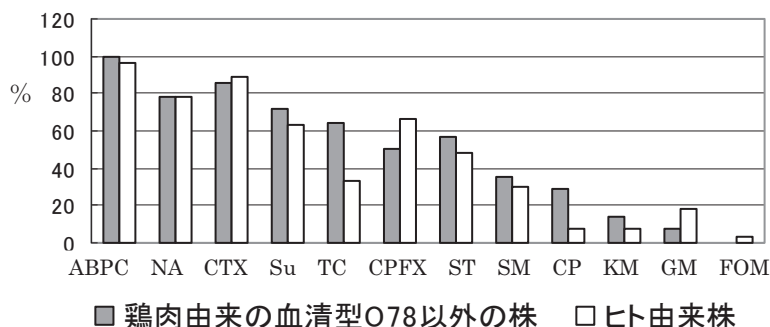


図1 鶏肉およびヒト由来ESBL産生大腸菌における薬剤別耐性率 (KB法) — 耐性のみ集計、中間の感受性は除く—

表2市販鶏肉から分離された*bla*<sub>CTX-M</sub>陽性大腸菌の性状

No.	血清型	CTX-M group	系統発生群	薬剤感受性 (Kirby-Bauer法)											MIC( $\mu$ g/mL) <sup>2)</sup>			
				CTX	CPFX	NA	ABPC	TC	Su	ST	SM	GM	KM	CP	CAZ	CPR	ERFX	
1	O8:HNM	M-1	A	R <sup>1)</sup>		R	R	R	R					R		16	>256	0.5
2	O91:H28	M-1	B1	R	R	R	R	R	R	R	I <sup>2)</sup>			R		32	96	128
3	O103:H51	M-1	D	R	R	R	R	R	R		R					2	32	32
4	O103:HUT	M-1	D	R			R									16	96	1
5	O115:HNM	M-1	D	R		R	R		R	R	R					32	64	1
6	O148:H28	M-1	B1	R	R	R	R	R	R	R						32	64	32
7	O159:H28	M-1	B1	R	R	R	R	R	R	R						32	64	32
8	O8:H7	M-2	B1	I	R	R	R									2	4	32
9	O8:HUT	M-2	D	R			R	R	R		R					4	>256	1
10	O25:HNM	M-2	A	R		R	R									1	8	0.5
11	O153:HUT	M-2	D	R			R									1	12	1
12	O18:H28	M-9	B1	I	I	R	R	R	R	R	R			R		32	6	8
13	O20:H19	M-9	A	R	R	R	R	R	R	R			R	R		2	12	32
14	O128:HUT	M-9	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R		2	24	32

1)R;耐性 2)I;中間の感受性を示す 3)CAZおよびERFXは奉天平板希釈法、CPRはE testで測定。

表3 市販鶏肉から分離された *bla<sub>CTX-M</sub>* 陽性大腸菌O78の性状

No.	血清型	株数	CTX-M group	CTX-M 型	系統 発生群	薬剤感受性(Kirby-Bauer法)										MIC( $\mu$ g/mL) <sup>2)</sup>				
						CTX	CPF	NA	ABPC	TC	Su	ST	SM	KM	CAZ	CPR	ERFX			
1	O78:H9	6	M-1	M-55	A	R <sup>2)</sup>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16~32	48~>256	32
2	O78:H9	1	M-1	M-55	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16	96	32
3	O78:H40	1	M-1	M-55	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	32	128	32
4	O78:HUT	5	M-1	M-55	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16~32	32~192	32
5	O78:H9	1	M-9	M-14	A	I <sup>3)</sup>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	12	32
6	O78:H9	1	M-9	M-14	A	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	8	32
7	O78:HUT	1	M-9	M-14	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	6	32

1)R;耐性 2)I;中間の感受性を示す 3)CAZおよびERFXは率天平板希釈法、CPRはE testで測定。

表4 散発下痢症患者から分離された *bla<sub>CTX-M</sub>* 陽性大腸菌の性状

No.	血清型	分離医療機関	年齢/性別	CTX-M group	CTX-M 型	系統 発生群	薬剤感受性(Kirby-Bauer法)										MIC( $\mu$ g/mL) <sup>8)</sup>					
							CTX	CPF	NA	ABPC	TC	Su	ST	SM	GM	FOM	KM	CP	CAZ	CPR	ERFX	
1	O25:H4	D4 <sup>1)</sup>	53/F	M-1	M-15	B2	R <sup>6)</sup>	R	R	R	R	I <sup>7)</sup>	I <sup>7)</sup>	R	I	I	R	I	32	96	64	
2	O78:H9	A <sup>1)</sup>	59/M	M-1	M-55	A	R	R	R	R	R	I	I	R	I	I	R	I	32	24	32	
3	O146:HUT	B <sup>2)</sup>	84/M	M-1	M-15	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	128	>256	64	
4	O111:HUT	C <sup>3)</sup>	7/M	M-2	NT <sup>5)</sup>	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	12	0.25>	
5	O111:HUT	C	78/M	M-2	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	8	0.25>	
6	O1:HUT	C	28/M	M-8	NT	D	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	8	0.25>	
7	O125:HNM	A	38/M	M-8	NT	B1	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	8	128
8	O1:HUT	C	1/M	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	12	8
9	O1:H6	B	80/M	M-9	NT	B1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	64	>512
10	O1:H6	B	78/F	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	4	96	>512
11	O1:H6	A	65/F	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8	16	>512
12	O1:H6	C	27/F	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	2	4	256
13	O25:H4	B	88/F	M-9	M-14	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8	96	>512
14	O25:H4	C	88/F	M-9	M-14	B2	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	8	192	>512
15	O25:H4	B	84/F	M-9	M-14	B2	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	8	192	256
16	O25:H4	A	82/F	M-9	M-27	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8	12	>512
17	O25:H4	B	88/F	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	4	32	512
18	O25:H4	A	95/F	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16	8	>512
19	O25:H4	C	8/M	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	48	128
20	O25:HNM	B	-	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8	12	>512
21	O25:HNM	B	83/F	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8	8	>512
22	O25:HUT	A	1/F	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	24	0.25>
23	O86a:H18	B	4/M	M-9	NT	D	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	6	0.25>
24	O86a:H18	A	68/F	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	16	0.5
25	O86a:H18	B	2/M	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	48	0.5
26	O125:H7	C	57/M	M-9	NT	B2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	3	0.25>
27	O166:HUT	B	40/M	M-9	NT	D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	12	0.25>

1)A;A病院 2)B;B検査センター 3)C;C病院 4)D;D病院 5)NT;検査未実施 6)R;耐性 7)I;中間の感受性を示す

8)CAZおよびERFXは率天平板希釈法、CPRはE testで測定。

### 3. 2. 2 第三、四世代セファロスポリン等のMIC値

試験に用いた4種類の第三、第四世代セファロスポリンのMIC値は、いずれも多くの鶏肉由来株に対し高い値を示し、鶏肉由来株とヒト由来株のMIC値を比較すると、CAZおよびCPRは有意差を示した(p<0.05)(図2-1)。一方、CPFおよびERFXはヒト由来株の方が高い値を示し、CPFでは有意差を示した(p<0.05)(図2-2)。

### 3. 3 その他の性状

#### 3. 3. 1 系統発生群

鶏肉由来株はA、B1およびDに属したが、O78はすべての株がAに属した。一方、ヒト由来株はAに属したのはO78:H9の1株のみで、B1、B2およびDに属したが、O25:H4、O25:HNMおよびO25:HUTの計11株はすべてB2であった。

#### 3. 3. 2 O78:H9について

鶏肉および糞便由来のO78:H9の各1株は、CTX-M typeはCTX-M-55、系統発生群はA、PFGEパターンは

類似し、MIC値はCPR以外がほぼ一致した。

#### 3. 3. 3 O25:H4について

今回の調査で、当センターで初めてCTX-M-15型、シークエンスタイプ131、系統発生群がB2、およびCPF耐性を示すO25:H4型株が確認された。

## 4. 考察

2004年以降、福井県の散発下痢症患者由来大腸菌において、*bla<sub>CTX-M</sub>*陽性株およびFQ系薬剤耐性株が確認されるようになった。*bla<sub>CTX-M</sub>*陽性株におけるヒト由来株はO25:H4、O1:H6およびO86a:H18の3種類の血清型が43%を占めた。我々の前回の調査結果<sup>7)</sup>である59%に比べると若干減少したものの、Suzukiら<sup>1)</sup>も前二者で60%を占めたと報告しているように、特定の血清型で多く確認されている。*bla<sub>CTX-M</sub>*陽性株は鶏肉66検体中23検体(35%)から分離され、血清型は12種類確認されたが、中でもO78:H9とO78:HUTで計16株も確認されたのが、



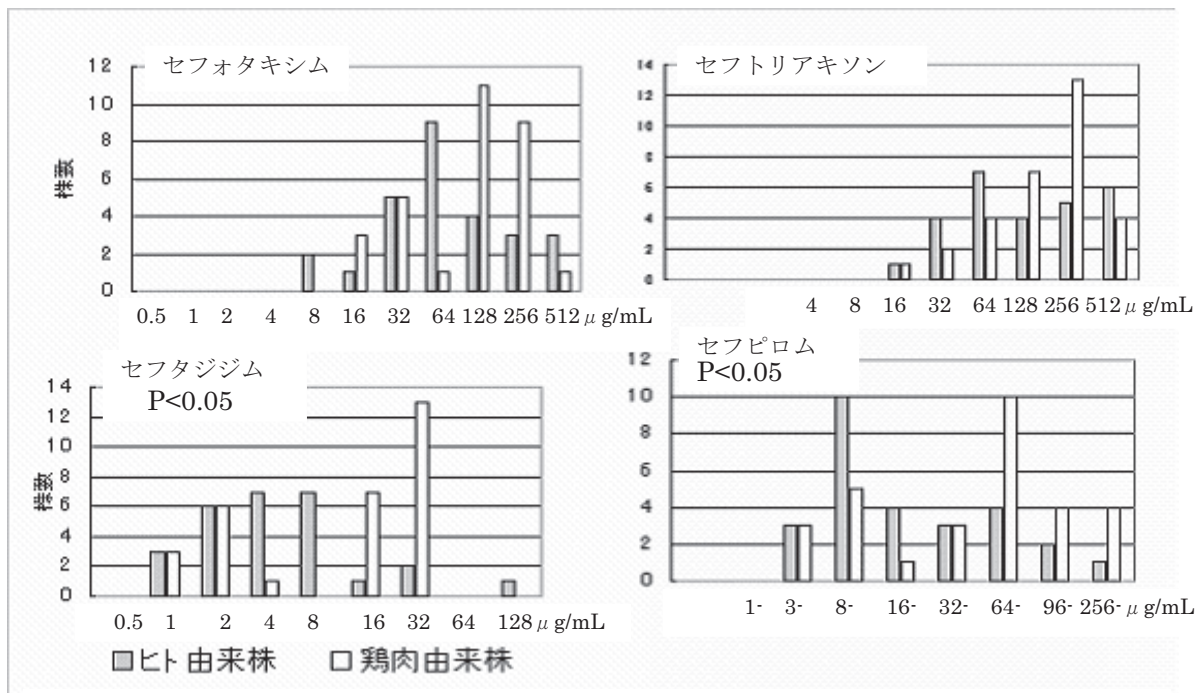


図 2-1 鶏肉およびヒト由来株に対するセファロスポリン系薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC)

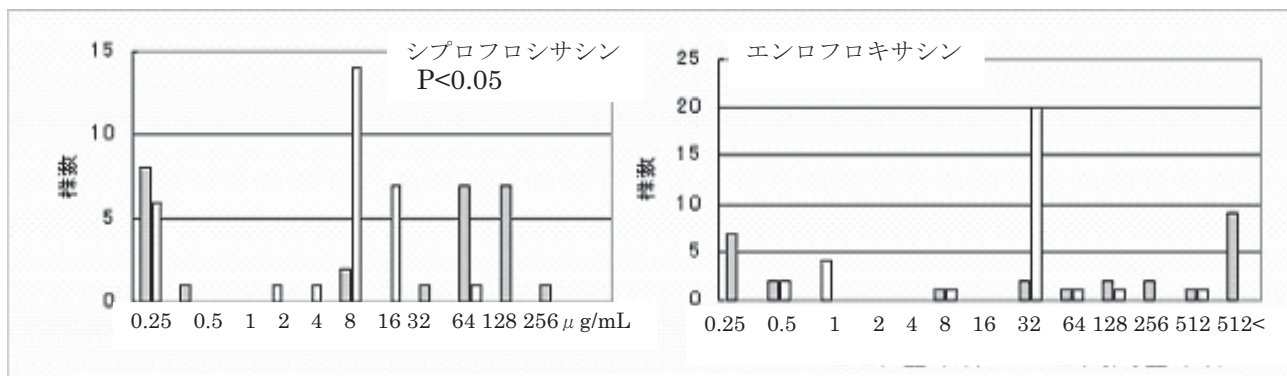


図 2-2 鶏肉およびヒト由来株に対するフルオロキノロン系薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC)

注目された。

Ozawa らは我が国で特別な遺伝型の鶏に病原性のある FQ 耐性 O78 が、広く分布している可能性があるとして報告している<sup>11)</sup>。一方、ヒト由来株ではスペインにおける CTX-M-14 産生の O78 : HNM の報告や、タイにおける CTX-M-55 産生大腸菌や *Klebsiella pneumoniae* の報告がある<sup>12-13)</sup>。今回、鶏肉由来の O78 において CTX-M-14 産生株が 3 株、CTX-M-55 産生株が 13 株確認され、ヒト由来株の O78 : H9 でも CTX-M-55 産生株が 1 株確認された。このように、O78 : H9 において、鶏肉由来株と患者糞便由来株で CTX-M-55 産生で他の各性状も類似した株が確認された。一方、鶏肉とヒト由来株で O78 : H9 の他に共通して分離された血清型 O25 : HNM は、CTX-M 型および CPFX の感受性に相違がみられた。

本研究では、患者および鶏肉由来 ESBL 産生大腸菌株間に明確な関連性、即ち鶏肉が人への感染源になり得るという確証は得られなかったが、鶏肉由来株とヒト糞便由来株において性状が極めて類似した O78 : H9 が確認されたことから関連性に注目すべきと思われる。また、市販鶏肉から CPFX 耐性の *bla*<sub>CTX-M</sub> 陽性大腸菌が分離されたことは、

*bla*<sub>CTX-M</sub> がプラスミド媒介性に他の病原細菌にも伝達される<sup>14)</sup>可能性を考えると、獣医公衆衛生的に注目する必要があると思われる。また、諸外国の ESBL 産生大腸菌の中でクローンとして注目されている CTX-M-15 型、シーケンスタイプが 131、系統発生群が B2、および CPFX 耐性を示す O25 : H4 型株<sup>5)</sup>が患者から分離されたことから、今後の動向に注意すべきである。

## 5. まとめ

1. 平成 21 年～22 年に、市販鶏肉 66 検体中 23 検体から 30 株、同時期の散発下痢症患者から 27 株の CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌が分離された。
2. 最も多かった血清型は、鶏肉由来株で O78 : H9、ヒト由来株で O25 : H4 であった。
3. 鶏肉とヒトの両方で確認された血清型は、O78 : H9 および O25 : HNM の 2 種類であった。
4. 鶏肉および糞便由来の O78 : H9 の各 1 株は、CTX-M type は CTX-M-55、系統発生群は A、PFGE パターンは類似し MIC 値は CPR 以外がほぼ一致した。

- 5) CTX-M-15型, シークエンスタイプが131、系統発生群がB2、およびCPFX耐性を示すO25:H4型株が患者から分離された。

## 謝辞

今回の調査に使用しました菌株を分与して頂きました、県内各医療機関の検査担当者の皆様、および調査研究費の一部を助成して頂きました社団法人福井県獣医師会に感謝します。

## 参考文献

- 1) Suzuki S *et al.* Change in the prevalence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread, *J Antimicrob Chemother*, 63, 72-79 (2009)
- 2) Warren RE *et al.* Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum- $\beta$ -lactamases in the UK, *J Antimicrob Chemother*, 61, 504-508 (2008)
- 3) Ho PL *et al.* Extensive dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* with multidrug resistance to 'critically important' antibiotics among food animals in Hong Kong, 2008-10, *J Antimicrob Chemother*, 66, 765-768 (2011)
- 4) Kiratisin P *et al.* Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic, *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2818-2824 (2008).
- 5) Nicolas-Chanoine MH *et al.* Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15, *J Antimicrob Chemother*, 61, 273-281 (2008)
- 6) Doi Y *et al.* Extended-spectrum and CMY-type  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain, *Clin Microbiol Infect*, 16:33-38, (2010)
- 7) 石畝 史他, 福井県内における人および鶏肉由来基質特異性拡張型 $\beta$ ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析, *日獣会誌*, 63, 883-887 (2010)
- 8) Shibata N *et al.* PCR classification of CTX-M-type  $\beta$ -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 791-795 (2006)
- 9) Dutour C *et al.* CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14  $\beta$ -lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France, *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 534-537 (2002).
- 10) Clermont O *et al.* Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group, *Appl Environ Microbiol*, 66, 555-4558 (2000).
- 11) Ozawa M *et al.* Antimicrobial susceptibilities, serogroups, and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *Avian Diseases*, 52, 392-397 (2008)
- 12) Coelho A R *et al.* Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain), *J Antimicrob Chemother*, 66, 517-526 (2010)
- 13) Kiratisin P *et al.* The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand, *Microbiol Infect Dis*, 58, 349-355 (2007)
- 14) Bonnet R, Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases the CTX-M enzymes, *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 1-14 (2004)

# ダイオキシン類－ヘキサクロロベンゼン同時分析法による 環境挙動解明に関する研究

三木 崇・小川綾子・熊谷宏之\*1

Environmental Behavior Research by Simultaneous Analysis of  
Dioxins and Hexachlorobenzene

Takashi MIKI, Ayako OGAWA, Hiroyuki KUMAGAI\*1

ヘキサクロロベンゼン (HCB) とダイオキシン類 (DXNs) の同時分析法を検討し、水や大気、染料など、各試料に対応した同時分析法を確立した。水環境への汚染実態の解明を目的として、本分析法で県内 17 河川について調査を行った結果、環境省 POPs モニタリング (平成 21 年度) の HCB 濃度を超えるものはなく、河川の特徴を反映した DXNs/HCB 濃度相関が得られた。高分解能 GC/MS 測定における 1 カラム簡易評価手法を検討し、河川水試料を対象に公定法との比較検討を行った結果、公定法とよく一致した良好な定量結果を得ることができた。また、通年で採取した大気試料の分析結果からは、DXNs/HCB の吸着挙動の差が明らかとなった。

## 1. はじめに

ヘキサクロロベンゼン (HCB) は、ダイオキシン類 (DXNs) と同様に、化学反応や燃焼反応に伴って副生成する非意図的生成物であり、毒性、難分解性、生物濃縮性の観点から、POPs の一種としてストックホルム条約の規制対象物質に指定されている。また、HCB は、1979 年に化学物質審査規制法の第一種特定化学物質に指定されて製造・使用が禁止されるまで、除草剤 PCP の原料として工業的に使用されていた。PCP 製剤は 1990 年に農薬登録が失効したが、DXNs と HCB が不純物として含まれており<sup>1,2)</sup>、現在も土壌中に残留しているおそれがある。また、近年では、テトラクロロ無水フタル酸 (TCPA) と TCPA を用いて製造される顔料等の中に HCB が含有されているとの報告もみられる<sup>3,4)</sup>。

さらに、福井県内の一部河川では、一般的に知られている DXNs 汚染要因 (ごみ焼却等の燃焼、農薬 (CNP、PCP) 中の不純物、塩素漂白過程、PCB 製品など) 以外に、染料由来によるダイオキシン類汚染が認められていることを我々は既に報告している<sup>5-10)</sup>。

こうした背景を踏まえ、非意図的生成物 (DXNs と HCB) による水環境への汚染実態や両者の相関を解明することを目的として、DXNs 分析法をベースとした HCB 同時分析法を新たに開発し、河川水の DXNs－HCB 濃度相関および大気試料における吸着挙動の解明を行った。

本報は平成 20～22 年にかけて行った DXNs/HCB 研究の総括であり、既報<sup>11)</sup>で報告済みの DXNs/HCB 同時分析法の検討結果も一部含めた形で報告する。

## 2. 方法

### 2. 1 DXNs/HCB 同時分析法の予備検討

DXNs と HCB の公定法を図 1 に示す。水質に係る DXNs 測定は JIS K 0312 が公定法として規定され、HCB 測定は環境省から POPs モニタリング調査マニュアルが示されている。

POPs マニュアルに示されているフロリジルカラムでは、精製不足で DXNs 分析の条件を困難にすると考えられたため、DXNs 分析法をベースとした手法を検討し、水質、大気、染料の DXNs/HCB 同時分析法を確立した。

なお、予備試験として行った添加回収試験では活性炭シリカゲルリバースカラムを用いた分画で HCB の大部分がモノオルト画分に溶出することが確認できた。環境水の場合は、ろ過・固相抽出の時点で、凝集剤 (PAC+FP-10) に活性炭分散シリカゲルを含有させた捕集材を添加すると HCB の回収に有効であった。HCB は DXNs と比べ蒸気圧が高く気散しやすいため、特に減圧濃縮などの操作は慎重に行う必要があることが分かった。これらの詳細な結果は既報<sup>11)</sup>のとおりである。

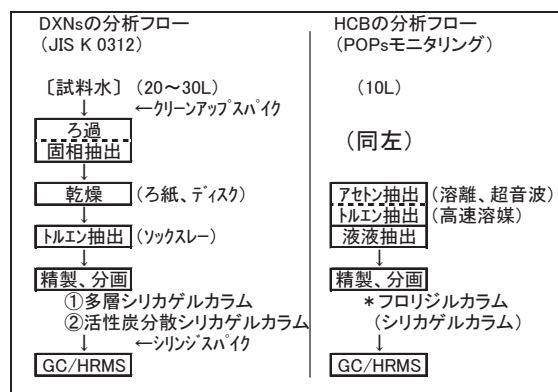


図 1 DXNs と HCB の分析法 (公定法)

\*1 福井県丹南健康福祉センター  
(元衛生環境研究センター)

## 2. 2 環境試料(水質・大気)および染料の DXNs/HCB 同時分析法

### (1) 水質試料(河川水)の分析:

試料水にクリーンアップスパイク ( $^{13}\text{C}$ -HCB、 $^{13}\text{C}$ -DXNs)、捕集剤(凝集剤に活性炭分散シリカゲル混合、pH調整)を添加、1時間程度放置した後、ろ過、固相抽出による捕集、乾燥後、ソックスサームによるトルエン抽出を行った。多層シリカゲルカラム、活性炭分散シリカゲルカラムで精製・分画を行い、GC/HRMSではSP-2331とRH-12msの2種類のGCカラムを用いて、毒性等価係数(TEF)を持つ29異性体を単独定量した。

### (2) 大気試料の分析:

ダイオキシン類に係る大気環境調査マニュアルに準拠し、2009~2010年の夏、秋、冬、春に試料を採取して同時分析の検討を行った。試料採取では、ポリウレタンフォーム(PUF)の上部と下部の間に活性炭繊維フェルト(ACF)をはさみ、石英繊維ろ紙(QMF)、PUF、ACFを別々に前処理、GC/HRMS測定を行い評価した。精製やGC/HRMS測定は水質分析と同一である。

### (3) 染料試料の分析:

分散染料0.5gを純水に分散させ、50mLに定容した。1mLを分取して分液ロートに入れ、硫酸30mLとクリーンアップスパイク( $^{13}\text{C}$ -HCB、 $^{13}\text{C}$ -DXNs)を400pg添加し、ヘキサンで液液抽出(40mL×2回)を行った。水洗、脱水、濃縮後、多層シリカゲルカラムで精製した。分画操作は行わず40 $\mu\text{L}$ に濃縮し、シリンジスパイクを添加してGC/HRMS測定(RH-12msの1カラム測定)を行い評価した。(分析法の検討の詳細については3.3を参照)

## 2. 3 GC/HRMS測定条件

DXNsとPOPsの測定に対応できるGCカラムとしてRH-12msを用い、グルーピング方式でHCBとDXNs(毒性等価係数(TEF)を持つ29異性体)を同時測定した。グルーピング設定は表1のとおりである。

DXNs公定法では、SP-2331とRH-12msの2種類のGCカラムを用い、毒性等価係数(TEF)を持つ主要29異性体を単独定量した。また、1カラムによる迅速分析では、RH-12msもしくはBPX-DXNを使用してグルーピング方式でHCBとDXNsを同時測定し、定量した。

表1 RH-12msを用いたGC/HRMSのグルーピング設定

No.	測定対象物質( $^{13}\text{C}$ -体を含む。)	備考
1	PCDDs/PCDFs: HCB, DL-PCB	(283.8102, 285.8072) (289.8303, 291.8273)
2	TeCDDs TeCDFs	TeCB PeCB HxCB 全異性体を測定
3	PeCDDs PeCDFs	HxCB HpCB グループ2, 4との関係で、PeCDDsとPeCDFsの一部異性体測定不可(TEFを持つ異性体は測定が可能)
4	HxCDDs HxCDFs	— 全異性体を測定
5	HpCDDs HpCDFs	— 全異性体を測定
6	OCDD OCDF	— 全異性体を測定

(備考)主要29異性体(TEF設定)とHCBは同時測定が可能

## 3. 結果および考察

### 3. 1 水質試料(河川水)のDXNs/HCB測定

平成21~22年度にかけて、県内の17河川24試料を採取し、DXNs/HCB同時分析を行った。結果は図2のとおりで、DXNs(実測濃度)/HCBの濃度相関は $R=0.81$ となり、良い相関が得られた。また、今回行ったHCB調査結果は7.1~90pg/Lであり、環境省が全国で実施しているPOPsモニタリング<sup>5)</sup>の濃度範囲(平成21年度:2.4~180pg/L)を超える地点はなかった。

HCBの主たる環境排出源としては、ゴミ焼却、農薬由来、工業原料中の不純物などが報告されているが<sup>1)</sup>、図2の分散図をDXNs排出源の一つである染色排水が流入する河川(染色河川)と、その他一般河川に分類すると、高濃度のデータは全て染色河川が占め、一般河川は全て低濃度であることが分かる。また、分類後のデータは染色河川、一般河川ともバラツキが大きく、各々についてDXNs/HCBの相関は認められなかった(図3)。

我々は20種類以上の染料についてDXNs/HCB同時分析を行ったが、DXNs/HCBの一方だけが含まれる染料もあるなど、その濃度比率は製品によって大きく異なる。したがって、工場からの染色排水は、個々の染料が積算して平均化された形で排出されているものと考えられ、染色河川においては、一般環境中の濃度に加え染料由来のDXNs/HCBが流入するため、比較的高濃度となる傾向があり、これら染色河川のDXNs/HCB濃度比は、工場で使用されている染料の種類や使用量など、2次的な要因が影響しているものと推察される。全河川で評価した際に得られた良い相関( $R=0.81$ )に関しては、低濃度側の一般河川と高濃度側の染色河川との二極化によるものと推察される。

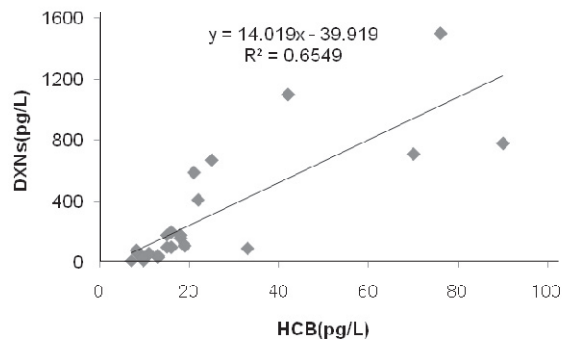


図2 県内17河川のDXNs/HCB相関(n=24)

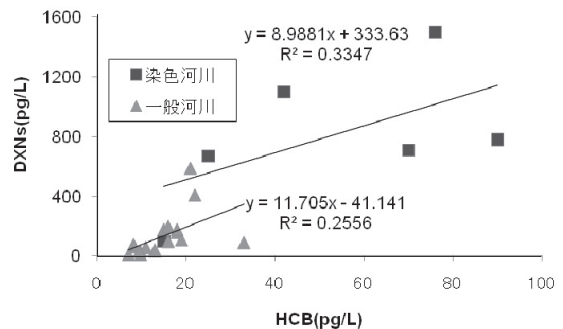


図3 排出源による河川分類



なお、過去の染料分析と太陽光照射試験結果<sup>5-10</sup>から染色排水由来との関係が最も示唆された染料種（DXNs 濃度：1.1～3.9ng-TEQ/g）について、製造メーカーやロットにより濃度差はあるものの、HCB 濃度は 84～110ng/g であった。BAT レベル（工業技術的・経済的に可能なレベル）<sup>4</sup>として設定されている 10,000ng/g (10ppm)を十分下回るものの、他の染料と比べ、やや高めの値であった。

以上より、DXNs/HCB 排出源の一つとして染料由来に着目して河川分類することで低濃度側・高濃度側へ分かれた結果を得ることができた。我々は DXNs/HCB 排出源として土壌中の残留農薬由来（PCP）にも着目し、代掻きや田植え等で農薬成分が顕著な灌漑期（5～6月）と非灌漑期（10～11月）への分類と相関係数の変化について検証した。

DXNs/HCB 排出源として PCP 由来の影響が顕著であれば、分類によって DXNs（実測濃度）/HCB の相関係数は改善されるかと思われたが、分類前後で相関が良くなる傾向は認められなかった。

次に、PCP 由来に特徴的な個々の DXNs 指標異性体濃度（OCDD など）と HCB の濃度相関について検討した。DXNs 指標異性体濃度は灌漑期に大きく増加するものの、もう一方の HCB 濃度に大きな変化はなく、両者に濃度相関は認められなかった（図 4～5、表 2）。これらの傾向を踏まえると、現時点における河川水への HCB 排出源としては、土壌中の残留農薬（PCP 由来）による影響は少ないものと考えられる。

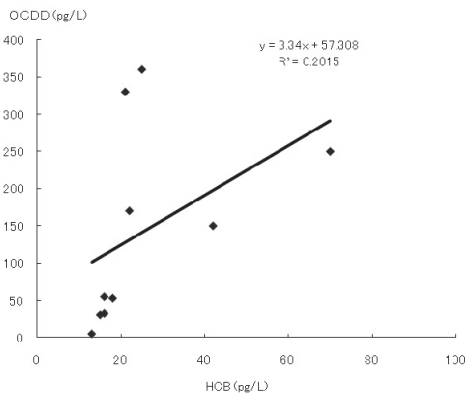


図 4 灌漑期（5～6月）の OCDD/HCB 濃度

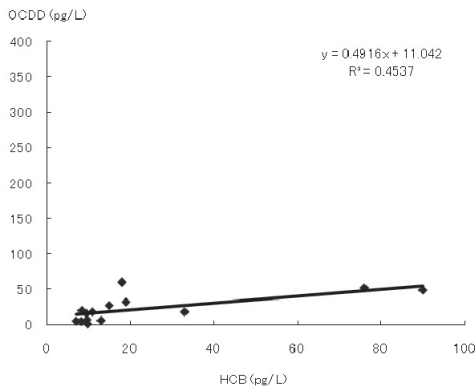


図 5 非灌漑期（10～11月）の OCDD/HCB 濃度

表 2 DXNs 汚染源と指標異性体(2006TEF)

	汚染源	異性体	TEF
TeCDD	CNP	1368	—
		1379	—
TeCDF	CNP	2468	—
PeCDD	CNP	12468, 12479	—
		12368	—
		12379	—
	CNP	<b>12378</b>	<b>1</b>
PeCDF	CNP	12468	—
HxCDF	PCP	124689	—
HpCDD	PCP	<b>1234678</b>	<b>0.01</b>
HpCDF	PCP	1234689	—
OCDD	PCP	<b>12346789</b>	<b>0.0003</b>
PeCDF	燃焼	<b>23478</b>	<b>0.3</b>
TeCDF	染色	1368	—
PeCDF	染色	13678	—
HxCDF	染色	123479	—
	染色	<b>234678</b>	<b>0.1</b>

一方、DXNs/HCB 排出源の一つとして燃焼由来に着目し、主な発生源が燃焼生成である 2,3,4,7,8-PeCDF について HCB との相関を検証した結果、全河川で  $R=0.85$ 、染色河川を除外した低濃度一般河川で  $R=0.78$  となり、どちらの場合も良い相関が得られた。全河川の場合は染色影響も含まれるが、河川水の DXNs/HCB 濃度には燃焼由来の寄与が大きいことを示唆する結果といえる。（図 6～7）

以上のように、DXNs/HCB 排出源には複数の要因が考えられる。今回の研究は県内全域を対象とした広域的な調査であったが、河川毎に分類して経時的にデータを蓄積していくことによって排出源が限定され、より相関の良い結果が得られる可能性も考えられる。

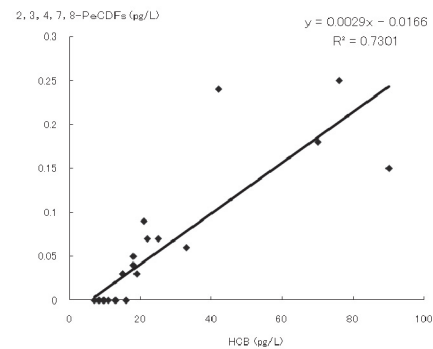


図 6 全河川（染色＋一般）の 2,3,4,7,8-PeCDF/HCB 濃度

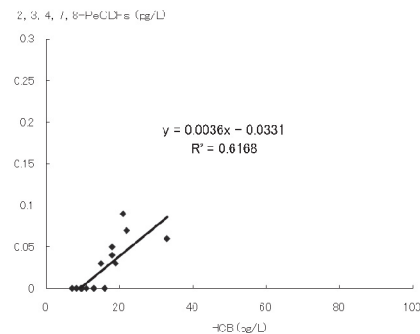


図 7 一般河川の 2,3,4,7,8-PeCDF/HCB 濃度

### 3. 2 大気試料のDXNs/HCB測定

各季節毎の HCB 濃度を図 8 に示す。HCB 濃度が環境省 POPs モニタリング<sup>12)</sup> (平成 21 年度) の濃度範囲を超えるものではなく、全国と同様、夏季に HCB 濃度が相対的に高く、温暖期、寒冷期とも全国平均値に近い値であった(表 3)。また、4 季節ともガラス繊維濾紙 (QMF) 中の HCB 濃度はブランクレベルであった。HCB は蒸気圧が高く、ガス態で存在しやすいためと考えられる。

吸着部材ごとの HCB 吸着量に着目すると、各部材の HCB 濃度合計値は夏季が冬季の 2 倍近い値であるが (130pg/m<sup>3</sup>>71pg/m<sup>3</sup>)、上流側のポリウレタンフォーム (PUF①) の吸着量は、夏季は冬季の 1/3 程度 (8.6pg/m<sup>3</sup><26.7pg/m<sup>3</sup>) であった。これらの結果は、PUF の HCB 吸着効率には顕著な温度依存性があり、高温条件下となる夏季には HCB の大部分が上流側の PUF①を破過し、下流側の活性炭フェルト (ACF) で捕集されている状況を示しているものと考えられる。

また、ダイオキシン類に関しては、ほぼ全てが QMF と PUF① (1 段目と 2 段目) に捕集されており、下流側の ACF (3 段目)、PUF② (4 段目) は ND であった (図 9)。QMF の吸着挙動に関しては浮遊じんの粒子径などの条件が影響している可能性も考えられるが、PCDD、PCDF、Co-PCB のいずれも、夏期は下流側 (PUF①) に移行しやすい傾向が認められた。

なお、HCB はモノオルト PCB 画分を GC/HRMS 測定することで、DXNs との同時分析が可能であり、回収率も概ね 50%以上を確保できた。しかし、河川水とは違い、大気中の HCB は DXNs 各異性体の実測濃度よりも数十～数万倍高いため、同一検液で GC/HRMS 同時測定は現実的に困難であり、検液を一部分取し、希釈して測定する必要がある。

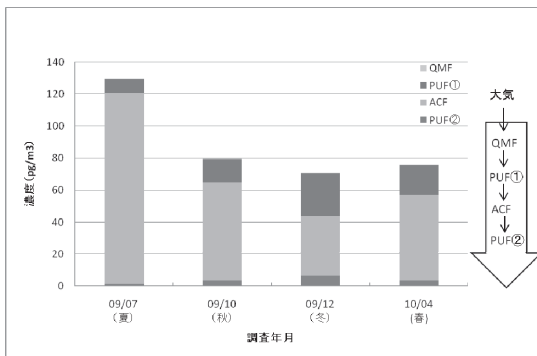


図 8 大気中 HCB 濃度 (衛生環境研究センター屋上)

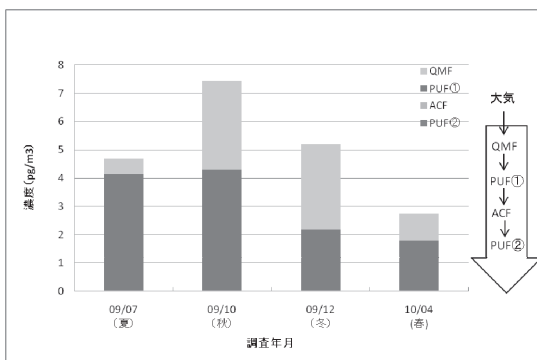


図 9 大気中の DXNs 実測濃度 (衛生環境研究センター屋上)

表 3 大気中 HCB 測定結果 (H21 環境省調査結果)

調査月	調査地点	DXNs濃度 (pg-TEQ/m <sup>3</sup> )	HCB濃度 (pg/m <sup>3</sup> )	全国のHCB濃度 (H21) (環境省エコ調査)	
				(温暖期)	(寒冷期)
7月	衛環研C (屋上)	0.018	130	78~210	59~150
<DXNs採取法>		0.019	15	平均: 110	平均: 87
10月	(同上)	0.081	80	(検出頻度: 34/34)	(検出頻度: 34/34)
12月	(同上)	0.055	71		
4月	(同上)	0.029	76		

(備考) DXNs大気環境基準: 0.6pg-TEQ/m<sup>3</sup> (年平均で評価)

### 3. 3 染料試料のDXNs/HCB同時分析法の検討

分散染料中の DXNs 分析では様々な問題点が生じ、凝集剤を用いた抽出法の改善 (従前法) などについて既に報告している<sup>6)</sup>。この従前法をベースに HCB との同時分析を当初は検討したが、5 試験で <sup>13</sup>C-HCB の回収率は 20~40%と悪く (表 4)、大気と同様に HCB のピークが飽和した染料もあった。そこで、DXNs 異性体の検出下限を従前法の 0.001ng-TEQ/g から 0.1ng-TEQ/g に変え、他の報告<sup>4)</sup>も参考に [硫酸溶解-ヘキサン抽出] で DXNs/HCB 同時分析を行った。この手法では、従来 5 回以上必要であった減圧濃縮操作が 2 回で済むこともあり、<sup>13</sup>C-HCB の回収率が 70%台まで改善され、DXNs 濃度 (Total-TEQ) も従前法とほぼ同値の結果が得られた (表 4、図 10)。さらに、本法は抽出段階で硫酸による精製が兼ねられるためエマルジョンが形成しないこと、また、分画操作を省略してもヘキサンのみの抽出や希釈率を高めることによって、従前法では精製不足で GC/MS への悪影響もあった欠点が解消される利点があり、著しい分析の迅速化も達成できた。ただし、低塩素化物 (ネイティブのみ) の抽出に難があるとみられた。染色排水 (染料) 由来では、TEF を有する低塩素化物が少ないため Total-TEQ への影響は少ないが、DXNs 分析としてはこのような点に留意して適切に運用する必要がある。

なお、本分析法で 20 種類以上のアゾ系・アントラキノン系染料の DXNs/HCB 濃度を測定した結果、両者のうち一方だけが含まれる染料もあるなど、その濃度比率は製品によって大きく異なり、濃度相関は認められなかった。また、アントラキノン系の染料の DXNs/HCB 濃度はどちらも非常に低い水準にあったが、アゾ系の染料は染料の種類によって濃度に差があり、幅広い結果となった。

表 4 染料の分析試験結果比較 (1 試料で 5 試験実施)

方法	RH-12ms DXNs (ng-TEQ/g)	HCB (ng/g)	<sup>13</sup> C-HCB 回収率 (%)
従前法 (凝集、ろ過、ToI-Sox)	1.7~1.8	(回収率不足のため評価対象外)	20~39
硫酸溶解-Hex抽出法	1.6~1.7	84	71~83

(備考) 既報で DXNs は 1.8ng-TEQ/g (WHO-TEF2006 で 1.6)

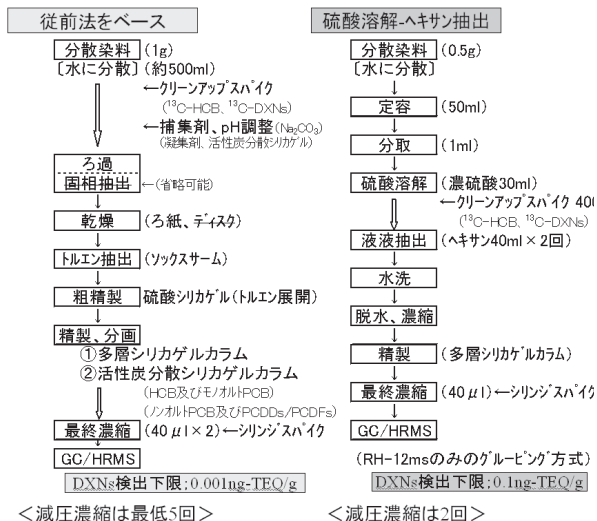


図 10 [硫酸溶解-ヘキサン抽出法]の検討

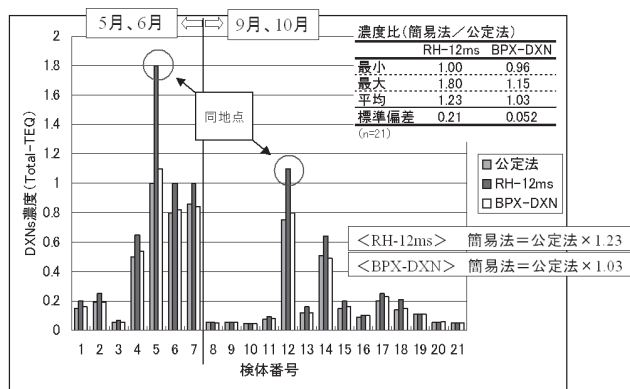


図 11 簡易法と公定法の数値比較 (TEQ)

### 3. 4 河川水試料における迅速分析の評価

公定法と簡易法で定量した DNXs 濃度 (Total-TEQ) の評価結果を図 11 に示す。濃度比 (簡易法/公定法) が 2 を超えるものはないが、RH-12ms の方が BPX-DXN より高めの濃度となる傾向があった。

RH-12ms 簡易法では、21 試料のうち 1 試料で公定法の 1.8 倍の定量値となったが、他の 20 試料では濃度比が 1.5 以下で概ね 1.0~1.3 の範囲にあり、簡易法として十分適用可能と考えられる。簡易法では BPX-DXN で濃度比が 1.1 となり、BPX-DXN の方が迅速分析として優位性が極めて高くなった。

RH-12ms において TEQ 濃度が公定法の 1.8 倍になった試料は染色排水が流入する河川であり、2,3,4,6,7,8-HxCDF (TEF=0.1) 定量値が公定法の 4.6 倍となった。これは、2,3,4,6,7,8-HxCDF と 1,2,3,4,6,9-HxCDF のリテンションタイムが同一でピーク分離できないため、TEF=0 の 1,2,3,4,6,9-HxCDF を TEF=0.1 の 2,3,4,6,7,8-HxCDF として計上したためである。なお、別の染料由来の寄与が大きい河川では、2,3,4,6,7,8-HxCDF が主体的で 1,2,3,4,6,9-HxCDF 濃度が低かったため、Total-TEQ にはほとんど影響がなかった。今回の例外的なケースは、公定法で環境基準値レベルの精査を要した検体ではあるものの、RH-12ms で河川水の迅速評価を行う場合には、上記の点に留意する必要がある。

## 4. まとめ

(1) DNXs 分析法をベースとした DNXs/HCB 同時分析法を開発し、水や大気、染料など、各試料に対応した同時分析法を確立した。

- ・大気中の HCB は DNXs 実測濃度よりも数十~数万倍高いため、同一検液での同時測定は現実的に困難であり、DNXs との濃度差を考慮したメソッドの構築が必要である。

- ・染料試料で検討した[硫酸溶解-ヘキサン抽出法]では、従前法での  $^{13}\text{C}$ -HCB の回収率低下や精製不足などの問題点が解決でき、同時に大幅な迅速化も達成できた。

(2) 水環境への汚染実態や濃度相関を解明することを目的として、県内 17 河川 24 試料を採取して同時分析を行った。

- ・全河川での評価では、DNXs(実測濃度)/HCB の濃度相関は  $R=0.81$  となり、良い相関が得られた。

- ・河川分類した結果、染色河川は高濃度側、一般河川は低濃度側に偏る結果となり、各々について DNXs/HCB 濃度の相関は認められなかった。染色排水流入河川は DNXs・HCB とともに高めの値が出やすい傾向があることに加え、個々の染料中の DNXs/HCB 比に相関がないためと推察される。

- ・汚染源に特徴的な個々の DNXs 異性体濃度について HCB 濃度との相関を評価した結果、農業(PCP)由来に関しては相関が認められず、燃焼由来の 2,3,4,7,8-PeCDF と HCB には良い相関が認められた。(全河川で  $R=0.85$ 、染色河川を除外した一般河川で  $R=0.78$ )

(3) 大気試料で DNXs/HCB 測定を行った結果、DNXs は QMF と PUF①(1 段目と 2 段目)に吸着するのに対し、HCB は大半が ACF (3 段目)に吸着しており、全濃度に対する PUF①の吸着量は、温暖期と寒冷期で顕著な差が認められた。

(4) 河川水 21 試料で 1 種類の GC カラムによる迅速分析を公定法と比較評価した結果、DNXs 濃度 (Total-TEQ) は RH-12ms と BPX-DXN の 1 カラム測定で公定法の 2 倍を下回り (概ね 1.0~1.3 倍)、BPX-DXN の方がやや優位性はあったが、いずれも有効な簡易手法と考えられた。

なお、本研究は文部科学省「特別電源所在県科学技術振興事業費補助金」により、「化学物質対策調査研究事業（平成20～22年度）」として実施した。

## 参考文献

- 1) 酒井伸一他：ヘキサクロロベンゼン (HCB) の環境排出とその発生源, 廃棄物学会誌, 12(6), 349-362 (2001)
- 2) 清家伸康他：水田土壤中ダイオキシン類の起源と推移, 環境化学, 13(1), pp.117-131 (2003)
- 3) 厚生労働省、経済産業省及び環境省：化学物質審査規制法第一種特定化学物質ヘキサクロロベンゼンの副生に係る対応について, 報道発表資料, 平成18年3月
- 4) 厚生労働省、経済産業省、環境省の合同委員会：TCPA及びソルベントレッド135中の副生HCBに係るBATレベルに関する報告書, 平成18年11月
- 5) 熊谷宏之他：未規制発生源からのダイオキシン類流入河川における汚染機構について一年間濃度変動と各汚染寄与割合の推定一, 福井県衛生環境研究センター年報, 4, 66-71 (2005)
- 6) 熊谷宏之他：福井県の未規制発生源からのダイオキシン類流入河川における年間濃度変動について, 第15回環境化学討論会講演要旨集, 304-305 (2006)
- 7) 熊谷宏之他：分散染料中のダイオキシン類分析について一抽出法の検討と測定データの特徴一, 福井県衛生環境研究センター年報, 5, 77-84 (2006)
- 8) 熊谷宏之他：未規制発生源である染色排水からのダイオキシン類排出機構について, 第16回環境化学討論会講演要旨集, 388-389 (2007)
- 9) 熊谷宏之他：分散染料中のダイオキシン類分析法の開発一凝集剤を用いた抽出法の評価一, 第16回環境化学討論会講演要旨集, 330-331 (2007)
- 10) 熊谷宏之他：未規制発生源である染色排水からのダイオキシン類排出機構について (その2) 一太陽光照射によるPCDFsの生成反応一, 第17回環境化学討論会講演要旨集, 410-411 (2008)
- 11) 熊谷宏之他：環境水中のダイオキシン類とヘキサクロロベンゼンとの同時分析法に関する検討, 福井県衛生環境研究センター年報, 7, 56-60 (2008)
- 12) 環境省：平成22年度版 化学物質と環境, 218-221



# ヨシ群落を利用した湖沼の水質改善とヨシ等の有効利用技術 (バイオマスエタノール等)に関する研究(第3報)

南部浩孝・片谷千恵子

Research on Improvement of Lake Water Quality utilizing *Phragmites australis*  
and Technology for Effective Use of *Phragmites australis* (3)

Hiroataka NANBU, Chieko KATAYA

湖沼の富栄養化対策として、水生植物による栄養塩類吸収後の系外除去を促進するため、ヨシ・ヒシ有効利用技術の可能性を検討した。エタノール発酵の基礎試験を行った結果、40℃、酵母量 2.0g/(100mL)、40℃、24 時間の条件が最適であった。ヨシ・ヒシからのエタノール発酵を検討した結果、ヨシで 96%、ヒシで 97% のエタノール収率を得た。また、三方湖周辺に存在するヨシ帯、ヒシ帯のバイオマス量を算定したところ、およそ 0.6 t のエタノール生産が見込まれた。

## 1. はじめに

湖沼の水質浄化や生物多様性保全の観点から、ヨシ群落の保全・再生の取組みが重要であり、本県でも水生植物を植栽した浮礁の設置や渚護岸の整備に取り組んでいる。

ヨシなど水生植物による水質浄化効果を十分に得るためには、富栄養化の原因物質である窒素・リンを吸収して成長した植物体を系外除去(刈り取り)する必要があるが、刈り取り後の利用として、梅林の肥料に一部利用されているほかは有効な利用方法がない。

このような状況を背景に、本研究は、ヨシや三方湖に大量繁茂したヒシをバイオマス資源としてとらえ、最終段階のエタノール製造技術まで開発することによって、新たな有効利用の可能性を確保し、湖沼の水質浄化を促進させることを目的としている。

著者らは、第2報<sup>1)</sup>において、硫酸分解によるヨシのグルコース生成の最適条件は 130℃、3.0N、8 時間であり、ヨシに含まれるセルロースからのグルコース生成収率は 48.9%であったこと、さらに同条件下でのヒシの硫酸分解では、ヒシに含まれるセルロースからのグルコース生成収率は 25.6%であったことを報告した。今回は、ヨシ・ヒシから得られたグルコースのエタノール発酵について検討し、若干の知見が得られたので報告する。

## 2. 方法

### 2. 1 エタノール発酵条件の検討

#### 2. 1. 1 GCを用いたエタノールの分析条件

サンプル 9mL と内標準液 0.02%2-メチル-1-プロパノール 1mL を 20mL 容バイアル瓶に分取し、直ちに密栓した。55℃水浴中で 10 分間加温したのち、ガスシリンジを用いて瓶内の気相の一定量を取り、GC 試料室に注入した。以下に FID-GC の分析条件を示す。

GC 装置：yanaco 社製 G6800

カラム：Rtx-BAC1 (0.32mmi.d.×30m×膜厚 1.8μm)

カラム温度：60℃(1分)~250℃(5℃/分)~250℃(1分)

キャリアガス：N<sub>2</sub>、50kPa

トランスファーライン温度：150℃

インジェクター温度：150℃

ニードル温度：150℃、注入量：100μL

#### 2. 1. 2 酵母の最適発酵条件

酵母は Yeast from *Saccharomyces cerevisiae*, Type II (sigma 製)、グルコース標準は D-(+)-GLUCOSE ANHYDROUS (和光製)を用いた。

本酵母の最適発酵条件を検討するため、グルコース標準を用いて、3,000mg/L のグルコース溶液を作成し、その 100mL を用いて、発酵温度を、発酵時間、および酵母量の条件を変えて検討を行った。なお、pH は 4.0~5.0 以外ではほとんど発酵が起きなかったため、すべて pH4.5 に調製して行った。

#### 2. 2 ヨシ・ヒシからのエタノール発酵

2. 1 で検討したエタノール発酵の最適条件をもとに、ヨシ・ヒシから生成したグルコースを用いてエタノール発酵を検討した。

2010 年 8 月に北潟湖の塩尻橋周辺で採取したヨシと三方湖湖面上で採取したヒシを乾熱機で 60℃、12 時間乾燥した。この乾燥体を Wonder Blender (大阪ケミカル製)で粉碎し、粉末試料を得た。成分分析を行ったところヨシのセルロース含有量は乾燥体で 41.9%、湿潤体で 23.5%、また、ヒシのセルロース含有量は乾燥体で 20.0%、湿潤体で 1.6%であった<sup>2)</sup>。

ヨシ等の植物体に多く含まれるリグニンは、酸分解や熱分解によりフルフラールや有機酸等のエタノール発酵阻害物質を生成するため、以下(1)~(3)の前処理方法について検討した。

- (1) 硫酸分解前に過酸化水素前処理を行うことにより、リグニンを除去する。
- (2) 発酵前に pH を 4.5 に調整する際に、一旦 pH10 まで上げ、30 分おいたのちに pH4.5 に調整するオーバーレイミング処理を行うことにより、阻害物質を沈殿除去する。ただし、本前処理のみではエタノール発酵が進まなかったため、(1)の前処理と組み合わせで行った。
- (3) 活性炭カラム(グルコース等を通し、阻害物質を吸着するカラム)を通過させることにより、阻害物質を除去する。

### 2.3 三方湖周辺のヨシ・ヒシのエタノール生成可能量の算定

三方湖周辺に存在するヨシ・ヒシからのエタノール生成量の算定条件は次のとおりとした。

現在、三方五湖には84基のヨシの浮礁(2×2m)が設置されており、1基あたり64株(8×8)のヨシが植栽できるとして算定した。また、三方湖植生護岸ヨシ帯はおおよそ6,515m<sup>2</sup>であり、1m<sup>2</sup>あたり52株生育しているとして算定した。なお、1株のヨシ重量は約16gとして算定した。

ヒシ帯は2009年8月の時点で三方湖の約6割を占め、占有面積はおおよそ2.0km<sup>2</sup>と推定される。これは1m<sup>2</sup>のヒシの推定個体数を4株とすると、8×10<sup>6</sup>株が生育している。なお、1株のヒシ重量は約20gとして算定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 エタノール発酵条件の検討

#### 3.1.1 GCを用いたエタノールの分析条件

エタノール標準溶液によるクロマトグラフと検量線を図1、図2に示す。

このとおり、エタノールは保持時間約2.5分で良好なピークを示し、検量線も良好な直線性を得たため、当分析条件でエタノール分析を行うこととした。

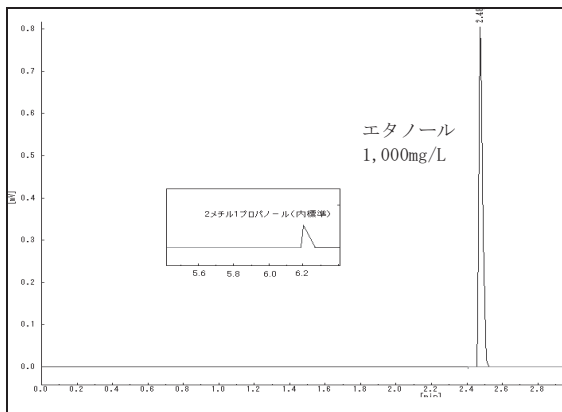


図1 FID-GCによるクロマトグラフ

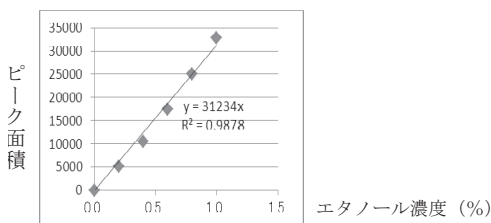


図2 検量線

#### 3.1.2 酵母の最適発酵条件

発酵温度を20、30、40、45℃、発酵時間を8、24、48、72時間、酵母量を0.5、1.0、2.0、3.0gと条件を変えてエタノール発酵を行った結果を示す(図3～図5)。

その結果、発酵温度40℃において、エタノール生成量が最も多くなり(図3)、酵母量2.0g(図4)、発酵時間24時間(図5)、でエタノール発酵が完了することが分かった。

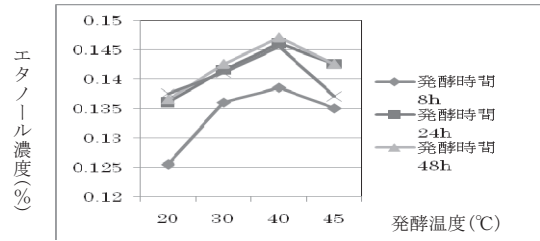


図3 酵母量2.0g/100mLにおける発酵温度の検討

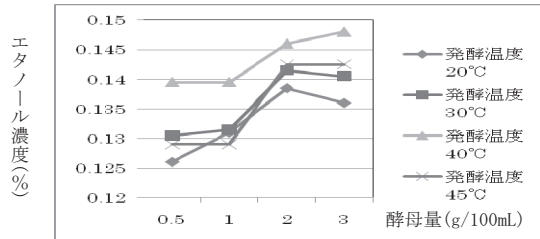


図4 発酵時間24hにおける酵母量の検討

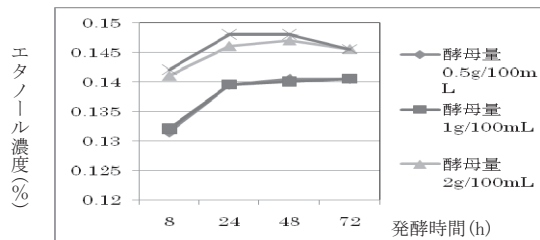


図5 発酵温度40℃における発酵時間の検討

### 3.2 ヨシ・ヒシからのエタノール発酵

#### 3.2.1 過酸化水素前処理

過酸化水素濃度を2.5、5.0%、分解温度を120、125℃、分解時間を30、60分の条件で前処理を行ったものについて、エタノール発酵を行った(図6～図9)。

その結果、ヨシでは、5.0%過酸化水素濃度、125℃、60分で発酵収率が96%を示した。ヒシについては、前処理なしに発酵収率97%を示したことから前処理が必要ないことがわかった。

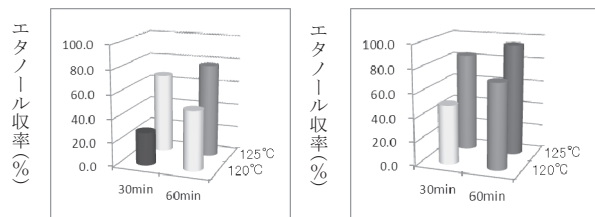


図6 ヨシの2.5%過酸化水素処理(左図)

図7 ヨシの5.0%過酸化水素処理(右図)

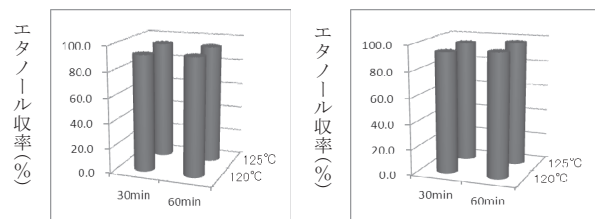


図8 ヒシの2.5%過酸化水素処理(左図)

図9 ヒシの5.0%過酸化水素処理(右図)

### 3. 2. 2 オーバーレイミング処理

3. 2. 1 と同様の条件で過酸化水素前処理した後、エタノール発酵前にオーバーレイミング処理を行い、エタノール発酵を行った（図 10、図 11）。

その結果、ヨシについて、5.0%過酸化水素濃度、125℃、30分もしくは、5.0%過酸化水素濃度、120℃、60分においても発酵収率が95%以上を示した。

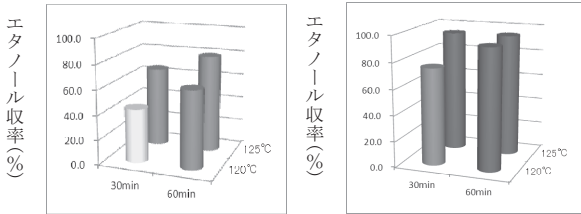


図 10 ヨシの 2.5%過酸化水素処理  
+オーバーレイミング処理（左図）

図 11 ヨシの 5.0%過酸化水素処理  
+オーバーレイミング処理（右図）

### 3. 2. 3 活性炭カラム処理

活性炭カラム（φ4.0×20 cm）に粒径 2~5 mmの活性炭を詰め、ヨシ・ヒシの硫酸分解試料（過酸化水素未処理）を自然落下により通過させた。通過前と通過後のエタノール発酵収率を表 1 に示す。

表 1 活性炭カラムによるエタノール阻害物質の除去

	カラム通過なし	カラム通過後
ヨシ	10%	95%
ヒシ	89%	93%

その結果、活性炭カラムを通過させることで 90%以上の収率を示した。ただし、硫酸分解試料を 300~400mL程度通すと吸着限界を超えてしまった。これは試料中の炭化生成物も同時に吸着してしまうためと考えられる。

### 3. 3 三方湖周辺のヨシ・ヒシから生成するエタノール量の算定

三方湖周辺に存在するバイオマス量とエタノール生成量の算定結果を表 2 に示す。

その結果、ヨシ浮礁 84 基から約 4kg、三方湖植生護岸ヨシ帯から約 250kg、三方湖ヒシ帯から約 320kg のエタノール生成が可能であると算定された。

表 2 三方湖周辺のバイオマス量とエタノール生成量

	バイオマス量(g)	セルロース含率(%)	セルロース含量(g)	セルロースからのグルコース収率(%)	グルコースからのエタノール生成収率(%)*	エタノール生成量(g)
ヨシ浮礁(84 基)	86,000	20.0	172,000	48.9	48.0	4,037
三方湖植生護岸ヨシ帯	5,420,000	20.0	1,084,000	48.9	48.0	254,436
三方湖ヒシ帯	160,000,000	1.6	2,560,000	25.6	48.5	317,850

\*脱炭酸が起きるため、発酵収率の約 50%となる。

## 4. まとめ

ヨシのエタノール発酵では、5%過酸化水素を用いて、125℃、60 分の前処理をすることにより 96%のエタノール発酵収率を得た。また、オーバーレイミング処理を施すことで、5.0%過酸化水素濃度、125℃、30分もしくは、5.0%過酸化水素濃度、120℃、60分においても発酵収率が95%以上を示した。ヒシは前処理なくとも、97%の発酵収率であった。

その結果、重量比でヨシ乾燥体から 9.8%\*\*、ヒシ乾燥体から 2.5%\*\*\*のエタノールを生成できることがわかった。これは、廃木材における約 10%のエタノール生成と同程度であり、三方湖周辺ヨシ帯やヒシ帯からおよそ 0.6 t のエタノール生産が見込まれることとなる。

なお、本研究は文部科学省「特別電源所在県科学技術振興事業費補助金」により、「湖沼水質浄化研究事業（平成 20~22 年度）」として実施した。

\*\* (ヨシ乾燥体中のセルロース含有量：41.9%) × (ヨシのグルコース収率：48.9%) × (ヨシのエタノール収率：48.0%)

\*\*\* (ヒシ乾燥体中のセルロース含有量：20.0%) × (ヒシのグルコース収率：25.6%) × (ヒシのエタノール収率：48.5%)

## 謝辞

本研究にあたり、ご指導いただいた国立環境研究所の板山朋徳研究員、若狭湾エネルギー研究センターの高城啓一主任研究員、田中良和主任研究員、遠藤伸之主査研究員、そして研究にご協力いただいた関係者の方々に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) 南部浩孝他：ヨシ群落を利用した湖沼の水質改善とヨシ等の有効利用技術（バイオマスエタノール等）に関する研究（第 2 報），福井県衛生環境研究センター年報,8, 58~60 (2009)
- 2) 片谷千恵子他：ヨシ・ヒシの成分分析およびヨシを対象としたバイオマス量の算定，福井県衛生環境研究センター年報,8, 106~107 (2009)

# 健康長寿延伸に向けた福井県民の心の健康づくりの研究 —「笑い」を取り入れたストレス対処能力の向上をめざす—

市川宏枝・浦松和枝・松永浩美・田中宏和・下中邦俊・平野映子・小川綾子・  
木村壽彦・戸田雅裕\*1・川端啓之\*2・池羽田篤\*3・持田忠司\*4・下迫光市\*5

Promoting Mental Health and Longevity for People in Fukui Prefecture  
-Stress Management through “Laughter”-

Hiroe ICHIKAWA, Kazue URAMATSU, Hiromi MATSUNAGA, Hirokazu TANAKA,  
Kunitoshi SHIMONAKA, Eiko HIRANO, Ayako OGAWA, Toshihiko KIMURA, Masahiro TODA\*1  
Hiroyuki KAWABATA\*2, Atsushi IKEHATA\*3, Tadashi MOCHIDA\*4, Koichi SHIMOSAKO\*5

平成 21 年度に、福井県民のストレスと笑いの実態把握調査、平成 22 年度には笑いによるストレス軽減効果の科学的検証を実施した。

実態調査では、ストレス感を自覚している人の方が笑いの頻度は少ないが、ストレスを自覚していない人よりも、笑いを意識して取り入れたり、ストレス解消行動をとろうとしていることが分かった。また、実態調査の結果から、ストレス軽減に笑いが有効であることが示唆され、その効果について「お笑いのビデオ」を用いて、生理学的に検証した結果、男性に有意な効果があった。

## 1. はじめに

福井県では、からだ・こころの健康づくりに大きな影響を持つと考えられている「笑い」や「ユーモア」を健康づくりに活用しようと、平成 19 年度から「笑い与健康」推進事業に取り組んでいる。

当該事業の一環として、当衛生環境研究センターでは、2 カ年の計画で本研究に取り組み、平成 21 年度には、福井県民のストレスと笑いの実態を把握し、日常生活における笑いがストレス対処にどう活かされているのかを明らかにするためのアンケート調査を実施した。

平成 22 年度には、「笑い」によるストレス軽減効果をか科学的に検証したので、その結果とともに本研究のまとめを報告する。

## 2. 方法

### 2. 1 福井県民のストレスと笑いの実態調査

質問紙による記述式のアンケート調査を、過剰ストレス\*1判定可能な 1,843 名(男性 620 名、女性 1,223 名)分を有効回答として解析対象を行った。<sup>1)</sup>

※1 アンケートの質問 15 が、福井県が作成した「心の健康度自己評価票」となっており、その 1 項目以上で基準値以上のものを指す。<sup>2)</sup>

### 2. 2 笑いによるストレス軽減効果の科学的検証

被験者 30 名(内訳は表 1 を参照)について、ストレス負荷(計算課題を 15 分間)を行った後、ビデオを 30 分間観賞してもらい、①ビデオ観賞直前、②ビデオ観賞終了直後、

③ビデオ観賞終了 30 分後の 3 回唾液採取を行い(図 1)、唾液中クロモグラニン A<sup>\*\*2</sup>(以降 CgA)レベルを ELISA 法により測定し、ストレスの変化を調べた。

調査は、若年グループと高齢グループに分け、別々の会場で、平成 22 年 7 月に実施した。

この一連の唾液採取調査は 2 回行ったが、観賞してもらったビデオの内容は、1 回目は「笑い」を、2 回目(1 回目の 1 週間後)は「風景」とした。

※2 CgA : 内分泌系や神経系に広く存在する物質で、精神的ストレスが高まると、唾液中に多く分泌される<sup>3)</sup>。

表 1 被験者の内訳

	若年 グループ	高齢 グループ	計
男性	20~22 歳 7 名	66~83 歳 7 名	14 名
女性	20~25 歳 8 名	62~78 歳 8 名	16 名
計	15 名	15 名	30 名

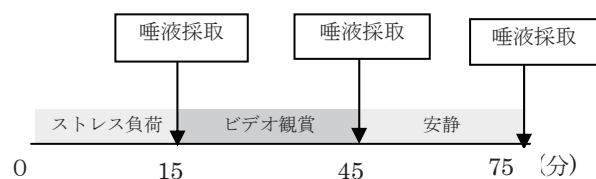


図 1 唾液採取のタイムスケジュール

\*1 大阪歯科大学薬理学講座

\*2 福井県立大学看護福祉学部社会福祉学科

\*3 福井県健康福祉部障害福祉課

\*4 福井県精神保健福祉センター

\*5 福井県健康福祉部健康増進課



### 3. 結果および考察

#### 3. 1 福井県民のストレスと笑いの実態調査

##### 3. 1. 1 ストレスの実態

全体の67.6%がストレスを「よく感じた」または「ときどき感じた」の回答が得られた。これらの人(以下、「ストレス感がある人」という。)がストレスの原因と思うものは、多い順に「仕事のこと」、「仕事上の人間関係」、「家族との人間関係」であった。

また、「過剰ストレスあり」と判定された人は全体の68.3%であった。

福井県におけるストレスに関する同様の調査として、福井県民健康・栄養調査があり、この調査の平成16年の結果(64.3%)、平成18年の結果(66.6%)と比較すると、今回の調査結果(67.6%)の方が「ストレス感」を訴える人の割合が高かった。回答者の属性(性別、年代、職業、地域など)や設問設定等を考慮する必要はあるが、社会情勢の変化の中でストレスを感じている県民が増加している可能性も否定できない。(図2)

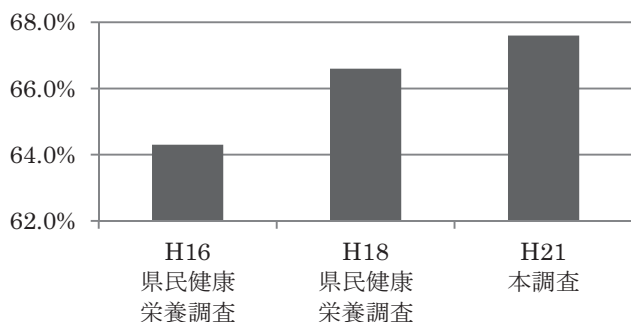


図2 類似調査との比較

##### 3. 1. 2 笑いの実態

全体では、1日に1回程度以上大笑いする人は約半数、1日に1回程度以上笑顔になる人は約8割であった。性別では女性が、また年代別では若い年代で笑う頻度が高かった(図3)。

また、笑いとストレス感または過剰ストレスとの関係を調べたところ、笑いの頻度が多い人ほど「ストレス感がある人」や「過剰ストレスあり」の人の割合が低下した(表2)。

選択肢として示した「笑顔になった要因」のうち、「あてはまる」と答えた人の多かったのは、男性では、「友人との会話(直接会う)」、「テレビ」、「家族団らん」、女性では、「友人との会話(直接会う)」、「家族団らん」、「テレビ」であった(図4)。

男女比較すると、女性の方が笑顔になる要因数は多く、男性では、年齢が高くなるにつれて、笑顔の要因数が減少する傾向が見られた。

■ 男性 ■ 女性

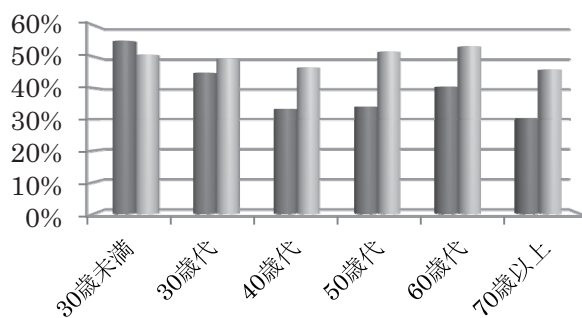


図3 ここ2週間の大笑い(頻度が1日1回以上)の人の性別年齢別割合

表2 笑いの頻度とストレスとの関係

笑いの頻度	ストレス感がある人の割合	過剰ストレスがある人の割合
笑顔がほとんどない人 (50人)	80.0%	84.0%
笑顔が2週に1回程度の人 (53人)	71.7%	75.5%
笑顔が1日1回程度以上の人 (1,441人)	66.0%	65.9%
大笑いが1日1回程度以上の人(867人)	61.6%	60.8%

■ 男性 ■ 女性

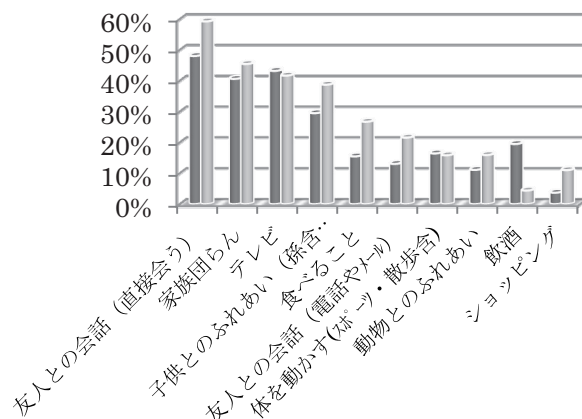


図4 笑顔になった理由

##### 3. 1. 3 ストレスと笑いの関係

それぞれのストレス解消方法が笑顔の要因にもなっているかどうかをみるために、ストレス解消方法の実施割合と、笑顔になった要因の回答率の単純相関をみたところ、過剰ストレスの有無には関わらず、正の相関を示した(図5,6)。

また、同一人物におけるストレス解消方法と笑顔の要因の項目別一致率をみたところ、34項目中、「その他」を除いた16項目で過剰ストレスなしの人の方が一致率は高く、多い方から順に10項目中「家族団らん」「体を動かす(スポーツ・散歩含む)」が有意に高かった(図7)。

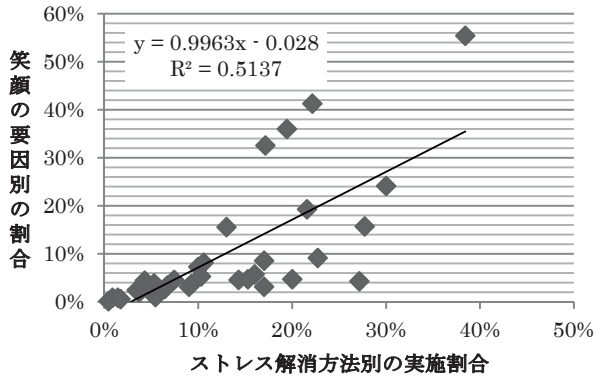


図5 ストレス解消方法と笑顔の要因の相関図 (過剰ストレスあり)

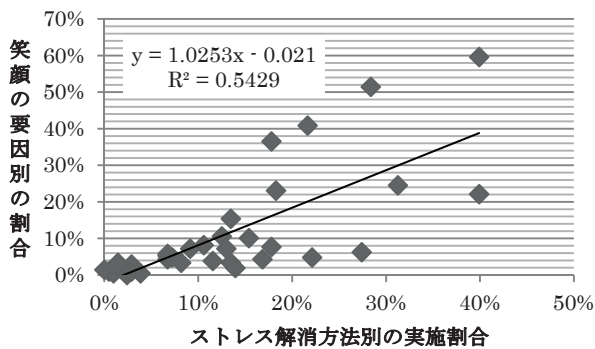


図6 ストレス解消方法と笑顔の要因の相関図 (過剰ストレスなし)

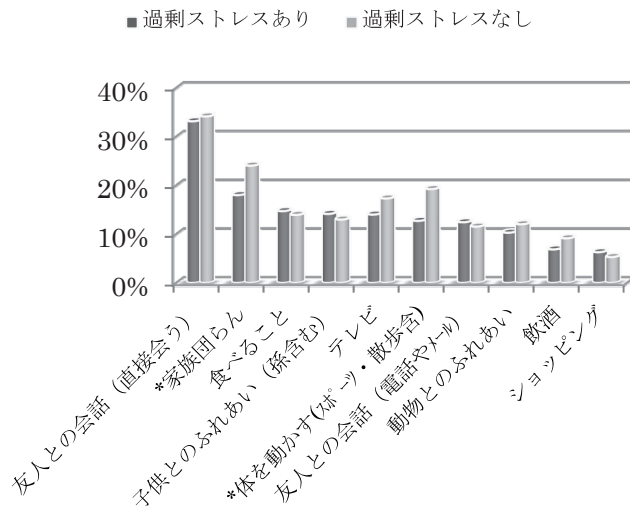


図7 ストレス解消法と笑顔の要因の項目別一致率

### 3. 2 笑いによるストレス軽減効果の科学的検証

#### 3. 2. 1 唾液中CgA濃度の変化

ストレスが笑いによって軽減されることを、科学的に検証するため、新しい分泌学的ストレスマーカーとして注目されている唾液中 CgA を用いて調査を試みた。

ストレス負荷時の唾液中CgA濃度の値を100とし、そ

れに対する比率の変化を観察したところ、「笑い」ビデオ観賞後、男性においてのみ唾液中CgA濃度レベルの有意な低下が認められた(図8)。男性グループで有意なレベル低下が見られた理由として、日常のストレス対処手段としてテレビやビデオ観賞を挙げた者の割合は男性(0%)より、女性(62.5%)の方が多かった(p<0.05)。

また、今回の調査から、「笑い」ビデオの観賞は、ストレス軽減を目的とする場合には特に男性において有効であると示唆された。一方女性ではその効果は個人差が大きく、笑いのビデオの嗜好が男性よりも多様であることが考えられ、軽減効果のある媒体を探ることが課題として残った。

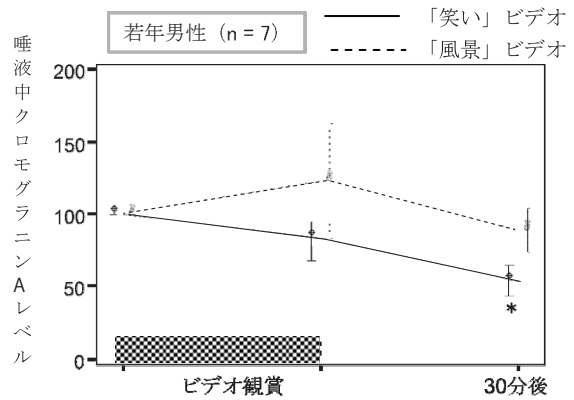


図8-1 唾液中CgA濃度レベルの変化(若年男性)

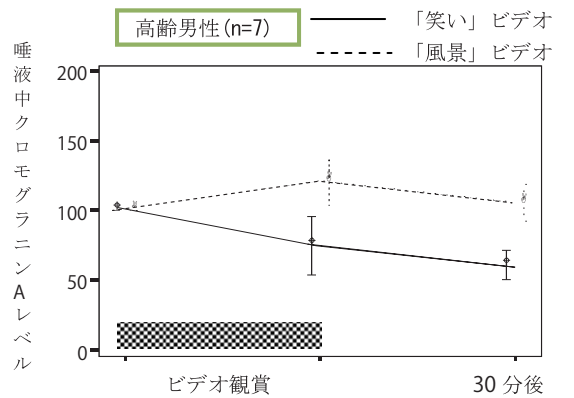


図8-2 唾液中CgA濃度レベルの変化(高齢男性)

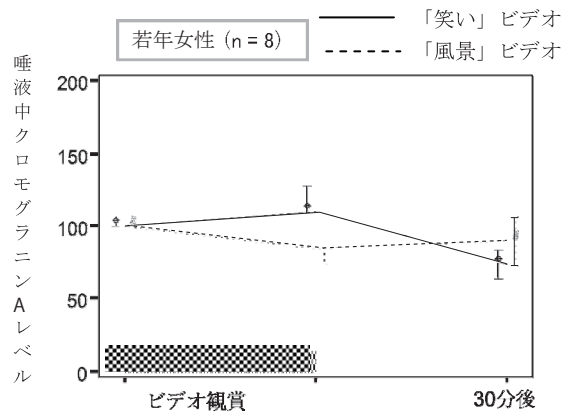


図8-3 唾液中CgA濃度レベルの変化(若年女性)

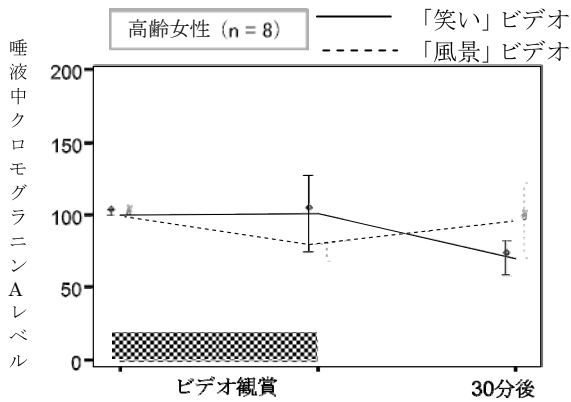


図8-4 唾液中CgA濃度レベルの変化(高齢女性)

#### 4. まとめ

本研究では、年々ストレスを感じる県民が増加傾向であり、性別や年代ではその内容も異なっており、ライフサイクルに応じたストレス対策の重要性がうかがえた。

一方で、「笑い」の頻度が多い人のほうがストレス感が少なく、過剰ストレス状態も回避できており、福井県民の笑いによるストレス軽減効果については、実態調査や科学的検証からも証明された。

特に、ストレスを自覚しにくく、笑う機会も少ないという実態であった男性や高齢において、「笑い」によるストレス軽減は有効であることが実証された。

したがって、ストレスチェックなどでストレスを自覚することは重要であり、とりわけ、日常的にストレスという概念に慣れ親しんでいない、あるいはストレスを自覚することに心理的抵抗が大きい男性や高齢に対してストレスや笑いに関する情報の普及を図ることは日常のストレス

を対処することに効果的であると考えられる。

#### 謝辞

本研究を実施するにあたり、アンケート調査の実施に御協力をいただきました福井県精神保健福祉センター、各健康福祉センター、また唾液採取に御協力いただきました坂井市丸岡町城町壮年会および婦人会の皆様、福井大学医学部、福井県立大学看護福祉学部および経済学部の学生の皆様に深く感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) 市川宏枝他,福井県民のストレスと笑いの実態調査,福井県衛生環境研究センター年報,第8巻,48-57(2009)
- 2) ストレス対策事業精度管理委員会,福井県自殺・ストレス防止対策事業報告書,福井県精神保健福祉センター(2009)
- 3) Home Care,米国home healthcare Nurse誌,Vol.3,第11号(2002)
- 4) 本橋豊他,市町村における自殺予防のための心の健康づくり行動計画策定ガイド,秋田大学医学部社会環境医学講座健康増進医学分野(公衆衛生学)(2003)
- 5) 大阪府,大阪発笑いのススメ～意外と知らない笑いの効用～,大阪府生活文化部・スポーツ振興室文化課(2006)
- 6) 福井県,福井県民の健康・栄養の現状～平成18年度県民健康・栄養調査～,福井県健康福祉部(2006)
- 7) 福井県立大学健康長寿研究総括班 編,「なぜか健康長寿」を考えるー「こころ・からだ・しゃかい」の視点からー福井県立大学(2009)