

北九州市洞海湾における水質汚濁の推移と生物相の変遷

○江藤優子・梶原葉子・松岡靖史・佐藤健司  
(北九州市環境科学研究所)

1. はじめに

北九州市のほぼ中央部に位置する洞海湾は全長約13km、湾幅0.5～1.3kmの細長い形をした小規模な閉鎖的内湾で、周囲には鉄鋼業をはじめとする重化学工場が数多く立地している。

かつて激甚な産業公害により水質汚濁が進み、昭和40年代前半には魚もすめない「死の海」と称されたが、規制強化や公共下水道の整備、汚泥の浚渫などさまざまな対策により水質は大きく改善し、平成元年から5年度にかけて実施した「洞海湾総合調査」では、魚類や底生動物、付着動物、海藻など多くの生物の生息が確認された。

当時の洞海湾は未だ富栄養化が著しい状況であったが、平成9年の環境基準の類型指定(第Ⅳ類型)により窒素・リン濃度は大幅に低減し、水生生物の生息状況の変化が推測されたことから、平成22年度から24年度にかけて付着動物調査を行い、富栄養化が解消する前後の組成変化を調査した。付着動物は一生の多くを岩や岸壁などに固着して生活するため、泳ぎ回る魚などに比べると水質の変化を反映しやすく、湾内の水質環境を知る上で重要な生物といえる。さらに、優占種の変化については水質の変化以外の影響も考えられるため、平成26年から目視による追跡調査を実施し、季節変化に伴う優占種の消長を調査した。

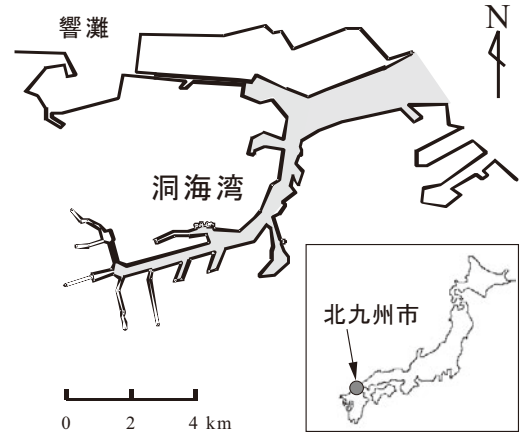


図1 北九州市洞海湾

2. 調査方法と結果

付着動物組成について、湾内5地点を調査地点とし、季節ごとに計4回、30cm方形区内の付着動物の同定、個体数及び湿重量の計測、並びに水質について調査を行った。

その結果、水質については、特にDO、T-N、T-Pが改善し、夏季の貧酸素状態は確認されなかった。付着動物については、湾全域の圧倒的な優占種であったムラサキイガイやマガキ、コウロエンカワヒバリガイは激減したものの、出現種数は74種から118種へ増加するとともに、ホヤやコケムシ、カイメン、フジツボなど多様な生物が湾全体に分布するようになった。また、湾口を除く4地点で出現量(湿重量)は1/5から1/10程度に減少した。

優占種の消長について、湾内2地点を調査地点とし、概ね月1回、30cm方形区内の付着動物の同定及び被度を調査した。その結果、マガキは春から夏にかけて成長したが、その後多くは死滅し、ムラサキイガイは期間を通じて確認することが出来ず、組成調査の結果と同様衰退傾向にあることが確認された。コウロエンカワヒバリガイは8月頃から稚貝が出現した。

3. まとめ

かつて「死の海」と称された洞海湾は、様々な対策により水質が大きく改善し、水生生物の回復、さらには付着動物の多様化といった生物相の変遷が確認されることとなった。

平成26年の夏季は例年と異なり多雨・低気温であったことから、今後も優占種の消長調査を継続することとした。

付着動物組成の調査(平成22-24年度)については、三井物産環境基金の研究助成を受けて実施しました。

## 北九州市洞海湾における水質の改善と付着動物組成の変化

○梶原葉子・村田達海・江藤優子(北九州市環境科学研究所)  
寺師朗子(同上下水道局)、山田真知子(福岡女子大学)

## 【目的】

北九州市の洞海湾はかつて深刻な水質汚濁により、1960年代には「死の海」と称されたが、その後の水質浄化対策により水質が改善された。1989～1992年には洞海湾総合調査を実施し、多くの生物が復帰していることを確認したが、当時は依然として富栄養化が著しい状態だった。しかし、1997年に「窒素・リンに係る環境基準(第Ⅳ類型)」が設定され、流入負荷削減の努力がされた結果、窒素・リンの濃度は急速に低下し、2001年には環境基準が達成された。この環境基準達成前後において付着動物調査を行い、水質変化に伴う付着動物組成の変化について若干の知見を得たので報告する。

## 【方法】

調査は、環境基準達成前後の1991年～1992年と2010年～2011年の両期間において、それぞれの四季に1回ずつ行った。調査地点は湾内に5地点を設定し、採集深度は1地点について潮間帯(潮位+20～+50cm)、潮下帯(潮位-50cm～-80cm)、海底付近(海底から120～150cm)の3層とした。これらの調査地点で水温、塩分、透明度、溶存酸素量、浮遊物質、化学的酸素要求量、全窒素、全リン、クロロフィル $a$ などの水質を調査した。付着動物は枠取り法(30cm×30cm)で採取したものを、種ごとに個体数と湿重量を計測した。

## 【結果】

水質の変化は、湾内全域において水温の上昇、溶存酸素の大幅な増加、全窒素、全リンの大幅な低下が認められた。

付着動物の全季節の総種類数は、表1に示すように、74種から118種と約1.5倍に増加した。両期間ともに総種類数の半分以上は多板類、腹足類、二枚貝類の貝類が占めており、中でも腹足類が19種から52種と増加が顕著であった。地点別に見ると総種類数は湾口部で多く、湾内では少ない傾向であったが、全地点ともに種類数が増加した。種類別に見ると腹足類は基準適合前には出現が湾口部に限定され、湾中央から湾奥の3地点に出現した種は移入種のシマメノウフネガイ1種のみであったが、基準適合後はムギガイなど17種に増加した。また、湾口部のみに認められた海綿類と出現地点が限定されていた苔虫類が、全地点に出現するなど分布が広がった。腕足類は基準適合後の調査で初めて確認された。

一方、優占種であったムラサキガイ、コウロエンカワヒバリガイ、マガキの出現量が激減し、付着動物の総湿重量は約1/5に減少した。

以上のように洞海湾の付着動物はこの20年間の水質改善に伴い、優占種の激減により総湿重量は減少したものの、湾奥まで多くの種が生息するようになり、種多様性が増大した。

表1 付着動物総種類数

動物名	1991-1992年	2010-2011年
海綿類	1	2
腕足類	0	2
苔虫類	4	6
多板類	3	2
腹足類	19	52
二枚貝類	25	28
フジツボ類	7	8
ホヤ類	15	18
合計	74	118

※本研究の2010年～2011年の調査は三井物産環境基金より研究助成を受けて実施したものです。

小型固相を用いた農作物中残留農薬試験法の妥当性評価結果について

○長井直子、陣矢大助、石橋正博、世戸伸一、田邊明  
(北九州市環境科学研究所)

[目的]

食品中残留農薬のうちGC/MS対象項目の試験法について、近年広く用いられている小型固相を採用した試験法を検討して妥当性評価を行い、良好な結果が得られたので報告する。

[方法]

1) 試薬及び機材 関東化学製の6種の農薬混合標準液(31、48、51、61、63及び1471番)を混合し、298項目含有の1 $\mu$ g/mLアセトン混合溶液を調製した。なお本検討ではこのうち高極性農薬等34項目を除く264項目を対象とした。抽出及び精製固相はAiSTI Science社 C18-50及びPSA-30、日本Waters社OASYS HLB 3cc(60mg)を用いた。測定機器はAgilent 7890A GC/7000 Triple Quad MS(AiSTI Science社大容量注入装置LVI-S200、Agilent社カラムDB-5MS+DG [30m、内径0.25mm、膜厚0.25 $\mu$ m])を用いた。

2) 試験法 通知一斉試験法の抽出法と小型固相による精製/抽出法<sup>1)</sup>を組合せた埼玉県の試験法<sup>2)</sup>を元に、当所で固相種類や抽出pH等を変更した方法を用いた(図1)。得られた試料液は、検量線用標準液(0.2、0.5、1、2、5ppb)とともにMRMモードで測定し、内標準法で定量した。

3) 妥当性評価 厚生労働省の妥当性評価ガイドラインに従い、添加回収試験を2名 $\times$ 3日もしくは3名 $\times$ 2日の枝分れ試験で実施した。予備試験で対象農薬が含まれないことを確認した17種の試料作物(玄米、ホウレンソウ、ブロッコリー、ダイコン、ネギ、キャベツ、タマネギ、バレイショ、カボチャ、ピーマン、ニンジン、ナス、トマト、キュウリ、リンゴ、オレンジ及びキウイ)に、農薬類を0.01ppm相当添加して分析した。

[結果]

1) 真度 目標値(70~120%)を満足した項目数は、190項目(ネギ)~253項目(ホウレンソウ)、平均231項目であった。図2に目標値を満足しなかった項目数を示す。各作物とも回収率が70%を下回った項目が一定数(6~35)あったが、玄米、ネギ及びキュウリについては、120%を超過する項目数(それぞれ49、65及び39項目)が他の作物(平均7.5項目)と比べて多かった。

2) 併行精度及び室内精度 各目標値を満足した項目数は、併行精度:251項目(ピーマン)~264項目(ホウレンソウ)、平均260項目、室内精度:233項目(玄米)~263項目(ダイコン)、平均254項目であった。図3に各精度評価の目標値を満足しなかった項目数を示す。これらは、大半が真度評価を満足しなかった項目であった。しかしジオキサチオンやトリアゾホス等のよ

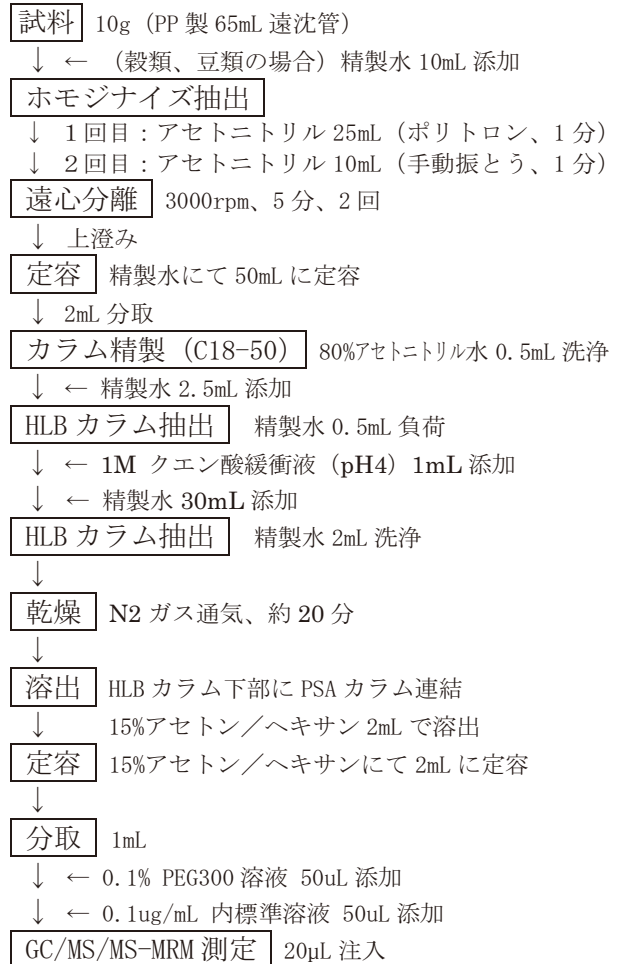


図1 分析フロー

うに、大半の作物で真度/精度評価を満足したものの、リンゴの室内精度評価のみ満足しない等の例もみられた。

3) 総合評価 真度、併行及び室内精度の全評価を満足した項目数は、189項目(ネギ)~251項目(ホウレンソウ)、平均228項目であった。

[考察]

真度の評価結果(図2)にあるように、玄米、ネギ及びキュウリを除き、マトリックス効果による定量値(回収率)の顕著な過大評価はみられなかった。この理由として、ア)本法の精製工程がC18及びPSAカラムによる精製に加えHLBカラムによる対象農薬の抽出を含むため精製効果が高いこと、イ)試料液及び検量線用標準液に添加した擬似マトリックス(PEG)の効果、が挙げ

られる。ア)に関して通知試験法と本法とで同量のキュウリを処理し、スキャン測定で比較したところ、本法の全イオンクロマトグラム (TIC) 上では夾雑成分のピークが少ないことが確認できた。

[まとめ]

小型固相を用いた残留農薬試験法を検討し、17作物について妥当性評価を行い、良好な結果を得た。ただし玄米やネギ等については、精製工程を改善する余地があると思われる。また玄米やブロッコリー等、作物によっては日間/作業間でバラつきが大きくなる例があるため、注意が必要と思われる。

[参考文献]

- 1) 残留農薬一斉分析 (STQ-GC-B法)、アイステイサイエンス社、<http://www.aisti.co.jp/assay/stq-gc-b/>
- 2) 石井他、埼玉県衛生研究所、第46回全国衛生化学技術協議会年会講演集、p.66.

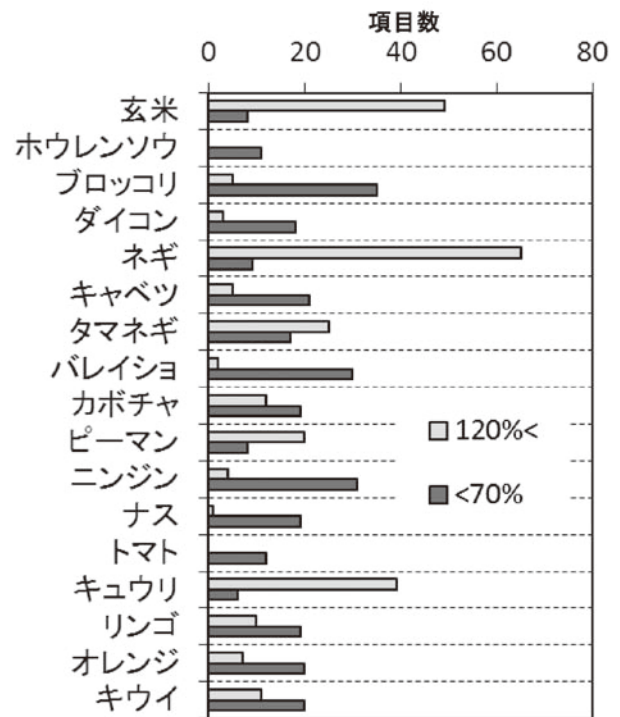


図2 真度の目標値を満足しなかった項目数 (対象264項目)

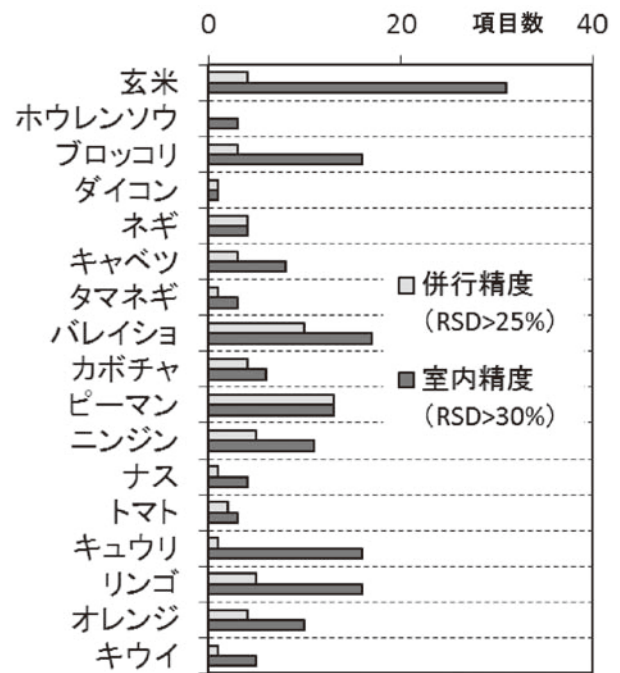


図3 併行及び室内精度の目標値を満足しなかった項目数(対象264項目)

腸管出血性大腸菌の異同判別スクリーニング法の検討

北九州市環境科学研究所 藤田景清 中村悦子 徳崎里美 齊藤寛

1 はじめに

本市では毎年20件程度の腸管出血性大腸菌感染症が発生している。平成26年は7月から継続して患者が例年以上に発生し何らかの共通した感染原因が考えられた。本感染症は感染症法で3類に指定されベロ毒素が確認された場合、医療機関からの届出が必要となっている。本市では届出後、感染原因を追究し感染拡大を防止する目的で保健所の疫学調査と本研究所周の菌株遺伝子型別検査と菌株性状検査を実施している。現在、遺伝子型別検査法は、ISプリンティング法(以下IS-P法)、パルスフィールドゲル電気泳動法(以下PFGE法)およびMultiple-locus variable-number tandem repeat analysis(以下MLVA法)が広く用いられているが、IS-P法は他2法に比較し精度が若干劣るものの短時間で結果を得られる利点があり、最近多くの事例報告がされている。また、PFGE法は多くの菌種で遺伝子解析が活用されデータベースが豊富であるが、解析結果までに5日間程度必要であり疫学調査への迅速な結果回答が困難な点を指摘されている。MLVA法は昨年度から国立感染症研究所で遺伝子解析に活用された方法で、PFGE法に精度的にも劣らず迅速性にも優れていることから今後の遺伝子解析法の主流と考えられているが、本研究所周での導入には至っていない。上記3法および菌株性状の一つである薬剤耐性型を含めて菌株の異同判別能を比較した報告は少ない。今回、平成26年に市内で発生した集団散発事例の分離菌株性状や遺伝子型別検査を実施したところ、腸管出血性大腸菌(以下EHEC)O157はIS-P型別と薬剤耐性型別の併用法により分離菌株の迅速な異同判別に効果を認めたので報告する。

2 市内の腸管出血性大腸菌感染症の発生状況

市内の本感染症の発生は平成23年28件、平成24年19件、平成25年20件、平成26年46件(表1)であった。図1に平成25年と26年の月別発生状況を示した。例年に比較し今年(26年)は7月中旬から8月中旬の発生が非常に多くなっている。市内で分離された菌株は、ベロトキシン型及びO血清型の判明後、本研究所周に搬入される。搬入菌株は性状の再確認検査のほか、H血清型、薬剤耐性型およびIS-P型を確認している。薬剤耐性型およびIS-P型は菌株搬入の翌日までに判明するが、H血清型は運動性増強のため通常4日間程度判明には必要である。今回EHEC46菌株中O157では39菌株中5株、O145では2菌株ともH血清型が不明となった。菌株の迅速な異同判別にはH血清型は適当ではないと考えられた。

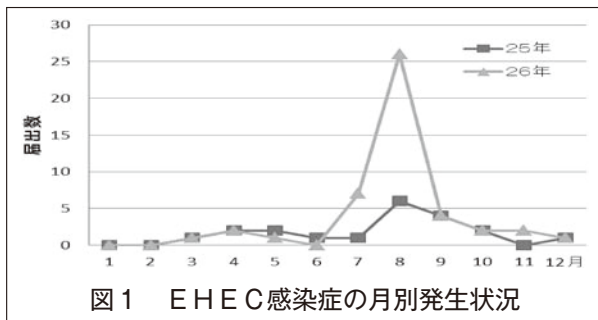


表1 分離菌株の内訳

血清型	ベロ毒素型別	男/女	年齢	有症者数
O157:H7	26 (VT1+2)	11/23	10未満~90代	31
	8 (VT2)			
O157:H-	5 (VT1+2)	1/4	10未満~20代	4
O26:H11	5 (VT1)	2/3	10未満~30代	4
O145:H-	2 (VT2)	0/2	20~70代	2

3 遺伝子型別による異同判別法および結果

7/15~8/9に散発事例が継続して発生したEHEC O157:H7 (VT1+2産生)15菌株のIS-P法、PFGE法(制限酵素Xba IおよびBln I)を定法に従い実施した。MLVA法は国立感染症研究所で解析した菌株の結果を併せて表2に示した。本市で分離した菌株のうち、IS-P型がIV・IV a型の2菌株はIS-P型が関東広域で分離した菌株と同一および類似型であったが、MLVA型は異なっていた。このIS-P IVおよびIV a型の2菌株はPFGE法でも違う遺伝子型として異同判別できた。また、昨年発生した1事例EHEC O157:H- (近隣自治体の焼き肉店による食中毒事例)のIS-P型は、今夏に流行したI型と同一型であったが、PFGE型およびMLVA型は今夏の流行型とは異なっていた。この2事例よりIS-P法の異同判別能はPFGE法やMLVA法に比較して若干劣ると推測できた。

表2 分離菌株の遺伝子解析状況

株数	図2.3番号	IS-P型	PFGE(Xba I)型	PFGE(Bln I)型	MLVA型
10	1~10	I (散発)	A	a	14c021,14c021a

2	11~12	II (散発)	B	b	14m0185
1	13	III (散発)	C	a	14c081
1	14	IV (散発・関東同一型)	D	c	14c025a (関東事例とは異なる)
1	15	IV a (散発・関東類似型)	E	d	14m0188 (関東事例とは異なる)

#### 4 薬剤耐性型別による異同判別法および結果

薬剤耐性型は12薬剤 (ABPC, CTX, GM, KM, SM, TC, CPF, CP, NA, SXT, NFLX, FOM) のセンシディスクを用いKB法で実施した。結果を図2に示した。IS-P I型の10菌株は薬剤耐性型もすべて同一の型を示した。また、IS-P II型の2菌株も薬剤耐性型は同一の型を示した。一方、IS-P IV型および類似型IV a型の2菌株は薬剤耐性型で12薬剤のうち5薬剤に違いを認めた。前述の昨年発生1事例O157:H-菌株のIS-P I型はAMPに対する薬剤耐性が今夏の流行型とは異なった。

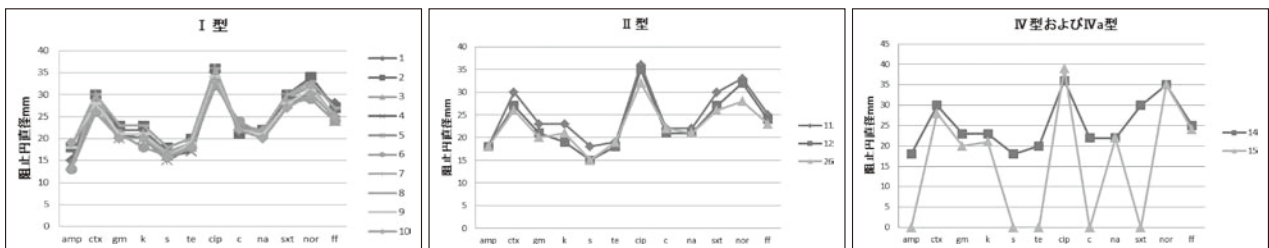


図2 15菌株のIS-P型別ごとの薬剤耐性型

#### 5 他24菌株のIS-P型と薬剤耐性型(図3参照)

平成26年に発生したO157:H7について、前述した散発事例分離菌株以外の19菌株およびO157:H-の5菌株についてIS-P型と薬剤耐性型を実施した。IS-P I型9菌株およびI a型 (I類似型) 1菌株の薬剤耐性型は前述の散発事例I型10菌株と同一の型を示した。IS-P II型1菌株も前述の散発事例II型2菌株と薬剤耐性型は同一の型を示した。O157:H7 (VT2産生) のIS-P V型8菌株は高齢者施設の集団発生事例より分離した5菌株および同一家族内感染3菌株であるが、すべて薬剤耐性型は同一の型を示した。また、O157:H- (VT1+2産生) のIS-P VI型3菌株は分離時期および居住区も異なる散発事例であるが、薬剤耐性型は同一の型を示した。O157:H-の残り2菌株はIS-P VII型1株、VIII型1株で他に同一の遺伝子型はなかった。また、IS-P VIII型は薬剤耐性型でも他の38菌株と異なりC (クロラムフェニコール) にのみ耐性を示した。このスクリーニング法によりI・I a事例、II事例以外にもV事例 (集団・2グループ8人) とVI事例 (散発・3人) でそれぞれ何らかの共通した感染原因が推測され、より精度の高い遺伝子型別による異同判別に進む必要があると考えられた。

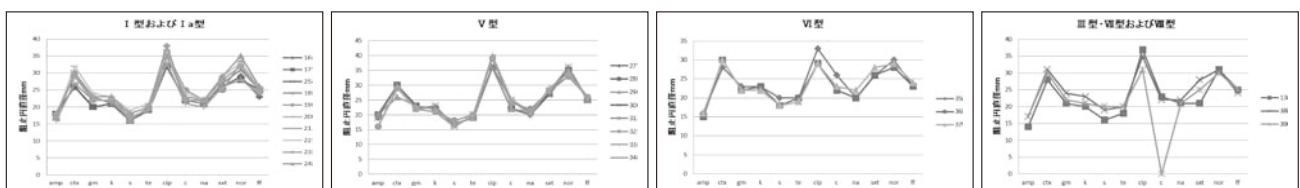


図3 他24菌株のIS-P型別ごとの薬剤耐性型

#### 6 まとめ及び考察

平成26年夏から秋の継続した腸管出血性大腸菌感染症の発生数は例年以上に多く、遺伝子型別検査を実施した結果、同一の遺伝子型が認められ、共通の感染原因が示唆された。遺伝子型別検査ではIS-P法が菌株搬入当日に異同を回答でき、疫学調査の初動に効果を認めた。本法は今回の事例のうちIS-P I型・I a型およびII型では、より異同判別精度の高いPFGE法やMLVA法と一致した結果となった。一方、関東広域発生事例と同一IS-P型および類似IS-P型の2事例はMLVA法およびPFGE法では異なる遺伝子型になった。このことは市内という限局した地域に短期間で起こった感染事例にはIS-P法は効果を認めるものの、一概に本法のみで異同を判別する危険性も示唆された。そこで併せて薬剤耐性型の異同も含めて総合判断した結果、異同判別能の向上につながった。本2法を併せたスクリーニング法は迅速性に優れ、保健所の疫学調査に有効に還元できると思われる。今後さらに事例数を増やし異同判別の検討を行いたい。