

東日本大震災被災地における汚泥（ヘドロ）の分析結果に基づく 被災地特有呼吸器疾患の診断と予防対策

東北大学環境・安全推進センター / 同大学院医学系研究科産業医学分野
助教 色川 俊也

(共同研究者)

東北大学環境・安全推進センター / 同大学院医学系研究科産業医学分野
准教授 小川 浩正

東北大学環境保全センター 助手 進藤 拓

東北大学環境保全センター 助手 中村 修

石巻赤十字病院呼吸器科 部長 矢内 勝

東北大学環境・安全推進センター / 同大学院医学系研究科産業医学分野
教授 黒澤 一

はじめに

2011年3月11日の東日本大震災で大津波に襲われた東北沿岸地域では、津波が去った後に残されたヘドロが、環境や人体にいかなる影響を及ぼすかが問題となった。実際に、被災後の後片付けでヘドロの処理をした住人が咳などの呼吸器症状を訴えるケースや、ヘドロの付着したがれきが積み重ねられたがれき置き場の近隣で生活する高校生や住民が頭痛、倦怠感、咳、眼や喉の刺激症状を訴えるケースが認められた。ヘドロは、長い年月をかけて海底に蓄積された堆積物であり生活排水や工業排水に含まれる様々な無機・有機物質や微生物が混入していると推測される。その中には、有害な化学物質や病原性をもった微生物が含まれている可能性も否定できない。震災後、各省庁が被災地のアスベストを中心とした粉塵や、土壌の汚染物質調査を行い、結果が公表されているが、細菌学的環境評価はなされていなかった。今回我々は、ヘドロを被ったがれきが集積したがれき置き場の土壌や、居住地域周辺の津波被災地区の土壌や水を採取し、理化学的及び細菌学的環境評価を行い、被災地住民や復旧作業従事者における呼吸器疾患誘発要因の評価を行った。

目 的

津波被災地域のヘドロ混入土（水）を採取し、理化学的分析、クローンライブラリー法による網羅的細菌叢解析、培養検査を行い被災地における呼吸器疾患発症のリスクを予測し予防の一助とする。

方 法

2012年1月、石巻地区のがれき置き場他（計8ヶ所）の土壌・水を採取し、理化学検査並びにクローンライブラリー法による網羅的細菌叢解析（蛍光染色による全菌数計測、PCR法による菌種の同定、培養検査）、培養検査を実施した。



1. 雲雀野町がれき処理場：土壌
2. 川口町がれき処理場：土壌
3. 市立女子商がれき処理場：土壌
4. 女川マリンパル前：土壌
5. 新沼：ヘドロ混入田の土
6. 県立商業高がれき処理場：土壌
- W1. 市立病院前貯池：水
- W2. ポンプ汲み出し場：水

採取標本は、各々 i) 理化学検査、ii) 蛍光染色による全菌数計測、iii) 培養検査、iv) 遺伝子工学的的手法による細菌叢解析を実施した。

i) 理化学試験：環境庁告示第13号で定める、産業廃棄物の検定に基づいて実施した。

検査内容は土壌汚染対策措置法に基づく土壌調査方法に準じ、イオン成分はイオンクロマトグラフで、金属成分は試験溶液を塩酸や硝酸で分解して、ICP-AESで分析した。

ii) 蛍光染色法による全菌数計測：下記iii) 遺伝子工学的解析のための溶菌処理前後に、菌数を蛍光染色法で計測した。試料の10倍希釈液1mlをEtBr水溶液（100 μg/l）で染色し、落射型蛍光顕微鏡Olympus BX50（オリンパス社）で検鏡した。1サンプルにつき50視野で細菌様の形状の物を計数し、土壌1g中の菌数を算出した。

菌体破壊率：DNA抽出前後のサンプル中の菌数を上記の蛍光染色法で計測し、以下の計算式で菌体破壊率を求めた。 $[100 - (\text{DNA抽出操作後の菌数} / \text{DNA抽出操作前の菌数} \times 100)]\%$ 。溶菌効率が80%以上のものを遺伝子工学的解析に用いた。

好気培養法（環境細菌用培地）：試料の10倍希釈系列を、環境微生物用の標準寒天培地（Yeast extract ; 0.5 g/l、Peptone ; 1.0 g/l、Glucose ; 0.2 g/l、Agar ; 15 g/l）2枚ずつに接種した後、30℃、6日間培養後に菌数を測定した。

iii) 培養検査：病原性を示す下痢原因菌（サルモネラ、シゲラ、大腸菌）（SSB培地）、コレラ菌（TCBS培地）とレジネラ属菌（WYO培地、血液寒天培地）について培養法とグラム染色法で検査した。コレラ菌類似のコロニーについては、血清型（01, 0139）、コレラ毒素産生性（PCR）を検査した。

iv) 遺伝子工学的的手法による細菌叢解析

DNAの抽出および精製：サンプルを溶菌処理後、DNAの抽出精製を行い、PCRの鋳型に用いた。

細菌叢解析：抽出したDNAを鋳型にし、ユニバーサルプライマーを用いて16S rDNAをターゲットにしたPCRを行った。得られたPCR産物（約580bp）のTOPO-TAクローニングキット（In Vitrogen）を用いて大腸菌K12にクローニングし、Applied Biosystems 3130xl ジェネティ

ックアナライザー（アプライドバイオシステムズ社）で塩基配列を決定した。

細菌の基準株の16S rDNA（5,878件）データベースに対する相同性検索（BLAST）を行った。BLAST検索の条件は、Overlap lengthが450bp以上でmatching %が80%以上の相同性が得られた配列は既知の菌種との類似性を認め、この条件を満たさない配列についてはUnclassifiedとした。

結 果

i) 理化学検査：pH では、土壌標本no1～no6はアルカリ性であった（一般的ながれきの傾向はアルカリ）。また、ヘドロをかぶったがれきが多いno3では、ヘドロに含まれていたと推測されるカドミウムやマンガン、亜鉛が高かった。硫酸イオン濃度は、no2, no3, no6とno1Wno2Wで高かった。no2, no3, no6は塩化物イオン濃度が高値であり、がれきが海水を浴びていることが示唆された。（表1）

ii) 全菌数：土壌は $10^7 \sim 10^9$ / g、水は $10^5 \sim 10^6$ / gであった。通常の土壌や水とほぼ同

(表1)採取標本（土壌、水）の生化学的分析結果

		no 1	no 2	no 3	no 4	no 5	no 6	no 1 W	no 2 W
項目	単位	雲雀野町がれき	川口町がれき	市女子商がれき	女川マリンパル	新沼、田土	県商高がれき	市立病院前	万石浦ポンプ
pH		8.3	8.2	7.7	7.9	7.9	10.6	7.3	7.1
電気伝導率	(mS/m)	0.1	1.2	2.4	1.8	0.1	1	10.7	29.4
有機体炭素	(mg/l)	6	12	36	11	7	22	2	4
Cd	(mg/l)	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.003	0.003	<0.001	<0.001
Pb	(mg/l)	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Fe	(mg/l)	0.113	<0.005	<0.005	0.023	0.143	<0.005	0.098	0.114
Mn	(mg/l)	<0.005	<0.005	0.057	<0.005	<0.005	<0.005	0.009	0.022
Cu	(mg/l)	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Zn	(mg/l)	<0.005	<0.005	0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
SO ₄ ²⁻	(mg/l)	3	347	1169	94	1	247	536	1373
PO ₄ ³⁻	(mg/l)	0.6	N. D	N. D	N. D	N. D	N. D	N. D	0.1
Cl ⁻	(mg/l)	1	164	112	693	1	125	389	14250

程度からむしろ少なめで、冬期に採取した影響も示唆されたが、特に異常増殖はないと考えられた。また、全菌数と好気培養法を比べると、全体に好气的環境にあることがわかった。（表2）

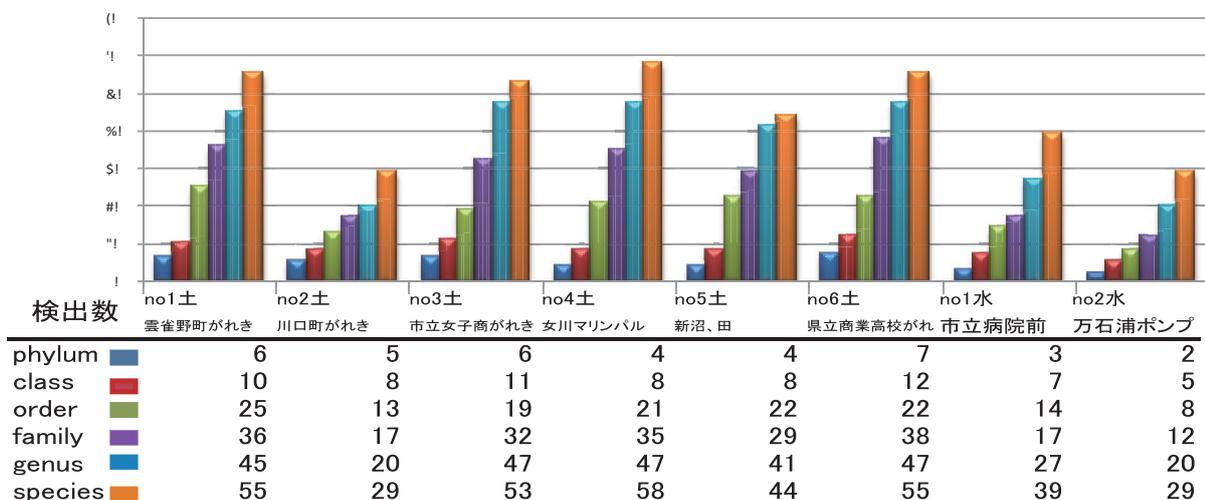
iii) 培養検査：下痢原性の代表的な病原菌（サルモネラ属菌、シゲラ属菌、病原性大腸菌）、ビブリオ属、レジオネラ属検出培地で培養検査を行ったが、特に病原菌は検出できなかった。

(表2) 採取標本の全菌数・好気培養・菌体破壊率の結果

	蛍光染色法(全菌数) (cell/g)	好気培養法 (cfu/g)	菌体破壊率 (%)
雲雀野町がれき (no1)	$3.5(\pm 0.4) \times 10^8$	$9.5(\pm 0.5) \times 10^5$	86.4(±2.1)
川口町がれき (no2)	$2.6(\pm 0.3) \times 10^9$	$4.6(\pm 0.3) \times 10^9$	89.4(±0.6)
市立女子商高がれき (no3)	$4.4(\pm 0.8) \times 10^8$	$1.2(\pm 0.05) \times 10^8$	86.9(±8.5)
女川マリンパル土壤 (no4)	$1.8(\pm 0.0) \times 10^8$	$2.3(\pm 0.5) \times 10^8$	79.9(±2.4)
新沼、田土 (no5)	$7.3(\pm 1.3) \times 10^7$	$2.5(\pm 1.5) \times 10^5$	85.0(±0.5)
県立商業高がれき (no6)	$8.3(\pm 0.0) \times 10^8$	$2.0(\pm 0.7) \times 10^8$	91.2(±1.0)
市立病院前水 (no1W)	$2.0(\pm 0.2) \times 10^5$	$1.4(\pm 0.05) \times 10^5$	99.9(±0.0)
万石浦ポンプ場水 (no2W)	$6.7(\pm 1.2) \times 10^6$	$1.8(\pm 0.1) \times 10^5$	99.9(±0.0)

iv) クローンライブラリー法による菌叢解析：菌叢解析による各階層の検出数をみると、分別の進んだがれき処理場である no 2 の多様性は低かった。水は土壤に比べて多様性が低かった (図1)。また、特に病原菌は検出されなかったが、ビブリオ属 (no 1 = 海水由来, no 5, no 6)、リケッチア属 (no 2, no 7)、レジオネラ属 (no 6) など病原菌が含まれる属が検出された検体があったことから、病原菌が生育しうる環境があると認識する必要がある。又、日和見感染が報告されている菌 (no1 の *Burkholderia-multivorans*、no3 の *Massilia-timonae*) も検出された。有毒ガス発生に関する菌では、no1、no5、no6 では硫酸還元菌が多く検出された。他に硫化水素産生能を有する嫌気性有芽胞細菌 (*Clostridium*) や、硝化細菌、メタン酸化菌、硫黄酸化細菌なども同定された (図2)。

(図1) 菌叢解析の各階層の検出数



(図2)環境中の各種物質循環に関わる細菌群の検出率

標本no		1	2	3	4	5	6	W1	W2	標本no		1	2	3	4	5	6	W1	W2
硫酸還元菌	<i>Desulfotomaculum-acetoxidans</i>	1								海水由来菌	<i>Erythrobacter-vulgaris</i>	1							
	<i>Desulfocapsa-thiozymogenes</i>	2									<i>Halomonas-desiderata</i>	1							
	<i>Desulfonatronum-thiodismutans</i>	1									<i>Sporosarcina-aquimarina</i>	10							
	<i>Desulfobacterium-catecholicum</i>					1					<i>Psychrobacter-aquimaris</i>	1							
	<i>Desulfosarcina-cetonica</i>					1					<i>Pseudomonas-alkaliphila</i>	21							
	<i>Desulfobulbus-mediterraneus</i>					1					<i>Marinobacter-algicola</i>			1					
	<i>Desulfotalea-psychrophila</i>					1					<i>Marinospirillum-alkaliphilum</i>			2	2				
	<i>Desulfuromusa-kysingii</i>					1					<i>Marinicola-seohaensis</i>			2					1
	<i>Desulfobacterium-anilini</i>						2				<i>Aquimonas-voraii</i>			1					
	<i>Desulfonatronum-cooperativum</i>						1				<i>Erythrobacter-citrus</i>							1	
<i>Desulfomonile-limmaris</i>						1			<i>Maribacter-orientalis</i>								2		
硫化水素産生能を有する嫌気性有芽胞細菌	<i>Clostridium-acetireducens</i>		1							<i>Maribacter-sedimenticola</i>								1	
	<i>Clostridium-bowmanii</i>						2			<i>Polaribacter-butkevichii</i>								10	
	<i>Clos.-estertheticum subsp. laramiense</i>						1			<i>Colwellia-aestuarii</i>								10	
	<i>Clostridium-thermocellum</i>						1			<i>Marinomonas-primoryensis</i>								1	
イオウ酸化細菌	<i>Thiobacillus-denitrificans</i>	1								日和見感染起因菌	<i>Vibrio属</i>	6				2			2
	<i>Thioalkalivibrio-thiocyanodenitrificans</i>	3							<i>Burkholderia-multivorans</i>		1								
	<i>Ectothiorhodospiraceae</i>		1	4			1		<i>Legionella-shakespearei</i>			2							
	<i>Hydrogenophaga</i>				2		1		<i>Orientia-tsutsumamushi</i>				1						
	<i>Chromatiales</i>				2				<i>Rickettsia-sp</i>					1					
<i>Comamonadaceae</i>						2		<i>Coxiella burnetii</i>				1							
硝化細菌	<i>Nitrospina-gracilis</i>					1			<i>Rickettsia-canadensis</i>									1	
	<i>Nitrobacter-alkalicus</i>					1													
	<i>Nitrosococcus-oceani</i>						2												
メタン酸化菌	<i>Methylocystis-echinoides</i>						1												
	<i>Methylophilus-leisingeri</i>							1											
<i>Methylophaera-hansonii</i>								1											

*数値は 96well micro titer plate 中の同定された菌数

考察

今回の調査では、培養検査の結果で特に病原菌が検出されなかったことから、がれき処理作業従事者や被災地住民が、即時に下痢や呼吸器疾患などの健康被害を受ける危険性はないと思われた。実際に震災後、被災地医療機関において、特定の感染症が大流行したという報告は出ていない。しかし、菌叢解析でビブリオ属（一部は海水由来）や日和見感染の起因菌がいくつか同定された事から、病原菌の生息しうる環境が存在すると考え、復旧作業従事者がヘドロ（がれき）を取り扱う作業を行う際には、手袋やマスクの防護具を装着する、作業後はうがいや手洗いを励行するなどの感染対策をすべきである。

1999年福岡県の安定型最終処分場で発生した硫化水素ガスによる従業員死亡事故の検証により、硫酸還元菌が存在するがれき置き場では、嫌気的環境、水分、有機物、硫酸塩の供給源（石膏ボードなど）といった条件が揃った際には、人体に有害な硫化水素ガスが発生することが証明されている。今回の理化学的環境の評価と網羅的細菌叢評価の結果から、殆どのがれき置き場で表層のサンプルであるにもかかわらず、硫酸還元菌の検出頻度が多いことから、深層で嫌気的環境にある際の硫化水素ガス発生の可能性は否定できないと考え、がれき処理作業従事者は、適切な防護マスクの装着による有害ガス対策を施した上で作業に従事するよう注意する必要があると思われた。更に、被災後に荒地となっている場所の標本では、網羅的細菌叢解析の結果、リケッチア属、レジオネラ属など病原菌が含まれる属が検出されたことから、これらの地点でも病原菌が生育し得る環境が存在していると考え、周辺住民の立ち入りに注意を促す、荒地となった被災水田の環境整備を行政に促すなど環境改善への働きかけが必要であると思われた。今回の採取は、細菌の生育が活発ではない一月の寒い時期であったため、細菌叢が安定していたと考えられる。今後、復旧が進む中で、今回採取し

た地点の環境も変化していくと予想されるため、継続的に同様の環境評価を続けていくことが重要である。

要 約

津波被災地域のヘドロ混入土（水）を採取し、理化学的分析とクローンライブラリー法による網羅的細菌叢解析を行い、被災地における呼吸器疾患など健康被害誘発のリスクを評価した。培養検査で病原菌が検出されなかったものの、菌叢解析では、病原菌が生息しうる環境の存在や、日和見感染起因菌の存在、硫化水素ガス発生誘因の存在が示唆され、ヘドロ（がれき）曝露の可能性がある際には復旧作業従事者や地域住民に対して、手袋やマスクの装着による曝露防止対策、作業後のうがい、手洗いの励行など感染対策を施すべきであることが示唆された。

（謝辞） 本調査にあたり、助成を賜りました公益財団法人大和証券ヘルス財団に深謝いたしますと同時に、標本解析に御協力いただいた、産業医科大学微生物学教室谷口初美教授、福田和正講師、諸富伸夫助教、並びに産業医科大学RIセンター馬田敏幸准教授に深謝いたします。

文 献

1. 谷口初美, 福田和正 ほか. 土壌細菌叢評価法の構築 – 廃棄物処理場の硫化水素ガス発生対策のために -. J UOEH. 26(3), 2004, 349-67.
2. Fukuda, K. et al. Risk assessment of bacterial infection from underground pit sludge of UOEH hospital. J UOEH. 29(1), 2007, 51-62.
3. Wada K, Fukuda K, Yoshikawa T, Hirose T, Ikeno T, Umata T, Irokawa T, Taniguchi H, Aizawa Y. Bacterial Hazards of Sludge Brought Ashore by the Tsunami after the Great East Japan Earthquake of 2011. J Occup Health. 2012, 255-262.
4. 色川俊也、諸富伸夫、福田和正、馬田敏幸、進藤拓、中村修、矢内勝、広瀬俊雄、小川浩正、谷口初美、黒澤一. 石巻地区におけるがれき置き場の土壌細菌叢評価からみた復興作業従事者健康障害要因の評価. 産衛誌 2012, 54: 191.