

災害調査報告書

飼料倉庫で発生した酸欠死亡災害

(要約版)

労働安全衛生総合研究所

1 要約

しょう油かすが保管されていた飼料倉庫において、酸素欠乏症による死亡災害が発生した。酸素欠乏に至る原因の特定に係る調査を行った結果、しょう油かす中に存在する微生物がしょう油かすの塩分濃度においても増殖可能であり、気密性の高い燻蒸用の倉庫内で微生物が増殖したことによって酸素欠乏に至ったものと推定された。

2 災害概要

(1) 災害発生場所

飼料倉庫

(2) 災害の概要

災害の起きた倉庫は鉄筋コンクリート平屋建ての倉庫であり、コンクリート壁により A 庫～F 庫に区画されている。災害発生場所である A 庫は縦 17.270m×横 20.026m×高さ 5.771m であり、倉庫内には内容積 1000 リットルのフレキシブルコンテナバッグ（以下、フレコンバッグ）に入った家畜飼料用粉碎しょう油かすが約 170t（約 340 袋）、倉庫内の東西両側に横 5～6 列、縦 2～3 段に集積されていた。

作業内容はしょう油かすの検品作業であり、出荷前の荷の状態を目視により確認し、カビ等が発生した場合は当該カビ等をフレコンバッグ表面の場合は雑巾で、フレコンバッグ中のしょう油かすの場合はスコップで取り除く作業であった。

災害発生当日、庫内に保管されているしょう油かすの検品作業のため倉庫内に立ち入ろうとしたところ、電動式大扉が故障していたため、倉庫内の室内操作盤にあるリセットボタンを操作すべく、非常用出入り口より倉庫内に立ち入ったところ、労働者 2 名が倒れ、心肺停止状態となり、搬送先病院にて死亡が確認された。解剖の結果、両名とも酸素欠乏症が死因とされた。

3 原因調査

所轄の労働基準監督署より、下記の調査の依頼があったことから、必要な調査を実施した。

調査依頼事項

- 倉庫内の酸素濃度が低下した原因について（酸素を消費した原因菌の特定）
 - しょう油かすに多く含まれる好気性微生物について（種類、個体数、呼吸能力）
 - しょう油かすが入っていたフレコンバッグに付着していたカビについて（種類、呼吸能力）
- 事業場側の「しょう油かすの塩分濃度（17～18%）の中では麴菌が死滅するため、酸欠の原因とはならない」という主張の検証

2.1 方法

2.1.1 しょう油かすサンプル中の微生物濃度の測定

(1) 前処理

所轄の労働基準監督署を通して提供された、被災現場で採取されたしょう油かすサンプル (No.1~5) 各 10g と滅菌水 100ml を滅菌袋に入れ、「エクスナイザー400」(オルガノ株式会社製) にて 1 分間抽出処理を行った。抽出された液体成分 50ml を滅菌済みの遠沈管に移し、10 分間静置した。抽出された液体の上澄み 1ml を滅菌水 9ml に希釈し、ボルテックスミキサーにて混和した(希釈液①, 希釈倍率: 110 倍)。希釈液①1ml を滅菌水 9ml に希釈し、ボルテックスミキサーにて混和した(希釈液②, 希釈倍率: 1,100 倍)。希釈液②1ml を滅菌水 9ml に希釈し、ボルテックスミキサーにて混和した(希釈液③, 希釈倍率: 11,000 倍)。

(2) 培地の調整

真菌用培地として「麦芽エキス寒天培地」(Oxoid 社製, 以下 MA 培地と略す) を、細菌用培地として「SCD 寒天培地「ダイゴ」」(日本製薬株式会社製, 以下 SCD 培地と略す) を選択した。しょう油かすの塩分存在下(しょう油かす製造業者による標準分析値として, 塩分 6.68%) での生育性を見るため, 通常の培地の他, 塩化ナトリウムを 5%ならびに 10%添加した培地を作成した。いずれの培地も指定量の水に混和後, オートクレーブにて 121℃で 20 分間滅菌し, 滅菌シャーレに 20ml ずつ分注・固化させた。

(3) 培地への植え付け・培養

各希釈液 0.1ml を培地に接種し, コンラージ棒で均一に塗抹した後, 裏返しにした状態で真菌は 25℃で 7 日間, 細菌は 35℃で 3 日間培養した。

(4) コロニーのカウント及びサンプル中微生物濃度の推定

培養終了後のコロニー数を計数し, 希釈倍率を乗算してサンプル中微生物の集落濃度 (cfu/g) を算出した。計数されたコロニー数が多すぎても少なすぎても誤差が生じやすいと言われているため, 数十~数百の範囲にある希釈倍率の値を採用した。

(注) なお, ここで測定される値は, 培養に用いた培地にて培養可能な微生物のみを対象としたものであり, 且つ個々の微生物そのものではなく, 集落(コロニー)として測定したものであるため, 存在する全ての微生物を測定したものでない。

※ cfu = Colony forming unit, コロニー形成単位

2.1.2 しょう油かす中及びフレコンバッグ付着物中の微生物の分離

(1) しょう油かす中の微生物の分離

白金耳を用いてコロニーを種類別に平板培地（コロニー数カウント時と同じもの）に接種し、種類ごとに分離培養した。なお、この操作はシャーレ上の微生物が単一種類のみとなるまで繰り返し行った。

(2) フレコンバッグ付着物中の微生物の分離

フレコンバッグ付着物を白金耳を用いて MA 平板培地上に接種し、培養した後、シャーレ上の微生物が単一種類のみとなるまで分離培養を繰り返した。

2.1.3 微生物の種類同定

(1) 液体培地による培養

分離された微生物を、真菌（糸状菌、酵母）をサブロー液体培地に、細菌は SCD 液体培地に接種し、真菌は 25℃、細菌は 35℃で震とう培養した。

(2) 遺伝子的手法による微生物の同定

培養後の微生物から ISOPLANT(ニッポンジーン株式会社)を用いて DNA を抽出した後、MicroSEQ 微生物同定システム (Applied Biosystems 社製) を用いて DNA の増幅ならびに伸長を行った。なお、真菌用として MicroSEQ D2 LSU Fungal Identification Kit, 細菌用として MicroSEQ 500 16S rDNA Bacterial Identification Kit を用いた。伸長産物はシーケンサー (3130 型, Applied Biosystems 社製) を用いた電気泳動を行った後、MicroSEQ ID Microbial Identification Software を用いて微生物の同定を行った。

2.1.4 しょう油かすサンプルの酸素消費能測定

セパラブル三口フラスコ（1リットル）に各しょう油かすサンプル 100 グラム（約 250 ミリリットル相当）を入れ、酸素モニタ OM-25MP10 型（泰榮電器株式会社製）のセンサーを内部に装着した状態で密閉し、25℃ に保った恒温器中にて酸素濃度の変化を測定した（図 1）。測定は酸素濃度が 0% となるまで、もしくは一定程度酸素濃度が減少するまで連続的に行い、酸素濃度 0% に達しなかった場合は 0% に達するまでの時間を推定した。

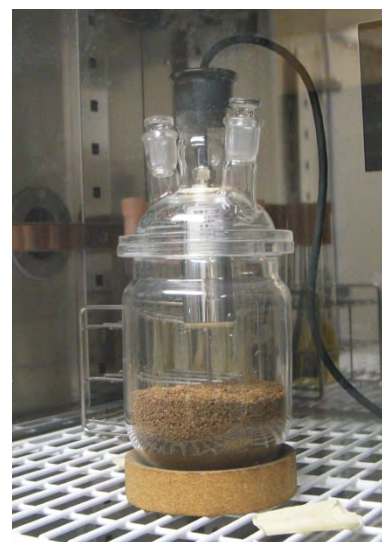


図 1：しょう油かすの酸素消費能測定装置

2.2 結果

2.2.1 しょう油かすサンプル中の微生物濃度

(1) 好気性細菌類の濃度

SCD 寒天培地を用いて算出した好気性細菌濃度の測定値を図 2 に示す。好気性細菌濃度の測定値はサンプル及び培地中の塩分濃度によって異なる結果であったが、塩分濃度 5~10% においても増殖可能であることが示された。しょう油かすの塩分(標準分析値として 6.68%)に近い塩化ナトリウム 5%添加培地での測定値は No.1, No.2, No.3, No.4, No.5 の順であり、最も高かった No.1 では約 600 万 cfu/g, No.2 では約 300 万 cfu/g という値であった。一方、No.5 の好気性細菌濃度は低かった。

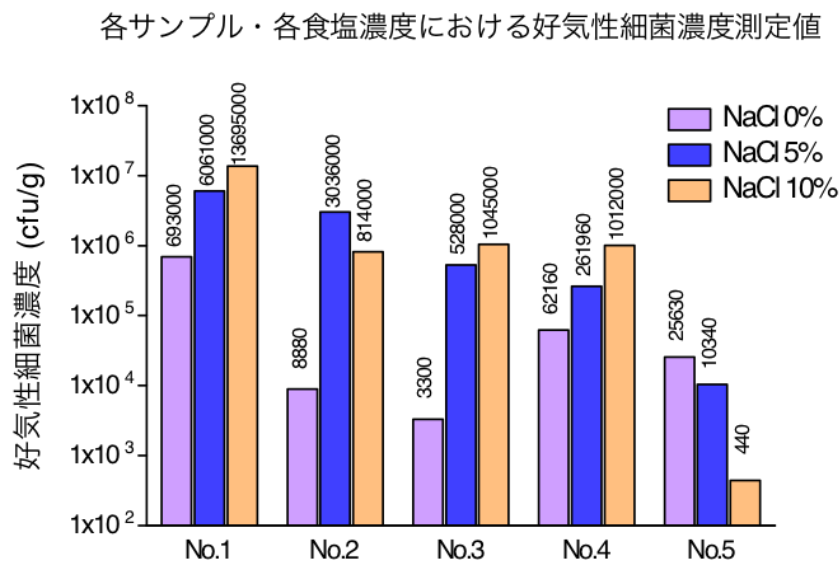


図 2 : しょう油かすサンプル中の好気性細菌濃度

(2) 真菌の推定濃度

MA 培地を用いて算出した総真菌(糸状菌, 酵母)濃度を図 3 に、そのうち糸状菌成分の濃度を図 4 に、酵母成分の濃度を図 5 に示す。総真菌濃度はサンプル及び培地中の塩化ナトリウム濃度によって異なる結果であったが、塩分濃度 5~10% においても増殖可能であることが示された。しょう油かすの塩分(標準分析値として 6.68%)に近い塩化ナトリウム 5% 添加培地での測定値は No.5, No.1, No.4, No.2, No.3 の順であった。糸状菌と酵母の構成比率はサンプルによって大きく異なり、No.1 では糸状菌が優勢、No.4, No.5 では酵母が優性、No.2, No.3 では糸状菌・酵母共に存在していた。

各サンプル・各食塩濃度における真菌濃度測定値

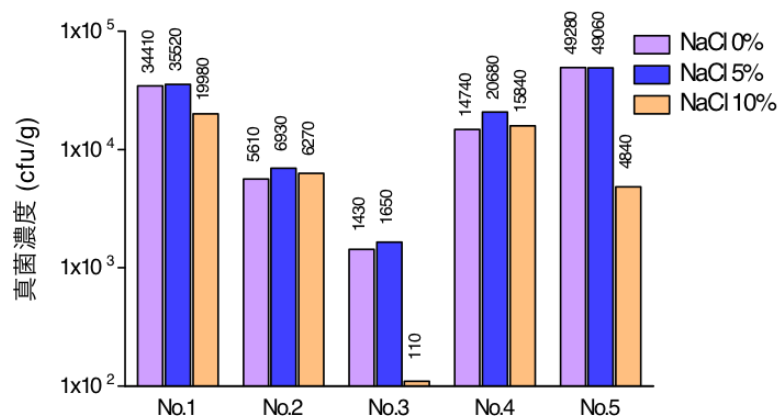


図 3：しょう油かすサンプル中の真菌濃度

各サンプル・各食塩濃度における糸状菌濃度測定値

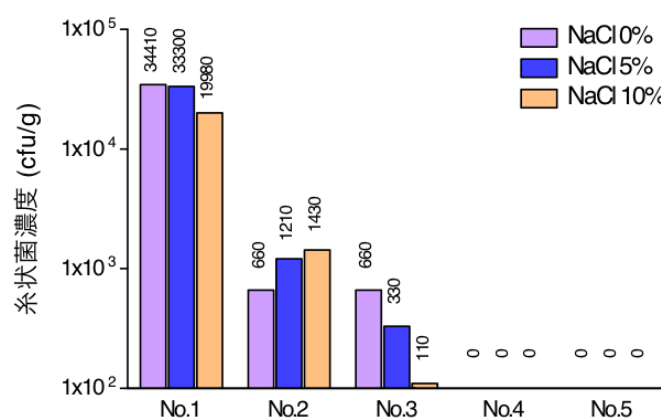


図 4：しょう油かすサンプル中の糸状菌濃度

各サンプル・各食塩濃度における酵母濃度測定値

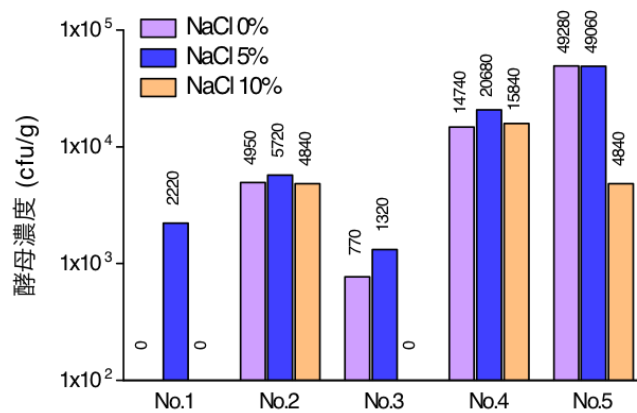


図 5：しょう油かすサンプル中の酵母濃度

2.2.2 しょう油かすおよびフレコンバッグ付着物中の微生物の種類

しょう油かすサンプルおよびフレコンバッグ付着物中より分離された微生物の種類は表1～表2に示す通りであった。

表1：しょう油かすサンプル中から検出された真菌の種類

サンプル	検出された糸状菌	検出された酵母
しょう油かす No.1	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
しょう油かす No.2	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Stephanoascus ciferrii</i>
しょう油かす No.3	<i>Penicillium crysogenum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
しょう油かす No.4		<i>Candida etchellsii</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
しょう油かす No.5		<i>Candida etchellsii</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> <i>Pichia triangularis</i>
フレコンバッグ付着物	<i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus wentii</i> <i>Chaetomium globisum</i>	<i>Pichia triangularis</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>

表2：しょう油かすサンプル中から検出された好気性細菌の種類

サンプル	検出された好気性細菌
しょう油かす No.1	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
しょう油かす No.2	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Gracilibacillus</i> sp.
しょう油かす No.3	<i>Bacillus subtilis</i>
しょう油かす No.4	<i>Bacillus subtilis</i>
しょう油かす No.5	<i>Bacillus subtilis</i>
フレコンバッグ付着物	<i>Bacillus subtilis</i>

2.2.3 しょう油かすサンプルの酸素消費能測定

しょう油かすサンプルの酸素消費能測定結果を図6～10ならびに表3に示す。しょう油かす No.1, No.3, No.5については実際に酸素濃度が0%になるまでの時間を、No.2については外挿による推定時間を示した。No.4については酸素濃度の低下が非常に緩やかであり、外挿による推定が困難であった。

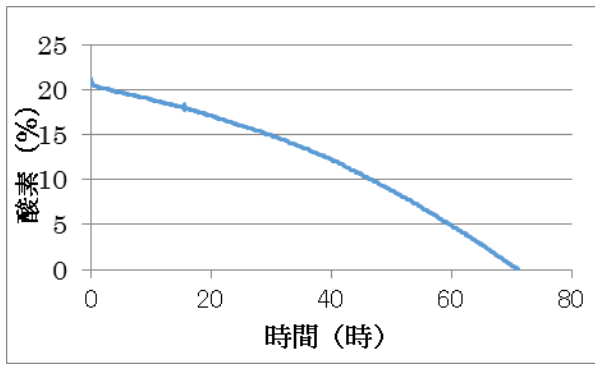


図 6：しょう油かす No.1 の酸素濃度変化
変化

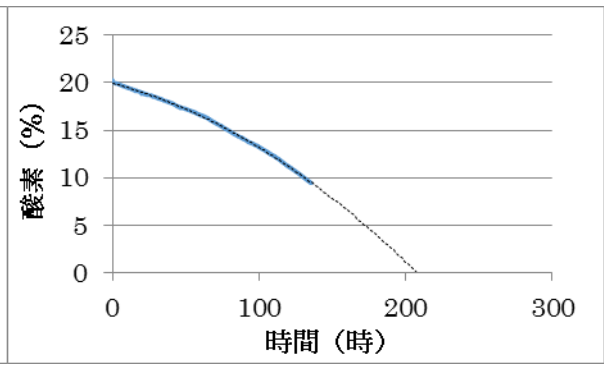


図 7：しょう油かす No.2 の酸素濃度

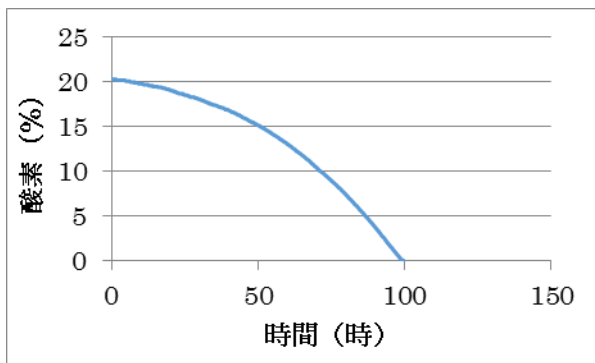


図 8：しょう油かす No.3 の酸素濃度変化
変化

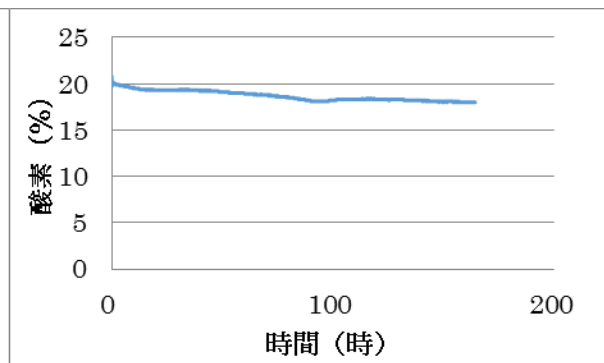


図 9：しょう油かす No.4 の酸素濃度

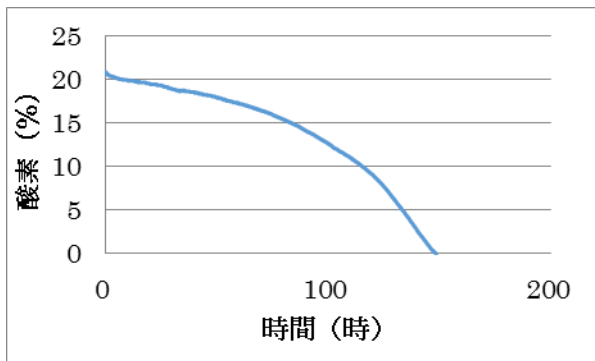


図 10：しょう油かす No.5 の酸素濃度変化

表 3：各しょう油かすサンプルにおいて酸素濃度 0%に達するまでの時間

しょう油かすサンプル番号	酸素濃度 0%に達するまでの時間 (注)
No.1	71 時間
No.2	206 時間 (推定)
No.3	99 時間
No.4	—
No.5	144 時間

(注:この数値は今回の実験条件によるものであり、実際の保管条件における時間ではない。)

2.3 考察

検出された微生物の由来については、しょう油製造工程に由来するものと、しょう油かす製造工程以降の環境に由来するものに分けられる。

検出された糸状菌 *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus wentii*, *Penicillium crysogenum*, *Chaetomium globisum* は、いずれもしょう油製造工程中において一般的に使用されるもの (*Aspergillus sojae*: ショウユコウジカビ, *Aspergillus oryzae*: ニホンコウジカビ) とは異なる種類であることから、しょう油の製造工程由来ではなく、しょう油かすの製造工程以降の環境中から移行し、増殖した可能性が高いと考えられる。

検出された酵母は、*Zygosaccharomyces rouxii* がしょう油の仕込工程 (中期) において使用される耐塩性酵母であり、*Candida* 属酵母, *Pichia* 属酵母, *Debaryomyces* 属酵母も仕込工程 (後期) に用いられることから、いずれもしょう油の仕込工程由来であると考えられる。細菌については、いずれもしょう油かすの製造工程以降の環境由来と考えられる。

しょう油かすの塩分濃度における生育の可否であるが、しょう油製造工程中に使用されたコウジカビ (*Aspergillus sojae*: ショウユコウジカビ, *Aspergillus oryzae*: ニホンコウジカビ) は検出されず、製造工程中の高い塩分濃度下、高い乳酸濃度下で死滅したか、もしくは高い塩分濃度下において生育しなかったと考えられる。一方、製造工程において使用された酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida* 属, *Debaryomyces* 属) は耐塩性が高いため、しょう油かすの高い塩分濃度下においても生存し、増殖したものと考えられる。

なお、今回用いた調査方法では好気性微生物のみ検出可能であり、嫌気性微生物の検出には別の方法での調査が必要であるが、今回問題となっているのは好気性微生物の存在と、それによる酸素消費についてであるため、嫌気性微生物の調査は行わなかった。

また、しょう油かすサンプルの酸素消費能測定において、1 例を除くとサンプル中の好気性微生物は酸素濃度 0% まで酸素消費する能力を示しており、二酸化炭素を生成する事と併せて考えると、酸欠を引き起こす可能性があると言える。

このように、しょう油かすサンプル中にはかなりの数の微生物 (好気性細菌, 真菌) が存在し、且つしょう油かすの高濃度の塩分環境下においても生育可能であることが示された。これらの微生物はしょう油製造工程に由来する酵母と、環境由来の糸状菌・細菌によって構成されていると考えられる。しょう油かすの酸素消費能測定においても酸素の消費が認められたことから考えても、荷であるしょう油かす中の微生物の存在が酸欠の主たる原因であると思われる。

3 推定される発生原因

当災害の発生原因は以下のように推定される。

- ① しょう油製造工程に用いられ、しょう油かすの塩分濃度下においても生存・増殖可能であった酵母がしょう油かす中で増殖し、周囲の酸素濃度を低下させた。
- ② しょう油かすの加工・保管過程において、周囲の環境中に存在していた微生物（カビ、細菌等）が付着・増殖し、周囲の酸素濃度を低下させた。なお、これらの微生物はしょう油かすの塩分濃度下でも増殖可能であった。
- ③ しょう油かすが保管されていた倉庫は燻蒸用の倉庫であり、気密性が高く、換気が不十分な状態であった。
- ④ 二酸化炭素は酸素や窒素より重いため、微生物の増殖によって発生した二酸化炭素濃度が高く酸素濃度が低い空気は倉庫の床近くにおいて高濃度となる。被災者がこの低酸素濃度の空気を吸引したため、酸欠事故が発生したと思われる。

4 再発防止対策

しょう油かす中に微生物が存在し、微生物による酸素消費によって保管場所の酸素濃度が低下することはほぼ明らかである。従って、しょう油かすの保管現場は酸素欠乏の可能性が高いものとして、再発防止に努める必要があると思われる。