

ISSN 0914－9309

CODEN : OKHNDV

岡山県環境保健センター年報

第 38 号

(平成25年度)

Annual Report
of
Okayama Prefectural Institute for Environmental
Science and Public Health

No. 38

2014

ま え が き

当センターは、県民の生活環境の保全と健康の保持増進に資するため、昭和 51 年 4 月に設置され、環境保全及び保健衛生に関する「試験検査」、「調査研究」、「研修指導」及び「情報の収集・解析・提供」の役割を担い、総合的な試験研究機関として業務を実施してきましたが、近年、社会情勢の変化などから、その役割はより重要なものになって来ていると感じています。

平成 25 年度に当センターが関わったものだけでも、保健分野では、マダニが媒介する重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の県内初の感染確認や、当時は脱法ドラッグと呼称されていましたが、危険ドラッグの社会問題化などの事案がありました。また、環境分野では、前年度末から開始された微小粒子状物質 (PM2.5) の注意喚起の取組みや、一級河川における使用禁止農薬による魚のへい死などの事案がありました。

いずれの事案とも、その対応に迅速さや正確さが求められるものであり、対応についてはセンター職員一同、身の引き締まる思いで取り組んできました。

また、積極的な情報提供という観点から、こうした県内外で発生するさまざまな社会問題や県民の関心の高い事案について、当センターが行った調査研究を含む有益な情報を広く県民に伝えられるよう、前年度末に開催した「公開講座」を平成 25 年度も引き続き開催しました。その取組みについては、県知事の表彰を受けたところです。

当センターでは、環境及び保健分野における「県民の安全・安心を科学的・技術的側面から保障する機関」として県行政の一翼を担っており、今後とも関係機関と緊密な連携を図り、県民・行政のニーズに応える機関としての役割を果たしていく所存であります。

このたび、平成 25 年度に実施した調査研究等の成果について取りまとめました。ご高覧いただき忌憚のないご意見をお寄せいただきますとともに、なお一層のご支援、ご鞭撻を賜りますようお願いいたします。

平成 26 年 12 月

岡山県環境保健センター

所 長 岸 本 壽 男

目 次

調査研究・資料

環境科学部

大気科

【調査研究】

- 1 自動測定機を用いたPM2.5とSPM及びその他の物質の相関について
喜多真帆，中野温朗，野村 茂，信森達也，鷹野 洋…………… 1

水質科

【調査研究】

- 2 事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究
—脂肪酸の水質分析法の検討—
吉岡敏行，浦山豊弘，新 和大，山本 淳…………… 7
- 3 児島湖及び流入河川底泥からのリンの溶出速度について
藤田和男，難波あゆみ，河野裕明，中野拓也，山本 淳…………… 15

放射能科

【資 料】

- 4 岡山県内における環境放射能バックグラウンド調査(第2報)
森上嘉亮，畑 陽介，清水光郎，片岡敏夫，小川 登…………… 29
- 5 赤和瀬観測局の降雪量等の経年変化，及び積雪深と空間 γ 線線量率の関係について
小川 登，片岡敏夫，森上嘉亮，畑 陽介，清水光郎…………… 35

保健科学部

細菌科

【調査研究】

- 6 *Listeria monocytogenes* のパルスフィールドゲル電気泳動法の改良
河合央博, 大畠律子, 中嶋 洋…………… 39
- 7 結核疫学調査における結核菌 DNA 解析データベースの活用 (6)
大畠律子, 河合央博, 中嶋 洋…………… 43
- 8 感染予防対策に向けたヒト及び環境等における感染症起因菌の調査 (平成 25 年度)
中嶋 洋, 大畠律子, 河合央博, 檜原幸二, 井上 勝, 仲 克巳…………… 49

ウイルス科

【調査研究】

- 9 胃腸炎ウイルスの疫学的研究
—岡山県の散発胃腸炎患者におけるロタウイルス A の流行状況 (2012/2013 シーズン)—
濱野雅子, 藤井理津志, 木田浩司, 葛谷光隆, 檜原幸二, 井上 勝, 濃野 信, 金谷誠久…………… 55
- 10 日本紅斑熱リケッチア検出 Real-timePCR 法の改良と中国四国地方の地方衛生研究所における模擬訓練
木田浩司, 溝口嘉範, 磯田美穂子, 濱野雅子, 藤井理津志…………… 59
- 11 岡山県におけるインフルエンザ流行の疫学的解析 (2012 ~ 2013 年シーズン)
木田浩司, 溝口嘉範, 磯田美穂子, 濱野雅子, 藤井理津志, 島村琢自…………… 63

【資 料】

- 12 感染症流行予測調査 (平成 25 年度ポリオ感染源調査)
磯田美穂子, 溝口嘉範, 木田浩司, 濱野雅子, 藤井理津志, 島村琢自…………… 67

衛生化学科

【調査研究】

- 13 GC/MS/MS を用いた野菜類及び果実類中残留農薬の一斉分析法の妥当性評価 (第 1 報)
難波順子, 浅田幸男, 赤木正章, 北村雅美, 肥塚加奈江…………… 69

他誌発表論文抄録…………… 83

単行本…………… 87

報告書等…………… 88

学会発表…………… 93

【調査研究】

自動測定機を用いたPM2.5 とSPM及びその他の物質の相関について

The Correlation between PM2.5 and SPM, other air substance
using an automatic measuring machine

喜多真帆, 中野温朗, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋(大気科)

Maho Kita, Atsurou Nakano, Shigeru Nomura,

Tatsuya Nobumori, Hiroshi Takano (Department of Atmosphere)

要 旨

自動測定機によるPM2.5 とSPM及びその他の大気汚染物質の関係を明らかにするために平成23～25年度の3年間の観測データについて検討を行った。その結果、PM2.5濃度とSPM濃度には相関が認められ、PM2.5/SPM比は0.79～0.85であったが、その範囲は最小値0.41、最大値1.41となり月別及び地域別の差異が認められた。SPM濃度20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下の低濃度域ではPM2.5/SPM比は無相関であり、SPM濃度45 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超える高濃度域ではPM2.5/SPM比は0.70～0.77に収束し、低濃度域が月別及び地域別の差異の一因であると考えられた。また、PM2.5濃度とOx濃度には相関がうかがえるが、地域による差異が大きいと考えられた。

[キーワード：PM2.5, SPM, 相関, 自動測定機]

[Key words : PM2.5, SPM, Correlation, automatic measuring machine]

1 はじめに

粒径 2.5 μm 以下の微小粒子状物質(以下「PM2.5」という。)は、呼吸器の奥深くまで侵入して喘息や気管支炎等の呼吸器疾患を起こす可能性が指摘されており¹⁾、その対策が大きな課題となっている。岡山県では環境大気測定局23局の中でPM2.5自動測定機4局、浮遊粒子状物質(以下「SPM」という。)自動測定機16局、光化学オキシダント(以下「Ox」という。)自動測定機18局、窒素酸化物(以下「NOx」という。)自動測定機21局、二酸化硫黄(以下「SO₂」という。)自動測定機11局、炭化水素(以下「HC」という。)自動測定機4局で観測測定を行っている。これらの観測データを用いてPM2.5とSPM及びその他の物質の関係を明らかにするために平成23～25年度の3年間のデータについて相関等の検討を行った。

2 解析方法

2.1 調査地点

PM2.5自動測定機を設置している茂平局(笠岡市)、総社局(総社市)、早島局(都窪郡早島町)、長津局(都窪郡早島町)の位置関係は図1のとおりである。一般環

境大気測定局3局の設置環境は、茂平局は南西方向に福山・笠岡コンビナート地帯があり、総社局の周囲は住宅街、早島局は田畝の中にあり秋から冬にかけて畑焼きや、すくも焼き等が行われる。自動車排出ガス測定局である長津局(以下「長津局(自)」という。)は、国道2号線と瀬戸中央自動車道が交わる早島インターチェンジの近傍に位置する。

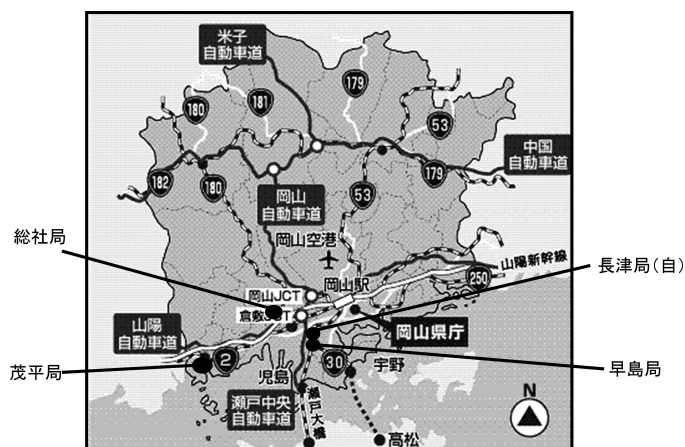


図1 岡山県測定局配置図

2.2 解析期間

解析は、平成 23 年 4 月から平成 26 年 3 月までの 3 年間とした。

2.3 解析項目及び測定機器

解析に用いた PM2.5 自動測定機、SPM 自動測定機の測定原理及びメーカーは表 1 のとおりである。

表 1 PM2.5 及び SPM 自動測定機一覧

	PM2.5 測定機	SPM 測定機
茂平局	FRM-377 東亜 DKK(株) β 線吸収法	SPM-613 紀本電子工業(株) β 線吸収法
総社局	FRM-377 東亜 DKK(株) β 線吸収法	DUB-242 東亜 DKK(株) β 線吸収法
早島局	SHARP5030 東京ダイレック (株)ハイブリッド (β 線吸収法と 光散乱法)法	DUB-32 東亜 DKK(株) β 線吸収法
長津局(自)	FRM-377 東亜 DKK(株) β 線吸収法	SPM-613 紀本電子工業(株) β 線吸収法

3 結果及び考察

3.1 PM2.5 と各測定項目の相関について

一般環境大気測定局のうち付近に大きな発生源のない総社局において、平成 23～25 年度の PM2.5 月平均値と SPM、5 時から 20 時までの O_x (以下「昼間 O_x」という。)、NO、NO₂、NO_x のそれぞれの月平均値との関係を図 2 に示す。PM2.5 との相関係数は、SPM (0.84)、昼間 O_x (0.65)、NO (-0.15)、NO₂ (0.03)、NO_x (-0.05) であり、PM2.5 は SPM と高い相関があり、O_x とは相関があり、NO、NO₂、NO_x とは相関がほとんどなかった。

長津局(自)の平成 23～25 年度の PM2.5 と CH₄、

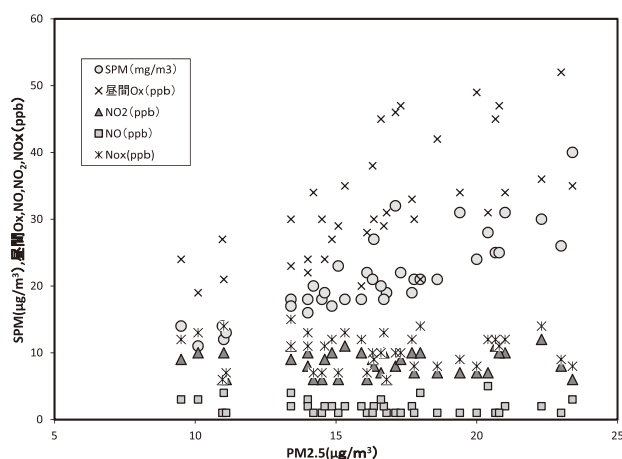


図 2 PM2.5 と SPM、昼間 O_x、NO、NO₂、NO_x の相関(総社局)

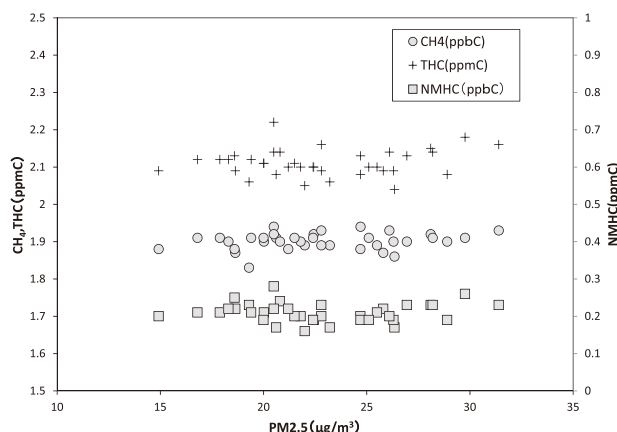


図 3 PM2.5 と CH₄、NMHC、THC の相関(長津局(自))

NMHC、TH との関係を図 3 に示す。PM2.5 との相関係数は、CH₄ (0.21)、NMHC (0.01)、THC (0.14) であり、ほとんど相関がなかった。

3.2 PM2.5 と SPM の比較

3.1 で PM2.5 と高い相関があった SPM との関係について測定局ごとに検討を行った。平成 23～25 年度にかけての茂平局、総社局、早島局及び長津局(自) (以下「4 測定局」という。)の PM2.5 を SPM で除した値 (以下「PM2.5/SPM 比」という。)を図 4～7 に示す(茂平局図 4、総社局図 5、早島局図 6、長津局(自)図 7)。また、各局の PM2.5/SPM の最高値、最低値、平均値を表 2 に示す。

茂平局の PM2.5/SPM 比の平均値は 0.82 であり、平成 23 年度は平均値を上回る月が多く、平成 24 年度及び 25 年度は平均値を下回る月が多かった。年度ごとにみると平成 23 年度は 5 月に低く、2 月に高い傾向であった。平成 24 年度は 7 月に低く、5～6、9 月に高かった。平成 25 年度は 11 月に高くなったものの、季節ごとの傾向は見られなかった。(図 4)

総社局の PM2.5/SPM 比の平均値は 0.79 であり、平成 23 年度 5～8 月、平成 24 年度は 7 月、平成 25 年度は 8 月に PM2.5/SPM 比が低くなるなど、PM2.5/SPM 比は夏期に低くなる傾向があった。(図 5)

早島局の PM2.5/SPM 比の平均値は 0.80 であり、平成 23 年度は 5～9 月、平成 24 年度は 7～9 月、平成 25 年度は 6～9 月に PM2.5/SPM 比が低く、平成 23 年度及び 24 年度は 12～2 月、平成 25 年度は 11 月に PM2.5/SPM 比が高くなり、PM2.5/SPM 比は夏期に低くなり秋期から冬期に高くなる傾向があった。(図 6)

長津局(自)の PM2.5/SPM 比の平均値は 0.85 であり、

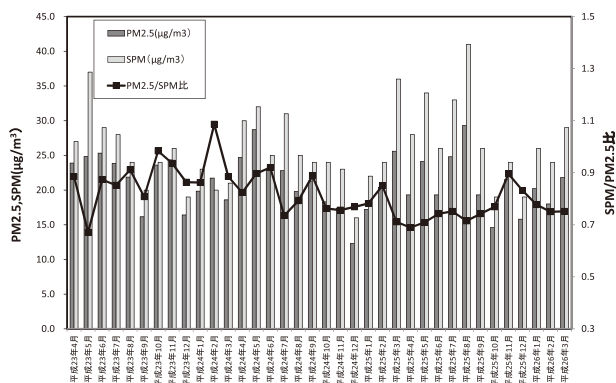


図4 平成23～25年度PM2.5/SPM比 茂平局

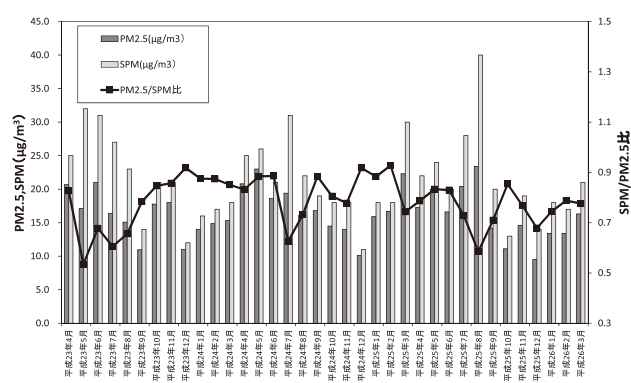


図5 平成23～25年度PM2.5/SPM比 総社局

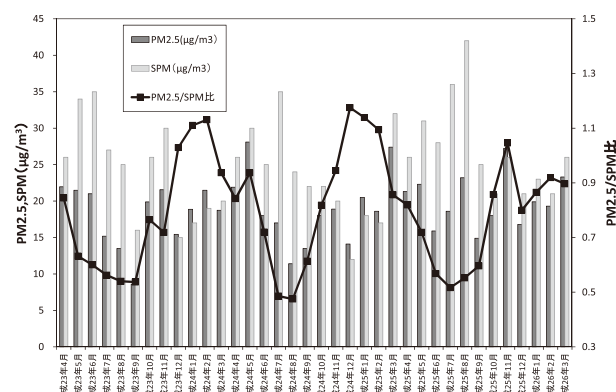


図6 平成23～25年度PM2.5/SPM比 早島局

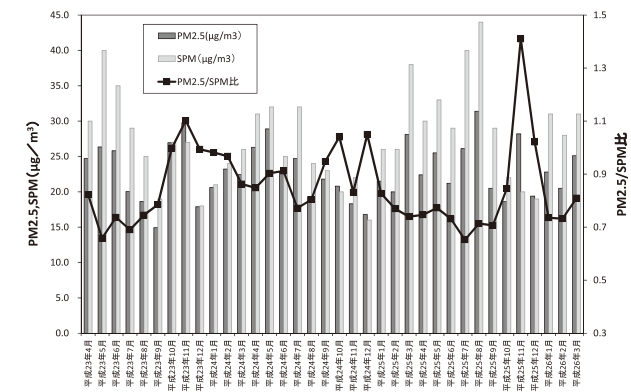


図7 平成23～25年度PM2.5/SPM比 長津局(自)

表2 平成23～25年度PM2.5/SPM比

	茂平局	総社局	早島局	長津局(自)
最小値	0.67	0.53	0.48	0.65
最大値	1.09	0.93	1.18	1.41
平均値	0.82	0.79	0.80	0.85

平成23年度5～7月にPM2.5/SPM比が低くなり、平成23年度は10～2月、平成24年度は10、12月、平成25年度は11～12月にPM2.5/SPM比が高くなり、秋期から冬期にPM2.5/SPM比が高くなる傾向があった。(図7)

総社局、早島局及び長津局(自)においてはPM2.5/SPM比が夏期に低くなる傾向があり、早島局と長津局(自)ではPM2.5/SPM比が秋期から冬期に高くなる傾向があった。早島局と長津局(自)は直線距離にして約1kmの場所にあり、早島局と長津局(自)周辺では秋期から冬期にかけて行われる畑焼きや、すくも焼き等がPM2.5/SPM比を高くする一因²⁾ではないかと考えられた。

また、4測定局のPM2.5/SPM平均値が0.79～0.85であったことは、総社局と長津局(自)において本県が平成23年度に行ったマニュアル測定でSPMの約8割が

PM2.5であると推定された検討結果³⁾とよく一致している。しかし、測定局における毎月のPM2.5/SPM比はその範囲は最小値0.48、最大値1.41と大きなばらつきがあり(表2)、PM2.5/SPM比は月別及び地域別の変動が大きい傾向があった。変動要因としては、測定局付近の固有発生源の存在や風向き等の影響が疑われるが、これらの把握には測定局ごとの詳細な調査及び検討が必要であると考えられた。

3.3 SPMとPM2.5/SPMの一時間値の相関

次に、各SPM濃度におけるPM2.5/SPM比について検討を行った。平成25年度の茂平局、総社局、早島局及び長津局(自)の1時間値のSPM濃度(µg/m³)とPM2.5/SPM比(1時間値)の関係を、図8～11に示す。

茂平局では、SPM濃度が20 µg/m³以下ではPM2.5/SPM比(1時間値)は発散しており、SPM濃度が40 µg/m³

m³を超えるとPM2.5/SPM比(1時間値)は0.73に収束していた。(図8)

総社局ではSPM濃度が20 µg/m³以下ではPM2.5/SPM比(1時間値)は発散しており、SPM濃度が40 µg/m³を超えるとPM2.5/SPM比(1時間値)は0.72に収束していた。(図9)

早島局ではSPM濃度が20 µg/m³以下ではPM2.5/SPM比(1時間値)が発散しており、SPM濃度が40 µg/m³を超えるとPM2.5/SPM比(1時間値)は0.70に収束していた。(図10)

長津局ではSPM濃度が15 µg/m³以下ではPM2.5/SPM比(1時間値)は発散しており、SPM濃度が45 µg/m³を超えるとPM2.5/SPM比(1時間値)は0.77に収束していた。(図11)

全体としてSPM濃度20 µg/m³以下の低濃度域ではPM2.5/SPM比(1時間値)は発散して不明確であり、SPM濃度45 µg/m³を超える高濃度域ではPM2.5/SPM比(1時間値)は0.70～0.77に収束した。SPM濃度20 µg/m³以下の低濃度域の出現率は茂平局40.0%、総社局

70.4%、早島局42.3%、長津局(自)34.3%であり、これらがPM2.5/SPM比に大きな変動を与えていると考えられた。

3.4 PM2.5と昼間Oxの比較

3.1でPM2.5年平均濃度との相関のあった昼間Ox濃度について、測定局ごとに検討を行った。なお、長津局はOx計を設置していないので検討から除外した。

平成23～25年度にかけての茂平局、総社局及び早島局(以下「3測定局」という。)のPM2.5月平均値(µg/m³)を昼間Ox月平均値(ppb)で除した値(以下「PM2.5/昼間Ox比」という。)を図12～14に示す。また、各局のPM2.5/昼間Ox比(月平均値)の平均値、最低値、最高値を表3に示す。

茂平局のPM2.5/昼間Ox比の平均値は0.74であり、平成23年度11月、平成25年度11、1月にPM2.5/昼間Ox比が高くなっていた。(図12)

総社局のPM2.5/昼間Ox比の平均値は0.53であり、平成23年度11月、平成25年度1月にPM2.5/昼間Ox比が高くなっていた。(図13)

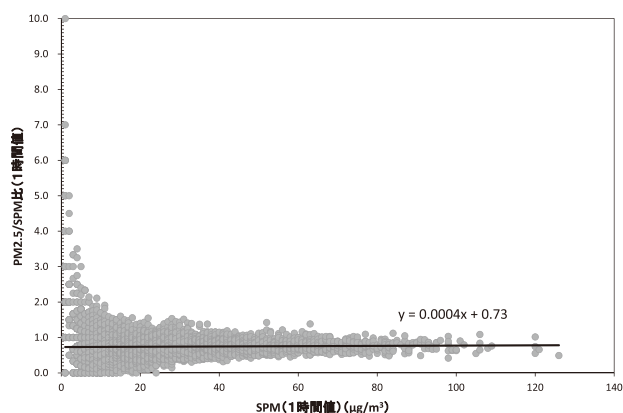


図8 平成25年度SPMとPM2.5/SPM比(1時間値)茂平局

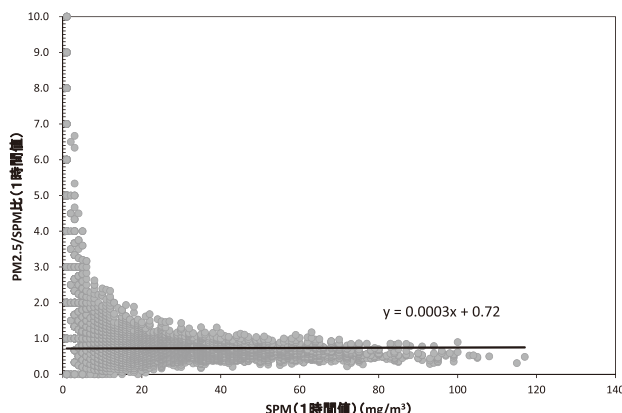


図9 平成25年度SPMとPM2.5/SPM比(1時間値)総社局

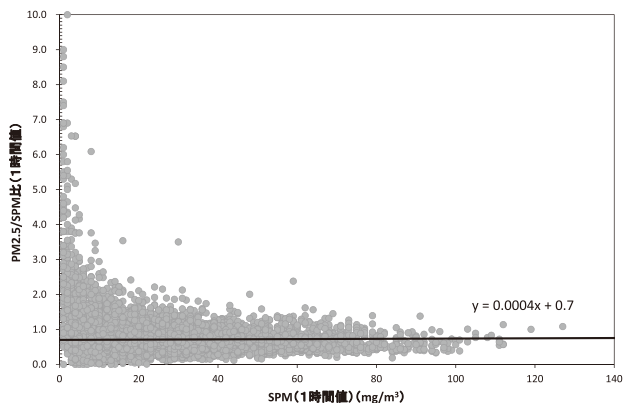


図10 平成25年度SPMとPM2.5/SPM比(1時間値)早島局

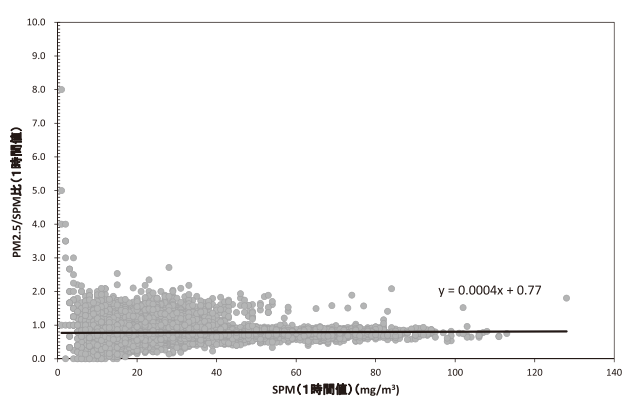


図11 平成25年度SPMとPM2.5/SPM比(1時間値)長津局(自)

早鳥局のPM2.5/昼間Ox比の平均値は0.64であり、平成23年度11月、平成25年度11、1月にPM2.5/昼間Ox比が高くなっていた。(図14)

3測定局では平成23年度11月と平成25年度1月にPM2.5/昼間Ox比が高くなるという傾向は認められたが、PM2.5/昼間Ox比の平均値は茂平局0.74、総社局0.53、早鳥局0.64とばらつきがあることから、地域による差異が大きいと考えられた。

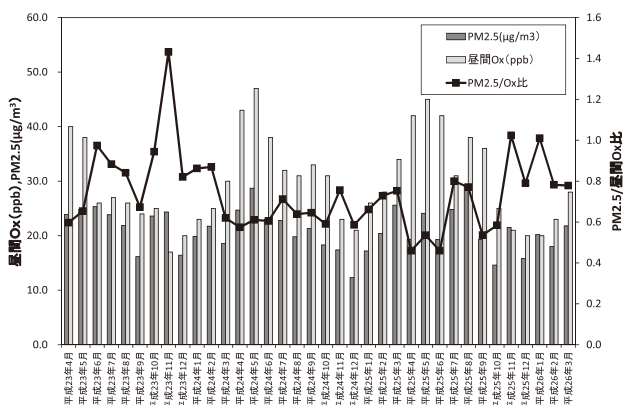


図12 平成23～25年度PM2.5/昼間Ox比 茂平局

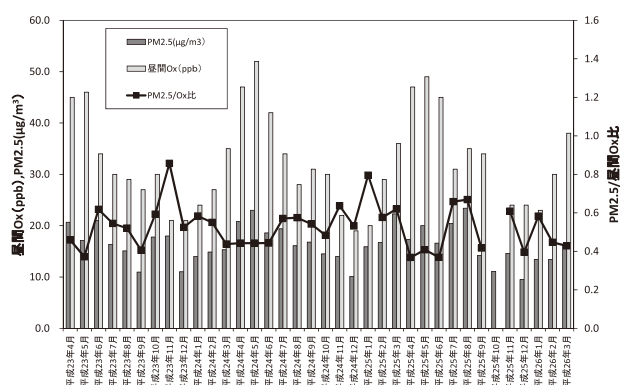


図13 平成23～25年度PM2.5/昼間Ox比 総社局

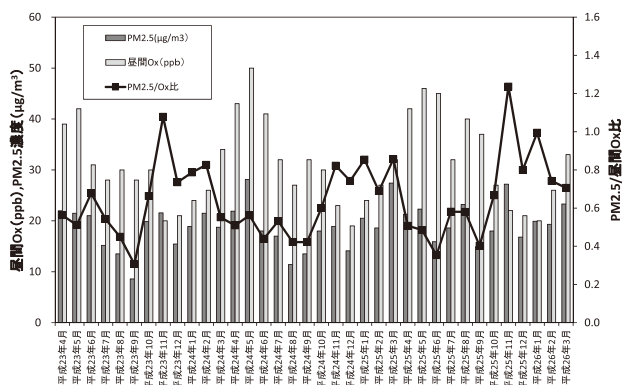


図14 平成23～25年度PM2.5/昼間Ox比 早鳥局

表3 平成23～25年度月平均値PM2.5/昼間Ox比(月平均値)

	総社局	茂平局	早鳥局
最小値	0.37	0.46	0.31
最大値	0.86	1.43	1.24
平均値	0.53	0.74	0.64

4 まとめ

- ①平成23～25年度の3年間について、PM2.5月平均値とSPM月平均値及びその他の物質(昼間Ox, NO, NO₂, NO_x, CH₄, NMHC, THC)の月平均値の相関について検討を行ったところ、SPMと昼間OxにPM2.5との相関があった。
- ②茂平局、総社局、早鳥局及び長津局(自)の月ごとのPM2.5/SPM比は、総社局、早鳥局及び長津局(自)は夏期にPM2.5/SPM比が低く、早鳥局と長津局で秋期から冬期が高くなる傾向があった。
- ③各測定局のPM2.5/SPM比の平均値は0.79～0.85となったが、最小値0.48、最大値1.41となり月別及び地域別の変動が大きかった。
- ④濃度別の精度について検討を行ったところ、SPM濃度20 µg/m³以下の低濃度域ではPM2.5/SPM比は不明確であり、SPM濃度45 µg/m³を超える高濃度域ではPM2.5/SPM比が0.70～0.77に収束し、低濃度域がPM2.5/SPM比に大きな変動を与えていると考えられた。
- ⑤茂平局、総社局及び早鳥局の月ごとのPM2.5/昼間Ox比(月平均値)は一定の相関はあるが測定局ごとの平均値の差異が大きく、地域差が大きいと考えられた。

文 献

- 1) 環境省：微小粒子状物質健康影響評価検討会報告書、第7章 p15-22, 2008年度
- 2) 伏見暁洋, 齊藤勝美, 林 健太郎, 須藤重人, 小野圭介 他：野焼き実験による粒子の排出特性と元素組成, NMCC 共同利用研究成果報文集, p197-200, 2010年度
- 3) 林隆義, 中桐未知代, 野村 茂, 小川 登, 深見武史 他：環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子状物質PM2.5による大気汚染)―第8報―岡山県環境保健センター年報, 2011年度

【調査研究】

事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究

—脂肪酸の水質分析法の検討—

Study on the development of analytical techniques of chemicals at the time of
the accident, such as emergency

—Study of water quality analysis method of fatty acids—

吉岡敏行, 浦山豊弘, 新 和大, 山本 淳(水質科)

Toshiyuki Yoshioka, Toyohiro Urayama, Kazuhiro Atarashi, Jun Yamamoto
(Department of Water)

要 旨

脂肪酸の高感度水質分析法を検討した。水環境中には脂肪酸メチルエステルが検出される可能性があることから、誘導体化は臭化ペンタフルオロベンジル (PFBB) による方法を検討した。炭素数 8 から 22 の 16 種類の脂肪酸を PFBB により誘導体化し、前処理方法を工夫し、操作の簡略化等を図ったところ、感度及び定量性が向上し、定量下限値は 0.072 ~ 3.8 $\mu\text{g/L}$ となる高感度分析法が開発できた。この分析法を応用して、公共用水域での動植物性油脂等に由来する脂肪酸の検出が期待できる。

[キーワード：脂肪酸, 誘導体化, 水質, GC/MS]

[Key words : Fatty acid, Derivatization, Water quality, GC/MS]

1 はじめに

脂肪酸は、油脂や脂質の構成成分で動物性油脂や植物性油脂に含まれている。炭素数が 4 以上のものが天然の脂肪に含まれ、炭素数 10 を超えるものが高級脂肪酸と呼ばれている。炭素鎖に二重結合がないものは飽和脂肪酸、ひとつ以上あるものは不飽和脂肪酸と呼ばれている。また、油脂中の脂肪酸は、動物や植物の種類に特有の構成比があり、脂肪酸を分析し、構成比が明らかになれば、油脂の種類がある程度推定できる。

近年、廃植物油等の生物由来の油脂からバイオディーゼル燃料 (BDF) を製造することが注目され、各種規模のプラントで BDF として脂肪酸メチルエステルが製造、利用されている。しかし、製造工程から廃液とグリセリンが発生し、廃棄物処理や廃液処理の問題等を抱えており、グリセリンの不法投棄事例も発生している。このため、脂肪酸メチルエステルは、水環境中から検出される可能性が考えられる。

脂肪酸は、GC/MS で直接測定すると、高極性物質のためピークがテーリングし、感度もあまり高くない。し

たがって、一般的には脂肪酸をメチル誘導体化して極性を減少させ、GC/MS で測定する。しかし、水環境中には微量の脂肪酸メチルエステルが検出される可能性があることから、水環境の脂肪酸を正確に分析するためには、メチル誘導体化による方法以外を検討する必要がある。

今回、脂肪酸を PFBB で誘導体化する方法を検討したところ、水質試料中の高感度分析法が開発できたのでその結果について報告する。

2 実験方法

2.1 検討物質

検討した脂肪酸を表 1 に示す。GC/MS 測定が可能で入手できた炭素数 8 から 22 の飽和脂肪酸 12 種類及び不飽和脂肪酸 4 種類について検討を行った。

2.2 GC/MS の測定条件

脂肪酸の測定条件を表 2、モニターイオンを表 3 に示す。対象物質の定量は、保持時間の近い内標準物質を用いた。GC カラムは、一般的に、脂肪酸メチルエステル分析等に使用される高極性の WAX 系カラムを選択し

表 1 検討物質一覧表

慣用名	組織名	示性式
カプリル酸	オクタン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$
カプリン酸	デカン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$
ラウリン酸	ドデカン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$
-	トリデカン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{COOH}$
ミリスチン酸	テトラデカン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$
ペンタデシル酸	ペンタデカン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{13}-\text{COOH}$
パルミチン酸	ヘキサデカン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$
マルガリン酸	ヘプタデカン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}-\text{COOH}$
ステアリン酸	オクタデカン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$
オレイン酸	<i>cis</i> -9-オクタデセン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
リノール酸	<i>cis,cis</i> -9,12-オクタデカジエン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
リノレン酸	9,12,15-オクタデカントリエン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
-	n-ノナデカン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{17}-\text{COOH}$
アラキジン酸	エイコサン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{18}-\text{COOH}$
ベヘン酸	ドコサン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{20}-\text{COOH}$
エルカ酸	<i>cis</i> -13-ドコセン酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$

表 2 GC/MS測定条件

機種	GC: Agilent7890A, MS: JMS-Q1000GCMk II
GCカラム	HP-INNOWAX 30m×0.25mm×0.25μm
カラム温度	50°C(2min)-20°C/min-120°C(0min)-5°C/min-260°C(6min)
注入口温度	240°C
注入方法	スプリットレス(パージ開始時間1.5min)
注入量	1μL
キャリアーガス	ヘリウム1.5mL/min(定流量)
インターフェース温度	230°C
イオン源温度	210°C
イオン化電圧	70eV
イオン化法	EI
イオン化電流	300μA
検出モード	SCAN

表 3 モニターイオン

物質名	RT	m/z		
acenaphthene-d ₁₀	16:03	164	-	-
phenanthrene-d ₁₀	25:17	188	-	-
fluoranthene-d ₁₀	31:53	212	-	-
カプリル酸	13:56	324	240	192
カプリン酸	17:21	352	240	192
ラウリン酸	20:44	380	240	199
トリデカン酸	22:22	394	240	195
ミリスチン酸	23:59	408	240	209
ペンタデシル酸	25:32	422	241	223
パルミチン酸	27:02	436	237	219
マルガリン酸	28:30	450	251	269
ステアリン酸	29:56	464	265	283
オレイン酸	30:11	263	245	221
リノール酸	30:52	460	279	195
リノレン酸	31:47	458	402	221
n-ノナデカン酸	31:19	478	279	297
アラキジン酸	32:40	492	293	311
ベヘン酸	35:30	520	321	339
エルカ酸	35:56	319	337	301

た。GC/MS測定は、SCANモードで、定量用イオンは、原則として、分子イオンを選択した。

2.3 前処理方法

PFBB誘導体化は、要調査項目のフェノール類の分析方法²⁾等に採用されており、酸性下で水質試料から目的物質を抽出し、溶媒中でPFBB誘導体化し、誘導体化物をヘキサン抽出する方法である。今回検討した分析フローを図1に示す。脂肪酸は炭素数が多くなると、水溶解度が小さくなり、ガラス容器に吸着することが懸念されることから、試料採取したガラス容器の洗浄、洗い込みを考慮してアセトンを添加した。水質試料からの脂肪酸の抽出溶媒は、抽出効率等を考慮してヘキサンからジクロロメタンに変更した。また、PFBB誘導体化後の抽出は参考法と同様にヘキサンを用いて行ったが、抽出時には内標準を同時に添加し、1回抽出とし、脱水操作も省略した。静置後、上澄みのヘキサン層を分取し、GC/MS測定した。また、脂肪酸PFBB誘導体化物のクリーンアップについても併せて検討した。

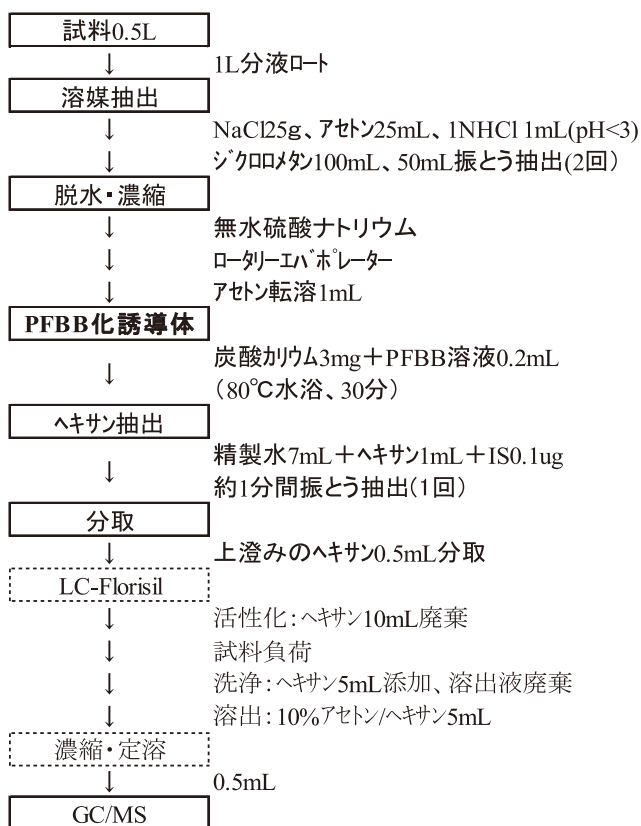


図1 分析フロー

2.4 装置検出下限値及び分析法の検出下限値と定量下限値

装置検出下限値 (IDL) 及び分析方法の検出下限値 (MDL) と定量下限値 (MQL) の測定及び算出は、「化学物質環境汚染実態調査の手引き (平成 20 年度版)」³⁾に従った。IDL は、検量線に用いる最低濃度付近の標準液を 7 回繰り返し測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。MDL 試験には、河川水に IDL の 5 倍程度の標準物質を添加した試料を 7 個作成し、分析フローに従い前処理を実施した後、GC/MS で測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。

$$IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1, I} \times 2$$

$t(n-1, 0.05)$: 危険率 5%, 自由度 $n-1$ の t 値 (片側)

$\sigma_{n-1, I}$: IDL 算出のための測定値の標本標準偏差

$$MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1, M} \times 2$$

$$MQL = 10 \times \sigma_{n-1, M}$$

$t(n-1, 0.05)$: 危険率 5%, 自由度 $n-1$ の t 値 (片側)

$\sigma_{n-1, M}$: MDL 算出のための測定値の標本標準偏差

3 検討結果及び考察

3.1 PFBB誘導体化の効果

脂肪酸を直接測定した場合と PFBB 誘導体化した場合のクロマトグラムを図 2 に示す。直接測定した場合は、特に、リテンションタイムが 30 分以降の脂肪酸はピークがテーリングし、ピーク強度が非常に小さくなった。また、ピークは 14 本しか確認できず、今回の GC/MS 条件では分子量の大きいベヘン酸とエルカ酸は測定できなかった。脂肪酸を PFBB 誘導体化した場合、極性が低くなり、ピークのテーリングが解消され、面積比で約 10 ~ 45 倍程度、感度が良くなり、定量性も向上し、16 種類の脂肪酸が測定できた。特に、炭素数が多いものや不飽和脂肪酸の感度向上が見られた。低濃度の脂肪酸-PFBB 誘導体化物のクロマトグラムを図 3 に示す。感度向上とピーク形状の改善により、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で、いずれの物質も S/N が 10 以上であった。

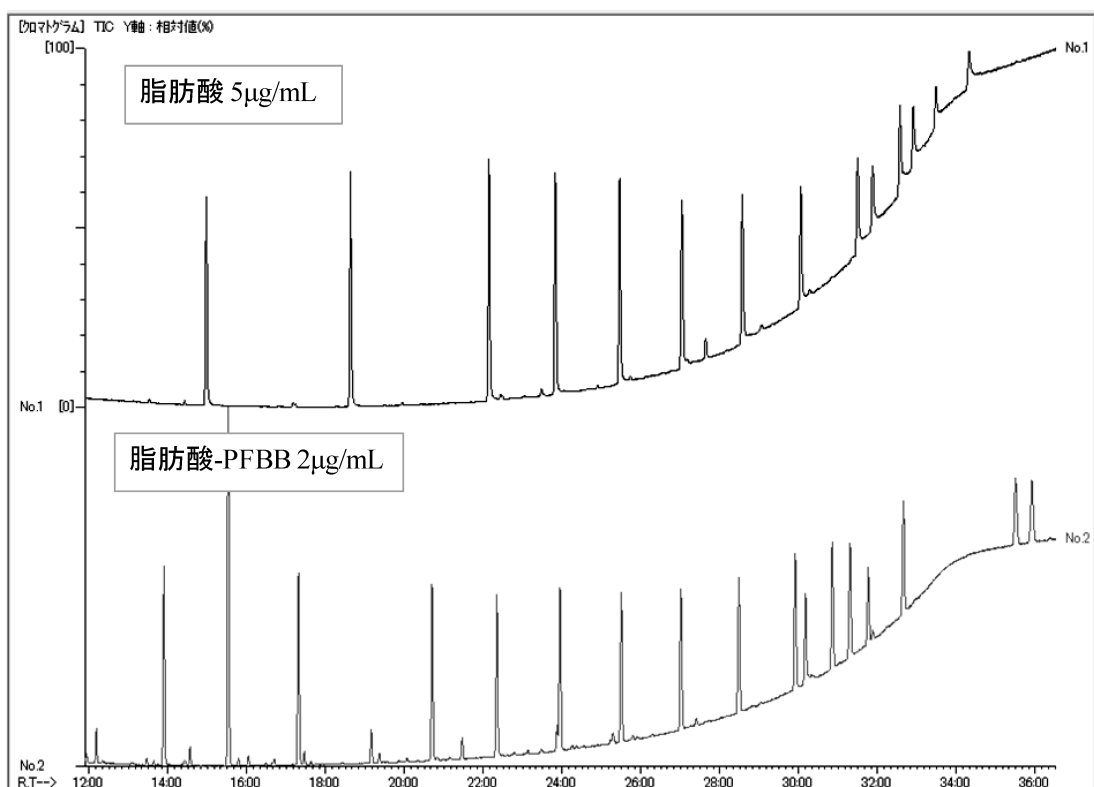


図2 誘導体化の有無のクロマトグラム比較

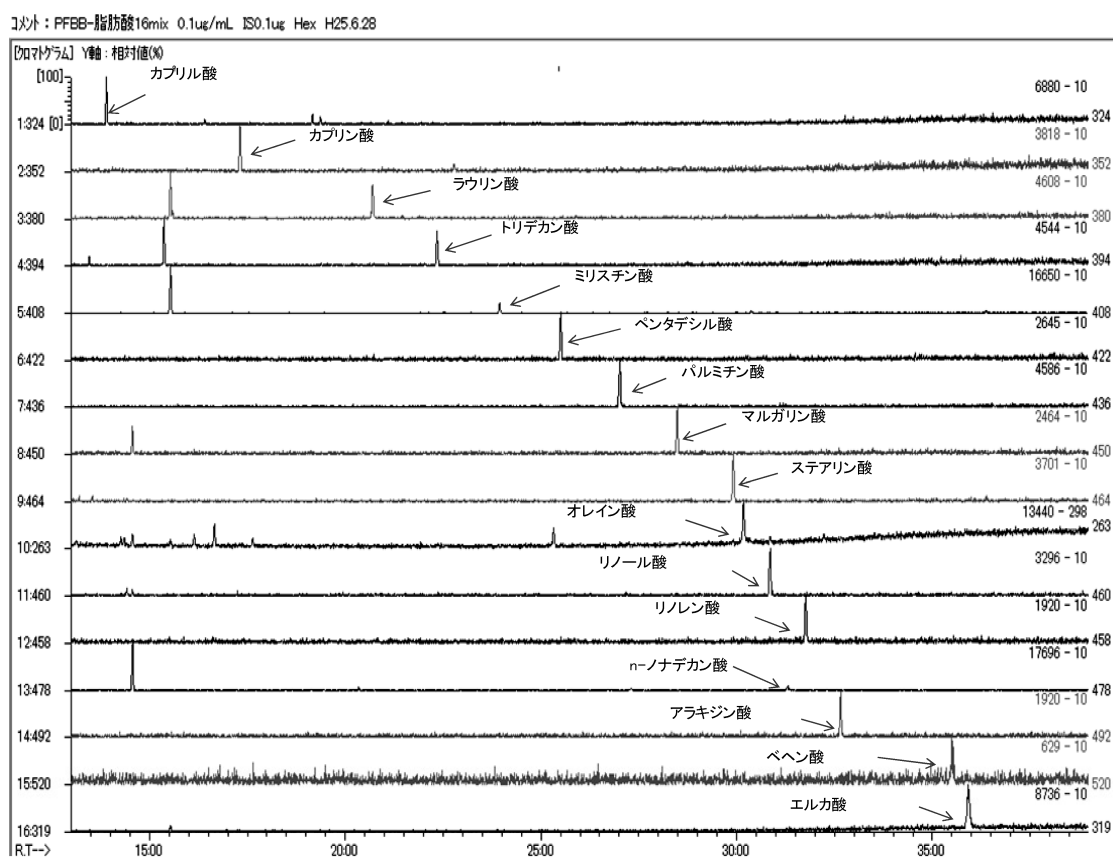


図3 脂肪酸-PFBB誘導体化物のクロマトグラム (0.1 μg/mL)

3.2 検量線

図4に検量線の一例を示す。リテンションタイムが最も遅いエルカ酸は、内標準物質としてフルオランテン-d₁₀を使用し、0.1～1 µg/mLの濃度範囲で直線性 ($r^2 > 0.9996$) が確認できた。そのほかの脂肪酸も同じ濃度範囲で、同様に直線性 ($0.9991 < r^2 < 0.9999$) が確認できた。

3.3 クリーンアップの検討結果

PFBB誘導体化後のヘキサン抽出では、脂肪酸-PFBB誘導体化物だけでなく、未反応なPFBBも同時に抽出さ

れることから、フロリジルによるクリーンアップを検討した。使用したフロリジルはSUPELCO製のLC-Florisil (1g/6mL) で、ヘキサンから順次、アセトン含有量を増加させた溶離液を流し、脂肪酸の分画試験を行った。フロリジル分画試験結果を表4に示す。各分画中のPFBBのクロマトグラムを図5に示す。PFBBの90%以上は、フロリジルに保持されず、ヘキサン画分に溶出した。一方、脂肪酸-PFBB誘導体化物はヘキサン画分には少し溶出するだけで、90%以上が10%アセトン/ヘキサン画分に溶出し、脂肪酸と大半のPFBBを分別することができた。

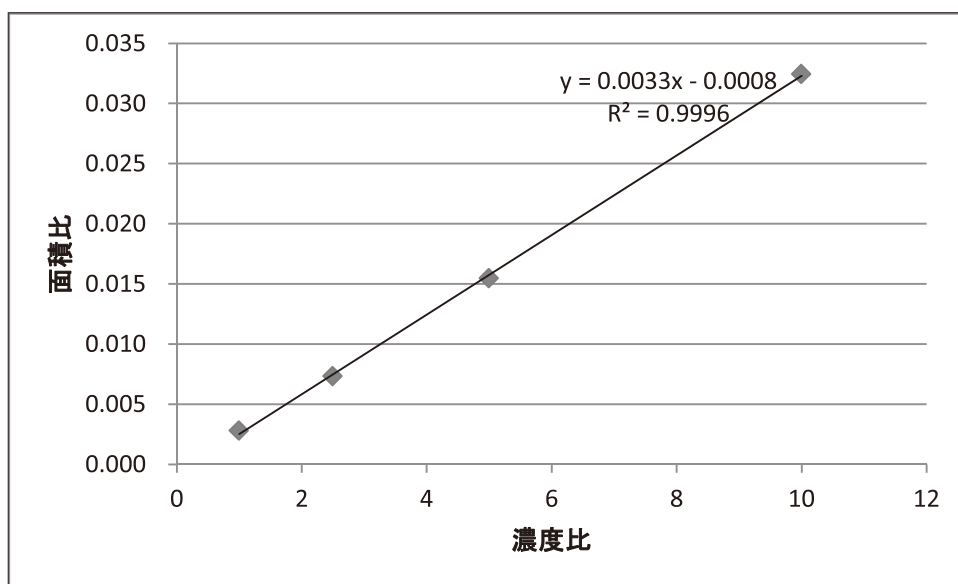


図4 エルカ酸の検量線

表4 フロリジル分画試験結果

物質名	Fr1 : Hex5mL	Fr2 : 10% Ac/Hex5mL	Fr3 : 20%Ac/Hex5mL	Fr4 : 50%AC/Hex5mL
カプリル酸	3	97	0	0
カプリン酸	3	97	0	0
ラウリン酸	3	97	0	0
トリデカン酸	4	96	0	0
ミリスチン酸	3	97	0	0
ペンタデシル酸	4	96	0	0
パルミチン酸	0	100	0	0
マルガリン酸	4	96	0	0
ステアリン酸	0	100	0	0
オレイン酸	1	99	0	0
リノール酸	3	97	0	0
リノレン酸	0	100	0	0
n-ノナデカン酸	5	95	0	0
アラキジン酸	5	95	0	0
ベヘン酸	10	90	0	0
エルカ酸	0	100	0	0

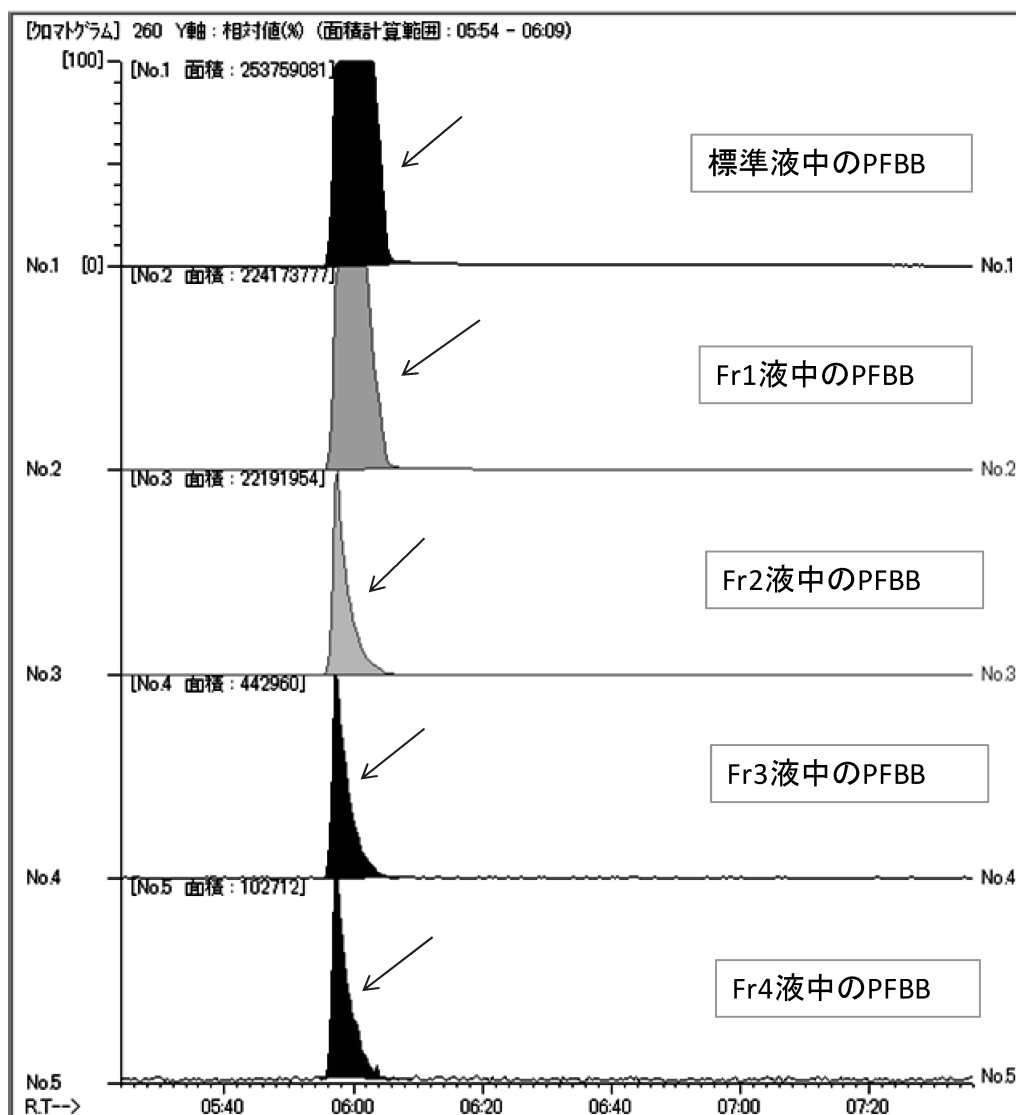


図5 フロリジル各分画中のPFBBクロマトグラム

3.4 IDL及びMDL, MQL

IDL及びMDL, MQLを表5に示す。IDLは0.026(カプリル酸)~0.092 $\mu\text{g/L}$ (ステアリン酸), MQLは0.072(カプリル酸)~3.8 $\mu\text{g/L}$ (リノレン酸)であった。試料0.5Lを最終的に1mLにすることにより, 非常に高感度な分析法が開発でき, 環境水中の微量脂肪酸の分析が可能となった。なお, MDLが1 $\mu\text{g/L}$ を超過したリノレン酸とパルミチン酸は, MDL試験に使用した河川水中に添加濃度以上に対象脂肪酸が含まれていたため, MDLが高くなったが, これら脂肪酸を含まない河川水でMDL試験を実施すれば, 他の脂肪酸と同程度のMDLが得られ

ると考えられる。

MDL試験に使用した河川水の脂肪酸濃度を表6に示す。生活排水の影響を強く受けている地点の水質試料を使用した, 7種類の脂肪酸が検出された。最も濃度が高かったリノレン酸は3.0 $\mu\text{g/L}$ 検出され, その由来は植物油と推察された。パルミチン酸は1.6 $\mu\text{g/L}$ 検出され, その由来は植物油や界面活性剤と推察された。

また, 今回検討した分析法を応用して, 動物性油脂や植物性油脂が公共用水域へ流出した際に, 油脂をけん化し, 脂肪酸とし, その脂肪酸組成から, 原因油脂の究明が期待できる。

表5 IDL及びMDL, MQL

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL ($\mu\text{g/L}$)	MDL ($\mu\text{g/L}$)	MQL ($\mu\text{g/L}$)
カプリル酸	0.5	1	0.026	0.028	0.072
カプリン酸			0.047	0.080	0.21
ラウリン酸			0.048	0.19	0.50
トリデカン酸			0.048	0.050	0.13
ミリスチン酸			0.039	0.25	0.65
ペンタデシル酸			0.042	0.098	0.25
パルミチン酸			0.090	0.57	1.5
マルガリン酸			0.045	0.058	0.15
ステアリン酸			0.092	0.15	0.38
オレイン酸			0.036	0.14	0.36
リノール酸			0.043	0.18	0.46
リノレン酸			0.051	1.5	3.8
n-ノナデカン酸			0.050	0.053	0.14
アラキジン酸			0.048	0.061	0.16
ベヘン酸			0.052	0.080	0.21
エルカ酸			0.058	0.069	0.18

表6 河川水の脂肪酸濃度

物質名	河川水 ($\mu\text{g/L}$)
カプリル酸	N.D
カプリン酸	N.D
ラウリン酸	N.D
トリデカン酸	N.D
ミリスチン酸	0.52
ペンタデシル酸	0.13
パルミチン酸	1.6
マルガリン酸	N.D
ステアリン酸	0.30
オレイン酸	0.39
リノール酸	0.28
リノレン酸	3.0
n-ノナデカン酸	N.D
アラキジン酸	N.D
ベヘン酸	N.D
エルカ酸	N.D

注:N.DはMDL未満、濃度はn=2の平均値

4 まとめ

脂肪酸のPFBB誘導体化による水質分析法を検討し、次の結果を得た。

- ① 直接測定法に比較してPFBB誘導体化測定法は、10倍以上の感度向上が見られた。
- ② フロリジルクリーンアップにより、未反応なPFBBを大部分除去することができた。
- ③ MQLは0.072～3.8 $\mu\text{g/L}$ となり、環境水中の脂肪酸の高感度分析法が開発できた。

文 献

- 1) 吉岡敏行, 山辺真一, 大月史彦, 新 和大: 有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究—GC/MSを用いた水質中脂肪酸メチルエステル (FAME) 等の多成分分析法の検討—, 岡山県環境保健センター年報, 第37号, 29-40, 2013
- 2) 環境庁水質保全局水質管理課: 要調査項目等調査マニュアル(水質, 底質, 水生生物)平成12年12月, 100-107, 2000
- 3) 環境省総合環境政策局環境保険部環境安全課: 化学物質環境実態調査実施の手引き(平成20年度版), 平成21年3月, 2009

【調査研究】

児島湖及び流入河川底泥からのリンの溶出速度について

Elution Rate of Phosphorus from the Sediment of Lake Kojima and Inflow Rivers

藤田和男, 難波あゆみ, 河野裕明, 中野拓也, 山本 淳(水質科)

Kazuo Fujita, Ayumi Nanba, Hiroaki Kouno, Takuya Nakano, Jun Yamamoto

要 旨

笹ヶ瀬橋, 倉敷川橋及び湖心底泥からのリン溶出速度について室内実験を行ったところ, 水温が高く溶存酸素が低いほど溶出速度は大きく, 水温 5 ~ 30℃, 嫌気条件において 0.1 ~ 34 mg/m³/day の範囲にあった。また, 湖内 22 地点を調査したところ流入河川河口部及び湖南部で T-P, COD, 強熱減量及び含泥率が高く, リン溶出速度も高い傾向があった。底層の溶存酸素(月平均値)は夏期に低く冬期に高い傾向があり, 笹ヶ瀬橋では 6.1 ~ 12 mg/L, 倉敷川橋では 5.5 ~ 15 mg/L の範囲にあった。さらに河川部の年間のリン溶出速度の変化を推算したところ, 笹ヶ瀬橋では 0 ~ 13 mg/m³/day, 倉敷川橋では 0 ~ 15 mg/m³/day の範囲で変動していると考えられた。両河川からの年間のリン溶出量は 3,300 kg, 湖水への影響は 4% と計算された。

[キーワード: リン溶出, 底泥, 児島湖]

[Key words: Phosphorous release, Sediment, Lake Kojima]

1 はじめに

近年の児島湖の水質を昭和 50 年代と比較すると, COD, 全窒素については改善が見られるが, 全リンの値は一時期改善が見られたものの最近では横ばいで推移しており, 明らかな改善傾向は見られていない。ちなみに, 湖心の全窒素(T-N)は 1.2 (mg/L) (平成 24 年度平均値)¹⁾と, 環境基準(1 mg/L)を上回っているものの減少傾向にある。一方, 全リン(T-P)は 0.19 (mg/L) (平成 24 年度平均値)¹⁾と, 環境基準(0.1 mg/L)の約 2 倍の値で推移²⁾している。この要因の一つとして, 底泥からの無機態リンの溶出や, 陸上部からの流入が考えられており, 「第 6 期湖沼水質保全計画」では児島湖の水質汚濁メカニズムの解明に向けて, 底泥からのリン溶出因子に関する調査が提言されている。

本報では, 湖内及び流入河川における底泥からのリン溶出量の把握とその要因を解明するため, 湖心及び流入河川のリン溶出状況を把握することを目的とした。リン溶出速度が水温及び溶存酸素によりどの程度変化するかを調べるために, 流入河川 2 地点及び湖内 1 地点で底質の組成調査及びリン溶出実験(水温 10 段階, 嫌気及び好気条件)を行った。併せて, 水中の溶存酸素濃度の変

遷を把握するために, 流入河川 2 地点で底層の溶存酸素の連続測定を行った。また, 湖内のリン溶出速度の面的な分布を調べるために, 湖内 22 地点で採泥し底質の組成を調査し, 室内実験(水温 4 段階, 嫌気条件)によりリン溶出速度を測定した。ここで得られたリン溶出速度と溶存酸素との関係, そして笹ヶ瀬橋及び倉敷川橋地点での底層溶存酸素測定結果から, 両地点での年間のリン溶出速度の変化を推算し, 湖内の水質への影響を検討した。

2 材料および方法

底泥採取地点は, 笹ヶ瀬橋, 倉敷川橋, 湖心 1 (これまで当センターで水質調査を行っている定点観測地点: 北緯 34 度 34 分 57 秒 東経 133 度 56 分 26 秒) 及び湖心 2 (湖心 1 の北側約 140m の地点: 北緯 34 度 35 分 01 秒 東経 133 度 56 分 25 秒) である(図 1)。笹ヶ瀬橋, 倉敷川橋では, 11 回(2013 年 5 月 ~ 2014 年 3 月)採泥した。湖心については, 湖心 1 で 3 回(2013 年 6 月 ~ 8 月), 湖心 2 で 8 回(2013 年 7 月 ~ 2014 年 2 月), エックマン採泥器により採泥した。また, 湖内の面的な状況を把握するために, 2014 年 1 月 28 日に児島湖全域の 22 地点(図

1)で採泥した。底層溶存酸素はウィンクラー・アジ化ナトリウム変法³⁾で測定し、併せて笹ヶ瀬橋及び倉敷川の橋脚下流付近に支柱(積水化学工業製タフポール)

を立て、溶存酸素計(JFEアドバンテック製RINKO W)を河床から50 cm直上に設置した(図1)。

底泥の組成(乾燥減量, 強熱減量, COD, T-P)は,

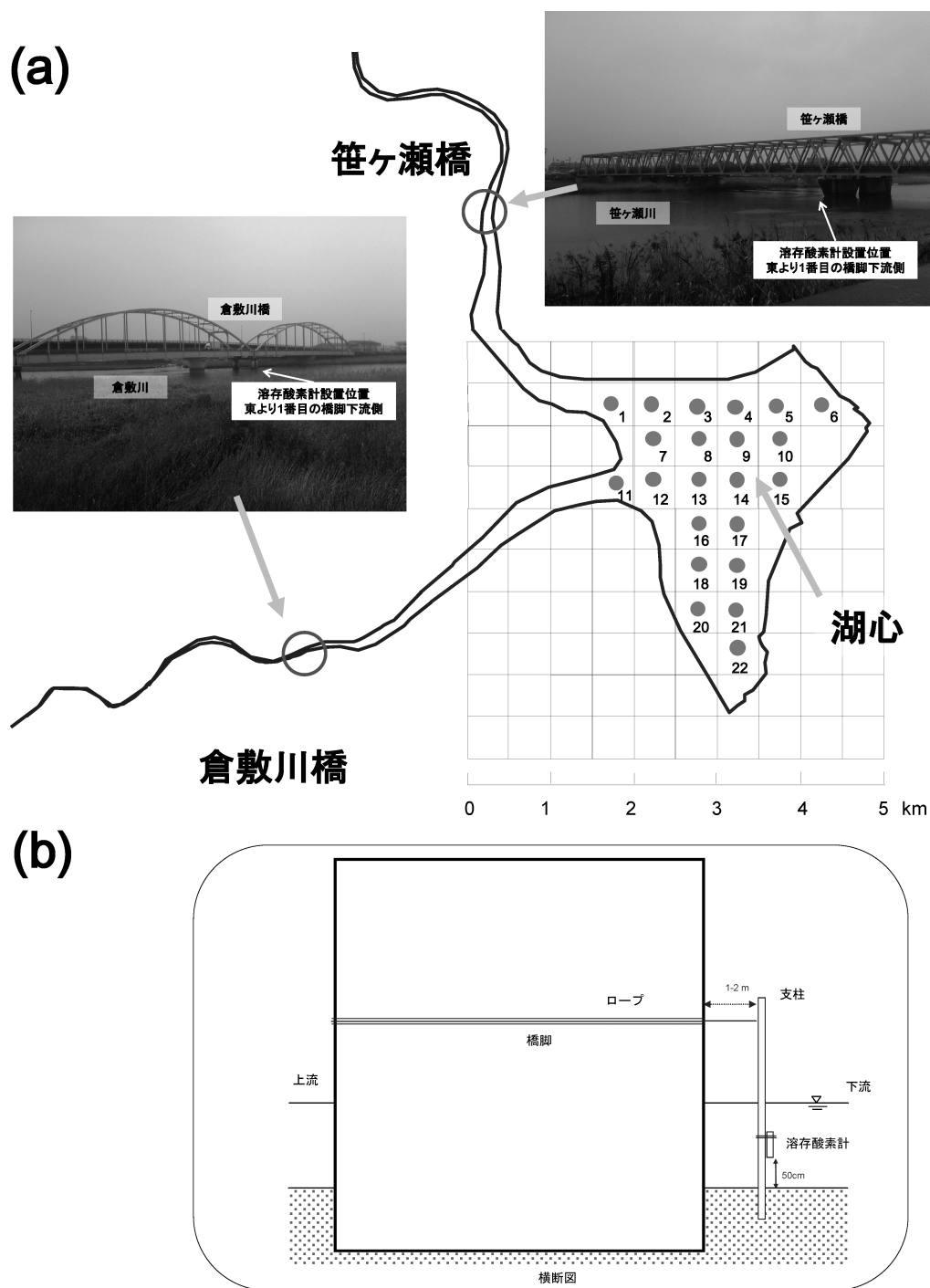


図1 底泥採取地点

(a) 各採泥地点

○：溶存酸素計設置地点, ●：湖内 22 地点

(b) 溶存酸素計設置方法の概念図

底質調査法³⁾に準じて測定した。また、粒径はレーザー回折式粒子径分布測定装置(島津製作所製SALD-3100)で測定した。

溶出実験は、1L容器に底泥を200mL、蒸留水を800mL入れ、好気条件では、上層水を空気で曝気し好気状態(溶存酸素>6 mg/L)を維持した(図2)。また嫌気条件は溶存酸素濃度が概ね1 mg/L以上となったとき窒素を曝気することにより溶存酸素濃度を約0.5 mg/L以下とした。なお、窒素は窒素ガス発生機(ジエールサイエ



図2 溶出実験

ンス製NM910)、または窒素ガスボンベ(純度99.995%以上)から通気した。温度については、4地点(笹ヶ瀬橋、倉敷川橋、湖心1及び2)で恒温器を用いて採水時の水温を参考に5月は20℃、6月は25℃、7月は27℃、8月は30℃、9月は26℃、10月は18℃、11月は16℃、12月は10℃、1月は7℃、2月は5℃とした。また、22地点についての実験では5℃、10℃、20℃及び30℃の4段階に設定し嫌気条件で行った。溶出したリン(PO₄-P)は、工場排水試験法K0102⁴⁾に準じて測定し、溶存酸素は、溶存酸素計(横河電機製YK-200PDO)で測定した。

3 結果および考察

3.1 3地点(流入河川及び児島湖)の底質調査

表1に3地点(笹ヶ瀬橋、倉敷川橋、湖心)での底泥測定結果を示す。底泥を目視で観察したところ、倉敷川橋及び湖心2(北側)は泥質、笹ヶ瀬橋は砂質、湖心1は泥質と砂質の混合した状態であった。土粒子を礫(2,000

表1 底泥調査結果(笹ヶ瀬橋、倉敷川橋、湖心)

月	地点	泥温	平均粒径 μm	含泥率 %	COD mg/g	T-P mg/g	乾燥減量 %	強熱減量 %	リン溶出速度 mg/m ² /day 嫌気 好気	
5月	笹ヶ瀬橋	22.4	139.3	26.3	6.1	0.74	27.8	2.6	18.2	2.9
6月	笹ヶ瀬橋	26.0	-	-	12.1	0.63	28.7	3.2	25.4	2.6
7月	笹ヶ瀬橋	28.2	784.5	0.0	3.5	0.51	26.7	2.0	25.9	15.1
8月	笹ヶ瀬橋	29.9	338.7	0.7	3.7	0.53	27.8	2.1	20.8	11.4
9月	笹ヶ瀬橋	25.6	20.5	-	8.9	0.74	32.4	3.2	18.9	4.8
10月	笹ヶ瀬橋	18.0	522.3	5.6	4.0	0.70	29.5	2.0	0.7	12.2
11月	笹ヶ瀬橋	16.8	340.6	0.0	1.1	0.31	27.8	1.9	0.2	3.6
12月	笹ヶ瀬橋	11.0	471.2	1.8	2.1	0.47	24.5	1.5	0.3	1.4
1月	笹ヶ瀬橋	7.0	442.0	0.1	2.0	0.36	21.9	1.4	0.0	1.1
2月	笹ヶ瀬橋	5.2	404.1	1.2	4.3	0.40	25.4	1.3	0.6	0.7
5月	倉敷川橋	22.2	7.9	98.6	29.5	5.16	49.6	9.6	22.9	7.6
6月	倉敷川橋	29.8	-	-	30.5	4.39	46.5	10.2	23.9	13.3
7月	倉敷川橋	28.0	14.9	89.0	24.0	5.12	38.2	11.5	28.3	4.6
8月	倉敷川橋	30.5	13.4	90.1	22.8	3.13	32.8	6.4	28.3	10.6
9月	倉敷川橋	24.8	7.01	98.6	25.8	3.06	49.3	9.6	17.8	11.9
10月	倉敷川橋	18.5	12.1	91.6	22.3	3.18	53.7	15.8	2.0	12.6
11月	倉敷川橋	17.0	9.8	96.4	20.4	3.53	69.3	17.1	1.2	13.2
12月	倉敷川橋	11.2	10.8	95.6	25.8	4.34	50.3	8.8	4.2	9.5
1月	倉敷川橋	8.8	11.0	96.1	15.7	5.28	45.8	8.0	1.1	7.5
2月	倉敷川橋	5.1	11.1	95.3	25.9	4.09	70.3	15.5	1.1	3.6
6月	湖心1	30	-	-	4.4	0.37	29.3	2.0	16.1	1.0
7月	湖心1	26.2	15.7	50.9	5.2	0.51	34.7	2.4	19.9	0.1
8月	湖心1	31.2	10.3	62.9	4.6	0.30	26.4	2.1	28.6	3.2
7月	湖心2(北側)	26.0	4.18	82.8	17.5	0.74	32.5	4.5	33.6	8.2
8月	湖心2(北側)	31.3	16.2	71.0	13.3	0.68	30.5	4.7	33.8	14.2
9月	湖心2(北側)	24.6	10.1	77.5	11.7	0.48	36.5	4.6	26.3	1.6
10月	湖心2(北側)	19.4	11.2	95.1	16.5	1.15	67.9	14.5	0.1	9.9
11月	湖心2(北側)	17.2	37.9	96.3	14.9	1.26	72.2	15.7	0.9	11.0
12月	湖心2(北側)	10.0	10.6	66.0	16.6	1.48	55.4	8.9	0.0	9.9
1月	湖心2(北側)	8.2	8.6	98.9	12.8	0.83	51.9	8.6	0.0	12.2
2月	湖心2(北側)	5.5	24.7	66.2	16.2	0.81	33.8	4.3	0.0	0.1

μm以上), 砂 (62.5 ~ 2,000 μm), シルト (3.9 ~ 62.5 μm), 粘土 (3.9 μm以下) の区分で分類すると, 測定期間内での粒径の平均値は, 倉敷川橋が 12 μm, 湖心 1 が 13 μm, 湖心 2 が 15 μm でいずれもシルトが多く, 笹ヶ瀬橋は 358 μm で砂が多かった。また, 今回の 4 地点では, COD, T-P, 強熱減量はいずれも笹ヶ瀬橋及び湖心 1 では低く湖心 2 や倉敷川橋で高かった。T-P (平均値) は, 笹ヶ瀬橋では 0.64 mg/g, 倉敷川橋は 4.2 mg/g, 湖心 1 は 0.41 mg/g, 湖心 2 は 0.93 mg/g であった。

3.2 22 地点 (湖内) の底質調査

底泥の面的な状況について, 湖内 22 地点の粒径 (平均粒径, 含泥率), COD, T-P, 乾燥減量及び強熱減量の調査結果を表 2 に示す。粒径は笹ヶ瀬川河口部, 倉敷川河口部及び湖南部で小さく, COD, T-P, 乾燥減量及び強熱減量は笹ヶ瀬川河口部, 倉敷川河口部及び湖南部で高い傾向があり, これらの区域で底泥の汚濁 (泥質化)

が進んでいると考えられた。平均値は含泥率 71 %, COD 23 mg/L, T-P 1.0 mg/L, 乾燥減量 40 %, 強熱減量 5 % であった。湖心付近 (地点 9 及び地点 14) の含泥率, COD, T-P, 乾燥減量及び強熱減量の値は湖全面の平均的な値であった。

3.3 3 地点 (流入河川及び児島湖) のリン溶出実験

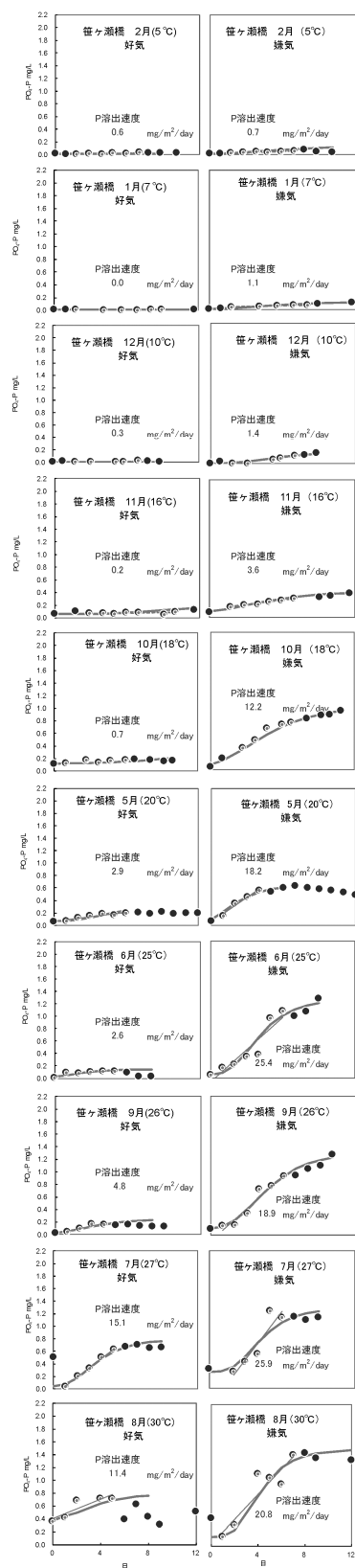
リン溶出実験について, 各水温での実験結果を図 3 に示し, 溶出速度を水温に対してプロットしたものを図 4 に示す。いずれの地点でも, 嫌気条件で好気条件よりも溶出速度が高かった。また水温が高いほど溶出速度が高い傾向があった。今回の水温 (5 ~ 30℃) 及び嫌気条件の溶出速度は笹ヶ瀬橋では 0.7 ~ 26 mg/m²/day, 倉敷川橋では 3.6 ~ 28 mg/m²/day, 湖心では 0.1 ~ 34 mg/m²/day の範囲にあった。文献値⁵⁾では笹ヶ瀬川, 倉敷川及び湖内での夏期 (27℃), 嫌気条件での溶出速度は 9 ~ 47 mg/m²/day であった。

表 2 底泥調査結果 (湖内 22 地点)

地点	平均粒径 μm	含泥率 %	COD mg/g	T-P mg/g	乾燥減量 %	強熱減量 %	リン溶出速度 mg/m ² /day 嫌気			
							5℃	10℃	20℃	30℃
地点 1 笹ヶ瀬川河口部	11.4	81.2	53.9	1.89	53.0	10.9	1.0	3.9	23.2	24.6
地点 2 笹ヶ瀬川河口部	12.4	91.7	44.5	2.07	59.3	11.1	1.7	6.8	21.9	11.2
地点 3	20.2	83.8	35.1	1.79	49.1	7.7	0.0	4.3	22.0	26.8
地点 4	10.7	93.4	35.1	1.20	58.1	9.3	7.4	8.9	34.3	15.3
地点 5	409.8	1.9	2.1	0.37	26.0	1.1	0.0	9.1	1.6	1.3
地点 6	598.2	6.4	2.7	0.26	25.0	1.3	0.2	0.0	0.4	0.8
地点 7	22.2	58.8	6.8	0.56	30.0	2.6	0.0	0.0	2.8	8.2
地点 8	14.3	55.5	8.4	0.62	29.3	2.3	0.4	0.7	6.0	5.6
地点 9	15.6	55.0	9.6	0.65	31.3	2.7	0.1	1.7	6.7	9.4
地点 10	10.8	63.2	13.1	0.48	32.8	3.2	0.0	0.0	0.9	1.4
地点 11 倉敷川河口部	12.4	91.4	38.7	2.50	49.6	8.5	1.1	6.5	7.2	17.9
地点 12 倉敷川河口部	15.3	90.4	36.9	0.30	48.0	7.7	1.5	1.6	7.2	19.6
地点 13	14.7	64.6	11.3	1.12	31.0	3.1	2.2	0.2	1.0	3.7
地点 14	3.8	89.7	24.3	1.11	40.4	5.6	0.1	0.2	5.2	10.0
地点 15	11.2	61.7	9.4	0.59	30.6	3.0	0.0	0.0	1.9	2.2
地点 16	10.2	64.1	9.7	0.26	30.7	2.9	0.0	0.0	1.1	2.3
地点 17	11.3	73.0	18.9	0.81	35.4	4.7	0.0	0.0	2.0	1.9
地点 18	11.7	74.7	20.6	0.92	35.9	4.7	0.1	0.0	0.4	2.1
地点 19	15.0	88.5	30.3	1.39	50.0	7.3	1.6	2.2	10.8	21.1
地点 20 湖南部	8.0	97.5	27.7	1.36	51.2	7.5	1.5	0.7	11.0	19.9
地点 21 湖南部	11.2	86.5	24.5	1.36	53.5	7.9	0.6	0.2	2.2	7.9
地点 22 湖南部	11.9	93.7	34.0	1.23	43.9	6.6	0.4	0.0	0.3	3.2

笹ヶ瀬橋

好気 嫌気



倉敷川橋

好気 嫌気

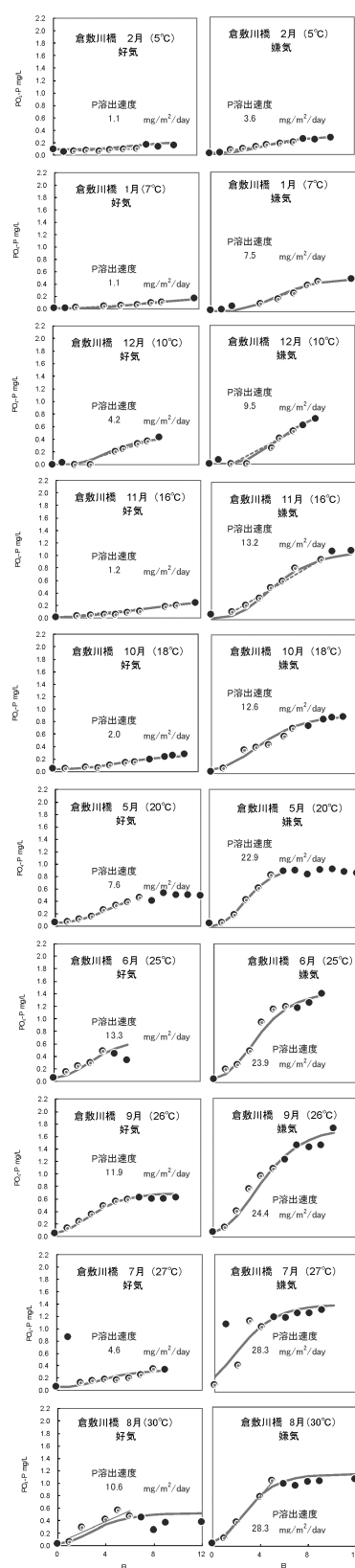
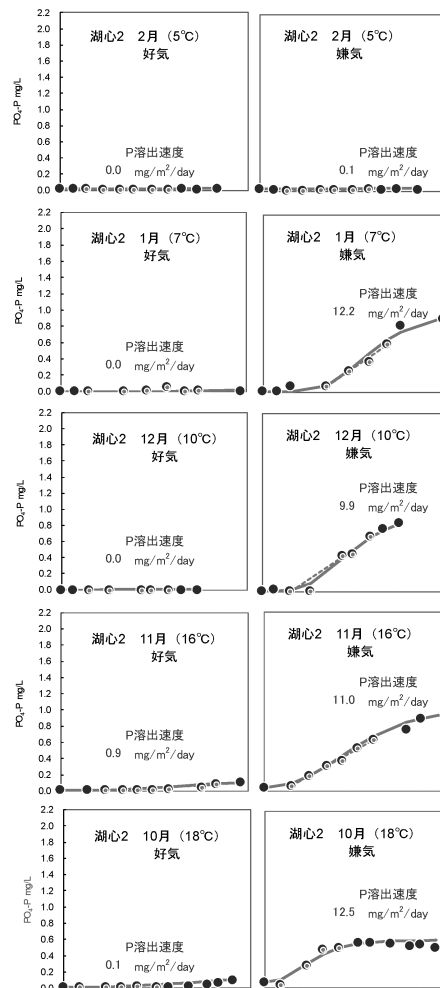


図 3 (a) 溶出実験結果 (笹ヶ瀬橋及び倉敷川橋)

湖心2

好気

嫌気



湖心1

好気

嫌気

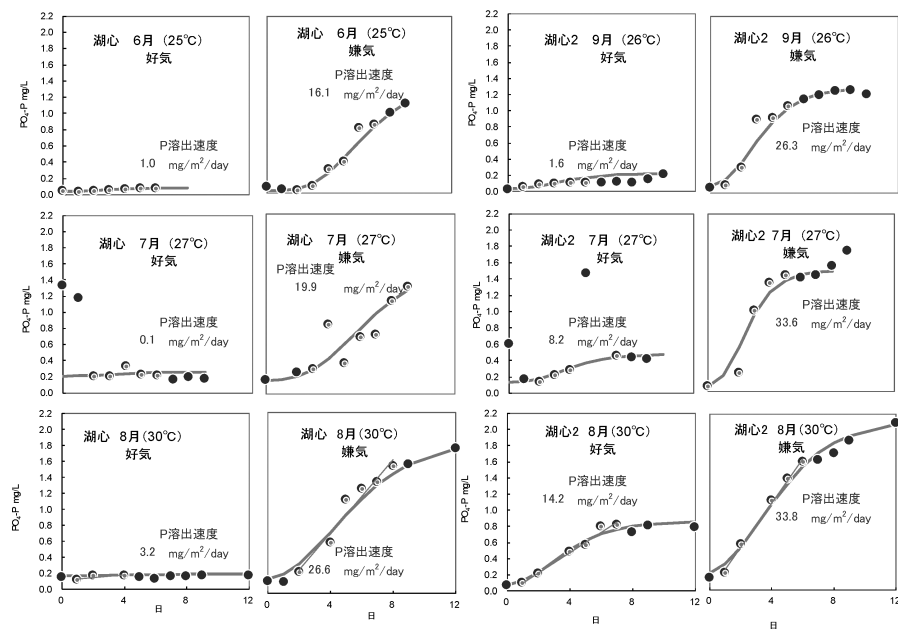


図 3 (b) 溶出実験結果 (湖心 1 及び湖心 2)

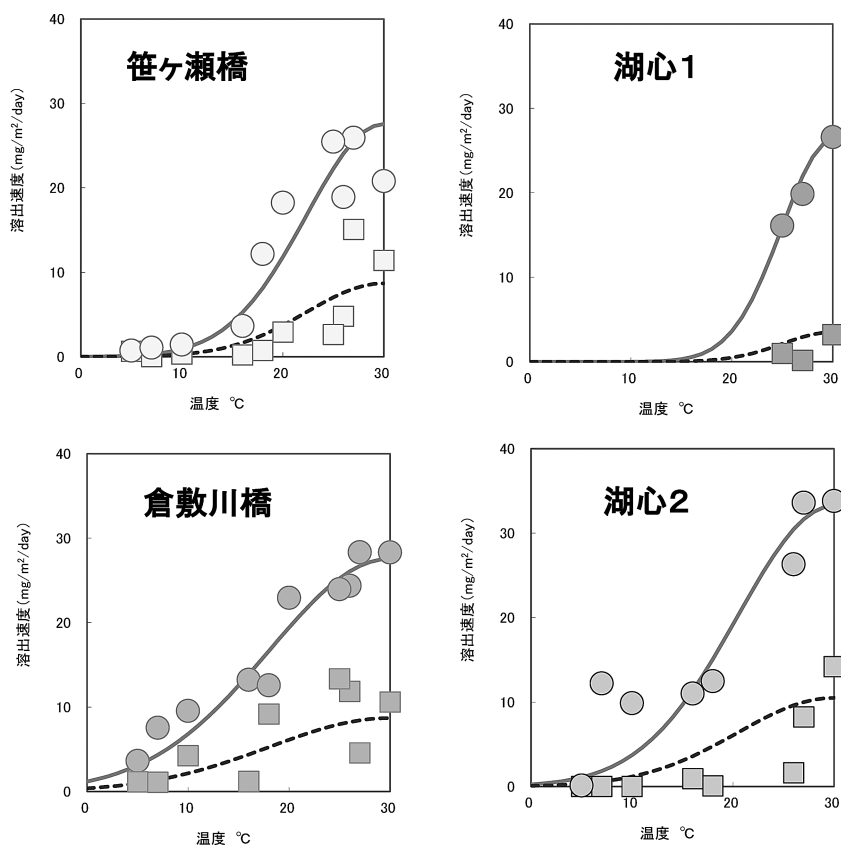


図4 溶出実験結果(水温と溶出速度の関係)

-○- : 嫌気条件
--□-- : 好気条件

3.4 22地点(流入河川及び児島湖)のリン溶出実験

22地点の5℃、10℃、20℃及び30℃での溶出実験結果を図5に示す。また各地点の水温と溶出速度の関係を図6及び図7に示す。いずれの地点も水温が高いほどリン溶出速度が高い傾向があった。リン溶出速度は笹ヶ瀬川河口部、倉敷川河口部及び湖南部で高かった。COD、T-P及び強熱減量も笹ヶ瀬川河口部、倉敷川河口部及び湖南部で高く、COD、T-P、強熱減量が高い地点でリン溶出速度が高い傾向があった。

3.5 3地点(流入河川河口部及び湖心)の底層溶存酸素素及びリン溶出速度の推算

笹ヶ瀬橋及び倉敷川橋地点での底層の溶存酸素濃度を図8(a)に示す。溶存酸素濃度は夏期に低く冬期に高く、月毎の平均値は笹ヶ瀬橋では6.1～12 mg/L、倉敷川橋では5.5～15 mg/Lの範囲にあった。

室内実験で得られたリン溶出速度と溶存酸素濃度及び水温の関係、そして笹ヶ瀬橋及び倉敷川橋地点の底層の溶存酸素濃度及び水温の変遷から、年間のリン溶出量の変遷を推算した(図8(b))。リン溶出速度(月平均値)は笹ヶ瀬橋で0～13 mg/m²/dayの範囲で変化し、年間の平均値は4.2 mg/m²/dayと計算された。また倉敷川橋では0～15 mg/m²/dayの範囲で変化し、年間の平均値は4.3 mg/m²/dayと計算された。年間のリン溶出量は笹ヶ瀬橋で1.1g/m²/year、倉敷川橋で0.92g/m²/yearと計算された。

これまでに、児島湖について室内の溶出試験で報告された値^{5～8)}は0～47 mg/m²/dayの範囲であった。米国Shagawa湖では夏期に3.1～4.2 mg/m²/day、湯乃湖では0～5 mg/m²/day⁹⁾であった。また手賀沼の沼内2カ所(手賀沼中央および根戸下)では、夏期に10 mg/m²/day(手賀沼中央)および30 mg/m²/day(根戸下)が報告されている。本報の値

も含め、概ねリン溶出速度は0～40 mg/m²/dayの範囲内にあると考えられる。

得られた溶出実験結果から、河川及び湖内からの溶出量を推算した。過去の報告¹⁰⁾では笹ヶ瀬橋下流部の一部(0.10 km²)及び倉敷川下流部の一部(0.20 km²)の6ヶ月間(27℃:3ヶ月及び5℃:3ヶ月間)のリン溶出量はそれぞれ146 kg及び348 kgと試算されている。同じ面積、期間及び温度条件について今回の調査結果を当てはめ試算したところ各リン溶出量は106 kg及び207 kgとなり、文献値より低いが概ね同等の範囲にある値と考えられた。次に両河川全域からの溶出量を試算するために、河川及び湖内の面積を仮定(笹ヶ瀬川:0.88 km²、倉敷川:1.24 km²、湖内:10.88 km²)¹⁰⁾してリン溶出量を推算すると河川3,300 kg/year(笹ヶ瀬川1,300 kg/year、倉敷川1,900 kg/year)、湖内12,000 kg/year、河川と湖内の合計は15,000 kg/yearであった。

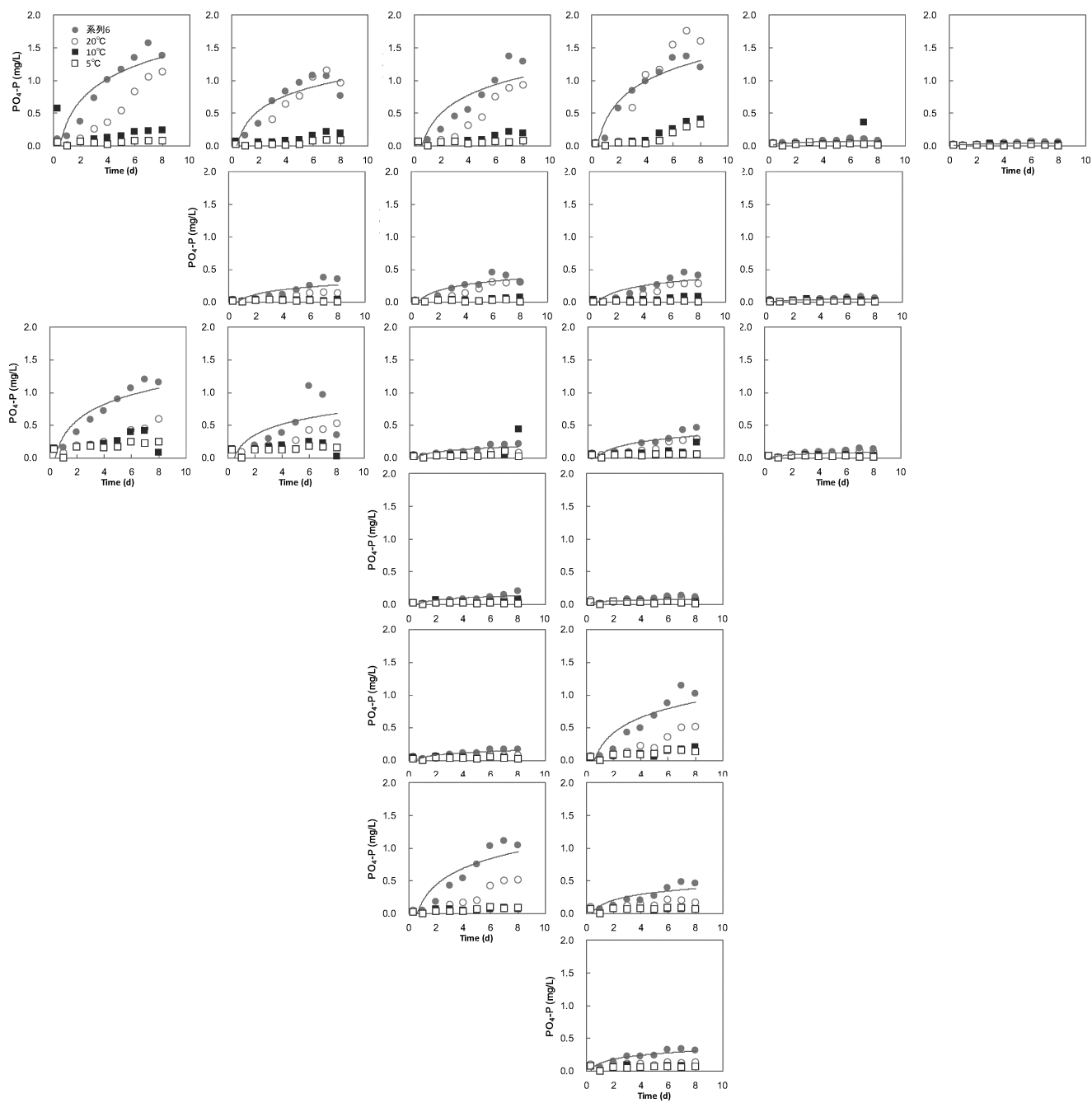


図5 底泥溶出実験結果(平成25年度)

採取日:平成26年1月28日

●:30°C, ○:20°C, ■:10°C, □:5°C

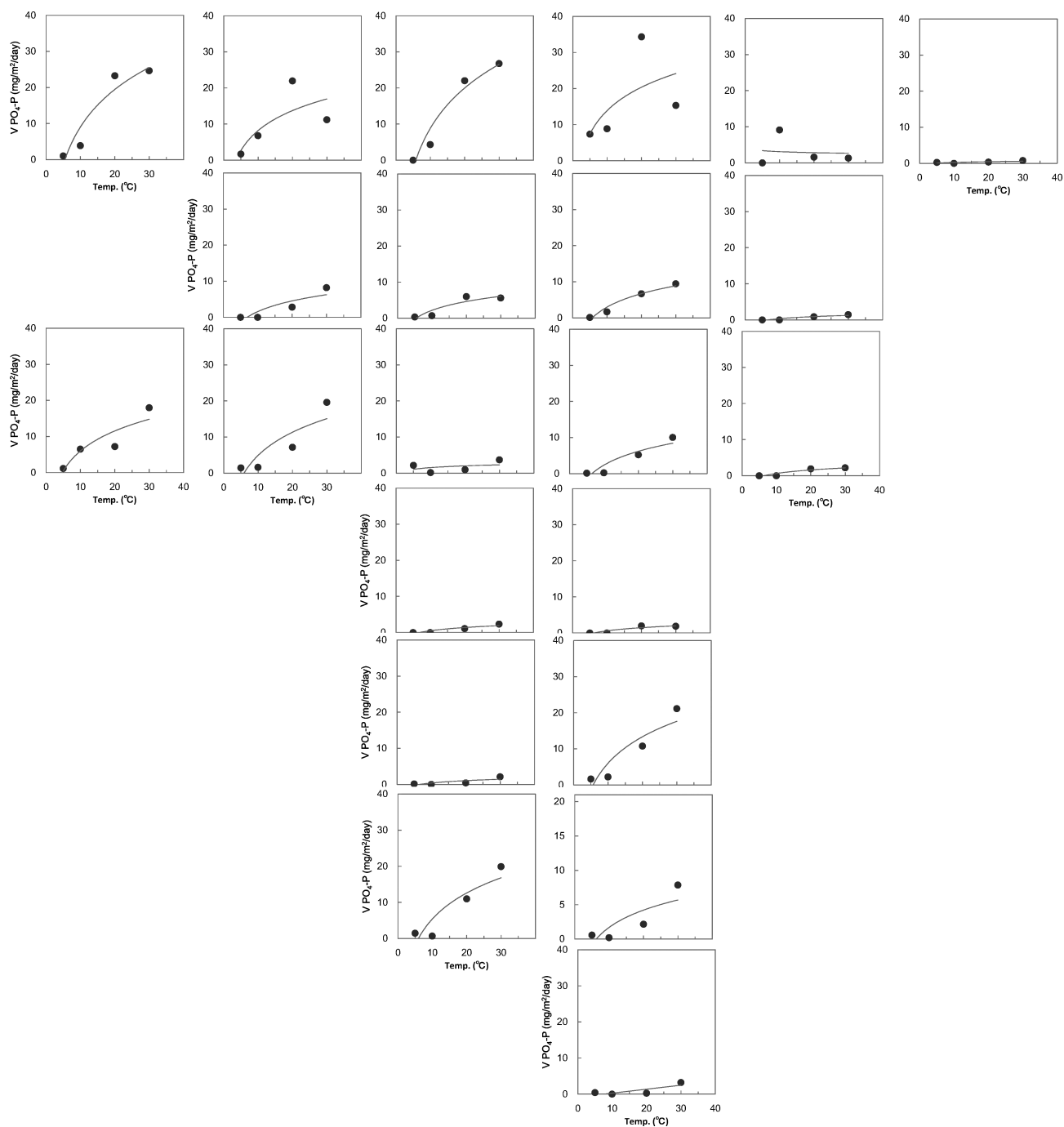
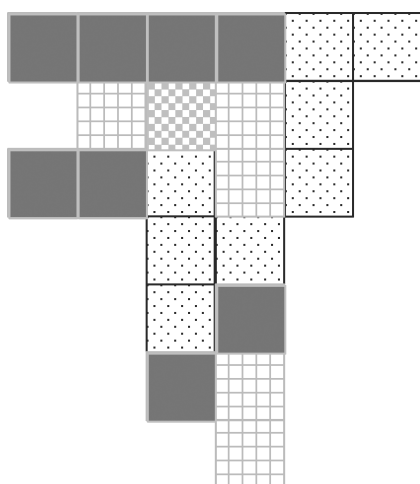
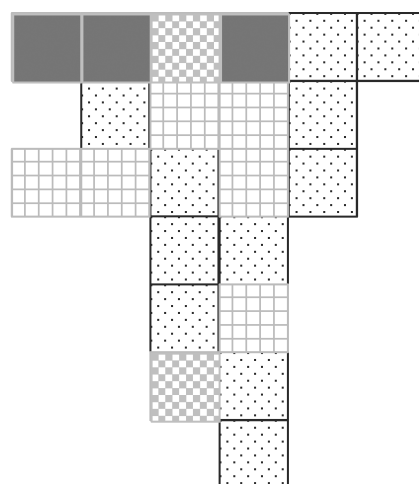


図6 底泥溶出実験結果(各水温での溶出速度)

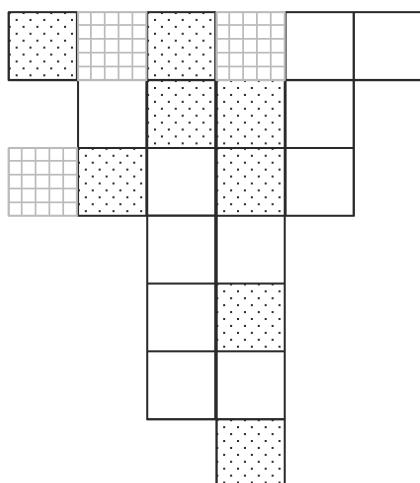
採取日：平成26年1月28日



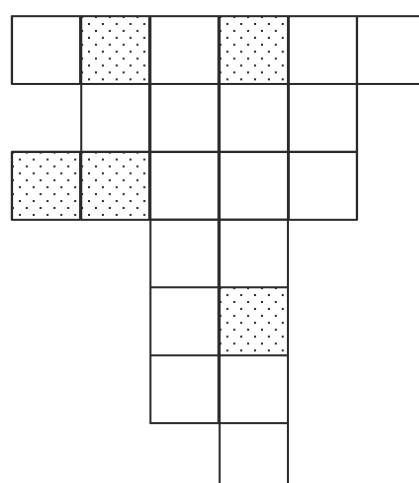
30°C
 平均値 11 mg/m²/day



20°C
 平均値 8.5 mg/m²/day



10°C
 平均値 1.8 mg/m²/day



5°C
 平均値 0.8 mg/m²/day

図7 室内実験でのリン溶出速度(児島湖22地点)

底泥採取日：2014年1月28日

- : 0 mg/m²/day
- ◻ : 0 ~ 4 mg/m²/day
- ▤ : 5 ~ 9 mg/m²/day
- ▥ : 10 ~ 19 mg/m²/day
- : 20 mg/m²/day以上

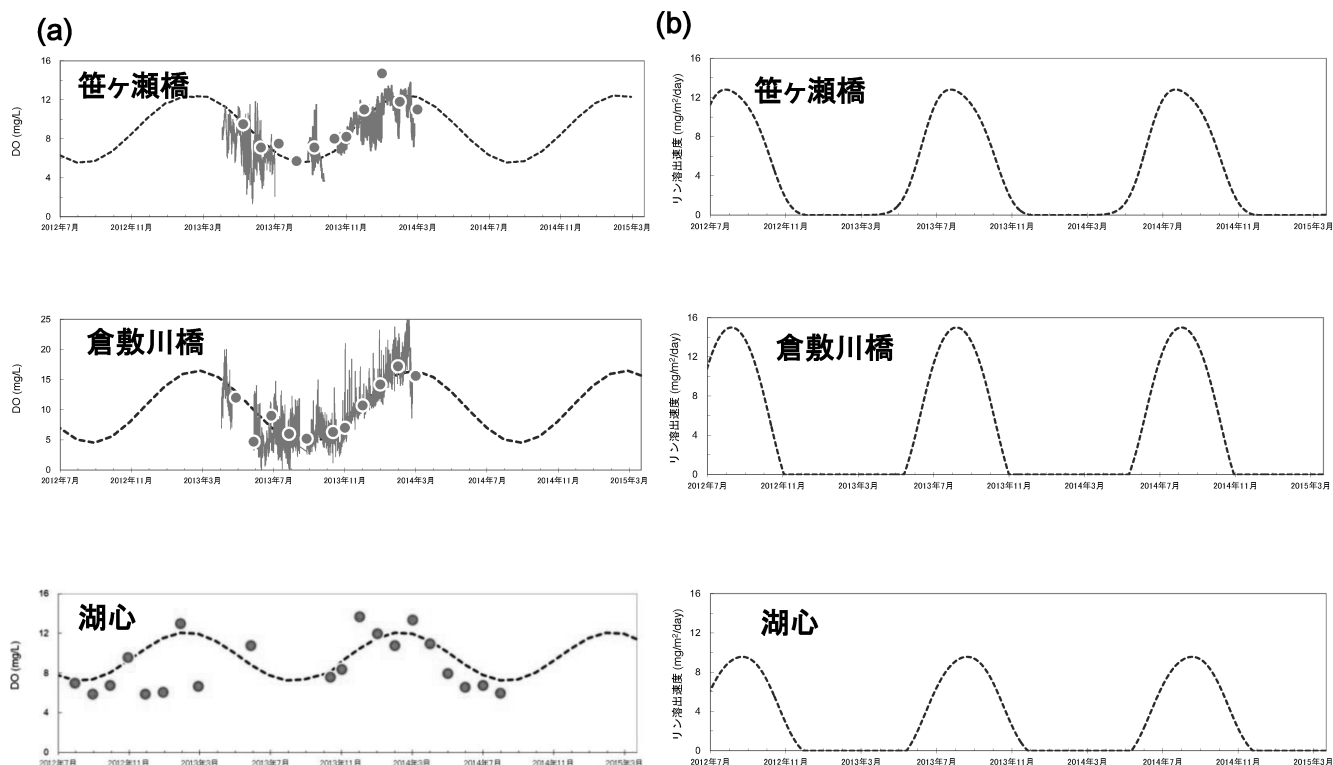


図8 底層の溶存酸素濃度及びリン溶出速度推算値

(a) 底層の溶存酸素

—: 測定値(DO計)、●: 測定値(ウィンクラー-アジ化ナトリウム変法)、
----: 予想値

(b) リン溶出速度推算値

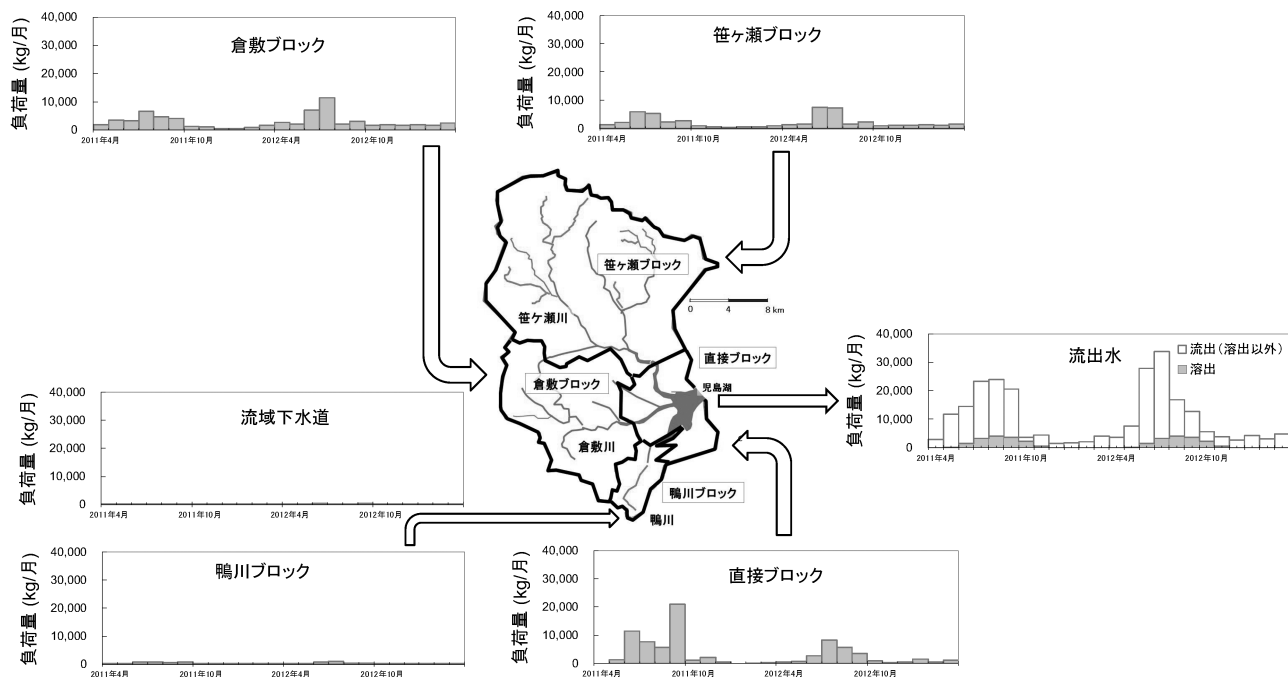
----: 予想値

次に児島湖のリン収支の簡単なモデルを仮定し、得られた溶出速度を用いて、河川及び湖内からの溶出による影響を検討した。公共用水域¹⁾の最新データが2012年度であることから、モデルでは2011～2012年度の水質を計算した。児島湖流域の流入水を5ブロック(笹ヶ瀬川流域：笹ヶ瀬ブロック、倉敷川流域：倉敷ブロック、鴨川流域：鴨川ブロック、直接流入域：直接ブロック及び流域下水道)に分け(図9)、各ブロックの水質^{1,11,12,13,14)}及び流量^{12,13,14,15,16)}から負荷量を計算し(図9a,b)、河川及び湖内からの溶出による水質への影響を推算した(図9c)。

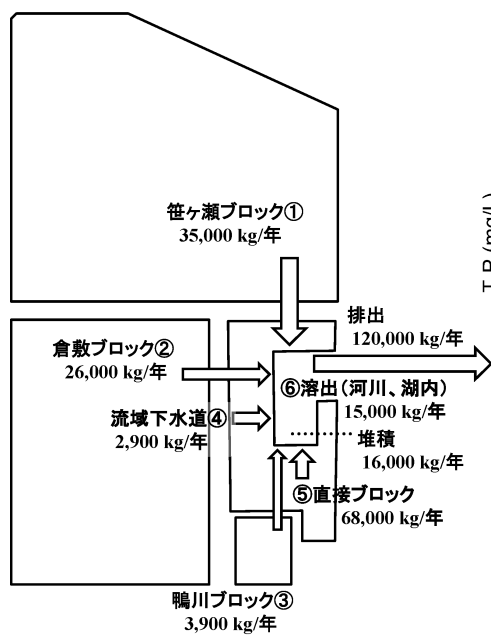
流入水が直接ブロック以外の主要な4ブロック(笹ヶ瀬ブロック、倉敷ブロック、鴨川ブロック及び流域下水道：全流水入量の77%^{14,15)})とした場合の流入水のT-P推算値(年平均値)は0.14 mg/Lで、湖心の実測値(年平均値)0.19 mg/L^{1,11)}よりもかなり低く、特に夏期(6～9月、

平均値)に湖心(実測値)では0.31 mg/Lに上昇するが流入水(推算値)は0.20 mg/Lと低かった(図9c, 推算1)。次に流入水に直接ブロックを加えた5ブロック(笹ヶ瀬ブロック、倉敷ブロック、鴨川ブロック、流域下水道及び直接ブロック)としたときのT-P推算値(年平均値)は0.21 mg/Lで湖心の実測値(0.19 mg/L)よりやや高いが近い値が見積もられ、特に夏期(6～9月、平均値)の流入水のT-Pは0.34 mg/Lと推算され、実測値(湖心)0.31 mg/Lよりやや高いが夏期の上昇をある程度再現していた(図9c, 推算2)。直接ブロックは流入水量としては全流入水量の23%と少ない^{14,15)}が、児島湖のリン物質収支から考えると、夏期における湖水のT-P上昇の主要因の一つと考えられた。

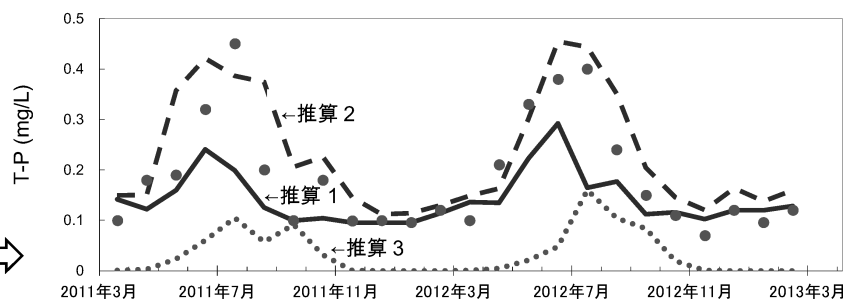
両河川からの溶出の影響は年平均4%(湖内のリン濃度0.19 mg/Lに対し0.007 mg/L増加)と推算された。また河川と湖内を合わせた溶出の影響は年平均18%(0.03



a 負荷量



b 概念図



T-P (年平均値)		
● 実測値	0.19 mg/L	
..... 推算3	0.03 mg/L	⑥溶出
- - - 推算2	0.21 mg/L	ブロック①+②+③+④+⑤直接ブロック
— 推算1	0.14 mg/L	ブロック①+②+③+④

c 実測値及び推算値

図9 リン溶出の水質への影響(推算)

a: 負荷量, b: モデル概念図, c: 実測値及び推算値

mg/L増加)と推算された(図 9c, 推算 3)。モデルでは各ブロックから流入するリン(合計 140,000 kg/year)の一部(合計 31,000 kg/year)が河川及び湖内の底泥として沈殿し, そのうち 15,000 kg/yearが夏期に溶出すると仮定された(図 9bに推算値を示す)。夏期(6～9月)に湖内のT-Pが平均 0.31 mg/Lまで上昇する要因を項目別に推算すると, 溶出の寄与率が14%, 直接ブロックから湖内へ流入する水の寄与率が57%(ただし沈殿・溶出分を除く), 直接ブロック以外の4ブロックから湖内へ流入する水の寄与率が43%(ただし沈殿・溶出分を除く)と推算された(ただし各ブロックの流入水におけるリンの沈殿及び溶出の割合は同じと仮定して計算している)。

今回の計算結果は限られたデータに基づいた推算値であり, 計算の基礎データとなる流域内の調査を加え, より長期的な期間に当てはめて検討する必要があると考える。直接ブロックの影響については, 推算に用いた水質データが直接ブロックの全水田面積の一部(24%)のみでの調査結果であることから, より多くの水田を調査し推算値を補正する必要がある。また溶出の影響については, 推算に用いた湖内の溶存酸素濃度のデータが連続測定ではなく月1回の実測値であることから, 今後は湖内で底層溶存酸素の連続調査及び室内実験を行い, 今回得られた結果と合わせて底泥からのリン溶出の影響を再検討する予定である。

4 まとめ

- ① 笹ヶ瀬橋, 倉敷川橋及び湖心底泥のリン溶出速度を室内実験で調査し, 水温 5～30℃, 嫌気条件において 0.1～34 mg/m²/day の範囲にあった。
- ② 流入河川河口部及び湖南部でT-P, COD, 強熱減量及び含泥率が高く, リン溶出速度も高い傾向があった。
- ③ 底層溶存酸素(月平均値)は笹ヶ瀬橋では 6.1～12 mg/L, 倉敷川橋では 5.5～15 mg/L の範囲にあり, 夏期に低く冬期に高かった。
- ④ 年間のリン溶出速度は笹ヶ瀬橋で 0～13 mg/m²/day, 倉敷川橋で 0～15 mg/m²/day と推算された。両河川からの年間のリン溶出量は 3,300 kg, 湖水への影響は 4%と推算された。

文 献

- 1) 岡山県環境文化部環境管理課：平成 24 年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2013
- 2) 岡山県：児島湖ハンドブック, 15-17, 2013
- 3) 環境省水・大気環境局編：底質調査法, 2012
- 4) 平河喜美男編：工場排水試験法 JIS-K0102, 日本規格協会, 東京, 2010
- 5) 岡山県, (株)ウェスコ：平成 3 年度児島湖水質保全計画基礎調査業務報告書, 83, 1992
- 6) 藤田和男, 鷹野洋, 坂本祐基, 宮崎清：児島湖底泥からの窒素・リンの溶出, 岡山県環境保健センター年報, 33, 25-28, 2009
- 7) 山本弘捷, 熊城一男, 清水光郎, 畑宏：底質中の栄養塩類の挙動に関する調査研究 第 7 報 児島湖底泥からの栄養塩の溶出について, 岡山県環境保健センター年報, 8, 155-158, 1984
- 8) 熊城一男, 山本淳, 吉村広：児島湖底質からの窒素・リンの溶出について, 岡山県環境保健センター年報, 10, 173-175, 1986
- 9) 細見正明：底質からの窒素およびリンの溶出とその制御, 水環境学会誌, 16, 91-95, 1993
- 10) 岡山県, (株)エクスラン・テクニカル・センター：平成 22 年度児島湖環境負荷影響調査業務調査結果報告書, 43, 2011
- 11) 岡山県環境文化部環境管理課：平成 23 年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2012
- 12) 平成 23 年度児島湖流域下水道維持管理年報, 23, 2012
- 13) 平成 24 年度児島湖流域下水道維持管理年報, 24, 2013
- 14) 岡山県：平成 25 年度指定湖沼汚濁負荷量削減状況調査報告書, 2014
- 15) 岡山県：平成 24 年度指定湖沼汚濁負荷量削減状況調査報告書, 2013
- 16) 岡山県：平成 17 年度指定湖沼汚濁負荷量削減状況調査報告書, 2006

いてサンプリング測定を行った。なお、測定手法は文部科学省放射能測定法シリーズ(7「ゲルマニウム半導体検出器によるガンマ線スペクトロメトリー」(平成4年改訂)、同13「ゲルマニウム半導体検出器等を用いる機器分析のための試料の前処理法」(昭和57年)、同14「ウラン分析法」(平成14年改訂)、同16「環境試料採取法」(昭和58年)、同19「ラジウム分析法」(平成2年)、同27「蛍光ガラス線量計を用いた環境 γ 線量測定法」(平成14年))及びふっ素イオン電極法(JIS K0101-1979)に準じて行った。また、各調査対象メッシュにおける調査地点の選定では、河川水は環境基準点から、その他の項目については長期にわたり周辺環境の変化が比較的少ないと考えられる公共施設から選定した。

2.1 空間 γ 線線量率

2.1.1 積算線量計法

設置した蛍光ガラス線量計(RPLD)について四半期毎に、RPLD測定装置(AGCテクノグラス株式会社製FGD-201)を用いて測定した。なお、測定は5検体測定した平均値を測定値とした。

2.1.2 サーベイメータ法

四半期毎にNaIシンチレーション式サーベイメータ(日立アロカメディカル株式会社製TCS-171)を用い、地上高1mで測定した。なお、測定は時定数30秒で、5回測定した平均値を測定値とした。

2.2 放射性核種及びふっ素濃度

河川水及び土壌試料を採取、前処理し、ゲルマニウム半導体検出器(CANBERRA社製GC-1520/GR-3019)を用いて人工放射性核種濃度を測定した。土壌はU-8容器に、河川水は直接2Lマリネリ容器に詰めてそれぞれ80,000秒測定した。

ウラン238(以下「U-238」という。)測定について、土壌は α 線波高分析装置(CANBERRA社製 α -Analyst)を用い、河川水はICP-MS分析装置(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製iCAPQc)を用いて測定した。ラジウム226(以下「Ra-226」という。)測定には、 2π ガスフロー自動測定装置(日立アロカメディカル株式会社製LBC-4311-R)を用い、ラドン222(以下「Rn-222」という。)測定には液体シンチレーション測定装置(日立アロカメディカル株式会社製LSC-7400)を用いた。また、ふっ素(以下「F」という。)濃度測定にはFイオンメーター(サーモエレクトロン社製920AQ)を用いて測定した。

なお、放射性核種の測定においては、計数誤差の3倍を超えた場合を有意値とし、これ以下の場合是不検出(ND)とした。

2.2.1 土壌

表土(0～5cm)を採取し、2mmの篩を通したものを人工核種及びU-238濃度測定用試料とし、300 μ mの篩を通したものをRa-226測定用に、150 μ mの篩を通したものをF測定用試料とした。

2.2.2 河川水

河川水を採取し、U-238測定用試料には河川水500mLに対して硝酸(68%)1mLを、Ra-226測定用試料には河川水5Lに対して塩酸(35%)10mLを加え試料とした。また、Rn-222及びF測定用試料には試薬等を加えず試料とした。

3 結果及び考察

3.1 空間 γ 線線量率

3.1.1 積算線量計(RPLD)及びサーベイメータによる測定結果

RPLD測定結果を表2に、サーベイメータ測定結果を表3に示す。平成25年度の測定範囲はRPLDが48～107nGy/h、サーベイメータが30～100nGy/hであり、平成24年度の測定結果²⁾(RPLD:46～109nGy/h、サーベイメータ:22～106nGy/h)および福島第一原発事故発生前である平成17年度～平成20年度の全国の測定値(サーベイメータ:20～113nGy/h)³⁾の範囲と同程度であった。A1地点においては、他の地点と比較して空間 γ 線線量率が高い傾向を示したが、これは花崗岩地質の影響⁴⁾⁵⁾と考えられた。

3.2 放射性核種及びF濃度調査

3.2.1 土壌

土壌中各種測定項目濃度について、平成25年度の結果を表4に示す。また、平成24年度の測定結果を表5に示す。全ての検体でセシウム134(以下「Cs-134」という。)は検出されず、福島第一原発事故の影響は認められなかった。また、セシウム137(以下「Cs-137」という。)はB4地域において最大 59.5 ± 1.1 Bq/kg乾が検出された。これは、平成24年度に同地点で測定した 53.6 ± 1.0 Bq/kg乾と同程度であり、また、福島第一原発事故発生前である平成17年度～平成21年度の全国の測定値(ND～77Bq/kg)の範囲³⁾内であることから、過去に行われ

表2 積算線量計 (RPLD) 測定結果 (平成 25 年度)

単位: nGy/h

測定エリア	第1四半期	第2四半期	第3四半期	第4四半期	H25年度 測定範囲	H24年度 測定範囲
A1	104	102	107	103	102 ~ 107	101 ~ 109
A2	99	96	102	100	96 ~ 102	90 ~ 103
A3	70	69	77	71	69 ~ 77	68 ~ 71
B1	68	67	70	68	67 ~ 70	69 ~ 70
B2	94	93	96	89	89 ~ 96	90 ~ 96
B3	77	77	82	78	77 ~ 82	75 ~ 80
B4	52	51	53	48	48 ~ 53	46 ~ 52
C1	85	86	99	86	85 ~ 99	86 ~ 89
C2	86	86	96	82	82 ~ 96	85 ~ 89
C3	77	77	91	81	77 ~ 91	74 ~ 79
D2	79	78	83	96	78 ~ 96	76 ~ 80
D3	78	88	97	92	78 ~ 97	87 ~ 93

表3 サーバイメータ測定結果 (平成 25 年度)

単位: nGy/h

測定エリア	第1四半期		第2四半期		第3四半期		第4四半期		H25年度 測定範囲	H24年度 測定範囲
	測定年月日	線量率	測定年月日	線量率	測定年月日	線量率	測定年月日	線量率		
A1	H25. 6. 24	92	H25. 9. 18	96	H25. 12. 16	96	H26. 3. 12	94	92 ~ 96	86 ~ 96
A2	H25. 6. 25	86	H25. 9. 19	80	H25. 12. 19	84	H26. 3. 13	88	80 ~ 88	80 ~ 106
A3	H26. 6. 24	52	H25. 9. 18	50	H25. 12. 16	54	H26. 3. 12	49	49 ~ 54	44 ~ 50
B1	H25. 6. 24	56	H25. 9. 18	60	H25. 12. 16	60	H26. 3. 12	67	56 ~ 67	54 ~ 58
B2	H25. 6. 25	80	H25. 9. 19	76	H25. 12. 19	78	H26. 3. 13	86	76 ~ 86	74 ~ 100
B3	H25. 6. 20	68	H25. 9. 26	68	H25. 12. 11	62	H26. 3. 6	63	62 ~ 68	66 ~ 92
B4	H25. 6. 25	30	H25. 9. 19	36	H25. 12. 19	36	H26. 3. 13	53	30 ~ 53	22 ~ 36
C1	H25. 6. 25	84	H25. 9. 17	72	H25. 12. 9	96	H26. 3. 11	100	72 ~ 100	72 ~ 100
C2	H25. 6. 21	78	H25. 9. 11	72	H25. 12. 17	76	H26. 3. 10	82	72 ~ 82	70 ~ 84
C3	H25. 6. 20	74	H25. 9. 26	70	H25. 12. 12	74	H26. 3. 6	65	65 ~ 74	68 ~ 73
D2	H25. 6. 20	62	H25. 9. 12	64	H25. 12. 17	64	H26. 3. 10	63	62 ~ 64	65 ~ 70
D3	H25. 6. 20	78	H25. 9. 12	66	H25. 12. 17	76	H26. 3. 10	78	66 ~ 78	71 ~ 80

表4 土壌測定結果 (平成 25 年度)

測定エリア	採取年月日	U-238 (Bq/g乾)	Ra-226 (Bq/g乾)	F (mg/kg乾)	Cs-134 (Bq/kg乾)	Cs-137 (Bq/kg乾)
A1	H25. 6. 24	0.041±0.003	0.090±0.006	360	ND	ND
A2	H25. 6. 25	0.029±0.002	0.059±0.005	210	ND	2.09±0.24
A3	H25. 6. 24	0.041±0.003	0.046±0.004	170	ND	2.73±0.23
B1	H25. 6. 24	0.010±0.001	0.030±0.003	220	ND	3.13±0.21
B2	H25. 6. 25	0.043±0.003	0.058±0.004	180	ND	ND
B3	H25. 6. 27	0.024±0.002	0.037±0.003	290	ND	2.41±0.23
B4	H25. 6. 25	0.010±0.001	0.018±0.003	150	ND	59.5±1.11
C1	H25. 6. 24	0.033±0.003	0.073±0.005	260	ND	ND
C2	H25. 6. 27	0.017±0.001	0.026±0.003	300	ND	1.85±0.20
C3	H25. 6. 27	0.020±0.001	0.033±0.003	230	ND	5.17±0.29
D2	H25. 6. 27	0.011±0.001	0.022±0.003	280	ND	1.14±0.17
D3	H25. 6. 27	0.020±0.002	0.038±0.003	200	ND	2.06±0.22

ND: 不検出の略 (計数誤差の3倍未満とする。)

た核実験等のフォールアウトに由来するものと考えられる。

天然核種であるU-238濃度は0.010～0.043Bq/g乾,
Ra-226濃度は0.018～0.090Bq/g乾であり、F濃度は

150～360mg/kg乾であった。全体的な傾向は概ね平成
24年度測定結果と同じであり、大きな変化は認められ
なかった。

表5 土壌測定結果(平成24年度)

測定エリア	採取年月日	U-238 (Bq/g乾)	Ra-226 (Bq/g乾)	F (mg/kg乾)	Cs-134 (Bq/kg乾)	Cs-137 (Bq/kg乾)
A1	H24. 8. 27	0.028±0.002	0.074±0.009	310	ND	ND
A2	H24. 8. 29	0.029±0.002	0.052±0.006	230	ND	2.16±0.29
A3	H24. 8. 27	0.016±0.001	0.034±0.004	180	ND	5.90±0.45
B1	H24. 8. 27	0.009±0.001	0.027±0.004	210	ND	2.57±0.29
B2	H24. 8. 29	0.036±0.002	0.078±0.009	280	ND	ND
B3	H24. 8. 29	0.024±0.002	0.044±0.005	290	ND	3.05±0.28
B4	H24. 8. 29	0.008±0.001	0.024±0.003	150	ND	53.6±0.95
C1	H24. 8. 28	0.029±0.002	0.056±0.007	300	ND	ND
C2	H24. 8. 29	0.017±0.001	0.027±0.004	310	ND	1.86±0.20
C3	H24. 8. 27	0.013±0.001	0.031±0.004	200	ND	4.77±0.39
D2	H24. 8. 29	0.008±0.001	0.029±0.004	290	ND	1.76±0.22
D3	H24. 8. 28	0.013±0.001	0.036±0.005	200	ND	1.16±0.21

ND:不検出の略(計数誤差の3倍未満とする。)

表6 河川水測定結果(平成25年度)

測定エリア	採取年月日	U-238 (mBq/cm ³)	Ra-226 (10 ⁻² mBq/cm ³)	F (mg/L)	Rn-222 (Bq/L)	Cs-134 (Bq/L)	Cs-137 (Bq/L)
A1	H25. 7. 18	ND	ND	0.30	0.13±0.02	ND	ND
A2	H25. 7. 18	ND	ND	ND	0.14±0.02	ND	ND
A3	H25. 7. 18	ND	ND	0.05	0.07±0.01	ND	ND
B1	H25. 7. 18	ND	ND	0.17	0.15±0.02	ND	ND
B2	H25. 7. 22	ND	ND	0.19	0.86±0.05	ND	ND
B3	H25. 7. 24	ND	ND	ND	0.37±0.03	ND	ND
B4	H25. 7. 24	ND	ND	ND	0.34±0.03	ND	ND
C1	H25. 7. 18	ND	ND	0.11	0.13±0.02	ND	ND
C2	H25. 7. 24	ND	ND	0.10	0.23±0.02	ND	ND
C3	H25. 7. 23	ND	ND	ND	0.16±0.02	ND	ND
D2	H25. 7. 30	ND	ND	0.09	2.57±0.08	ND	ND
D3	H25. 7. 30	ND	ND	ND	0.20±0.02	ND	ND

ND:不検出の略(U-238:<0.003, F:<0.05, その他:計数誤差の3倍未満とする。)

表7 河川水測定結果(平成24年度)

測定エリア	採取年月日	U-238 (mBq/cm ³)	Ra-226 (10 ⁻² mBq/cm ³)	F (mg/L)	Rn-222 (Bq/L)	Cs-134 (Bq/L)	Cs-137 (Bq/L)
A1	H24. 8. 27	ND	ND	0.30	0.05±0.01	ND	ND
A2	H24. 8. 29	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A3	H24. 8. 27	ND	ND	0.06	0.14±0.02	ND	ND
B1	H24. 8. 27	ND	ND	0.27	0.40±0.03	ND	ND
B2	H24. 8. 29	ND	ND	0.27	1.26±0.06	ND	ND
B3	H24. 8. 27	ND	ND	0.07	0.28±0.03	ND	ND
B4	H24. 8. 29	ND	ND	ND	0.25±0.03	ND	ND
C1	H24. 8. 28	ND	ND	0.18	ND	ND	ND
C2	H24. 8. 28	ND	ND	0.15	ND	ND	ND
C3	H24. 8. 27	ND	ND	ND	0.07±0.02	ND	ND
D2	H24. 8. 27	ND	ND	0.11	9.61±0.16	ND	ND
D3	H24. 8. 28	ND	ND	0.09	0.19±0.02	ND	ND

ND:不検出の略(U-238:<0.003, F:<0.05, その他:計数誤差の3倍未満とする。)

3.2.2 河川水

河川水中各種測定項目濃度について、平成 25 年度の結果を表 6 に示す。また、平成 24 年度の測定結果を表 7 に示す。全ての検体でCs-134 は検出されず、福島第一原発事故の影響は認められなかった。また、U-238, Ra-226 及びCs-137 についても全ての検体で検出されなかった。F 濃度はND～0.30 mg/Lであり、平成 24 年度と同様、概ね県南部が県北部に比べて高い傾向であった。Rn-222 濃度はD2 地点において 2.57Bq/Lとやや高く、他地点においては 0.07～0.86Bq/Lであり、平成 24 年度と同様の傾向がみられた。D2 地点においては採水地点の約 150m 上流に確認された湧水がRn-222 の供給源となり、他地点に比べて高濃度であった⁶⁾。この濃度は平成 16 年にまとめられた日本における一般的な河川水のラドン濃度(< 0.1～14.6Bq/L)の範囲⁷⁾内であった。

4 まとめ・今後の展開

平成 25 年度に実施した県内の広域調査では、全ての項目で平成 24 年度の結果と同じ傾向であり、環境放射能レベルに大きな変化がないことが確認できた。また、福島第一原発の事故によって岡山県内に飛来した放射性物質¹⁾は、平成 25 年度においても局所的な集積は発生していないことが確認できた。

平成 26 年度においても、空間 γ 線線量率、土壌、河川水等の人工放射性核種濃度などについて継続して調査を実施し、3 年間の結果をとりまとめ、岡山県内の環境放射能バックグラウンドレベルを把握したいと考えている。

文 献

- 1) 森上嘉亮, 西村佳恵, 清水光郎, 片岡敏夫: 東京電力(株)福島第一原子力発電所事故に起因する県内における環境放射能調査, 岡山県環境保健センター年報, 36, 65-68, 2012
- 2) 森上嘉亮, 畑陽介, 清水光郎, 片岡敏夫, 小川登: 岡山県内における環境放射能バックグラウンド調査, 岡山県環境保健センター年報, 37, 65-68, 2013
- 3) 原子力規制庁: “環境放射線データベース”, <http://search.kankyo-hoshano.go.jp/top.jsp>
- 4) 独立行政法人産業技術総合研究所地質調査総合センター, “日本全国の海と陸の地球化学図データベース”, <https://gbank.gsj.jp/geochemmap/>
- 5) 阿部史郎: わが国における自然の空間放射線分布の測定, 保健物理, 17, 169-193, 1982
- 6) 畑陽介, 清水光郎, 小川登, 森上嘉亮, 片岡敏夫: 金剛川水系における河川水中ラドン濃度調査, 岡山県環境保健センター年報, 37, 73-76, 2013
- 7) 安岡由美, 堀内公子: 日本における天然水中のラドン濃度, 水中ラドンに関する専門研究会活動報告書, 5-15, 2004

【資 料】

赤和瀬観測局の降雪量等の経年変化, 及び積雪深と空間 γ 線線量率の関係について

Interannual variation of Snowfall, and Relationship between Depth of Snow and γ -ray dose rate at Akawase Monitoring Station.

小川 登, 片岡敏夫, 森上嘉亮, 畑 陽介, 清水光郎 (放射能科)

Noboru Ogawa, Toshio Kataoka, Yoshiaki Morikami, Yousuke Hata, Mitsuo Shimizu
(Department of Environmental Radiation)

要 旨

赤和瀬観測局は独日本原子力研究開発機構人形峠環境技術センター周辺の放射線監視を目的として、岡山県北部の鏡野町上斎原に設置された3つの観測局の1つであり、空間 γ 線線量率等の測定と併せ、積雪深・気温・降水量等の気象観測を実施している。赤和瀬観測局での1990年度から2013年度における12月から3月の降雪量・平均気温・降水量の経年変化を検討した結果、降雪量は年度による変動が大きく増減傾向は認められなかった。平均気温は2007年度までの間はやや増加傾向が認められた。降水量は降雪量に比べると年度による変動は小さく増減傾向は認められなかった。平均気温と降雪量との間には負の相関関係が認められた。積雪深と空間 γ 線線量率との間には強い負の相関関係が認められるが、積雪深が約1.5m以上となると空間 γ 線線量率の減少はほとんど見られなくなる傾向が認められた。

[キーワード：降雪量, 積雪深, 空間 γ 線線量率]

[Key words : snowfall, snow depth, γ -ray dose rate]

1 はじめに

岡山県では1979年から岡山県北部に立地する独日本原子力研究開発機構人形峠環境技術センター周辺に観測局舎3局を設置し環境放射線等の連続測定を実施しており、気象観測も併せて実施している(観測局舎の位置は図1に示す)。このうち赤和瀬観測局が設置されている鏡野町上斎原赤和瀬地区は標高約700mに位置し周囲を山に囲まれた盆地となっており、3つの観測局のうちでは気象観測を実施するのに最も適している。また、赤和瀬地区は岡山県内における豪雪地域として知られており、冬期の月平均気温は東北地方の山形市とほぼ同程度である。

積雪深を測定している地点は岡山県内でも少なく、また、気温・降水量等のデータも長期間蓄積されたことから、今回、積雪深のデータから降雪量を算出し、気温・降水量とともにその経年変化について検討した。また、冬期は積雪層の影響で地殻からの γ 線の一部が遮へいされることにより空間 γ 線線量率の値が低下すること

がよく知られており、赤和瀬観測局における積雪深と空間 γ 線線量率の関係についても併せて検討した。

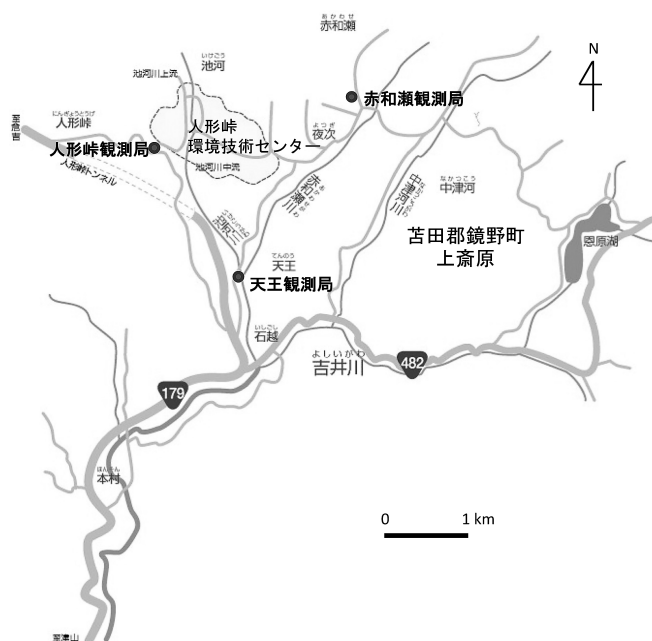


図1 観測局の配置

2 解析方法

2.1 対象期間と項目

対象期間は1990年度から2013年度とし、各年度の12月から3月までの期間を集計の対象とした。項目については、積雪深・気温・降水量・空間 γ 線線量率の1時間値データを対象とした。降雪量は、各日における1時間毎の積雪深差(正の値のみ)の合計を日降雪量とし(気象庁の地球温暖化予測情報第8巻第4章¹⁾記載の算出方法)、月別に合計して4ヶ月分の合計値を算出した。気温は12月から3月までの1時間値を平均して平均気温を算出し、降水量は12月から3月までの1時間値の合計値により算出した。

降雪量の集計にあたっては降水量が0.5mm以上観測されている場合、または感雨計で降水(雪)が検知されている場合の1時間値を有効とした。また、雨雪の判別には気象研究所技術報告第8号²⁾に掲載されている雨雪判別図を参考とし、赤和瀬地区の12月から3月の平均湿度(約80%)を考慮して気温3℃未満の場合を降雪と判断した。

2.2 測定機器

積雪深・気温・降水量等の測定機器は数年ごとに更新しているため、代表機器として2013年度に用いた測定機器を以下に示す。

積雪深の測定には、拓和製TRM-300S型空中超音波パルス反射方式(精度:±0.01m)を使用した。なお、積雪深の測定にはある程度の面積の平地が必要とされることから、機器は赤和瀬観測局の西南西約70mの位置に設置し、地上5mまでの積雪を測定可能とした。気温の測定には、池田計器製作所製PT-100S型を、降水量の測定には池田計器製作所製PH-5型を使用した。また、湿度の測定には、池田計器製作所製HM-204S型を使用し、感雨(雪)の測定には、池田計器製作所製RFG-901型を使用した。なお、気温・降水量等の測定機器は、観測局における設置環境の制約により地上約5mに設置した。

空間 γ 線線量率の測定には、富士電機製N13J-117型(NaI(Tl)2"φ×2")を使用し、地上4mに設置した。

3 結果及び考察

3.1 降雪量・平均気温・降水量の経年変化

1990年度から2013年度における、12月から3月の降雪量・平均気温・降水量は表1に示したとおりであった。集計値については、対象期間4ヶ月間で9割以上の1時間値が測定された場合を有効とした。また、降雪量・平均気温・降水量の経年変化を図2、図3、図4に示した。なお、グラフには5年間移動平均を併せて破線で示した。移動平均は、動きの激しい年ごとの変化をなめらかにするために、連続する数値の平均を求める方法であり、今回は、直近5年間の平均値をとって5年間移動平均を算出した³⁾。降雪量は年度による変動が大きく、5年間移動平均ではやや平滑化されるが明らかな増減傾向は認められなかった。平均気温は、5年間移動平均では2007年度までの間はやや増加傾向が認められ、その後やや減少傾向が認められた。降水量は降雪量に比べると年度による変動は小さく、5年間移動平均ではほとんど増減傾向が認められなかった。

降雪量と平均気温の関係について、図2と図3を比較すると、平均気温が極小値を示したとき降雪量は極大値

表1 12月から3月の降雪量・平均気温・降水量の経年変化

年度	降雪量(m)	平均気温(℃)	降水量(mm)
1990	7.11	0.2	956.0
1991	6.39	0.5	893.5
1992	6.91	0.6	847.5
1993	8.14	-0.4	810.5
1994	6.86	0.1	924.5
1995	7.66	-1.1	917.0
1996	4.87	-0.1	661.5
1997	3.50	0.9	736.0
1998	4.65	0.5	713.5
1999	6.86	-0.6	849.0
2000	—	-0.6	653.5
2001	6.50	1.2	762.0
2002	7.30	0.3	799.0
2003	—	1.2	718.5
2004	7.15	1.0	834.5
2005	9.87	-0.2	724.5
2006	3.48	2.2	—
2007	7.33	1.1	957.0
2008	5.48	1.0	885.0
2009	5.38	0.8	700.0
2010	8.14	-0.6	746.0
2011	8.70	-0.6	—
2012	6.20	-0.3	699.5
2013	6.03	-0.3	844.0
平均	6.57	0.3	801.5

「—」は機器不調等による集計値の欠測を示す

を示し、平均気温が極大値を示したとき降雪量は極小値を示す傾向が認められた。特に平均気温は2006年度の2.2℃が最高値であり、降雪量も3.48mと最低値であった。この年度は全国的に冬の平均気温が高かった年度であり、平均気温が観測史上最高となった地点が、日本全国153地点中75地点であった。日本海側の雪は1962年以降で最も少なかった年度であり、赤和瀬観測局の結果は

この統計結果⁴⁾とよく一致していた。平均気温は1995年度の-1.1℃が最低値であったが、降雪量は2005年度の9.87mが最高値となり、平均気温が最低値となった年度と降雪量が最高値となった年度は、一致しなかった。2005年度は、積雪を観測している日本全国339地点のうち23地点で積雪の最大記録を更新した年度であり、赤和瀬観測局の結果はこの統計結果⁵⁾とよく一致していた。

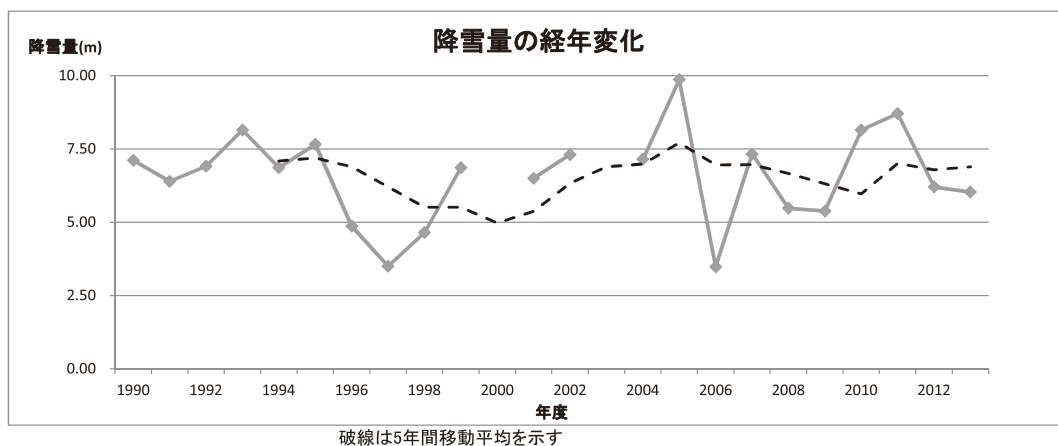


図2 降雪量の経年変化

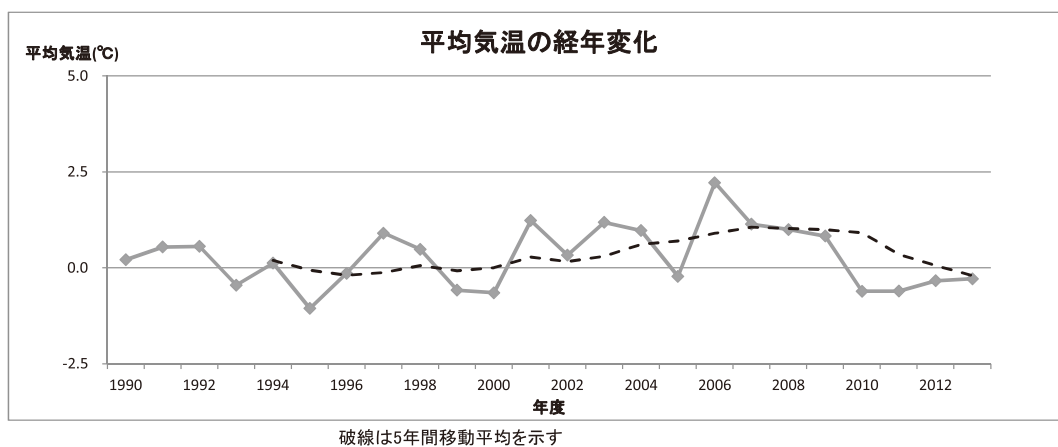


図3 平均気温の経年変化

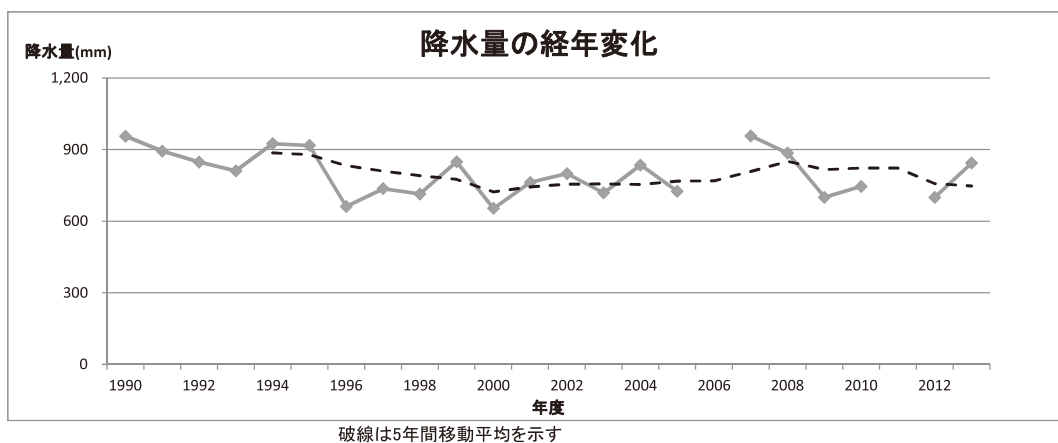
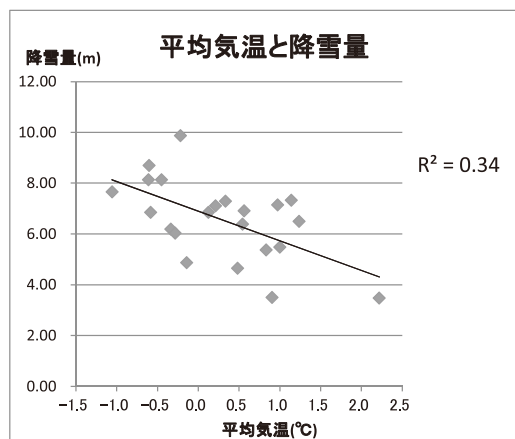


図4 降水量の経年変化

3.2 平均気温と降雪量の関係

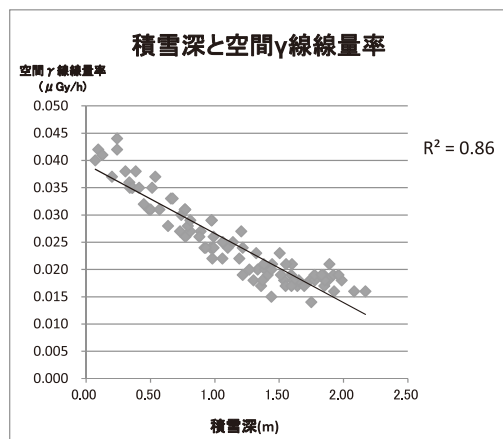
平均気温と降雪量の関係は、図5に示したとおりであった。負の相関関係が認められ、相関係数は0.58であった。平均気温の極大値・極小値と降雪量の極小値・極大値が対応するという傾向は認められたが強い相関ではなかった。このことは、降雪量には平均気温が関与しているが、それ以外の要素の関与も大きいことを示していると考えられた。



実線は回帰直線を示す
図5 平均気温と降雪量の関係

3.3 積雪深と空間γ線線量率の関係

各年度の月別の積雪深の最高値と、積雪深が月最高値を観測した日時の空間γ線線量率との関係をまとめると図6のとおりとなった。なお、積雪深の最高値に対応する空間γ線線量率の1時間値が複数ある場合は平均値を算出した。積雪深の最高値は2008年2月の2.17mであり、空間γ線線量率の最低値は2000年2月の0.014 μGy/hであった。積雪深の最高値2.17mは、鏡野町上斎原の恩原高原における過去の積雪深の岡山県記録3.07m⁶⁾



実線は回帰直線を示す
図6 積雪深と空間γ線線量率の関係

の約3分の2の値であった。積雪深と空間γ線線量率との間には負の相関関係があり、相関係数は0.93と強い相関が認められたが、積雪深が約1.5m以上になると、空間γ線線量率が0.015～0.020 μGy/hとなり、ほとんど減少しなくなる傾向が認められた。このことから、この空間γ線線量率の範囲は、12月から3月における赤和瀬観測局での地殻からのγ線の影響をほぼ除いたレベルの値に相当すると考えられた。

4 まとめ

赤和瀬観測局の1990年度から2013年度における、12月から3月の降雪量・平均気温・降水量の経年変化を検討した結果、降雪量は年度による変動が大きく、明らかな増減傾向は認められなかった。平均気温は、2007年度までの間はやや増加傾向が認められ、その後やや減少傾向が認められた。降水量は降雪量に比べると年度による変動は小さく、ほとんど増減傾向が認められなかった。降雪量と気温との間には負の相関関係が認められた。積雪深と空間γ線線量率との間には、強い負の相関関係が認められたが、積雪深が約1.5m以上となると空間γ線線量率の減少はほとんど見られなくなる傾向が認められた。

文 献

- 1) 気象庁：地球温暖化予測情報第8巻第4章-積雪・降雪の将来予測-，58-64，2013
- 2) 気象研究所物理気象研究部：気象研究所技術報告第8号-大気中における雪片の融解現象に関する研究-，9-23，1984
- 3) 株式会社 しがぎん経済文化センター：滋賀ビジネスレポート，地球温暖化を彦根(滋賀)の気温変動にみる，長山真由美，2008年3月
<https://www.keibun.co.jp/economy/business-report/pdf/research/200803heating.pdf>
- 4) 気象人 トピックス-2006/2007 冬の天候-，
<http://www.weathermap.co.jp/kishojin/topics/200703winter.php>
- 5) 気象人 トピックス-2005/2006 冬の天候-，
<http://www.weathermap.co.jp/kishojin/topics/200603winter.php>
- 6) 竹久順一ほか編著：岡山県の地理，139-149，1978

【調査研究】

Listeria monocytogenes のパルスフィールドゲル電気泳動法の改良

Improved Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) method for *Listeria monocytogenes*

河合央博, 大島律子, 中嶋 洋 (細菌科)

Hisahiro Kawai, Ritsuko Ohata, Hiroshi Nakajima

(Department of Bacteriology)

要 旨

Listeria monocytogenes のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法について, アメリカの PulseNet が *Listeria monocytogenes* 用に示したプロトコル (section 5.3 August 2009) に準じて実施したところ, 菌株によっては明瞭なバンドが得られないものがあった。そのため, 国立感染症研究所が平成 15 年に示した腸管出血性大腸菌 O157 のためのプロトコルを参考に, PFGE 法の改良を行った。その結果, 良好な結果が得られ, *Listeria monocytogenes* の PFGE 解析に有用な一つのプロトコルを構築できた。

[キーワード: *Listeria monocytogenes*, パルスフィールドゲル電気泳動, 疫学]

[Key words: *Listeria monocytogenes*, Pulsed-field Gel Electrophoresis, Epidemiology]

1 はじめに

Listeria monocytogenes (以下「*L.m.*」という。)は食中毒や, 人の髄膜炎, 死産, 敗血症等の起因菌である他, 主として反すう畜にも脳炎, 死産等を引き起こす人畜共通感染症起因菌である。米国の CDC (Centers for Disease Control and Prevention) は, 米国内でこの菌による感染症を毎年約 1,600 人が発症し, そのうち約 260 人が死亡しているとホームページで報告している。欧米では食品による集団事例が多数報告されているが, 日本では平成 13 年にナチュラルチーズを原因とした北海道での集団事例 1 件以外この菌による事例は確認されていない。なお, 日本におけるリステリア症発生報告数は年間 83 件と推定した報告¹⁾もある。*L.m.*は動物や土壌等の環境に広く常在しているため, 食肉や乳製品, 魚介類加工品などからの分離が報告¹⁾されており, 当センターの調査でも食肉の平均 20% が汚染されていたことが判明しているが²⁾, 食品からしばしば *L.m.* が分離される事実とリステリア症との因果関係は不明である。これらのことから, *L.m.* について感染源・感染経路の究明や感染症の発生予防に役立てることを目的として, 食品の汚染状況や動物の保菌状況等の調査を継続して行っている。

その中で, 食品や動物等から分離された *L.m.* 菌株に

ついて, パルスフィールドゲル電気泳動 (以下「PFGE」という。)法を使用し, 分子疫学解析を行ったが, その際, アメリカの PulseNet が示したプロトコル (section 5.3 August 2009 以下「PulseNet 法」という。)に準じて実施した場合, 菌株によってはスメアが生じるなど明瞭なバンドが得られないことを経験した。

一方, 腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析に用いる PFGE 法では, 平成 15 年に国立感染症研究所が示したプロトコル (以下「O157 感染研プロトコル」という。)に従って実施しているが, すべての菌株で非常に明瞭なバンドが得られている。

そこで, 今回, O157 感染研プロトコルをベースに *L.m.* の PFGE プロトコルの改良を試み (以下「改良法」という。), PulseNet 法との比較検討を行ったので報告する。

2 方法

2.1 供試菌株及び菌液調整

供試菌株として, 平成 23 年度から 24 年度の間に当センターで牛直腸便等から分離した *L.m.* 菌株 5 株 (No. 1 ~ 5, 血清型はすべて 1/2b) を用いた。菌液は, 菌株を Brain Heart Infusion Agar (日水製薬) で 37℃, 18 ~ 20 時間培養した後, 滅菌水に McFarland 5 程度になるように浮

遊し調整した。菌株5株についてそれぞれ菌液を調整し、同一菌液を用いて以下に示すPulseNet法及び改良法により処理を行った。

2.2 菌液処理

(1) PulseNet法

アメリカのPulseNetがホームページ上で公開した*L.m.*のPFGEプロトコル(section5.3 August2009)に準じて行った。菌液 200 μ lを用いてプラグを作製し、制限酵素処理等を行った。制限酵素はApa I (TaKaRa)とAsc I (New England Biolabs)の2種類を用いた。また、酵素量は、Apa Iは45units/sample, Asc Iは40units/sampleとし、37℃水浴中で3時間、ゆっくり振とうしながらインキュベートした。

(2) 改良法

改良法は、O157 感染研プロトコルを参考にして試案した。この方法のフローチャートを図1に示す。菌液 200 μ lを1.5mlマイクロチューブに入れ、Lysozyme from chicken egg white (SIGMA)を用いて調整したリゾチーム液(20 mg/ml TE (pH8.0) 溶液)を10 μ l添加し、50℃水浴中で15分間、ゆっくり振とうしながらインキュベート後、1%Seakem Gold Agarose200 μ lと混和してプラグを作製した。ProK液(1 mg/ml ProteinaseK (Roche), 1% N-lauroylsarcosine (SIGMA) 0.5MEDTA (pH8.0) 溶液)1mlを入れた13ml丸底遠心チューブ(ザルスタット)にプラグを入れ、50℃水浴中で2時間、ゆっくり振とうしながらインキュベートした。プラグを泳動時用の大きさにカットし、1.5mlスリムチューブ(住友ベークライト)に入れ、4mMPefabloc SC[AEBSF] (Roche) TE (pH8.0) 溶液 500 μ lで2回洗浄(50℃水浴中20分間、ゆっくり振とうしながらインキュベート), TE (pH8.0) 1mlで1回洗浄(氷上20分間、ゆっくり振とうしながらインキュベート), さらに制限酵素に添付されている10 $\times$ buffer (Apa I : 10 $\times$ Lbuffer, Asc I : NEbuffer4) から調製した1 $\times$ buffer200 μ lで1回洗浄(氷上20分間、ゆっくり振とうしながらインキュベート)後、制限酵素で処理した。制限酵素はApa I (TaKaRa)とAsc I (New England Biolabs)の2種類を用いた。酵素量はApa I, Asc Iともに30units/sampleとし、37℃水浴中で3時間、ゆっくり振とうしながらインキュベートした。酵素処理後、0.5 $\times$ TBE400 μ lに入れ替え、電気泳動まで室温保管した。

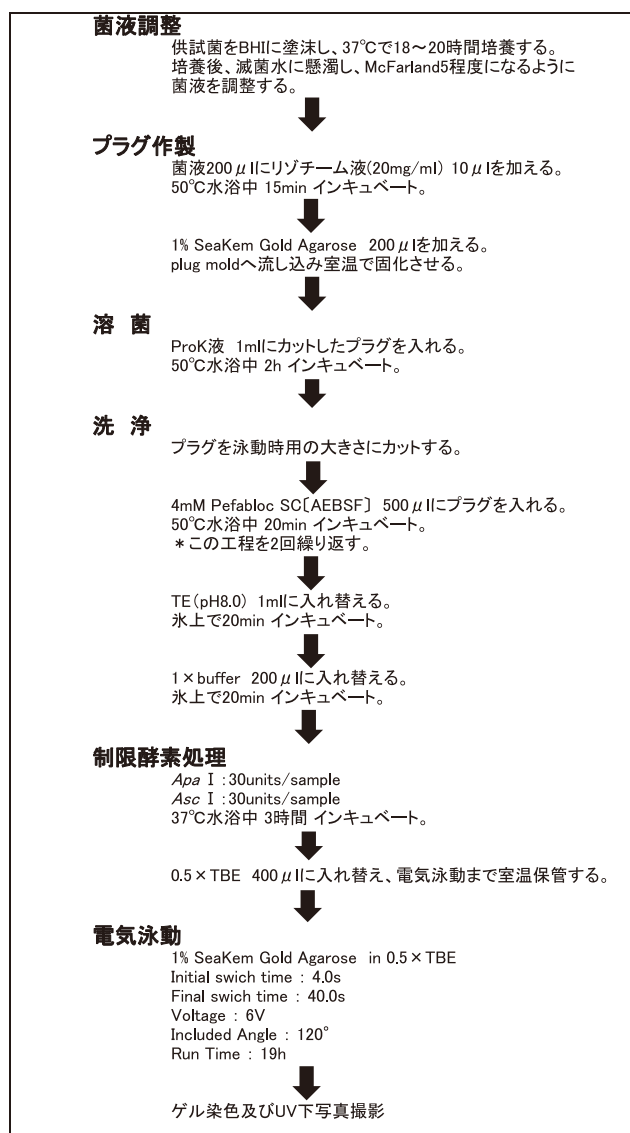


図1 改良法プロトコルフローチャート

2.3 電気泳動

電気泳動は、PulseNet法、改良法ともに以下に示す条件で行った。泳動後、0.2～0.5 μ g/mlのEthidium bromide水溶液で染色し、脱色を行い紫外線下で写真撮影した。

使用機器：CHEF-DR III (BioRad)

緩衝液：0.5 $\times$ TBE

アガロース：1% SeaKem Gold Agarose in 0.5 $\times$ TBE

Voltage : 6V

Included Angle : 120°

Switch time : 4.0sec ～ 40.0sec

Run time : 19h

3 結果

供試菌株 5 株について、それぞれ PulseNet 法及び改良法により処理し電気泳動を行った。その際、電気泳動像を比較するため、菌株毎に 2 つの処理法を並べて泳動した。Apa I 処理の電気泳動像を図 2 に、Asc I 処理の電気泳動像を図 3 に示す。

全体的に PulseNet 法よりも改良法の方がバンドが濃く、明瞭な傾向が見られた。特に、Asc I ではその差が大きく見られた。また、菌株 No. 5 は、Apa I、Asc I とともに PulseNet 法ではバンドが非常に薄く、スミアになってバンドの一部が確認できなかった。

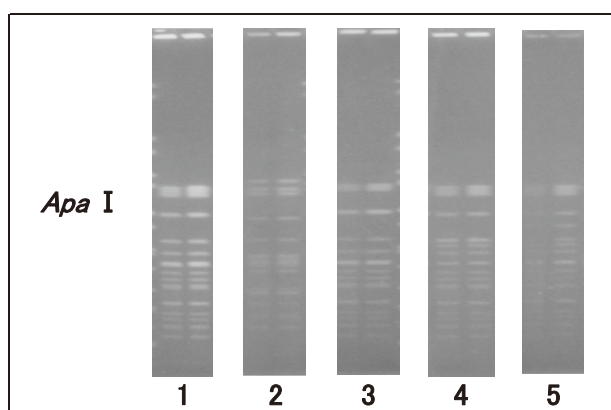


図 2 PulseNet 法と改良法の PFGE 電気泳動像の比較 (Apa I)
(左：PulseNet 法 右：改良法)

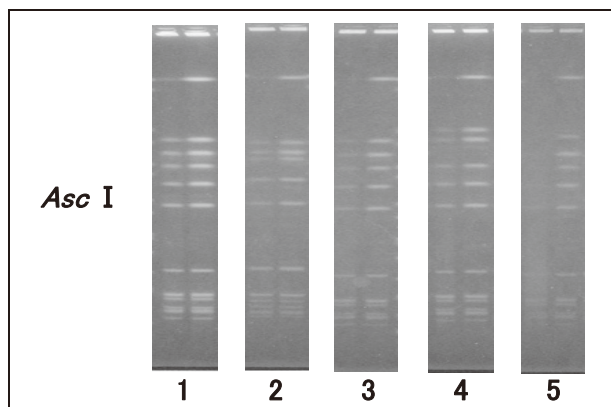


図 3 PulseNet 法と改良法の PFGE 電気泳動像の比較 (Asc I)
(左：PulseNet 法 右：改良法)

4 考察

今回、PulseNet 法と改良法の比較を行ったが、改良法の方がバンドが明瞭な傾向が見られた。PulseNet 法と改良法の主な違いは、① Proteinase K の使用量、② 洗浄方法、及び③ 制限酵素使用量であった。① Proteinase K の使用量は、若干ではあるが改良法の方が使用量は多く、溶菌が十分であったと思われる。② 洗浄方法は、

PulseNet 法では滅菌水及び TE (pH8.0) で洗浄を行うのに対し、改良法は Pefabloc SC [AEBSF] を用いることにより、Proteinase K の失活が完全に行われ、良好な結果が得られたものと考えられた。

また、③ 制限酵素使用量は、PulseNet 法では Apa I : 45units/sample, Asc I : 40units/sample, 改良法では Apa I : 30units/sample, Asc I : 30units/sample と、改良法は Apa I, Asc I とともに PulseNet 法に比べ少量であった。菌株 No. 1 ~ 4 について 2 つの方法のバンドパターンを比較したところ、同一バンドパターンであることが確認できたことから、改良法の酵素量で十分消化できることが示された。

一方、今回の供試菌株の中で、菌株 No. 5 は PulseNet 法ではバンドが非常に薄く、不明瞭であったが、改良法ではバンドが鮮明であった。当センターでは、実際に *L.m.* 菌株百数株について改良法により PFGE を行ったが³⁾、すべての菌株でおおむね良好な電気泳動像が得られたことから、改良法は PulseNet 法に比べより広範囲の菌株について解析可能な方法であることが示された。

これらのことから、改良法を用いた PFGE 法は、菌株間のバンドパターンの比較が容易となり、*L.m.* 感染症の感染源や感染経路の究明等に非常に役立つものであると考える。今回試案した改良法は、リゾチーム液の添加及び使用制限酵素の種類他は、O157 感染研プロトコルに示された試薬量等の条件を参考にしたものであるため、さらに条件の比較検討を行うことで、より *L.m.* に適した方法に改善されるものとする。

文 献

- 1) 五十君 静信：食品由来のリストéria菌による健康被害に関する研究、厚生労働科学研究費補助金 食品・化学物質安全総合研究事業 平成 14 年度 総括・分担研究報告書、2005
- 2) 狩屋英明、大畠律子、中嶋 洋、国富泰二：動物を含めた環境中及び調理用食肉のリストéria汚染状況、岡山県環境保健センター年報、28、73-77、2004
- 3) 河合央博、大畠律子、仲 克巳、檜原幸二、中嶋 洋：牛由来検体等からのリストéria及びサルモネラの検出状況とパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた *Listeria monocytogenes* の型別解析について、岡山県環境保健センター年報、37、83-88、2013

【調査研究】

結核疫学調査における結核菌DNA解析データベースの活用 (6)

Application to epidemiological investigation with
DNA database of *Mycobacterium tuberculosis* (6)

大島律子, 河合央博, 中嶋 洋 (細菌科)

Ritsuko Ohata, Hisahiro Kawai, Hiroshi Nakajima
(Department of Bacteriology)

要 旨

岡山県では、平成 11 年度から結核蔓延状況の把握及び感染源・感染経路の究明、二次感染の予防等、結核対策に資するため、県内の結核新登録患者から分離された結核菌の DNA 解析を実施し、その結果を菌株情報と融合させてデータベース化している。平成 25 年度は、Variable number of tandem repeats (VNTR) 解析法により、散発事例や家族内感染疑い 1 事例について、感染源究明のための解析を行った。また、感染伝播力の強さや薬剤耐性との関連から注目されている北京遺伝子型株の分離状況についても調査した。

[キーワード：結核菌，データベース，VNTR 解析，北京型]

[Key words : *M.tuberculosis*, database, VNTR analysis, Beijing type]

1 はじめに

岡山県では、結核の感染源・感染経路の究明や二次感染予防を目的に、結核菌の DNA 解析を行い、菌株情報と融合させたデータベースを構築して、感染事例の疫学調査に活用している^{1), 2)}。結核菌の遺伝子型別は、国内標準法として提唱されている JATA (12)-VNTR 解析法 (以下「JATA (12)-VNTR」という。)を用いて実施し³⁾、さらに、JATA (12)-VNTR の型別能力を補うために、JATA (12)-VNTR に 3 領域を加えた JATA (15)-VNTR 解析法 (以下「JATA (15)-VNTR」という。)と 3 つの多型性に富んだ領域を解析する超多変 (hypervariable, HV) 領域の VNTR 解析法 (以下「HV-VNTR」という。)を加えて精度の向上を図っている^{4), 5)}。今回は、結核の散発事例や家族内感染疑い 1 事例について、感染源の究明を行った。

結核菌の遺伝子型については、東アジアの分離株の多くを占め、世界の分離株の約 3 割が属し⁶⁾、我が国でも分離株の 7～8 割が属する北京型株 (Beijing genotype strain) が、結核対策上重要である⁷⁾。北京型株は、感染伝播力が強く、薬剤耐性との関連性が高いことが報告されており⁸⁾、さらに、新興型 (modern type) と祖先型

(ancient type) に区分され、新興型株は、祖先型株よりも感染伝播力が強く発病し易いと言われている⁹⁾。我が国の北京型株分離状況の特徴としては、他の国では新興型株が 7 割以上を占めているのに対して、祖先型株が 8 割程度を占めていることと⁷⁾、若年者層の結核患者から新興型株が多く分離されることがあげられる¹⁰⁾。若年者層の結核患者では、その発病のほとんどが、過去の再燃ではなく現在の流行状況を反映しているため、特に新興型株の動向に注目する必要がある。これらのことから、平成 25 年度は、従来の遺伝子型の異同による型別に加えて、北京型株の検出及び新興型と祖先型の区分も実施し、データベースに追加した。

2 材料及び方法

2.1 平成 25 年度の DNA 解析対象株

県内の医療機関または検査機関において分離された結核菌のうち、家族内感染疑い事例の 2 株と、以下の条件に該当した散発事例 53 株の計 55 株が搬入され、重複する 1 株を除く 54 株で VNTR 解析を実施した。

(1) 60 歳以下の塗抹陽性患者 (結核予防法第 29 条適用者) の菌株

(2) 保健所から依頼のあった菌株

- ・ 社会福祉施設等（集団生活等）で発生した患者（利用者、職員）の菌株
- ・ 接客業、看護師、保健師、保育士、教員、医師等の菌株
- ・ その他保健所長が必要と判断した患者の菌株

2.2 安全対策

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（平成 10 年法律第 114 号。以下「感染症法」という。）に基づき通知されている「特定病原体等の運搬に係る容器等に関する基準」（平成 19 年厚生労働省告示第 209 号）に従って菌株を運搬した。

また、搬入された菌株の管理は、感染症法第 56 条の 24 及び第 56 条の 25 に適合した施設で行った。

結核菌の DNA 抽出は、バイオセーフティーレベル 3 の施設内で N95 微粒子用マスクを装着し、クラス II の安全キャビネットを使用して行った。

2.3 菌株からの DNA 抽出

DNA 抽出は、結核菌 VNTR ハンドブック（地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編 第一版 2012 年）の「菌懸濁液の加熱死菌上清の作成方法」に準じて行った。

2.4 VNTR 解析

全 54 株で JATA (12)-VNTR³⁾を実施し、JATA (12)-VNTR 型が 54 株中または 945 株の JATA (12)-VNTR 型が登録されているデータベース中の株と一致した場合は、JATA (15)-VNTR 及び HV-VNTR を追加し、解析結果をデータベースに登録した。VNTR 解析及びデータベース作成には、解析ソフト BioNumerics ver 7.1 (APPLIED MATHS) を用いた。

2.5 事例の感染源究明

家族内感染疑い 1 事例（事例 1）について、患者から分離された結核菌の VNTR 解析により感染源を究明した（表 1）。

2.6 北京型と他の遺伝子型の区別

北京型と他の遺伝子型の区別は、Warren らの方法¹¹⁾に従って実施した。

2.7 北京型株における新興型と祖先型の区分

新興型と祖先型の区分は、Mokrousov らの方法¹²⁾に従って実施した。

3 結 果

3.1 VNTR 解析結果

平成 25 年度に解析した結核菌 54 株の VNTR 型を、図 1 に示した。

54 株の VNTR 解析の結果、JATA (12)-VNTR では 2 ～ 3 株を含む 4 組のクラスターが形成され（①～④）、9 株が含まれた（クラスター形成率 16.7%）。これらのクラスターを、JATA (15)-VNTR 及び HV-VNTR で解析したところ、JATA (15)-VNTR のみでは全て一致したが、HV-VNTR を加えると、クラスター②が異なった（クラスター形成率 11.1%）。

54 株の VNTR 型をデータベース中の他株と比較したところ、7 組 9 株が JATA (12)-VNTR、JATA (15)-VNTR 及び HV-VNTR 全てで一致した（矢印 i ～ vii）。i ～ vii の中で、i と vi はそれぞれデータベース中の 1 株と一致しており、患者の居住地が同じ地域であったため、現在関連性が調査されているところである。ii は、50 歳代の患者由来株 2 株と 80 歳代の患者由来株 2 株の 4 株と一致したが、これらの患者 6 名は同じ市内に居住し、1 年程度の間に届出がされており、20 歳代の患者も含まれていたことから、患者間に関連性が疑われたが、接点を見出すことはできなかった。iii と v は、それぞれデータベース中の 2 株と一致したが、双方とも流行株の遺伝子型であり、発病時期が離れていることや居住地が遠いことなどから偶然一致の可能性が高いと思われる。iv は、20 歳代の患者 2 名から分離された 2 株と一致したが、これら 4 名の患者はいずれも 20 歳代で県南部に居住し、

表 1 事例の概要

事例	No.	所 管 保健所	患 者	届出時 年齢	届 出	発 病	VNTR 型	事例概要
1	1543	K	a	50	2013/8/26	不明	一致	患者 a と b は家族で、両者から分離された結核菌 DNA の VNTR 型が一致したので、a から b への感染と考えられた。
	1544	K	b	56	2013/11/18	症状無し		

1 年程度の期間内に結核と診断されているため、関連性が強く示唆されたが、接点は不明であった。viiは、届出当時 40 歳代～ 50 歳代の 5 名の患者由来株を含む 7 株と一致した。これら 8 名の患者は 10 年程度の間に散発的に届出られており、接点は見出せなかった。

3.2 事例の検討結果

結果は、表 1 に示すとおりであった。

事例 1 は家族内感染が疑われた事例で、患者 a、b から分離された結核菌 DNA の VNTR 型が一致したため、家族内感染と推測された。

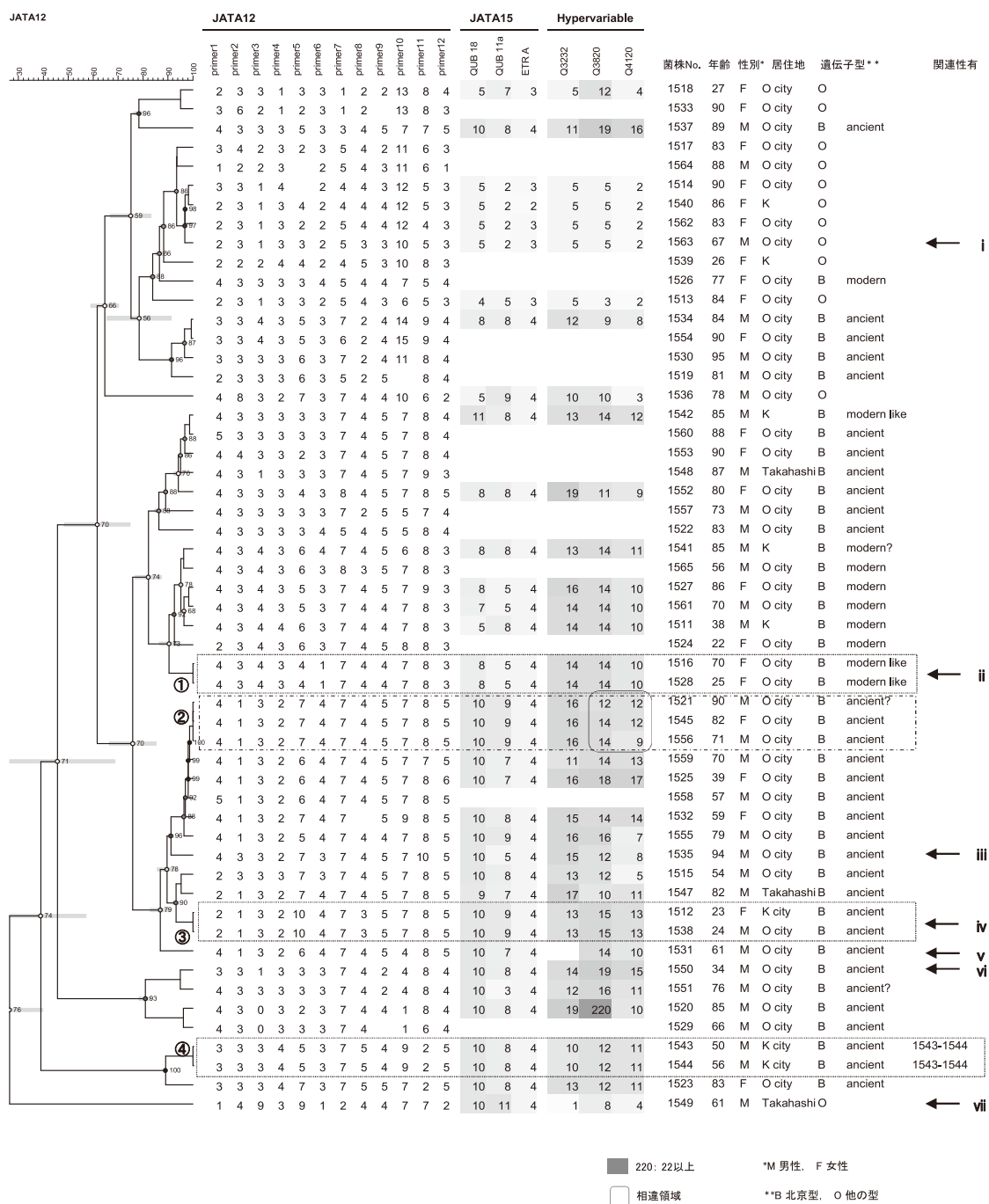


図 1 平成 25 年度に解析した結核菌 54 株の VNTR 型

3.3 北京型と他の遺伝子型の区別および北京型株における新興型と祖先型の区分

結果は、表2に示すとおりであった。

54株中42株が北京型を示し(77.8%)、うち、新興型が10株(23.8%)で祖先型が32株(76.2%)であった。北京型株の分離状況を患者の年齢別で見ると、60歳より若い患者では新興型が30.8%で60歳以上では20.7%であり(図2)、若年者層の患者において、祖先型よりも新興型の割合が高い傾向が見られた。

また、クラスター①は、データベース中の4株と一致して6株のクラスターを形成したが、6株とも全て新興型に属していた(図1)。

4 考 察

54株のVNTR解析の結果、JATA(12)-VNTRにJATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加えて一致した株のうち、事例1以外は患者間の関連性が不明であった。それらの中で、特にiiとivは、両方とも1年程度の期間内に全ての患者が結核と診断されており、若年者層の患者が含まれていることや居住地域が広範囲ではないことから、何等かの接点が潜んでいると考えられたが、明らかにすることができなかった。このような潜在的な接点をいかにして見出して感染源を究明するかが、疫学調査の大きな課題であると思われる。これを克服するためには、空気感染という結核の特殊な感染様式を考慮に

表2 北京型株の分離状況

患者の年齢	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-	total	%
新興型	0	2	1	0	1	0	3	3	0	10 (23.8%)	
北京型 祖先型	0	2	2	0	5	2	5	11	5	32 (76.2%)	
小 計	0	4	3	0	6	2	8	14	5	42 (100%)	77.8
他 の 型	0	2	0	0	0	2	1	5	2	12	22.2
合 計	0	6	3	0	6	4	9	19	7	54	100.0

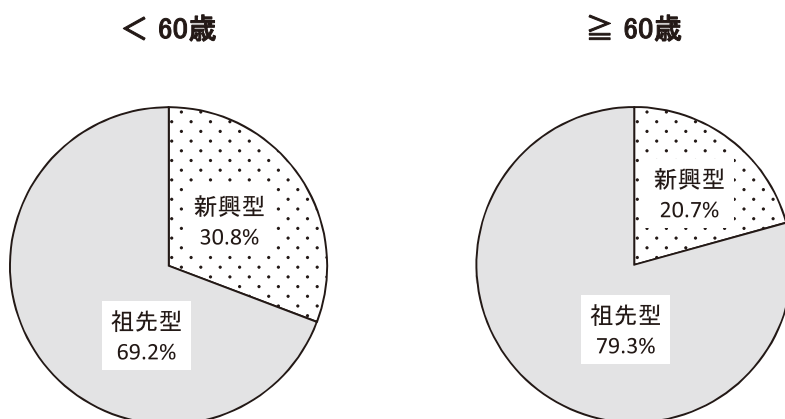


図2 患者の年齢別北京型株分離状況

入れ、どのような患者情報が有用であるかを十分検討する必要があると思われた。

北京型の分離状況では、77.8%が北京型に属しており、全国的な調査結果(73.8%)および過去に実施した県内の結果(72.5%)と大きな違いは無かった^{7), 13)}。北京型株における新興型と祖先型の区分では、調査した株数が少ないものの、新興型は、若年者層の結核患者において多く分離される傾向を示した。また、データベース中の株とともに6株からなるクラスター①(ii)を形成していたことから、その感染力の強さも示唆された。従って、新興型の動向を調査することは、結核対策上重要であると考えられた。

今後も、県内の結核菌分離株について、JATA(12)-VNTRにJATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加えた方法で解析を行い、併せて北京型株の分離状況を調査することでデータベースの充実を図り、結核対策に役立てる予定である。

文 献

- 1) 大島律子, 中嶋 洋: 結核対策における地域ベースの結核菌RFLP解析の意義, 日本公衆衛生雑誌, 52, 736-745, 2005
- 2) 大島律子, 石井 学, 中嶋 洋: 結核疫学調査における結核菌DNA解析データベースの活用(5), 岡山県環境保健センター年報, 37, 89-92, 2013
- 3) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗 聡, 菅原 勇, 加藤 誠: 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型(VNTR)分析システム, 結核, 83, 673-678, 2008
- 4) 和田崇之, 長谷 篤: 結核菌の縦列反復配列多型性(VNTR)解析に基づく分子疫学とその展望, 結核, 85, 845-852, 2010
- 5) 前田伸司, 和田崇之, 岩本朋忠: 国内結核菌を効率よく型別するための標準反復配列多型(VNTR)分析法, 日本細菌学雑誌, 65, 201, 2010
- 6) Abebe F, Bjune G: The emergence of Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* and low-level protection by bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccines: is there a link?, Clin Exp Immunol, 145, 389-397, 2006
- 7) 岩本朋忠: 結核菌分子疫学研究的将来展望, 結核, 84, 789-791, 2009
- 8) Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN: Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains, Trends Microbiol, 10, 45-52, 2002
- 9) Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy C. R. E, et al.: A Recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is Associated with an increased ability to spread and cause disease, J Clin Microbiol, 45, 1483-1490, 2007
- 10) Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, Wada T, Shirai C, et al.: Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan, J Clin Microbiol, 47, 3340-3343, 2009
- 11) Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, et al.: Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen, Am J Respir Crit Care Med, 169, 610-614, 2004
- 12) Igor Mokrousov I, Jiao WW, Valcheva V, Vyazovaya A, Otten T: Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-Based inverse PCR, J Clin Microbiol, 44, 2851-2856, 2006
- 13) 大島律子, 多田敦彦: 岡山地区で分離された結核菌におけるBeijing familyおよび他の遺伝子型, 結核, 79, 47-53, 2004

【調査研究】

感染予防対策に向けたヒト及び環境等における感染症起因菌の調査 (平成 25 年度)

Investigation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, *Legionella* and pathogenic *Yersinia* in the human and the environmental samples for prevention of transmission
(FY2013)

中嶋 洋, 大島律子, 河合央博, 檜原幸二*, 井上 勝*, 仲 克巳** (細菌科)

*岡山赤十字病院第一小児科, **くらしき作陽大学食文化学部現代食文化学科

Hiroshi Nakajima, Ritsuko Ohata, Hisahiro Kawai, Kouji Narahara*,

Masaru Inoue*, Katsumi Naka** (Department of Bacteriology)

* Department of Pediatrics, Okayama Red Cross General Hospital

** The Department of Contemporary Food Culture, Kurashiki Sakuyo University

要 旨

県内で多発する志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 感染症およびレジオネラ症の予防のため, ヒト, 動物, 食品および環境材料について検査を行い, 同時に県内で分離された STEC, レジオネラの疫学調査を実施した。STEC は, ヒト由来株 76 株中, O 血清群 157 が 59.2% で最も検出率が高かった。牛由来検体の分離株は, すべて O 血清群 157 以外であった。県内でヒトから分離された *L.pneumophila* 血清群 3 のうち, 本県に地域特異的な遺伝子型 ST93 株の感染源究明のため, 浴槽水等 140 検体の調査と分離株の疫学解析を行ったが, 感染源は究明できなかった。エルシニア感染症の発生実態把握のため, 患者血清のエルシニア抗体価を測定した結果, 患者の 11.6% に抗体価の上昇が見られた。

[キーワード: 志賀毒素産生性大腸菌, レジオネラ, エルシニア, 疫学, 抗体価]

[Key words: shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Legionella*, *Yersinia*, epidemiology, antibody titer]

1 はじめに

岡山県下で発生した志賀毒素産生性大腸菌 (以下「STEC」という。) 感染症やレジオネラ症の感染源・感染経路の究明と発生予防を目的として, 疫学調査を実施している。平成 25 年度は, 収集したヒト由来株, 食品, 動物および浴槽水等から分離した菌株を用いて疫学解析を行った。また, 感染実態が不明であるエルシニア感染症の調査のため, 患者血清の抗体価を測定したので, 併せて報告する。

2 材料及び方法

2.1 菌株及び検体

STEC の検査は, 平成 25 年度にヒトから分離された 76 株と, 牛直腸便 423 検体及び牛ホルモン 43 検体を用いて行った。

レジオネラの検査には浴槽水等 140 検体と, 保健所などが浴槽水等から分離したレジオネラ属菌 79 株および患者由来株 1 株を用いた。

エルシニアの抗体価測定は, 全国の病院小児科等の受診あるいは入院患者のうち, エルシニア感染症の疑いあるいは川崎病との鑑別のため, 抗体価測定の依頼があった 147 名の患者血清 284 検体について実施した。なお, 抗体価調査は, 当センターの倫理審査委員会に諮り, 承認を得て実施した。

2.2 検査法

各菌種の検査は, 以下の方法で実施した。

2.2.1 生化学的性状試験

STEC の性状試験は, ID テスト EB20 (日水) を用いて

菌の同定を行った。

2.2.2 血清型別

STEC及びレジオネラの血清型別は、病原性大腸菌免疫血清(デンカ生研)及びレジオネラ免疫血清(デンカ生研)を用いて実施した。

2.2.3 STECの毒素(STX)型別

STECの毒素型別は、ラテックス凝集反応による大腸菌ベロ毒素検出用キット(デンカ生研)及びPCR法¹⁾により実施した。

2.2.4 パルスフィールドゲル電気泳動法によるDNAパターンの解析

STECのパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法は、寺嶋ら²⁾のプロトコールにより実施し、DNAパターンによる型別(PFGE型別)は、国立感染症研究所に依頼して実施した。レジオネラのPFGE法は、常らの改良法³⁾により実施した。

2.2.5 IS-printing systemによる疫学解析

STEC O血清群(以下「O」という。)157株の疫学解析は、IS-printing System (TOYOBO)を用いて実施した。

2.2.6 Sequence-Based Typing (SBT)

レジオネラ株のSBT法を用いた型別(Sequence Type (ST))^{4), 5)}は、国立感染症研究所に依頼して実施した。

2.2.7 エルシニアの抗体価測定

エルシニアの抗体価測定は、患者血清を56℃、30分

間非働化後、生理食塩水で10倍希釈し、これを2倍段階希釈した希釈系列を、使用する抗原数と同数作成した。抗原液は、当センターが保有する*Y.pseudotuberculosis*(以下「Yp」という。)(血清群1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4a, 4b, 5a, 5b, 6)株と*Y.enterocolitica*(以下「Ye」という。)(血清群O3, O5, O8, O9)株を25℃、2日間培養し、菌体を生理食塩水に浮遊してマックファーランドNo 0.5の濃度に調整した。各希釈系列にそれぞれ1種類の抗原液を同量ずつ加え、混和して50℃、1晩凝集反応を行って翌日判定し、1:160以上を陽性とした。

3 結果及び考察

3.1 岡山県内で分離されたSTECの疫学調査

平成25年度にヒトから分離されたSTECの月別検出状況を、表1に示した。

ヒト由来STEC 76株は2月を除くすべての月で検出され、例年と同様に7月～9月の夏季に13.2%～23.7%と高率に検出された。

ヒト由来STECの血清型・毒素型を、表2に示した。

12種類の血清型・毒素型株が検出され、このうちO157は45株(59.2%)、O26は20株(26.3%)で、これらが全体の85.5%を占めた。また、これら以外にO103, O111, O121, O146, O163, O58, O91, OUTが検出された。

表1 ヒト由来STEC月別検出状況

月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	計
分離株数	5	5	7	18	14	10	4	6	4	2	0	1	76
(%)	6.6	6.6	9.2	23.7	18.4	13.2	5.3	7.9	5.3	2.6	0.0	1.3	

7月の患者1名からO157:H7 VT2とO111:H- VT1が検出

表2 ヒトから検出されたSTECの血清型・毒素型

	毒素型	株数	(%)
O103:H2	1	3	3.9
O111:H-	1	2	2.6
O121:H19	2	1	1.3
O146:H-	2	1	1.3
O157:H-	1	1	1.3
	1,2	2	2.6
O157:H7	1	1	1.3
	2	14	18.4
	1,2	27	35.5
O163:H19	2	1	1.3
O26:H-	1	1	1.3
O26:H11	1	19	25.0
O58:H28	1	1	1.3
O91:H14	1	1	1.3
OUT:H21	2	1	1.3
計		76	

O157 及び O26 の PFGE 型を、表 3-1 及び表 3-2 に示した。

O157 は 37 種類、O26 は 16 種類に型別され、O157 : H7 と O26 : H11 は多種類の PFGE 型に分類された。いずれの血清型でも、同一家族内や同じ保育園に通う児童など、疫学的に関連性のある分離株間において、僅かな遺伝子の変異が頻繁に見られることが示された。一方、

O157 株について実施した IS-printing system による解析結果は、疫学的関連のある株間では同一の結果を示し、PFGE 型に比べより疫学情報と一致する結果であった。本法は、手技が PFGE 法に比べて簡単で、短時間に結果を得ることができることから、事例発生時における分離株の分子疫学解析にスクリーニング的に利用することが、有効であると思われる。

表 3-1 ヒト由来 STEC O157 の PFGE 型

血清型	毒素型	PFGE型	株数	備考
O157:H-	1	g359	1	
	1, 2	i443	1	
		i444	1	
O157:H7	1	i445	1	
	2	g501	2	家族C由来株
		h327	1	家族E由来株
		i189	1	
		i435	3	家族D由来株
		i447	1	家族C由来株
		i448	1	家族C由来株
		i449	1	家族E由来株
		i450	1	
		i602	1	
		i613	1	
		k12	1	
	1, 2	d483	2	家族A由来株
		h426	1	
		h727	1	
		i253	1	
		i266	1	
		i399	1	
		i434	2	同一飲食店で喫食歴あり
		i436	1	
		i437	2	家族I由来株
		i439	1	
		i440	1	
		i441	1	
		i442	1	
		i446	1	
		i532	1	
		i606	1	
		i607	3	家族L由来株:1、家族M由来:2(同一保育園①児童)
		i608	1	家族L由来株
		i609	1	家族L由来株(同一保育園①児童)
		i614	1	
		i615	1	
		k11	1	
計			45	

表 3-2 ヒト由来 STEC O26 の PFGE 型

血清型	毒素型	PFGE型	株数	備考
O26:H-	1	i11	1	家族B由来株
O26:H11	1	i114	1	保育園②
		i131	2	家族H由来株
		i132	1	家族B由来株
		i133	1	家族G由来株
		i134	1	家族G由来株
		i135	1	家族J由来株
		i136	1	家族J由来株
		i137	1	
		i138	1	
		i139	3	家族F由来株
		i140	1	
		i141	1	
		i142	1	保育園②
		i217	2	家族K由来株
		i218	1	
計			20	

牛直腸便及び牛ホルモンから検出されたSTECの血清型・毒素型を、表4に示した。

牛直腸便 423 検体中 46 検体 (10.9%)、牛ホルモン 43 検体中 1 検体 (2.3%) からSTECが検出されたが、ヒトから高率に検出される O157 及び O26 は検出されず、多くはOUT (O血清群別不能) であった。この結果は、過去の調査結果と同様の傾向を示しており、同じ状況が継続していることが確認された。

表4 牛直腸便由来STECの血清型・毒素型

検体名	血清型	毒素型	陽性検体数	検出率 (%)
牛直腸便	O6:H34	2	1	0.2
	O6:HUT	2	2	0.5
	O8:H19	1, 2	1	0.2
	O74:H7	2	1	0.2
	O103:HUT	2	1	0.2
	O124:H19	2	1	0.2
	O153:HUT	2	1	0.2
	O153:HUT	1, 2	2	0.5
	O153:H-	1, 2	1	0.2
	OUT:H11	2	5	1.2
	OUT:H19	2	2	0.5
	OUT:H19	1, 2	2	0.5
	OUT:H2	1	2	0.5
	OUT:H21	2	3	0.7
	OUT:H41	1, 2	1	0.2
	OUT:H7	2	1	0.2
	OUT:HUT	2	3	0.7
	OUT:HUT	1, 2	5	1.2
	OUT:H-	1	1	0.2
	OUT:H-	2	10	2.4
	計		46	
牛ホルモン	OUT:H21	2	1*	2.3
	OUT:HUT	2	1*	2.3
	計		1	

*: 同一検体から検出

3.2 浴槽水等のレジオネラ汚染調査

浴槽水等 140 検体について実施したレジオネラ汚染調査結果を、表5に示した。

培養法により、浴槽水 128 検体中 30 検体 (23.4%)、原水・給湯水 11 検体中 1 検体 (9.1%) からレジオネラが検出され、ジャグジープール水 1 検体からは検出されなかった。浴槽水からは *L.pneumophila* (以下「*Lp*」という。) 血清群 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, UT が、原水・給湯水では *Lp* 血清群 1 が検出され、浴槽水は多様な血清群の *Lp* で汚染されていることが確認された。

保健所の検査で浴槽水等から検出されたレジオネラ 79 株を収集し、血清群別を実施した結果を、表6に示した。

浴槽水由来株は、*Lp* 血清群 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, UT と、*L.anisa*, *L.micdadei* およびレジオネラ属菌で、当センターの調査と同様に、多様な血清群および菌種が検出された。シャワー水由来株は *Lp* 血清群 5 と 6, ジャグジー水由来株は *Lp* 血清群 3 と 10, プール水由来株は *Lp* 血清群 1, 3, 10, 冷却塔水由来株は *Lp* 血清群 1, 3, 13 であった。

浴槽水等から分離された *Lp* 血清群 3 のうち、過去に分離された株も含めた 131 株について、PFGE法による解析を行った結果を、表7に示した。

表5 検体別レジオネラ検出状況 (平成 25 年度)

検体名	検体数	陽性検体数	検出率 (%)	検出菌種及び血清群(検体数)*
浴槽水	内湯	101	25	24.8
	露天風呂	27	5	18.5
原水・給湯水	11	1	9.1	<i>L.pneumophila</i> SG1(1)
ジャグジープール水	1	0	0.0	
計	140	31	22.1	

*: 重複を含む。 UT : O血清群別不能

表6 保健所等分離レジオネラ株 (平成 25 年度)

検体名	菌株数	検出菌種及び血清群 (株数)
浴槽水	65	<i>L.pneumophila</i> SG1(10), 3(11), 4(6), 5(6), 6(9), 8(1), 9(3), 10(12), 12(1), UT(2)
		<i>L.anisa</i> (1), <i>L.micdadei</i> (2), <i>Legionella</i> spp. (1)
シャワー水	3	<i>L.pneumophila</i> SG5(1), 6(2)
ジャグジー水	2	<i>L.pneumophila</i> SG3(1), 10(1)
プール水	3	<i>L.pneumophila</i> SG1(1), 3(1), 10(1)
冷却塔水	6	<i>L.pneumophila</i> SG1(3), 3(2), 13(1)
計	79	

UT : O血清群別不能

表7 県内で分離された*L.pneumophila* SG3 株のPFGEパターン数

由来	菌株数	バンドパターン数*
浴槽水	91	51
原湯	3	3
ジャグジー水	3	2
プール水	8	4
プールの過水	5	2
フローミル水	9	1
冷却塔水	3	3
患者	9	1
計	131	61

*検体間の重複を含む

表8 エルシニア抗体価測定結果(H25 年度)

菌種	患者数	検体数	陽性患者数	陽性率 (%)	血清群 (陽性患者数)
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	147	284	15	10.2	1(2), 2(3), 3(1), 4(2), 5(3), 6(4)
<i>Y. enterocolitica</i>			2	1.4	03(1), 08(1)

PFGEパターンは61パターンに分類され、多数の株が分離された浴槽水では、最も多い51パターンに分類された。一方、本年度県内のレジオネラ症患者1名から分離された*Lp*血清群3の株を含め、今まで県内で分離された患者由来*Lp*血清群3のPFGEパターンはすべて一致し、同じST93に型別された。これらの株は他地域では分離されておらず、本県でのみ地域特異的に継続分離されている。これらのことから、同一感染源からの感染が示唆されたが、他の浴槽水等由来株のPFGEパターンやSTとは異なっており、さらに多様な検体について、継続した汚染実態調査を実施する必要があると考える。

3.3 エルシニア抗体価調査

エルシニア感染症疑いあるいは川崎病との鑑別のため、小児科受診患者あるいは入院患者の血清抗体価を測定した結果を、表8に示した。

患者147名の血清284検体についてエルシニア抗体価を測定した結果、15名(10.2%)のYp(血清群1, 2, 3, 4, 5, 6)に対する抗体価が1:160以上の上昇が見られ、2名(1.4%)はYe(血清群O3, O8)に対する抗体価が1:160以上に上昇していた。本調査は、原因不明の川崎病との鑑別や感染実態が不明なエルシニア感染症の状況を明らかにするため、過去の検体も含めて本年度より3年間の調査を実施して、さらにデータの集積と解析を行っていく予定である。

なお、レジオネラの調査については、平成25年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る

公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」の研究班による調査の一環として実施したものである。また、エルシニア抗体価調査の一部は、姫路赤十字病院小児科との共同研究の検体を使用した。

謝 辞

本調査の実施に際して、STECのPFGE型別をお願いしました国立感染症研究所の寺嶋 淳先生、泉谷 秀昌先生、レジオネラのST型別をお願いしました国立感染症研究所の前川 純子先生、菌株の分与や検体採取にご協力いただきました関係機関の先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) 小林一寛：腸管出血性大腸菌の同定法 2. PCR法. 臨床検査, 36, 1334 ~ 1338, 1992
- 2) 寺嶋 淳, 泉谷秀昌, 三戸部治郎：食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究. 新興・再興感染症研究事業平成15年度総括・分担研究報告書2004, 10 ~ 21, 2004
- 3) 常 彬, 前川 純子, 渡辺 治雄：レジオネラを解析するパルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法の改良. IASR 2008, 29, 333-334.
- 4) Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, and Harrison TG.: Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*, J.Clin.Microbiol., 43, 2047-52, 2005

- 5) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. :
Addition of neuA, the gene encoding N-acetylneuraminat
cytidyl transferase, increases the discriminatory
ability of the consensus sequence-based scheme
for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1
strains, J.Clin.Microbiol., 45, 1965-1968, 2007

【調査研究】

胃腸炎ウイルスの疫学的研究

—岡山県の散発胃腸炎患者におけるロタウイルスAの流行状況(2012/2013 シーズン)—

Epidemiological Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama

—Surveillance of Rotavirus A from Sporadic Gastroenteritis in Okayama Prefecture (2012-2013)—

濱野雅子, 藤井理津志, 木田浩司, 葛谷光隆*, 檜原幸二**, 井上 勝**, 濃野 信***,
金谷誠久**** (ウイルス科)

*岡山県食肉衛生検査所

岡山赤十字病院小児科, *のうの小児科

****国立病院岡山医療センター小児科

Masako Hamano, Ritsushi Fujii, Kouji Kida,

Mitsutaka Kuzuya, Kouji Narahara, Masaru Inoue, Shin Nouno, Tomohisa Kanadani
(Department of Virology)

*Okayama Prefectural Meat Sanitation Inspection Station

Department of Pediatrics, Okayama Red-Cross Hospital, *Nouno Pediatric Clinic

****Department of Pediatrics, National Hospital Organization Okayama Medical Center

要 旨

2012/2013 年シーズン(2012 年 9 月～2013 年 8 月)の散発性胃腸炎患者ふん便 630 件について、イムノクロマト法または酵素抗体法によるロタウイルス A(以下「RVA」という)の検索を行い、陽性となった 145 件について、逆転写 PCR 法(以下「RT-PCR」という)により G 型別と P 型別を実施した。その結果、132 件で RT-PCR により RAV 遺伝子が確認された。RAV の検出時期は、2012 年 11 月～2013 年 6 月で、検出率のピークは 3 月～4 月であった。年齢別で検出率が高かったのは 1 歳と 2 歳で、ともに 30%を超えていたが、10 歳以上での検出例も 3 件みられた。G 型および P 型別は 126 件で可能であった。内訳は、G1P[8]が 117 件で最も多く、次いで G9P[8]が 5 件、G2P[4]と G3P[8]が各 1 件であった。また、G1P[8]と G3P[8]の混合感染例が 2 件みられた。もっとも多く見られた G1P[8]については、昨シーズン県内で遺伝子再集合体由来株の流行が確認されているため、簡易的に鑑別を行った結果、鑑別可能であった 115 件のうち 36 件(31.3%)が遺伝子再集合体由来株と推定された。

[キーワード: ロタウイルス A, 胃腸炎, 逆転写 PCR 法, 遺伝子再集合体]

[Key words: Rotavirus A, Gastroenteritis, Reverse-transcription PCR, Reassortant]

1 はじめに

ロタウイルス A(以下「RVA」という)は、レオウイルス科に属する 2 本鎖 RNA をゲノムとして持つウイルスであり、外殻糖たん白(VP7)及び外殻スパイクたん白(VP4)をコードする遺伝子に基づき、それぞれ G (Glycoprotein の略号) 遺伝子型 (G 型) 及び P (Protease sensitive の略号) 遺伝子型 (P 型) に分類される¹⁾。これまでに、G 型については G1～G27 型、P 型については P

[1]～P[35] 型がそれぞれ確認されており²⁾、さらに両者の組み合わせによって多くの遺伝子型が存在しうるが、そのうちヒトから検出される頻度が高いのは、G1P[8] 型、G2P[4] 型、G3P[8] 型、G4P[8] 型、および G9P[8] 型である^{1), 3)}。

RVA は小児の急性胃腸炎の病原体としてきわめて重要視されていることから、本ウイルスの感染予防を目的とした生ワクチンが複数メーカーで開発され、その導入

が世界的に進められている⁴⁾。主なものとしては、ヒト RVA 株 (G1P [8] 型) 由来の単価ワクチンである Rotarix[®] (グラクソ・スミスクライン社製)、及びヒト RVA の G1 ～ G4 型の VP7 遺伝子と P [8] 型の VP4 遺伝子を組み込んだ、ウシ RVA 遺伝子組み換え株に由来する 5 価ワクチンの RotaTeq[®] (メルク社製) が知られている。我が国においては、Rotarix[®] が 2011 年 7 月に、RotaTeq[®] が 2012 年 1 月にそれぞれ製造承認され導入が開始された。我々は、以前より岡山県内における RVA 流行状況を継続的に調査し、特定の血清型の流行パターンの変遷⁵⁾や、新しい遺伝子再集合体 RAV の県内侵入⁶⁾等を明らかにしてきた。2012 ～ 2013 年も、引き続き散発胃腸炎患者からのウイルス検出と遺伝子型別を行い、県内の RVA の流行状況を調査した。

2 対象と方法

2.1 対象

2012 年 9 月～ 2013 年 8 月 (毎年 9 月～翌年 8 月までを 1 シーズンとする) に県内の 3 医療機関で採取された散発胃腸炎患者 (年齢 0 ～ 28 歳) ふん便 630 件を用いた。

2.2 方法

市販の RVA 検出キット (イムノクロマト法または酵素抗体法) により RVA のスクリーニングを行い、陽性となった検体について、ふん便乳剤から市販キット (QIAamp Viral RNA mini kit, 株式会社キアゲン) により RNA を抽出した。この RNA を用いて、Gouvea ら⁷⁾

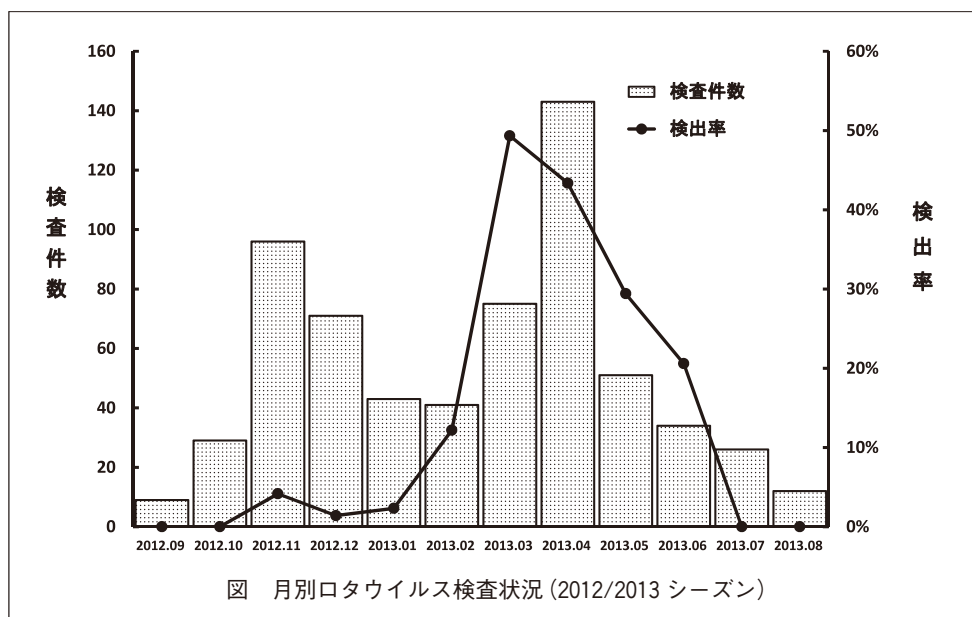
の報告した逆転写 PCR (RT-PCR) 法で G 型別を、Wu ら⁸⁾の方法による RT-PCR 法で P 型別を実施した。G1P [8] と同定された株については、2011/2012 シーズンに県内侵入が確認された異なるゲノグループ間 (Wa ゲノグループと DS-1 ゲノグループ) の遺伝子再集合体 (リアソータント) に由来する株 (VP7 および VP4 遺伝子型は G1 型プロトタイプの Wa 株と同じ G1P [8] 型であるが、VP6, NSP4 および NSP5/6 遺伝子型は G2 型プロトタイプの DS-1 株と同一である株) か否かを簡易的に判別するため、NSP4 遺伝子と NSP5/6 遺伝子を増幅する RT-PCR 法⁶⁾を実施した。これにより得られた産物サイズの比較を行い、NSP4 産物 > NSP5/6 産物の株は、従来型 (電気泳動像: Long パターン) 株、NSP4 産物 < NSP5/6 産物の株は、リアソータント由来型 (電気泳動像: Short パターン) 株と推定した。

3 結果

3.1 ウイルス検出状況

ふん便検体 630 件のうち、スクリーニングで陽性となったのは 145 件 (23.0%)、うち RT-PCR でウイルス遺伝子が確認されたのは 132 件 (20.9%) であった。

月別の検査検体数と RAV 検出率を図に示す。RAV は、2012 年 11 月～ 2013 年 6 月の間、毎月検出され、検出率が最も高かったのは、3 月 (49.3% : 37/75) で 4 月 (43.4% : 62/143) とともに 40% を超えるレベルで推移した後に漸減し、7 月には検出されなくなった。



RAVが検出された患者の年齢は、0～28歳で、年齢別検出率では、1歳(34.7%：70/202)と2歳(30.4%：24/79)が30%を超えて最も高かったが、10歳、12歳および28歳でも各1例のRAV陽性例が見られ、10歳以上の比較的年齢の高い患者が、少数ながら存在することが確認された。

3.2 G遺伝子型およびP遺伝子型の解析

ウイルス遺伝子が確認された132件のうち、126件でG遺伝子型およびP遺伝子型が決定可能であった。各遺伝子型の月別検出状況を表1に示す。

G1P[8]が117件と最も多く、次いでG9P[8]が5件、G2P[4]とG3P[8]が各1件、G1P[8]とG3P[8]の混合感染例が2件であった。G1P[8]は全遺伝子型の92.8%を占めて3～5月を中心にほぼシーズンをとおして検出され、検出年齢は、0～3歳を中心に28歳にまで及んだ。

一方、G9P[8]は2～4月に0～2歳の患者から検出された。

3.3 G1P[8]のリアソータント由来株解析

G1P[8]と同定された117件のうち、115件でNSP4遺伝子とNSP5/6遺伝子のPCR産物が得られ、比較を行ったところ、79件(68.7%)が従来型株、36件(31.3%)がリアソータント由来型株と推定された。従来型株とリアソータント由来型株の月別検出状況を表2に、また、年齢別検出状況を表3に示す。

従来型株が2月以降6月までのシーズン後半に検出されたのに対し、リアソータント由来型株は11月～5月のより長期間にわたって検出された。検出年齢は、従来型株が0～2歳を中心に大部分が6歳までの比較的低年齢の患者からの検出であったのに対して、リアソータント由来型株は7～28歳の患者からも検出された。

表1 各遺伝子型の月別検出状況

遺伝子型	採 取 月												計 (%)
	2012.09	2012.10	2012.11	2012.12	2013.01	2013.02	2013.03	2013.04	2013.05	2013.06	2013.07	2013.08	
G1P[8]			4		1	2	35	57	11	7			117 (92.8)
G2P[4]						1							1 (0.8)
G3P[8]				1									1 (0.8)
G9P[8]						2	1	2					5 (4.0)
G1&3P[8]								2					2 (1.6)
計	0	0	4	1	1	5	36	61	11	7	0	0	126

表2 G1P[8]型の月別検出状況

型別	採 取 月												計 (%)
	2012.09	2012.10	2012.11	2012.12	2013.01	2013.02	2013.03	2013.04	2013.05	2013.06	2013.07	2013.08	
従来株型						1	23	45	3	7			79 (68.7)
リアソータント株型			4		1	1	12	10	8				36 (31.3)
計	0	0	4	0	1	2	35	55	11	7	0	0	115

表3 G1P[8]型の年齢別検出状況

型別	年 齢 (歳)													計 (%)
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11～	不明	
従来株型	8	45	16	4	1	1	1					1	2	79 (68.7)
リアソータント株型	2	17	3	4	4		2	2			1	1		36 (31.3)
計	10	62	19	8	5	1	3	2	0	0	1	2	2	115

4 考察

2012/2013 シーズンの岡山県内におけるRAVの流行は、3、4月をピークとするG1P[8]を主流行型とするものであった。G1P[8]は、ヒトから最も高頻度に検出されるといわれるRAVの遺伝子型であるが、岡山県では2004/2005 シーズン以降の8シーズンでは、2006/2007 シーズンを除いてG1P[8]が主流行型となったことはなかった^{9), 10)}。しかし、2011/2012 シーズン後半から検出割合が増加し⁶⁾、6シーズンぶりに主流行型となった。2011/2012 シーズン後半から検出されたG1P[8]は、その7割が異なるゲノグループ間(WaゲノグループとDS-1ゲノグループ)のリアソータント由来型株であり、これは県内では初めて確認されたものであった⁶⁾。今シーズン検出されたG1P[8]では、リアソータント由来型株の占める割合は昨シーズンより低下していたが、従来型株に比べてシーズン中の長期間、広い年齢層から検出されており、また、岡山県以外の地域でも多数検出されている¹¹⁾ことから、これまで遺伝的に不安定であると考えられてきたリアソータント由来型株が2シーズン連続で広範囲に流行しうることが明らかになった。また、リアソータント由来型株は少数ながら年齢の高い患者からも検出されており、従来型株と免疫学的に差があるのか、既に導入されているワクチンとの関係等、今後も注視していく必要があると考えられる。

文 献

- 1) 小林宣道, 浦沢正三: ロタウイルス, ウイルス, 50: 157-172, 2000
- 2) Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Banyai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P., Nakagomi, O., Parreno, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J. T., Desselberger, U., Van Ranst, M.: Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.*, 156: 1397-1413, 2011
- 3) Santos, N. and Hoshino, Y.: Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 15: 29-56, 2005
- 4) 中込とよ子, 中込 治: ロタウイルスワクチンの現状と展望, 病原微生物検出情報, 26, 14-16, 2005
- 5) 葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志, 金谷誠久: 胃腸炎ウイルスの研究—岡山県における血清型G9型A群ロタウイルスの流行状況について, 岡山県環境保健センター年報, 34, 85-89, 2010
- 6) Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Kida K, Mizoguchi Y, Kanadani T, Nishimura K, Kishimoto T.: Prevalence and molecular characterization of G1P[8] human rotaviruses possessing DS-1-like VP6, NSP4, and NSP5/6 in Japan. *Med Virol.* 2014 Jun;86(6):1056-64. doi: 10.1002/jmv.23746. Epub 2013 Sep 16
- 7) Gouvea, V., Glass, R. L., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B. and Fang, Z. Y.: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens, *J. Clin. Microbiol.*, 28: 276-282, 1990
- 8) Wu, H., Taniguchi, K., Wakasugi, F., Ukae, S., Chiba, S., Ohseto, M., Hasegawa, A., Urasawa, T., Urasawa, S.: Survey on the distribution of the gene 4 alleles of human rotaviruses by polymerase chain reaction., *Epidemiol. Infect.*, 112: 615-622, 1994
- 9) 葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志, 岸本壽男, 金谷誠久, 西村恵子: 岡山県におけるA群ロタウイルス検出状況と血清型分布の最近の動向, 病原微生物検出情報, 32, 71-72, 2011
- 10) 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志, 岸本壽男, 葛谷光隆, 金谷誠久, 福岡義久: 岡山県におけるA群ロタウイルスの検出状況(2010/11 ~ 2012/13 シーズン), 病原微生物検出情報, 35, 68-69, 2014
- 11) 藤井克樹: 2012/2013 年シーズンにおけるロタウイルス分子疫学解析, 平成 25 年度厚生労働省新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業「網羅的ロタウイルス分子疫学的基盤構築とワクチン評価」研究分担報告書, 53-56, 2014

【調査研究】

日本紅斑熱リケッチア検出Real-timePCR法の改良と 中国四国地方の地方衛生研究所における模擬訓練

Improvement of the Japanese spotted fever rickettsia detection Real-time PCR method, and training at the prefectural and municipal public health Institutes of the Chugoku-Shikoku region.

木田浩司, 溝口嘉範, 磯田美穂子, 濱野雅子, 藤井理津志 (ウイルス科)

Kouji Kida, Yoshinori Mizoguchi, Mihoko Isoda, Masako Hamano, Ritsushi Fujii
(Department of Virology)

要 旨

花岡ら (EID,2009) が開発した *Rickettsia japonica* を検出する real-timePCR法の陽性コントロールとして, 標的遺伝子領域に遺伝子マーカー配列を組み込んだプラスミドを作成した。これにより, *R. japonica* 遺伝子の定量が可能となった。また, 本法を応用し, 遺伝子マーカー配列を probe とすることで, 検査と同時に陽性コントロールの検体への混入を確認できる Duplex real-timePCR法を開発し, 中国四国地方の地方衛生研究所 8 機関で模擬訓練を実施したところ, 全ての機関で良好な結果が得られた。今後, 本法の導入を促進し, 全国的な検査体制の強化に努めたい。

[キーワード: 日本紅斑熱, リケッチア, リアルタイムPCR, TaqMan probe]

[Key words: Japanese spotted fever, Rickettsia, Real-time PCR, TaqMan probe]

1 はじめに

日本紅斑熱は感染症法で四類感染症に規定されるダニ媒介性細菌感染症であり, 毎年 100 名を超える患者が報告され, 治療が遅れると死に至ることもある重篤な熱性発しん性感染症である。本症は, 発症後早期に有効な抗菌剤を投与することで重症化を防ぐことができるため, 迅速な診断が求められている。2009 年, 花岡らによって *R. japonica* を特異的に検出する real-timePCR法が報告され¹⁾, 導入施設が徐々に増加している。real-timePCR法は, 感度・迅速性に優れるなど多くの利点を併せ持つ検査法であるが, 反面, 陽性コントロールの検体への混入による誤判定の危険性が高いことが知られており, 本病原体に限らず, 近年の実験室診断の大きな課題となっている。そこで我々は, *R. japonica* 検出 real-timePCR法の標的遺伝子領域に遺伝子マーカー配列を組み込んだプラスミドを作成し, 陽性コントロールとして利用可能か検証した。

2 材料と方法

2.1 コントロールプラスミドの作成

R. japonica 検出 real-timePCRの標的遺伝子 216bpORFの増幅領域である 85 塩基に, 遺伝子マーカー配列 33 塩基を挿入した 118 塩基を合成し (図 1), PCR法によって増幅した。次に, PCR増幅産物を TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen 社) を用い, 添付マニュアルに従って pCR2.1-TOPO vector にクローニングした。プラスミドに挿入した遺伝子配列を, キット添付の M13 プライマーセットを用いたダイレクトシーケンシング法により確認した後, PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) を用い, 添付マニュアルに従って組換えプラスミドを精製した。得られた組換えプラスミド溶液の OD 値から, TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH8.0) にて 10^7 copies/ 2μ L に調製したものをコントロールプラスミド原液とした。

2.2 コントロールプラスミドのPCR増幅効率と定量性の検討

$10^7 \sim 10^0$ copies/well となるよう 10 倍階段希釈したコントロールプラスミド溶液を用いて検量線を作成し, real-timePCR法における増幅効率及び定量性の検討を

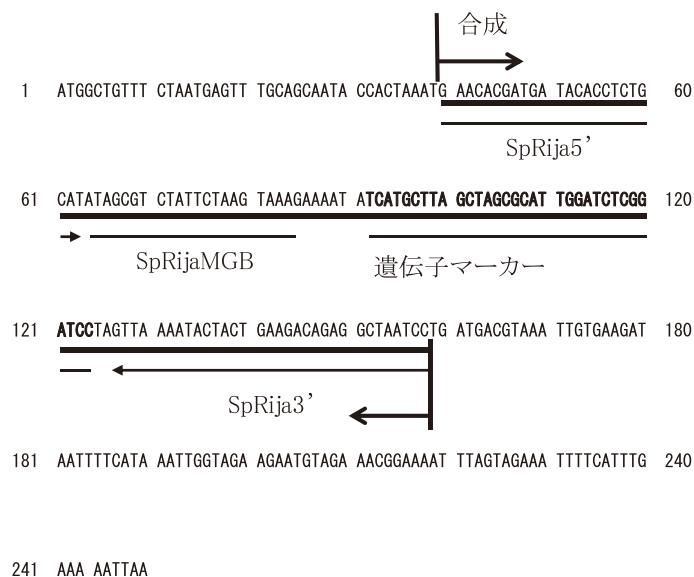


図1 *R. japonica*検出real-timePCRの増幅領域と遺伝子マーカーの挿入部位

Primerset : SpRija5' , SpRija3' Probe(MGB) : SpRijaMGB

行った。また、遺伝子マーカー配列の挿入による影響を検討するため、*R. japonica*培養液から抽出したDNAを 10^{-4} まで10倍階段希釈し、増幅効率を比較した。

real-timePCR法は、花岡らの報告をもとに、TaqMan Universal Master mix (life technologies社)を用い、20 μ L容量(検体2 μ L)でStepOnePlus (life technologies社)により実施した。プライマー及びプローブの配列を表1に示した。

2.3 Duplex real-timePCR法の検討

コントロールプラスミドに挿入した遺伝子マーカー配列を利用し、VIC標識したPC check probeを作成し(表1)、Duplex real-timePCR法によってコントロールプラスミドと*R. japonica*培養液から抽出したDNAが判別可能か検証した。

Duplex real-timePCR法は、花岡らの方法にPC

check probe(表1)を0.1 μ Mとなるよう添加し、20 μ L容量(検体2 μ L)でStepOnePlusにより実施した。

2.4 中国四国地方の地方衛生研究所における模擬訓練

中国四国地方の地方衛生研究所8機関にDuplex real-timePCR法に必要な試薬を模擬訓練実施マニュアルとともに配布し、*R. japonica*から抽出したDNAを検体として、定量値、非特異反応の有無及び使用機器・試薬について報告を求めた。

3 結果

3.1 コントロールプラスミドのPCR増幅効率と定量性の検討

10倍階段希釈したコントロールプラスミド溶液を用いてreal-timePCR法を実施したところ、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^1$ copies/wellの範囲内で、PCRサイクル数に比例した

表1 プライマー及びプローブ

	塩基長 (base)	塩基配列
SpRija5'	24	5'-GAA CAC GAT GAT ACA CCT CTG CA-3'
SpRija3'	32	5'-GAT TAG CCT CTG TCT TCA GTA GTA TTT TAA CT-3'
SpRijaMGB	21	5'-(FAM)-TAG CGT CTA TTC TAA GTA AAG-(NFQ)-(MGB)-3'
PC check probe*	33	5'-(VIC)-TCA TGC TTA GCT AGC GCA TTG GAT CTC GGA TCC -(NFQ)-(MGB)-3'

* Duplex real-timePCRに使用

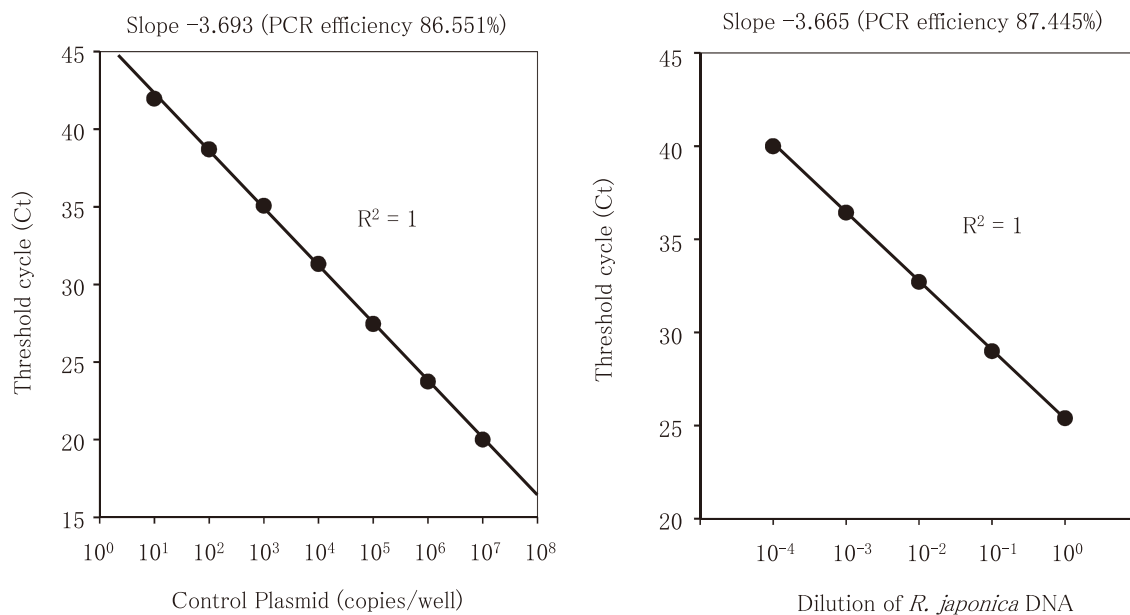


図2 コントロールプラスミドと *R. japonica* 抽出DNAによる real-timePCR 効率の比較

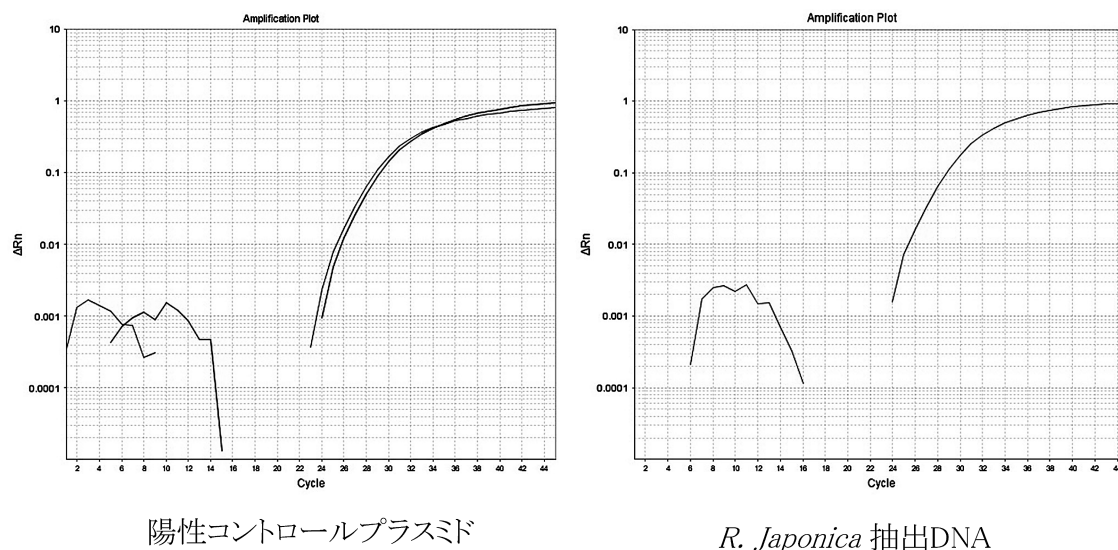


図3 Duplex real-timePCRによる SpRijaMGB probeとP.C. check probeの感度比較

赤:SpRijaMGB (FAM)
青:PC check probe (VIC)

遺伝子の増幅が認められた。また、X軸にコントロールプラスミドのコピー数、Y軸にThreshold cycle (Ct)をプロットした検量線を作成したところ、直線性、傾きともに良好であった(図2)。また、*R. japonica* 培養液から抽出したDNAを10倍階段希釈してreal-timePCR法を実施し、X軸に希釈倍数、Y軸にThreshold cycle (Ct)をプロットしたグラフを作成して解析を行ったところ、コントロールプラスミドと同様の直線性と傾きを示した(図2)。これらのことから、コントロールプラスミドへ

挿入した遺伝子マーカ配列によるPCR増幅効率への影響はなく、定量が可能であることが明らかとなり、その感度は 1×10^1 copies/well であると推定された。

3.2 Duplex real-timePCR法の検討

Duplex real-timePCR法によって、コントロールプラスミドはFAMとVICの蛍光増幅が確認された。これに対し、*R. japonica* 培養液から抽出したDNAでは、FAMの蛍光増幅のみが確認された(図3)。

表2 中国四国地域の地方衛生研究所における模擬訓練

機関	装置	試薬	検体定量値	備考
A	ABI 7500	TaqMan Universal Master Mix	3.3×10^4	
B	ABI 7500	TaKaRa Premix EX Taq	5.1×10^4 1.1×10^4	2名でそれぞれ検査
C	Lightcycler Nano	TaqMan Universal Master Mix	2.0×10^4	
D	ABI 7500	TaqMan Universal Master Mix	1.5×10^4	
E	ABI 7500 fast	TaqMan Universal Master Mix	2.2×10^4	
F	ABI 7500 fast	TaqMan Universal Master Mix	3.0×10^4	
G	ABI 7500	Taqman fast advanced master mix	1.2×10^4	Cycle条件を変更 95°C3sec 60°C30min
岡山県	ABI StepOnePlus	TaqMan Universal Master Mix	1.9×10^4	

3.3 中国四国地方の地方衛生研究所における模擬訓練

realtime PCR装置は8機関中6機関がABI 7500(うち2機関でABI 7500fast), 1機関がLightcycler Nano, 1機関がABI StepOnePlusを使用していた。また, 試薬は8機関中6機関がTaqMan Universal PCR Master Mix (ABI), 1機関がTaqman fast advanced master mix (ABI), 1機関がPremix EX Taq (TaKaRa)を使用していた。

Duplex real-timePCR法については, 8機関全てで正しく実施されており, コントロールプラスミドの検体へのコンタミネーションは認められなかった。また, *R. japonica* 遺伝子の定量値は $1.1 \sim 5.1 \times 10^4$ copies/well の範囲であった(表2)。

4 考察

real-timePCR法は迅速性に優れるだけでなく, 電気泳動を必要としないためコンタミネーションのリスクも低い検査法であるが, 近年, 地方衛生研究所における陽性コントロールのコンタミネーション事例が頻繁に報告されている。これは, 人事異動等による技術力の低下も要因の一つであると考えられるが, 検査法の改善など, 対策は急務である。

今回我々は遺伝子マーカー配列を挿入したコントロールプラスミドを作成し, 花岡らの開発した*R. japonica* を特異的に検出するreal-timePCR法¹⁾への応を試みた。コントロールプラスミドと*R. japonica*から抽出したDNAを用いたreal-timePCR法によるPCR増幅効率と定量性の検討の結果, 両者に明確な違いは観察されず, 挿入した遺伝子マーカー配列によるreal-timePCR法への悪影響は無いと考えられた。また, SpRijaMGB (FAM

標識)とPC check probe (VIC標識)を用いたDuplex real-timePCR法において, コントロールプラスミドではFAMとVICの蛍光増幅が確認されたのに対し, *R. japonica* 培養液から抽出したDNAでは, FAMの蛍光増幅のみが確認され, 両者を明確に判別できた。これらのことから, 我々の開発したコントロールプラスミドを陽性コントロールとして利用したDuplex real-timePCR法によって, 検査と同時にコンタミネーションの有無を確認できると考えられた。

そこで, 中国四国地方の地方衛生研究所8機関を対象としたDuplex real-timePCR法の模擬訓練を実施したところ, 装置3種, 試薬3種, またその組み合わせは4パターンであったが, いずれも*R. japonica* 遺伝子が検出可能であり, その定量値もおおむね良好な結果が得られた。また, 全ての機関で陽性コントロールプラスミドの検体へのコンタミネーションの有無が確認できており, 本法の有用性が確認された。今後, 本法の導入を促進し, 全国的な検査体制の強化に努めたい。

文 献

- 1) Nozomu Hanaoka, Minenosuke Matsutani, Hiroki Kawabata, Seigo Yamamoto, Hiromi Fujita, Akiko Sakata, Yoshinao Azuma, Motohiko Ogawa, Ai Takano, Haruo Watanabe, Toshio Kishimoto, Mutsunori Shirai, Ichiro Kurane, and Shuji Ando : Diagnostic Assay for *Rickettsia japonica*, Emerging Infect. Dis. , 15, 1994-1997, 2009

【調査研究】

岡山県におけるインフルエンザ流行の疫学的解析 (2012 ～ 2013 年シーズン)

Epidemiological Analysis of Influenza in Okayama Prefecture during 2012 to
2013 Season

木田浩司, 溝口嘉範, 磯田美穂子, 濱野雅子, 藤井理津志, 島村琢自* (ウイルス科)

*岡山県保健福祉部健康推進課

Kouji Kida, Yoshinori Mizoguchi, Mihoko Isoda, Masako Hamano, Ritsushi Fujii and
Takuji Shimamura*

(Department of Virology)

*Public Health Policy Division, Department of Health and Social Welfare, Okayama Prefectural
Government

要 旨

2012 ～ 2013 シーズンの岡山県におけるインフルエンザは、岡山県感染症発生動向調査事業における患者発生状況から、2012 年第 52 週 (12 月下旬) に流行が始まり、2013 年第 22 週 (6 月上旬) に終息したものと考えられた。ウイルス検査成績から、今シーズンは AH3 型を主流行とした B 型との混合流行であると推察された。シーズン前半から流行のピークにかけて、AH3 型が最も多く検出されたが、2013 年に入り、B 型の検出比率が高くなった。B 型に着目すると、2012 年には山形系統のみ検出されたが、2013 年に入り、ビクトリア系統の検出比率が高くなった。

[キーワード：岡山県, インフルエンザウイルス, インフルエンザ集団発生, 感染症発生動向調査, 疫学解析]

[Key words : Okayama Prefecture, Influenza virus, Outbreak of influenza, Infectious disease surveillance,
Epidemiological analysis]

1 はじめに

2012 ～ 2013 年シーズンの岡山県におけるインフルエンザ流行の詳細を明らかにするため、学校等におけるインフルエンザ集団発生事例の患者発生状況及び岡山県感染症発生動向調査事業の定点医療機関におけるインフルエンザ患者発生状況を解析した。また、患者から採取された咽頭拭い液等からインフルエンザウイルス (Inf.V) の検索を行った。

2 材料及び方法

2.1 インフルエンザ患者発生状況

岡山県感染症発生動向調査事業の週別患者報告に基づき、定点医療機関あたりのインフルエンザ患者数 (1 週間に 1 ヶ所の定点医療機関を受診したインフルエンザ患者数の平均値) を算出・集計した。

2.2 Inf.V 検査材料

2012 年 11 月～2013 年 4 月にインフルエンザ集団発生が認められた 12 施設の患者 32 人及び平成 24 年 12 月～25 年 8 月に発生動向調査で確認されたインフルエンザ患者 44 人 (合計 76 人) から採取した咽頭拭い液等を Inf.V 検査材料とした (表 1)。

2.3 遺伝子検出法に基づく A 型 Inf.V 検査

遺伝子検出法に基づく A 型 Inf.V の検査については、国立感染症研究所から示された「インフルエンザ診断マニュアル (第 2 版)」に従って実施した。すなわち、QIAamp Viral RNA Mini Kit (株式会社キアゲン) を用い、検体からウイルス RNA を抽出後、前記マニュアルに従って逆転写リアルタイム PCR (RT-realtimePCR) 法を実施した。

表1 インフルエンザウイルス検査成績

	検 体 採 取 状 況				ウイルス検出・同定			
	施設 No.	施 設 名	所在地	検体採取 年月日	検 出 ^{*1}	同 定		
						AH3型	B 型 (ビクトリア系統)	B 型 (山形系統)
集団 発生事例	1	A 高等学校	岡山市	2012. 11. 6	1/1	1	0	0
	2	A 小学校	笠岡市	2012. 12. 12	2/3	0	0	2
	3	B 小学校	岡山市	2013. 1. 15	2/2	2	0	0
	4	C 小学校	瀬戸内市	2013. 1. 15	5/5	5	0	0
	5	B 高等学校	勝央町	2013. 1. 15	2/2	2	0	0
	6	D 小学校	赤磐市	2013. 1. 17	2/2 ^{*2}	1	0	0
	7	E 小学校	総社市	2013. 1. 21	1/1	1	0	0
	8	F 小学校	新見市	2013. 1. 21	2/5	2	0	0
	9	G 小学校	真庭市	2013. 1. 21	2/5	2	0	0
	10	H 小学校	倉敷市	2013. 1. 22	2/2	2	0	0
	11	I 小学校	高梁市	2013. 1. 22	0/2	0	0	0
	12	J 小学校	岡山市	2013. 4. 18	1/2	0	0	1
	小 計					22/32 (68. 8%)	18 (56. 2%)	0 (0. 0%)
散発事例	所管保健所名 検体採取年月日							
	岡山市保健所 2012. 12. 11～2013. 8. 1				16/23	12	2	2
	備前保健所 2012. 12. 19～2013. 2. 1				3/3	2	1	0
	備中保健所 2012. 12. 28～2013. 4. 9				8/12	2	3	3
	美作保健所 2013. 8. 8				0/6	0	0	0
小 計					27/44 (61. 4%)	16 (36. 4%)	6 (13. 6%)	5 (11. 4%)
合 計					49/76 (64. 5%)	34 (44. 7%)	6 (12. 8%)	8 (10. 5%)

*1 陽性数／検体数

*2 1件はA型別不能

2.4 Inf.Vの分離

Inf.Vの分離はMDCK細胞を使用して行った¹⁾。Inf.V検査材料をMDCK細胞に接種し、盲継代2～3代後に細胞変性効果のみられた検体について、ニワトリ赤血球を用いて赤血球凝集(HA)試験²⁾を実施し、HAが観察された場合を分離陽性とした。分離株については、AH1pdm09型ワクチン株(A/California/7/2009(H1N1pdm09))、AH3型ワクチン株(A/Victoria/361/2011(H3N2))、山形系統³⁾に属するB型Inf.V(B型山形系統Inf.V)標準株(B/Wisconsin/01/2010)及びビクトリア系統³⁾に属するB型Inf.V(B型ビクトリア系統Inf.V)ワクチン株(B/Brisbane/60/2008)に対する抗血清(いずれも国立感染

症研究所より分与)を用いた赤血球凝集阻止(HI)試験により型別を行った。

3 結 果

3.1 患者発生状況

岡山県感染症発生動向調査事業における県全体の定点医療機関あたり(定点あたり)のインフルエンザ患者数の推移を図1に示した。2012年第52週(12月下旬)に、定点あたり患者数がインフルエンザ流行開始の目安とされる1.0人を超えた後、2013年第2週(1月上旬)には注意報レベルにあたる定点あたり5.0人を上回った。その後、患者数は急激に増加し、第5週(2月上旬)には警報

レベル(定点あたり30人)を超えてピーク(31.8人)に達した。その後、患者数は漸減し、第21週(5月下旬)には定点あたり1.0人を下回り、流行はほぼ終息した。

3.2 ウイルス検査成績

インフルエンザ患者からの検体採取状況及びウイルス検出状況を表1及び図1に示した。インフルエンザ集団発生が認められた12施設中11施設の患者22人(68.8%)からInf.Vが検出されたが、その内訳はAH3型18件(56.2%)及びB型山形系統3件(9.4%)であった。一方、散发例では44人中27人(61.4%)からInf.Vが検出されたが、その内訳はAH3型16件(36.4%)、B型ビクトリア系統6件(13.6%)及びB型山形系統5件(11.4%)であった。ウイルス株全体ではAH3型(34件:44.7%)が最も多く、次いでB型山形系統(6件:12.8%)、B型ビクトリア系統(5件:10.5%)の順であった。

週別のウイルス検出状況を図1に示した。AH3型はシーズン前半から流行のピークにかけて最も多く検出された。B型に着目すると、山形系統は2012年第50週(12月中旬)から検出されはじめ、2013年第3週(1月中旬)まではB型の主流であったが、第5週(2月上旬)からはビクトリア系統の検出比率が高くなった。

4 考 察

今シーズンの岡山県におけるインフルエンザは、患者発生状況から2013年第5週(2月上旬)をピークとする一峰性の流行パターンが認められた。また、ウイルス分離成績等から、今シーズンはAH3型を主流行としたB型との混合流行であると推察された。流行時期別では、シーズン前半にはAH3型及びB型山形系統が、シーズン後半には主にB型ビクトリア系統が検出され、AH1pdm09型は検出されなかった。全国の流行状況を見ると²⁾、2013年第4週をピークとする一峰性の流行パターンが認められた。分離成績では、AH1pdm09型は全体の2%しか分離されていないが、AH3型はシーズン当初から分離され、流行のピークを過ぎるまでは分離株の大半を占めており、2013年第12週以降、B型の分離報告数がA型を上回っていた。これらは本県の今シーズンの状況と類似していた。

HI試験については、2012年度までは国立感染症研究所からフェレット感染血清が供給されていたが、2013年度からウサギ免疫血清に変更となったため、抗原性解析が実施不能になった。そのため、遺伝子解析法等の導入により、県内流行株の詳細を把握する必要があると考えられるが、今後の課題である。

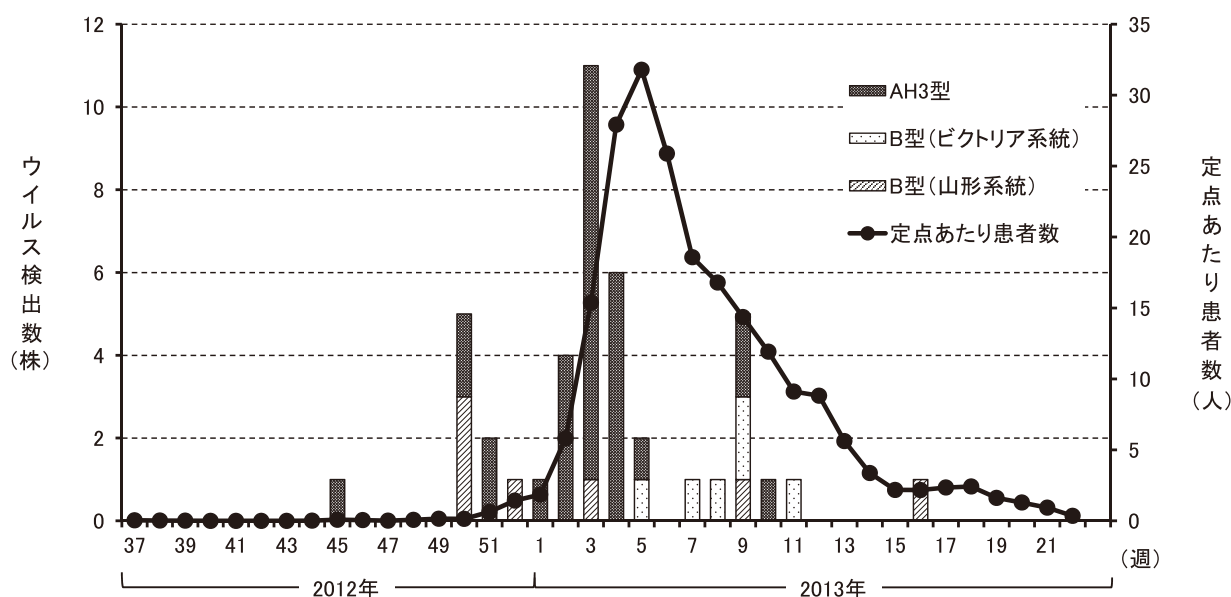


図1 週別のインフルエンザ患者数及びウイルス検出状況

カラムが型別のウイルス検出数を、折れ線が県全体の定点医療機関あたり(定点あたり)患者数を示す。

文 献

- 1) 飛田清毅：MDCK細胞によるインフルエンザウイルスの分離，臨床とウイルス，4，58-61，1976
- 2) 国立感染症研究所 感染症情報センター：インフルエンザ 2012／13 シーズン，病原微生物検出情報，34，325-327，2013

【資 料】

感染症流行予測調査(平成 25 年度ポリオ感染源調査)

Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases
Surveillance of Poliovirus in Okayama Prefecture (2013-2014)

磯田美穂子, 溝口嘉範, 木田浩司, 濱野雅子, 藤井理津志, 島村琢自* (ウイルス科)

*岡山県保健福祉部健康推進課

Mihoko Isoda, Yoshinori Mizoguchi, Koji Kida, Masako Hamano, Ritsushi Fujii, Takuji Shimamura*
(Department of Virology)

*Public Health Policy Division, Department of Health and Social Welfare,
Okayama Prefectural Government

要 旨

厚生労働省委託事業である感染症流行予測調査の一環として, ポリオウイルス野生株の侵入監視を目的として感染源調査を実施した。岡山市の健康な保育園児 60 名を対象に, 平成 25 年 8 月に採取した糞便検体からポリオウイルスの分離を試みたが, 全て陰性であり, ポリオウイルス野生株の侵入は認められなかった。

[キーワード: 感染症, サーベイランス, ポリオウイルス]

[Key words: Infectious disease, Surveillance, Polio virus]

1 はじめに

厚生労働省委託事業である感染症流行予測調査は, 予防接種が実施されている様々な感染症に対する集団免疫の把握状況(感受性調査)及び病原体の検索等の調査(感染源調査)を行うことで, 総合的に疾病の流行を予測するとともに, 予防接種事業の効果的な運用を図ることを目的としている。ポリオウイルスの感染源調査はその一環であり, 我が国では 1993 年以降確認されていないポリオウイルス野生株の国内侵入を監視するために重要である。岡山県では昭和 55 年から本調査を継続的に実施しているが, 平成 25 年度についても引き続き調査を行った。

2 材料及び方法

2.1 検査対象

岡山市内の H 保育園の健康な園児 60 人(0~1 歳 20 人, 2~3 歳 20 人, 4~6 歳 20 人)から, 平成 25 年 8 月 2 日~8 月 10 日の期間にふん便を採取し, 試験に供した。

2.2 ウイルス分離及び同定検査

感染症流行予測調査実施要領(平成 25 年度)及び感染

症流行予測調査事業検査術式(平成 14 年 6 月)¹⁾に従い, FL 細胞及び RD18S 細胞を使用した。分離されたウイルスの同定は中和試験により行った。

3 結果及び考察

表 1 に年齢群別ポリオ及びその他のウイルス分離成績を示す。ポリオウイルスの分離はすべて陰性であった。その他のウイルスとしてコクサッキーウイルス B2 型(CB2)19 株(1 歳児 9 人, 2 歳児 1 人, 3 歳児 2 人, 4 歳児 5 人, 5 歳児 2 人), アデノウイルス 2 型(AD2)1 株(1 歳児 1 人)及びアデノウイルス 6 型(AD6)1 株(0 歳児 1 人)が分離された。

CB2 は岡山県内の感染症発生動向調査(平成 25 年度)では全く分離されていないにもかかわらず, 本調査では最も多く分離された。これは, 感染症発生動向調査が医療機関受診者を対象とするのに対し, 本調査は基本的に健康者を対象とすることが一因として考えられる。全国的(平成 25 年 4 月~平成 26 年 2 月)には 7 月~9 月に多く検出され, コクサッキーウイルス B 群の中では CB3 に次いで報告数が多かった²⁾。本調査の結果と全国的な

表1 年齢群別ポリオ及びその他のウイルス分離成績

年齢群 (歳)	検体数	ウイルス分離				
		ポリオ	CB2	AD2	AD6	合 計
0～1	20	0	9	1	1	11
2～3	20	0	3	0	0	3
4～6	20	0	7	0	0	7
合 計	60	0	19	1	1	21

分離状況を勘案すると、本県にも7月～9月頃に本ウイルスの広範な侵淫があった可能性が高いと考えられる。

また、アデノウイルスではAD2及びAD6が1株ずつ検出された。AD2は岡山県内の感染症発生動向調査では6, 7, 12, 1及び2月に合計5株分離され、アデノウイルスの中ではAD3に次いで多く分離された。全国的(平成25年4月～平成26年2月)には年度を通じて検出され、アデノウイルスの中では最も報告数が多かった²⁾。一方AD6は岡山県内の感染症発生動向調査では全く検出されていなかった。全国的(平成25年4月～平成26年2月)にはアデノウイルスの中では9番目に多く検出されている。

本調査は、第一義的にはポリオウイルスの感染源を特定する目的で実施されるが、感染症発生動向調査では掴みきれないウイルスの侵淫状況を推察できる点で意義深い。

ポリオ侵入をより広域的に監視するため、下水を採取しウイルス検査を行う環境水サーベイランスが平成25年度より一部の自治体において実施されている。平成26年度には本県においても導入が検討されている。

文 献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課・国立感染症研究所
感染症流行予測事業委員会：感染症 流行予測検査術式，2002
- 2) 国立感染症研究所，厚生労働省健康局結核感染症課：
病原微生物検出情報，Vol.35，No.3，89，2014

【調査研究】

GC/MS/MSを用いた野菜類及び果実類中残留農薬の一斉分析法の 妥当性評価(第1報)

Validation Study on a Method for Simultaneous Determination of Pesticide Residues
in Vegetables and Fruits by GC/MS/MS (1)

難波順子, 浅田幸男, 赤木正章, 北村雅美, 肥塚加奈江(衛生化学科)

Junko Namba, Yukio Asada, Masaaki Akaki, Masami Kitamura, Kanae Koeduka
(Department of Food and Drug Chemical Research)

要 旨

GC/MS/MSを用いた野菜類及び果実類中残留農薬の一斉分析法の妥当性評価を、厚生労働省の妥当性評価ガイドラインに従って行った。各農薬を試料からアセトニトリルで抽出し、塩析、脱水した後、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、GC/MS/MSで測定した。添加を行う代表的な野菜類及び果実類として、ばれいしょ、キャベツ、ほうれん草、りんご及びオレンジの5種類を用いた。添加濃度は試料中0.1ppmおよび0.01ppmの2濃度とし、添加試料を1名が2併行、5日間の枝分かれ試験で行った。その結果、5農産物全てでガイドラインの目標値を両濃度で満たしたのは163種類であった。

[キーワード：残留農薬、一斉分析法、妥当性評価、ガスクロマトグラフィータンデム質量分析計]

[Key words : pesticide residues, simultaneous determination, validation study, GC/MS/MS]

1 はじめに

食品中の残留農薬等の規格基準にポジティブリスト制度が導入され、平成18年5月29日から残留基準が設定されていない農薬等を含む食品については一律基準(0.01ppm)が適用され、それを超えた量を含む食品の販売等が禁止された。これに伴い、監視対象農薬が大幅に増加し、一斉分析法を用いた迅速かつ高感度な農産物中の残留農薬分析が求められようになった。岡山県でも、通知試験法であるGC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)¹⁾に示された試験溶液調製法に準拠した一斉分析法により、農産物中の残留農薬検査をGC/MS/MS及びLC/MS/MSを用いて実施している。

また、平成19年11月15日付け食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」²⁾(以下「ガイドライン」という。)が平成22年12月24日に改正された³⁾ことにより、通知試験法¹⁾に基づき残留農薬検査を実施する場合においても、食品の多様性等にも配慮の上、平成25年12月13日までに妥当性評価を実施する必要性が生じた。そのため、

代表的な5種類の野菜・果実を用いて、当センターで行っているGC/MS/MSを用いた残留農薬の一斉分析法の妥当性評価を行ったので報告する。

2 方法

2.1 試料

ガイドラインに代表的な野菜・果実として例示されている、ばれいしょ、キャベツ、ほうれん草、りんご及びオレンジを用いた。

2.2 試薬及び標準品

農薬標準品：和光純薬工業製ポジティブリスト制度一斉試験対応混合標準液(PL-1-1, PL-2-1, PL-3-2, PL-4-2, PL-5-1, PL-6-3, PL-11-2, PL-12-1), Sigma-Aldrich製及び和光純薬工業製の残留農薬試験用標準品を用いた。

測定用混合標準液：測定対象農薬の内、和光純薬工業製一斉試験対応混合標準液に含まれていないものは、各残留農薬試

験用標準品から 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液を調製し、これをアセトン：ヘキサン (1:1) で希釈した混合標準液に添加し、異性体を含む 241 種類の農薬成分の混合標準液 (各 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を作成した。

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：

SUPELUCO 製 ENVI-Carb/LC-NH₂ カラム (500 mg/500 mg) 6mL をアセトニトリル及びトルエン (3:1) 混液 10mL でコンディショニングして使用した。

その他の試薬は、和光純薬工業製及び関東化学製の残留農薬試験用または特級品を用いた。

2.3 装置及び条件

装置：ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS/MS)：Varian300MS, Varian450GC

GC/MS/MS測定条件

カラム：Agilent 製 VF-5MS + 10m EZ Guard 30m $\times$ 0.25 mm 膜圧 0.25 μm

カラム温度：50 $^{\circ}\text{C}$ (1 分) - 20 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ - 200 $^{\circ}\text{C}$ - 2 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ - 220 $^{\circ}\text{C}$ - 3 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ - 250 $^{\circ}\text{C}$ - 5 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ - 280 $^{\circ}\text{C}$ - 20 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ - 310 $^{\circ}\text{C}$ (20 分)

注入口温度：260 $^{\circ}\text{C}$

注入量：2 μL (高圧注入, スプリットレス)

イオン源温度：220 $^{\circ}\text{C}$

トランスファーライン温度：300 $^{\circ}\text{C}$

クイックスイッチバルブ温度：300 $^{\circ}\text{C}$

流量：キャリアーガス He 定流量 1.2mL/min

イオン化モード (電圧)：EI (70 eV)

測定方法：multiple reaction monitoring (MRM) 測定

2.4 定量

混合標準液をアセトン及びヘキサン (1:1) 混液で適宜希釈し、検量線用の 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の混合標準液を作成した。混合標準液及び試験溶液をそれぞれ 2 μL を GC/MS/MS に注入し、濃度とピーク面積から絶対検量線で定量した。

2.5 試験溶液調製法

GC/MS による農薬等の通知試験法 (農産物)¹⁾ に示されている、試験溶液調製法の (2) 果実、野菜、ハーブ、茶及びホップの場合に準拠して抽出、精製を行った。す

なわち、試料 20.0g を量り取り、アセトニトリル 50mL で抽出した後、吸引ろ過した。残渣をアセトニトリルで洗い、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100mL とした。ここから 20mL を分取し、塩化ナトリウム 10g 及び 0.5mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 20mL を加え、10 分間振とうした。静置した後、分離した水層を捨て、アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を濃縮し、溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル及びトルエン (3:1) 混液 2mL を加えて溶かし、抽出液を得た。コンディショニングした ENVI-Carb/LC-NH₂ カラムに抽出液を負荷した後、アセトニトリル及びトルエン (3:1) 混液 20mL を注入し、全溶出液を 1mL 以下に濃縮した。これにアセトン 10mL を加えて 1mL 以下に濃縮し、再度アセトン 5mL を加えて濃縮し、溶媒を除去した。残留物をアセトン及びヘキサン (1:1) 混液で正確に 2mL とし、この内、1mL を正確に分取して GC/MS/MS 測定用試験溶液とした。なお、残り 1mL を濃縮し、メタノールで 2mL に定容し、0.45 μm のシリンジフィルターでろ過したものを、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS/MS) での測定用試験溶液とした。

2.6 評価の方法

添加濃度はガイドラインに従って、試料中 0.1ppm 及び 0.01ppm の 2 濃度とし、添加後 30 分以上経過してから抽出を行った。性能パラメーターを求めるための実験は、ガイドラインに示された実験計画に従い、添加試料を 1 名が 2 併行、5 日間の枝分かかれ試験で行った。得られたデータから定量限界、選択性、真度、併行精度及び室内精度を求め、ガイドラインに従って評価を行った。

3 結果及び考察

3.1 定量限界

異性体を含めて 241 種類の農薬成分を 2 つのグループ (グループ 1 及び 2) に分けて MRM 測定を行った。定量イオンと確認イオンのプリカーサーイオン (Q1)、プロダクトイオン (Q3) 及びコリジョンエネルギー (CE) は、メーカー推奨値を参考にして、感度良く測定できる条件を設定した (表 1 及び 2)。0.01ppm の定量感度を得られない農薬成分が 3 種類 (ジクロラン、イマザメタベンズメチルエステル、チフルザミド) あった。これら 3 農薬は、

表1 分析条件(グループ1)

	農薬名	保持時間 (min)	定量イオン			確認イオン			CE (V)
			Q1	>	Q3	Q1	>	Q3	
1	Omethoate	9.36	156	>	110	156	>	80	15
2	Propoxur	9.42	110	>	64	110	>	63	20
3	Chlorethoxyfos	9.48	153	>	125	153	>	97	5
4	Ethoprophos	9.63	242	>	200	242	>	158	5
5	Trifluralin	9.75	306	>	264	306	>	206	15
6	Dicrotophos	9.91	127	>	95	127	>	109	25
7	Phorate	10.17	121	>	93	121	>	65	6
8	Dimethoate	10.55	125	>	47	125	>	79	20
9	Carbofuran	10.57	164	>	149	164	>	131	15
10	Simazine	10.62	201	>	173	201	>	138	10
11	Atrazine	10.79	215	>	200	215	>	173	10
12	Clomazone	10.83	204	>	107	204	>	78	35
13	Quintozene	10.92	237	>	119	237	>	143	30
14	Terbufos	10.96	231	>	175	231	>	157	15
15	gamma-BHC	11.03	219	>	147	219	>	183	20
16	Diazinon	11.01	304	>	179	304	>	162	10
17	Propyzamide	11.03	173	>	145	173	>	109	20
18	Tefluthrine	11.26	177	>	127	177	>	137	15
19	Isazophos	11.33	161	>	119	161	>	120	25
20	Ethylthiomethone	11.35	142	>	109	142	>	81	10
21	Triallate	11.53	268	>	184	268	>	226	15
22	Formothion	11.90	125	>	93	125	>	79	10
23	Propanil	12.35	161	>	99	161	>	90	35
24	Chlorpyrifos-methyl	12.29	286	>	271	286	>	241	20
25	Vinclozoline	12.36	285	>	212	285	>	241	5
26	Spiroxamine	12.35	100	>	72	100	>	58	10
27	Alachlor	12.47	160	>	132	160	>	145	11
28	Parathion-methyl	12.48	263	>	109	263	>	127	10
29	Fenchlorphos	12.84	285	>	270	285	>	240	25
30	Pyrimiphos-methyl	13.01	290	>	125	290	>	151	20
31	Terbutryn	13.11	241	>	185	241	>	170	10
32	Fenitrothion	13.22	277	>	260	277	>	109	10
33	Ethofumesate	13.19	207	>	137	207	>	161	10
34	1-Naphthylacetamide	13.24	185	>	141	185	>	142	10
35	Malathion	13.37	173	>	99	173	>	127	15
36	Metolachlor	13.61	162	>	133	162	>	120	11
37	Chlorpyrifos	13.65	314	>	258	314	>	286	15
38	Thiobencarb	13.75	125	>	89	125	>	99	20
39	Fenpropimorf	13.78	128	>	70	128	>	84	25
40	Fenthion	13.81	278	>	109	278	>	125	25
41	Isofenphos oxon	13.94	229	>	201	229	>	121	15
42	Parathion	13.91	291	>	109	291	>	137	10
43	Triadimefon	14.01	208	>	181	208	>	127	10
44	Methoprene	14.60	153	>	111	153	>	107	5
45	(E)-Clofenvinfos	14.76	267	>	159	267	>	203	15
46	Pendimethalin	14.83	252	>	162	252	>	191	10
47	Fipronil	14.89	367	>	213	367	>	255	25
48	Bioallethrin	15.07	123	>	81	123	>	95	10
49	Penconazole	15.13	248	>	157	248	>	192	20
50	Isofenphos	15.09	213	>	121	213	>	185	10
51	(Z)-Clofenvinfos	15.22	267	>	159	267	>	203	15
52	Mecarbam	15.27	131	>	74	131	>	86	15
53	Triadimenol	15.60	168	>	70	168	>	112	10
54	Procymidon	15.70	283	>	96	283	>	255	15
55	Bromophos-ethyl	16.03	359	>	303	359	>	331	15
56	Methidathion	16.11	145	>	85	145	>	58	15
57	Propaphos	16.20	304	>	220	304	>	262	10

58	Chlorbenside	16.25	268	>	125	268	>	127	10
59	Tetrachlorvinphos	16.36	329	>	109	329	>	314	25
60	alpha-Endosulfan	16.80	195	>	159	195	>	125	20
61	Flutriafol	16.90	219	>	123	219	>	95	30
62	Fenamiphos	16.95	303	>	260	303	>	243	15
63	Flutolanil	17.12	173	>	145	173	>	95	25
64	Chlorofenson	17.29	302	>	175	302	>	111	10
65	Isoprothiolane	17.49	290	>	204	290	>	118	5
66	Profenofos	17.53	339	>	269	339	>	311	10
67	Oxadiazon	17.69	175	>	112	175	>	147	10
68	Myclobutanil	17.98	179	>	125	179	>	152	10
69	Oxyfluorfen	18.00	252	>	146	252	>	170	30
70	Buprofezin	18.07	172	>	115	172	>	83	20
71	Kresoxim-methyl	18.22	206	>	116	206	>	131	10
72	Carboxin	18.25	143	>	87	143	>	115	10
73	Chlorfenapyr	18.57	247	>	200	247	>	227	30
74	Cyproconazole	18.70	222	>	125	222	>	85	15
75	1,1-Dichloro-2,2-bis(4-ethylphenyl)ethan	18.89	223	>	167	223	>	179	15
76	Flufenpyr-ethyl	19.31	408	>	345	408	>	373	15
77	Chlorobenzilate	19.44	251	>	139	251	>	111	20
78	beta-Endosulfan	19.62	195	>	159	195	>	125	20
79	Ethion	19.83	231	>	175	231	>	185	15
80	Triazophos	20.70	161	>	77	161	>	91	25
81	Carfentrazone-ethyl	21.10	312	>	151	312	>	195	25
82	Norflurazon	21.53	303	>	145	303	>	260	35
83	Propiconazole	21.45	259	>	69	259	>	191	10
84	Quinoxyfen	21.52	237	>	208	237	>	181	35
85	Hexazinone	22.29	171	>	71	171	>	85	20
86	Tebuconazole	22.63	250	>	125	250	>	70	10
87	Propargite	22.69	173	>	135	173	>	115	20
88	Diflufenican	22.91	266	>	218	266	>	183	25
89	Epoxiconazole	23.38	192	>	138	192	>	111	20
90	Acetamipride	24.08	152	>	116	152	>	112	15
91	Fosmet	24.39	160	>	133	160	>	77	15
92	Bromopropylate	24.61	341	>	185	341	>	155	30
93	Bifenthrin	24.58	181	>	166	181	>	153	10
94	Picolinafen	24.73	376	>	238	376	>	145	40
95	Methoxychlor	25.06	227	>	169	227	>	141	25
96	Fenpropathrin	25.15	265	>	210	265	>	181	25
97	Fenamidone	25.20	268	>	180	268	>	92	20
98	Azinophos-methyl	26.64	160	>	132	160	>	104	10
99	Pyriproxyfen	27.07	136	>	78	136	>	96	20
100	Cyhalothrin	27.16	197	>	141	197	>	161	5
101	Fenarimol	28.09	251	>	139	251	>	111	20
102	Pyraclufos	29.06	360	>	194	360	>	139	10
103	Spirodiclofen	29.43	312	>	109	312	>	259	20
104	Bitertanol	29.80	170	>	115	170	>	141	35
105	Permethrin	30.06	163	>	127	163	>	91	10
106	Fluquinconazole	30.43	340	>	298	340	>	108	25
107	Pyridaben	30.40	147	>	132	147	>	119	15
108	Fenbuconazole	31.42	198	>	129	198	>	102	25
109	Cyfluthrin	31.62	163	>	127	163	>	91	10
110	Cypermethrin	32.45	163	>	127	163	>	91	10
111	Flucythrinate	32.89	199	>	107	199	>	157	15
112	Fluridon	33.80	328	>	189	328	>	127	40
113	Fenvalerate	34.61	225	>	119	225	>	147	15
114	Fluvalinate	34.88	250	>	200	250	>	208	25
115	Difenoconazole	35.44	323	>	265	323	>	202	25
116	Deltamethrin	35.90	253	>	174	253	>	172	10
117	Cinidon-ethyl	37.38	330	>	302	330	>	222	30

表2 分析条件 (グループ2)

	農薬名	保持時間 (min)	定量イオン			確認イオン			CE (V)
			Q1	>	Q3	Q1	>	Q3	
1	Mevinphos	8.11	192	>	164	192	>	127	5
2	XMC	8.93	136	>	121	136	>	103	20
3	Isoprocarb	8.92	122	>	77	122	>	107	25
4	Tecnazene	9.40	203	>	85	203	>	143	30
5	Propachlor	9.52	176	>	92	176	>	120	20
6	Ethalfuralin	9.64	276	>	202	276	>	248	10
7	Benfluralin	9.79	292	>	206	292	>	160	15
8	Chlorpropham	9.81	213	>	127	213	>	171	10
9	Monocrotophos	9.91	127	>	95	127	>	109	25
10	Cadusafos	10.05	159	>	131	159	>	97	10
11	alpha-BHC	10.36	183	>	147	219	>	183	20
12	Hexachlorobenzene	10.46	284	>	249	284	>	214	25
13	Dichloran	10.61	206	>	176	206	>	148	20
14	Propazine	10.73	229	>	58	229	>	187	10
15	beta-BHC	10.84	183	>	147	219	>	183	20
16	Cyanophos	11.04	243	>	109	243	>	127	10
17	Phosphamidon	11.10	127	>	109	127	>	95	20
18	Pyroquilon	11.15	173	>	130	173	>	144	15
19	Pyrimethanil	11.24	198	>	118	198	>	158	40
20	Prohydrojasmon	11.28	153	>	97	153	>	83	15
21	Terbacil	11.41	161	>	88	161	>	144	25
22	delta-BHC	11.63	183	>	147	219	>	183	20
23	Iprobenfos	11.69	204	>	91	204	>	171	10
24	Benoxacor	11.88	259	>	120	259	>	176	15
25	Dichlofenthion	12.07	279	>	223	279	>	251	10
26	Benfuresate	12.09	256	>	163	256	>	121	25
27	Dimethenamid	12.15	230	>	154	230	>	111	20
28	Acetochlor	12.20	162	>	91	162	>	146	30
29	Bromobutide	12.27	232	>	114	232	>	176	15
30	Tolclofos-methyl	12.50	265	>	250	265	>	93	25
31	Simetryn	12.57	213	>	170	213	>	137	15
32	Metalaxyl	12.62	206	>	132	206	>	162	10
33	Ametryn	12.66	227	>	170	227	>	212	15
34	Prometryn	12.70	241	>	184	241	>	58	10
35	Heptachlor	12.79	272	>	237	272	>	235	15
36	Bromacil	13.28	205	>	132	205	>	188	30
37	Esprocarb	13.41	222	>	91	222	>	162	10
38	Diethofencarb	13.61	267	>	168	267	>	196	20
39	Quinoclamine	13.71	207	>	116	207	>	126	30
40	(Z)-Dimethylvinphos	13.72	295	>	109	295	>	280	20
41	Cyanazine	13.80	225	>	189	225	>	172	15
42	Chlorthal-dimethyl	13.84	301	>	273	301	>	222	20
43	Aldrin	13.91	263	>	193	263	>	228	30
44	Tetraconazole	13.95	336	>	204	336	>	156	30
45	Nitrothal-isopropyl	14.10	236	>	194	236	>	148	15
46	Dicofol (Kelthane) (deg.)	14.26	250	>	139	250	>	215	10
47	Bromophos	14.45	331	>	316	331	>	286	30
48	Diphenamid	14.47	239	>	167	239	>	152	25
49	Fosthiazate	14.52	195	>	103	195	>	139	10
50	Fthalide	14.57	243	>	144	243	>	142	35
51	Dimethametryn	15.04	212	>	122	212	>	94	15
52	(Z)-PyrifenoX	15.20	262	>	91	262	>	200	15
53	Oxychlordane	15.26	387	>	263	387	>	287	10
54	Heptachlor Epoxide (isomer A)	15.29	353	>	263	353	>	282	15
55	Phenthoate	15.42	274	>	121	274	>	246	10
56	Dichlocymet	15.43	277	>	221	277	>	155	15
57	Heptachlor Epoxide (isomer B)	15.44	183	>	119	183	>	155	20
58	Quinolphos	15.47	146	>	118	146	>	91	10
59	Dimepiperate	15.67	145	>	69	145	>	112	20
60	(E)-PyrifenoX	16.28	262	>	91	262	>	200	15
61	Butachlor	16.41	176	>	147	176	>	134	15

62	Paclobutrazol	16.47	236	>	125	236	>	167	10
63	Fenothiocarb	16.58	160	>	72	160	>	106	15
64	Butamifos	16.78	286	>	202	286	>	258	10
65	Imazamethabenz methyl ester	16.91	144	>	89	144	>	116	15
66	Napropamide	17.10	271	>	72	271	>	128	15
67	Hexaconazole	17.27	214	>	124	214	>	152	30
68	Prothiofos	17.31	309	>	239	309	>	281	15
69	Pretilachlor	17.36	176	>	147	176	>	134	15
70	Tricyclazole	17.69	189	>	161	189	>	135	20
71	p,p'-DDE	17.74	246	>	176	246	>	211	25
72	Thifluzamide	17.71	194	>	166	194	>	125	10
73	Uniconazole P	17.76	234	>	137	234	>	165	15
74	Tribufos	17.80	169	>	57	169	>	115	5
75	Flamprop methyl	17.84	230	>	170	230	>	129	25
76	Dieldrin	18.04	263	>	193	263	>	228	25
77	Bupirimate	18.05	208	>	98	208	>	164	25
78	Imibenconazole desbenzyl type	18.24	270	>	235	270	>	166	10
79	Azaconazole	18.42	217	>	173	217	>	145	20
80	Isoxathion	18.68	177	>	130	177	>	116	10
81	Fenoxanil	18.87	293	>	155	293	>	198	15
82	Endrin	19.06	263	>	193	263	>	228	25
83	(Z)-Pyriminobac-methyl	19.34	302	>	256	302	>	230	15
84	Fensulfothion	19.50	293	>	125	293	>	141	12
85	Oxadixyl	19.88	163	>	132	163	>	117	20
86	p,p'-DDD	19.87	235	>	165	235	>	199	25
87	o,p'-DDT	19.97	235	>	165	235	>	199	25
88	Fluacrypyrim	20.31	204	>	189	204	>	161	15
89	Mepronil	20.60	269	>	119	269	>	210	10
90	Benalaxyl	21.06	206	>	132	206	>	148	15
91	Edifenphos	21.39	310	>	173	310	>	191	10
92	Trifloxystrobin	21.45	222	>	130	222	>	162	10
93	(E)-Pyriminobac-methyl	21.67	302	>	256	302	>	230	15
94	Lenacil	21.71	153	>	136	153	>	82	20
95	p,p'-DDT	21.84	235	>	165	235	>	199	25
96	Pyraflufenethyl	21.87	412	>	349	412	>	307	25
97	Thenylchlor	22.33	288	>	141	288	>	174	10
98	Diclofop-methyl	22.71	253	>	162	253	>	184	15
99	Zoxamide	23.43	187	>	159	187	>	123	20
100	Mefenpyr diethyl	23.56	253	>	189	253	>	128	35
101	Pyributicarb	23.70	165	>	108	165	>	93	15
102	Pyridaphenthion	24.03	340	>	199	340	>	204	10
103	EPN	24.55	169	>	141	185	>	157	15,10
104	Piperophos	24.68	320	>	122	140	>	98	10,25
105	Etoxazole	25.05	359	>	330	359	>	340	10
106	Tebufenpyrad	25.42	318	>	131	318	>	145	15
107	Anilofos	25.44	226	>	184.1	226	>	157	5
108	Bifenox	25.57	341	>	281	341	>	310	15
109	Phenothrin	25.96	183	>	153	183	>	168	15
110	Tetradifon	26.11	229	>	201	229	>	166	25
111	Phosalone	26.42	182	>	111	182	>	138	11
112	Mefenacet	27.19	192	>	136	192	>	164	10
113	Cyhalofop-butyl	27.25	256	>	120	256	>	184	20
114	Pyrazophos	28.20	221	>	193	221	>	177	15
115	Acrinathrin	28.36	289	>	93	289	>	91	20
116	Cafenstrole	31.27	188	>	119	100	>	72	35,20
117	Halfenprox	32.55	263	>	129	263	>	169	25
118	Ethofenprox	33.23	163	>	135	163	>	107	10
119	Flumioxazin	34.62	354	>	176	354	>	325	20
120	Tralomethrin	35.90	253	>	174	253	>	172	10
121	Flumiclorac-pentyl	36.09	423	>	318	423	>	308	15
122	Tolfenpyrad	36.51	383	>	145	383	>	171	10
123	Imibenconazole	37.14	253	>	82	375	>	260	10,20
124	Fluthiacet-methyl	37.58	403	>	84	403	>	286	15

定量限界が目標値を満たさない農薬

0.01ppmの標準品のピーク形状が良好ではなく、 $S/N \geq 10$ を常に満たすことが難しかった。

3.2 選択性

ブランク試料を試験法に従って測定し、定量を妨害するピークの有無を確認した。妨害ピークを認めた場合で、ガイドラインの許容範囲を超えていたのは、ほうれん草中のトリアジメノール、オレンジ中のホレート、カズサホス及びキノクラミンであった。図1にホレート標準品(0.01ppm)、図2にオレンジブランク試料のクロマトグラムを示す。オレンジブランク試料では、ホレートの保持時間(10.17min)より少し早い保持時間(10.14min)に、ホレート標準品(0.01ppm)のピークの10倍以上の妨害ピークがあり、このピークの影響で選択性が満たされなかった。オレンジブランク試料はクロマトグラムで示される、選択性の許容範囲を超える様な妨害ピークが複数存在していること等から、精製が十分ではないことが推測された。

3.3 真度

定量限界及び選択性で目標値を満たす項目について、真度及び精度の評価を行った。真度の結果を表3に示す。真度の目標値(70～120%)を両添加濃度で満たす農薬は、ばれいしょ 230 種類、キャベツ 211 種類、ほうれん草 210 種類、りんご 207 種類、オレンジ 193 種類であった。目標値から外れる農薬では、120%を超える農薬が70%未満の農薬よりも多く、正のマトリックス効果を受けたことが推測された。特にオレンジで120%を超える農薬が41種類あり、顕著であった。両添加濃度で真度が50～150%を満たす農薬は、いずれの農産物でも227種類以上と94%を超え、スクリーニングとしての有用性が示された。

3.4 精度

精度の結果を表4に示す。併行精度はいずれの農産物でもほぼ全ての農薬で目標値を満たす良好な結果が得られた。併行精度で目標値を満たさない農薬は、全て真度でも目標値を満たしておらず、これらの農薬は一斉分析

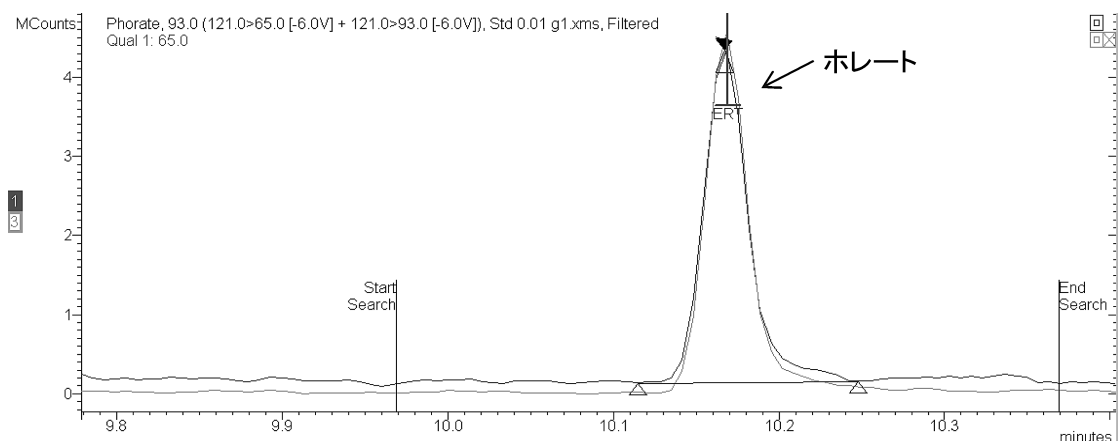


図1 ホレート標準品(0.01ppm)のクロマトグラム

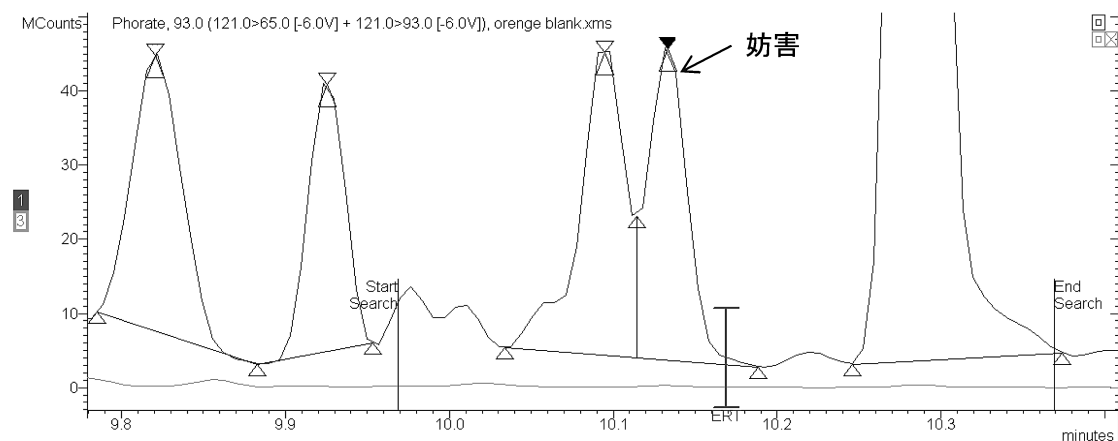


図2 オレンジブランク試料のクロマトグラム

法では定量性に問題があると考えられた。室内精度は併行精度よりも目標値を満たさない農薬が多かった。0.01ppm添加時に室内精度の目標値を満たしていない場合が多く、それらの農薬は他の農薬に比べて定量感度を得ることが難しい農薬であることが多かった。

3.5 妥当性評価結果

妥当性評価で適合と判定される両添加濃度で真度及び精度の目標値を全て満たす農薬はA, 0.01ppm添加時のみ目標値を満たす農薬はB, 0.1ppm添加時のみ目標値を満たす農薬はC, 両濃度添加時共に目標値を満たさない農薬はD, 定量限界又は選択性が許容範囲外の農薬はEに分類した。各農産物別の集計結果を表5に、農薬別の詳細結果を表6に示す。目標値を全て満たすAの農薬は、ばれいしょ 229 種類、キャベツ 209 種類、ほうれん草 210 種類、りんご 200 種類、オレンジ 192 種類であった。5 農産物ともにAであった農薬は 163 種類であり、妥当性を評価した 241 種類の 68%であった。野菜の方が目標値を満たす農薬が多く、野菜 3 農産物ともにAで

あった農薬は、果実 2 農産物ともにAであった農薬よりも多かった。

3.6 実態調査

本法を用いて県内で市販されていた野菜 29 種類 112 検体、果実 10 種類 22 検体、合計 39 種類 134 検体について実態調査を行い、GC/MS/MS測定での農薬の検出結果を表7に示す。14 検体から農薬が延べ 17 種類検出された。検出された農薬は全て残留基準値以下であった。野菜は 4 種類 8 検体から 8 農薬検出されており、検体の検出率は 7%であった。一方、果実は 5 種類 6 検体から 9 農薬検出されており、検体の検出率は 27%であり、野菜よりも高頻度に検出された。検査検体の内、輸入品は野菜 1 種類 1 検体、果実 4 種類 5 検体、合計 5 種類 6 検体であった。その中で果実 3 種類 4 検体から 6 農薬検出されており、検体の検出率は 80%であった。調査した検体数が少ないが、輸入品の果実から高頻度に農薬が検出されることが推測された。今後とも実態調査を行っていききたい。

表3 真度結果

真度 (%)	ばれいしょ	キャベツ	ほうれん草	りんご	オレンジ
<50	1	1	3	6	1
50-70	1	3	1	4	1
70-120	230	211	210	207	193
120-150	6	13	22	16	36
150<	0	10	1	5	5

添加濃度0.1ppm及び0.01ppmにおける目標値 真度: 70-120%

表4 精度の目標値を満たした農薬数

精度	ばれいしょ	キャベツ	ほうれん草	りんご	オレンジ
併行精度	238	237	236	234	236
室内精度	235	228	232	226	237

添加濃度0.1ppm目標値 併行精度: RSD%<15, 室内精度: RSD%<20

添加濃度0.01ppm目標値 併行精度: RSD%<25, 室内精度: RSD%<30

表5 妥当性評価結果まとめ

グループ	判定		ばれいしょ	キャベツ	ほうれん草	りんご	オレンジ	5種まとめ
	0.01ppm	0.1ppm						
A	○	○	229	209	210	200	192	163
B	○	×	0	2	0	9	5	7
C	×	○	7	12	23	21	32	39
D	×	×	2	15	4	8	7	26
E	定量限界, 選択性 ×		3	3	4	3	5	6

表6 妥当性評価結果詳細

	農薬名	ばれいしょ	キャベツ	ハウレンソウ	りんご	オレンジ	5種まとめ
1	(E)-Clofenvinfos	A	A	A	A	A	A
2	(E)-Pyrifeno	A	A	A	D	A	D
3	(E)-Pyrinobac-methyl	A	A	A	A	A	A
4	(Z)-Clofenvinfos	A	A	A	A	A	A
5	(Z)-Dimethylvinphos	A	A	A	A	C	C
6	(Z)-Pyrifeno	A	A	A	D	A	D
7	(Z)-Pyrinobac-methyl	A	A	A	A	A	A
8	1,1-Dichloro-2,2-bis(4-ethylphenyl)ethan	A	A	A	A	A	A
9	1-Naphthylacetamide	A	D	C	C	C	D
10	Acetamidpride	A	D	C	A	C	D
11	Acetochlor	A	A	A	C	C	C
12	Acrinathrin	A	A	A	A	A	A
13	Alachlor	A	A	A	A	A	A
14	Aldrin	A	A	A	A	A	A
15	alpha-BHC	A	A	A	B	A	B
16	alpha-Endosulfan	A	A	A	A	A	A
17	Ametryn	A	A	A	A	A	A
18	Anilofos	C	A	A	A	A	C
19	Atrazine	A	A	A	A	A	A
20	Azaconazole	A	A	A	A	A	A
21	Azinophos-methyl	A	D	C	C	A	D
22	Benalaxyl	A	A	A	C	A	C
23	Benfluralin	A	A	A	A	A	A
24	Benfuresate	A	A	A	C	A	C
25	Benoxacor	A	A	A	A	A	A
26	beta-BHC	A	A	A	A	A	A
27	beta-Endosulfan	A	A	A	A	A	A
28	Bifenox	A	A	A	A	A	A
29	Bifenthrin	A	A	A	A	A	A
30	Bioallethrin	A	A	A	C	D	D
31	Bitertanol	A	A	D	A	A	D
32	Bromacil	A	C	A	C	A	C
33	Bromobutide	A	A	A	A	A	A
34	Bromophos	A	A	A	A	A	A
35	Bromophos-ethyl	A	A	A	A	A	A
36	Bromopropylate	A	A	A	A	A	A
37	Bupirimate	A	A	A	A	A	A
38	Buprofezin	A	A	A	A	A	A
39	Butachlor	A	A	A	A	A	A
40	Butamifos	A	A	A	A	A	A
41	Cadusafos	A	A	A	A	C	C
42	Cafenstrole	A	C	C	A	A	C
43	Carbofuran	A	C	A	C	A	C
44	Carboxin	D	D	D	D	A	D
45	Carfentrazone-ethyl	A	A	A	A	A	A
46	Chlorbenside	A	A	A	A	A	A
47	Chlorethoxyfos	A	A	A	D	A	D
48	Chlorfenapyr	A	A	A	A	A	A
49	Chlorobenzilate	A	A	A	A	A	A
50	Chlorofenson	A	A	A	A	A	A
51	Chlorpropham	A	A	A	A	C	C
52	Chlorpyrifos	A	A	A	A	A	A
53	Chlorpyrifos-methyl	A	A	A	A	A	A
54	Chlorthal-dimethyl	A	A	A	A	A	A
55	Cinidon-ethyl	A	A	A	A	A	A
56	Clomazone	A	A	A	A	A	A
57	Cyanazine	A	B	A	A	A	B
58	Cyanophos	A	A	A	A	C	C
59	Cyfluthrin	A	A	A	A	A	A
60	Cyhalofop-butyl	A	A	A	A	A	A
61	Cyhalothrin	A	A	A	A	A	A
62	Cypermethrin	A	A	A	A	A	A
63	Cyproconazole	A	A	A	A	A	A
64	delta-BHC	A	A	A	A	A	A

65	Deltamethrin	A	A	A	A	A	A
66	Diazinon	A	A	A	A	A	A
67	Dichlocymet	A	A	A	A	A	A
68	Dichlofenthion	A	A	A	A	A	A
69	Dichloran	E	E	E	E	E	E
70	Diclofop-methyl	A	A	A	A	A	A
71	Dicofol (Kelthane) (deg.)	A	A	A	D	A	D
72	Dicrotophos	A	D	C	C	C	D
73	Dieldrin	A	A	A	A	A	A
74	Diethofencarb	A	A	A	A	A	A
75	Difenoconazole	A	A	A	A	A	A
76	Diflufenican	A	A	A	A	A	A
77	Dimepiperate	A	A	A	A	A	A
78	Dimethametryn	A	A	A	A	C	C
79	Dimethenamid	A	A	A	A	A	A
80	Dimethoate	A	D	C	C	D	D
81	Diphenamid	A	A	A	A	A	A
82	Edifenphos	C	A	C	A	A	C
83	Endrin	A	A	A	A	A	A
84	EPN	A	A	A	A	A	A
85	Epoxiconazole	A	A	A	A	A	A
86	Esprocarb	A	A	A	A	A	A
87	Ethalfuralin	A	A	A	A	A	A
88	Ethion	A	A	A	A	A	A
89	Ethofenprox	A	A	A	A	A	A
90	Ethofumesate	A	A	A	A	A	A
91	Ethoprophos	A	A	A	A	A	A
92	Ethylthiomethone	D	B	D	D	A	D
93	Etoxazole	A	A	A	A	A	A
94	Fenamidone	A	A	A	A	A	A
95	Fenamiphos	A	A	A	A	A	A
96	Fenarimol	A	A	A	A	A	A
97	Fenbuconazole	A	A	C	C	A	C
98	Fenchlorphos	A	A	A	A	A	A
99	Fenitrothion	A	A	A	B	B	B
100	Fenothiocarb	A	C	A	A	C	C
101	Fenoxanil	A	A	A	A	A	A
102	Fenpropathrin	A	A	A	A	A	A
103	Fenpropimorf	A	A	A	A	A	A
104	Fensulfothion	A	C	C	A	C	C
105	Fenthion	A	A	A	A	A	A
106	Fenvalerate	A	A	A	A	A	A
107	Fipronil	A	A	A	A	A	A
108	Flamprop methyl	A	A	A	A	A	A
109	Fluacrypyrim	A	A	A	A	A	A
110	Flucythrinate	A	A	A	A	A	A
111	Flufenpyr-ethyl	A	A	A	A	A	A
112	Flumiclorac-pentyl	A	A	A	A	A	A
113	Flumioxazin	A	A	A	A	A	A
114	Fluquinconazole	A	A	A	A	A	A
115	Fluridon	A	A	A	C	C	C
116	Fluthiacet-methyl	A	A	A	A	C	C
117	Flutolanil	A	A	A	A	A	A
118	Flutriafol	A	A	A	A	A	A
119	Fluvalinate	A	A	A	A	A	A
120	Formothion	A	A	A	A	A	A
121	Fosmet	A	C	A	A	A	C
122	Fosthiazate	C	C	C	C	C	C
123	Fthalide	A	A	A	A	A	A
124	gamma-BHC	A	A	A	A	A	A
125	Halfenprox	A	A	A	A	A	A
126	Heptachlor	A	A	A	A	A	A
127	Heptachlor Epoxide (isomer A)	A	A	A	A	A	A
128	Heptachlor Epoxide (isomer B)	A	A	A	A	A	A
129	Hexachlorobenzene	A	A	A	D	A	D
130	Hexaconazole	A	A	C	C	C	C
131	Hexazinone	A	A	A	C	A	C
132	Imazamethabenz methyl ester	E	E	E	E	E	E

133	Imibenconazole	A	A	C	C	C	C
134	Imibenconazole desbenzyl type	A	D	D	C	D	D
135	Iprobenfos	A	A	A	A	C	C
136	Isazophos	A	A	A	A	A	A
137	Isofenphos	A	A	A	A	A	A
138	Isofenphos oxon	A	A	A	A	A	A
139	Isoprocarb	A	A	A	A	A	A
140	Isoprothiolane	A	A	A	A	A	A
141	Isoxathion	C	A	C	A	C	C
142	Kresoxim-methyl	A	A	A	A	A	A
143	Lenacil	A	A	A	A	A	A
144	Malathion	A	A	A	A	A	A
145	Mecarbam	A	A	A	A	A	A
146	Mefenacet	A	A	A	A	A	A
147	Mefenpyr diethyl	A	A	A	A	A	A
148	Mepronil	A	C	A	A	A	C
149	Metalaxyl	A	A	C	A	A	C
150	Methidathion	A	A	A	A	A	A
151	Methoprene	C	D	C	C	D	D
152	Methoxychlor	A	A	A	A	A	A
153	Metolachlor	A	A	A	A	A	A
154	Mevinphos	A	D	A	B	A	D
155	Monocrotophos	A	C	A	A	C	C
156	Myclobutanil	A	A	A	A	A	A
157	Napropamide	A	A	A	A	A	A
158	Nitrothal-isopropyl	A	A	A	A	A	A
159	Norflurazon	A	A	A	A	A	A
160	o,p'-DDT	A	A	A	A	A	A
161	Omethoate	A	D	C	B	C	D
162	Oxadiazon	A	A	A	A	A	A
163	Oxadixyl	A	A	A	A	A	A
164	Oxychlordan	A	A	A	A	A	A
165	Oxyfluorfen	A	A	A	B	B	B
166	p,p'-DDD	A	A	A	A	A	A
167	p,p'-DDE	A	A	A	A	A	A
168	p,p'-DDT	A	A	A	A	A	A
169	Paclobutrazol	A	A	A	A	C	C
170	Parathion	A	A	A	B	B	B
171	Parathion-methyl	A	A	A	B	B	B
172	Penconazole	A	A	A	A	D	D
173	Pendimethalin	A	A	A	A	B	B
174	Permethrin	A	A	A	A	A	A
175	Phenothrin	A	A	A	A	A	A
176	Phenthoate	A	A	A	A	A	A
177	Phorate	A	A	A	B	E	E
178	Phosalone	A	A	A	A	A	A
179	Phosphamidon	A	C	C	C	C	C
180	Picolinafen	A	A	A	A	A	A
181	Piperophos	A	A	A	A	A	A
182	Pretilachlor	A	A	A	A	A	A
183	Procymidon	A	A	A	A	A	A
184	Profenofos	A	A	A	A	A	A
185	Prohydrojasmon	A	A	A	A	A	A
186	Prometryn	A	A	A	A	A	A
187	Propachlor	A	A	A	A	A	A
188	Propanil	A	D	C	B	C	D
189	Propaphos	A	A	A	A	A	A
190	Propargite	A	A	A	A	A	A
191	Propazine	A	A	A	A	A	A
192	Propiconazole	A	A	A	A	A	A
193	Propoxur	A	A	A	A	A	A
194	Propyzamide	A	A	A	A	A	A
195	Prothiofos	A	A	A	A	A	A
196	Pyraclofos	A	A	C	A	A	C
197	Pyraflufenethyl	A	A	A	A	A	A
198	Pyrazophos	A	A	A	A	A	A
199	Pyributicarb	A	A	A	A	A	A
200	Pyridaben	A	A	A	A	A	A

201	Pyridaphenthion	A	A	A	A	A	A
202	Pyrimethanil	A	A	A	A	C	C
203	Pyrimiphos-methyl	A	A	C	A	A	C
204	Pyriproxyfen	A	A	A	A	A	A
205	Pyroquilon	C	D	C	C	D	D
206	Quinoclamine	A	A	A	A	E	E
207	Quinolphos	A	A	A	A	A	A
208	Quinoxifen	A	A	A	A	A	A
209	Quintozene	A	A	A	A	A	A
210	Simazine	A	A	A	C	C	C
211	Simetryn	A	A	A	A	C	C
212	Spirodiclofen	C	A	A	A	D	D
213	Spiroxamine	A	D	A	A	A	D
214	Tebuconazole	A	A	A	A	A	A
215	Tecnazene	A	A	A	A	A	A
216	Tefluthrine	A	A	A	A	A	A
217	Terbacil	A	C	A	A	C	C
218	Tebuconazole	A	A	A	A	A	A
219	Terbufos	A	A	A	A	A	A
220	Terbutryn	A	A	A	A	A	A
221	Tetrachlorvinphos	A	A	A	A	A	A
222	Tetraconazole	A	A	A	A	A	A
223	Tetradifon	A	A	A	A	A	A
224	Thenylchlor	A	A	A	A	A	A
225	Thifluzamide	E	E	E	E	E	E
226	Thiobencarb	A	A	A	A	C	C
227	Tolclofos-methyl	A	A	A	A	A	A
228	Tolfenpyrad	A	A	A	A	A	A
229	Tralomethrin	A	A	A	A	A	A
230	Triadimefon	A	A	A	A	A	A
231	Triadimenol	A	A	E	A	C	E
232	Triallate	A	A	A	A	A	A
233	Triazophos	A	A	C	A	A	C
234	Tribufos	A	A	A	A	C	C
235	Tricyclazole	A	D	C	A	C	D
236	Trifloxystrobin	A	A	A	A	A	A
237	Trifluralin	A	A	A	A	A	A
238	Uniconazole P	A	A	A	A	A	A
239	Vinclozoline	A	A	A	A	A	A
240	XMC	A	D	A	A	C	D
241	Zoxamide	A	C	A	D	A	D

表 7 検出結果

検出検体 (検出数/検体数)	検出農薬	検出値 (ppm)	基準値 (ppm)	産地
はくさい (2/5)	ベルメトリン	0.01	5.0	国産
	エトフェンプロックス	0.02	5	国産
ねぎ (1/3)	マラチオン	0.02	8.0	国産
トマト (2/8)	ジエトフェンカルブ	0.14	5.0	国産
	ブプロフェジン	0.02	1	国産
きゅうり (3/8)	ホスチアゼート	0.02	0.2	国産
	クロルフェナピル	0.03	0.5	国産
	シベルメトリン	0.01	0.5	国産
イチゴ (1/1)	フルバリネート	0.18	1.0	国産
	テブフェンピラド	0.02	1	
ぶどう (1/1)	テブコナゾール	0.02	10	国産
オレンジ (1/1)	クロルピリホス	0.36	1	輸入
	フェンプロバトリン	0.03	5	
バナナ (2/2)	クロルピリホス	0.02	3	輸入
	ミクロブタニル	0.07	2	輸入
レモン (1/1)	クロルピリホス	0.09	1	輸入
	ホスメット	0.03	5	

4 まとめ

GC/MS/MSを用いた野菜類及び果実類中残留農薬の一斉分析法の妥当性評価を、厚生労働省の妥当性評価ガイドラインに従って行い、次の結果を得た。

- ①異性体を含めて 241 種類の農薬成分のMRM測定を行ったところ、試料中濃度 0.01ppm の定量感度を 238 種類の農薬で得られた。
- ②選択性は、ほうれん草中のトリアジメノール、オレンジ中のホレート、カズサホス及びキノクラミンで許容範囲を超えていた。
- ③真度の目標値 (70 ～ 120 %) を両添加濃度で満たす農薬は、ばれいしょ 230 種類、キャベツ 211 種類、ほうれん草 210 種類、りんご 207 種類、オレンジ 193 種類であった。
- ④併行精度はいずれの農産物でもほぼ良好な結果が得られていた。室内精度は併行精度よりも目標値を満たさない農薬が多かった。0.01ppm 添加時に目標値を満たしていない場合が多く、それらの農薬は他の農薬に比べて定量感度を得ることが厳しい農薬であることが多かった。
- ⑤妥当性評価で適合と判定される両添加濃度で真度及び精度の目標値を全て満たす農薬は、ばれいしょ 229 種類、キャベツ 209 種類、ほうれん草 210 種類、りんご 200 種類、オレンジ 192 種類であった。5 農産物ともに A であった農薬は 163 種類であり、妥当性を評価した 241 種類の 68 % であった。
- ⑥本試験法を用いて、実態調査を野菜・果実 39 種類 134 検体で行い、14 検体から延べ 17 種類の農薬が全て残留基準値以下で検出された。輸入品の果実から高頻度に検出された。今後は、妥当性評価された試験法を評価したものと類似の野菜類及び果実類中に適応するため、妥当性評価を継続して行いたい。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について、食安発第 0124001 号、平成 17 年 1 月 24 日、2005
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて、食安発第 1115001 号、平成 19 年 11 月 15 日、2007
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について、食安発 1224 第 1 号、平成 22 年 12 月 24 日、2010

他誌発表論文抄録

最近のダニ媒介性疾患—マダニ媒介のSFTS（重症熱性血小板減少症候群）

岸本壽男，木田浩司

日本内科学会誌，Vol.102，No.11，2846-2853，2013

2011年に中国で初めて確認された新たなダニ媒介性感染症である重症熱性血小板減少症候群(SFTS)が2013年1月に我が国でも確認された。死亡率が高く，根本的な治療法やワクチンがないことから大きな問題

となっている。疫学や病態，保有マダニの種類や分布など自然界での存在様式についてもまだ不明な点が多いが，ここでは話題のSFTSについての概略ならびに現状とその対処法について述べた。

重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) について

岸本壽男, 木田浩司, 岡 弘子, 秋山三紀恵

東京小児科医会報 別冊, Vol.32, No. 2, 15-22, 2013

2011年に中国で初めて確認された新たなダニ媒介性感染症である重症熱性血小板減少症候群 (severe fever with thrombocytopenia syndrome) が2013年1月に本邦で初めて確認された。その後、西日本を中心に症例の報告が相次ぎ、根本的な治療法やワクチンがないこと、

現時点では死亡率が非常に高いことから大きな問題となっている。自然界での存在様式や、臨床像、特に小児や若年者の症例がほとんど報告されていないことなど、まだ不明な点が多い。ここでは、SFTSについての概略ならびに現状について述べる。

Specific molecular detection of *Anaplasma* sp. closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in Ixodid ticks and cattle in a pastureland in Hokkaido, Japan.

Adrian P. Ybañez, Michihito Tagawa, Kotaro Matsumoto, Toshio Kishimoto, Naoaki Yokoyama, Hisashi Inokuma

Vector Borne and Zoonotic Disease, Vol.13, No.1, 6-11, 2013

Recent molecular analyses of the *Anaplasma* sp. closely related to *Anaplasma phagocytophilum* (previously believed to be *A. phagocytophilum*) in Japan have clarified its distinct phylogenetic position. PCR methods relying on 16S rRNA- and P44/MSP2-based primers designed to detect this species have low sensitivity and specificity. In this study, a highly sensitive and specific nested PCR method using newly designed primers based on heat-shock operon gene (*groEL*) was developed to detect this species. The method was later used in an epidemiological study

testing DNA samples from 85 Ixodid ticks (collected by flagging) and 50 cattle from the same pastureland in Nakaosobetsu, Hokkaido, Japan. Results revealed prevalence rates of 2.4% (2 of 85) in ticks and 2% (1 of 50) in cattle. The present study also reported the first molecular detection of the *Anaplasma* sp. closely related to *A. phagocytophilum* in Japan in *H. douglasii*, and established a new reliable PCR method that detects this *Anaplasma* sp. closely related to *A. phagocytophilum* in Japan.

小型哺乳類の分布と生息状況の再評価の必要性 —岡山県における現状—

中本 敦, 木田浩司, 森光亮太, 小林秀司, 岸本壽男

哺乳類学, Vol.53, No.1, 107-115, 2013

岡山県全域を対象とした小型哺乳類の捕獲調査を2010年10月～2011年12月にかけて実施した。齧歯目6種, トガリネズミ型目2種の計130個体が捕獲された。小型哺乳類の8種すべてで生息密度が非常に低かった。アカネズミ *Apodemus speciosus* の捕獲数が最も多く, 捕獲場所も県内全域の様々な環境に及んだ。これに対してアカネズミ以外の種では, 植生や標高などの生息環境に選択性が見られた。アカネズミの生息密度に最も大き

な影響を与えたのはハビタットタイプではなく, 年2回の繁殖による個体数の増加であった。岡山県では何らかの理由で小型哺乳類の生息密度が非常に低くなっていると思われるが, 特にこれまで普通種とされていたヒメネズミ *A. argenteus* とハタネズミ *Microtus montebelli* の生息数の減少が懸念された。他県においても普通種を含めた小型哺乳類の生息密度の再評価が必要な時期に来ていると思われる。

単行本

つつが虫病

岸本壽男

疾患・症状別 今日の治療と看護(改訂第3版), 934-935, 2013

「リケッチア感染症」の「つつが虫病」の項で、疫学情報、診断法及び治療の実際と看護のポイントについて説明した。

報 告 書 等

メチル＝ドデカノアート等(14物質)の分析法

吉岡敏行

平成 24 年度化学物質分析法開発調査報告書(環境省環境安全課), 227-274, 2013

水質試料中の脂肪酸メチルエステル類等 14 種類の分析法を開発した。水質試料 1L を採取現場でヘキサン抽出し, シリカゲルカートリッジカラムでクリーンアップ

後, GC/MS-SIM で定量した。本法により水質試料中の脂肪酸メチルエステル類等 14 種類が 0.66 ~ 4.9 ng/L で定量可能であった。

4-メチルベンジリデンカンファーの分析法

大月史彦

平成 24 年度化学物質分析法開発調査報告書(環境省環境安全課), 578-624, 2013

水質試料中の 4-メチルベンジリデンカンファーの分析法を開発した。水質試料 100 mL にサロゲート内標準を添加した後, 固相抽出し, LC/MS/MS-SRM で定量

した。本法により水質試料中の 4-メチルベンジリデンカンファーを 0.44 μ g/L で定量可能であった。

人形峠周辺の環境放射線等測定報告(平成 25 年度)

小川 登, 森上嘉亮, 畑 陽介, 片岡敏夫, 清水光郎,
山本 淳, 西平 強, 岸本壽男

岡山県環境保健センター, 同 環境企画課: 平成 25 年度人形峠周辺の環境放射線等測定報告書

(独)日本原子力研究開発機構人形峠環境技術センター
周辺の安全確保や環境保全のために, 昭和 54 年度から
環境放射線等の連続測定及びサンプリング測定を実施

している。平成 25 年度における放射線, 放射能, ふっ
素等の測定結果に施設由来の異常値は認められなかつ
た。

患者由来 *Legionella pneumophila* 血清群 3 sequence type 93 の 疫学調査—岡山県

中嶋 洋, 大畠律子, 河合央博 他

病原微生物検出情報, 164-165 (34), 2013

県下で分離された患者由来株のうち, *L. pneumophila* (以下, Lp) 血清群 (以下, SG) 3 sequence type (以下, ST) 93 株は国内の他地域では未だ検出されていない地域特異的な株であるため, 感染源の究明や環境中での本菌の分布を把握する目的で疫学調査を実施している。平

成 20 年～平成 24 年に当センター, 保健所検査課, 衛生検査所で分離された浴槽水等由来レジオネラ属菌のうち, Lp SG3 に同定・血清群別された 71 株を用いて患者株と比較したが, 現在まで患者由来株と同じ Lp SG3 ST93 株は検出されていない。

病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの 構築に関する研究 (平成 25 年度)

中嶋 洋, 大畠 律子, 河合 央博 他

病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究
厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
平成 25 年度 総括・研究分担報告書, 97-160, 2014

中四国ブロックの分子疫学解析手法の維持・向上と, より精度の高いデータベースの構築を目的として, 腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 菌株を用いてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) 及び IS-printing System による精度管理を実施した。その結果, PFGE 法による解析では, 目視による泳動パターンはどの施設の結果もほぼ一致していたが, デンドログラム解析におけるバンド位置の認識の差により, 解析結果が多少異なっていた。IS-printing system による解析では, 2nd set primer による 4 本目の増幅産物の扱いで, 解析結果が

2 グループに分かれたが, それ以外の結果は一致しており, 両解析方法とも概ね良好な結果を示した。中四国地域の EHEC O157 による感染事例について, IS-printing system による解析データを収集し解析した結果, 9 種類の IS コードの菌による感染事例の発生が, 複数の県で確認された。広域発生事例の疫学解析に重要な分子疫学情報等のデータベース構築に向け, 今後さらに分子疫学解析技術の維持・向上が重要になってくるものと思われる。

レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み（平成25年度）

森本 洋, 中嶋 洋 他

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究
厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
平成25年度 総括・分担研究報告書, 105-132, 2014

地方衛生研究所のレジオネラレファレンスセンターを中心メンバーとしたレジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループ内で、標準的な検査法の整理と提示、研修システムの構築、精度管理の3点を柱とし、行政・民間の検査機関を問わず検査精度の安定に向けた取

組みを検討している。本年度は、シスメックス・ビオメリュー社のBioBallを利用した外部精度管理を試みた。ワーキンググループが推奨する標準的な検査法では、適切な結果を得ることができた。

地域特異的な感染源不明クラスターに関する調査（平成25年度）

中嶋 洋

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究
厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
平成25年度 総括・分担研究報告書, 181-187, 2014

県内で発生したレジオネラ症患者のうち、平成20年～25年に*L.pneumophila* (Lp) 血清群(SG) 3を9株収集した。sequence-based typing (SBT) 法による型別の結果、すべての株がsequence type (ST) 93に型別され、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子パターンも一致した。このことは、患者の感染源及び原因菌が同一である可能性を示唆しており、感染源究明のための調査を継続実施している。現在までのところ、本菌は岡山県内のみで分離されており、地域特異的

な菌株である。本年度は、浴槽水等140検体を検査し、31検体からレジオネラが分離された。また、保健所等が分離したレジオネラ菌株79株を収集した。これらのうちのLp SG3と、過去に浴槽水等から分離されたLpSG3株を含め、131株についてPFGE法による解析を行ったが、いずれの菌株も患者分離株とは遺伝子パターンが異なっており、感染源の究明には至らなかった。今後もレジオネラ感染防止対策として、多様な検体について調査を行い、感染源を究明していく必要がある。

リケッチア・レファレンスセンターの活動について

安藤秀二, 木田浩司, 岸本壽男 他

国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 53-56, 2014

リケッチア症は、国内発生を考慮した場合、ベクターの種類、リケッチアの種類によって、発生時期や患者発生地域の集中など地域特性が強く表れる疾患であるため、本研究では、全国共通基盤を構築することを目指し、初年度、つつが虫病と日本紅斑熱のマニュアル改訂、全国共通となる検査法の評価の準備、全国情報の共有と担当者自身のスキルアップの機会を積極的に行った。マニュアルに関してはつつが虫病と日本紅斑熱を優先し、順次進めている。あわせて日本紅斑熱のリアルタイム

PCR系標準化のための準備等を行った。リケッチア関連の情報共有として、特定の疾患が話題になった際、それに固執し、鑑別対象とされるべきリケッチア症が置き去りにされ、そのために治療等が遅れ、死亡または重症化する症例が増える危険性があることが指摘された。レファレンスセンターを中心とした地域の診断体制を確固としたものとすると同時に、情報発信のあり方を再考すべき時期である。

ラボネットワークの構築と課題に関する検討

岸本壽男, 木田浩司 他

ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる
技術・情報の体系化に関する研究
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 129-133, 2014

ダニ媒介性細菌感染症の多角的な対応を可能とすることを目指している。従来より進めてきたリケッチア症の診断・治療ネットワーク構築とその課題に関する検討をベースに、地方衛生研究所、国立感染症研究所、そして関連研究機関と協力、以下の活動を継続実施し、課題の検討と解決方法の試行を行っている。(1) リケッチア症に対する地域特性を考慮した調査及び検査法の開発に取り組んだ。地域ブロック間の調整をしつつ、地域性を考慮した具体的な反応は、ニーズに合わせ、個々のブロック、地方衛生研究所を中心に進められた。(2) 複数県参加型の地域ラボネットワーク構築活動として、①東

北ブロックでは、ダニ媒介性感染症の情報の共有と感染源対策の基盤情報を得るために必要なマダニの形態同定のための研修会を実施した。②中国四国ブロックでは、*Rickettsia japonica* 検出系の精度管理に資するツールの開発とともに、複数の施設でその精度管理を試験的に実施した。③九州ブロックでは、前年度の実験室検査技術研修に連動させうる野外調査を行った。さらに、(3) リケッチア症検査体制に現状確認を更新するとともに、地方衛生研究所等がもつ地域情報の収集と整理を開始した。

Rickettsia japonica の real-timePCR 検出系における 検体への汚染が検証可能な陽性コントロールの作成

木田浩司, 岸本壽男, 磯田美穂子, 溝口嘉範, 濱野雅子, 藤井理津志 他

ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる

技術・情報の体系化に関する研究

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 155-160, 2014

現在, 日本紅斑熱の病原リケッチアである *R. japonica* を検出する遺伝子検査法として, 花岡ら (EID,2009) によって開発された real-timePCR 法が多くの施設で利用されている。しかし, 遺伝子診断は陽性コントロール DNA の検体への混入による誤判定の危険性が高いことが知られており, 本病原体に限らず, 近年の実験室診断の大きな課題となっている。そこで我々は, *R. japonica* 検出 real-timePCR 法の標的遺伝子領域に遺伝子マーカー配列を組み込んだプラスミドを作成し, 陽性コントロールとして利用可能か検証した。その結果, 遺伝子マーカー配列挿入による影響はなく, プラスミドを用いた検量線による *R. japonica* 遺伝子の定量が可能で

あることが確認された。次に, 遺伝子マーカー配列を検出する VIC 標識の MGB probe を作成し, *R. japonica* 検出用 probe (FAM 標識 MGB probe) との Duplex real-timePCR 法を実施したところ, コントロールプラスミドでは FAM と VIC の蛍光増幅が確認されたのに対し, *R. japonica* 培養液から抽出した DNA では, FAM の蛍光増幅のみが確認され, 両者を明確に判別できた。今回開発した陽性コントロールプラスミドを用いた Duplex real-timePCR 法は, *R. japonica* 遺伝子の定量が可能となるだけでなく, 検体への陽性コントロールの混入を検査と同時に確認できる検査系であり, 非常に有用である。

学 会 発 表

No.	題 名	発 表 者	学 会 名
1	Legionella pneumophila臨床分離株の遺伝子解析による分類	前川純子, 倉 文明, 渡邊祐子, 磯部順子, 田中 忍, 中嶋 洋, 吉野修司 他	第87回日本感染症学会学術講演会
2	Legionella pneumophila血清群 1 環境分離株の遺伝子解析による分類	前川純子, 倉 文明, 渡邊祐子, 磯部順子, 田中 忍, 中嶋 洋, 吉野修司 他	第87回日本感染症学会学術講演会
3	当院におけるマイコプラズマ分離株の薬剤感受性の検討	堺 隆大, 石田 直, 橘 洋正, 伊藤明広, 古田健二郎, 岩破将博, 田中麻紀 他	第87回日本感染症学会学術講演会
4	喀痰培養よりMycoplasma pneumoniaeを検出した15歳以上のマイコプラズマ肺炎患者の臨床的検討	伊藤明広, 石田 直, 橘 洋正, 古田健二郎, 岩破将博, 田中麻紀, 時岡史明 他	第87回日本感染症学会学術講演会
5	岡山県の流行性角結膜炎患者からの新しいD種アデノウイルスの検索(1990～2012)	濱野雅子, 木田浩司, 溝口嘉範, 葛谷光隆, 藤井理津志, 岸本壽男, 大本佐和子	第54回日本臨床ウイルス学会
6	水質試料中の4-メチルベンジリデンカンファールの分析	浦山豊弘	第22回環境化学討論会
7	ノロウイルス検査の迅速化のためのエコーウイルス9型のReal-time RT-PCR検出法開発と核酸検出効率の評価	木田浩司, 溝口嘉範, 磯田美穂子, 濱野雅子, 藤井理津志	平成25年度岡山県獣医三学会
8	エコーウイルス9型定量系によるノロウイルス通知法の評価	溝口嘉範, 木田浩司, 磯田美穂子, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男 他	第34回日本食品微生物学会学術総会

No.	題 名	発 表 者	学 会 名
9	ノロウイルス検査の迅速化のためのエコーウイルス9型のReal-time RT-PCR検出法開発と核酸検出効率の評価	木田浩司, 溝口嘉範, 磯田美穂子, 濱野雅子, 藤井理津志	平成25年度獣医学術中国地区学会
10	溶連菌感染の関与が疑われた急性尿細管間質性腎炎の1例	島袋 渡, 郭 義胤, 久野 敏, 田代克弥, 大塚泰史, 中嶋 洋	第35回日本小児腎不全学会学術集会
11	児島湖流域の長期的な水質シミュレーション	藤田和男, 難波あゆみ, 河野裕明, 山本 淳	日本水処理生物学会第50回大会
12	感染性推定遺伝子検査法の下水中のノロウイルス検出への応用	溝口嘉範, 木田浩司, 磯田美穂子, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男 他	第106回日本食品衛生学会学術講演会
13	中国四国ブロックの地方衛生研究所におけるDuplex real-time PCRによるRickettsia japonica検査法の模擬訓練	木田浩司, 溝口嘉範, 磯田美穂子, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男	第6回日本リケッチア症臨床研究会・第20回リケッチア研究会合同研究発表会
14	一飼育施設における牛のリストeria・モノサイトゲネス保菌調査	河合央博	第20回岡山県保健福祉学会
15	GC/MSを用いた水質中のメチル＝ドデカノートの分析について	吉岡敏行	平成25年度化学物質環境実態調査環境科学セミナー
16	LC/MS/MSを用いた水質中の4-メチルベンジリデンカンファーの分析について	浦山豊弘	平成25年度化学物質環境実態調査環境科学セミナー

岡山県環境保健センター年報 第38号

(平成25年度)
平成26年12月26日発行

編集・発行 岡山県環境保健センター
〒701-0298 岡山市南区内尾739-1
TEL 総務課 086-298-2681 企画情報室 086-298-2682
大気科 086-298-2683 水質科 086-298-2684
放射能科 086-298-2685 細菌科 086-298-2686
ウイルス科 086-298-2687 衛生化学科 086-298-2688
FAX 086-298-2088 (代表)
ホームページ <http://www.pref.okayama.jp/soshiki/185/>
