

# 岡山県環境保健センター年報

第 36 号

(平成 23 年度)

Annual Report

of

Okayama Prefectural Institute for Environmental  
Science and Public Health

No.36

2012

## 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提供等の業務を総合的に実施しています。

平成23年度は、福島第一原子力発電所の事故に伴う空間線量率及び食品等の放射能測定強化を図るため、県内4ヶ所にモニタリングポストを増設するとともに、海水から農水産物まで幅広く放射能測定を実施したほか、職員8名を環境放射線モニタリングチームとして福島県に派遣しました。

また、大気関係では県内の4測定局において大気中の微小粒子状物質（PM2.5）の自動測定を開始し、水質関係では事業場排水の行政検査や公共用水域における水質汚濁事象への対応等を行いました。

一方、保健衛生関係では、馬刺しを原因とする食中毒の発生などにより細菌検査数が増加するとともに、季節性インフルエンザの流行規模拡大や手足口病の大流行も経験しました。

さらに、食品中の残留農薬の超過事案や食品中の放射性セシウム検査、脱法ドラッグや未承認医薬品等の健康食品を原因とする違反事例など多くの事案に対処するとともに、分析法の開発や疫学に関する調査研究にも取り組んできました。

こうした県内外で発生する様々な事案への対応や調査研究等を通じて、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、県行政の推進に努めています。

このたび、平成23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。御高覧いただき忌憚のない御意見をお寄せいただきますとともに、なお一層の御支援、御指導を賜りますようお願いいたします。

平成24年11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. 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 2大気測定局におけるPM2.5及びSPMの成分分析—  
林 隆義, 中桐未知代, 野村 茂, 小川 登, 深見武史, 中桐基晴 ..... 1
2. 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9報 PM2.5中のレボグルコサン等の分析法と県内の存在状況—  
中桐未知代, 林 隆義, 野村 茂, 小川 登, 深見武史, 中桐基晴 ..... 9

##### 【資 料】

3. 光化学オキシダント情報・注意報の発令と気象測定局の風向の関係について  
小川 登, 深見武史, 林 隆義, 野村 茂, 中桐未知代, 中桐基晴 ..... 17
4. 2011年度における酸性雨調査  
深見武史, 小川 登, 林 隆義, 野村 茂, 中桐未知代, 中桐基晴 ..... 21

#### 水質科

##### 【調査研究】

5. 児島湖流域の水質シミュレーション計算  
藤田和男, 難波 勉, 難波あゆみ, 鷹野 洋, 板谷 勉 ..... 25
6. 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を用いた水質中フタル酸エステル (PAE) の多成分分析法の検討—  
吉岡敏行, 山辺真一, 坂口浩範, 大月史彦 ..... 35
7. 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  
—LC/MS/MSを用いた生物中農薬の分析法の検討—  
大月史彦, 浦山豊弘, 吉岡敏行, 山辺真一, 坂口浩範, 剣持堅志 ..... 45
8. 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  
—LC/MS/MSを用いた水質中ポリ-*tert*-ブチルフェノール類の同時分析法の検討—  
大月史彦, 吉岡敏行, 山辺真一, 坂口浩範, 剣持堅志 ..... 51

##### 【資 料】

9. 児島湖底泥のユスリカ調査  
藤田和男, 難波 勉, 難波あゆみ, 鷹野 洋, 板谷 勉 ..... 57
10. 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  
—多環芳香族炭化水素 (PAH) 類の水質環境実態調査—  
吉岡敏行, 山辺真一, 坂口浩範, 大月史彦 ..... 61

#### 放射能科

##### 【資 料】

11. 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  
森上嘉亮, 西村佳恵, 清水光郎, 片岡敏夫 ..... 65

## 保健科学部

### 細菌科

#### 【調査研究】

12. 県内における食中毒及び感染症起因菌の疫学的解析  
①下痢症・呼吸器感染症起因菌の疫学調査と検査法の検討（平成23年度）  
中嶋 洋, 大島律子, 石井 学, 植原幸二, 仲 克己…………… 69
13. 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（4）  
大島律子・石井 学・中嶋 洋…………… 75
14. 牛由来検体からのリステリア及びサルモネラの検出状況と県内におけるサルモネラの疫学的解析（平成23年度）  
石井 学, 大島律子, 仲 克己, 中嶋 洋…………… 79

### ウイルス科

#### 【調査研究】

15. 2011年県内における手足口病の大規模流行  
濱野雅子, 葛谷光隆, 木田浩司, 溝口嘉範, 藤井理津志, 秋山三紀恵, 羽原 誠…………… 83
16. 県内におけるインフルエンザ流行の疫学的解析（2010～2011年シーズン）  
葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志, 羽原 誠…………… 89
17. 胃腸炎ウイルスの疫学的研究  
—下水を用いたヒトC群ロタウイルスサーベイランスの有効性—  
葛谷光隆, 木田浩司, 溝口嘉範, 濱野雅子, 藤井理津志…………… 95
18. 感染症流行予測調査（平成23年度ポリオ感染源調査）  
溝口嘉範, 木田浩司, 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 羽原 誠 …… 101

#### 【資 料】

19. 胃腸炎ウイルスの疫学的研究  
—電子顕微鏡を用いた胃腸炎ウイルスの検出（2010/11シーズン）—  
藤井理津志, 葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 溝口嘉範, 植原幸二, 濃野 信, 金谷誠久 …… 105

### 衛生化学科

#### 【資 料】

20. 厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価（第2報）  
浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 山本 淳 …… 109
21. 健康食品からの医薬品成分検出事例について  
浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 山本 淳, 鎌倉浩之, 合田幸広 …… 115

他誌発表論文抄録 …… 123

単行本 …… 128

報告書等 …… 129

学会発表 …… 139

【調査研究】

## 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 2大気測定局におけるPM2.5及びSPMの成分分析—

Component analysis of PM2.5 and SPM at two air pollution monitoring stations

林 隆義, 中桐未知代, 野村 茂, 小川 登, 深見武史, 中桐基晴 (大気科)  
Takayoshi Hayashi, Michiyo Nakagiri, Shigeru Nomura, Noboru Ogawa,  
Takeshi Fukami, Motoharu Nakagiri (Department of Atmosphere)

### 要 旨

平成23年度大気常時監視として微小粒子状物質 (PM2.5) の成分分析を開始した総社一般環境大気測定局及び長津自動車排出ガス測定局において, 調査期間及び測定項目を拡大するとともに浮遊粒子状物質 (SPM) の成分分析も並行して行い, これらの質量濃度やイオン成分, 無機成分等の地点間差を比較した。質量濃度の季節変動は, いずれの測定局においても過去の調査と異なり夏季~秋季に低下しており, 夏季の大気不安定な状況が原因の一つと考えられた。長津自動車排出ガス測定局の質量濃度はともに総社一般環境大気測定局よりも高値を示したが, 2測定局は同じ変動傾向を示した。イオン成分や金属成分の主要な成分の割合は2測定局でほとんど変わらず, 明らかな地域差は認められなかったが, 長津自動車排出ガス測定局は8月を除きCl<sup>-</sup>が高値を示した。同測定局の調査期間における風向は, 8月は西北西が主であったのに対し, それ以外の時期は東北東~北東が主でありCl<sup>-</sup>の特定発生源の存在が推察されるため今後原因を調査する必要がある。

[キーワード: 浮遊粒子状物質, 微小粒子状物質, 大気環境測定局, 成分分析]

[Key words: PM2.5, SPM, Monitoring Station, Component Analysis]

## 1. はじめに

本県では, 平成21年度から環境省試行事業として, 早鳥一般環境大気測定局 (以下「早鳥局」という。) において微小粒子状物質 (以下「PM2.5」という。) 自動測定機による常時監視を開始した。また, 平成22年度末に長津自動車排出ガス測定局 (以下「長津局」という。), 総社一般環境大気測定局 (以下「総社局」という。) 及び茂平一般環境大気測定局 (以下「茂平局」という。) の3測定局にPM2.5自動測定機を整備し, 平成23年度から計4測定局 (岡山市及び倉敷市設置分を除く。) において大気汚染防止法に基づくPM2.5常時監視と長津局及び総社局で成分分析を開始した (図1)。

本調査ではPM2.5の季節変動やその成分をより詳細に把握するため, 調査期間及び測定項目を拡大するとともに浮遊粒子状物質 (以下「SPM」という。) の成分分析を行い, その結果をとりまとめたので報告する。

## 2. 調査方法

### 2.1 調査地点

平成22年度はPM2.5常時監視開始前の事前調査のため, 環境省の試行調査と併せて, 早鳥局においてPM2.5とSPMについてマニュアル測定と自動測定機による並行測定を年5時期に分けて実施し, 測定法による質量濃度の差や時期による成分変動を調査するとともに, サンプリング方法や分析に係る実施上の問題点の把握を行った<sup>2)</sup>。

この結果をもとに平成23年度の常時監視の成分分析は, 使用可能なThermo社製PARTISOL-FRM Model 2000 PM2.5ローボリウムサンプラー (以下「PM2.5-LV」という。) が2台であること, サンプリングにかかる時間や移動の問題を考慮して, PM2.5の主要発生源のひとつとされている自動車排出ガス中のディーゼル排気粒子 (DEP) 等の影響と, 一般住民居住地域の状況の把握等を目的として, 国道2号線と瀬戸中央自動車道が交わる幹線道路沿線に設置された長津局と, 大規模な事業場等がない総社市中心部の住宅地に設置された総社局の2測定局とした (図1)。

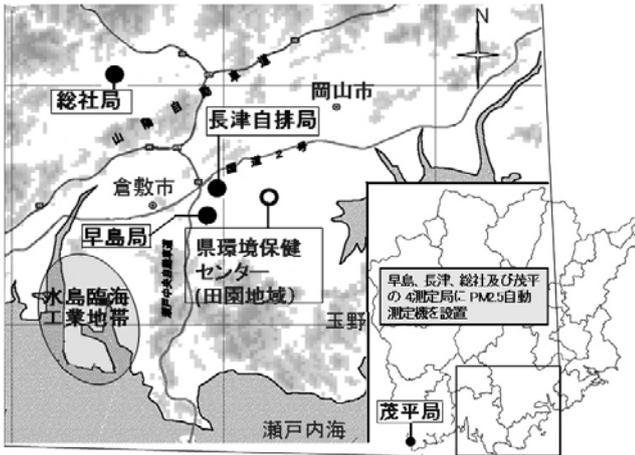


図1 調査地点

## 2.2 試料採取

各測定局にPM2.5-LVと新宅機械製FKS型ローボリウムエアサンプラー（以下「SPM-LV」という。）を1台ずつ設置し、常時監視計画の年4回（5月、8月、11月及び2月）に加え、過去の調査<sup>1) 2)</sup>でPM2.5濃度の増加傾向が認められた秋季～冬季に調査を2回（10月及び1月）サンプリングを実施した（表1）。

PM2.5及びSPMは、いずれも石英繊維ろ紙（Pallfulex 2500QAST, 8x10inch）を直径47mmに切り抜いたものを使用した。

試料のサンプリング時間は、ろ紙の交換作業や車での移動を考慮して、長津局は午前10時～翌日午前9時、総社局は午前11時～翌日午前10時の23時間とし、各回とも月曜日から金曜日までの延べ5日間行い、PM2.5及びSPM各24検体、2測定局で合計96検体を得た。

## 2.3 装置及び使用条件

PM2.5の質量濃度の秤量は「環境大気常時監視マニュアル 第6版（平成22年3月）」<sup>3)</sup>に従って、採取試料は温度 $21.5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $35 \pm 5\%$ の条件で24-72時間コンディショニング後、ウルトラマイクロ天秤で秤量した。サンプリング及び秤量に用いた機器等は表2のとおりである。

表1 試料採取期間

採取場所:長津局・総社局					
時期	期間	PM2.5試料数		SPM試料数	
		長津局	総社局	長津局	総社局
5月	2011/ 5/16(月) - 5/20(金)	4	4	4	4
8月	2011/ 8/ 8(月) - 8/12(金)	4	4	4	4
10月	2011/10/17(月) - 10/21(金)	4	4	4	4
11月	2011/11/28(月) - 12/ 2(金)	4	4	4	4
1月	2012/ 1/16(月) - 1/20(金)	4	4	4	4
2月	2012/ 2/14(月) - 2/18(金)	4	4	4	4
計		24	24	24	24
長津局	午前10時～翌日午前9時(23時間)				
総社局	午前11時～翌日午前10時(23時間)				

秤量後のPM2.5及びSPM採取後の石英繊維ろ紙を1/4カッターを用いて4等分し、それぞれ1/4を、「大気中微小粒子状物質（PM2.5）測定方法暫定マニュアル 改訂版」<sup>4)</sup>に従い、イオン8成分（ $\text{Na}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ ）、金属13成分（Mn、Cr、Ni、Be、As、Al、Fe、Zn、Cu、V、Pb、Se、Cd）、多環芳香族炭化水素類（PAHs）26成分等の分析に供し、残り1/4は $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

## 3. 結果と考察

当報告では、PM2.5の主要な成分である質量濃度、イオン成分及び金属成分等についてとりまとめた。PAHs及びその他成分については中桐らが別途報告している<sup>5)</sup>。

### 3.1 測定地点及び時期における質量濃度と主要成分の割合の比較

PM2.5及びSPMのマニュアル測定で得られた各々24検体の質量濃度と、同時期に測定した自動測定機の1時間値の23時間分の平均値及びその他の常時監視データを示す（表3）。

ただし、長津局のSPM自動測定機の点検のため11月29日の自動測定機によるSPMのデータは欠測とした。

各調査時期におけるPM2.5とSPMの質量濃度の変動を図2に示した。長津局はPM2.5及びSPMともに総社局を上回ったが2測定局の変動は同期しており、バックグラウンドと考えられる総社局の値に自動車排出ガスが恒常的に影響を与えているものと考えられた。しかし、総社局のPM2.5の平均値においても環境基準値である年平均 $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ を超過しており、住宅地域においてもPM2.5が高い濃度で推移していた。

センター屋上や早島局における過去の結果<sup>1) 2)</sup>では、PM2.5及びSPMともに初夏から初冬にかけて上昇し冬季に低下する一山型の傾向を示していたが、今回はこれとは異なり、長津局、総社局ともに8月から10月にかけて減少し、11月に若干上昇し1月に低下した後、2月に上昇するというW型の変動を示していた。8月にPM2.5の上昇がみ

表2 マニュアル測定の捕集条件と秤量条件

	PM2.5	SPM
捕集用 ローボリウム エアサンプラー	PM2.5捕集用 ローボリウム エアサンプラー(PM2.5-LV) Rupprecht&Patashnic製 PARTISOL-FRM Model 2000	SPM捕集用 ローボリウム エアサンプラー(SPM-LV) 新宅機械製、FKS型 10 $\mu$ m $\phi$ 分級装置付
ろ紙	47mm $\phi$ 石英繊維ろ紙 PALLFLEX製 TISSUQUARTZ 2500QAT 8"×10"から打ち抜き	同左
流量	16.7L/分	20L/分
捕集時間	1日(23時間)	同左
秤量機器	ウルトラマイクロ天秤 Sartorius製 SE-2F	同左
コンディショニング	温度21.5 $\pm$ 1.5 $^{\circ}$ C 湿度35 $\pm$ 5%	同左

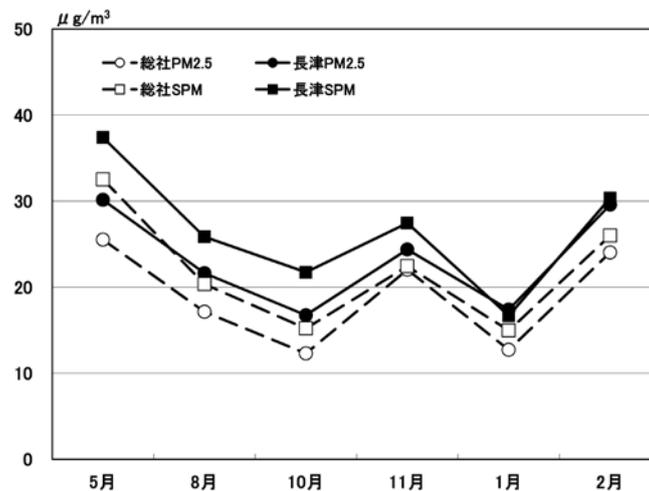


図2 PM2.5及びSPMの質量濃度 (マニュアル測定)

られなかったのは、夏季における大気的不安定な状況との関連が疑われる。11月の上昇は県南部で稲刈り後のワラ焼きが行われるためと思われるが、10月の低値の原因究明については、今後のデータの蓄積が必要である。

次にPM2.5とSPMについてマニュアル測定の質量濃度の相関をみた(図3, 4)。

2測定局ともに良い相関を示し、また回帰式の傾きからSPMの8割程度をPM2.5が占めていることが確認され、SPMの挙動を捕らえることによりPM2.5の状況を一定程度推測可能と思われた。

次に、PM2.5とSPMの主要な成分である、イオン成分、金属成分及び炭素成分を含むその他成分について、調査時期別にその割合を図5, 6に示した。

2測定局ともに質量濃度の差はあるものの、調査時期にかかわらず3つの主要な成分の割合に大きな差は認められなかった。金属13成分の割合は2測定局ともにPM2.5で2%程度、SPMで4%程度とSPMの方が多かったが質量全体に占める割合は小さかった。イオン成分の割合はPM2.5の方がSPMよりも若干高いものの、平均して40%程度と粒子中の質量の多くを占めていた。また、炭素成分を

含むと考えられるその他成分の割合については2測定局で明確な差は見られなかったが、長津局は総社局に比べて自動車排出ガスの影響を強く受けると考えられることから、今後凍結保存した1/4ろ紙中の炭素成分の詳細な状況を捕らえる必要がある。

### 3.2 水溶性イオン成分分析結果

水溶性イオン8成分についてPM2.5及びSPMの測定局別のイオン当量比を図7及び図8に示す。

2測定局ともにPM2.5, SPMのいずれもNH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>が主成分を占め、夏季にNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の当量比が低く、秋季にから冬季にかけて増加する傾向は過去の調査結果と同様であった。

SPMについては2測定局ともにNa<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, 及びCa<sup>2+</sup>の当量比がPM2.5の当量比よりも大きく、粗大粒子(>粒径2.5 $\mu$ m)である海塩粒子の捕集によるものと推察された。

また、2測定局間のNa<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>及びCa<sup>2+</sup>の当量比の差は少なく、海塩粒子の影響は2測定局とも同程度と考えられた。しかしCl<sup>-</sup>当量比については、PM2.5及びSPMとも長津局が高い傾向を示した。特に海塩粒子の影響が少ないと考

表3 PM2.5及びSPMの質量濃度

採取開始 月日	天気	気温 平均 ℃	湿度 平均 %	風速 平均 m/s	Ox 最大 ppb	NO 最大 ppb	NO2 最大 ppb	マニュアル測定			自動測定機					
								PM2.5 μg/m <sup>3</sup>	SPM μg/m <sup>3</sup>	PM2.5 /SPM	PM2.5 μg/m <sup>3</sup>	SPM μg/m <sup>3</sup>	PM2.5 /SPM			
総社局	5月16日	月	晴れ	21.0	48.1	1.2	90	3	20	33.0	43.7	0.755	35.5	44.3	0.801	
	5月17日	火	晴れ	18.2	58.4	1.7	73	3	12	20.4	25.5	0.800	20.3	24.5	0.829	
	5月18日	水	晴れ	20.4	42.6	1.4	90	2	17	20.3	27.0	0.749	20.5	26.6	0.769	
	5月19日	木	晴れ	21.2	58.5	1.4	95	3	19	28.4	33.9	0.839	30.3	39.1	0.775	
	5月平均				<b>20.2</b>	<b>51.9</b>	<b>1.4</b>	<b>87</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	<b>25.5</b>	<b>32.5</b>	<b>0.784</b>	<b>26.6</b>	<b>33.6</b>	<b>0.792</b>
	8月	8月8日	月	晴れ	30.1	65.9	1.2	68	7	14	18.4	22.6	0.814	20.1	33.2	0.605
		8月9日	火	晴れ	31.2	60.3	1.6	45	4	13	20.3	21.9	0.926	21.2	33.0	0.641
		8月10日	水	晴れ	31.6	54.8	1.9	56	4	14	15.7	19.8	0.792	20.5	30.0	0.684
		8月11日	木	晴れ	30.7	60.8	1.8	53	4	11	14.2	17.1	0.830	15.7	25.0	0.629
	8月平均				<b>30.9</b>	<b>60.4</b>	<b>1.6</b>	<b>56</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>17.1</b>	<b>20.4</b>	<b>0.842</b>	<b>19.4</b>	<b>30.3</b>	<b>0.639</b>
	10月	10月17日	月	曇り	17.3	56.6	1.2	43	3	9	11.6	14.0	0.827	12.3	13.9	0.881
		10月18日	火	晴れ	17.4	56.2	1.3	47	11	11	12.1	14.7	0.822	9.5	10.8	0.884
		10月19日	水	晴れ	18.1	59.5	1.1	48	3	14	11.1	14.7	0.753	9.8	13.3	0.738
		10月20日	木	晴れ	20.5	63.4	1.2	49	5	19	14.4	17.3	0.829	17.4	20.4	0.850
	10月平均				<b>18.3</b>	<b>58.9</b>	<b>1.2</b>	<b>47</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>12.3</b>	<b>15.2</b>	<b>0.809</b>	<b>12.2</b>	<b>14.6</b>	<b>0.838</b>
	11月	11月28日	月	曇り	13.1	80.7	0.9	20	43	31	34.1	35.1	0.971	35.9	43.8	0.819
		11月29日	火	晴れ	14.8	79.4	0.7	15	69	47	38.2	39.3	0.973	42.6	49.3	0.865
		11月30日	水	晴れ	14.5	70.1	1.4	32	8	31	12.8	12.9	0.993	14.2	17.7	0.804
		12月1日	木	曇り	10.0	65.8	1.5	33	9	16	3.0	2.4	1.270	1.8	0.5	3.517
	11月平均				<b>13.1</b>	<b>74.0</b>	<b>1.1</b>	<b>25</b>	<b>32</b>	<b>31</b>	<b>22.0</b>	<b>22.4</b>	<b>0.983</b>	<b>23.6</b>	<b>27.8</b>	<b>0.849</b>
	1月	1月16日	月	曇り	4.5	60.7	1.0	32	29	27	11.8	13.9	0.847	10.7	10.3	1.040
		1月17日	火	晴れ	4.6	59.8	1.2	38	20	32	10.0	12.7	0.787	7.4	9.0	0.827
		1月18日	水	晴れ	7.5	58.8	0.7	31	38	36	22.4	26.2	0.856	16.8	21.7	0.773
		1月19日	木	雨	6.5	87.9	1.3	29	23	25	6.7	7.1	0.942	4.1	3.4	1.189
1月平均				<b>5.8</b>	<b>66.8</b>	<b>1.1</b>	<b>33</b>	<b>28</b>	<b>30</b>	<b>12.7</b>	<b>15.0</b>	<b>0.850</b>	<b>9.8</b>	<b>11.1</b>	<b>0.878</b>	
2月	2月20日	月	晴れ	4.2	53.8	1.1	40	14	31	17.5	19.5	0.896	15.6	15.4	1.012	
	2月21日	火	曇り	6.1	72.7	0.7	33	19	35	29.6	29.3	1.010	25.0	31.1	0.803	
	2月22日	水	曇り	7.6	83.6	1.2	37	20	26	22.6	24.3	0.931	18.5	21.5	0.860	
	2月23日	木	雨	9.3	62.6	1.7	55	15	25	26.4	30.8	0.858	25.3	31.9	0.792	
2月平均				<b>6.8</b>	<b>68.2</b>	<b>1.2</b>	<b>41</b>	<b>17</b>	<b>29</b>	<b>24.0</b>	<b>26.0</b>	<b>0.925</b>	<b>21.1</b>	<b>25.0</b>	<b>0.844</b>	
長津局	5月16日	月	晴れ	20.9	48.2	0.8	85	81	83	37.8	47.8	0.789	43.8	53.4	0.820	
	5月17日	火	晴れ	18.3	58.7	1.3	76	66	52	24.6	29.0	0.850	29.4	32.7	0.899	
	5月18日	水	晴れ	20.3	42.4	0.7	83	63	69	25.1	34.0	0.739	31.9	37.4	0.853	
	5月19日	木	晴れ	21.2	58.2	0.6	89	63	47	33.1	38.8	0.852	36.3	43.3	0.837	
	5月平均				<b>20.2</b>	<b>51.9</b>	<b>0.8</b>	<b>83</b>	<b>68</b>	<b>63</b>	<b>30.1</b>	<b>37.4</b>	<b>0.806</b>	<b>35.3</b>	<b>41.7</b>	<b>0.847</b>
	8月	8月8日	月	晴れ	30.0	65.9	0.5	57	86	49	24.7	28.0	0.883	29.5	37.3	0.790
		8月9日	火	晴れ	31.3	60.5	0.9	60	70	48	26.2	30.7	0.853	29.7	38.0	0.781
		8月10日	水	晴れ	31.6	55.1	1.6	64	63	44	19.8	25.3	0.781	25.6	34.0	0.753
		8月11日	木	晴れ	30.7	60.6	1.5	53	49	36	15.9	19.4	0.817	18.9	25.5	0.740
	8月平均				<b>30.9</b>	<b>60.5</b>	<b>1.2</b>	<b>59</b>	<b>67</b>	<b>44</b>	<b>21.6</b>	<b>25.8</b>	<b>0.837</b>	<b>25.9</b>	<b>33.7</b>	<b>0.769</b>
	10月	10月17日	月	曇り	17.3	57.0	0.7	49	125	42	15.5	24.7	0.629	18.2	19.7	0.926
		10月18日	火	晴れ	17.4	56.1	0.9	54	117	55	12.3	8.1	1.526	15.1	20.9	0.724
		10月19日	水	晴れ	18.1	59.2	0.6	61	86	38	16.6	25.2	0.659	21.9	21.8	1.003
		10月20日	木	晴れ	20.4	63.3	0.7	59	80	53	22.5	28.9	0.778	28.8	32.2	0.895
	10月平均				<b>18.3</b>	<b>58.9</b>	<b>0.7</b>	<b>56</b>	<b>102</b>	<b>47</b>	<b>16.7</b>	<b>21.7</b>	<b>0.770</b>	<b>21.0</b>	<b>23.6</b>	<b>0.889</b>
	11月	11月28日	月	曇り	13.0	80.7	0.4	8	165	45	52.2	57.7	0.905	71.7	51.4	1.395
		11月29日	火	晴れ	14.7	79.4	0.3	11	207	59	58.5	66.5	0.880	79.4	欠測	-
		11月30日	水	晴れ	14.5	70.4	1.3	34	63	38	16.2	18.0	0.899	21.1	18.8	1.120
		12月1日	木	曇り	10.0	65.9	1.7	34	65	39	4.7	6.6	0.709	3.9	5.9	0.660
	11月平均				<b>13.1</b>	<b>74.1</b>	<b>0.9</b>	<b>22</b>	<b>125</b>	<b>45</b>	<b>32.9</b>	<b>37.2</b>	<b>0.884</b>	<b>44.0</b>	-	-
	1月	1月16日	月	曇り	4.5	60.9	0.7	32	233	58	15.8	17.7	0.892	17.3	19.1	0.902
		1月17日	火	晴れ	4.7	59.6	0.7	40	238	59	16.6	17.9	0.927	17.0	17.3	0.982
		1月18日	水	晴れ	7.4	58.3	0.6	35	73	42	25.5	19.7	1.293	24.2	26.2	0.926
		1月19日	木	雨	6.5	87.4	1.0	24	89	37	11.7	11.5	1.022	14.3	12.3	1.170
1月平均				<b>5.8</b>	<b>66.5</b>	<b>0.8</b>	<b>33</b>	<b>158</b>	<b>49</b>	<b>17.4</b>	<b>16.7</b>	<b>1.042</b>	<b>18.2</b>	<b>18.7</b>	<b>0.973</b>	
2月	2月20日	月	晴れ	4.3	53.1	0.6	41	172	61	21.2	25.8	0.821	19.5	28.7	0.679	
	2月21日	火	曇り	5.9	72.3	0.5	25	143	52	40.2	44.3	0.908	25.8	49.5	0.521	
	2月22日	水	曇り	7.6	82.8	1.1	38	108	41	28.5	18.8	1.515	24.9	31.9	0.780	
	2月23日	木	雨	9.3	64.5	1.2	53	186	65	28.4	32.5	0.875	17.2	40.9	0.421	
2月平均				<b>6.8</b>	<b>68.2</b>	<b>0.9</b>	<b>39</b>	<b>152</b>	<b>55</b>	<b>29.6</b>	<b>30.3</b>	<b>0.975</b>	<b>21.9</b>	<b>37.8</b>	<b>0.579</b>	

※気温・湿度は岡山 ※長津は早島のOx値を参照

えられるPM2.5でCl<sup>-</sup>当量比が、8月を除き、顕著に総社局よりも高値を示した。

幹線道路沿道である長津局は総社局よりもNO<sub>x</sub>濃度が高く、PM2.5中のNO<sub>3</sub><sup>-</sup>も若干高いことから、NO<sub>x</sub>の影響によるクロロロスによりCl<sup>-</sup>当量比は低値を示すものと予測さ

れたが、これに反して8月以外は総社局よりも高値を示した。

8月のCl<sup>-</sup>については、高温により揮散して総社局との差がなくなったと推察されるが、その他の時期でCl<sup>-</sup>が高い原因を調べるため、長津局における各調査期間におけ

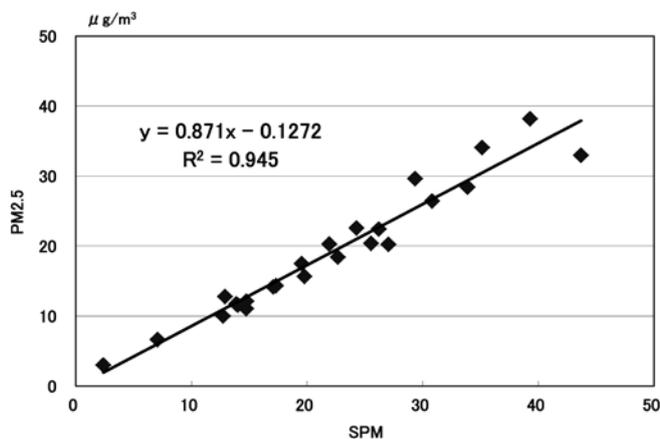


図3 総社局のSPMとPM2.5の相関（マニュアル測定）

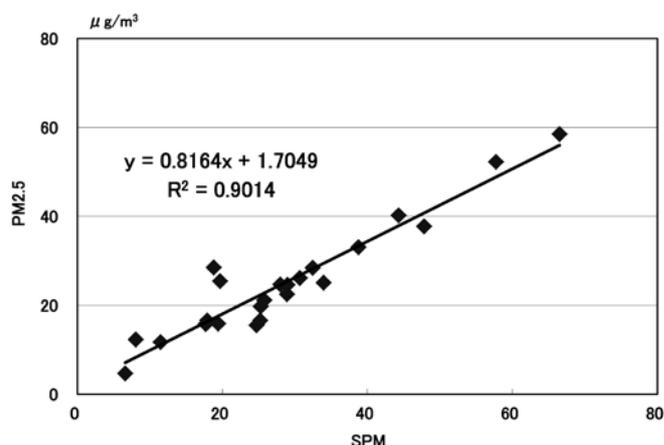


図4 長津局のSPMとPM2.5の相関（マニュアル測定）

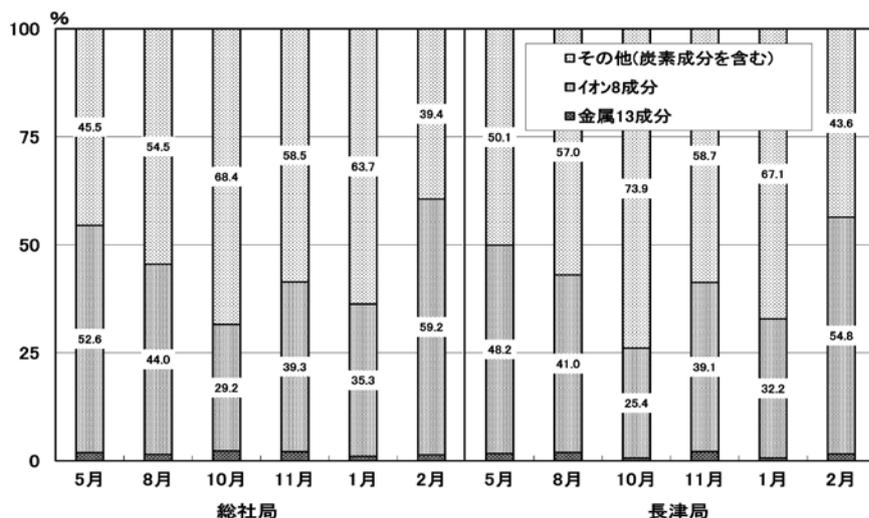


図5 PM2.5主要成分の割合

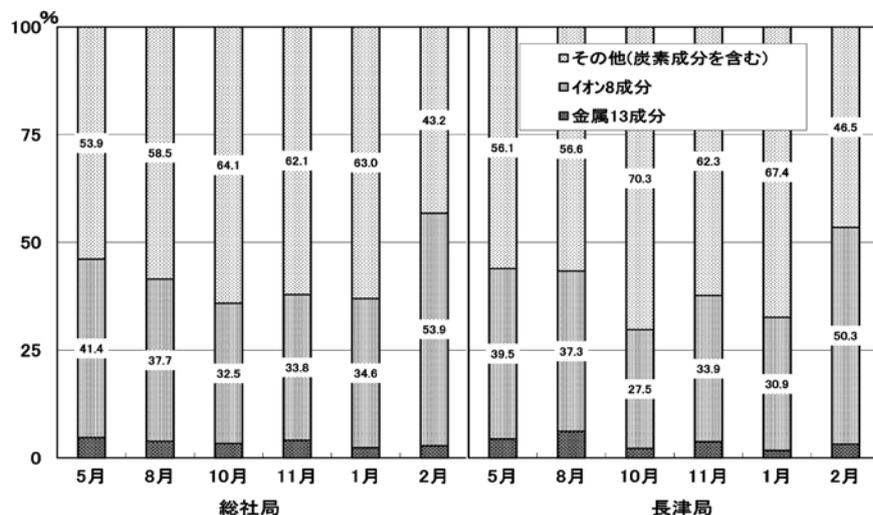


図6 SPM主要成分の割合

る風向を確認したところ、8月の主な風向は西南西であったが、それ以外の時期では、北東から東北東であった(図9)。

今後、Cl<sup>-</sup>が高値となる原因としてその発生源(廃棄物焼却施設等の状況)について調査する必要があると思われる。

### 3.3 金属成分分析結果

PM2.5及びSPMの調査時期別の金属13成分の結果を示す(図10, 11)。

金属13成分の合計濃度は、長津局が総社局よりも高い値

を示すものの、PM2.5で0.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、SPMで1.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度であり、粒子全体質量に占める割合はわずかであったが、その変動は質量濃度の変動とほぼ同期しており、Fe、Al、Znの3元素が、金属13成分の大部分を占めていた。しかし、1/4ろ紙では、捕集した粒子が低濃度の場合、ブランク値が高い元素等では定量が困難なものがあり、発生源究明のため正確に金属成分分析を測定するには、分析試料の質量を増やすかブランク値の小さいPTFEろ紙による捕集の必要性が感じられた。

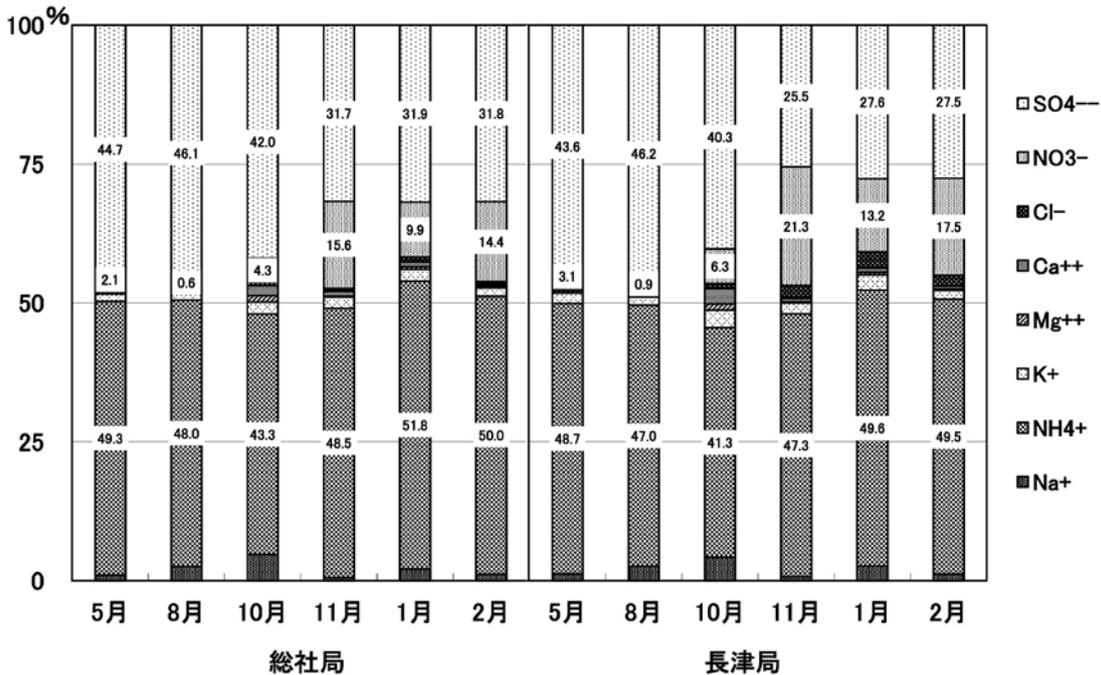


図7 PM2.5イオン当量比

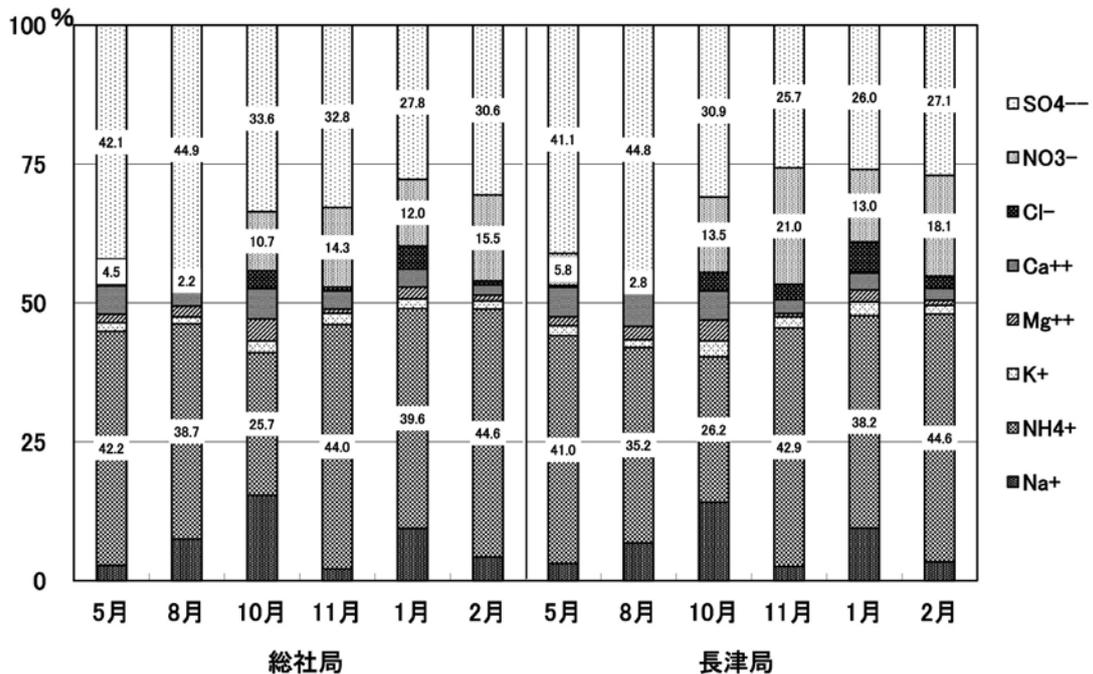


図8 SPMイオン当量比

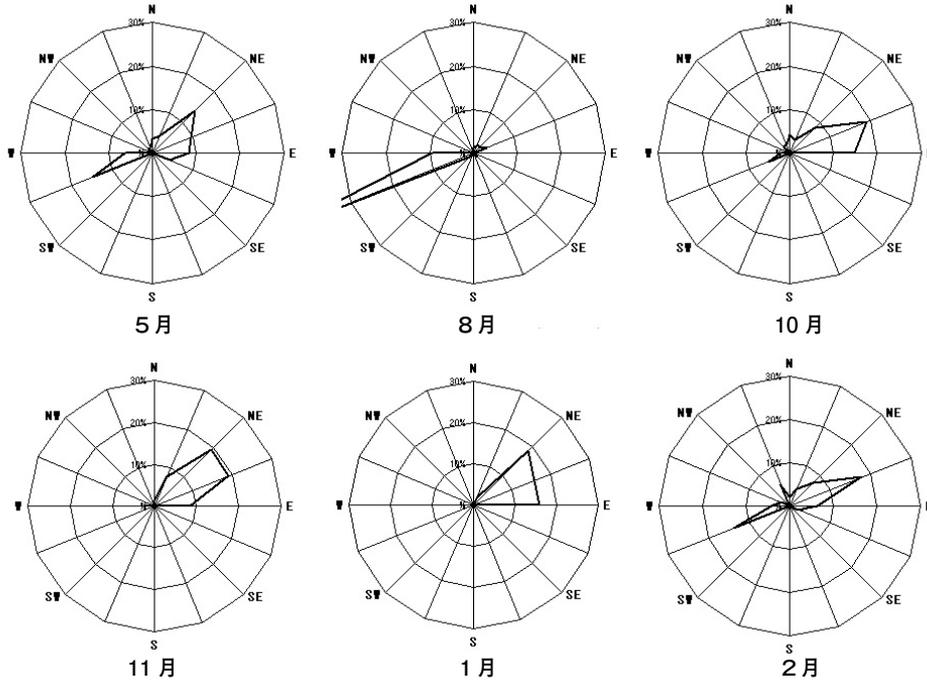


図9 調査期間における長津局の風配図

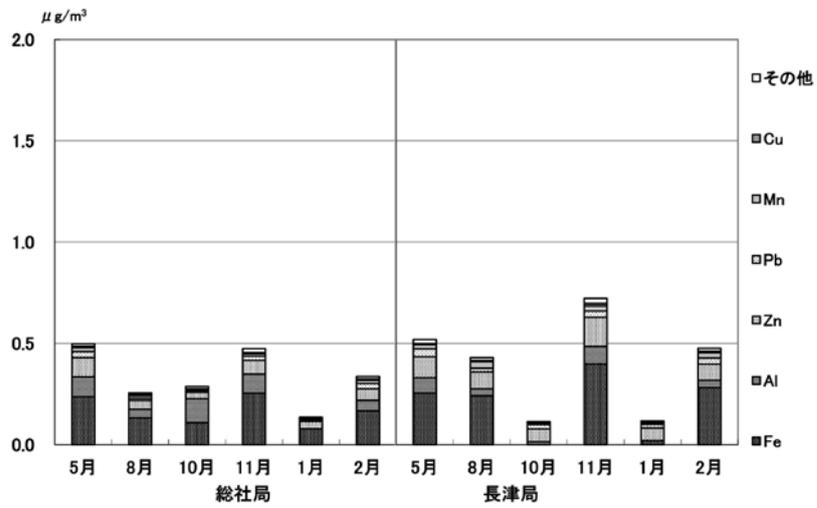


図10 PM2.5金属成分

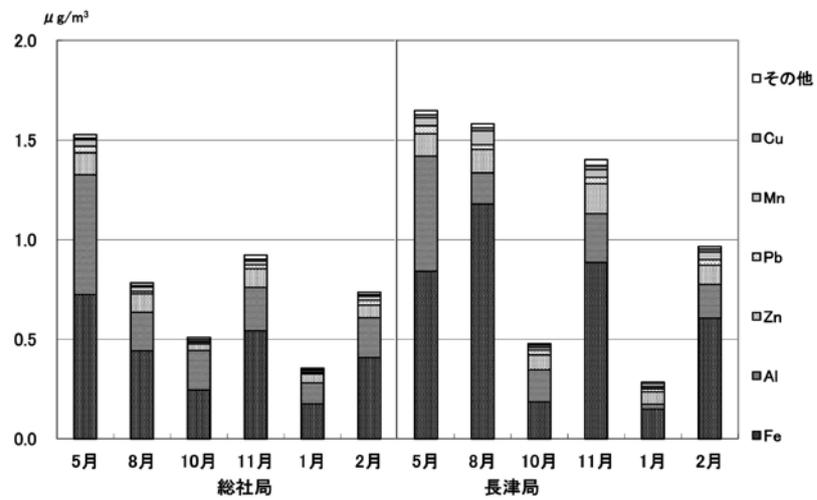


図11 SPM金属成分

## 4. まとめ

平成23年度、PM2.5常時監視を開始した一般環境大気測定局の総社局及び自動車排出ガス測定局の長津局において、四半期毎、年4回の常時監視成分分析に、調査研究による2回の成分分析期間を追加し、PM2.5のイオン成分、無機金属成分等の分析を実施するとともに、SPMについても同様に並行して採取分析した結果、以下のとおりであった。

- 1) 質量濃度はPM2.5、SPMともに長津局が総社局よりも常に高値を示したが、調査時期による変動傾向は同じであった。しかし、総社局のPM2.5の平均値においても環境基準値(年平均 $15\mu\text{g}/\text{m}^3$ )を超過しており、住居地域での高濃度の状況が確認された。
- 2) 過去のセンター屋上や早島局での調査とは異なり、夏季～秋季にPM2.5が高値を示す状況が認められなかった。これは、夏季における大気的不安定な状況との関連性が疑われた。
- 3) マニュアル測定では2測定局ともPM2.5とSPMの間に良い相関が認められ、一次回帰式の傾きが0.8程度と、SPMの質量濃度の約8割がPM2.5であることが確認できた。このことから、SPMの測定によりPM2.5の状況が一定程度推測できるものと考えられた。
- 4) 2測定局における、PM2.5とSPMの主要成分(金属成分、イオン成分及びその他成分)の割合については、大きな差は認められなかった。
- 5) 2測定局ともSPMでは海塩粒子の影響が認められたが、その影響割合には2測定局間で大きな差は認められなかった。
- 6) 長津局のPM2.5では、8月を除くと $\text{Cl}^-$ 当量比が総社局よりも高値であった。風向は8月以外は主に東北東～北東であり、今後この方向について $\text{Cl}^-$ 当量比が高値となる原因(廃棄物焼却施設等の状況)を調査する必要があると思われる。
- 7) 金属13成分は、2測定局ともにPM2.5及びSPMの質量濃度の2.4%と少なく、Fe、Al、Znの3成分が大部分を占めていた。石英繊維ろ紙を用いた金属成分分析は、捕集粒子の質量濃度が低い場合、ブランクが高い元素等の定量が困難であった。分析試料の質量を増やしブランクの低いPTEFろ紙を使用するために、平成24年度からはPM2.5-LVは2台/1測定局体制とすることとした。

## 参考文献

- 1) 石井尚志, 野村 茂, 中桐未知代, 山辺真一: 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子PM2.5による大気汚染)―第5報―, 岡山県環境保健センター年報34, 7-10, 2010
- 2) 林 隆義, 中桐未知代, 野村 茂, 小川 登, 片岡敏夫, 中桐基晴: 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子PM2.5による大気汚染)―第6報―, 岡山県環境保健センター年報35, 1-7, 2011
- 3) 環境省: 環境大気常時監視マニュアル 第6版(平成22年3月)
- 4) 環境省: 大気中微小粒子状物質(PM2.5)測定方法暫定マニュアル改定版(平成19年7月)
- 5) 中桐未知代, 林 隆義, 野村 茂, 小川 登, 深見武史, 中桐基晴: 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子PM2.5による大気汚染)―第9報―, 岡山県環境保健センター年報36, 投稿中, 2012

【調査研究】

## 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9報 PM2.5中のレボグルコサン等の分析法と県内の存在状況—

The analysis method and the existence of PAHs and Levoglucosan in PM2.5

中桐未知代, 林 隆義, 野村 茂, 小川 登, 深見武史, 中桐基晴 (大気科)  
Michiyo Nakagiri, Takayoshi Hayashi, Shigeru Nomura, Noboru Ogawa,  
Takeshi Fukami and Motoharu Nakagiri (Department of Atmosphere)

### 要 旨

本県ではこれまでに浮遊粒子状物質及び微小粒子状物質について質量濃度, イオン成分, 無機元素成分, 炭素成分及び多環芳香族炭化水素の分析を行ってきた。平成23年度は, より詳細な微小粒子状物質の科学的知見を収集するため, それらに加えてレボグルコサン, ジカルボン酸類の分析を行い, 県内の挙動を調査した。レボグルコサンとジカルボン酸類の多環芳香族炭化水素類との同時分析は不可能であったが, GC/MSによる同時測定は可能であった。今回の調査では, レボグルコサンは初夏・初春に大陸からの影響, 夏季から初冬にかけて地域の産業活動からの影響を受けていると考えられた。

[キーワード: 粒子状物質, PM2.5, SPM, 多環芳香族炭化水素類 (PAHs), レボグルコサン]

[Key words: Particulate matter, PM2.5, SPM, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Levoglucosan]

### 1. はじめに

微小粒子状物質 (以下「PM2.5」という。) は人の健康影響が懸念されている粒径 $2.5\mu\text{m}$ 以下の微小粒子で, 平成21年9月に環境基準が定められた。本県では平成21年度からPM2.5の質量濃度を連続測定しているが, 環境基準を超過している状況が続いている。

PM2.5の削減対策を進めるためにはPM2.5及びその前駆物質の大気中の挙動等に関する知見や, 発生源の特定が必要不可欠であるが, その知見は十分でない。このため本県ではこれまでに, 質量濃度に加えイオン成分, 無機元素成分, 炭素成分 (一部) 及び多環芳香族炭化水素類 (以下「PAHs」という。) の成分分析を実施し報告した<sup>1,4)</sup>。

従来知見を踏まえ, より詳細なPM2.5の科学的知見を集積するため, 今回はGC/MSによる分析が可能な<sup>5)</sup>レボグルコサン及びジカルボン酸についてPAHsとの同時分析を検討し, 平成23年度に県内で採取した試料についてこれらの分析を実施し, 知見を得たので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 調査対象物質

調査対象物質を表1に示す。PAHsについては, 環境省が「大気中微小粒子状物質 (PM2.5) 測定方法暫定マニュアル<sup>6)</sup>」 (以下「暫定マニュアル」という。) に示す19物

質に7物質を加えた26物質を調査対象物質とし, 特定の発生源に関する情報を得られるレボグルコサンと, PAHsからの酸化分解による二次生成が主な生成過程であるジカルボン酸類7物質を調査対象物質とした。

#### 2.2 試薬

PAHsの標準物質は, 第7報<sup>4)</sup>に記載している試薬を用いた。レボグルコサンとジカルボン酸類の標準物質及び内部標準物質は全てSUPELCO社製を用いた。ジクロロメタン及びヘキサンは残留農薬・PCB試験用, シリル化試薬は和光純薬社製のN, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) +10%trimethylchlorosilane (TMCS), シリカゲルカートリッジはSUPELCO社製のLC-Si (1g/6mL) を用いた。

#### 2.3 調査地点及び試料採取方法

調査地点を図1に示す。バックグラウンドとして総社一般環境大気測定局 (以下「総社局」という。) を, 移動発生源として長津自動車排出ガス測定局 (以下「長津局」という。) を選定した。総社局周辺は住宅地で, 公園内に立地している。測定地点から約1km離れた周囲には住宅地を囲むように田園が広がっている。長津局は県内で最も交通量の多い国道2号線と瀬戸中央自動車道が交わる幹線道路

沿線に設置しているが、周辺には田園もある。

本調査では、平成23年5月から平成24年2月を6時期に分けて各4日間、23時間を採取単位時間としてPM2.5とSPMのマニュアル測定を行い、計96検体を得た(表2)。質量濃度、イオン成分、無機元素成分の詳細は第8報<sup>7)</sup>に記載している。採取した試料は24時間、20℃、湿度35%の条件でコンディショニング後、ウルトラマイクロ天秤で秤量し、-20℃で保存した。保存後のろ紙を常温に戻し、カットしたものを分析に供した。

## 2.4 装置及び測定条件

GC/MS分析は表3に示す測定条件により行った。保持時間及びモニターイオンは表1に示す。定量は内部標準法により行い、PAHsは調査対象物質のd体または保持時間が近い物質のd体をサロゲート内部標準物質とし、レボグルコサン及びジカルボン酸類はcis-ketopinic acidをサロゲート内部標準物質として用いた。

## 2.5 前処理操作

### 2.5-1 PAHsの前処理操作

褐色の共栓沈澱管にろ紙を小さく刻み入れ、サロゲート内部標準物質をろ紙に添加した。共栓沈澱管に2mLのジクロロメタンを加え、氷浴中で20分間超音波抽出した。抽出操作を2回繰り返し、合わせた抽出液を50mLのナス型フラスコに移した。抽出液に5~10mLのn-ヘキサンを加えロータリーエバポレーターで乾固直前まで濃縮した。n-ヘキサン添加と濃縮操作を2~3回繰り返し、最終的に1mL以下のn-ヘキサン溶液にした。10mLのn-ヘキサンでコンディショニングしたシリカゲルカートリッジにn-ヘキサン溶液を負荷し、10%ジクロロメタン/ヘキサン10mLで溶出させた。この時、負荷液も回収した。溶出液を窒素ガスで0.1mL以下まで濃縮した。これにシリンジスパイク用の内部標準物質(p-Terphenyl)を添加し、n-ヘキサンで0.2mLに定容し、GC/MS測定用試料とした。

表1 調査対象物質

物質名	略称	環数	保持時間(分)	定量イオン(m/z)	参照イオン(m/z)	内部標準物質(サロゲート)
Acenaphthylene	Acy	3	10.5	152	153	Ace-d <sub>10</sub>
Acenaphthene	Ace	3	10.8	153	154	Ace-d <sub>10</sub>
Fluorene	Fle	3	12.1	166	165	Ace-d <sub>10</sub>
Phenanthrene	Phe	3	15.5	178	176	Phe-d <sub>10</sub>
Anthracene	Ant	3	15.5	178	176	Phe-d <sub>10</sub>
Fluoranthene	Fla	4	19.4	202	200	Fla-d <sub>10</sub>
Pyrene	Pyr	4	20.4	202	200	Fla-d <sub>10</sub>
o-Terphenyl	o-T	3	16.9	230	229	Fla-d <sub>10</sub>
m-Terphenyl	m-T	3	20.3	230	229	Fla-d <sub>10</sub>
p-Terphenyl	p-T	3	20.9	230	229	Fla-d <sub>10</sub>
Benz[a]anthracene	BaA	4	24.4	228	226	BaA-d <sub>12</sub>
Chrysene	Chr	4	24.7	228	226	Chr-d <sub>12</sub>
Triphenylene	Tri	4	24.7	228	226	Chr-d <sub>12</sub>
Benzo[b]fluoranthene	BbF	5	28.0	252	253	BkF-d <sub>12</sub>
Benzo[k]fluoranthene	BkF	5	28.0	252	253	BkF-d <sub>12</sub>
Benzo[e]pyrene	BeP	5	29.0	252	253	BeP-d <sub>12</sub>
Benzo[a]pyrene	BaP	5	29.2	252	253	BeP-d <sub>12</sub>
Perylene	Per	5	29.6	252	253	BeP-d <sub>12</sub>
Dibenz[a,c]anthracene	DcA	5	32.1	278	276	IcP-d <sub>12</sub>
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	IcP	6	32.2	276	278	IcP-d <sub>12</sub>
Dibenz[a,h]anthracene	DhA	5	32.2	278	276	IcP-d <sub>12</sub>
Benzo[b]chrysene	BbC	5	32.5	278	276	BgP-d <sub>12</sub>
Picene	Pic	5	32.7	278	276	BgP-d <sub>12</sub>
Benzo[ghi]perylene	BgP	6	32.9	276	278	BgP-d <sub>12</sub>
Dibenzo[a,e]pyrene	DaP	6	35.6	302	304	Cor-d <sub>12</sub>
Coronene	Cor	7	35.6	300	301	Cor-d <sub>12</sub>
Levoglucosan			11.4	333	73	cis-keteopinic acid
Malonic acid			6.0	233	248	cis-keteopinic acid
Succinic acid			6.9	248	262	cis-keteopinic acid
Glutaric acid			7.8	261	262	cis-keteopinic acid
Adipic acid			9.0	275	217	cis-keteopinic acid
Pimelic acid			10.2	289	217	cis-keteopinic acid
Suberic acid			11.4	303	139	cis-keteopinic acid
Azelaic acid			12.7	217	273	cis-keteopinic acid



図1 調査地点

表2 試料採取期間

採取場所: 総社局, 長津局

時期	期間	検体数
初夏	H23/ 5/16 (月) - 5/20 (金)	4
夏季	H23/ 8/ 8 (月) - 8/12 (金)	4
秋季	H23/10/17 (月) -10/21 (金)	4
初冬	H23/11/28 (月) -12/ 2 (金)	4
冬季	H24/ 1/16 (月) - 1/20 (金)	4
初春	H24/ 2/20 (月) - 2/24 (金)	4
合計		24

総社局: 午前11時~翌日午前10時までの23時間捕集  
 長津局: 午前10時~翌日午前 9時までの23時間捕集

表3 GC/MSの測定条件

装置	: Agilent6890(GC), JMS-AMsun(MS)
使用カラム	: DB-17HT 30m × 0.320mm, 0.15 μ m (J&W)
キャリアーガス	: ヘリウム (1.8mL/min)
カラム温度	: 50°C (2min)-20°C/min-120°C (0min)-7°C/min-310°C (0min)-20°C/min-340°C (5min)
注入方法	: スプリットレス
注入口温度	: 280°C
注入量	: 1 μ L
インターフェース温度	: 250°C
イオン源温度	: 240°C
イオン化法	: EI法
イオン化電圧	: 70eV
イオン化電流	: 300 μ A
検出器電圧	: 700V
検出モード	: SIM

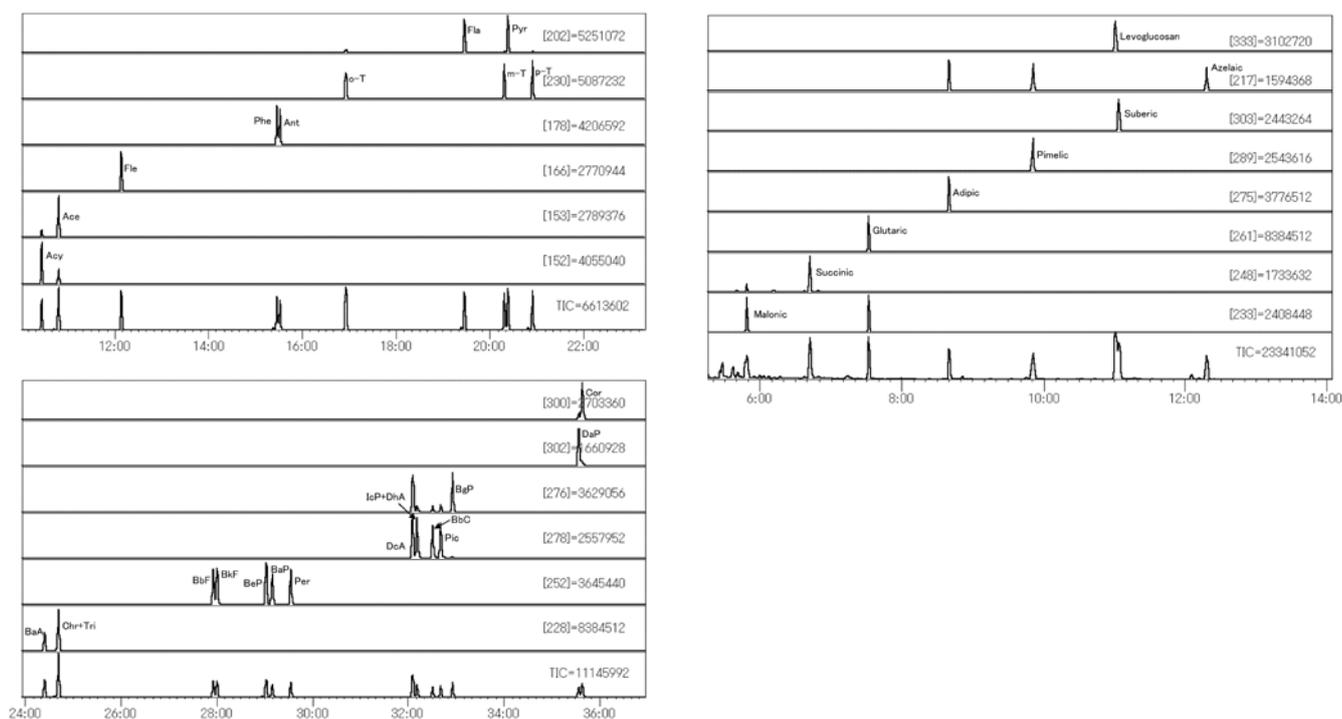


図2 標準物質のクロマトグラム

### 2.5-2 レボグルコサン及びジカルボン酸の前処理操作

PAHsと同様にジクロロメタン抽出までを行い、抽出液をリアクションバイアルに移しながら親水性テフロン製シリレンジフィルタでろ過した。抽出液を乾燥窒素気流下でほぼ乾固させ、ジクロロメタン/ヘキサン（1：1）混合液を50 $\mu$ L、シリル化試薬50 $\mu$ Lを添加し、テフロンテープを巻いて密封し、75 $^{\circ}$ Cの恒温器で2.5時間シリル化反応を行った。この反応液にシリレンジスパイク用の内部標準物質（p-Terphenyl）を添加し、n-ヘキサンで0.2mLに定容し、GC/MS測定用試料とした。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 分析法の検討結果及び考察

#### 3.1-1 GC/MS測定条件の検討結果

対象物質のGCカラムでの分離状況を図2に示す。本法では、Chrysene (Chr) とTriphenylene (Tri), Indeno [1, 2, 3-cd] pyrene (IcP) とDibenz [a, h] anthracene (DhA) のクロマトグラムの分離ができなかったため、それぞれ1物質として扱ったが、これら以外は全て相互に分離できた。

この結果から、PAHsとレボグルコサン及びジカルボン酸類は同じGCカラム、測定条件で同時測定が可能であることが判明した。

#### 3.1-2 同時分析法の検討

3.1-1の知見を踏まえ、これらの同時分析を検討した。同時分析により、前処理作業の簡略化だけでなく、試料ろ紙の使用量を倍にできるため感度を2倍に上げることができる。レボグルコサン及びジカルボン酸類は極性があるため、シリカゲルカートリッジでのクリーンアップはシリル化により極性を下げた後に行うべきと考え、抽出・ろ過後の試料をシリル化し、反応液をシリカゲルカートリッジに負荷した。溶離液は、0, 10, 20, 50, 100%ジクロロメタン/ヘキサン溶液について検討した。

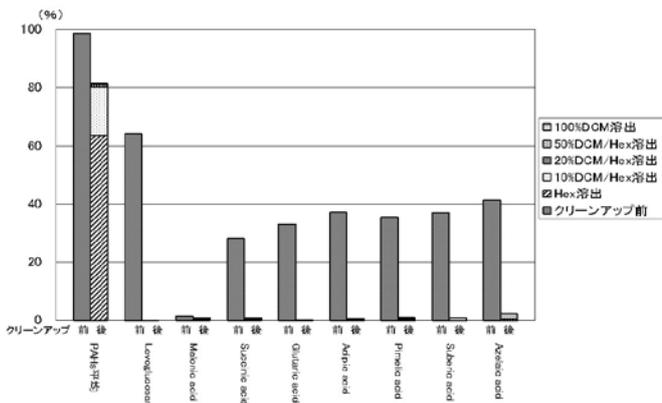


図3 前処理方法の検討結果

溶出試験結果はシリレンジスパイクを内部標準物質として回収率を求め、図3に示す。各物質2本ずつの棒グラフを示し、左側にシリカゲルカートリッジに負荷する前の回収率、右側に溶出液中の回収率を示した。PAHsについては、全物質の平均の回収率を示している。PAHsはヘキサンで約60%、10%ジクロロメタン/ヘキサンまでの溶離液で約80%の回収率があったが、レボグルコサン及びジカルボン酸類についてはほとんど溶出しなかった。溶離液をジクロロメタンからアセトンに変えて同様の溶出試験も行ったが、クリーンアップ効果が失われ、レボグルコサン、ジカルボン酸類ともに溶出しなかった。なお、PAHsはヘキサンで約60%の回収率があることから、負荷液も回収することにした。

これらの結果から、PAHsの分析とレボグルコサン及びジカルボン酸の同時分析は不可能と判断し、分析は別々に行った。

#### 3.1-3 検出下限値及び定量下限値

検出下限値及び定量下限値を表4に示す。検出下限値はPAHsで0.005~0.174ng/m<sup>3</sup>、レボグルコサンで0.127ng/m<sup>3</sup>、ジカルボン酸類で0.219~0.853ng/m<sup>3</sup>であり、定量下限値はPAHsで0.016~0.579ng/m<sup>3</sup>、レボグルコサンで0.423ng/m<sup>3</sup>、ジカルボン酸類で0.729~2.842ng/m<sup>3</sup>であった。

#### 3.1-4 添加回収試験結果

大気粒子中の他成分との相互作用等を考慮するため、ブランコ紙での添加回収（n=2）と環境大気捕集ろ紙での添加回収（n=2）を行った。結果を表4に示す。PAHsは87~100%の回収率、レボグルコサンは88%の回収率、ジカルボン酸類は7~100%の回収率があった。ジカルボン酸については、定量下限値が高く、回収率もあまり良くなかったため、分析法をさらに検討することとした。

#### 3.1-5 サロゲート内標準物質の回収率

サロゲート内標準物質の回収率を表4に示す。標準試料中のシリレンジスパイク内標準のサロゲート内標準に対する量の比とピーク強度を用いて相対感度係数（RRFss）を算出し、このRRFssと試料中のシリレンジスパイク内標準のピーク強度と内標準のピーク強度の比を用いてサロゲート内標準の回収率を求めた。PAHsは調査対象物質のd体、レボグルコサンはcis-ketopinic acidの回収率を示している。PAHsは60~100%の回収率があり、レボグルコサンは62%の回収率であった。

表4 測定結果

物質名	検出下限値 (ng/m <sup>3</sup> )	定量下限値 (ng/m <sup>3</sup> )	添加回収試験 (%)	サロゲート回収率 (%)	インパクターオイル試験結果 ng/10 $\mu$ Lオイル
Acy	0.021	0.069	100	—	0.549
Ace	0.171	0.571	95	60	0.306
Fle	0.174	0.579	100	—	0.560
Phe	0.086	0.285	92	77	1.752
Ant	0.018	0.059	100	—	0.039
Fla	0.056	0.187	89	100	0.188
Pyr	0.044	0.147	88	—	0.236
o-T	0.007	0.025	87	—	0.128
m-T	0.017	0.055	100	—	0.060
p-T	0.005	0.018	100	—	0.379
BaA	0.009	0.032	90	100	0.040
Chr+Tri	0.005	0.016	89	100	0.035
BbF	0.008	0.027	100	—	×
BkF	0.005	0.017	94	100	×
BeP	0.012	0.039	92	100	×
BaP	0.010	0.033	99	—	×
Per	0.023	0.076	100	—	×
DcA	0.010	0.034	97	—	ND
IcP+DhA	0.009	0.029	100	100	0.014
BbC	0.009	0.031	100	—	0.053
Pic	0.010	0.033	100	—	0.027
BgP	0.006	0.020	91	100	0.013
DaP	0.034	0.113	100	—	ND
Cor	0.008	0.027	100	—	ND
Levogluconan	0.127	0.423	88	62	ND
Malonic acid	0.294	0.979	7	—	ND
Succinic acid	0.853	2.842	49	—	ND
Glutaric acid	0.295	0.984	72	—	ND
Adipic acid	0.617	2.057	66	—	ND
Pimelic acid	0.219	0.729	83	—	ND
Suberic acid	0.416	1.387	92	—	ND
Azelaic acid	0.758	2.527	100	—	ND

×:妨害ピークにより分析が困難な物質

### 3.1-6 オイルインパクターの影響評価

PM2.5サンプラーは分粒部分にインパクター方式を採用した装置を使用している。インパクター部分には、粗大粒子の再飛散を防止するため、オイルを浸透させたフィルターを装着している。このインパクターオイルの影響を評価するため、ブランクろ紙に直接インパクターオイルを10  $\mu$ L添加したものをサンプルと同様に分析した。この結果を表4に示す。表中の×印は、妨害ピークにより分析が困難な物質である。PAHsでは多少影響があったが、レボグルコサンとジカルボン酸類では影響はなかった。実際の試料で、妨害ピークにより分析困難となる物質はなく、通常の採取で影響がでる程のインパクターオイルが付着することないと考えられるが、平成24年度以降のサンプリングにはインパクターオイルを含浸させたフィルターを使用せず試料捕集を行うとともに、再飛散を防止するためインパクター部分の清掃を徹底することとした。

## 3.2 測定結果及び考察

### 3.2-1 PM2.5及びSPM中の対象物質濃度

PM2.5とSPM中のPAHsの結果を図4に示す。上段は絶

対量のグラフ、下段は全量を100としたときの各々の物質の割合を示す。総社局及び長津局いずれも平均的にBenzo

(b) fluorantheneが最も多く、次いでFluoranthene, Benzo (a) pyreneが多かった。また、PAHsの絶対量が変化しても各々の物質の相対的な割合はほぼ同じであることから、3環以上のPAHsでは生成過程や大気中での挙動が似ていると考えられる。PM2.5とSPMに含まれるPAHsの総量は2測定局ともほぼ同じであったが、総社局は初夏と初春に多く、長津は夏季と初冬が多かった。

PM2.5質量濃度との相関を図5に示す。弱い正の相関が見られたが、含有量が微量であることから、PM2.5質量濃度にはあまり寄与していないと考えられる。

PM2.5とSPM中のレボグルコサン濃度の経日変化を図6に示す。秋季から冬季にかけて、レボグルコサンの濃度が高く、PM2.5の質量濃度と同じ挙動を示している。レボグルコサンはバイオマス燃焼指標物質であり、特にボイラー(木くず)、野焼き、喫煙所、地下街において顕著に検出されることが知られている<sup>8)</sup>。秋季から冬季にかけてのみ高濃度となり、PM2.5の質量濃度と同じ挙動を示している。このことから、この季節でのPM2.5の質量濃度には周

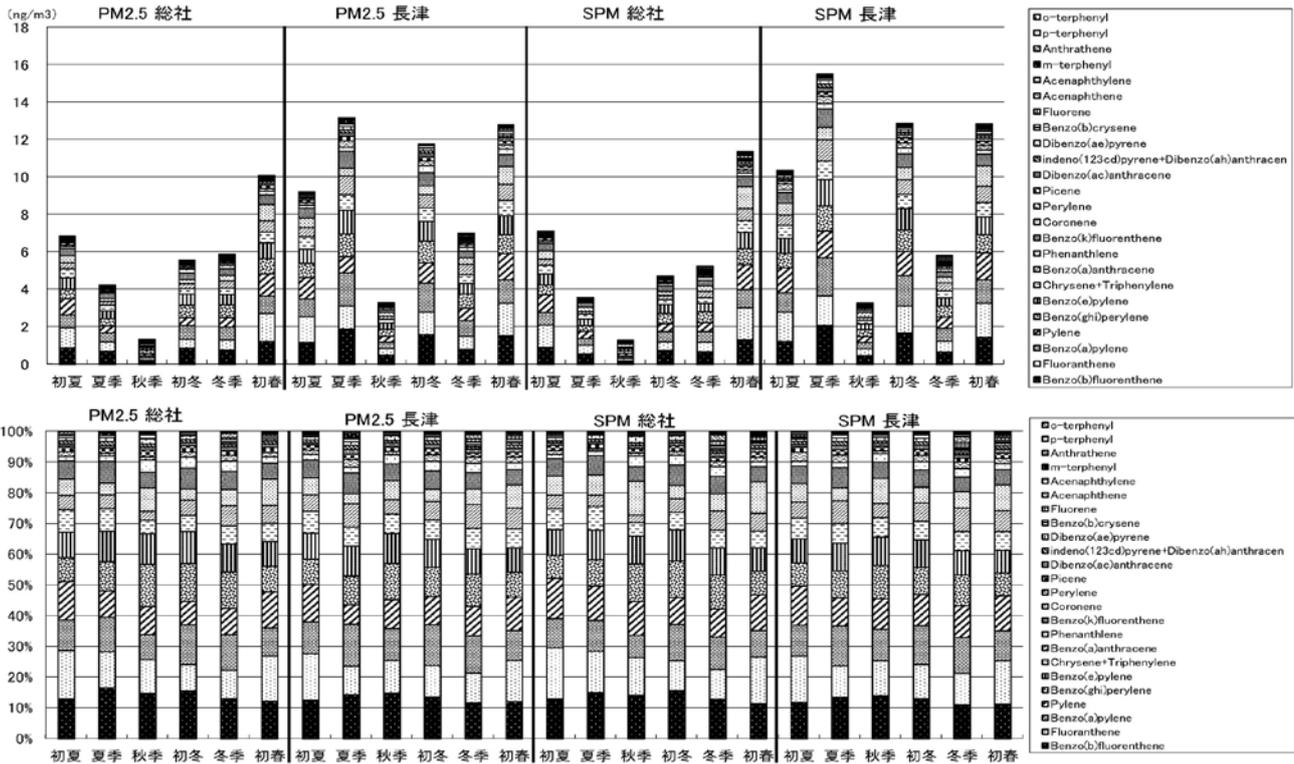


図4 PM2.5及びSPM中のPAHs濃度

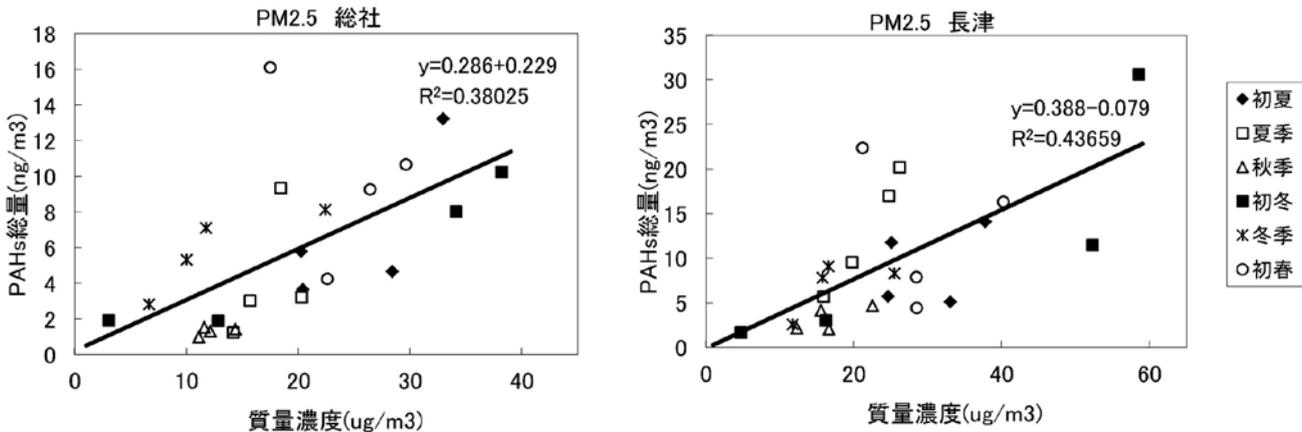


図5 PM2.5質量濃度とPAHs総量の相関関係

辺地域において秋季から冬季に実施されるワラ焼き作業などの野焼きが大きく寄与していると考えられる。

### 3.2-2 HYSPLIT Modelを用いた後方流跡線解析

総社局と長津局のレボグルコサン及び今回対象とした全てのPAHsが似た挙動を示したことから、測定地点近隣の局所的な発生源の影響だけでなく、他地点からの移流影響などの広域的な影響が各成分に影響していることが考えられる。このため、採取期間中の後方流跡線結果 (NOAA HYSPLIT Model) から広域的な影響について検討した。採取期間中の高濃度出現時の後方流跡線を図7に示す。

初夏と初春の調査期間中、移動性高気圧が西から東に通

過しており、これによって図7に示すように中国大陸を経由する気塊が測定地点に流れていた。このことから初春から初夏にかけてのPAHsの高濃度発現には大陸からの移流の影響を受けている可能性も示唆された。

夏季の調査期間中は広く高気圧に覆われており、南側からの移流が認められた。長津局のみでPAHsの高濃度が見られたことも踏まえると、これは局所的な汚染と考えられる。秋季は、レボグルコサンが低濃度であったこと、採取期間中に南西からの風が卓越していたことから、移動発生源や水島工業地帯等の固定発生源の影響を受けているのではないかと考えられる。

一方、初冬は日本付近を漂った気塊が測定地点に流れ

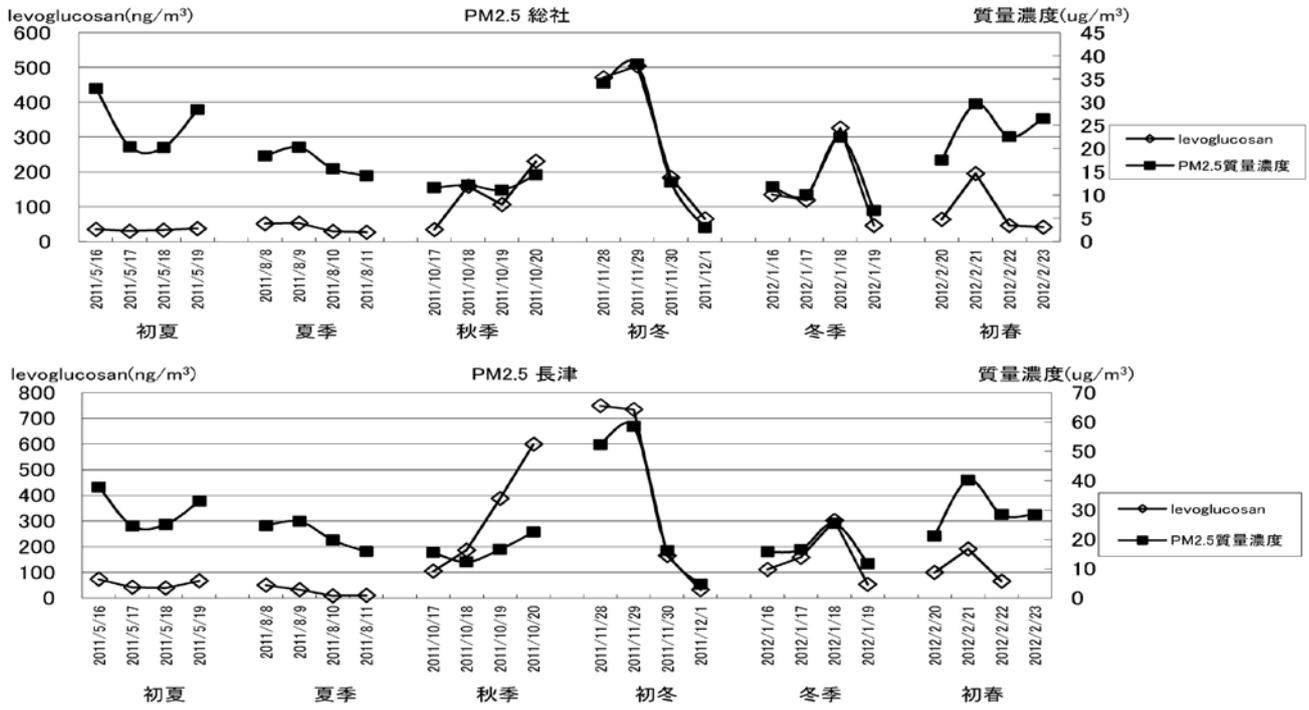


図6 レボグルコサン濃度の経日変化

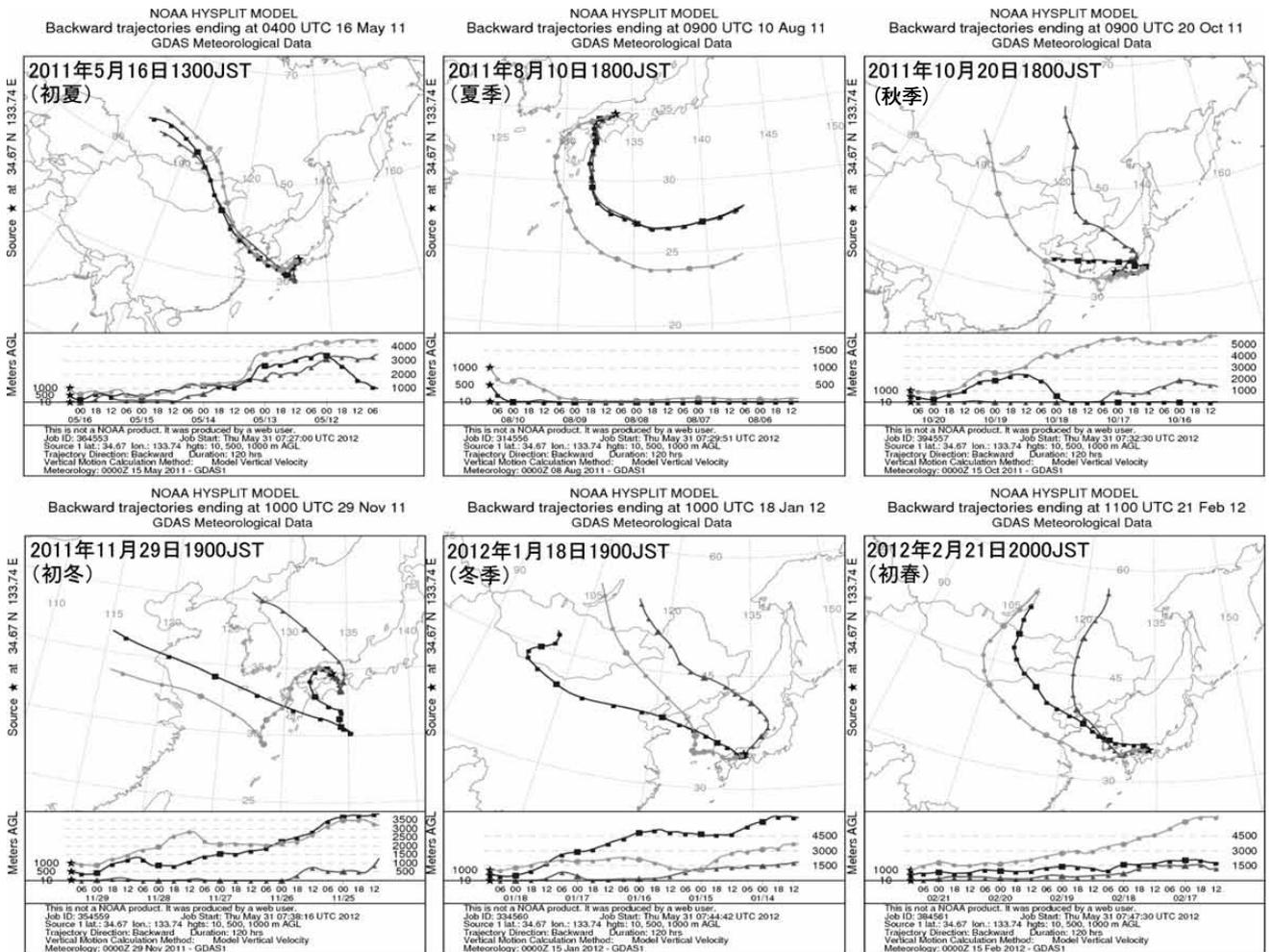


図7 採取期間中の後方流跡線 (NOAA) 結果

ていたこと、及びレボグルコサンが高濃度であったことから、周辺地域で季節的に盛んなワラ焼きによる局所的な影響を大きく受けていると考えられた。

#### 4. まとめ

総社局及び長津局で延べ24日間PM2.5及びSPMを捕集し、PAHs、レボグルコサン及びジカルボン酸の分析法の検討、測定を行ったところ次に示す結果を得た。

- 1) レボグルコサン及びジカルボン酸類とPAHsはGC/MSにより同時測定が可能であることが判明した。
- 2) PAHsとレボグルコサン、ジカルボン酸類の同時分析を試みたが、シリル化の後のクリーンアップでレボグルコサンとジカルボン酸を回収することができなかつたため、同時分析は不可能であった。
- 3) 検出下限値及び添加回収試験の結果から、PAHsとレボグルコサンについては分析可能であったが、ジカルボン酸類については、検出下限値が高く、回収率が悪いものもあり、測定が困難だったことから今後さらなる検討が必要である。
- 4) 分粒装置のインパクターオイルは実際の測定には影響がほとんどないと考えられた。
- 5) PM2.5及びSPM中のPAHsとレボグルコサンの測定結果から、初夏と初春には大陸からの影響も受けている可能性が示唆されたが、夏季や初冬には地域の環境から局所的な影響を受けていると考えられた。
- 6) PM2.5削減対策を進めるためには、より詳細な発生源情報や大気中での挙動等の知見が必要であることから、レセプターモデル等での解析も必要となる。

#### 参考文献

- 1) 杉山広和, 石井尚志, 野村茂, 門田実, 前田泉: 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), 岡山県環境保健センター年報33, 1-5, 2009
- 2) 石井尚志, 野村茂, 中桐未知代, 山辺真一: 環境中の大気汚染物質に関する研究 (微小粒PM2.5による大気汚染), 岡山県環境保健センター年報34, 7-10, 2010
- 3) 林隆義, 中桐未知代, 野村茂, 小川登, 片岡敏夫, 中桐基晴: 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), 岡山県環境保健センター年報35, 1-7, 2011
- 4) 中桐未知代, 吉岡敏行, 林隆義, 野村茂, 中桐基晴: 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), 岡山県環境保健センター年報35, 9-18, 2011

5) Kimiyo Kumagai (2010) : Determination of Dicarboxylic Acid and Levoglucosan in Fine Particles in the Kanto Plain, Japan, for Source Apportionment of Organic Aerosols, Aerosol and Air Quality Research, 10 : 282-291

6) 環境省: 大気中微小粒子状物質 (PM2.5) 測定方法暫定マニュアル 改定版 平成19年7月

<http://www.env.go.jp/air/report/h19-03/index.html>

7) 林隆義, 中桐未知代, 野村茂, 小川登, 深見武史, 中桐基晴: 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), 岡山県環境保健センター年報36, 2012

8) 東京都: PM2.5等のレボグルコサン分析に関する研究, [http://www.kankyo.metro.tokyo.jp/air/05\\_levo.pdf](http://www.kankyo.metro.tokyo.jp/air/05_levo.pdf)

【資 料】

光化学オキシダント情報・注意報の  
発令と気象測定局の風向の関係について

Relationship between Annouement of Photochemical Oxidant Prediction or Warning and Wind Direction of Weather Observation Station in Okayama Prefecture.

小川 登, 深見武史, 林 隆義, 野村 茂, 中桐未知代, 中桐基晴 (大気科)  
Noboru Ogawa, Takeshi Fukami, Takayoshi Hayashi, Shigeru Nomura,  
Michiyo Nakagiri, Motoharu Nakagiri (Department of Atmosphere)

要 旨

2006年度から2011年度における本県南部の光化学オキシダント情報・注意報の発令状況と気象測定局の風向を調査し、県南部の発令日の発令地域パターンに関連性があるかどうかを検討した。光化学オキシダント情報・注意報は複数の発令地域に対して発令されることが多いことから、県中央部、東部、及び西部などの発令地域パターンに分けた場合、各発令地域パターンにおける高倉山測定局の13時から15時までの風向頻度にはそれぞれ特徴が認められ、特に南西の風が「東部」で44.5%、「中央部+東部」で21.2%と風向頻度の1位であること、南東の風が「西部」で41.7%、「中央部+西部」で20.0%と風向頻度の1位であることは、発令地域パターンを予想する指標の一つとなると考えられた。

[キーワード：光化学オキシダント，風向，高層気象]

[Key words : photochemical oxidant, wind direction, upper air]

1 はじめに

高倉山測定局は表1に示すとおり、県南部の赤磐市の高倉山山頂（標高460m）に岡山市が設置した気象測定局であり、県の測定局で唯一高層の気象データを観測している。

本県では光化学オキシダント濃度が0.1ppm以上となり継続することが予想される場合に情報を、0.12ppm以上となり継続することが予想される場合に注意報を発令している<sup>1)</sup>。発令状況については例年倉敷市の発令回数が最も多いが、年度により県南西部や南東部の市町村に発令地域が偏ることもあることから、県南部の光化学オキシダント情報・注意報の発令状況に着目して、高倉山測定局の風向との関連性を検討した。

表1 高倉山測定局の属性情報

測定局名称	高倉山
市町村	赤磐市
局区分	気象・立体局
住所	赤磐市西中字西山1636-310
建物名称	高倉山山頂ライオンズの森 地上の独立局
緯度	北緯34度45分5秒
経度	東経133度58分17秒
標高	460m
設置年月日	1983年11月
用途地域	その他
管理自治体	岡山市

2 解析方法

2.1 対象期間・項目

対象期間は、2006年度から2011年度までの6年間とし、項目については風向1時間値データを対象とした。

2.2 対象日・時刻

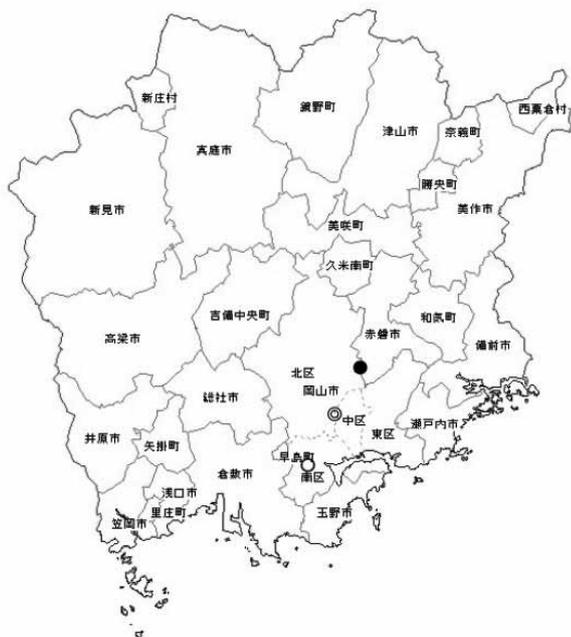
光化学オキシダント情報・注意報の発令日<sup>2)~7)</sup>を対象とし、発令日の発令頻度の高い13時から15時までの高倉山測定局の風向との関連性を検討した。

2.3 対象とした発令地域（市町村）と発令地域分類

本県では発令地域を市町村の区域としている<sup>7)</sup>。2009年度から全県を発令地域としているが、今回2006年度から2011年度までを対象期間としたことから、県南部の発令地域を解析の対象とした。本県地図（市区町村界あり）は図1に示したとおりであり、高倉山、岡山県庁及び環境保健センターの位置を参考のため地図上に示した。解析にあたり、表2に示したとおり県南部の発令地域を大きく中央部・東部・西部の3つに分類した。

表2 発令地域分類と市町村の関係

発令地域分類	市町村				
中央部	岡山市	倉敷市	玉野市	早島町	総社市
東部	備前市	赤磐市	瀬戸内市	和気町	
西部	浅口市	笠岡市	井原市	里庄町	矢掛町



●：高倉山測定局 ◎岡山県庁 ○環境保健センター  
図1 岡山県の地図（市区町村境界あり）

## 2.4 発令地域パターン

光化学オキシダント情報・注意報は複数の発令地域に対して発令されることが多いことから、発令地域パターンを表3に示したとおり、「中央部」、「中央部+東部」、「中央部+西部」、「東部」、「西部」、「東部+西部」、「全域」の7パターンに分けて高倉山測定局の風向との関連性を検討した。

例えば、倉敷市と岡山市に発令された場合の発令地域パターンは「中央部」、岡山市と備前市に発令された場合は「中央部+東部」、倉敷市と笠岡市に発令された場合は「中央部+西部」、備前市と赤磐市に発令された場合は「東部」、笠岡市と浅口市に発令された場合は「西部」、備前市と井原市に発令された場合は「東部+西部」、倉敷市・岡山市・備前市・笠岡市に発令された場合は「全域」とした。

表3 県内の発令地域パターン

中央部
中央部+東部
中央部+西部
東部
西部
東部+西部
全域

## 3 結果及び考察

### 3.1 年度別の発令地域パターン割合

表4 年度別の発令地域パターン割合

発令地域パターン	2006	2007	2008	2009	2010	2011	計	割合(%)
中央部	13	9	19	10	8	2	61	54.4
中央部+東部	4	1	1	1	4		11	9.8
中央部+西部	1	4	2	6	5	2	20	17.9
東部		1			7	1	9	8.0
西部				1	1	2	4	3.6
東部+西部					1		1	0.9
全域			1	2	3		6	5.4
計	18	15	23	20	29	7	112	100.0

表4に年度別の発令地域パターン割合を示した。6年間の合計では最も多いのは「中央部」で54.4%、2番目に多いのは「中央部+西部」で17.9%、3番目に多いのは「中央部+東部」9.8%、以下「東部」8.0%、「全域」5.4%、「西部」3.6%、「東部+西部」0.9%の順であった。年度別に見ると2006年度は「中央部」と「中央部+東部」の割合が多く、2007年度と2009年度は「中央部」と「中央部+西部」の割合が多い。2008年度は「中央部」の割合が多く、2010年度と2011年度はパターンの偏りが少ないなど、年度によって発令地域パターンにばらつきがみられた。

### 3.2 発令地域パターン別の高倉山測定局の風向頻度

表5に発令地域パターン別の高倉山測定局の13時から15時までの風向頻度を示した。また、それを円グラフに示したのが図2である。

「中央部」ではSSWとSWがそれぞれ14.8%と最も多く、ついでSSEが13.7%、Sが13.1%、WSWが8.2%、ESEが7.1%、SEとWがそれぞれ5.5%などとなっていた。南よりの風（風向にSの入っているもの）の頻度の合計は77.2%であった。

「中央部+東部」では、SWが21.2%、SSWとWSWがそれぞれ18.2%などとなっており、南寄りの風の頻度の合計は72.8%、西よりの風（風向にWの入っているもの）の頻度の合計は72.7%であった。

「中央部+西部」では、SWが20.0%、SSWが13.3%、SとSSEがそれぞれ11.7%などとなっており、南よりの風の頻度の合計は85.0%、東よりの風（風向にEの入っているもの）の頻度の合計は46.7%であった。

「東部」ではSWが44.5%と最も多く、SSWが18.5%、SとWSWがそれぞれ14.8%などとなっており、南よりの風の頻度の合計は100%、西よりの風の頻度の合計は77.8%であった。

「西部」ではSEが41.7%と最も多く、ESE、E、ENEがそれぞれ16.7%、SSEが8.2%となっており、東よりの風の頻度の合計は100%、南よりの風の頻度の合計は66.6%であった。

「東部+西部」は2010年度に1事例しかなく、風向頻度の解析の対象としなかった。

「全域」ではSとSWがそれぞれ22.2%、SSEとESEが

表5 発令地域パターン別の高倉山測定局の風向頻度（13時から15時まで）

「中央部」		「中央部+東部」		「中央部+西部」	
風向	頻度(%)	風向	頻度(%)	風向	頻度(%)
SSW	14.8	SW	21.2	SE	20.0
SW	14.8	SSW	18.2	SSW	13.3
SSE	13.7	WSW	18.2	S	11.7
S	13.1	SSE	9.1	SSE	11.7
WSW	8.2	SE	6.1	WSW	10.0
ESE	7.1	W	6.1	ESE	8.3
SE	5.5	WNW	3.0	SW	8.3
W	5.5	NW	3.0	NE	3.3
WNW	3.8	NNW	3.0	W	1.7
N	2.2	Calm	12.1	WNW	1.7
NW	2.2			SE	1.7
E	1.1			NNE	1.7
NNE	1.1			Calm	6.6
NNW	0.5				
ENE	0.5				
NE	0.5				
Calm	5.4				

Calm: 静穏

「東部」		「西部」		「全域」	
風向	頻度(%)	風向	頻度(%)	風向	頻度(%)
SW	44.5	SE	41.7	S	22.2
SSW	18.5	ESE	16.7	SW	22.2
S	14.8	E	16.7	SSE	16.7
WSW	14.8	ENE	16.7	ESE	16.7
SSE	7.4	SSE	8.2	SSW	11.1
				SE	5.6
				E	5.5

それぞれ16.7%，SSWが11.1%などとなっており，南よりの風の頻度の合計は94.5%，東よりの風の頻度の合計は44.5%，西寄りの風の頻度の合計は33.3%であった。

「中央部」，「中央部+東部」，「中央部+西部」，「東部」，「西部」，「全域」ともに南よりの風の頻度の合計はほぼ70%以上となっており，海風の吹く日に発令が多く，県南の工業地域の影響が示唆された。

「東部」と「中央部+東部」では南寄りの風の頻度に加えて西よりの風の頻度が高いこと，「西部」と「中央部+西部」では南寄りの風の頻度に加えて東よりの風の頻度が高いことから発令地域と風向との間に関連性があることが示唆された。

すなわち「東部」でSWが44.5%，「西部」でSEが41.7%と非常に高い割合を占めることが特徴であった。また，「中央部+東部」でもSWが21.2%と1位であること，「中央部+西部」でもSEが20.0%と1位であることなどから，ともに県南中央部からの風向時に発令頻度の高いことが示唆され，高倉山測定局の風向は発令地域パターンを予想する指標の一つとなる可能性があると考えられた。

#### 4 まとめ

2006年度から2011年度までの県南部の光化学オキシダント情報・注意報の発令状況と風向について解析し，県南部の発令日の発令地域パターンと高倉山測定局の風向に関連性があるかどうかを検討した。

- 1) 発令地域パターンの割合でみると6年間の合計では「中央部」が最も多く54.4%，2番目に多いのは「中央部+西部」で17.9%，3番目に多いのは「中央部+東部」9.8%であったが，年度によりばらつきがみられた。
- 2) 各発令地域パターンにおける高倉山測定局の13時から15時までの風向頻度にはそれぞれ特徴が認められた。
- 3) 特に「中央部+東部」ではSW，「中央部+西部」ではSEの時に発令回数が多いことから，県南中央部からの風向時に発令頻度が高いことが示唆された。
- 4) 高倉山測定局の風向は県内の発令地域パターンを予想する指標の一つとなると考えられた。

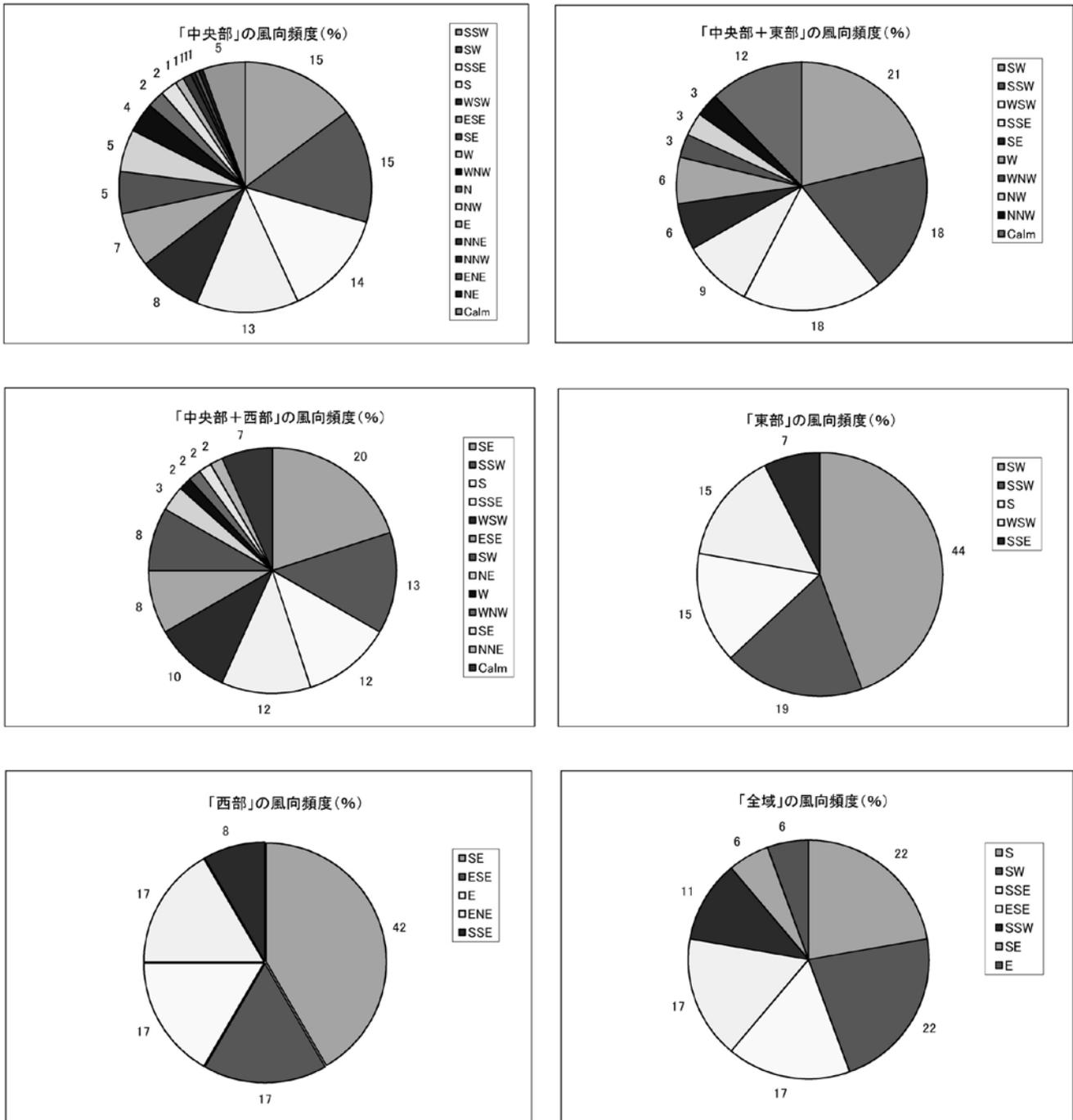


図2 発令地域パターン別の高倉山測定局の風向頻度グラフ

最後に高倉山測定局の風向データの利用についてご協力いただいた岡山市環境情報センターに感謝いたします。

## 文 献

- 1) 岡山県大気汚染緊急時対策実施要綱  
[http://www.pref.okayama.jp/uploaded/life/113258\\_362707\\_misc.pdf](http://www.pref.okayama.jp/uploaded/life/113258_362707_misc.pdf)
- 2) 平成18年度岡山県環境保健センター業務概要報告書, P21-22, 2007
- 3) 平成19年度岡山県環境保健センター業務概要報告書, P20-21, 2008
- 4) 平成20年度岡山県環境保健センター業務概要報告書, P20-21, 2009
- 5) 平成21年度岡山県環境保健センター業務概要報告書, P20-21, 2010
- 6) 平成22年度岡山県環境保健センター業務概要報告書, P28-30, 2011
- 7) 平成23年度岡山県環境保健センター業務概要報告書, P27-28, 2012

【資 料】

## 2011年度における酸性雨調査 Acid Rain in Okayama Prefecture in 2011

深見武史, 小川 登, 林 隆義, 野村 茂, 中桐未知代, 中桐基晴 (大気科)  
Takeshi Fukami, Noboru Ogawa, Takayoshi Hayashi, Shigeru Nomura,  
Michiyo Nakagiri, Motoharu Nakagiri (Department of Atmosphere)

### 要 旨

2011年度に美作県民局及び備中県民局井笠地域事務所の2地点に常時開放型のろ過式バルクサンプラーを設置し、約2週間ごとに全量捕集し、pH、EC、イオン濃度を測定した。

pHの年平均値は、美作県民局が4.83、備中県民局井笠地域事務所が5.27であり、また、pHの最頻値、pHの出現範囲の値とも備中県民局井笠地域事務所の方が高い値となった。

イオン濃度の年平均値については、陽イオンは、美作県民局で $\text{NH}_4^+$ が23%、備中県民局井笠地域事務所で $\text{nss-Ca}^{2+}$ が31%を占め、最も高かった。備中県民局井笠地域事務所の方が美作県民局よりpHが高いのは、中和作用がある $\text{nss-Ca}^{2+}$ が高いことに起因していると考えられる。

また、受け器とサンプリングチューブの交換を一切しない系を8月後半から備中県民局井笠地域事務所に設置し、今年度調査用の系と測定結果を比較することで影響を及ぼすのか確認したが、測定結果に大きな差異は確認されなかった。

[キーワード：酸性雨, 湿性沈着, バルク式捕集]

[Key words : acid rain, wet deposition, bulk sampling]

## 1 はじめに

我が国では1970年代に関東地方に酸性度の強い雨が降り、多くの人の目に痛みなどの健康被害や農作物への被害が発生した。それを受けて関東では酸性雨調査に取り組み、その後、多くの自治体で酸性雨調査研究が行われてきた。

本県においては、降水の酸性化の実態を把握することを目的として、1990年度から湿性沈着に関する調査を継続して実施している。

本報では、2011年度の調査結果について報告する。

## 2 調査方法

### 2.1 調査地点

津山盆地の中央で商業地域に位置する美作県民局（以下「美作局」という。）の屋上5階（津山市山下53）と、広島県との県境付近で商業地域に位置する備中県民局井笠地域事務所（以下「井笠事務所」という。）の屋上3階（笠岡市六番町2-5）に常時開放型のろ過式バルクサンプラー（非冷蔵保存）を設置した。

### 2.2 試料採取と分析方法

上記2地点に常時開放型のろ過式バルクサンプラー（非

冷蔵保存）を設置した。

平成23年4月から平成24年3月までの期間に捕集された降水（降雪を含む）を約2週間ごとに全量捕集し、pH及び電気伝導率（以下、EC）測定用試料とした。また、メンブレンフィルター（ $0.45\mu\text{m}$ ）でろ過したものをイオン濃度測定用試料とした。分析項目はpH、EC、イオン濃度（ $\text{Na}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ ）を測定した。

分析方法は、湿性沈着モニタリング手引き書（第2版）<sup>1)</sup>に準拠し、pHはイオン電極法、ECは電気伝導率計法、イオン濃度はイオンクロマトグラフ法を用いた。

なお、各分析項目の平均値は降水量で重み付けした加重平均値として算出した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 降水量

検体数は、美作局で22検体、井笠事務所で21検体であった。各月の降水量の平均値である月別降水量を図1に示す。

なお、9月に降水量が多くなっているが、これは台風12号による影響で、大雨が降ったことに起因していると考えられる。

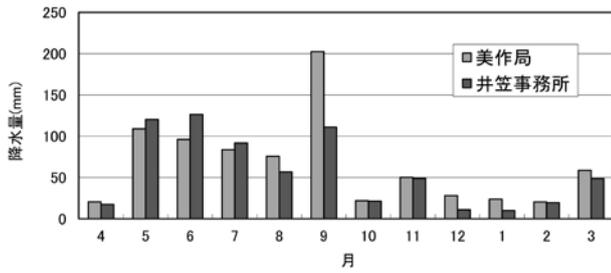


図1 月別降水量

### 3.2 pH

pH頻度分布図を図2に示す。pHの年平均値は、美作局が4.83、井笠事務所が5.27であり、最頻値は美作局が4.5~5.0、井笠事務所が5.5~6.0で、出現範囲は美作局が4.0~6.5、井笠事務所が4.5~7.0で、最頻値、出現範囲の値ともに井笠事務所の方が高い値となった。

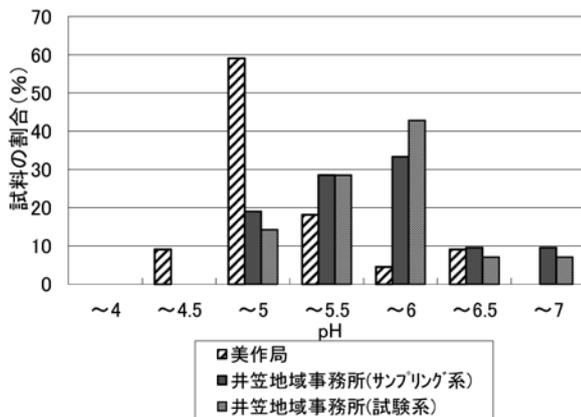


図2 pHの頻度分布図

### 3.3 イオン濃度

SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>及びCa<sup>2+</sup>は海塩由来のものと非海塩由来のものが存在する。これらの違いを区別するために、降水中のNa<sup>+</sup>をすべて海塩由来のものと仮定して、海塩中のそれぞれのイオンの存在割合<sup>2)</sup>から算出した海塩由来成分を差し引いた非海塩由来成分をnss (non-sea-salt) と表示した。表1に各測定地点のイオン濃度の年平均値を、図3には各測定地点のイオンごとの平均値の濃度組成割合を示す。

陽イオンは、美作局でNH<sub>4</sub><sup>+</sup>が29% (21.2 μeq/L)、井笠事務所でnss-Ca<sup>2+</sup>が46% (41.6 μeq/L)を占め、最も高かった。陰イオンは美作局ではnss-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>が40% (23.1 μeq/L)、井笠局ではnss-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>が52% (37.9 μeq/L)を占め、最も高かった。前述のとおり井笠事務所のpHが高い原因としては、中和作用があるnss-Ca<sup>2+</sup>が高いことに起因し

表1 イオン濃度の年平均値

	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	nss-Ca <sup>2+</sup>	ss-Ca <sup>2+</sup>	H <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nss-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	ss-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
美作局	15.1	21.2	2.0	4.5	16.0	0.7	14.9	16.9	15.7	23.1	1.8
井笠事務所(サンプリング系)	12.1	20.2	1.4	8.8	41.6	0.5	5.3	15.0	19.2	37.9	1.5
井笠事務所(試験系) <sup>※</sup>	15.8	16.8	1.3	10.1	47.6	0.7	5.4	18.3	23.3	37.4	1.9

※ただし井笠事務所(試験系)は、8月後期から3月後期までの加重平均を示す

ている。nss-Ca<sup>2+</sup>は土壌粒子や道路粉じん等に多く含まれているが、発生源の特定については今回の調査では検討できなかったため、今後の課題とする。

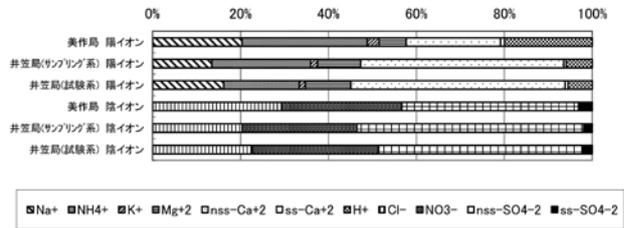


図3 イオン濃度の年平均濃度組成割合

### 3.4 試料採取装置の劣化について

試料採取装置は定期的に器具を交換しているものの、長期間屋外へ設置しているため、サンプリングチューブ内に藻が繁殖したり、風により地表から舞い上げられた粉じん等が受け器に付着することなどにより、測定結果に影響を及ぼすおそれがある。

今回、試料採取器具類のうち、受け器とサンプリングチューブを一切交換しない系を「試験系」として、8月後半から井笠事務所に設置した。そして、試験系についても同様に分析を実施し、測定結果を比較することで、その影響について確認した。

8月後期から3月後期までの年間降水量、pH、EC及び各イオン濃度の年平均値比較を表2に示す。

測定結果年平均値を比較したところ、あまり大きな差異は確認されなかった。また、測定結果は示さないが、月ごとの測定結果も大きな差異は確認されなかった。

今回の調査は年度途中の8月から実施したため、日射が強い時期をあまりカバーしきれなかったことや、今年度は

表2 年平均値比較

項目	試験系	H23年度調査系
降水量	611.1	587.3
pH	5.27	5.04
EC	1.22	1.20
Na <sup>+</sup>	15.8	15.5
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	16.8	15.6
K <sup>+</sup>	1.3	1.4
Mg <sup>2+</sup>	5.1	4.4
Ca <sup>2+</sup>	24.2	20.6
Cl <sup>-</sup>	18.3	17.0
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	23.3	20.0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	19.6	19.4

大気が不安定な日が多かったこと等から、藻が繁殖しづらい環境にあり、測定結果に影響があまりでなかったことも考えられる。

#### 4 まとめ

2011年度に美作局及び井笠事務所の2地点において、常時開放型のろ過式バルクサンプラーを設置し、約2週間ごとに全量捕集し、pH、EC、イオン濃度を測定した。

- 1) pHの年平均値は、美作局が4.83、井笠事務所が5.27であり、また、pHの最頻値、pHの出現範囲の値ともに井笠事務所の方が高い値となった。
- 2) イオン濃度の年平均値については、陽イオンは、美作局で $\text{NH}_4^+$ が29%、井笠事務所で $\text{nss-Ca}^{2+}$ が46%を占め、最も高かった。陰イオンは美作局では $\text{nss-SO}_4^{2-}$ が40%、井笠事務所では $\text{nss-SO}_4^{2-}$ が52%を占め、最も高かった。
- 3) 井笠事務所の方が美作局よりpHが高い要因としては、中和作用がある $\text{nss-Ca}^{2+}$ が高いことに起因していると考えられるが、今後、原因も含め調査する。
- 4) 受け器とサンプリングチューブの交換を一切しない系を8月後半から井笠事務所に設置し、今年度調査用の系と測定結果を比較することで影響を及ぼすのか確認したが、測定結果に大きな差異は確認されなかった。
- 5) 今回の調査は年度途中の8月から実施したため、日射が強い時期をあまりカバーしきれなかったこと等から藻が繁殖しづらい環境にあり、測定結果に影響があまりでなかったことも考えられる。

#### 文 献

- 1) 湿性沈着モニタリング手引き書（第2版）、2000  
[http://www.env.go.jp/air/acidrain/man/wet\\_deposi/index.html](http://www.env.go.jp/air/acidrain/man/wet_deposi/index.html)
- 2) 日本海洋学会：海洋観測指針、145、1990



【調査研究】

# 児島湖流域の水質シミュレーション計算

Simulation Calculation of Water Quality of Lake Kojima Catchment

藤田和男, 難波 勉, 難波あゆみ, 鷹野 洋, 板谷 勉 (水質科)  
Kazuo Fujita, Tsutomu Nanba, Ayumi Nanba, Hiroshi Takano,  
Tsutomu Itadani (Department of Water)

## 要 旨

児島湖流域を8ブロックに分け、CODと窒素・リンについて、最近の5年間(2007~2011年度)の測定結果から、シミュレーション計算を行った。笹ヶ瀬川及び倉敷川流域の水質はいずれも正弦曲線で近似された。湖心のシミュレーション計算結果の平均値は7.5mg/Lで報告値(公共用水域)の平均値7.3mg/Lと近い値であった。

[キーワード: COD, 窒素, リン, 児島湖, シミュレーション計算]

[Key words: COD, Nitrogen, Phosphorus, Lake Kojima, Simulation Calculation]

## 1 はじめに

児島湖の水質保全や水質改善効果の検証のため、これまで児島湖の計算モデルを作成し、現況再現のためのシミュレーション計算<sup>1)~5)</sup>及び結果の検討等を行ってきたが、こうした数値シミュレーションを用いることにより、例えば流入水の水質を構成している各因子の寄与率が算定できれば、ある因子に対する浄化施策と水質改善効果について推算でき、現状の評価及び将来の予測が可能となる。

今回は、児島湖流域を8ブロックに分け各ブロックから汚濁負荷が流入するモデルを作り計算した。その結果、児島湖の水質や季節変化をシミュレーション計算に組み込むことができたので報告する。

## 2 材料および方法

### 2.1 調査地点および測定方法

児島湖の水質保全計画である第6期湖沼水質保全計画(平成23~27年度)と同じブロック分けにより、流域を8ブロック<sup>6)</sup>に区分した(図1)。

各地点のデータは、当センターが直接採水及び分析した結果を使用したほか、県がとりまとめた公共用水域調査結果等<sup>6)~11)</sup>を用いて計算した。また、児島湖の平均滞留時間<sup>5)・12)</sup>、日射量(日本気象協会)は過去の既報告値を用いた。

COD, 全窒素(T-N), 全リン(T-P), NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NH<sub>4</sub>-N及びPO<sub>4</sub>-Pは工場排水試験法K0102<sup>13)</sup>に準じて測定した。なお、サンプルをろ紙(Whatman, GF/C)によりろ過し、ろ液のCODを溶存態COD(以下「D-COD」という。)とし、CODからD-CODを差し引い

た値を懸濁態COD(以下「P-COD」という。)とした。懸濁態窒素(以下「P-N」という。)及び懸濁態リン(以下「P-P」という。)についてもP-CODと同様にろ液との差から懸濁態の値を求めた。

### 2.2 水質モデル

水域の生態系のモデルを図2に示す。計算式に用いる定数値は報告値<sup>6)・14)</sup>を使用し、これらを図中に併せて示す。

モデル式中の各項目(P-N, P-P, Chl.aおよびP-COD)間の関係式について、実測値(1997~2009年度)から得られた関係式<sup>4)</sup>を用いた(図3)。このモデルに基づくシミュレーション計算は数値計算ソフトウェアScilabを用いて行った。計算プログラムを図4に示す。



図1 児島湖流域

本プログラムでは、植物プランクトンの増殖をCODで表すこととし、以下の式<sup>6)</sup>により計算した。

$$\frac{dA - COD}{dt} = (\text{流入}) + (\text{増殖}) - (\text{死滅}) - (\text{沈降}) - (\text{流出})$$

$$= \left( \frac{A - COD_{in}}{\tau} \right) + (\mu \cdot A - COD) - (k_d \cdot K_T \cdot A - COD) - \left( \frac{k_{sv}}{H} \cdot A - COD \right) - \left( \frac{A - COD}{\tau} \right)$$

$$K_T = \theta^{T-12}$$

A-COD：植物プランクトン態COD (mg/L) , A-COD<sub>in</sub>：流入水の植物プランクトン態COD (mg/L) ,  $\mu$ ：比増殖速

度 (1/day) ,  $k_d$ ：死滅速度 (1/day) ,  $K_T$ ：水温に関する影響因子 (-) ,  $\theta$ ：水温に係る定数1.04 (-) , T：水温

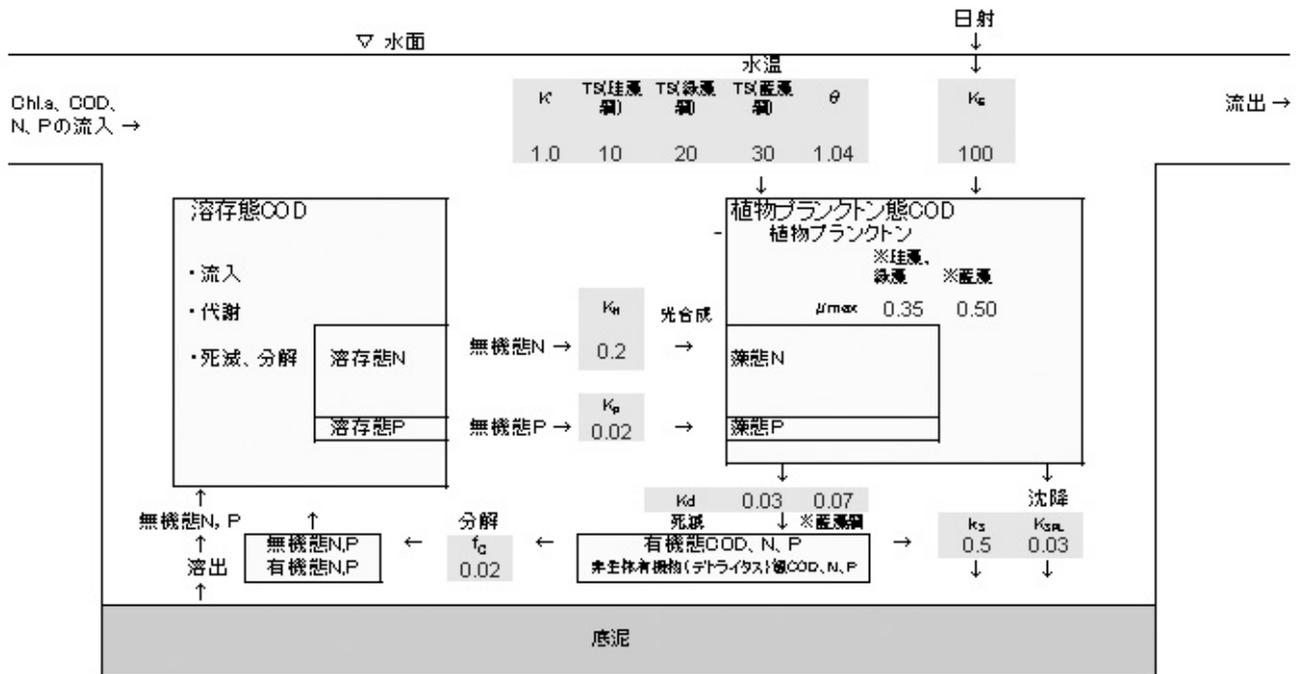


図2 計算モデル (概念図)

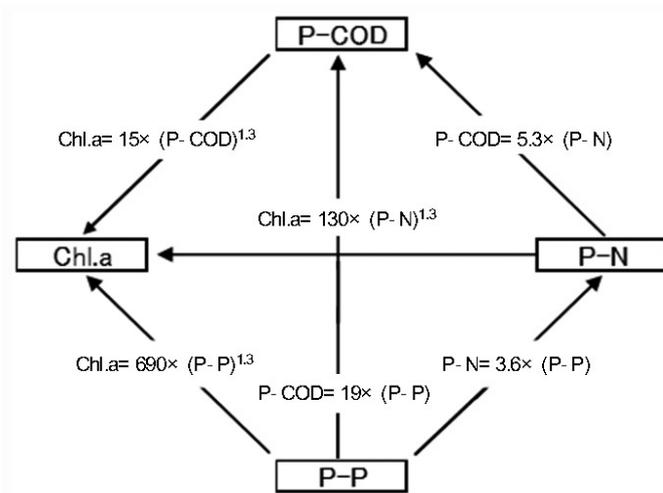
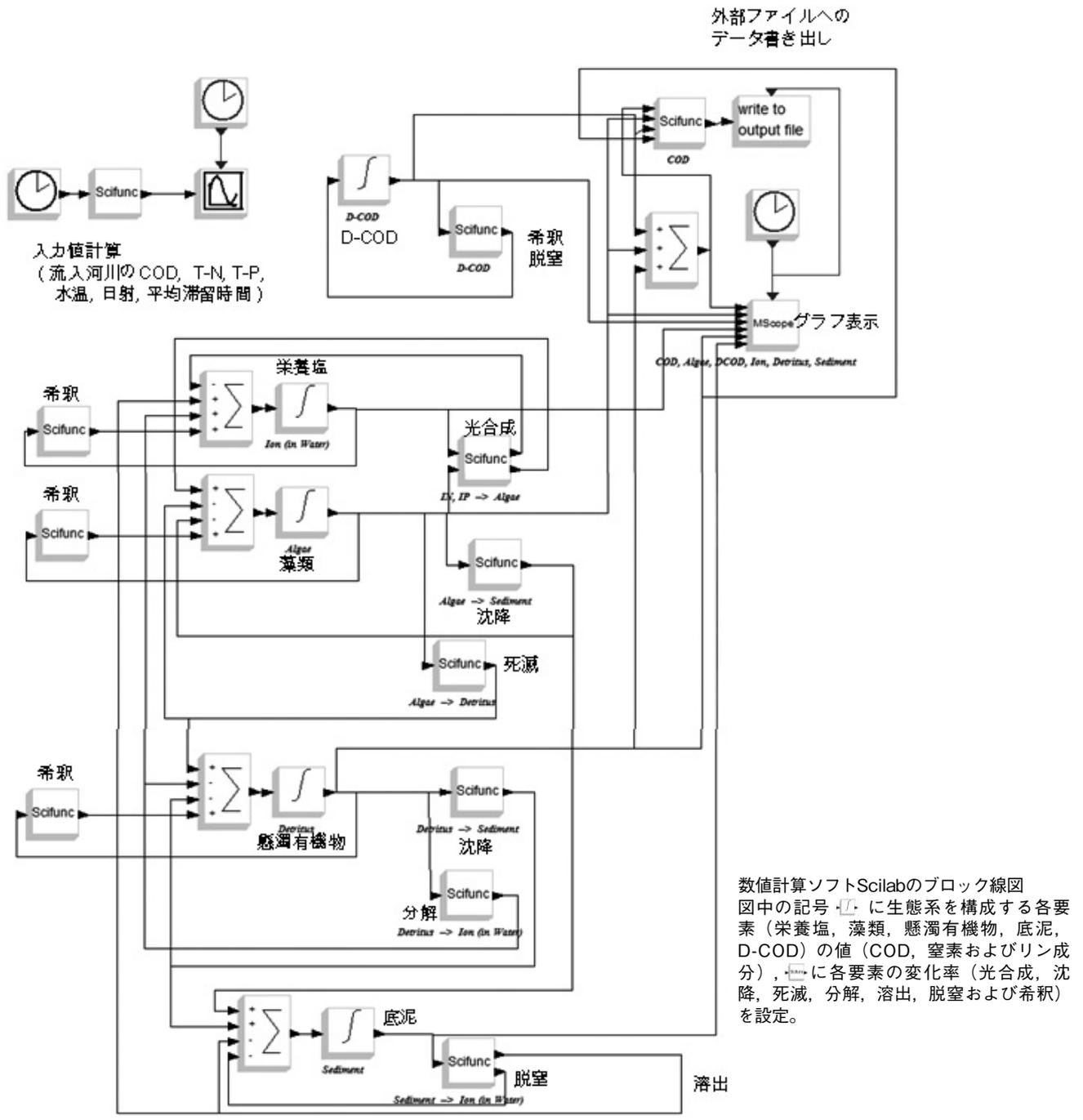


図3 P-COD, T-N, T-PおよびChl.aの関係



数値計算ソフトScilabのブロック線図  
 図中の記号  $\Sigma$  に生態系を構成する各要素（栄養塩、藻類、懸濁有機物、底泥、D-COD）の値（COD、窒素およびリン成分）、 $\frac{d}{dt}$  に各要素の変化率（光合成、沈降、死滅、分解、溶出、脱窒および希釈）を設定。

( $^{\circ}\text{C}$ )、 $k_{\text{SPL}}$ ：植物プランクトン沈降速度 (m/day)、 $H$ ：水深 (m)、 $\tau$ ：平均滞留時間 (day) である。また植物プランクトンの死滅により生ずる有機物の沈降速度は、 $k_s$ ：有機物沈降速度 (m/day) で表した。

式中の  $\mu$  (比増殖速度) は以下の式<sup>6)</sup> で定義した。

$$\mu = \mu_{\text{max}} \times (\text{窒素因子}) \times (\text{リン因子}) \times (\text{光因子}) \times (\text{温度因子})$$

$$= \mu_{\text{max}} \left( \frac{N_d}{K_N + N_d} \right) \cdot \left( \frac{P_d}{K_P + P_d} \right) \cdot \left( \frac{E}{K_E + E} \right) \cdot \left( \frac{T}{T_s} \cdot \exp\left(\frac{T_s - T}{T_s}\right) \right)^3$$

$\mu_{\text{max}}$ ：最大比増殖速度 (1/day)、 $N_d$ ：無機態窒素 (mg/L)、 $P_d$ ：無機態リン (mg/L)、 $K_N$ ：窒素半飽和定数 (mg/L)、 $K_P$ ：リン半飽和定数 (mg/L)、 $E$ ：日射量 (cal/cm<sup>2</sup>/day)、 $K_E$ ：日射量半飽和定数 (cal/cm<sup>2</sup>/day)、 $T_s$ ：増殖に最適な水温 ( $^{\circ}\text{C}$ ) である。

窒素については、以下の式<sup>6)</sup> で定義した。

(全窒素) = (懸濁態窒素) + (溶存態窒素)

= (植物プランクトン態窒素) + (有機態窒素) + (無機態窒素)

$$\frac{d(T-N)}{dt} = \frac{d(A-N)}{dt} + \frac{d(O-N)}{dt} + \frac{d(D-N)}{dt}$$

(植物プランクトン態窒素) = (クロロフィル a) × (換算係数)

$$\frac{d(A-N)}{dt} = \xi_N \cdot \frac{d(Chl.a)}{dt}$$

(有機態窒素) = (流入) + (植物プランクトンの死滅) - (沈降) - (流出)

$$\frac{d(O-N)}{dt} = \left( \frac{O-N_{in}}{\tau} \right) + (\xi_N \cdot k_d \cdot K_{TW} \cdot Chl.a) - \left( \xi_N \cdot \frac{k_s}{H} \cdot Chl.a \right) - \left( \xi_N \cdot \frac{O-N}{\tau} \right)$$

(無機態窒素) = (流入) - (植物プランクトンによる吸収)

+ (植物プランクトン分解による供給) + (底泥からの溶出) - (流出)

$$\frac{d(D-N)}{dt} = \left( \frac{I-N_{in}}{\tau} \right) - (\xi_N \cdot G_p \cdot Chl.a) + f_N \cdot K_{TW} \cdot (O-N) + \left( \frac{D_p}{H} \right) - \left( \frac{I-N}{\tau} \right)$$

T-N: 全窒素 (mg/L), D-N: 溶存態窒素 (mg/L), A-N: 植物プランクトン態窒素 (mg/L), O-N: 有機態窒素 (植物プランクトンの死滅によって生ずる) (mg/L), I-N: 無機態窒素 (NO<sub>3</sub>-N + NO<sub>2</sub>-N + NH<sub>4</sub>-N) (mg/L), I-N<sub>in</sub>: 流入水の無機態窒素 (mg/L), ξ<sub>N</sub>: 植物プランクトンと窒素の換算係数 (-), k<sub>SN</sub>: 有機態窒素沈降速度 (m/day), f<sub>N</sub>: 有機態窒素分解速度 (1/day), DN: 底泥からのI-N溶出速度 (g/m<sup>2</sup>/day)である。なお, P-N (懸濁態窒素)は, A-NとO-Nの合計値である。

また, リンについては窒素と同様に,

$$\frac{d(T-P)}{dt} = \frac{d(A-P)}{dt} + \frac{d(O-P)}{dt} + \frac{d(D-P)}{dt}$$

$$\frac{d(A-P)}{dt} = \xi_P \cdot \frac{d(Chl.a)}{dt}$$

$$\frac{d(O-P)}{dt} = \left( \frac{O-P_{in}}{\tau} \right) + (\xi_P \cdot k_d \cdot K_{TW} \cdot Chl.a) - \left( \xi_P \cdot \frac{k_s}{H} \cdot Chl.a \right) - \left( \xi_P \cdot \frac{O-P}{\tau} \right)$$

$$\frac{d(D-P)}{dt} = \left( \frac{I-P_{in}}{\tau} \right) - (\xi_P \cdot G_p \cdot Chl.a) + f_P \cdot K_{TW} \cdot (O-P) + \left( \frac{D_p}{H} \right) - \left( \frac{I-P}{\tau} \right)$$

T-P: 全リン (mg/L), P-P: 懸濁態リン (mg/L), D-P: 溶存態リン (mg/L), A-P: 植物プランクトン態リン (mg/L), O-P: 有機態リン (植物プランクトンの死滅によって生ずる) (mg/L), I-P: 無機態リン (PO<sub>4</sub>-P) (mg/L), I-P<sub>in</sub>: 流入水の無機態リン (mg/L), ξ<sub>P</sub>: 植物プランクトンとリンの換算係数 (-), k<sub>SP</sub>: 有機態リン沈降速度 (m/day), f<sub>P</sub>: 有機態リン分解速度 (1/day), D<sub>P</sub>: 湖底からのI-P溶出速度 (g/m<sup>2</sup>/day)であり, P-P (懸濁態リン)は, A-PとO-Pの合計値とした。

8ブロックに分けた児島湖流域の負荷量から, 以下の式で計算された値を流入水の水質として計算した。

$$C_{in} = \frac{(L_{S1} + L_{S2} + L_{S3} + L_{S4} + L_{K1} + L_{K2} + L_{Ka} + L_T) \cdot 1,000}{Q_m}$$

C<sub>in</sub>: 流入水の水質 (mg/L), L<sub>S1</sub>~L<sub>T</sub>: 各ブロック (S1, S2, S3, S4, K1, K2, Ka及び直接流入ブロック)からの負荷量 (kg/day), Q<sub>in</sub>: 湖への流入水量 (m<sup>3</sup>/day)である。

流入水の植物プランクトン種 (綱)として珪藻綱を設定し, 最適水温を珪藻綱12℃<sup>6)</sup>とした。

現況再現計算の入力値となる各ブロックの流入水の水質 (COD, T-N, T-P), 水温, 平均滞留時間および湖心の水質 (COD)は年度毎に似た増減を繰り返す傾向が見られることから, 周期的なパターンの解析に用いられる正弦曲線<sup>15)</sup>により近似し, この近似値を用いて流域の汚濁負荷流入の計算を行った。

$$y(t) = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i \sin \left( \frac{2\pi t}{T} - b_i \right)$$

y: 水温 (°C), 平均滞留時間 (day)またはP-COD (mg/L), t: 時間 (day), a<sub>0</sub>: 平均値 (振幅の中心となる値, °C, dayまたはmg/L), a<sub>i</sub>: 振幅 (°C, dayまたはmg/L), T: 周期 (day), b<sub>i</sub>: 位相 (day), i: 近似式の次数 (-)である。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 流入水の水質

基礎となるデータについて当センターの測定結果及び公共用水域調査結果等<sup>7)~11)</sup>を用い, 正弦曲線により近似させた。図5~7にCOD, T-N及びT-Pを示す。笹ヶ瀬川の4地点及び倉敷川の2地点のCOD, T-Pはいずれも夏期に高く冬期に低い値であり, T-Nは逆に夏期に低く冬期に高い値であった。

次に水質, 流量及び汚濁負荷量の関係から各ブロックの流量及び汚濁負荷量を計算し設定した。各地点での流量の設定値を図8に示す。また各ブロックからの汚濁負荷 (COD, T-P及びT-N)流入量を水質 (図5~7)と流量 (図8)を掛けて計算し, 既報<sup>6), 12)</sup>に従い6つの発生源 (生活系, 産業系, 畜産・農地系, 都市系及び自然系)に分けて示した (図9~11)。負荷量の年間の変動パターンを設定するにあたって農地系及び自然系からの負荷量が総負荷量 (図9~11の推算値)の季節変化の増減に比例すると仮定して設定した。

負荷量はCOD, T-P及びT-Nのいずれも春期から夏期に高く秋期から冬期に低い値であり要因として灌漑等の影響が考えられたことから, ここでは農地系からの負荷量の時間的な増減パターンが総負荷量の増減パターンと単純に比例すると仮定したが, 実際の季節的な変動パターンや単位面積あたりの流出量については現場での調査を含めた今後の検討が必要である。

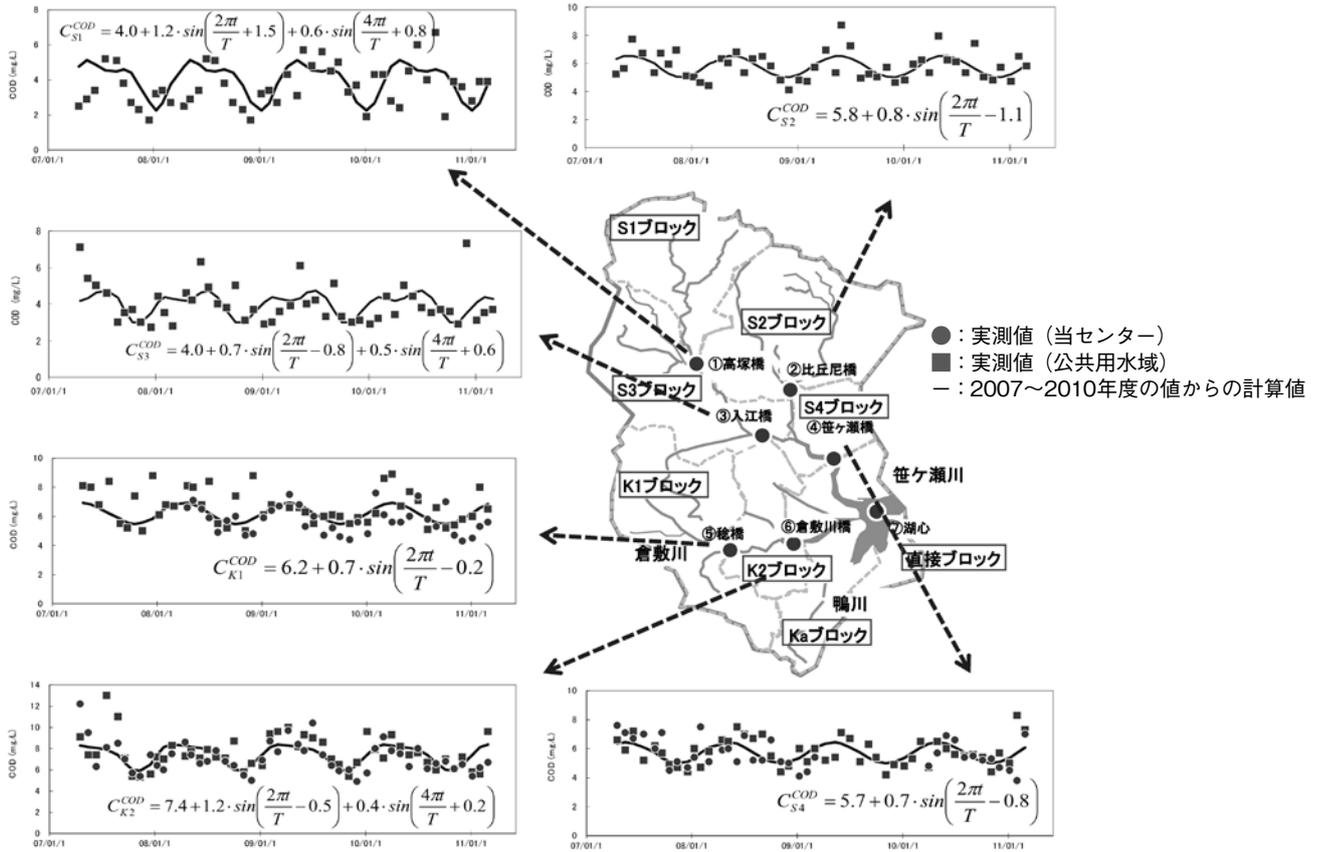


図5 児島湖流域のCOD

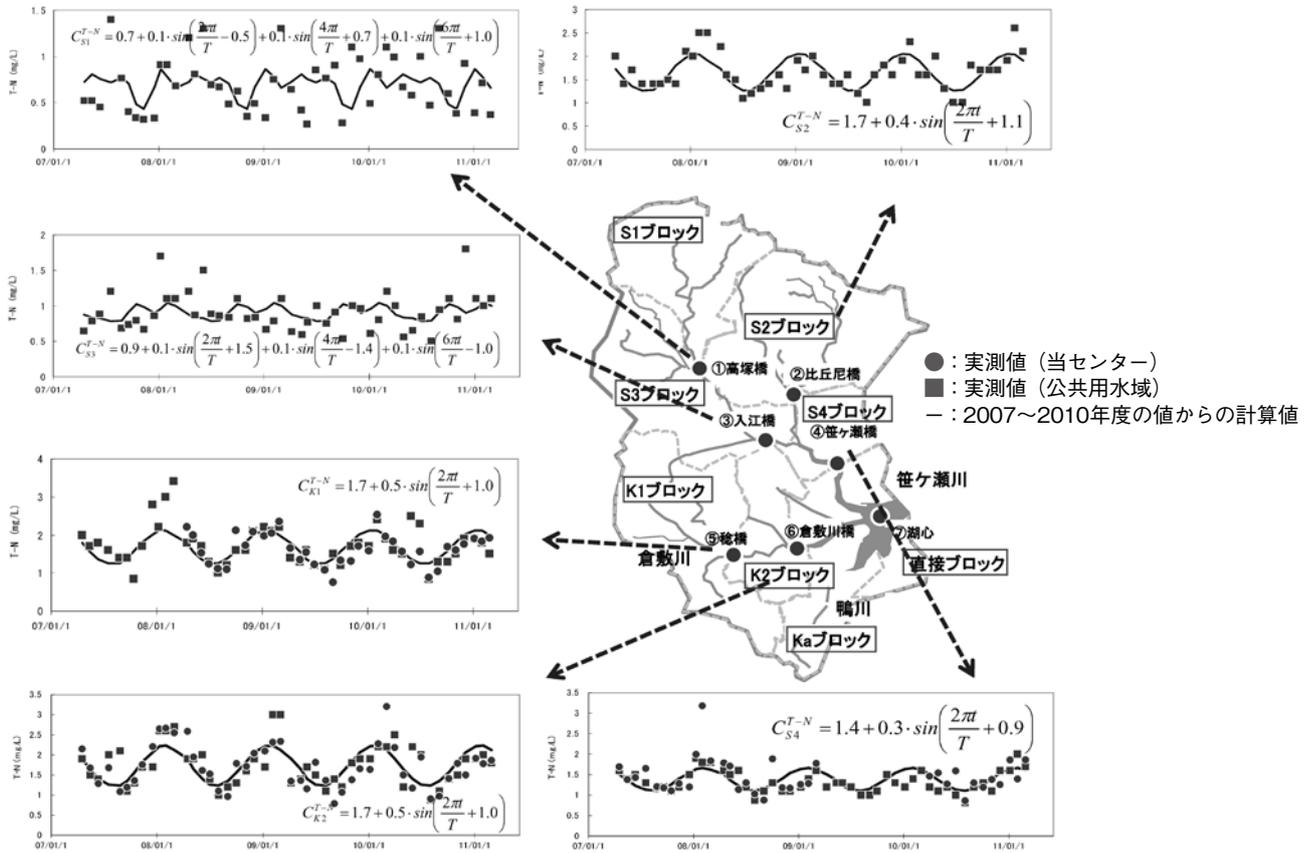


図6 児島湖流域のT-N

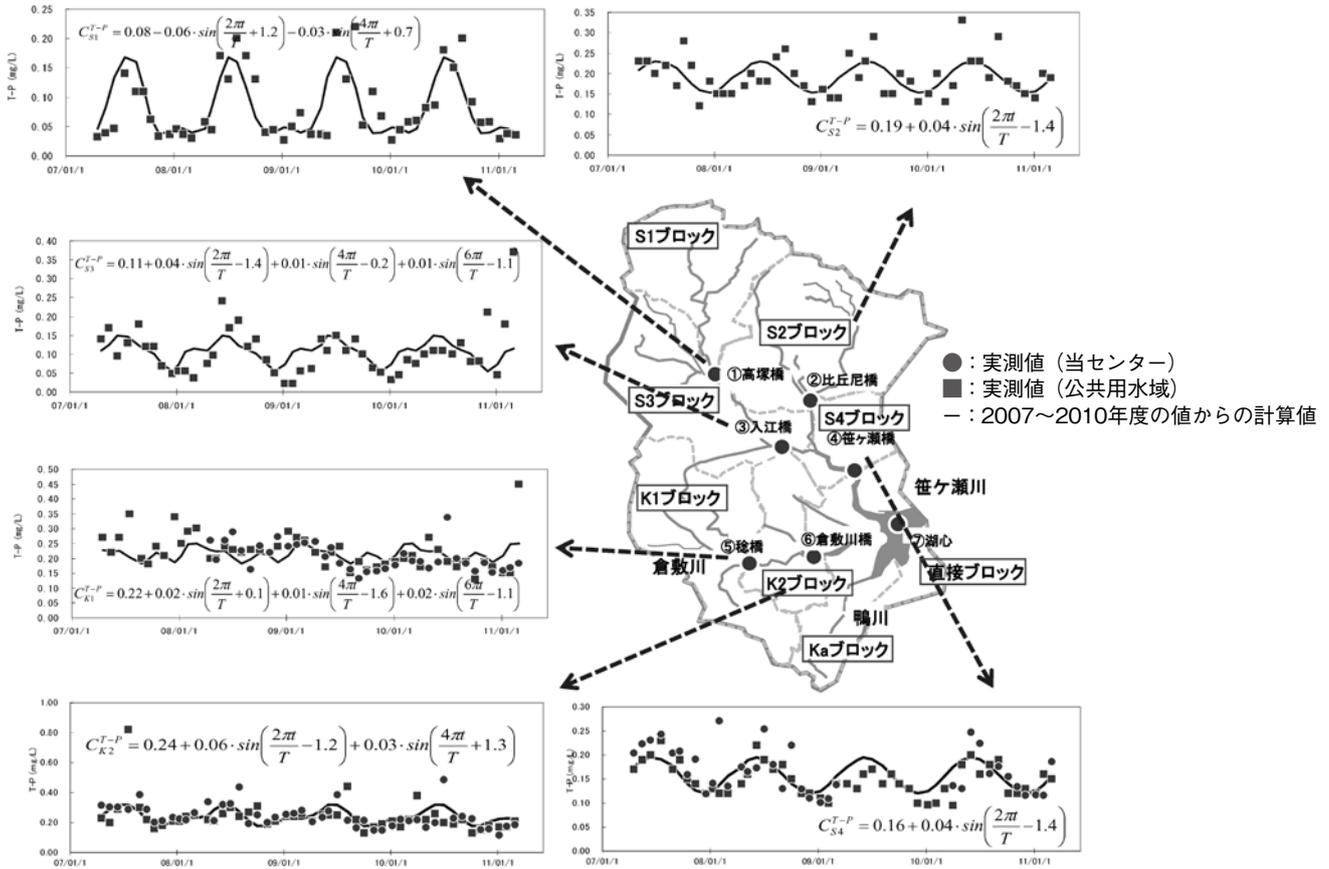


図7 児島湖流域のT-P

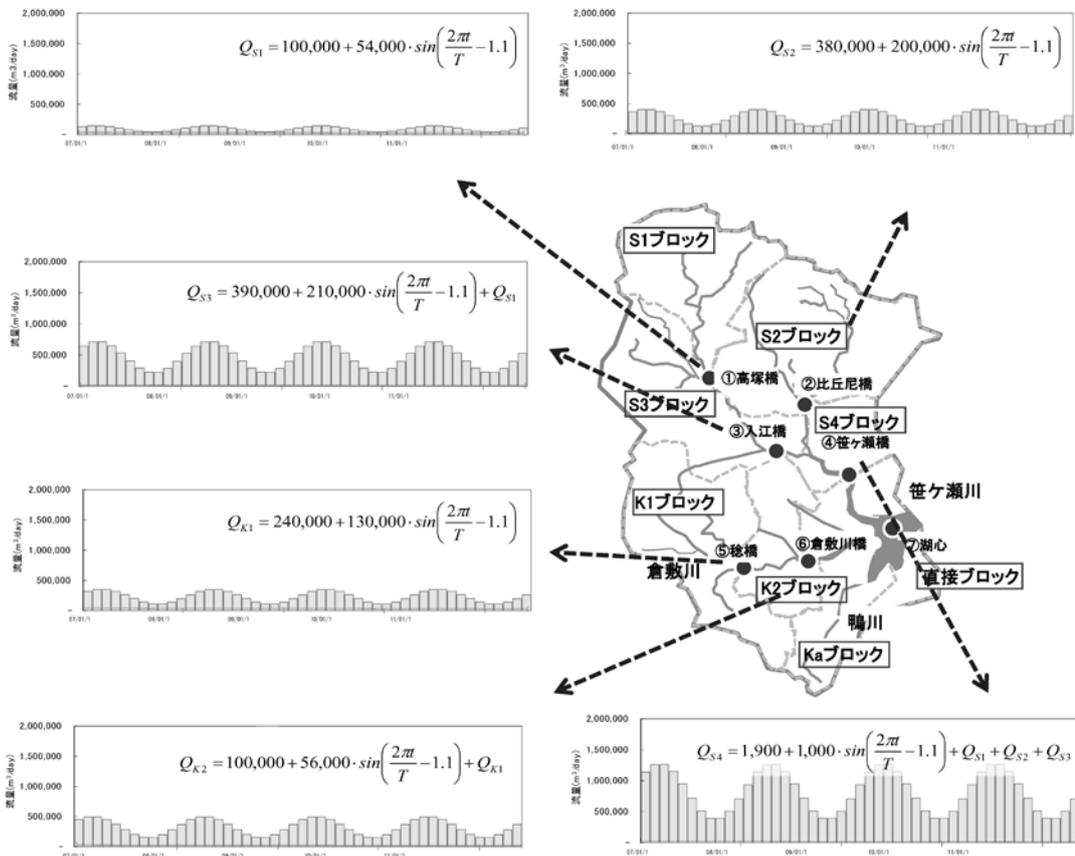


図8 児島湖流域の河川流量 (設定値)

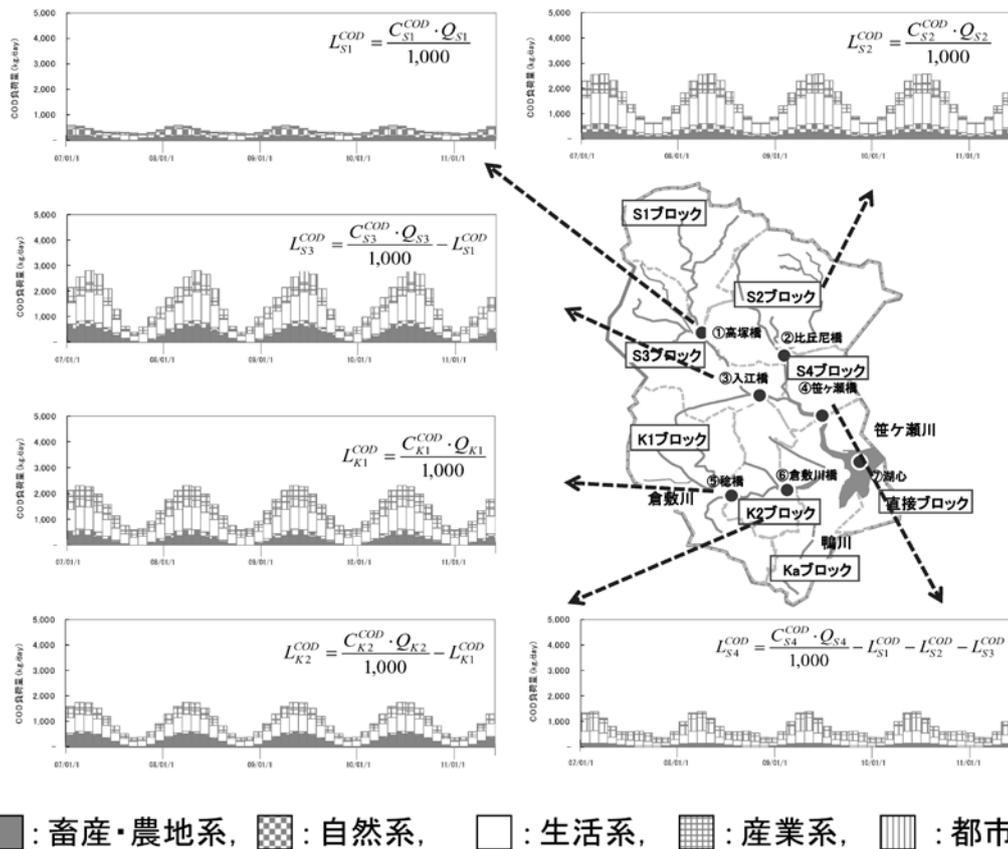


図9 児島湖流域のCOD負荷量（設定値）

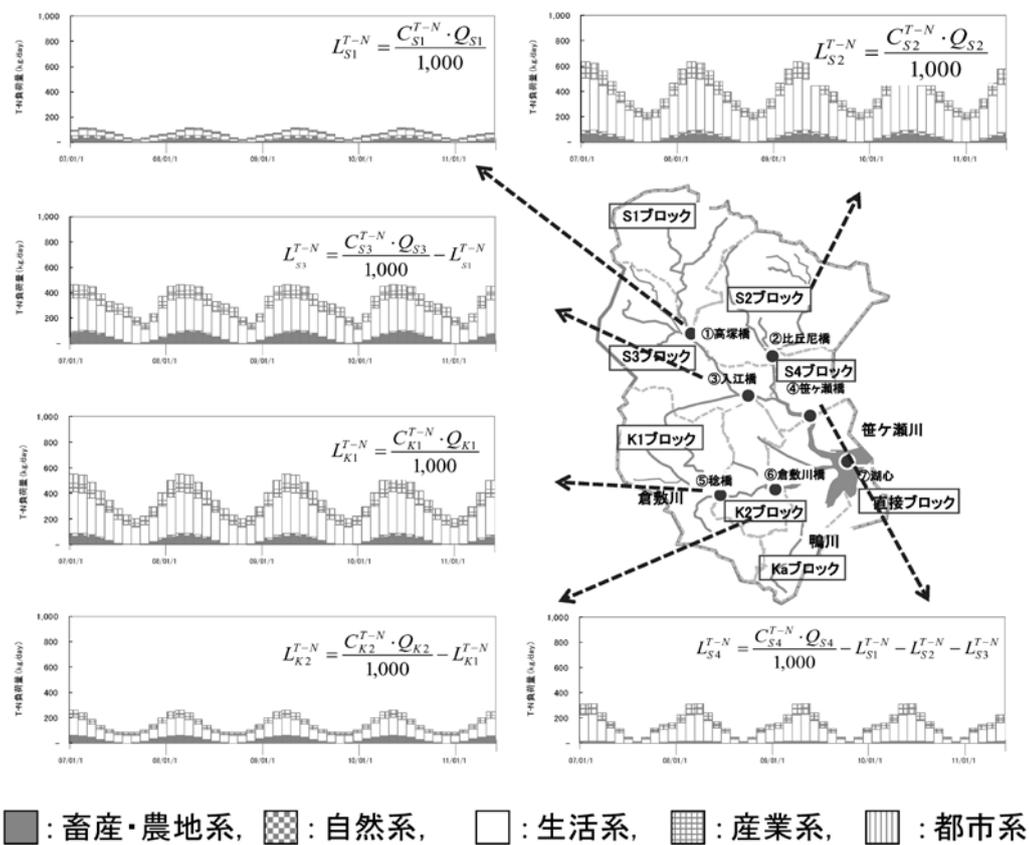


図10 児島湖流域のT-N負荷量（設定値）

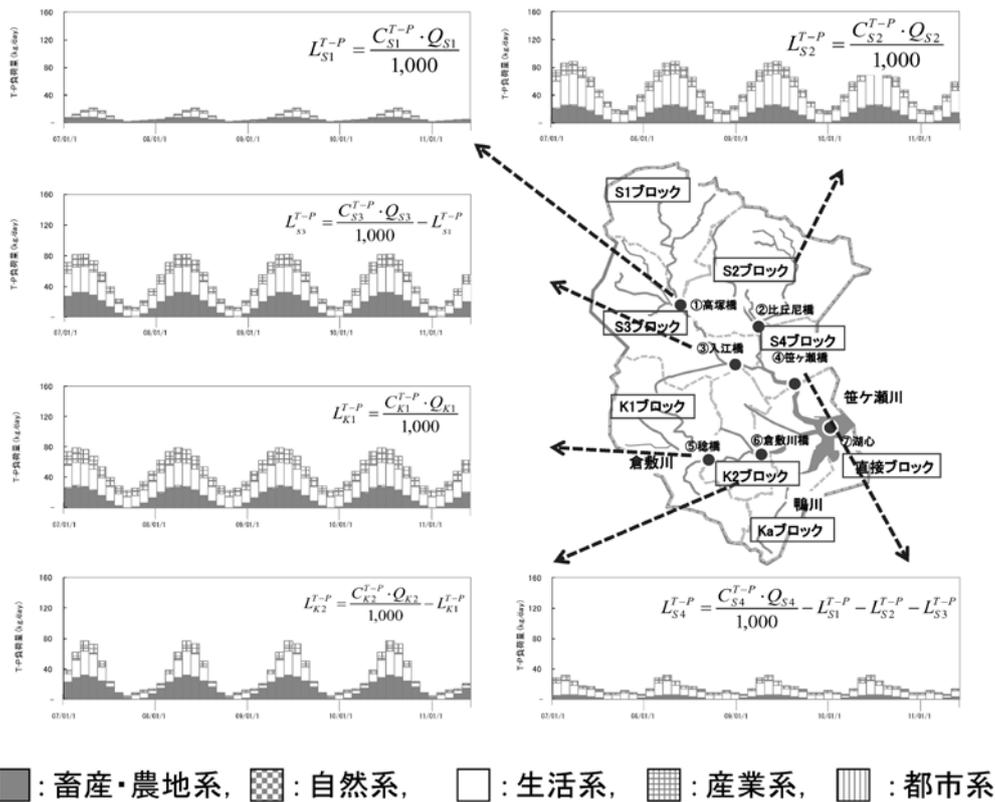


図11 児島湖流域のT-P負荷量（設定値）

### 3.2 湖心のシミュレーション計算

図12に最近4年間（2007年～2010年度）の流入水の水質に基づく湖心での水質（COD, P-COD, D-COD, T-N及びT-P）のシミュレーション計算（図中の実線）及び実測値を示す。児島湖湖心のCOD及びP-CODの実測値は春期に高く秋期から冬期にかけて低い傾向がみられ、シミュレーション計算で再現することができた。シミュレーション計算の結果について、CODの平均値は7.5mg/Lであり公共用水域及び地下水の水質測定結果（2007～2010年度）<sup>7)～10)</sup>におけるCODの平均値7.3mg/Lに近い値であった。P-CODの平均値（当センターでの実測値）は2.0mg/Lであったが、シミュレーション計算の平均値は2.4mg/Lであった。T-Nはシミュレーション計算の平均値が1.1mg/Lで公表されている公共用水域のT-N平均値（2007～2009年度の3年間）1.2mg/Lと近い値であった。T-Pはシミュレーション計算の平均値が0.18mg/Lで公表されている公共用水域T-P平均値（2007～2009年度の3年間）0.19mg/Lと近い値であった。

第6期湖沼水質保全計画<sup>6)</sup>では各種の汚濁負荷対策を行った場合、汚濁負荷量が平成22年度と比較して平成27年度にCODで1,100kg/day、T-Nで362kg/day、T-Pで41kg/day削減すると見込まれている<sup>6)</sup>。これを仮定しシミュレーション計算すると（図12中の点線で示す）、CODは年平均7.0mg/L（6.4%減少）、T-Nは年平均1.0mg/L（9.8%減少）、T-Pは年平均0.17mg/L（8.1%減少）と推算された。

計算結果は負荷量が単純に減少すると仮定したものであるが詳細な条件や結果の妥当性については今後さらに検討する必要がある。

## 4 まとめ

児島湖流域を8ブロックに分け、水質測定結果をモデル式に当てはめ、最近5年間（2007～2011年度）のシミュレーション計算を行った結果、以下の知見が得られた。

- 1) 汚濁負荷流入量はいずれも夏期に高く冬期に低い値で灌漑の影響が大きいと考えられた。
- 2) 湖心の実測値及び計算結果は夏期に高く冬期に低い値で、COD（平均値）が7.5mg/Lで実測値の7.3mg/Lと近い値であった。
- 3) T-Nは計算結果の平均値が1.1mg/Lで実測値の1.2mg/Lと同等の値であり、T-Pは計算結果の平均値が0.18mg/Lで実測値の0.19mg/Lと同等の値であった。

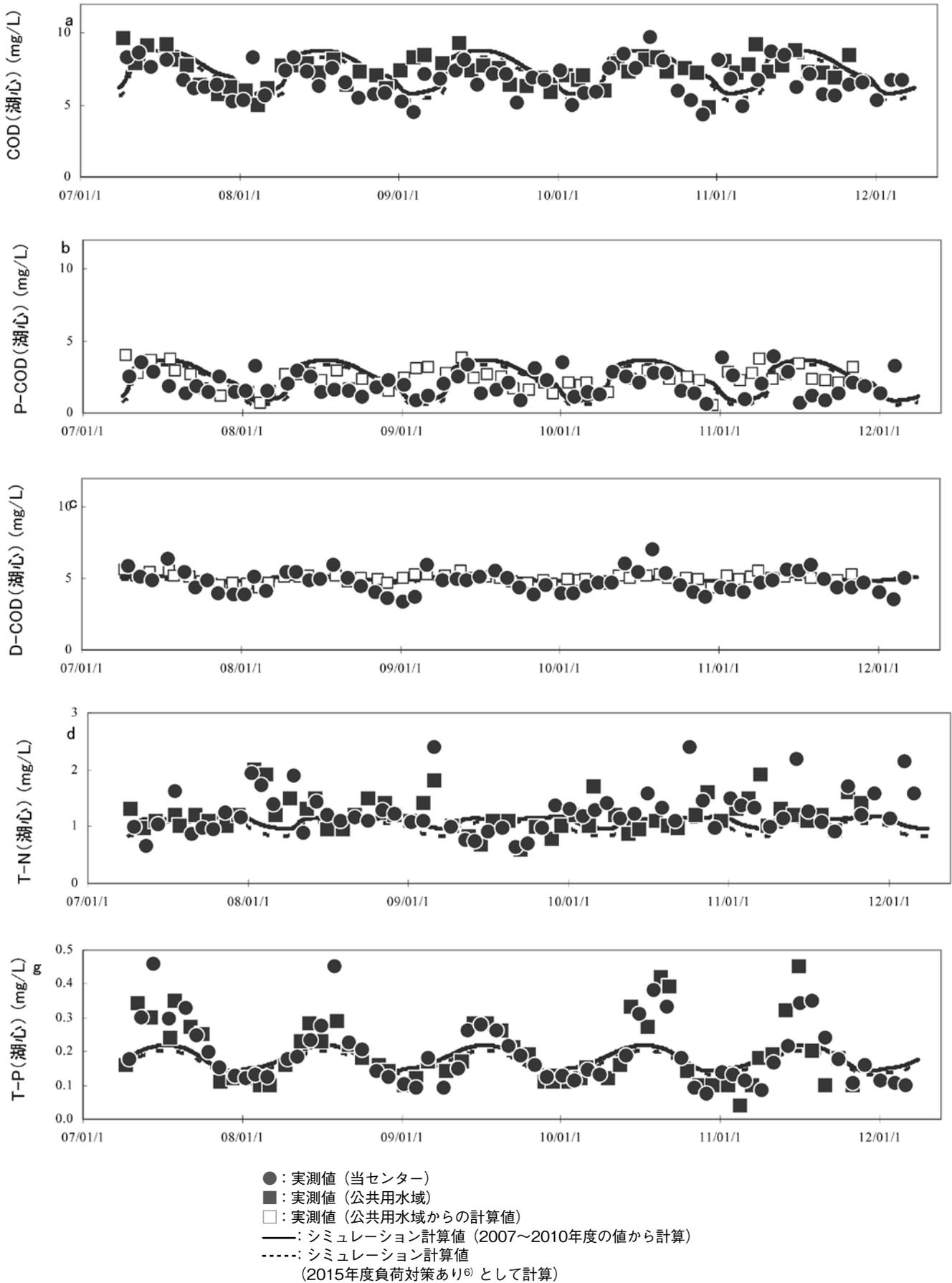


図12 児島湖流域のCOD, T-N及びT-Pの実測値及び計算値

## 文 献

- 1) 藤田和男, 山本 淳, 小野 質, 北村雅美, 斎藤直己: 児島湖下流域の内部生産 (4) —植物プランクトンのP-CODおよび窒素・リン—, 岡山県環境保健センター年報, 28, 13-16, 2004
- 2) 藤田和男, 北村雅美, 斎藤直己: 児島湖下流域の内部生産 (5) —植物プランクトンのP-COD, クロロフィル a および窒素・リン—, 岡山県環境保健センター年報, 29, 27-31, 2005
- 3) 藤田和男, 鷹野 洋, 坂本祐基, 板谷 勉, 宮崎 清: 児島湖におけるクロロフィル a およびCODと栄養塩 (窒素・リン) の関係, 岡山県環境保健センター年報, 33, 13-18, 2009
- 4) 藤田和男, 鷹野 洋, 坂本祐基, 板谷 勉, 剣持堅志: 児島湖におけるクロロフィル a およびCODと栄養塩 (窒素・リン) の関係 (2), 岡山県環境保健センター年報, 34, 17-24, 2010
- 5) 藤田和男, 難波 勉, 坂本祐基, 鷹野 洋, 板谷 勉: 児島湖の水質シミュレーション計算, 岡山県環境保健センター年報, 35, 27-34, 2011
- 6) 岡山県: 平成23年度指定湖沼汚濁負荷量削減状況調査報告書, 148-226, 2012
- 7) 岡山県: 平成19年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2007
- 8) 岡山県: 平成20年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2008
- 9) 岡山県: 平成21年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2009
- 10) 岡山県: 平成22年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2010
- 11) 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, 61, 1992
- 12) 岡山県: 児島湖ハンドブック, 50, 2011
- 13) 平河喜美男編: 工場排水試験法 JIS-K0102, 42-44, 日本規格協会, 東京, 1998
- 14) 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
- 15) 大石進一: フーリエ解析, 7, 岩波書店, 東京, 1989

【調査研究】

## 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を用いた水質中フタル酸エステル (PAE) の多成分分析法の検討—

Study for Simultaneous Analysis Method of Phthalate esters  
(PAE) in Water by GC/MS

吉岡敏行, 山辺真一, 坂口浩範, 大月史彦 (水質科)

Toshiyuki Yoshioka, Shinichi Yamabe, Hironori Sakaguchi, Fumihiko Otsuki (Department of Water)

### 要 旨

フタル酸エステル10種類の水質分析法を検討した。前処理方法は、メスフラスコを用いたヘキサンスターラー攪拌抽出法と分液ロートを用いたジクロロメタン振とう抽出法を比較検討するとともに、ブランクの管理手法についても検討した。その結果、分析法の検出下限値は0.0013~0.040  $\mu\text{g/L}$ 、定量下限値は0.0034~0.10  $\mu\text{g/L}$ となり、従来の分析法に比べてブランク値がほとんど検出されずばらつきの少ない高感度分析方法が確立できた。

[キーワード：フタル酸エステル, 操作ブランク, GC/MS, 多成分分析]

[Key words : Phthalate esters, Operation Blank, GC/MS, Simultaneous analysis]

### 1 はじめに

本県では、最新の化学物質情報の入手や分析技術の習得等を目的に、毎年、環境省が実施する化学物質環境実態調査に参画し、化学物質の新規分析法の開発や、環境中の濃度の把握に努めている。今回、平成23年度化学物質環境実態調査と連携して、フタル酸ブチルベンジル及びフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)等のフタル酸エステル10種類の水質分析法について検討した。

フタル酸エステルは、その有害性から食品衛生法では特に、玩具や器具及び容器包装で規制がされている。環境基本法では水質汚濁に係る環境基準の要監視項目としてフタル酸ジエチルヘキシルの指針値が0.06mg/Lと規定され、また、その測定方法として、共栓付き試験管を用いたヘキサン抽出法でGC/MS又はGC/ECD等を用いて測定する方法が規定されている。一方、環境省の化学物質環境実態調査では、フタル酸ブチルベンジルがメスフラスコを用いたヘキサン抽出法によりGC/MSを用いて測定する方法<sup>1)</sup>がある。また、JIS K0450-30-10では、工業用水・工場排水中のフタル酸エステル類の試験法として8種類の同様の測定法<sup>2)</sup>がある。このようにさまざまな公定法が規定されているが、フタル酸エステルはプラスチック製品の可塑剤等として身近に多量に使用されており、特に、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)やフタル酸ジ-n-ブチルは実験環境や試薬・器具類等からの汚染により、操作ブランク値が検出されることが多く、一定にコントロールすることは比較的困難であった。そのため、できるだけシンプルで操作ブランクの混入

が少ない分析法を採用しているが、基本的には検出された操作ブランク値を差し引いて定量すること等から変動係数が比較的高く、検出下限も比較的高い等の問題点がある。

今回、試薬、器具、操作手順等を再確認したところ、汚染経路が明確となり、操作ブランク値をできるだけ低減するように汚染対策を行い、操作ブランク値がほとんど検出されず、検出下限も従来の分析法よりかなり低い分析方法を確立することができたので報告する。

### 2 実験方法

#### 2.1 ガラス器具及び試薬

ガラス器具(メスフラスコ)は、洗剤を入れたステンレス製の容器につけ置き、水道水、超純水で十分すすいだ後、乾燥させ、アセトン、ヘキサンで洗浄し、乾燥機で250℃、約3時間加熱処理後、放冷して使用した。加熱処理しないパスツールピペットと測定用バイアルピンは使用直前にアセトン、ヘキサンで洗浄後、自然乾燥し、直ちに使用した。

試薬(アセトン、ヘキサン、塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム)は、フタル酸エステル試験用の規格品を使用した。塩化ナトリウムや無水硫酸ナトリウムは、あらかじめ450℃、約16時間加熱処理後、ある程度冷却してデシケーター中で保管したものをできるだけ早く使用した。

#### 2.2 分析フロー及び前処理工程における検討

今回検討した分析フローを図1に示す。化学物質環境実

態調査の分析方法<sup>1)</sup>を採用したが、汚染の原因のひとつであると考えられる塩析は行わなかった。使用するガラス器具もメスフラスコとパストゥールピペットだけで極力、汚染の機会を排除したシンプルな分析方法とした。前処理工程では、メスフラスコを用いたヘキサンスターラー攪拌抽出法と分液ロートを用いたジクロロメタン振とう抽出法を比較検討した。

また、妨害物質の除去を行う必要がある試料を想定してシリカゲルカートリッジカラムによる溶出パターンも検討した。

### 2.3 GC/MSの測定条件

今回検討したGC/MSの測定条件を表1に、モニターイオンを表2に示す。d体がある物質はクリーンアップスパイク

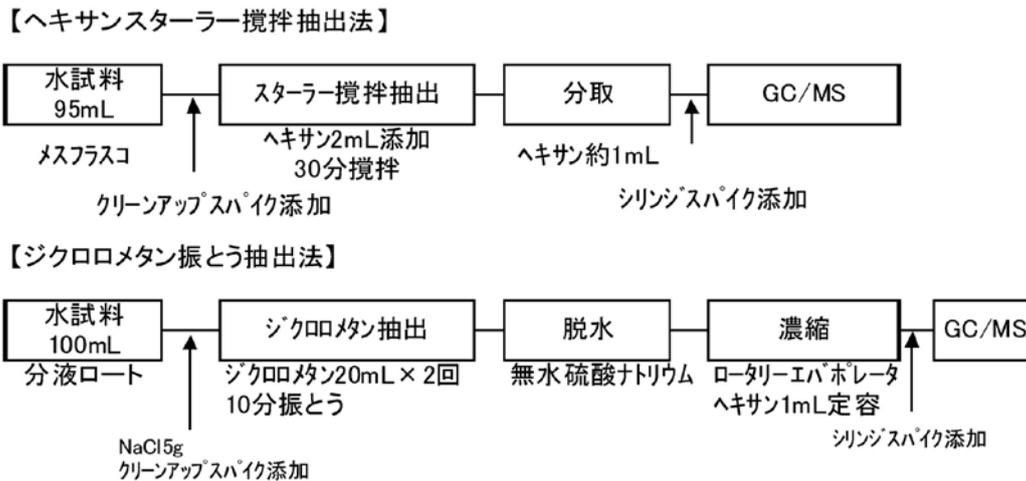


図1 分析フロー

表1 GC/MSの測定条件

使用機種	: GC: Agilent7890A, MS: JMS-Q1000GCMk II
カラム	: HP-1MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm (Agilent)
カラム温度	: 50°C (2min)-20°C/min-120°C(0min)-7°C/min-310°C(5min)
注入口温度	: 250°C
注入方法	: スプリットレス(パージ開始時間1.5 min)
注入量	: 1 μL
キャリアーガス	: ヘリウム 1 mL/min(定流量)
インターフェース温度	: 240°C
イオン源温度	: 210°C
イオン化電圧	: 70eV
検出モード	: SIM

表2 モニターイオン

番号	IS	保持時間	定量イオン(Q)	参照イオン(I)	
IS	IS p-terphenyl-d14	-	0:21:08	244	-
S1	Di-methyl phthalate-d4	-	0:10:49	198	-
S2	Di-ethyl phthalate-d4	-	0:12:54	153	-
S3	Di-isobutyl phthalate-d4	-	0:16:57	153	-
S4	Di-n-butyl-d4	-	0:18:13	153	-
S5	Benzyl n-butyl-d4	-	0:22:57	153	-
S6	Di-n-heptyl phthalate-d4	-	0:25:18	153	-
S7	Di(2-ethylhexyl) phthalate-d4	-	0:25:27	153	-
S8	Di-n-octylphthalate-d4	-	0:27:23	153	-
1	Di-methyl terephthalate	S1	0:11:38	163	194
2	Di-ethyl phthalate	S2	0:12:55	149	177
3	Di-allyl phthalate	S3	0:15:09	149	189
4	Di-isobutyl phthalate	S3	0:16:58	149	223
5	n-Butyl phthalate	S4	0:18:14	149	223
6	Butyl benzyl phthalate	S5	0:22:58	149	206
7	Di-n-heptyl phthalate	S6	0:25:20	149	265
8	Di-cyclohexyl phthalate	S6	0:24:55	149	167
9	Di(2-ethylhexyl) phthalate	S7	0:25:29	149	167
10	Di-n-octyl phthalate	S8	0:27:24	149	279

イクを内標準とし、d体がない物質は保持時間が近いクリーンアップスパイクを内標準として定量した。シリンジスパイク (p-terphenyl-d14) は、クリーンアップスパイクの回収率の計算に用いた。

## 2.4 分解性スクリーニング試験及び保存性試験

化学物質環境実態調査実施の手引き(平成20年度版)<sup>2)</sup>に基づき、分解性スクリーニング試験を実施した。試験液は精製水を用いてpH5、pH7、pH9のものを作成し、対象物質の濃度が0.42 $\mu$ g/Lになるように添加し、1時間後及び7日後(明所及び暗所に保存)にサロゲート物質を添加した後、ヘキサン抽出を行い、GC/MSで測定した。

保存性試験は、河川水に対象物質の濃度が0.21 $\mu$ g/Lになるように添加し、添加直後、7日後、14日後及び1ヶ月(冷暗所に保存)にサロゲート物質を添加した後、ヘキサン抽出を行い、GC/MSで測定した。

## 2.5 装置検出下界値及び分析法の検出下限値と定量下限値

装置検出下界値(IDL)及び測定方法の検出下限値(MDL)と定量下限(MQL)は、化学物質環境汚染実態調査の手引き(平成20年度版)<sup>2)</sup>に従って実施した。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とMQL試験には、用水路の水質試料を使用し、無添加の用水からフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)が検出されたため、精製水で1/4に希釈した試料を7個作成した。フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)を除く9物質の標準物質を添加して、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。

## 2.6 添加回収試験

河川水は、旭川(乙井手堰)の水質試料95mLに標準物質を添加し、海水は水島沖の水質試料95mLに標準物質を添加し、分析フローに従い前処理を実施した後、GC/MSで測定した。

# 3 検討結果及び考察

## 3.1 GC/MS測定条件の検討結果

対象物質のGCカラムでの分離状況を図2と図3に示す。フタル酸エステルの測定では、一般的に、無極性から微極性のGCカラムが使用されるが、HP-1MSとDB-5MS(Agilent J&W)を比較したところ、DB-5MSではフタル酸ジ-n-ヘプチルとフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)のピークが分離しなかったため、今回はHP-1MSを用いて検討を行った。

フタル酸エステルの検量線を図4に示す。物質により最

低濃度は0.05~2.0ng/mLの幅があり、感度は大きく異なっていた。また、一部の物質では検量線は直線ではなく、二次曲線で相関が高かったが、今回検討に使用した分析装置の特徴と思われる。

## 3.2 汚染源の検討結果

試薬類は、フタル酸エステル分析用の規格品が販売されているが、必ず、事前にブランクの有無をチェックして使用した。しかし、一度、開封して実験室内に放置すると、実験室の環境によっては室内空気から汚染されることがあることから、念のため使用の都度、新しい溶媒を使用した。なお、当センターの微量化学物質分析棟(建設後約10年経過)は、外気の導入及び室内空気の排気は活性炭フィルターやヘパフィルター等でろ過しているため、実験室内の空気が非常に清浄であり、溶媒を開封して約1ヶ月放置したものでほとんどフタル酸エステルの汚染はなかった。

塩化ナトリウムや無水硫酸ナトリウムはフタル酸エステル用のものであっても、使用前には加熱処理し、清浄な環境で放冷したものを使用した。しかし、長期間保存すると、室内空気から再度汚染される可能性があるため、基本的には塩析も脱水も行わない分析法とすることが望ましい。

器具類の洗浄等に使用する水は超純水を用い、また、操作ブランクに使用する水は超純水を活性炭(EDS-Pak)処理した後、必要に応じて、さらに、ヘキサン洗浄した。

加熱処理できるガラス器具類は、溶媒(アセトンとヘキサン)洗浄後、乾燥させ、250℃で3時間程度加熱処理した後、放冷し、できるだけ早めに使用することによりブランクを低く管理することができた。

分析操作で汚染を受ける可能性が考えられたのは、駒込ピペットのゴム球と操作を行う人の手指が考えられた。素手で分析を行うと、極微量のフタル酸エステルが検出されることがあり、ブランクを一定にコントロールすることは非常に困難であった。今回、試薬やガラス器具等のブランク管理を十分行った状態で、分析操作時に手袋をしないで低濃度試料を分析したときのフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)のばらつきを図5に示す。操作ブランクである超純水にも0.010 $\mu$ g/L程度検出され、変動係数も15%を超過し、測定結果は比較的ばらついていた。実際の河川試料の変動係数は、試料水の濃度が高くなるほど小さくなる傾向があり、0.025 $\mu$ g/L程度であれば変動係数が10%を下回り、安定した測定値が得られた。

その原因を確認するために、手指にヘキサンを1mL滴下してGC/MSで分析したところ、図6に示すとおり、非常に高濃度のフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)が検出され、分析工程での最大の汚染源は分析者の手指である可能性

が示唆された。このためフタル酸エステル類の分析を行う際には、試料採取から分析操作のすべての工程において、素手でガラス器具等を取り扱えないと判断した。次に、手指からの汚染を避けるために手袋の汚染状況を手指と同様の方法で確認したところ、ニトリル手袋にはフタル酸エステルはほとんど検出されなかったことから、分析のすべての工程でニトリル手袋を着用することとした。その結果、操作ブランクはほとんど検出されなくなった。操作ブランクのクロマトグラムを図7に示す。

また、フタル酸エステルの分析では、GC/MS測定時にブランクピークが検出される場合<sup>3)</sup>もあるが、今回の検討時には装置由来のブランクピークはまったく検出されなかった。当センターでは、日常的に比較的清潔な試料と汚染の程度が著しい試料では分析装置の使用を目的により使い分けていることや、ピークのテーリング等が生じた場合には、頻繁に注入口周辺の洗浄と部品の交換を実施し、装置のメンテナンスを十分に行っているため装置由来のブランクが検出されなかったものと考えられた。

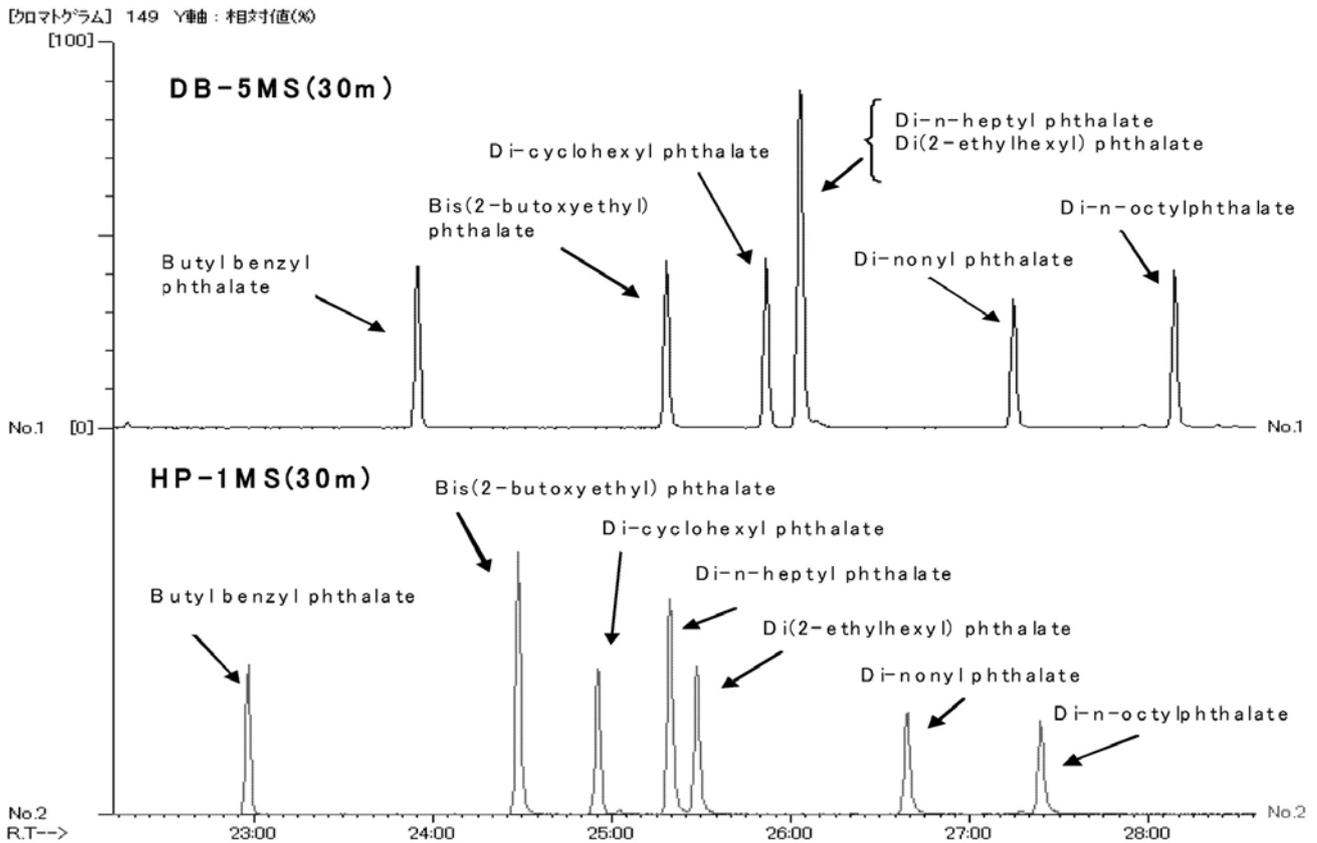


図2 GCカラムの比較

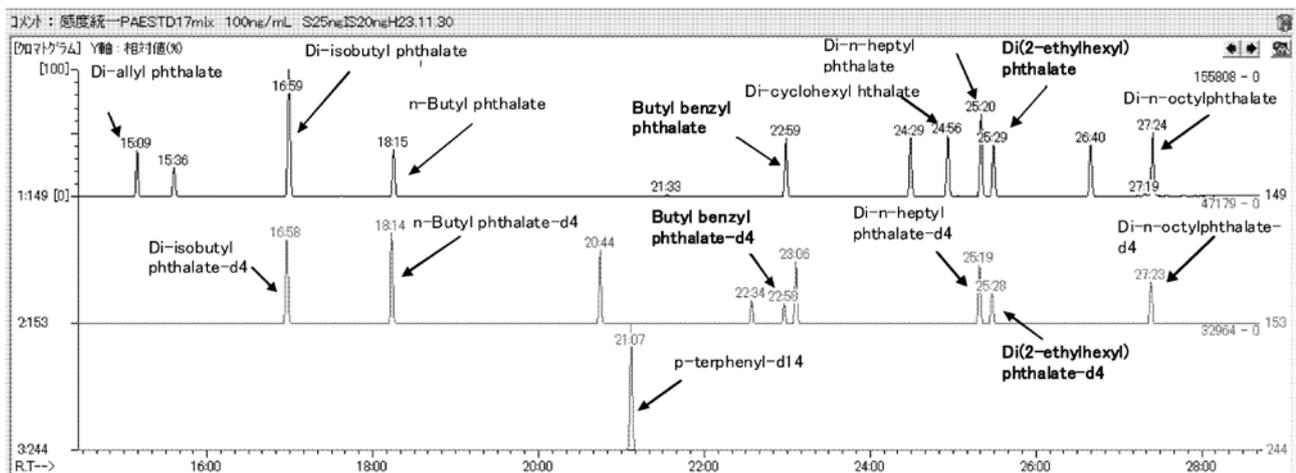


図3 標準物質のクロマトグラム

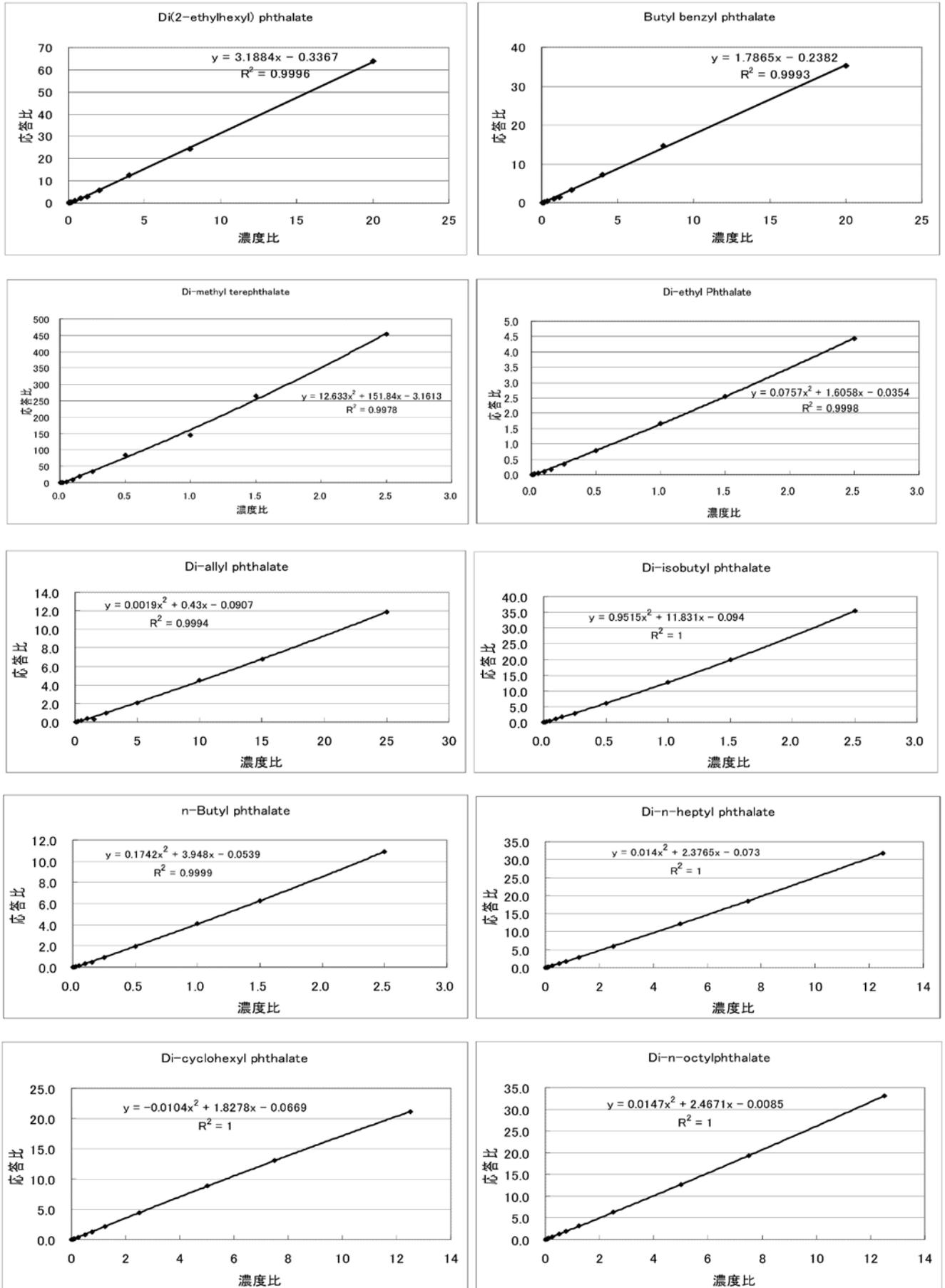


図4 検量線

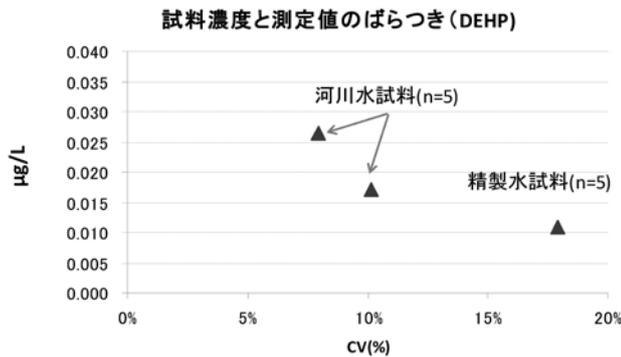


図5 フタル酸ジ (2-エチルヘキシル) 濃度による測定値のばらつき

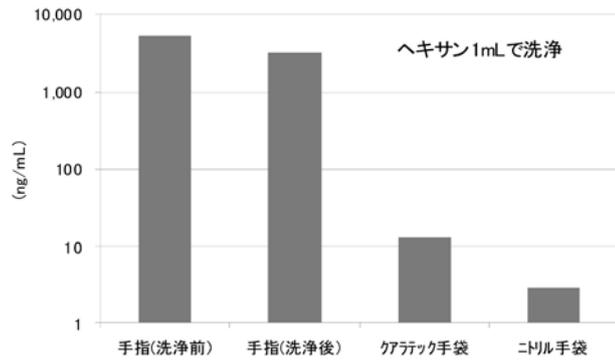


図6 フタル酸ジ (2-エチルヘキシル) の汚染状況

### 3.3 抽出方法及びクリーンアップの検討結果

メスフラスコを用いたヘキサンスターラー攪拌抽出法と分液ロートを用いたジクロロメタン振とう抽出法の添加回収試験結果を図8と図9に示す。ヘキサンスターラー攪拌抽出法では、比較的分子量が小さく水溶性が高いテレフタル酸ジメチルとフタル酸ジエチルの回収率は40%未満と低くかった。また、フタル酸ジアリルの回収率も60%程度であり、スターラー攪拌が十分でない抽出率が低くなる傾向が見られた。なお、今回の検討では塩析を行わなかったことから、河川水の回収率は海水の回収率に比べて若干低い傾向が見られた。ジクロロメタン振とう抽出法では、分液ロートを加熱処理しなかったことや塩化ナトリウムと無

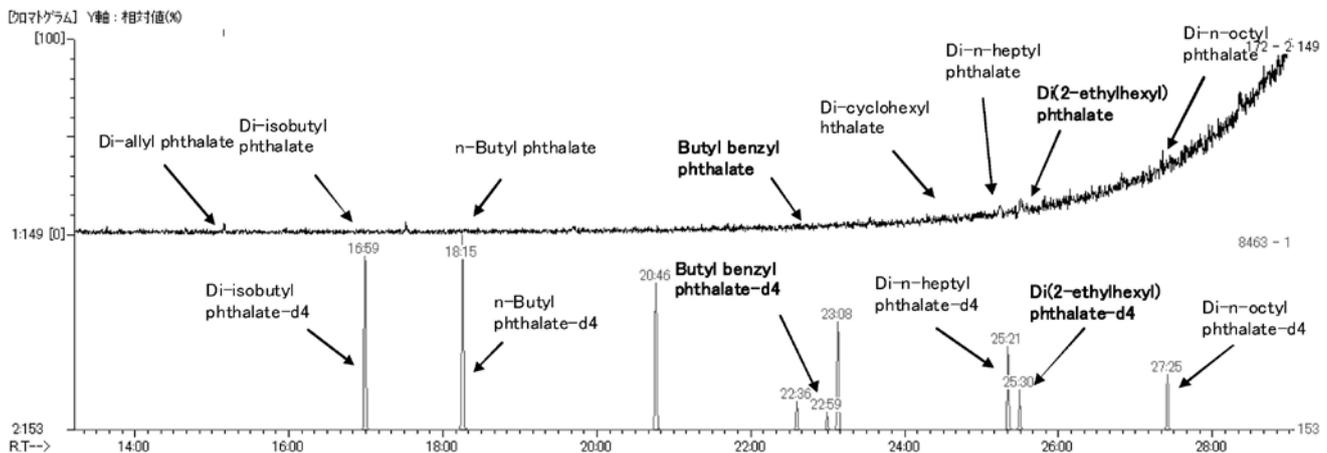


図7 操作ブランクのクロマトグラム

水硫酸ナトリウムの添加や、ロータリーエバポレーターの使用等の操作工程が増加したことにより、フタル酸ジ-n-ブチルやフタル酸ジ (2-エチルヘキシル) 等の汚染をコントロールできず、回収率が100%を大きく超過した。

2種類の抽出方法を検討した結果、操作ブランクが懸念される物質でヘキサンによる抽出率に問題のないフタル酸エステルは、ヘキサンスターラー攪拌抽出法が適用できると考えられた。一方、ヘキサン抽出率が悪いが、操作ブランクが検出されないフタル酸エステルは、ジクロロメタン振とう抽出法が適用できると考えられた。

シリカゲルカートリッジカラム (Supelclean LC-Si 1 g) の溶出パターンを図10に示す。アセトン及びヘキサンで洗浄したカートリッジカラムに標準物質 (d体) を10ng添加し、溶出液を順次、流したところ、5%アセトン/ヘキサン5mLの画分に溶出したが、試料95mLを2mLヘキサンで抽出することから濃縮倍率が低く、妨害物質がない限りは、汚染の原因となる可能性があるクリーンアップ操作は省略するほうが望ましいと考えられた。なお、カートリッジカラムは、ガラス製であっても使用しているテフロンフリットから妨害物質が溶出することがあるため、あらかじめアセトンで洗浄した後、再度、ヘキサンで十分置換してから使用する必要があった。

### 3.4 分解性スクリーニング試験及び保存性試験結果

分解性スクリーニング試験結果を表3に示す。7日後程度であれば、いずれのフタル酸エステルも分解はほとんど認められなかった。

保存性試験結果を表4に示す。1ヶ月経過した後、フタル酸ジアリルを除いて残存率は70%以上であった。フタル酸ジアリルの残存率が低くなった原因は、ヘキサンスターラー攪拌抽出法を行う際、攪拌が不十分で、抽出率が低下した可能性が考えられた。

また、標準物質を添加しない超純水だけの保存性試験結

果を図11に示す。14日後までは目立った操作ブランクは見られなかったが、1ヶ月経過した際の精製水からはフタル酸ジエチルやフタル酸ジアリル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)が検出され、冷蔵庫での保存中に汚染された可能性が考えられた。したがって、分解する可能性は少ないが、保存中に汚染を受ける可能性があることを考慮すれば、試料採取後は数日中には分析するのが望ましいと考えられた。

### 3.5 IDL及び分析法のMDLとMQL

IDL及びMDL, MQLを表5に示す。IDLは0.00023~0.013 µg/L, MDLは0.0013~0.040 µg/L, MQLは0.0034~0.10 µg/Lであり、徹底したブランク管理と分析操作の簡略化により従来の分析方法に比べてかなり定量下限値を下げる事ができた。

### 3.6 添加回収試験

添加回収試験結果を表6に示す。回収率は62~111%と比較的良好な結果であった。

サロゲートの回収率も69~90%であり、特に問題はなかった。

表3 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	1時間後の 残存率(%)	7日後の残存率(%)	
			暗所	明所
Di-allyl phthalate	pH5	88	90	104
	pH7	89	79	98
	pH9	97	83	76
Di-isobutyl phthalate	pH5	88	90	105
	pH7	90	80	99
	pH9	99	86	78
n-Butyl phthalate	pH5	104	99	112
	pH7	106	70	109
	pH9	116	104	97
Butyl benzyl phthalate	pH5	93	88	97
	pH7	96	71	95
	pH9	84	76	87
Di-n-heptyl phthalate	pH5	83	88	97
	pH7	95	53	98
	pH9	94	105	106
Di-cyclohexyl phthalate	pH5	87	86	101
	pH7	97	60	97
	pH9	102	108	109
Di(2-ethylhexyl) phthalate	pH5	90	89	106
	pH7	103	61	87
	pH9	98	90	104
Di-n-octylphthalate	pH5	79	75	94
	pH7	85	54	74
	pH9	89	72	84

初期濃度0.42 µg/L

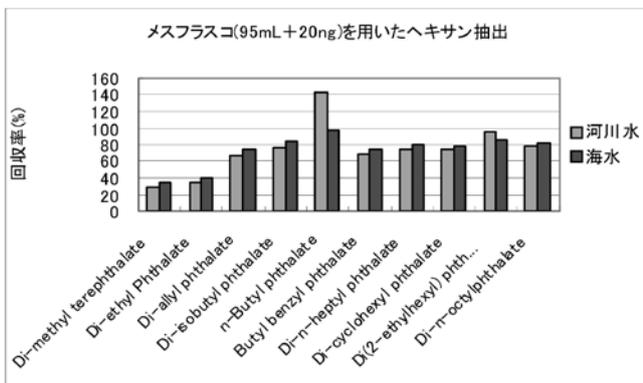


図8 ヘキサンスターラー攪拌抽出法の回収率

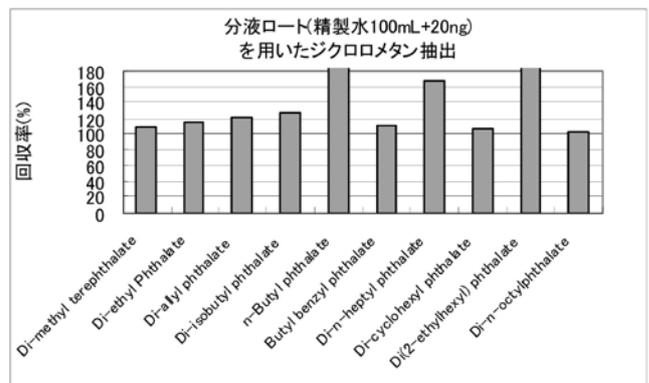


図9 ジクロロメタン振とう抽出法の回収率

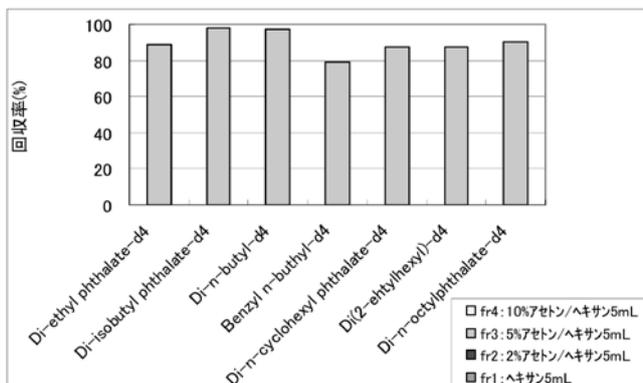


図10 シリカゲルカートリッジカラムの溶出パターン

表4 保存性試験結果

	試料	1時間後	1日後	3日後	6日後	14日後	1ヶ月後
Di-allyl phthalate	河川水	66	68	60	58	55	54
	海水	75	72	75	70	61	58
Di-isobutyl phthalate	河川水	74	79	81	79	81	91
	海水	83	71	89	84	81	93
n-Butyl phthalate	河川水	101	87	85	81	87	94
	海水	96	77	100	95	87	98
Butyl benzyl phthalate	河川水	73	71	74	74	73	77
	海水	75	77	85	83	77	90
Di-n-heptyl phthalate	河川水	73	76	81	82	79	54
	海水	80	65	87	86	81	89
Di-cyclohexyl phthalate	河川水	70	74	77	79	81	97
	海水	79	63	88	85	82	93
Di(2-ethylhexyl) phthalate	河川水	93	86	93	90	92	112
	海水	87	92	93	94	85	97
Di-n-octylphthalate	河川水	76	76	84	84	80	74
	海水	81	80	88	89	82	89

初期濃度0.21 μg

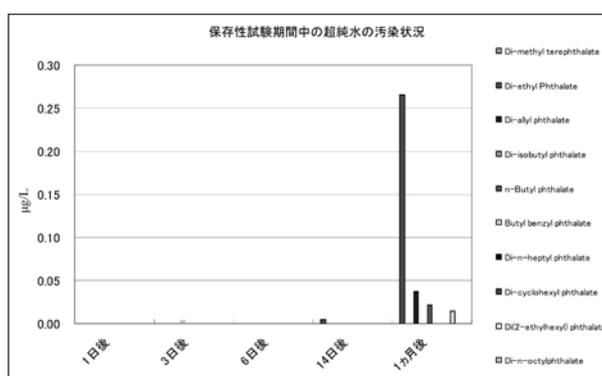


図11 保存性試験期間中の超純水の汚染状況

表5 IDL及びMDL, MQL

	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	IDL (μg/L)	MDL (μg/L)	MQL (μg/L)
Di-methyl terephthalate*	100	1.00	0.00052	0.0013	0.0034
Di-ethyl phthalate*	100	1.00	0.00023	0.0016	0.0040
Butyl benzyl phthalate	95	2.00	0.013	0.033	0.085
Di(2-ethylhexyl) phthalate	95	2.00	0.0076	0.014	0.035
Di-allyl phthalate	95	2.00	0.011	0.040	0.10
Di-isobutyl phthalate	95	2.00	0.00048	0.0051	0.013
n-Butyl phthalate	95	2.00	0.00057	0.0045	0.012
Di-n-heptyl phthalate	95	2.00	0.0042	0.026	0.067
Di-cyclohexyl phthalate	95	2.00	0.0036	0.024	0.063
Di-n-octyl phthalate	95	2.00	0.0024	0.028	0.073

\*：分液ロートをを用いたジクロロメタン振とう抽出法

表6 添加回収試験結果

試料	物質名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	検対数	検出濃度 (μg/L)	回収率 (%)	サロゲート 回収率
河川水	Butyl benzyl phthalate	95	40	6	0.45	107	88
	Di(2-ethylhexyl) phthalate	95	40	6	0.48	108	90
	Di-allyl phthalate	95	10	6	0.065	62	-
	Di-isobutyl phthalate	95	1	6	0.0082	78	84
	n-Butyl phthalate	95	1	6	0.0081	77	86
	Di-n-heptyl phthalate	95	5	6	0.043	83	78
	Di-cyclohexyl phthalate	95	5	6	0.043	81	75
	Di-n-octylphthalate	95	5	6	0.050	95	69
海水	Butyl benzyl phthalate	95	40	6	0.47	111	85
	Di(2-ethylhexyl) phthalate	95	40	6	0.49	111	85

## 4 まとめ

フタル酸ブチルベンジル及びフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)を含むフタル酸エステル10種の水質分析法について検討し、次の結果を得た。

- 1) フタル酸エステルを分析する際の最大の汚染源は分析者の手指であることが確認された。汚染の少ないニトリル手袋を使用することにより、前処理工程で汚染されることが多いフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)等の操作ブランクが検出されない分析方法が確立できた。
- 2) テレフタル酸ジメチルとフタル酸ジエチル以外の8種類のフタル酸エステルは、ブランクを管理するため、使用するガラス器具はメスフラスコとパスツールピペットだけで、塩析も行わず、サロゲートと抽出溶媒のヘキサンを添加し、回転子によりスターラー攪拌して抽出する非常にシンプルな分析方法とした。
- 3) 汚染の少ないテレフタル酸ジメチルとフタル酸ジエチルは、ヘキサンスターラー攪拌抽出法では抽出率が悪く、分液ロートを用いたジクロロメタン振とう抽出法が適用できた。
- 4) 徹底したブランク管理と操作法の簡略化により、MDLは0.0013~0.040  $\mu\text{g/L}$ 、MQLは0.0034~0.10  $\mu\text{g/L}$ となり、従来の分析方法に比べてかなり定量下限値を下げ

ることができた。

なお、本研究は環境省委託の平成23年度化学物質環境実態調査と連携して実施した。

## 文 献

- 1) 環境庁環境保健部環境安全課：化学物質と環境 平成11年度化学物質分析法開発調査報告書 129-144 2000
- 2) 日本規格協会：工業用水・工場排水中のフタル酸エステル類の試験法 JIS K 0450-30-10 2006
- 3) 笠井信善ら：環境中の化学物質の測定方法に関する研究(第4報) 富山県環境科学センター年報 研究報告 第31-2号 14-19 2003



【調査研究】

## 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

—LC/MS/MSを用いた生物中農薬の分析法の検討—

Study for Simultaneous Analysis Method of Pesticides in Organism by LC/MS/MS

大月史彦, 浦山豊弘, 吉岡敏行, 山辺真一, 坂口浩範, 劔持堅志

Fumihiko Otsuki, Toyohiro Urayama, Toshiyuki Yoshioka, Shinichi Yamabe, Hironori Sakaguchi,  
Katashi Kenmotsu (Department of Water)

### 要 旨

環境試料（生物中）における農薬2種類（フルフェノックスロン、フルアジナム）の同時分析法について検討した。

分析法は生物試料を有機溶媒で抽出後、リン酸緩衝液等で夾雑物を除去し、更にヘキサン/アセトニトリル分配で脱脂したのち定容した。その一部を分取し、ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub>のデュアルレイヤー固相カートリッジで精製しLC/MS/MS（SRM法）で測定する方法とした。

LC/MSの機種によっては、著しいマトリックス効果が起こり、マトリックス検量線の使用が必要であった。その場合検量線標準溶液の保存性に留意する等の注意を要するが、本分析法は要求感度を満足する検出下限値が得られ、回収率や保存性等の試験も良好であった。また、環境試料を分析したところ、いずれの農薬も検出されなかった。

[キーワード：農薬, マトリックス効果, LC/MS/MS法]

[Key words : Pesticides, Matrix Effect, LC/MS/MS]

## 1 はじめに

フルフェノックスロン及びフルアジナムは、近年使用されている農薬であるが、環境に及ぼす影響等の実態はよくわかっていない。今回、当該物質が環境省の実施する化学物質環境実態調査の調査対象物質として選定され、本県に分析法の開発が委託されたことから、当該調査と連携して当該物質をLC/MS/MSを用いて分析する方法を検討し、マトリックス効果等について知見を得るとともに、環境試料の濃度レベルを測定したので報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試薬

フルフェノックスロン

和光純薬工業製（残留農薬試験用, 98.0%）

フルアジナム

和光純薬工業製（残留農薬試験用, 97.0%）

メタノール, ギ酸

LC/MS用

アセトン, ヘキサン, 酢酸エチル, アセトニトリル, トルエン

5000倍濃縮検定品

精製水

ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調製

塩化ナトリウム, 無水硫酸ナトリウム

残留農薬・PCB試験用

リン酸二水素カリウム, リン酸水素二カリウム

特級

固相カートリッジ

SUPELCO製ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (500mg/500mg)

NaCl飽和0.5Mリン酸緩衝液 (pH=7.0)

リン酸水素二カリウムを52.7 g, リン酸二水素カリウムを30.2 gそれぞれ量りとり, 1 L弱の精製水で溶かす。これをNaOHでpH=7.0に調整後, 塩化ナトリウムを飽和量入れ, 1 Lにメスアップする。(以下「リン酸バッファー」という。)

### 2.2 LC/MSの測定条件

LC/MSの測定条件を次に示す。

(LC条件)

カラム

Atlantis T3 150mm×2.1mm, 3μm (Waters製)

移動相

A (0.35%ギ酸) : B (メタノール)

0~2min A : B = 95 : 5  
 2~7min A : 95→5  
 B : 5→95 linear gradient  
 7~20mi A : B = 5 : 95  
 20~20.1min A : 5→95  
 B : 95→5 linear gradient  
 20.1~30min A : B = 95 : 5  
 流 量 0.2mL/min  
 カラム温度 40℃  
 注 入 量 10μL

**(MS条件)**

使用機種 Micromass Quattro micro API  
 キャピラリー電圧 0.5kV  
 ソース温度 100℃  
 デゾルベーション温度 500℃  
 コーンガス流量 50L/hr  
 デゾルベーションガス流量600L/hr  
 イオン化法 ESI Positive (フルフェノクスロン)  
 ESI Negative (フルアジナム)  
 コーン電圧 30V (フルフェノクスロン)  
 30V (フルアジナム)  
 コリジョンエネルギー 20eV (フルフェノクスロン)  
 20eV (フルアジナム)  
 モニターイオン 488.9>157.8 (フルフェノクスロン)  
 462.9>415.7 (フルアジナム)

**2.3 分析法**

図1に示す分析法について検討した。

生物試料10gを100mLのコニカルビーカーにとり、アセトン：ヘキサン=1：2を50mL加える。これを1minホモジナイズする。その後、吸引濾過し、濾紙上の残渣を25mLのアセトン：ヘキサン=1：2を用いて洗浄する。

40℃以下で乾固直前まで濃縮し、これに酢酸エチル：アセトニトリル=3：1を50mL、リン酸バッファーを50mL、塩化ナトリウムを1~2g加え、5min振とうして洗浄する。静置後、有機溶媒層をとる。水層に酢酸エチル：アセトニトリル=3：1を50mL再度加え、同様の操作を実施する。有機溶媒層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、石英ガラスをフィルターとした漏斗でろ過する。

40℃以下で乾固直前まで濃縮し、これにアセトニトリル飽和ヘキサンを25mL、ヘキサン飽和アセトニトリルを30mL加え、5min振とうする。静置後、アセトニトリル層をとる。ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリルを30mL再度加え、同様の操作を合計3回実施する。アセトニトリル層を合わせ、40℃以下で50mL以下に濃縮しヘキサンを除去したのち、アセトニトリルで100mLに定容する。

このうち、20mLを分取し、20mLのトルエン：アセトニトリル=1：3であらかじめコンディショニング済みのENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (500mg/500mg) 固相に負荷する。この時流出する負荷液もとる。負荷後20mLのトルエン：アセトニトリル=1：3で溶出し、40℃以下で1mL程度まで濃縮する。10mLのアセトンを加え同様に1mL程度まで濃

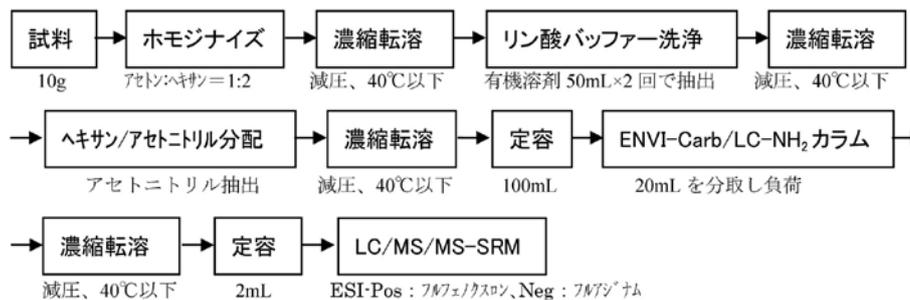


図1 分析法のフローチャート

表1 マトリックス効果の装置による違い (Matrix有り/Matrix無しの相対%)

装置	Micromass Quattro micro API				AppliedAPI3200
	0.35%ギ酸		5mMCH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>		5mMCH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>
カラム	T3	Xterra	T3	Xterra	Xterra
フルフェノクスロン	38	51	50	47	96
フルアジナム	103	117	107	112	※

■は本開発での条件。

※AppliedAPI3200は臨時に借りたため、回収率が良好なフルアジナムは測定せず。

縮する。10mLのなし型フラスコに移し、再度5mLのアセトンを加え0.5mL程度まで濃縮する。これに40℃以下の乾燥窒素を吹き付けて乾固させる。

残渣に50%アセトニトリル溶液2mLを加え、0.45μmのフィルターでろ過したものを試料液とする。

なお、検量線作成用マトリックス抽出液については、上記と同様の操作を、検量線を希釈作成するのに十分な量が得られるだけ複数回繰り返した後、得られた抽出液を混合均一化したものを用いた。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 マトリックス効果の検討

フルフェノクスロンで見かけ上の回収率の低下が生じたため、マトリックス効果について各種の検討を実施した。

##### 3.1.1 マトリックス効果の装置による違いの検討

マトリックス効果の装置による違いについて検討を行った結果を表1に示す。50%アセトニトリル溶液と、同組成のマトリックス含有溶液に標準物質を1ng/mLの濃度で添加し、マトリックス効果を確認した。Micromass Quattro micro APIではカラム、移動相によらず著しいイオン化抑制が生じたが、AppliedAPI3200ではイオン化抑制はほぼ起こらなかった。装置により、マトリックス効果が著しく異なる場合があるとの結果が得られた。

#### 3.1.2 マトリックス効果の標準濃度依存性の検討

マトリックス効果の標準濃度依存性について検討を行った結果を表2に示す。フルフェノクスロンは、濃度によらずイオン化抑制のマトリックス効果がほぼ一定であり、フルアジナムは、高濃度でマトリックス効果によりイオン化が増進されていることがわかった。

#### 3.1.3 マトリックス効果のマトリックス希釈率依存性の検討

マトリックス効果のマトリックス希釈率依存性について検討を行った結果を表3に示す。添加濃度1ng/mLでマトリックス液の希釈率依存性を確認した。マトリックスの希釈率が変わると、マトリックス効果の程度が変わることから、マトリックス液は希釈できないことがわかった。

#### 3.1.4 マトリックス効果のマトリックス種依存性の検討

マトリックス効果のマトリックス種依存性について検討を行った結果を表4に示す。添加濃度1ng/mLでマトリックス液のマトリックス種依存性を確認した。マトリックスの種類が変わると、マトリックス効果の程度が変わることから、分析対象に応じてマトリックス検量線を作る必要があることがわかった。

表2 マトリックス効果の濃度依存性 (Matrix有り/Matrix無しの相対%)

濃度 ng/mL	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10	20	50	100
フルフェノクスロン	46	24	27	27	37	31	32	35	31	29	28	29	33
フルアジナム	56	68	81	83	94	98	98	103	103	115	123	154	196

表3 マトリックス液希釈倍率依存性確認 (Matrix有り/Matrix無しの相対%)

希釈倍率	抽出液原液	2倍希釈	5倍希釈	10倍希釈	マトリックス無し
フルフェノクスロン	40	51	70	77	100
フルアジナム	100	101	101	96	100

表4 マトリックス液種類依存性確認 (Matrix有り/Matrix無しの相対%)

種類	ヒラメ	マス	コイ	サーモン	アサリ	鶏肉	ボラ
フルフェノクスロン	78	70	86	67	52	64	52
フルアジナム	112	111	109	111	112	116	113

表5 添加回収試験結果

試料名	物質名	試料量 (g-wet)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度 (ng/g-wet)	回収率 (%)	変動係数 (%)
ボラ	フルフェノクスロン	10	無添加	1	ND	—	—
		10	3	5	0.284	95	6.8
	フルアジナム	10	無添加	1	ND	—	—
		10	3	5	0.213	71	9.5

表6 保存性試験結果

物質名	試料名	初期濃度 (ng/mL)	残存率(%)				
			6日	12日	14日	17日	28日
フルフェノクスロン	標準溶液	0.1	—	—	—	—	92
		50	—	—	—	—	99
	マトリックス標準 (ボラ)	0.1	111	128	—	65	0
		50	103	117	—	85	33
		※粗抽出液 (ボラ)	0.1	—	—	95	—
フルアジナム	標準溶液	0.1	—	—	—	—	89
		50	—	—	—	—	102
	マトリックス標準 (ボラ)	0.1	115	136	—	110	0
		50	106	138	—	107	23
		※粗抽出液 (ボラ)	0.1	—	—	93	—

※粗抽出液は「2.3 分析法」中の「アセトニトリルで100mLに定容する。」まで実施したものとし、この粗抽出液20mLに0.2ngの標準を添加した。添加した粗抽出液を0日、14日保存後、カラム以降の前処理を実施した。

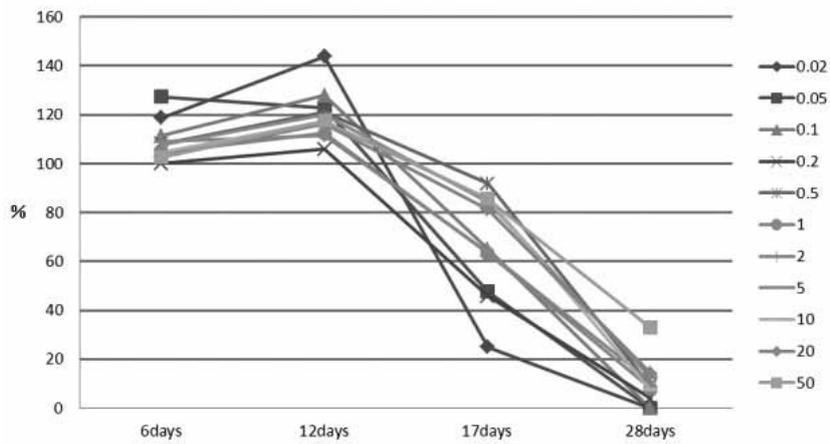


図2 マトリックス標準の残存率 (フルフェノクスロン)

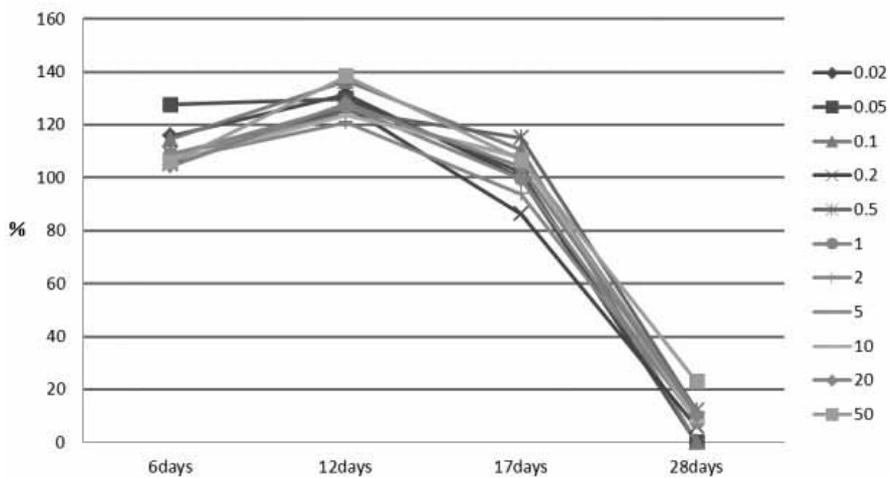


図3 マトリックス標準の残存率 (フルアジナム)

### 3.2 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表5に示す。添加回収試験には水島沖において採取されたボラを使用した。フルフェノクスロン、フルアジナムともに良好な添加回収試験結果が得られた。

### 3.3 保存性試験結果

保存性試験結果を表6に示す。また、マトリックス標準液の各濃度における残存率を図2, 3に示す。

マトリックスの入っていない標準溶液の保存性は良好であり、マトリックス標準液は約2週間程度までは保存性が良好であった。また、粗抽出液による試験において、14日後の保存性が良好であるのも、この傾向と一致している。このことから、溶液を調整後、2週間以内での測定が必要であることがわかった。

### 3.4 環境試料の分析結果

平成23年8月に採取した環境試料の生物（水島沖のボラ）から対象物質は検出されなかった。定量下限はフルフェノクスロンが $0.025\text{ng/g-wet}$ 、フルアジナムが $0.032\text{ng/g-wet}$ であった。

## 4 まとめ

生物中の農薬2種の同時分析法を検討し、次の結果を得た。

- 1) LC/MSの機種によっては、著しいマトリックス効果が起こり、マトリックス検量線等を用いる必要があった。
- 2) マトリックス効果の程度は、装置、標準濃度、マトリックスの種類及び濃度などで変化するため適切なマトリックス検量線を用いる等の注意が必要であった。
- 3) 添加回収試験結果は良好であった。
- 4) 保存性試験結果から、溶液を調整後、約2週間以内での測定が必要であることがわかった。
- 5) 環境試料の生物（水島沖のボラ）から対象物質は検出されなかった。

なお、本研究は環境省委託の平成23年度化学物質分析法開発調査（環境省環境安全課）と連携して実施した。

## 文 献

- 1) 環境省総合環境政策局環境保全部環境安全課：化学物質環境汚染実態調査の手引き（平成20年度版），平成21年3月，2009
- 2) 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「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農作物）、フルアジナム試験法、フルフェノクスロン試験法」，食安発第0124001号，平成17年1月24日，2005
- 3) 環境庁告示：フルアジナム試験法，環境庁告示第32号，平成12年4月28日，2000
- 4) 環境庁告示：フルフェノクスロン試験法，環境庁告示第20号（号外第84号），平成9年4月30日，1997



【調査研究】

## 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

—LC/MS/MSを用いた水質中ポリ-*tert*-ブチルフェノール類の同時分析法の検討—  
Study for Simultaneous Analysis Method of Poly-*tert*-butyl phenols in Water by LC/MS/MS

大月史彦, 吉岡敏行, 山辺真一, 坂口浩範, 剣持堅志  
Fumihiko Otsuki, Toshiyuki Yoshioka, Shinichi Yamabe, Hironori Sakaguchi,  
Katashi Kenmotsu (Department of Water)

### 要 旨

環境試料(水質中)のポリ-*tert*-ブチルフェノール類4種の多成分同時分析法について検討した。

分析法はヘキサンで抽出後, アセトニトリルに転溶しLC/MS/MS (SRM法) で測定する方法とした。各種溶媒, バイアルセプタム等に対象物質が含まれており, これらの影響を除外するための様々な対策が必要であった。

開発した分析法では, 要求感度を満足する検出下限値が得られ, 回収率や保存性等の試験も良好であった。また, 環境試料を分析したところ, いずれの物質も検出されなかった。

[キーワード: ポリ-*tert*-ブチルフェノール類, 一斉分析, LC/MS/MS法]

[Key words: Poly-*tert*-butyl phenols, Simultaneous Determination, LC/MS/MS]

## 1 はじめに

2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールは, 魚毒性が強く, また難分解性有害化学物質のおそれも想定されている物質であるが, 環境に及ぼす影響等の実態はよくわかっていない。今回, 当該物質が環境省の実施する化学物質環境実態調査の調査対象物質として選定され, 本県に分析法の開発が委託されたことから, 当該物質を含め4種類のポリ-*tert*-ブチルフェノール類について, 当該調査と連携して, LC/MS/MSを用いて同時分析する方法を検討するとともに, 環境試料の濃度レベルを測定したので報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試薬

2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール

東京化成工業製

2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール

東京化成工業製

3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノール

MP Biomedicals製 (輸入元: 和光純薬工業)

2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノール

東京化成工業製

アスコルビン酸

試薬特級 (和光純薬工業製)

無水硫酸ナトリウム

残留農薬・PCB試験用 (関東化学製)

塩酸 1 mol/Lに調整済みの市販品

アセトニトリル, メタノール LC/MS用

ヘキサン 5000倍濃縮検定品

精製水 ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調製

### 2.2 LC/MSの測定条件

LC/MSの測定条件を次に示す。

#### (LC条件)

カラム

Atlantis T3 150mm×2.1mm, 3μm (Waters製)

移動相

A (水) : B (アセトニトリル)

0~18min A : B = 30 : 70

18~18.5min A : 30→0

B : 70→100 linear gradient

18.5~27min A : B = 0 : 100

27~27.5min A : 0→30

B : 100→70 linear gradient

27.5~40min A : B = 30 : 70

流量 0.2mL/min

カラム温度 40℃

注入量 10μL

(MS条件)

使用機種 Micromass Quattro micro API

キャピラリー電圧 3.0kV

ソース温度 100℃

デゾルベーション温度 500℃

コーンガス流量 50L/hr

デゾルベーションガス流量 600L/hr

イオン化法

ESI Negative (2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール)

ESI Negative (2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)

ESI Negative (3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノール)

ESI Negative (2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノール)

コーン電圧

40V (2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール)

40V (2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)

40V (3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノール)

40V (2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノール)

コリジョンエネルギー

20eV (2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール)

20eV (2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)

20eV (3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノール)

20eV (2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノール)

モニターイオン

205.17>205.17 (2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール)

205.17>205.17 (2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)

205.17>205.17 (3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノール)

261.22>261.22 (2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノール)

2.3 分析法

図1に示す分析法について検討した。

水質試料100mLにアスコルビン酸0.2gを添加し混合する。これを希塩酸でpH2に調整し、ヘキサン10mLを加え、5min振とう抽出する。水層を捨て、ヘキサン層に精製水10mLを加え振とう洗浄する。ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム充填のロートを用いて濾過脱水した後、アセトニトリル10mLを加え、40℃以下で5mL以下まで濃縮し、これをアセトニトリルで10mLに定容し、試験溶液とする。

3 結果及び考察

3.1 各種条件の検討結果

3.1.1 移動相溶媒と質量分析条件の検討

移動相溶媒と質量分析条件の検討を行った結果を表1に示す。100ng/mLの2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールの標準溶液を用いて確認したところ、移動相溶媒をアセトニトリルとし、SRMで二重にフィルターをかける形の205>205の質量数の分析で、最も良好なS/N比が得られ、これを条件とした。また、205>189の質量数は対象物質からフェノールの酸素原子が外れるという、物質の構造を示す特有のピークと推測され確認イオンとして最適であると考えられた。

3.1.2 HPLC条件の検討

HPLC条件の検討を行った結果を表2と図2に示す。移動相溶媒、溶出モードを変更して各物質の分離状況と2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールのブランクを確認したところ、移動相溶媒をアセトニトリルとし、溶出モードをアイソクラティックとすることで、良好な分離とブランクが得られた。グラジエントでブランクのピークが検出されるのは、

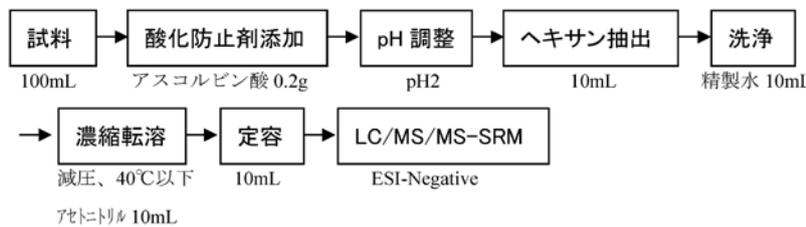


図1 分析法のフローチャート

表1 各条件における2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールのS/N比 (各最適条件化済み)

定量方法	SRM			
	SIM	205>189	205>205	
モニターイオン	205	205>189	205>205	
移動相溶媒	アセトニトリル	200	130	830
	メタノール	100	85	520

■は本開発での条件。

3.1.3の検討結果から、移動相溶媒中の不純物等に由来するものと考えられた。

### 3.1.3 ブランクの検討

各種の実験時に、2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールがブランクで検出されたため、ブランクについての検討を実施した。当該物質は酸化防止剤の中間体として、幅広いところで用いられていることから、様々な場所での汚染が想定された。

装置に標準溶液を繰り返し注入するとピーク強度が上昇したため、バイアルの蓋からの汚染を確認したところ、セプタムから汚染が起きていることがわかった。テフロン

製のセプタムを使用することにより、対処できた。結果を表3と図3、4に示す。

また、グラジエント条件でブランクから検出されたことから、溶媒からの汚染が疑われたため、ガラスの器具を用いて、溶媒をエバポレーターで100倍濃縮し確認したところ、表4のとおり、すべての溶媒から2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールが測定装置の検出限界と同程度のレベルで確認された。このため、前処理は抽出溶媒をあまり濃縮せず、かつ必要最小量を用いることとした。

表2 HPLC条件の検討結果（各物質の分離状況）

	溶出モード	グラジエント	アイソクラティック
移動相溶媒	アセトニトリル	Blank で検出、分離良好	Blank で未検出、分離良好
	メタノール	Blank で検出、分離良好	Blank で未検出、分離不良

は本開発での条件。

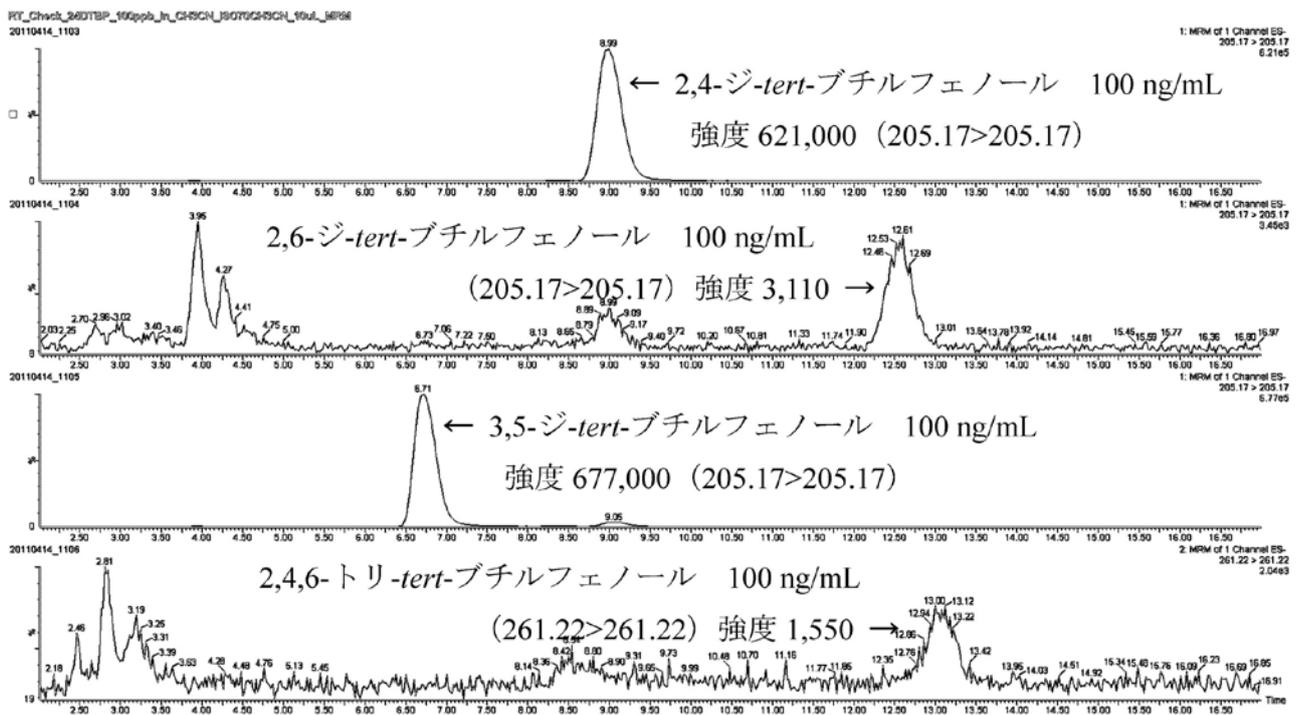


図2 各物質の分離状況と強度

表3 バイアル蓋（セプタム）からの検出状況（ng/mL）

	A社 赤色	A社 青色	A社 緑色	W社 赤色	W社 青色	W社 緑色	W社 白色	S社 黒色	S社 テフロン1	S社 テフロン2
24DTBP	25.5	19.1	36.4	25.1	32.7	21.8	40.5	12.0	ND	ND
26DTBP	10.2	ND	ND							
35DTBP	ND	ND								
246DTBP	ND	ND								

セプタムを4つに切り、5mLのアセトニトリルで3.5時間振とう抽出した上澄みを測定。

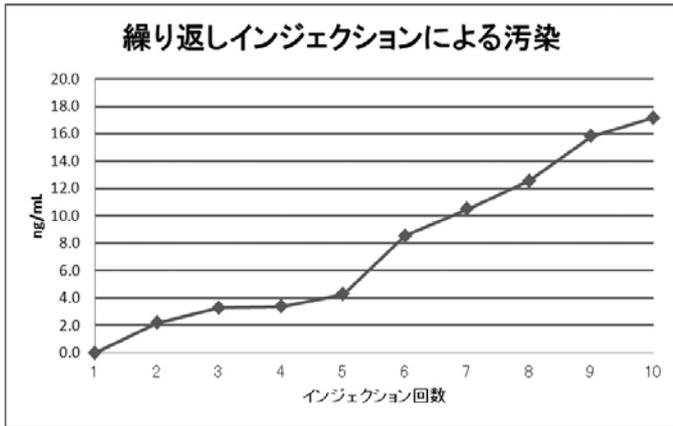


図3 繰り返しによる汚染 (W社白色蓋)

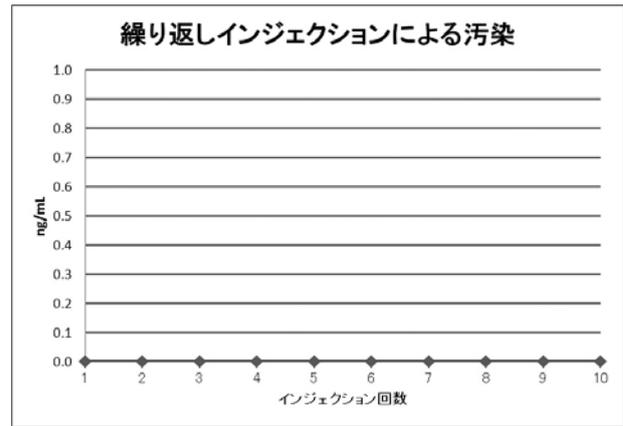


図4 繰り返しによる汚染 (S社テフロン1)

表4 溶媒からの検出状況 (ng/mL)

	W社 LC/MS CH <sub>3</sub> CN Lot1	W社 LC/MS CH <sub>3</sub> CN Lot2	W社 5000 CH <sub>3</sub> CN	W社 707M CH <sub>3</sub> CN	W社 LC/MS CH <sub>3</sub> OH	W社 5000 CH <sub>3</sub> OH	K社 LC/MS CH <sub>3</sub> OH	K社 5000 CH <sub>3</sub> OH	W社 5000 ヘキサン	W社 5000 7ピトン
24DTBP	0.160	0.208	0.061	0.189	0.180	0.142	0.124	0.172	0.158	0.137
26DTBP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
35DTBP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
246DTBP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Sample17\_4Mix\_24\_26\_35\_246TBP\_in\_CH3CN\_ISO70CH3CN\_10uL\_MRM\_Check\_Recovery\_MilliQ\_BL\_0p

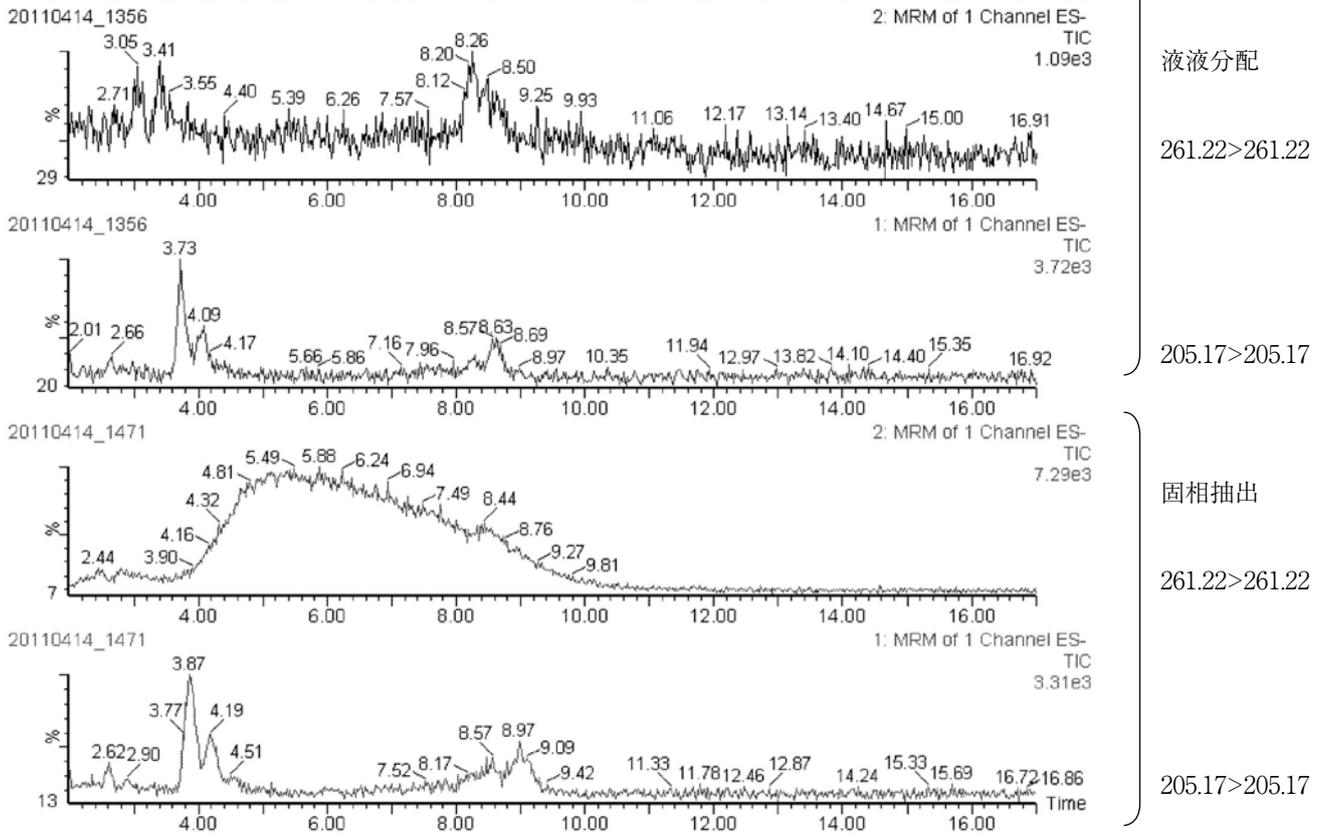


図5 液液分配と固相抽出時のブランク比較用クロマトグラム

### 3.1.4 前処理法の検討

前処理法は、液液分配による方法と、固相抽出による方法を検討した。いずれの方法でも回収率は良好であったが、固相抽出は図5に示すようにブランクが大きく、またプラスチック製の大容量リザーバーがブランク対策で使用できないことから操作性が悪い等の問題点があったため、液液分配を採用した。

### 3.2 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表5に示す。添加回収試験には河川水として旭川水系の乙井手堰の水質試料を、海水として岡山県倉敷市水島沖の水質試料を使用した。河川水、海水と

もに良好な添加回収試験結果が得られた。

### 3.3 分解性スクリーニング試験結果

分解性スクリーニング試験結果を表6に示す。pHや光の有無によらず、著しい分解性は見られなかった。

### 3.4 保存性試験結果

保存性試験結果を表7に示す。保存性は良好であった。

### 3.5 環境試料の分析結果

平成23年10月に採取した河川水（旭川乙井手堰）及び海水（水島沖）から対象物質は検出されなかった。定量下限

表5 添加回収試験結果

試料名	物質名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
河川水	2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	100	無添加	1	ND	—	—
	2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	100	5	7	46.8	94	10.0
	3,5-ジ-tert-ブチルフェノール	100	無添加	1	ND	—	—
	3,5-ジ-tert-ブチルフェノール	100	5	7	45.7	92	5.5
海水	2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	100	無添加	2	ND	—	—
	2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	100	50	3	479.5	96	2.0
	3,5-ジ-tert-ブチルフェノール	100	無添加	2	ND	—	—
	3,5-ジ-tert-ブチルフェノール	100	50	3	487.8	98	2.7

2,6-ジ-tert-ブチルフェノールと2,4,6-トリ-tert-ブチルフェノールは当装置では他に比べて感度が1/100以下と著しく悪かったため添加回収試験はせず。

表6 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験数	初期濃度 (ng/L)	1時間後の残存率(%)	7日後の残存率(%)	
					明所	暗所
2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	5	2	500	109	90	—
	7	2	500	100	88	95
	9	2	500	98	86	—
3,5-ジ-tert-ブチルフェノール	5	2	500	105	95	—
	7	2	500	100	98	97
	9	2	500	98	92	—

※7日後の残存率は、1時間後の残存量を100とした値である。

表7 保存性試験結果

物質名	試料名	初期濃度 (ng/mL)	残存率(%)		
			1週間後	9週間後	13週間後
2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	試料(河川水)	0.2	101	—	—
	標準溶液	1	—	—	98
	標準溶液	2	—	106	—
	標準溶液	100	—	101	99
3,5-ジ-tert-ブチルフェノール	試料(河川水)	0.2	100	—	—
	標準溶液	1	—	—	97
	標準溶液	2	—	101	—
	標準溶液	100	—	100	97

は、2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールが46.6ng/L, 3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノールが25.1ng/Lであった。

年度化学物質分析法開発調査報告書（愛知県環境調査センター），平成21年12月，543-569，2009

#### 4 まとめ

4種類のポリ-*tert*-ブチルフェノール類について，多成分同時分析法を検討し，次の結果を得た。

- 1) 対象物質はすべてESI Negative モードでイオン化され，SRM (MS/MS) 法による測定が有効であった。
- 2) 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールと3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノールは高感度測定が可能であったが，2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノールと2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノールは当装置では感度が著しく悪かったため，分離はできるものの他と同濃度レベルでの定量は困難と考えられた。
- 3) 移動相溶媒にアセトニトリル，定量方法にSRMを用いると，最も良好なS/N比を得ることができた。
- 4) 各種溶媒，バイアルセプタム等に対象物質が含まれており，これらの影響を除外するための様々な対策が必要であった。
- 5) 液液分配と固相抽出による前処理方法を検討し，いずれも回収率は良好であったが，ブランクと操作性の点から液液分配を採用した。
- 6) 添加回収試験結果は，河川水，海水ともに良好であった。
- 7) 分解性スクリーニング試験結果は，pH条件や光の有無によらず，著しい分解性は見られなかった。
- 8) 保存性試験の結果，保存性は良好であった。
- 9) 河川水（旭川乙井手堰）及び海水（水島沖）から，対象物質は検出されなかった。

なお，本研究は環境省委託の平成23年度化学物質分析法開発調査（環境省環境安全課）と連携して実施した。

#### 文 献

- 1) 環境省総合環境政策局環境保全部環境安全課：化学物質環境汚染実態調査の手引き（平成20年度版），平成21年3月，2009
- 2) 根本了，小林麻子，高附巧，佐々木久美子，豊田正武：食品中の2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノール及び関連化合物の分析，食品衛生学雑誌，42，359-366，2001
- 3) 環境省環境管理局水環境部企画課：要調査項目等調査マニュアル（水質，底質，水生生物），平成15年3月，73-83，2003
- 4) 環境省環境保健部環境安全課：平成15年度化学物質分析法開発調査報告書（兵庫県立健康環境科学研究センター），平成16年8月，96-112，2004
- 5) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：平成20

【資 料】

## 児島湖底泥のユスリカ調査

Investigation of Chironomidae in Sediment of Lake Kojima

藤田和男, 難波 勉, 難波あゆみ, 鷹野 洋, 板谷 勉 (水質科)  
Kazuo Fujita, Tsutomu Nanba, Ayumi Nanba, Hiroshi Takano,  
Tsutomu Itadani (Department of Water)

### 要 旨

平成22年度から2年間、延べ10回にわたり、児島湖内の22地点において底泥中のユスリカ幼虫個体数及び底泥の酸化還元電位を調査した。ユスリカ幼虫個体数の全地点での平均値は660個体/m<sup>3</sup>で夏期に低く冬期に高かった。底泥の酸化還元電位の平均値は-180mVで夏期に低く、泥温の変動と一致していた。底泥は多くの生物にとって棲息困難な還元状態と考えられたが、ユスリカ幼虫は冬期から春期にかけて湖内の全域において棲息していたことが判明した。

[キーワード：ユスリカ, 児島湖]

[Key words : Chironomidae, Lake Kojima]

### 1 はじめに

児島湖において大量に発生するユスリカによって、住宅内への侵入や洗濯物への付着など地域における生活環境の問題となっている。児島湖では堤防の締切工事完成（昭和32年2月）直後からユスリカの大発生（昭和32年5月、オオユスリカ）が記録されている。その後、昭和60年10月下旬～11月下旬頃に再び大発生し、このときの被害は主にアカムシユスリカによるものでオオユスリカは確認されなかったといわれている。

ユスリカによる被害は一般に不快害虫（外壁・洗濯物、商店の商品への付着等）としてのものである<sup>1)</sup>が、一方で、底泥に蓄積された有機物を系外に取り出す浄化作用があること、また生態系においては、魚などの高次捕食者の餌となっていると考えられる。これらの側面から、ユスリカの実態を知りその影響を考察することが必要と思われる。

しかしながら児島湖におけるユスリカ幼虫の分布は一部の調査を除き明らかになっていない。

本調査はユスリカ幼虫及び生息環境の知見を得、不快害虫であるユスリカ対策を検討する際の一助とするとともに、生態系内の物質循環の面からの考察につなげることを目的とする。児島湖内におけるユスリカ幼虫の面的な分布状況及び時間的な増減等の実態把握のため、湖内の22地点で底泥中のユスリカ幼虫個体数密度を調査した。また底泥の有機物の分解が進み酸素濃度の低下や硫化物の生成<sup>2) 3)</sup>による底質の悪化に伴い多くの生物が棲息困難となるが、ユスリカ、特にアカムシユスリカは棲息可能である環境であることから、酸化還元電位を調査し、これらの結果をと

りまとめたので、報告する。

### 2 材料及び方法

#### 2.1 調査時期及び地点

平成22年度に4回（5月、8月、11月、2月）及び平成23年度に6回（5月、7月、9月、11月、1月、3月）、児島湖の22地点（図1）で調査（以下「採泥調査」という）を行った。

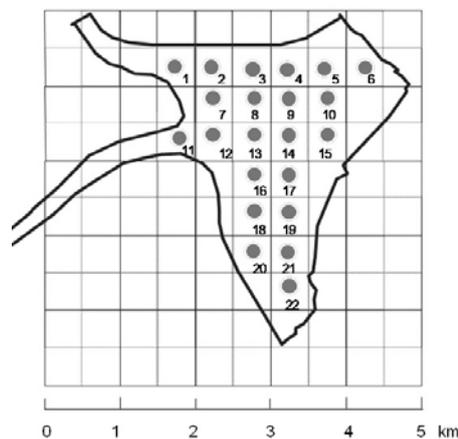


図1 調査地点

#### 2.2 調査方法

底泥の採取はエックマンバージ式採泥器（15cm×15cm）により行った。その際水温及び泥温を測定し、また有機物分解の指標となる酸化還元電位については、ORP計（横河電機製YK-23RP）で測定した。採取した検体は6℃で冷蔵し順次ふるい（口径1mm及び0.5mmの2段階）でろ過しユスリカ幼虫の個体数を計測した。

表1 同一地点での採泥位置による測定値の変動

採泥地点	地点 8				
	No.	1	2	3	4
採泥検体中のユスリカ幼虫個体数(個)	1	1	2	3	2
ユスリカ幼虫個体密度(個/m <sup>2</sup> )	44	44	89	133	89
平均値(個/m <sup>2</sup> )	80				
標準偏差(個/m <sup>2</sup> )	37				
変動係数(%)	46%				

採泥地点	地点 11				
	No.	1	2	3	4
採泥検体中のユスリカ幼虫個体数(個)	19	17	15	19	11
ユスリカ幼虫個体密度(個/m <sup>2</sup> )	844	756	667	844	489
平均値(個/m <sup>2</sup> )	720				
標準偏差(個/m <sup>2</sup> )	149				
変動係数(%)	21%				

採泥地点	地点 22				
	No.	1	2	3	4
採泥検体中のユスリカ幼虫個体数(個)	19	22	26	21	25
ユスリカ幼虫個体密度(個/m <sup>2</sup> )	844	978	1,156	933	1,111
平均値(個/m <sup>2</sup> )	1004				
標準偏差(個/m <sup>2</sup> )	128				
変動係数(%)	13%				

### 3 結果及び考察

#### 3.1 採泥位置による測定値のばらつきを検討

全22地点のうちの3地点(地点8, 地点11及び地点22)を選定し,平成24年3月27日に各地点で5回づつ(採水船の左舷及び右舷で各2回,船首付近で1回の計5回)採泥し,採泥位置によるばらつきを検討した。その結果を表1に示す。変動係数は地点8で46%,地点11で21%,地点22で13%であった。地点8での変動係数が大きかったがこれは採泥サンプル中のユスリカ幼虫の個体数が1~3個と少なかったためと考えられた。なお地点11では11~19個,地点22では19~26個の範囲であった。

#### 3.2 底泥の酸化還元電位

採泥調査時の水温及び泥温の実測値並びに泥温の測定結果から近似させた正弦曲線の計算値を図2に示す。泥温の全地点での年間の平均値は18.7℃,夏期(8月)の泥温の平均値は31.2℃で水温の平均値(32.4℃)と比較して1.2℃低く,冬期(2月)の泥温の平均値は5.2℃で水温の平均値(4.9℃)より0.3℃高かった。

酸化還元電位の測定値をコンター図で表したものを図3

に示す。また酸化還元電位の22地点の平均値の経時変化,及びその結果から近似させた正弦曲線での計算値及び泥温の近似計算値を図4に示す。酸化還元電位は湖北東側の樋門付近の水深の深い部分(地点10)が最も低い値であった。湖を全体的に見ると湖南側は北側と比較して酸化還元電位が低い傾向が認められ,湖南側の方が有機汚濁物が蓄積していると推測された。全地点での年間を通した平均値は-180mVで,時期的に比較すると冬期は高く(>

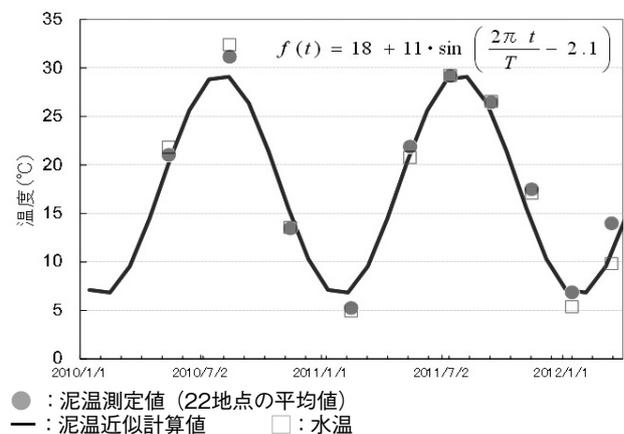


図2 泥温

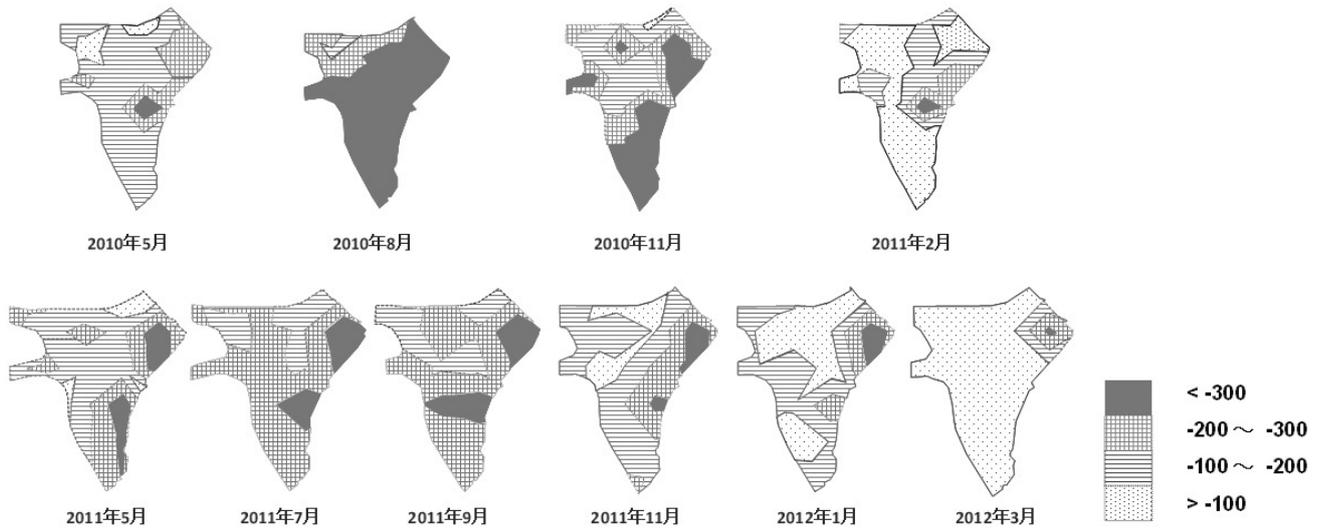


図3 底泥の酸化還元電位 (mV)

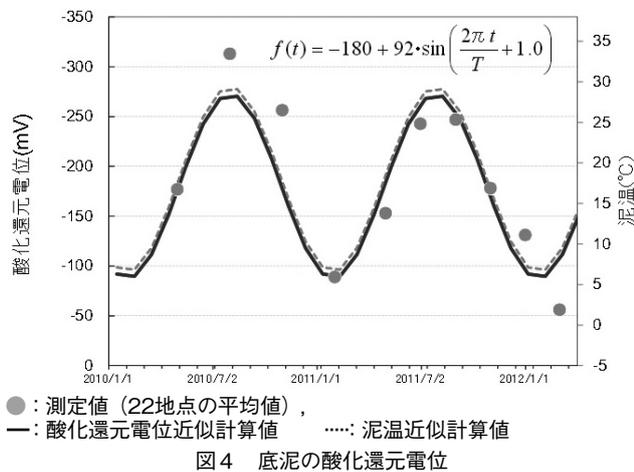


図4 底泥の酸化還元電位

-100mV) 夏期に低下 (-200~-300mV) しており、泥温の変動と一致していた (図4) ことから、夏期は泥温の上昇により冬期と比較して底泥の還元化が進行していることが

判明した。このことから夏期に底泥において低酸素及び硫化水素の発生による生物の死滅<sup>2)・3)</sup>などの減少が推測できることから、児島湖内の底質においては多くの生物にとって棲息し難い環境であると考えられた。

### 3.3 ユスリカ幼虫個体数密度

採泥調査におけるユスリカ幼虫個体数密度の結果をコンター図で表したものを図5に示す。分布の様子を平成22年度と23年度と同じ季節と比較すると同様の分布状況を示しており、また、ユスリカ幼虫は冬期から春期にかけては湖の概ね全域で棲息し児島湖の南側では、北側よりユスリカ幼虫個体数密度が高い傾向であった。

図6にユスリカ幼虫個体数密度の22地点の平均値の経時変化を示し、また泥温の近似計算値を縦軸について反転表示したものを合わせて示す。全地点での年間を通したユスリカ幼虫個体数密度の平均値は660個体/㎡で、冬期か

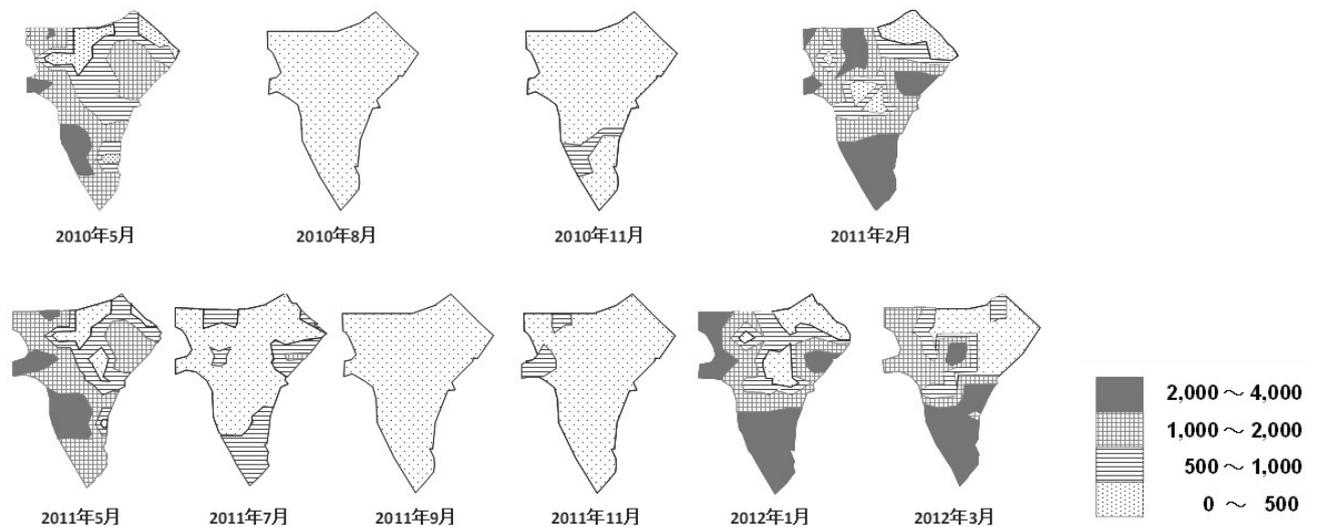
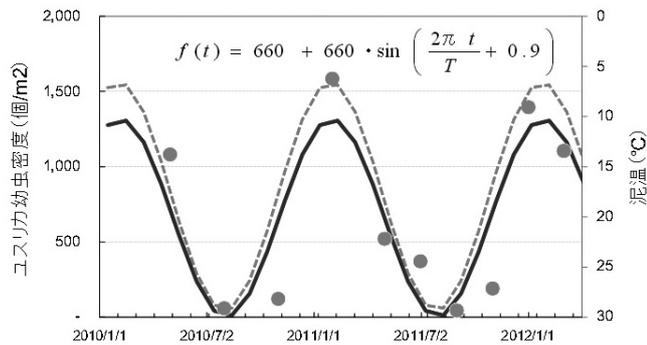


図5 ユスリカ幼虫密度 (個体/㎡)



●：測定値（22地点の平均値），—：近似計算値  
 ……：泥温近似計算値

図6 ユスリカ幼虫密度（個体/m<sup>2</sup>）

表2 他の湖との比較

児島湖	2010～11年度	22地点	0～4,044（個体/m <sup>2</sup> ）
		平均値	660（個体/m <sup>2</sup> ）
河口湖	1995年	21地点の平均値	1,000（個体/m <sup>2</sup> ）
	1995年	<参考>イトミミズ（平均値）	5,500（個体/m <sup>2</sup> ）
霞ヶ浦	1982～90年	中央部	150～2,200（個体/m <sup>2</sup> ）
	2009年	西浦(60地点)	76±57（個体/m <sup>2</sup> ）
		北浦(40地点)	152±106（個体/m <sup>2</sup> ）
諏訪湖	1928～50年	中央部	440～2,918（個体/m <sup>2</sup> ）
	1968～70年		206～4,812（個体/m <sup>2</sup> ）
	1977～85年		409～5,569（個体/m <sup>2</sup> ）
	1986～95年 ※1988年を除く		409～2,559（個体/m <sup>2</sup> ）
	1988年		13,000（個体/m <sup>2</sup> ）
琵琶湖	1994年	北湖、水深5～10m	2,000～3,000（個体/m <sup>2</sup> ）
		南湖、14地点の平均値	2,800（個体/m <sup>2</sup> ）
木崎湖	2005～06年	St.1の平均値	3,843±760（個体/m <sup>2</sup> ）
		St.2の平均値	66±12（個体/m <sup>2</sup> ）

ら春期にかけては湖全域に棲息し、春期から夏期にかけて44個体/m<sup>2</sup>と低下し、再び1500個体/m<sup>2</sup>と冬期に高くなっており、泥温と似た推移を示した。この理由は春期から秋期にかけて泥温の高い時期にユスリカ幼虫が成虫となり羽化し、泥中の幼虫個体数密度が減少し、その後産卵された卵が冬期に幼虫まで成長するためではないかと推測された。

過去のデータと比較すると、平成8～9年度に7回実施した調査<sup>4)</sup>では湖心で0～9個体/m<sup>2</sup>が報告されており、今回の100分の1以下の値であった。さらに昭和62～63年度に8回実施した調査では湖心において50～2,550個体/m<sup>2</sup>が報告されており、この8回分の平均値は710個体/m<sup>2</sup>で、今回と同程度の値であった。過去及び今回得られた値から、児島湖全体では、ユスリカ幼虫は23年前に概ね700個体/m<sup>2</sup>程度を計測しているが、14年前には減少が認められ、近年は23年前と同程度の密度で存在している。他の湖（表2）<sup>1)</sup>の値と比較すると、河口湖、霞ヶ浦、諏訪湖、琵琶湖及び木崎湖のユスリカ幼虫個体数密度はいずれも数100から最大数1,000個体/m<sup>2</sup>程度の値であり、児島湖も同様の値であった。ユスリカ幼虫は琵琶湖や諏訪湖においては有機物含量の高い泥質の湖底に高密度に棲息すること、手ヶ沼のようにさらに過栄養な湖では有機物の分解に伴い湖底が無酸素状態となり幼虫密度は激減する<sup>1)</sup>ことが知られている。児島湖は底泥の酸化還元電位は-100～-300mVであり酸素の少ない還元状態で他の多くの生物にとっては棲息が難しい状態であるが、ユスリカ幼虫は児島湖全域で棲息しており、その分布状況はより酸化還元電位が低い南側において北側より生息密度が高かった。このことから児島湖では北側と比較して南側の底質が悪化しており南側の底質の改善が、児島湖の水質改善につながる可能性を示唆していた。今後は、生息する種類や底質の詳細調査等により児島湖内の底質環境の詳細調査を実施し、湖内の改善対策の一助につなげていく。

## 4 まとめ

児島湖の22地点で平成22～23年度に底泥のユスリカ幼虫個体数密度及び酸化還元電位を調査した。結果は次のとおりである。

- 1) 底泥の酸化還元電位の平均値は-180mVで夏期に低下し、多くの生物にとって棲息困難な状況と考えられた。
- 2) ユスリカ幼虫個体数密度の全期間及び全地点での平均値は660個体/m<sup>2</sup>であった。
- 3) ユスリカ幼虫個体数密度は冬期に1,500個体/m<sup>2</sup>程度と高く、春期から秋期にかけて羽化により減少すると考えられた。

## 文 献

- 1) 近藤繁生, 平林公男, 岩熊敏夫, 上野隆平編：ユスリカの世界, 58, 培風館, 東京, 2001
- 2) 瀬戸内海環境保全協会：瀬戸内海環境情報基本調査—播磨灘・燧灘—（解析編）, 15, 1983
- 3) 奥畑博史, 杉野伸義, 宮坂均, 森川博代, 竹野健次, 佐々木健：ビタミン類添加による底泥の有機質の浄化, 環境技術, 40, 12, 737-743, 2011
- 4) 岡山県：児島湖ハンドブック, 9, 2011

【資料】

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

－多環芳香族炭化水素（PAH）類の水質環境実態調査－

Environmental survey of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in public waters

吉岡敏行, 山辺真一, 坂口浩範, 大月史彦 (水質科)

Toshiyuki Yoshioka, Shinichi Yamabe, Hironori Sakaguchi, Fumihiko Otsuki (Department of Water)

要 旨

平成22年度に開発したフルオランテンを含む多環芳香族炭化水素（PAH）類の多成分同時分析法を用いて、公共用水域における環境実態調査を実施した。

[キーワード：フルオランテン, 多環芳香族炭化水素, GC/MS, 多成分分析, 環境調査]

[Key words : Fluoranthene, polycyclic aromatic hydrocarbon, GC/MS, Simultaneous analysis, Environmental Survey]

1 はじめに

フルオランテンはPAHのひとつで、有機物の不完全燃焼により生成し、主な発生源は、化石燃料や排ガス等である。平成15年度に環境省が実施した調査では、県内38調査地点すべてで不検出（検出下限値13ng/L）であった<sup>1)</sup>。

平成22年度、環境省が実施する化学物質環境実態調査においてフルオランテンを含むPAH類の水質分析法<sup>2)</sup>を検討した結果、フルオランテンの検出下限値を0.069ng/Lまで低減することができた。その分析法を用いて保存水質試料中のPAH類を分析したところ、ほとんどすべての試料からフルオランテン等が検出されたので、公共用水域における

PAH類の環境実態調査を実施した。

2 調査方法

試料採取は、平成23年7月に図1と図2に示す主要な環境基準点34地点で行った。水試料の採取は、橋の場合は流心で、堰の場合は護岸でバケツを用いて表層水を採取した。また、調査の結果、吉井川周匝大橋でPAH類が突出した値で検出されたことから、周辺の調査を平成23年12月に図3に示す地点で実施した。

水試料の分析は、既報<sup>2), 3)</sup>によりPAH（29成分）類をGC/MSで測定した。

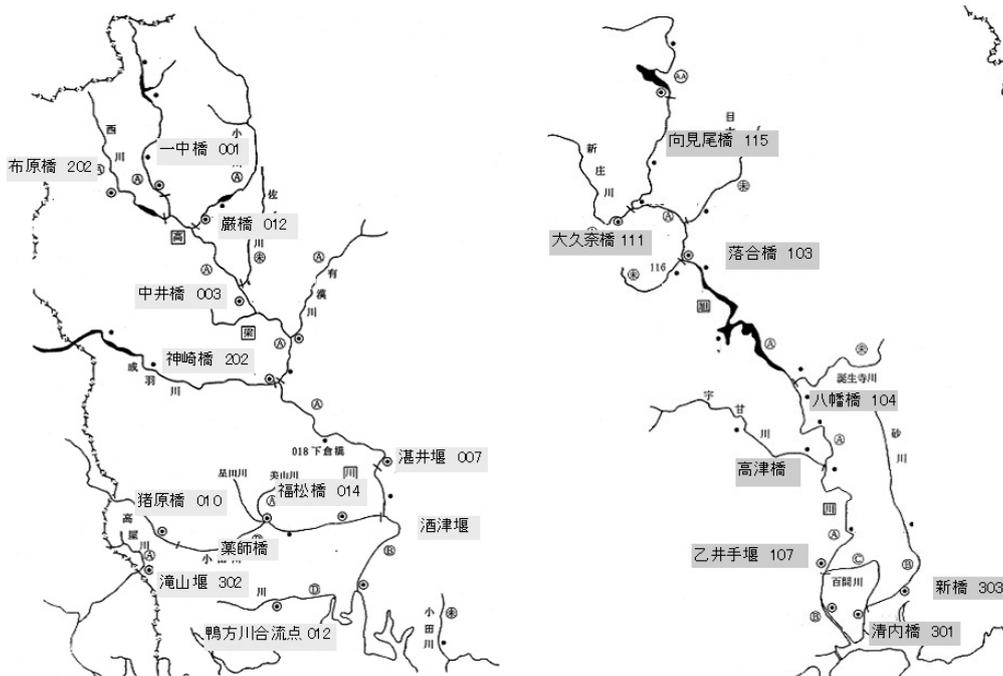


図1 調査地点（高梁川水系、旭川水系）



図2 調査地点（吉井川水系，児島湖流域）

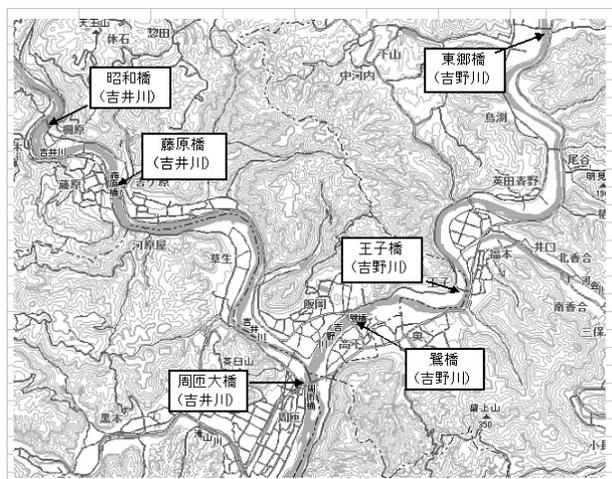


図3 調査地点（吉井川周匝大橋周辺）

### 3 調査結果及び考察

図4～図7に河川別のPAH類の検出状況を積み上げグラフで示す。高梁川及び旭川水系はPAH類の合計値が6 ng/L未満であり，そのうちナフタレンが占める割合が最も多かった。ナフタレンは，家庭用防虫剤としても多量に使用されており，生活排水の影響を受ける2級河川の下流域で高くなる傾向が見られ，生活排水の指標となる可能性が考えられた。

吉井川水系では周匝大橋においてPAH類が120ng/Lを超過して検出され。他の地点と比べて突出して値が高く，周辺に何らかの発生源があると考えられた。検出濃度が高い物質は，アセナフテンが38ng/L，2-メチルナフタレンが22ng/L，1-メチルナフタレンが19ng/L，フルオレンが19ng/Lであった。いずれの物質も3環未満のInternational Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) の定義ではPAHには該当しない物質であるが，これらの物質も化石燃料由来である可能性が高いと考えられた。アセナフテンの検出例は，平成18年度要調査項目測定結果（環境省）

4) で20ng/L検出されたことがある。2-メチルナフタレン及び1-メチルナフタレンの検出事例は，平成23年度版化学物質と環境（環境省）<sup>5)</sup>で9.9ng/L及び5.0ng/L検出された。アセナフテンは，化石燃料に含まれ，燃焼生成物<sup>6)</sup>でもあり，用途としては染料原料，殺菌・殺虫剤<sup>7)</sup>である。メチルナフタレンとフルオレンは，工業的な用途もあるが，化石燃料<sup>3)</sup>にも含まれ，アセナフテン同様に河川への流入起源は不明であるが，これら3物質群の排出源は同一であると推察された。

その他の2級河川等の検出濃度は数十ng/Lであり，一級河川と比べて一桁以上濃度が高く，倉敷川と笹ヶ瀬川水系では流下に伴い検出濃度が高くなる傾向が見られた。

表1にPAH類の最高検出濃度と検出された地点名を示す。吉井川周匝大橋において高濃度で検出されたPAH類は，環数の少ないものが主体であり，環数の多いものは倉敷川倉敷川橋で最高濃度が検出される傾向が見られた。倉敷川では5員環のジベンゾ（a，h）アントラセンまで検出された。6員環以上のPAHは，水環境中からは検出されなかった。PAH類は分子量が大きくなるに従い水に溶けにくく不揮発性になる傾向があり，環数の多いPAHは水環境中ではほとんどSSに吸着し，底質に堆積していると推察された。

吉井川周匝大橋でPAH類が突出して高かったことから，周辺の調査を平成23年12月に実施した。その結果を図5に示す。平成23年12月には，いずれの地点でも他の一級河川と同程度の濃度レベルであり，平成23年7月の検出濃度は一過性の可能性も考えられ，再確認の必要がある。PAH類が河川へ流入する経路としては，化石燃料の直接的な流入や粉塵由来，工場・事業場排水，燃焼起源等さまざまなものが想定されるため原因の特定は困難と考えられた。

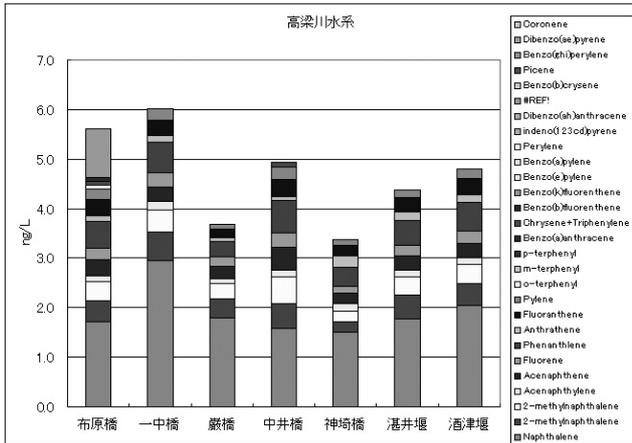


図4 高梁川水系の検出状況

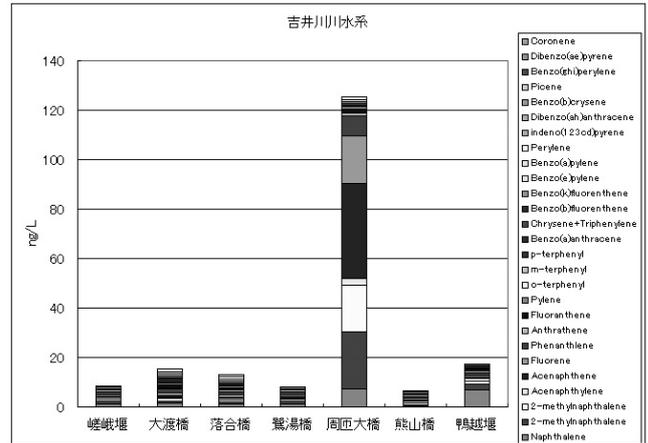


図6 吉井水系の検出状況

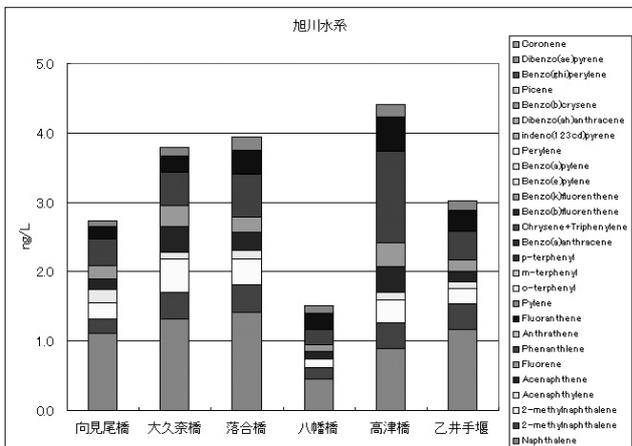


図5 旭川水系の検出状況

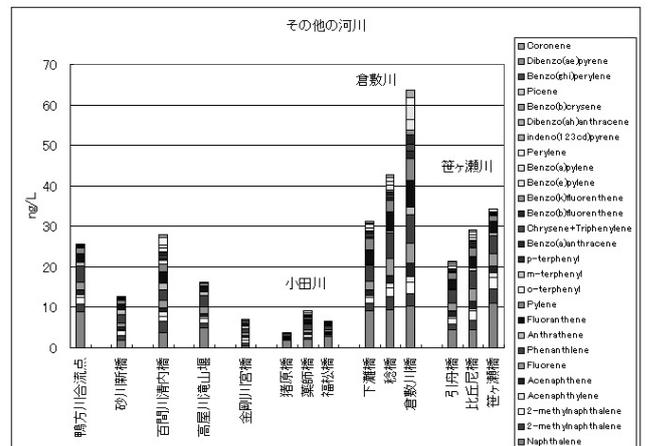


図7 その他の河川の検出状況

表1 検出最大値と検出地点名

	最大値 (ng/L)	最大値検出地点名
Napht halene	11	笹ヶ瀬川 笹ヶ瀬橋
2-methylnapht halene	23	吉井川 周匝大橋
2-methylnapht halene	19	吉井川 周匝大橋
Acerapht hylene	2.7	吉井川 周匝大橋
Acerapht hene	38	吉井川 周匝大橋
Fluorene	19	吉井川 周匝大橋
Phenanth hene	8.0	吉井川 周匝大橋
Anthrat hene	2.0	倉敷川 倉敷川橋
Fluoranthene	6.6	倉敷川 倉敷川橋
Pylene	5.4	倉敷川 倉敷川橋
Benzo(a)anthracene	1.9	倉敷川 倉敷川橋
Chrysene+Triphenylene	1.6	倉敷川 倉敷川橋
Benzo(b)fluorant hene	2.2	倉敷川 倉敷川橋
Benzo(k)fluoranthene	1.1	倉敷川 倉敷川橋
Benzo(e)pylene	2.6	倉敷川 倉敷川橋
Benzo(a)pylene	3.6	倉敷川 倉敷川橋
Perylene	2.0	倉敷川 倉敷川橋
Diberzo(a)h)ant hracene	1.7	倉敷川 倉敷川橋

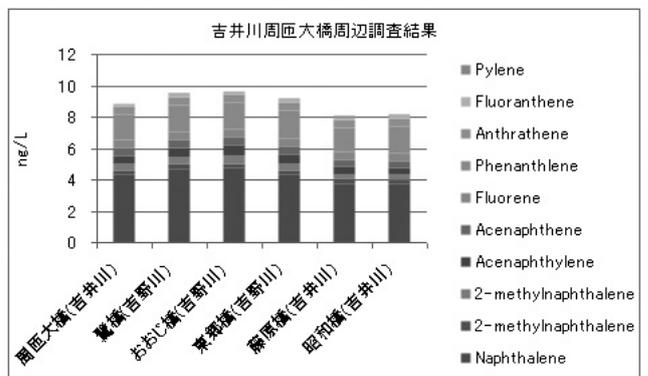


図8 吉井川周匝大橋周辺調査結果

今回検出されたPAH類を環境省が公表している化学物質の環境リスク初期評価<sup>8)</sup>に基づき生態リスク評価を試算した結果を表2に示す。PEC/PNECが1を超過しているのはフルオランテンだけであり、そのほかの物質はPNECを下回っており、検出濃度に問題は無いと判断された。フルオランテンとアントラセンは、環境省のデータでは検出下

限値が高くPEC/PNECが計算できなかったが、今回の分析法では検出下限値を下げるにより水環境中の濃度が明らかになり、環境リスク初期評価を行うことができた。フルオランテンはPNECより若干高い濃度で検出されたことから、今後の濃度推移を継続的に調査していくことが望ましいと考えられた。

表2 生態リスク評価の試算

物質名	PNEC* (ng/L)	PEC* (ng/L)	PEC/PNEC*	今回の調 査のPEC (ng/L)	今回の調査の PEC/PNEC
1-メチルナフタレン	2200	4.6	0.002	23	0.010
2-メチルナフタレン	2300	9	0.004	19	0.008
アセナフテン	2500	11.0	0.044	38	0.015
フルオランテン	6	<13	<2	6.6	1.1
ピレン	40	10	0.25	5.4	0.13
アントラセン	2.8	<13	<5	2.0	0.70
ベンゾ(a)ピレン	5	20	4	3.6	0.71

\*環境省環境保健部環境リスク評価室：化学物質の環境リスク評価（環境省 HP データ）  
予測環境中濃度（PEC） 予測無影響濃度（PNEC）

#### 4 まとめ

水環境中のフルオランテンを含むPAH類の水質環境実態調査を行い、次の結果を得た。

- 1) 公共用水域でのPAH類の水質濃度が明らかになった。
- 2) 小河川の下流域でPAH類の濃度が高くなることが判明した。特に、ナフタレンは、生活排水の影響を判断する物質として指標性があると考えられた。
- 3) 検出されたPAH類は、ナフタレンからジベンゾ（a, h）アントラセンまでの5員環までの18物質であった。
- 4) 吉井川周匝大橋の濃度が高く、周辺に何らかの発生源があることが疑われたが、再調査の結果は、他の一級河川と同程度の濃度レベルであった。
- 5) 環境リスク初期評価を試算したところ、フルオランテンだけがPNECをわずかに超過しており、継続的な調査が必要と考えられた。

#### 文 献

- 1) 要調査項目の検出状況について：  
[http://www.env.go.jp/council/09water/y095-13/mat06\\_3.pdf](http://www.env.go.jp/council/09water/y095-13/mat06_3.pdf)
- 2) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：化学物質と環境 平成22年度化学物質分析法開発調査報告書 148-174, 2011
- 3) 吉岡敏行, 藤原博一, 山辺真一, 浦山豊弘：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を用いた水質中多環芳香族炭化水素（PAH）の多成分分析法の検討—, 岡山県環境保健センター年報35, 35-42, 2011
- 4) 環境省水環境部企画課：平成18年度要調査項目測定結果 2008
- 5) 環境省総合環境政策局環境保険部環境安全課：平成23年度版 化学物質と環境 2012
- 6) Hazardous Substances Data Bank : <http://toxnet.nlm.nih.gov/>
- 7) 化学工業日報社：15308の化学商品 2008
- 8) 化学物質の環境リスク初期評価関連（環境省環境保健部環境リスク評価室）：  
<http://www.env.go.jp/chemi/risk/index.html>

【資料】

# 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

Survey of Environmental Radiation in Okayama Prefecture  
following the Fukushima Nuclear Accident

森上嘉亮, 西村佳恵, 清水光郎, 片岡敏夫 (放射能科)

Yoshiaki Morikami, Yoshie Nishimura, Mitsuo Shimizu, Toshio Kataoka  
(Department of Environmental Radiation)

## 要 旨

東京電力(株)福島第一原子力発電所の事故により放出された放射性物質の県内への飛来状況を調査したところ、降下物についてはI-131が、大気浮遊塵についてはI-131, Cs-134, Cs-137が極微量検出された。水道水及び広域サンプリングによる河川水、土壌においては人工放射性物質は検出されず、広域サーベイ及び県内のモニタリングポストによる空間γ線線量率にも影響は見られなかった。

[キーワード：環境放射能, 岡山, 原子力事故]

[Key words : Environmental Radiation, Okayama, Nuclear Accident]

## 1 はじめに

平成23年3月11日に発生した東日本大震災により引き起こされた東京電力(株)福島第一原子力発電所（以下「福島第一原発」という。）の事故により、原子炉から大量の放射性物質が環境中に放出される事態となった。これに対応した環境放射能水準調査強化モニタリング（文部科学省委託）などにより、県下における環境放射能調査を実施したので、この概要を報告する。

## 2 調査方法

測定方法は、文部科学省測定法シリーズ及び環境放射能水準調査計画書に準じて行った。詳細については、次のとおりである。また、調査は平成23年3月から12月までを期間とし、人工放射性物質を検出した5月までの期間を図で示した。

### 2-1 空間γ線線量率

#### 2-1-1 モニタリングポスト

岡山市南区、鏡野町上齋原人形峠地区、同赤和瀬地区及び天王地区に設置しているモニタリングポストのNaIシンチレーション検出器（岡山市設置：MAR-22, 鏡野町設置：N13J-117）により測定した1時間値及び日平均値の評価を実施した。

#### 2-1-2 サーベイメータ

(1) 毎日、岡山市南区（環境保健センター）でNaIシンチ

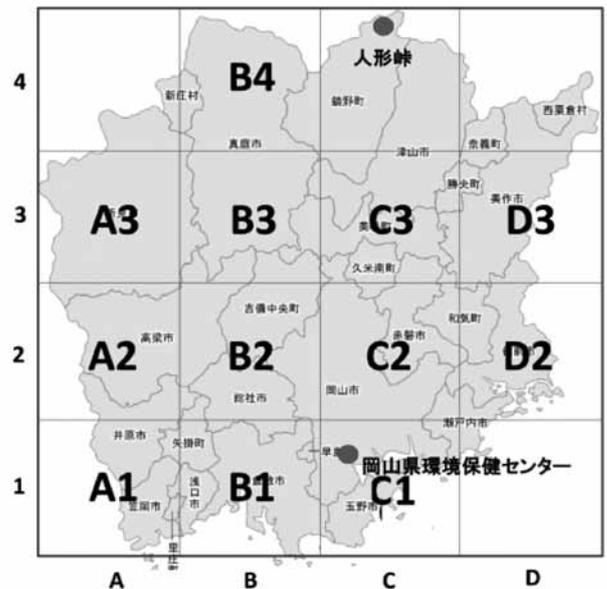


図1 県内広域メッシュ調査地点

レーション式サーベイメータ（TCS-171）を用い地上高1mで測定を実施した。

(2) 平成23年6月、県内広域メッシュ調査地点（図1）で、NaIシンチレーション式サーベイメータ（TCS-171）を用い地上高1mで測定を実施した。（広域サーベイ）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 放射性核種濃度

文部科学省測定法シリーズに準じて、試料を採取、前

表1 空間γ線線量率測定結果

測定法	期間	場所	測定範囲	過去(H17～H20年度)の測定範囲 <sup>2),3)</sup>
モニタリングポスト	H23.3.12-12.31	岡山市南区	0.045～0.078	0.043～0.104
	H23.3.12-12.31	鏡野町人形峠地区	0.024～0.103	0.020～0.112
	H23.3.12-12.31	鏡野町赤和瀬地区	0.021～0.087	0.016～0.096
	H23.3.12-12.31	鏡野町天王地区	0.028～0.091	0.022～0.110
サーベイメータ	H23.6.15-12.27	岡山市南区	0.054～0.090	0.031～0.070

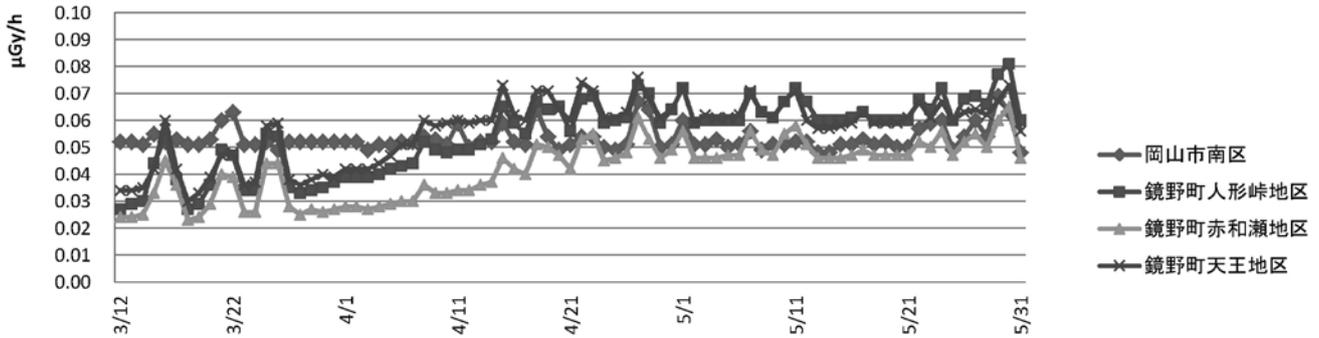


図2 空間γ線線量率経日変動グラフ

処理し、ゲルマニウム半導体検出器 (GC-1520/GR-3019) を用いて20,000秒測定を実施した。ただし、土壌及び河川水については詳細に調査するために80,000秒測定を実施した。

なお、試料採取場所について、降下物、大気浮遊塵及び水道水は岡山市南区（環境保健センター）で行い、土壌及び河川水はB4を除く県内広域メッシュ地点（図1）で行った。

### 2-2-1 降下物

雨水採取器により、24時間毎に降下物を採取した。雨水をU-8容器に移し、試料とした。また、降雨のない場合は蒸留水を用いてドライフォールアウトを洗いこみ、試料とした。

### 2-2-2 大気浮遊塵

ハイボリウムエアサンプラーを用いて、毎日流速1,300L/minで24時間大気を吸引し、ろ紙に大気浮遊塵を捕集した。ろ紙を円形に打ち抜き、U-8容器に移し試料とした。

なお、後方流跡線解析は（独）国立環境研究所地球環境研究センターが開発したCGER-METEX<sup>1)</sup>を利用した。

### 2-2-3 水道水

毎日、水道水をメスシリンダーで2L採取し、2Lマリネリ容器に移し試料とした。

### 2-2-4 土壌

平成23年12月にB4を除く県内広域メッシュ地点（図1）で、表土（0～5cm）を採取し、2mmメッシュの篩を通したものをU-8容器に詰め試料とした。

### 2-2-5 河川水

平成23年12月にB4を除く県内広域メッシュ地点（図1）で、河川水を採取し、2Lマリネリ容器に移し試料とした。

## 3 結果及び考察

### 3-1 空間γ線線量率

#### 3-1-1 モニタリングポスト及びサーベイメータ

空間γ線線量率測定結果を表1に示した。県内で測定した全ての地点において、空間γ線線量率はモニタリングポスト、サーベイメータともに、過去（H17～H20年度）の事故発生前の範囲<sup>2),3)</sup>と同程度であり、異常な上昇は認められなかった。

空間γ線線量率（モニタリングポスト）経日変動グラフを図2に示した。岡山市南区に比べて鏡野町の3局は3月～4月中旬にかけて線量率上昇が見られるが、これは積雪による遮へい効果の減少による自然現象に由来するものである。また、日最大値の変動ピークは降水による自然放射能降下の影響によるものである。

広域サーベイ結果を表2に示した。今回の測定値は本県

表2 広域サーベイ結果

地点	測定場所	放射線線量率(μSv/h)
A1	笠岡市内	0.079
A2	高梁市内	0.083
A3	新見市内	0.037
B1	倉敷市内	0.061
B2	総社市内	0.060
B3	真庭市勝山地内	0.058
B4	真庭市蒜山地内	0.044
C2	赤磐市内	0.079
C3	津山市内	0.058
D2	和気郡和気町内	0.069
D3	美作市内	0.067
測定範囲		0.037～0.083
過去の測定範囲 <sup>4)</sup> (H3～H8)		0.030～0.168

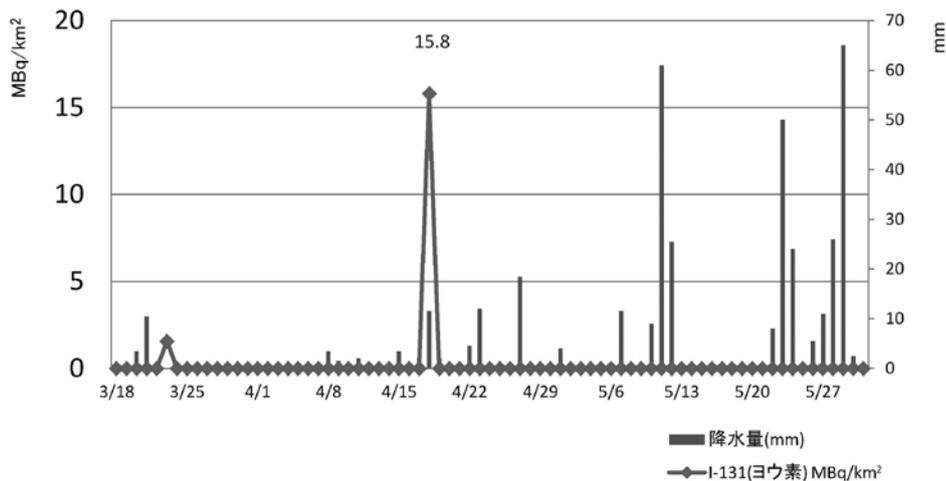


図3 降下物中放射性核種濃度経日変動グラフ

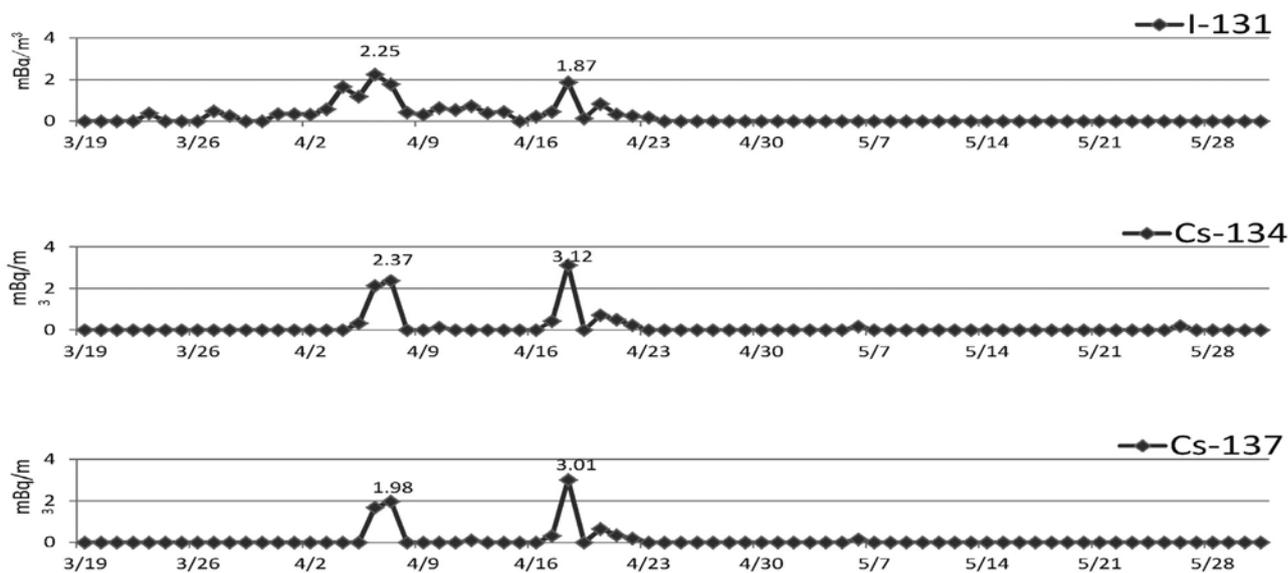


図4 大気浮遊塵中放射性核種濃度経日変動グラフ

が過去に行った県内広域サーベイ結果<sup>4)</sup>の範囲内であり、特異的に線量が高い地域は認められなかった。

### 3-2 放射性核種濃度調査

#### 3-2-1 降下物

降下物中放射性核種濃度経日変動グラフを図3に示した。3月22日～3月23日及び4月17日～4月18日に採取した試料から微量のI-131が検出され、その最大値は15.8MBq/km<sup>2</sup>（4月17日～4月18日採取）であった。また、Cs-134及びCs-137は検出されなかった。

#### 3-2-2 大気浮遊塵

大気浮遊塵中放射性核種濃度経日変動グラフを図4に示した。3/22～5/26の期間に採取した28件（日）の試料から、微量のI-131、Cs-134、Cs-137が検出され、その最大値はI-131が2.25mBq/m<sup>3</sup>（4月6日～7日採取）、Cs-134が

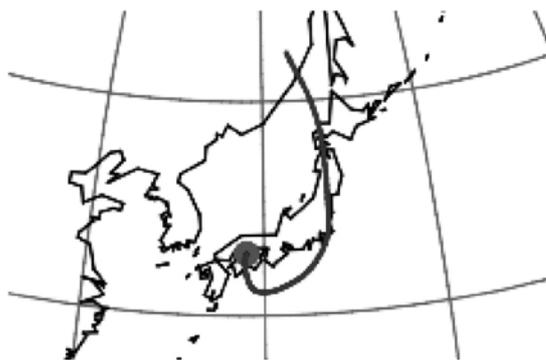


図5 後方流跡線解析結果

3.12mBq/m<sup>3</sup>（4月18日～19日採取）、Cs-137が3.01mBq/m<sup>3</sup>（4月18日～19日採取）であった。また、環境保健センター上空500mを起点としたCGER-METEXによる後方流跡線解析（72h）結果から、最初にピークが見られた4月7日に検出された放射性物質は福島第一原発上空から西日本への大気移入により飛来してきたものと推測された。こ

表3 土壤中放射性核種濃度測定結果

地点	採取地点	採取年月日	I-131(Bq/kg)	Cs-134(Bq/kg)	Cs-137(Bq/kg)
A1	笠岡市内	H23.12.20	ND	ND	ND
A2	高梁市内	H23.12.20	ND	ND	1.2±0.27
A3	新見市内	H23.12.20	ND	ND	6.9±0.42
B1	倉敷市内	H23.12.20	ND	ND	2.4±0.29
B2	加賀郡吉備中央町内	H23.12.21	ND	ND	ND
B3	真庭市内	H23.12.15	ND	ND	3.5±0.33
C1	岡山市内	H23.12.21	ND	ND	ND
C2	岡山市内	H23.12.16	ND	ND	2.9±0.32
C3	津山市内	H23.12.15	ND	ND	4.8±0.35
D2	和気郡和気町内	H23.12.16	ND	ND	0.94±0.21
D3	美作市内	H23.12.16	ND	ND	0.26±0.036

表4 河川水中放射性核種濃度測定結果

地点	採取地点	採取年月日	I-131(Bq/L)	Cs-134(Bq/L)	Cs-137(Bq/L)
A1	浅口市内	H23.12.20	ND	ND	ND
A2	高梁市内	H23.12.20	ND	ND	ND
A3	新見市内	H23.12.20	ND	ND	ND
B1	倉敷市内	H23.12.20	ND	ND	ND
B2	岡山市内	H23.12.21	ND	ND	ND
B3	真庭市内	H23.12.15	ND	ND	ND
C1	岡山市内	H23.12.21	ND	ND	ND
C2	岡山市内	H23.12.21	ND	ND	ND
C3	津山市内	H23.12.15	ND	ND	ND
D2	和気郡和気町内	H23.12.16	ND	ND	ND
D3	美作市内	H23.12.16	ND	ND	ND

れは、フランス放射線防護原子力安全研究所が行った大気中拡散予報<sup>5)</sup>とも概ね一致する結果であった。

### 3-2-3 水道水

水道水について、平成23年3月18日から毎日採取した全ての検体で人工放射性核種は検出されなかった。

### 3-2-4 土壌

土壌中放射性核種濃度の測定結果について、表3に示した。全ての検体でI-131及びCs-134は検出されなかった。また、Cs-137が最大6.9Bq/kgが検出されたが、これは平成17年度から平成20年度に実施した全国の測定値の範囲<sup>2)</sup> ND～49Bq/kg以内であり、過去に行われ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。なお、フォールアウトは地形及び気象条件により県内均一に分布していないため、ばらつきがあるものと考えられる。

### 3-2-5 河川水

河川水中放射性核種濃度測定結果について、表4に示した。全ての検体でI-131、Cs-134及びCs-137は検出されなかった。

## 4 まとめ・今後の展開

今回の福島第一原発事故によって県内に飛来した放射性物質は極微量であり、大気浮遊塵、降下物において最大値を検出した日を含めて空間γ線線量率に上昇は認められ

ず、人体への影響は考えられなかった。また、水道及び広域で調査した土壌、河川水については福島第一原発の事故による影響は認められなかった。

今後とも、県内における空間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、事故後の一般環境における測定データの蓄積などを行っていきたいと考えている。

## 文 献

- 1) 国立環境研究所地球環境研究センター：“CGER-METEX”，<http://db.cger.nies.go.jp/metex/trajectory.jp.html>，（参照 2012-05-01）。
- 2) 文部科学省．“環境放射線データベース”．<http://search.kankyo-hoshano.go.jp/servlet/search.top>，（参照 2012-05-01）。
- 3) 岡山県環境保健センター編：人形峠周辺の環境放射線等測定報告書（2005～2008）
- 4) 杉山広和，道広憲秀，清水光郎，片岡敏夫，柚木英二，森忠繁：岡山県における空間γ線量率調査，岡山県環境保健センター年報，20，49-53，1996
- 5) IRSN：Accident de la centrale de Fukushima Daiichi：Modelisation de la dispersion des rejets radioactifs dans l'atmosphere a l'echelle mondiale - Version du 30 mars 2011，[http://www.irsn.fr/FR/popup/Pages/irs-n-meteo-france\\_30mars.aspx](http://www.irsn.fr/FR/popup/Pages/irs-n-meteo-france_30mars.aspx)

【調査研究】

## 県内における食中毒及び感染症起因菌の疫学的解析

①下痢症・呼吸器感染症起因菌の疫学調査と検査法の検討（平成23年度）

Epidemiological Studies on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*,  
*Legionella* and *Corynebacterium ulcerans* in Okayama Prefecture (FY2011)

中嶋 洋, 大畠律子, 石井 学, 檜原幸二\*, 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, Manabu Ishii, Kouji Narahara\*  
and Katsumi Naka\*\* (Department of Bacteriology)

\*Department of Pediatrics, Okayama Red Cross General Hospital

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

### 要 旨

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 感染症, レジオネラ症及びコリネバクテリウム・ウルセランスによる感染症の予防対策に資するため, 平成23年度に県内で分離されたSTEC, レジオネラの疫学解析と, コリネバクテリウム・ウルセランス等の産生するジフテリア毒素に対する牛血清の抗体保有状況を調査した。STECは, ヒト由来株62株中, O血清群157が27株 (43.5%), O血清群26は20株 (32.3%) であり, O157及びO26以外のO血清群 (103, 111, 115, 121, 145, 165) が24.2%分離された。牛直腸便415検体中STECは16.1%検出され, O血清群157は4検体 (1.0%) が陽性であった。ヒトから分離された *L.pneumophila* 血清群3について遺伝子解析を実施したところ, 国内ではじめて分離された遺伝子型の株であった。牛血清のジフテリア抗毒素価は, 62検体中1検体 (1.6%) が0.1IU/mL以上の高い抗毒素価を示し, ジフテリア毒素産生菌による感染が示唆された。今後も, これらの菌について流行状況や汚染実態を継続調査し, 感染予防に役立てるために疫学解析を行う必要があると考える。

[キーワード: 志賀毒素産生性大腸菌, レジオネラ, コリネバクテリウム・ウルセランス, 疫学]

[Key words: shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Legionella*, *Corynebacterium ulcerans*, epidemiology]

## 1 はじめに

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及び過去に県内で患者が発生したジフテリア様毒素を産生するコリネバクテリウム・ウルセランスによる感染症について, 感染源・感染経路の究明や発生予防を目的として, 計画的に調査を実施している。本報告では, 平成23年度に収集したヒトおよび食品由来株と, 動物及び浴槽水等から分離した菌株を用いた疫学解析結果と牛のジフテリア抗毒素価保有状況について報告する。

## 2 材料及び方法

### 2.1 菌株及び検体

STECの検査は, 県内で平成23年度にヒトから分離されたSTEC株62株と, 牛直腸便415検体, 牛糞堆肥27検体, 牛飼料7検体及び有機野菜60検体を用いた。

レジオネラの検査には浴槽水等49検体と, 保健所が浴

槽水等から分離したレジオネラ属菌133株及び患者由来株9株を用いた。コリネバクテリウム・ウルセランスの調査は, 牛血清62検体を用いた。

### 2.2 検査法

各菌種の検査は, 以下の方法で実施した。

#### 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) 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) とレジオネラ免疫血清 (デンカ生研) を用いて実施した。

#### 3) STECの毒素 (STX) 型別及びジフテリア毒素遺伝子の保有

STECの毒素型別は, ラテックス凝集反応による大腸菌ペロ毒素検出用キット (デンカ生研) 及びPCR

法<sup>1)</sup>により実施した。コリネバクテリウムのジフテリア毒素遺伝子保有は、PCR法<sup>2)</sup>により実施した。

4) ジフテリア抗毒素価の測定

ジフテリア抗毒素価の測定は、宮村ら<sup>3)</sup>の培養細胞法により、国立感染症研究所細菌第二部第三室に依頼して実施した。

5) 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（以下PFGE）法は、寺嶋ら<sup>4)</sup>のプロトコールにより実施した。また、DNAパターンによる型別（以下「PFGE」型別という。）は、国立感染症研究所細菌第一部に依頼して実施した。

6) Sequence-Based Typing (SBT)

レジオネラ株のSBTを用いた型別（Sequence Type (ST)）<sup>5)・6)</sup>は、国立感染症研究所細菌第一部に依頼して実施した。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 県内で分離されたSTECの疫学調査

平成23年度のヒト由来STEC月別検出状況を、表1に示した。

本年度収集した62株は、4月と3月を除いたすべての月で検出された。6月～9月は16.1～22.6%と高率に検出され、腸管出血性大腸菌感染症注意報が発令された。昨年に引き続いて本年度も分離株数が例年よりやや少なかった。これは、富山県を中心に焼肉チェーン店のユッケによるSTEC感染症があり、例年以上に本菌に対する注意喚起がなされたため、患者発生数の減少に繋がった可能性が考え

られる。

検出されたSTECの血清型・毒素型を表2に示した。

STECの血清型・毒素型は12種類に分類され、O血清群157は27株（43.5%）、O血清群26は20株（32.3%）で、これら47株が分離株全体の75.8%を占めた。また、本年度はこれら以外にも、O103, O111, O115, O121, O145, O165などの多種O血清群が検出された。

STEC O血清群157及び26のPFGE型を、表3-1及び表3-2に示した。

O血清群157は15種類、O血清群26は7種類に型別され、特にO157:H7 STX1,2及びO26:H11 STX1の株は、それぞれ多様なPFGE型株が検出された。家族由来株は同一のPFGE型を示す株が多かったが、一部の株では同じ家族内で遺伝子の変異が見られた。

牛直腸便、牛糞堆肥、牛飼料及び有機野菜のSTEC検出状況及び検出されたSTECの血清型・毒素型を、表4及び表5に示した。

牛直腸便415検体中67検体（16.1%）からSTECが検出され、このうちO血清群157は4検体（1.0%）から検出された。牛糞堆肥は27検体中2検体（7.4%）から検出されたが、牛飼料7検体及び有機野菜60検体では、STECは検出されなかった。牛直腸便及び牛糞堆肥から検出されたSTECの血清型・毒素型は30種類に分類され、例年どおりO血清群型別不能（OUT）が69検体中48検体（69.6%）を占めた。O血清群157は昨年度牛直腸便から検出されなかったが、本年度は4検体から検出されており、ヒトへの感染源として継続した牛の保菌実態調査が必要であると思われる。

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	0	3	14	13	10	11	5	1	2	2	1	0	62
(%)	0.0	4.8	22.6	21.0	16.1	17.7	8.1	1.6	3.2	3.2	1.6	0.0	

表2 ヒトから検出されたSTECの血清型・毒素型

血清型	毒素型	株数	(%)
O103:H2	1	4	6.5
O111:H-	1,2	1	1.6
O115:H10	1	3	4.8
O121:H19	2	3	4.8
O145:H-	1	1	1.6
O157:H-	1,2	1	1.6
O157:H7	2	6	9.7
O157:H7	1,2	20	32.2
O165:H-	1,2	3	4.8
O26:H-	1	1	1.6
O26:H-	1,2	1	1.6
O26:H11	1	18	29.0
計		62	

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-	1,2	g70	1	
	2	c389	2	家族由来株
O157:H7	1,2	d342	2	
		g117	1	
		g159	1	
		g161	1	
		g163	1	
		g216	1	
		g419	1	
		g421	1	
		g422	1	
		g423	1	
		g425	2	家族由来株
		g427	3	
		g61	2	家族由来株
計			21	

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	g36	1	
	1,2	b48	1	
O26:H11	1	g37	1	
		g38	7	家族由来株3株
		g49	5	家族由来株2株+2株
		g50	2	家族由来株
		g51	2	g50の家族由来株1株
計			19	

表4 牛由来検体のSTEC検出状況

検体名	検体数	陽性検体数	検出率(%)
		(O157陽性)	(O157陽性)
直腸便	415	67*	16.1
		(4)	(1.0)
牛糞堆肥	27	2	7.4
		(0)	(0)
牛飼料	7	0	0
		(0)	(0)
有機野菜	60	0	0
		(0)	(0)
合計	509	69	27.1
		(4)	(0.8)

\*：3検体から2種類の血清型株を検出

表5 牛直腸便および牛糞堆肥由来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	O119:H-	2	2	2.9
	O119:H7	1	1	1.4
	O119:HUT	1	1 <sup>a</sup>	1.4
	O124:H19	2	1	1.4
	O157:H7	1,2	1 <sup>b</sup>	1.4
	O157:H7	2	3 <sup>a</sup>	4.3
	O26:H11	1	1	1.4
	O28ac:H23	2	1	1.4
	O28ac:H7	2	1	1.4
	O55:H21	2	1	1.4
	O6:H34	2	3	4.3
	O74:H20	2	1	1.4
	O74:H27	2	1	1.4
	O74:H28	2	2	2.9
	O74:HUT	2	1	1.4
	O8:H19	2	1	1.4
	O91:H21	2	1	1.4
	OUT:H-	2	12 <sup>b,c</sup>	17.4
	OUT:H11	1,2	1 <sup>c</sup>	1.4
	OUT:H11	2	1	1.4
	OUT:H19	2	5	7.2
	OUT:H2	2	3	4.3
	OUT:H21	2	7	10.1
	OUT:H28	1	1	1.4
OUT:H28	2	1	1.4	
OUT:H4	2	1	1.4	
OUT:H51	2	1	1.4	
OUT:HUT	1	10	14.5	
OUT:HUT	2	4	5.8	
牛糞堆肥	OUT:H-	1	1	1.4
	OUT:HUT	1	1	1.4
計			69	

a, b, c: 各々1検体から2種類の血清型菌を検出

### 3.2 浴槽水等のレジオネラ汚染調査

浴槽水等について実施したレジオネラ汚染調査結果を表6と表7に示した。

レジオネラを培養法により検査した結果、浴槽水43検体中4検体(9.3%)、冷却塔水6検体中5検体(83.3%)から検出された。浴槽水は*L.pneumophila*血清群1、6、9群が、冷却塔水では*L.pneumophila*血清群1、5、7、13群とUT、それにレジオネラ属菌が検出された。一方、保健所の検査で浴槽水等から検出されたレジオネラは、*L.pneumophila*血清群1、3、4、5、6、8、9、10、12

群とUT及び*L.micdadei*とレジオネラ属菌であった。

患者から分離されたレジオネラを表8に示した。

55歳以上の男性7名及び女性2名から検出され、全国的な傾向と同様に高齢男性からの検出が多かった。検出菌は*L.pneumophila*血清群1が9株中6株と多く、その他血清群2及び3が検出された。血清群1ではST1077が3株、ST120が2株検出され、同じ感染源の可能性が示唆された。血清群3の2株もST93と同じ感染源の可能性が示されたが、これらの株は国内ではじめて分離されたST株であったため、今後本菌の感染源の究明が重要であると考えられる。

表6 浴槽水等のレジオネラ検査結果

検体名	検体数	陽性検体数(%)	菌種	血清群	株数
浴槽水	43	4 (9.3)	<i>L.pneumophila</i>	1	3
				6	3
				9	1
冷却塔水	6	5 (83.3)	<i>L.pneumophila</i>	1	4
				5	1
				7	1
				13	1
			UT	1	
計			<i>Legionella spp.</i>		2
計					17

UT: untypable

表7 保健所から収集したレジオネラ株

検体名	菌種	血清群	株数
浴槽水	<i>L.pneumophila</i>	1	16
		3	21
		4	7
		5	22
		6	25
		8	1
		9	2
		10	14
		12	2
		UT	10
	<i>L.micdadei</i>		1
冷却塔水	<i>L.pneumophila</i>	1	1
		UT	3
	<i>Legionella spp.</i>		1
プール水	<i>L.pneumophila</i>	3	3
		5	2
		10	2
計			133

表8 患者由来レジオネラ株

No	年齢	性別	分離年月	血清群	ST	PFGE	症状
1	55	女	2011.07	1	1077	未実施	発熱、胸部異常影(糖尿病あり)、呼吸困難
2	78	男	2011.10		120		発熱、呼吸困難、肺炎
3	78	男	2011.11		120		腹痛、呼吸困難、意識障害、肺炎、多臓器不全
4	91	男	2011.11		1077		発熱、咳嗽、肺炎
5	69	男	2011.12		1077		発熱、咳嗽、意識障害、肺炎
6	55	男	2012.02		42		発熱、呼吸困難、肺炎
7	63	男	2011.06	2	354	未実施	発熱、咳嗽、肺炎から死亡(糖尿病あり)
8	77	男	2011.07	3	93	同一	胸部異常影、症状無し
9	59	女	2011.09		93		胸部異常影、症状無し

ST : sequence type

### 3.3 牛のジフテリア抗毒素価保有状況

牛血清を用いてジフテリア抗毒素価を測定した結果を、表9に示した。

牛血清62検体のうち、抗毒素価が0.01IU/mL以上を示したのは2検体(3.2%)、特に0.1IU/mL以上の高い抗毒素価を示したものが1検体(1.6%)あった。ヒトでは、以前は0.01IU/mL以上の抗毒素価を感染防御レベルとされてきたが、最近では0.1IU/mL以上が必要であると考えられている<sup>7)</sup>。牛ではコリネバクテリウム・ウルセランスによる乳房炎などが報告<sup>8)</sup>されており、抗毒素価が0.01IU/mL以上であった牛では、ジフテリア毒素産生性のコリネバクテリウムによる感染の可能性が示唆されるため、今後継続して抗毒素価を指標とするジフテリア毒素産生性コリネバクテリウムによる感染実態の調査を行う予定である。

なお、レジオネラの調査については、平成23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)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」の研究班で、コリネバクテリウム・ウルセランスの調査は、平成23年度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)「ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究」の研究班による調査の一環として実施したものである。

表9 牛血清のジフテリア抗毒素価

抗毒素価 IU/ml	検体数	保有率(%)
<0.01	60	96.8
0.01<, <0.1	1	1.6
0.1<	1	1.6
計	62	

## 謝 辞

本調査の実施に際して、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、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、ジフテリア抗毒素価の測定をお願いしました国立感染症研究所の小宮 貴子先生、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) Pallen, M.J. : Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the polymerase chain reaction, J.Clin.Pathol., 44, 1025-1026, 1991
- 3) Miyamura, K., Nishio, S., Ito, A., Murata, R., and Kono, R. 1974. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. I.Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. J.Biol.Stand. 2 : 189-201.
- 4) 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
- 5) Gaia V, Fry NK, Afshar B, Luck 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
- 6) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Luck PC. : Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminate cytidylyl 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
- 7) Hasselhorn HM, Nubling M, Tiller FW, Hofmann F. : Factors influencing immunity against diphtheria in adults, Vaccine, 16(1), 70-75, 1998
- 8) Barrett NJ : Communicable disease associated with milk and dairy products in England and Wales : 1983-1984, J Infect, 12, 265-272, 1986

【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 (4)

Application to epidemiological investigation with  
DNA database of *Mycobacterium tuberculosis* (4)

大畠律子・石井 学・中嶋 洋 (細菌科)

Ritsuko Ohata, Manabu Ishii and Hiroshi Nakajima (Department of Bacteriology)

### 要 旨

本県では、平成11年度から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、結核の感染源・感染経路の究明や二次感染の予防など結核対策に活用している。平成23年度は、Variable number of tandem repeats (VNTR) 解析により、集団感染を含む6つの感染事例の感染源究明を行った。

[キーワード：結核菌，データベース，VNTR解析]

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

### 1 はじめに

本県では、結核の感染源・感染経路の究明や二次感染予防を目的に、Restriction fragment length polymorphism (以下「RFLP」という。)解析法及びVariable number of tandem repeats (以下「VNTR」という。)解析法を用いて結核菌の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<sup>1)・2)</sup>。従来、RFLP解析法が世界的標準法であったが、操作が簡単で結果を数値化できるVNTR解析法であるJATA (12) -VNTR解析法 (以下「JATA (12) -VNTR」という。)が平成20年に確立され<sup>3)</sup>、現在の国内標準法として提唱されている。さらに、JATA (12) -VNTRの型別能力を補う方法として、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。)や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。)が報告されている<sup>3)・4)</sup>。本県でも、平成20年度にJATA (12) -VNTRを試験的に実施し、平成21年度と22年度はRFLP解析結果との比較によりその有用性を確認し、平成23年度はJATA (15) -VNTR及びHV-VNTRを導入して、RFLP解析法からVNTR解析法に完全移行した。

今回、VNTR解析結果のデータベースを活用して、集団感染事例を含む6つの感染事例について感染源の究明を行ったので、その概要を報告する。

## 2 材料及び方法

### 2.1 平成23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、以下の条件に該当した102株が搬入された。

- (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

これらのうち、搬入時に菌の増殖が認められなかった1株を除く101株でVNTR解析を実施した。

### 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, 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、小川培地上の菌体からDNA抽出キット ISOPLANT (ニッポンジーン) を用いて行った。

## 2.4 VNTR解析

全101株でJATA (12) -VNTR<sup>5)</sup> を実施し、さらに詳細な型別が必要な場合は、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。平成23年度末現在、540株のJATA (12) -VNTR型が登録された。VNTR解析及びデータベース作成には、解析ソフトBioNumerics ver6.5 (APPLIED MATHS) を用いた。

## 2.5 事例の感染源究明

平成23年度に調査した事例の概要を表1に示した。集団感染の2事例（事例1と事例2）、同居人同士の感

染の1事例（事例3）、家族内感染の1事例（事例4）、院内感染が疑われた1事例（事例5）及び施設内感染が疑われた1事例（事例6）の計6事例について、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。

## 3 結果

### 3.1 VNTR解析結果

平成23年度に解析した結核菌101株のVNTR型を図1に示した。

101株のVNTR解析の結果、JATA (12) -VNTRでは2～4株を含む9組のクラスターが形成され、23株が含まれ

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	1285*	K	a	75	20101028	20100700	一致	患者a,b,cは同じ施設の入所者で、2年前の初発患者発病後相次いで発病し、3名から分離された結核菌DNAのVNTR型が一致したため施設内感染と考えられた。さらに、施設内には感染者3名の存在も判明しており、集団感染**に該当する事例となった。 2011年3月に届出があった患者dはa,b,cと同じ施設の入所者で、初発患者及びbと同室であった。患者d分離株のVNTR型はa,b,cと一致したため、集団感染に含まれる症例と考えられた。
	1287*		b	41	20090714	20090700		
	1342*		c	61	20101224	不明		
	1354		d	51	20110323	不明		
2	1361	O	e	61	20110325	20101000	一致	2011年3月にX病院に長期入院中だった患者eが結核を発病したため、入院患者や通院患者、病院職員等を対象に接触者健康を実施したところ、患者f, gを含む5名の発病と38名の感染が判明した。患者e, f, gから分離された結核菌DNAのVNTR型は一致し、集団感染に該当する事例となった。
	1410	Bt	f	62	20110613	20110531		
	1435	O	g	63	20110930	不明		
3	1316*	O	h	66	20100927	不明	一致	患者hとiは同居人で、両者から分離された結核菌DNAのVNTR型が一致したため、両者間の感染が判明した。
	1375		i	64	20110303	不明		
4	1377	O	j	48	20110531	20110530	一致	患者kとlは夫婦でjはその子である。患者kの結核登録後、jとkが相次いで結核登録され、3名から分離された結核菌DNAのVNTR型は一致したため家族内感染と判明した。
	1378		k	83	20110312	不明		
	1437		l	75	20110719	不明		
5	1351*	K	m	32	20110301	不明	相違	患者mは届出以前から結核症状があり、届出時には喀痰塗抹ガフキー5号の状態であった。患者nはmと同じ病院に通院歴があったため、mからの感染が疑われたが、両者から分離された結核菌DNAのVNTR型が異なっていたため、それぞれ別感染源と判った。
	1431		n	26	20110902	不明		
6	1407	Bz	o	84	20110611	20110600	一致	2011年12月に患者pが結核と診断され、調査の結果、2011年6月頃結核を発病した患者oと同じ施設で同室であった事が判明した。両者から分離された結核菌DNAのVNTR型が一致したため、患者oからpに感染したと考えられた。
	1436		p	87	20111231	20111200		

\*H23年度より前に搬入された結核菌株

\*\*結核集団感染（厚生労働省定義）

同一の感染源が、2家族以上にまたがり、20人以上に結核を感染させた場合をいう。  
ただし、発病者1人は6人が感染したものとして患者数を計算する。

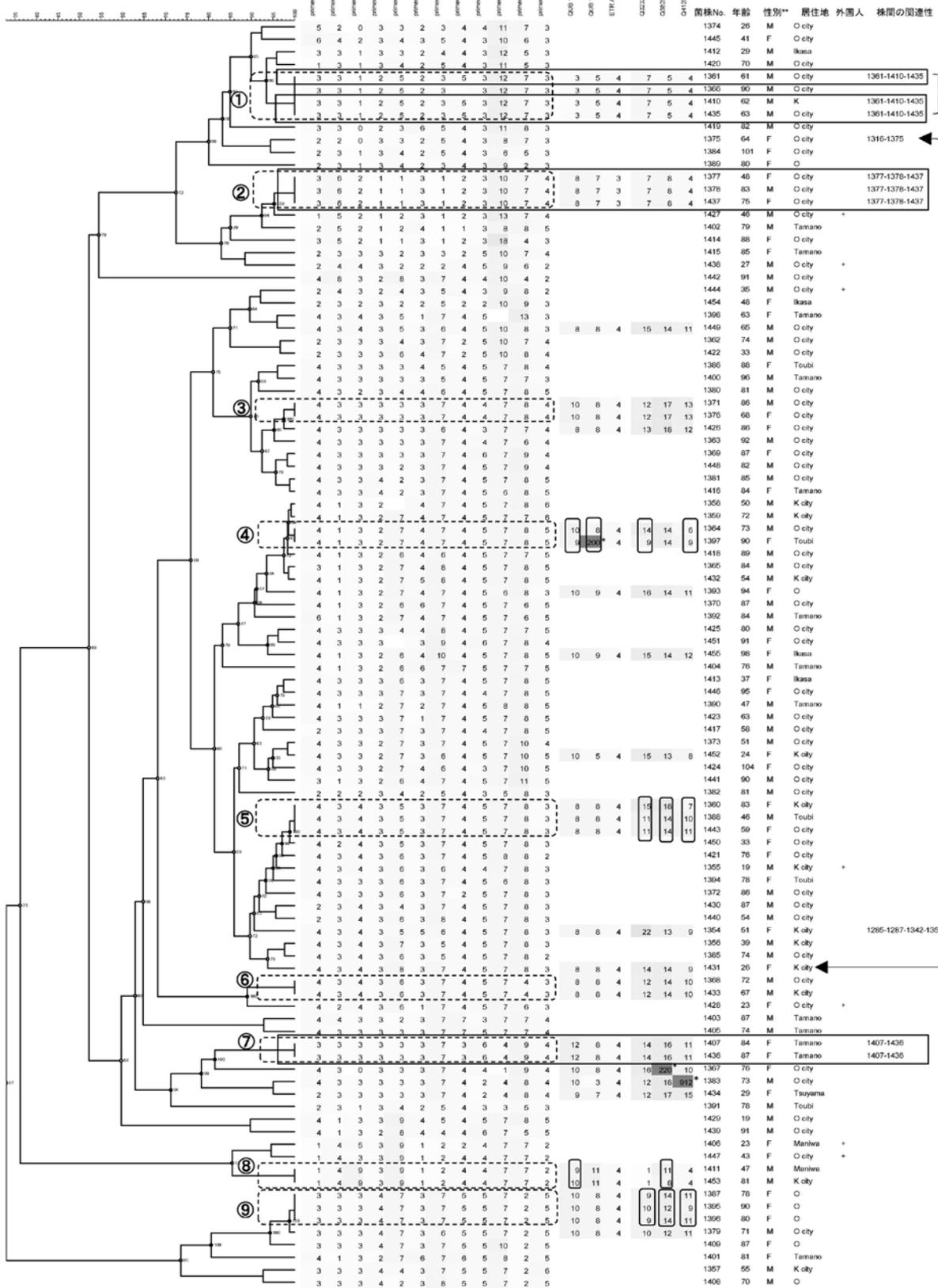


図1 H23年度に解析した結核菌101株のVNTR型

\* 200 : >20, 220 : >22, 912 : 9 と12

相違領域

\*\*M 男性, F 女性

た(クラスター形成率22.8%) (①~⑨)。これらのクラスターを、JATA(15)-VNTR及びHV-VNTRでさらに解析したところ、JATA(15)-VNTRのみではクラスター④と⑧の4株が異なり19株が一致し(クラスター形成率18.8%)、JATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加えると、クラスター④、⑤、⑧の全株と⑨の1株を含む8株が異なり、それぞれ事例2、4、6を含むクラスター①、②、⑦とクラスター③、⑥の全株及び⑨の2株(No.1387と1396)を含む15株が一致した(クラスター形成率14.9%)。なお、クラスター①に含まれるNo.1366は、JATA(12)-VNTRのprimer 8領域が増幅されなかったが、JATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法で結果がクラスター①の他の3株と一致したため、同一型株と解釈した。

### 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は平成22年度に集団感染が判明していた事例で、患者dは接触者健診対象者であった。d分離株のVNTR型は患者a、b、c分離株と一致したため、dは集団感染の患者と判った。事例2は院内感染の事例であり、初発患者eの濃厚接触者を対象とした血液検査により高い感染率が認められ、対象者を拡大した接触者健診の結果、厚生労働省の集団感染の定義を上回る人数の感染者が確認され、集団感染と判断された事例であった。判断後に実施されたVNTR解析の結果、患者e、f、g分離株のVNTR型は一致し、集団感染を支持する結果となった。事例3は同居人hとiの間で感染が疑われた事例であり、両者分離株のVNTR型が一致したため、h・i間の感染と考えられた。事例4は家族内感染が疑われた事例で、患者j、k、l分離株のVNTR型が一致した。kが初発患者でjはkから感染し、lはkとjのいずれかから感染したと推測された。事例5は通院患者間の院内感染が疑われた事例であったが、患者mとn分離株のVNTR型が異なり、それぞれ別の感染源と判明した。事例6は施設内感染が疑われた事例であり、患者oとpからの分離株のVNTR型が一致した。施設で患者pと同室であった患者oは、結核届出時には喀痰塗抹陽性で排菌状態にあったと考えられ、oからpへ感染したと推測された。

## 4 考察

101株のVNTR解析の結果、JATA(12)-VNTR単独ではクラスター形成率は22.8%であったが、JATA(15)-VNTRを加えると18.8%に低下し、さらにHV-VNTRを加えると14.9%になった。従って、最初にJATA(12)-VNTRを実施し、VNTR型が一致した場合、JATA(15)-VNTRとHV-VNTR

の両法を追加することにより、精度の高い解析ができることが確認できた。ここで、JATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加えてもVNTR型が一致した株のうち、クラスター③と⑥の全株、①の1株(No.1366)及び⑨の2株(No.1387と1396)を含む7株(6.9%)は、クラスター内の患者間で関連性が発見できなかった。これらの患者はいずれも67~90歳と高齢であり、過去の再燃などで感染源が不明なためと考えられた。このように、VNTR解析においては、JATA(12)-VNTRにJATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加えた結果が一致しても、患者間の関連性が見いだせない場合があることを念頭に置く必要があると思われる。

感染事例の感染源を究明した結果、事例1から4及び6でVNTR型が一致し、保健所の実地疫学調査結果を裏付ける科学的根拠となった。また、事例5は患者mとnの接触が濃厚ではなく実地疫学調査だけでは感染の判断が難しかったが、VNTR型が異なったことでmからnへの感染ではないことが判明した。これらのことから、VNTR解析は感染事例の感染源究明において非常に有用な疫学指標と考えられた。

今後は、VNTR解析を結核対策に役立てるため、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、データベースの充実を図る予定である。

## 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(3), 岡山県環境保健センター年報, 35, 73-77, 2011
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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

【調査研究】

## 牛由来検体からのリステリア及びサルモネラの検出状況と 県内におけるサルモネラの疫学的解析（平成23年度）

Detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* from the Internal Organs and Rectum Feces of Cattle and Epidemiological Study on *Salmonella* in Okayama Prefecture (FY2011)

石井 学, 大島律子, 仲 克己\*, 中嶋 洋 (細菌科)

\*くらしき作陽大学食文化学部現代食文化学科

Manabu Ishii, Ritsuko Ohata, Katsumi Naka\*, Hiroshi Nakajima (Department of Bacteriology)

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

### 要 旨

リステリアは重篤な症状を起こす感染症の起因菌であり、サルモネラによる食中毒は県下でも毎年多数発生している。このため、両菌の感染予防や発生時の原因究明、感染拡大防止に役立てるため、県内の動物の保菌状況等を調査した。平成23年度に県内の2施設から採取した牛直腸便415検体、牛糞堆肥27検体、飼料7検体、市販の野菜60検体及び腸管感染症疑い患者便135検体についてリステリアとサルモネラの分離を試みたところ、リステリアは、牛直腸便32検体、牛糞堆肥3検体、飼料2検体及び患者便1検体から分離されたが、野菜からは検出されなかった。サルモネラは、患者便2検体から分離されたが、他の検体からは検出されなかった。血清型はリステリアでは1/2bが34検体で最も多く、サルモネラではS.Thompson, S.Weltevredenが各1検体であった。また、県内で分離された食品由来サルモネラ株11株を収集して血清型別を実施した結果、S.Infantisが7株で最も多かった。

[キーワード：リステリア, サルモネラ, 牛, 疫学]

[key words : *Listeria*, *Salmonella*, Cattle, epidemiology]

## 1 はじめに

*Listeria monocytogenes* (以下「*L.monocytogenes*」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ほか反芻畜にも脳炎、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は、米国内で毎年約2,500例の重症感染例が発生し、そのうち約500人が死亡していると報告している。五十君の報告<sup>1)</sup>によると、日本における重症化したリステリア症は年間83人と推計され、発生は稀であるが、欧米に比べて極端に少ないものではないとしている。平成13年に北海道で発生した我が国で初めての食品媒介リステリア症の集団発生は、リステリアに汚染されたナチュラルチーズが感染源であることが判明した<sup>2)</sup>。国内でリステリア症の発生が少ない理由は不明であるが、当センターの調査では食肉の平均20%が汚染されていた<sup>3)</sup>。また、県内のリステリア症患者及び動物や食肉から分離された菌株の生化学的性状と病原性に関与する遺伝子の保有についても検討している<sup>4)</sup>。サルモネラについては、岡山県下では毎年多数のサルモネラ食中毒が発生しており、感染源・感染経路の究明及び感染症の発生予防に役

立てることを目的として分離株を収集し、食品や動物から検出された菌株とともに疫学解析を行い、流行株の把握に努めている。

## 2 材料及び方法

### 2.1 材料

平成23年度に県内の2施設の牛から採取した直腸便415検体、牛糞堆肥27検体、飼料7検体及び県内の病院で採取された腸管感染症疑い患者便(以下「患者便」という。)135検体についてリステリアとサルモネラの検査を行なった。さらに、市販の野菜60検体についてリステリアの検査を行った。

また、リステリアについては平成23年度に県内で分離された患者由来株1株を、サルモネラについては、患者由来株1株及び食品由来株11株(鶏肉由来10株、豚肉由来1株)を収集して血清型別を実施した。

### 2.2 方法

牛直腸便、牛糞堆肥、飼料及び患者便は9倍量の

1/15M PBS (pH7.6) に懸濁した。*L.monocytogenes*の検査は、その1mLをUVM Modified Listeria Enrichment Broth (DIFCO) (以下「UVM」という。) 10mLに接種して30℃, 48時間増菌した。野菜については、その25gをUVM225mLに接種して30℃, 48時間増菌した。いずれの検体もその後、PALCAM-Listeria-Selective agar (supplement添加: MERCK; 以下「PALCAM培地」という。) 及びCHROMagar™ Listeria寒天平板 (CHROMagar社: フランス; 以下「CHROMagar培地」という。) に塗抹して、37℃, 48時間分離培養を行った。PALCAM培地上でのエスクリン分解能又はCHROMagar培地上でのハロー形成能が見られたコロニーをTSYEA培地で再分離した後、SIM確認培地に接種して25℃, 48時間培養後の傘状発育と、カタラーゼ試験陽性を確認した。さらに、Beutin培地 (自家製, 5%羊血液添加) による溶血性, ラムノース, マンニト, キシロースの分解試験を行い同定するとともに、同定した株についてリステリア型別用免疫血清「生研」(デンカ生研) を用いて血清型別を実施した。

サルモネラの検査は前述の懸濁液1mLをセレナイト培地10mLに接種し、37℃, 18-24時間増菌後、白糖加SS寒天培地(日水)で37℃, 18-24時間培養した。疑わしいコロニーをTSI及びSIM確認培地で性状を確認し、腸内細菌同定用キットEB-20(日水)で同定した。収集した菌株については、サルモネラ免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて血清型別を実施した。

### 2.3 PCR法による*hlyA*遺伝子の確認

生化学的性状試験で*L.monocytogenes*と同定された菌株について、TSYEA培地で増殖させた菌を滅菌ミリQ水に浮遊させ、100℃, 10分間加熱後急冷し、8,000rpm, 10分間遠心した上清をPCR法に使用し*hlyA*遺伝子の保有を確認した。PCR法はGene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を使用して、94℃ 3分間熱変性し、94℃, 1分間, 55℃, 1分間, 72℃, 1分間を30サイクル行い、さらに72℃ 7分間伸長反応を行った。

使用したプライマー<sup>5)</sup>は次のとおりである。

プライマー-*hlyA* 1

5' -ATTTTCCCTTCACTGATTGC-3'

プライマー-*hlyA* 2

5' -CACTCAGCATTGATTTGCCA-3'

PCR増幅産物(276bp)の確認は、増幅産物を滅菌ミリQ水で5倍希釈したのち、マイクロチップ電気泳動装置MCE-202 MultiNA (島津製作所; 以下「MultiNA」という。) を用い、試薬キットとしてDNA-1000キットを用いた。

## 3 結果

### 3.1 牛直腸便, 牛糞堆肥, 飼料, 野菜及び患者便からの*L.monocytogenes*とサルモネラの検出状況

牛直腸便, 牛糞堆肥, 飼料, 野菜及び患者便からの*L.monocytogenes*の検出状況は、表1のとおりであった。

*L.monocytogenes*は、牛の直腸便415検体中32検体(7.7%), 牛糞堆肥27検体中3検体(11.1%), 飼料7検体中2検体(28.6%), 患者便135検体中1検体(0.7%)から検出され、すべての株が*hlyA*を保有していたが、野菜からは検出されなかった。分離株の血清型は、直腸便では1/2bが28検体(87.5%), 4bが2検体(6.3%), 型別不能(UT)が2検体(6.3%), 牛糞堆肥及び飼料はすべての検体が1/2bであった。また、患者便からの分離株も1/2bであった。リステリアが検出された牛糞堆肥はそのほとんどが発酵初期のものであり、十分に発酵が進んだ牛糞堆肥からはリステリアは検出されなかった。

牛直腸便, 牛糞堆肥, 飼料及び患者便からのサルモネラの検出状況は表2のとおりであった。

サルモネラは患者便135検体中2検体(1.5%)から検出され、分離株の血清型はS.Thompson, S.Weltevredenが各1検体であった。牛直腸便, 牛糞堆肥及び飼料については、サルモネラは検出されなかった。

### 3.2 収集したリステリア及びサルモネラ菌株の血清型

収集した患者及び食品由来のリステリアとサルモネラ菌株の血清型は、表3のとおりである。

リステリアの患者由来株の血清型は1/2aであり、今回検出した他のいずれの菌株とも異なっていた。サルモネラの患者由来株の血清型は、S.Thompsonであった。鶏肉由来サルモネラの10株は、S.Infantisが7株で最も多く、他の3株はS.Manhattan, S.Schwarzengrund, O8群H型別不能株であった。豚肉由来の1株はS.Derbyであった。

## 4 考察

今回、牛の直腸便から*L.monocytogenes*が7.7%検出されたが、同一施設において直腸便及び牛糞堆肥からそれぞれ87.5%, 100%と高率に同じ血清型のリステリアが検出され、飼料からも同じ血清型のリステリアが検出された。調査の結果、この飼料は同施設で作った牛糞堆肥を肥料の一部に用いていたことが判明しており、飼料へのリステリア汚染の結果、この施設において牛が高率にリステリアを保菌する原因となった可能性が示唆された。

サルモネラの食品由来の血清型は、鶏肉検体ではS.Infantisが最も多く、過去の調査からも、食鳥の本菌汚染

が恒常化していることが示されている。患者便からもリステリア及びサルモネラが検出されていることから、牛肉や鶏肉を介したリステリア感染症及びサルモネラ食中毒の予防対策としては、施設の衛生管理を徹底して実施することが重要であり、引続き調査を行って汚染実態を把握してい

く必要があると思われる。

## 文 献

- 1) 五十君 静信：食品由来のリステリア菌による健康被害，食品衛研究，53 (4)，19-23，2003

表1 牛由来検体，野菜及び患者便からの*L.monocytogenes*の検出状況

	牛直腸便	牛糞堆肥	飼料	野菜	患者便
検体数	415	27	7	60	135
検出数(率)	32(7.7%)	3(11.1%)	2(28.6%)	0(0.0%)	1(0.7%)
血清型	1/2b : 28(87.5%) 4b : 2(6.3%) UT : 2(6.3%)	1/2b : 3(100%)	1/2b : 2(100%)		1/2b : 1(100%)

表2 牛由来検体及び患者便からのサルモネラの検出状況

	牛直腸便	牛糞堆肥	飼料	患者便
検体数	415	27	7	135
検出数(率)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	2(1.5%)
血清型				<i>S. Thompson</i> : 1(50.0%) <i>S. Weltevreden</i> : 1(50.0%)

表3 収集した患者及び食品由来のリステリアとサルモネラ菌株の血清型

菌種	サルモネラ			
	リステリア	患者由来	鶏肉由来	豚肉由来
由来	患者由来	患者由来	鶏肉由来	豚肉由来
検体数	1	1	10	1
血清型	1/2a	<i>S. Thompson</i>	<i>S. Infantis</i> : 7株(70.0%) <i>S. Manhattan</i> : 1株(10.0%) <i>S. Schwarzengrund</i> : 1株(10.0%) 08群H型別不能株 : 1株(10.0%)	<i>S. Derby</i>

- 2) 五十君 静信：リステリア症の概況と対策，月刊フードケミカル，21 (5)，32-37，2005
- 3) 狩屋英明，大島律子，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テリア汚染状況，岡山県環境保健センター年報，28，73-77，2004
- 4) 狩屋英明，大島律子，中嶋 洋：食肉及び牛直腸内容物から検出されたリステリアの生化学的性状と病原遺伝子保有状況並びにその遺伝子系統解析，岡山県環境保健センター年報，31，99-102，2007

- 5) Ermolaeva, S., Karpova, T., Novella, S., Wagner, M., Scortti, M., Tartakovskii, I., Vazquez-Boland, J.A. :  
A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogenes* based on induction of lecithinase activity by charcoal, Int.J.Food Microbiol., 82, 87-94, 2003



【調査研究】

## 2011年県内における手足口病の大規模流行

Epidemiological Studies on Outbreaks of Hand, Foot and Mouth Disease  
in Okayama (2011)

濱野雅子, 葛谷光隆, 木田浩司, 溝口嘉範, 藤井理津志 (ウイルス科),  
秋山三紀恵\* (感染症情報センター), 羽原 誠\*\* (健康推進課)

Masako Hamano, Mitsutaka Kuzuya, Kouji Kida, Yoshinori Mizoguchi, Ritsushi Fujii, Mikie Akiyama\*  
and Makoto Habara\*\* (Department of Virology)

\*Okayama prefectural Infectious Disease Surveillance Center

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

### 要 旨

本県では2011年に手足口病 (Hand, Foot and Mouth Disease: HFMD) の大規模流行を経験し、患者発生状況の解析とともに原因ウイルスの検索と遺伝子解析を行った。岡山県感染症発生動向調査における患者報告数は、例年より約1ヶ月早い5月上旬以降急増し、6月末には流行がピークに達し、定点あたり患者数は10.61人と本調査開始以来最大となった。その後8月上旬まで急速に減少したが、10~12月は再び増加した。地域的には、5~8月は都市部で始まった流行が周辺地域に拡大したが、患者報告が再増加した10~12月は、県北部から県南部への流行波及であった。流行原因の究明のため2010年12月~2011年11月採取のHFMD患者 (0~11歳) 検体85件 (咽頭拭い液83件, 糞便2件) についてウイルス検索を実施したところ、65件からウイルスが検出された。検出ウイルスは、コクサッキーウイルスA6型 (CA6) が43株 (65.2%), CA16が12株 (18.2%), CA10が4株 (6.1%) とA群コクサッキーウイルスが大部分を占めたが、各血清型の検出時期は異なっており、5~8月の流行はCA6、10~12月の流行はCA16によるものと考えられた。CA6によるHFMDの流行は、岡山県内では初めてであり、系統解析の結果、CA6検出株は2009年中国株と最も高い相同性を示し、過去の国内株とは別系統のウイルスであった。以上より今回の流行は、従来とは異なるCA6が引き起こした5~8月の大規模流行と、CA16による10~12月の小規模流行が連続して起こったものと考えられた。

[キーワード: 手足口病, A群コクサッキーウイルス, 疫学, PCR法]

[Key words: Hand Foot and Mouth Disease, Group A Coxsackievirus, Epidemiology, Polymerase chain reaction]

### 1 はじめに

手足口病 (Hand, Foot and Mouth Disease: 以下「HFMD」という。) は、口腔粘膜および手掌や足底などに現れる水疱性発疹を主症状とした急性ウイルス感染症で、4歳以下の幼児を中心に、主として夏季に流行が見られる。HFMDはエンテロウイルス感染症のひとつで、主要な原因ウイルスは、コクサッキーウイルスA16型 (CA16), コクサッキーウイルスA10型 (CA10), エンテロウイルス71型 (EV71) などである。基本的に予後良好な疾患であるが、無菌性髄膜炎の合併が見られることがあり、稀であるが急性脳炎を生ずることもある。特にEV71は中枢神経系合併症の発生率が他のウイルスより高いことが知られている<sup>1)</sup>。

2011年県内におけるHFMDの流行は、5月頃から患者報

告が急速に増加し例年とは異なるパターンを呈したため、流行拡大に伴う中枢神経系合併症の発生を防止するべく、流行状況の把握に努め、県民に対して注意を促すとともに、患者検体からのウイルス検索により流行原因の究明を行った。

### 2 材料と方法

#### 2.1 対象

患者発生状況の解析には、岡山県感染症発生動向調査事業の小児科定点54医療機関における2010年第50週~2011年第52週間のHFMD患者報告数を用いた。また、ウイルス検索には、同調査で2010年12月~2011年11月の間にHFMD患者 (0~11歳) から採取された検体85件 (咽頭拭い液83件, 糞便2件) を用いた。

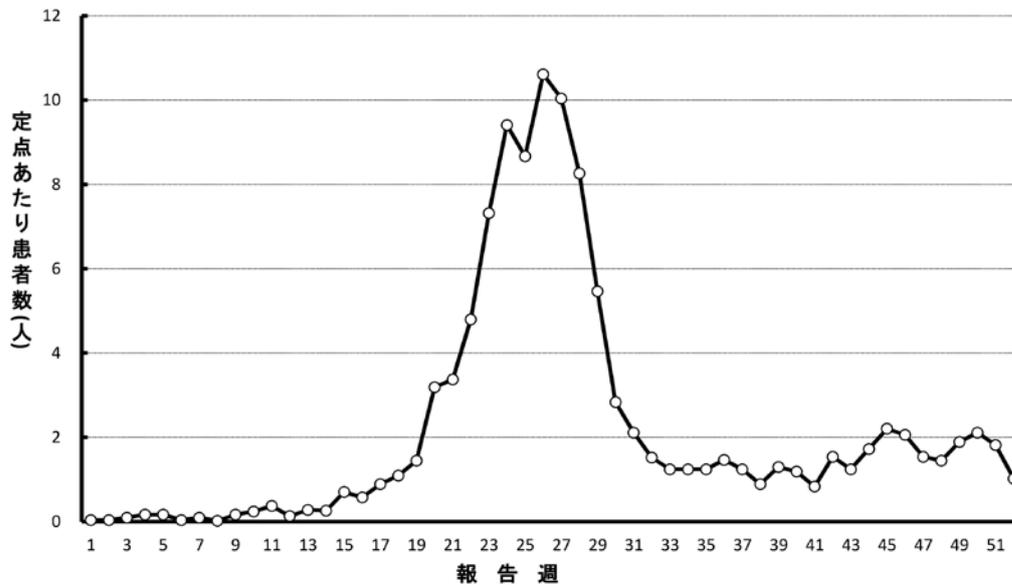


図1 2011年岡山県における手足口病発生状況

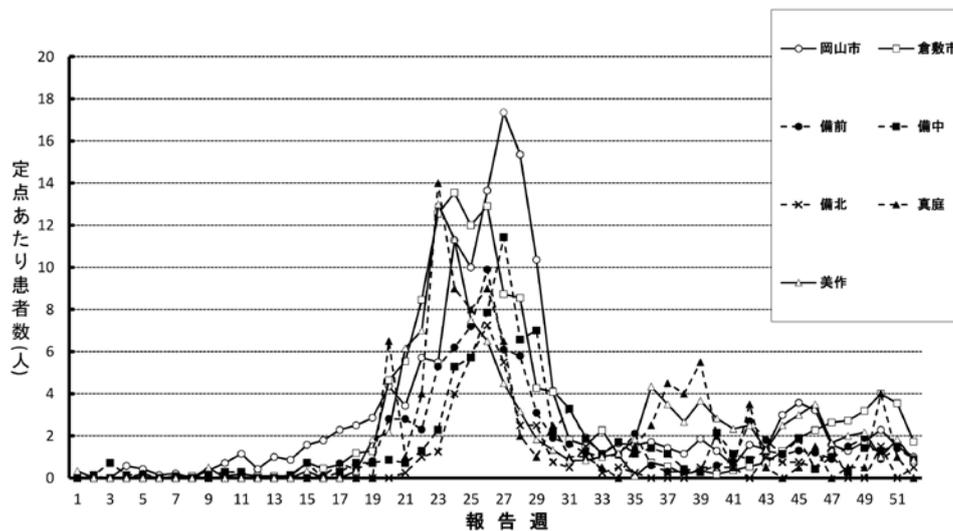


図2 保健所別患者発生状況

## 2.2 方法

患者発生状況は、毎週の患者報告数から1定点医療機関あたりの患者数(定点あたり患者数)を算出し、保健所別、年齢群別に比較解析した。流行開始時期の判定は、インフルエンザで用いられる定点あたり患者数1.0人を基準値とし、週ごとの変動を考慮して3週連続で1.0人を超えた最初の週を「流行開始週」、いったん1.0人を下回った後に再び3週連続で1.0人を超えた最初の週を「流行再開週」とした。

患者検体は、常法どおり前処理後、培養細胞(FL, VERO, RD18S)に接種して1週間観察後、培養上清を新しい細胞に継代して更に1週間観察した。この間に分離されたウイルスについて、中和試験により同定を行った。

また、患者検体から直接、あるいは細胞培養で陽性となった検体の培養上清からウイルスRNAを抽出し、エンテ

ロウイルスの構造タンパク質をコードするVP4-VP2領域の一部を増幅する逆転写PCR<sup>2)</sup>(RT-PCR)を実施した。すなわち自動核酸抽出装置(QIACube;キアゲン社)によるRNA抽出を行い、特異プライマーであるOL68-1を用いた逆転写反応によりc-DNAを合成した。その後、このc-DNAを鋳型として、プライマーペアEVP4/OL68-1により94℃10秒、50℃10秒、65℃60秒を1サイクルとするPCRを35サイクル行い、得られたPCR産物をマイクロチップ電気泳動装置(MultiNA;鳥津製作所)により泳動して、分子量約650bpのバンドが認められたものをPCR陽性とした。陽性検体は、ダイレクトシーケンシング法により増幅領域の一部約470bpの塩基配列を決定し、BLAST検索で最も相同性の高かったデータベース登録株の血清型により同定した。



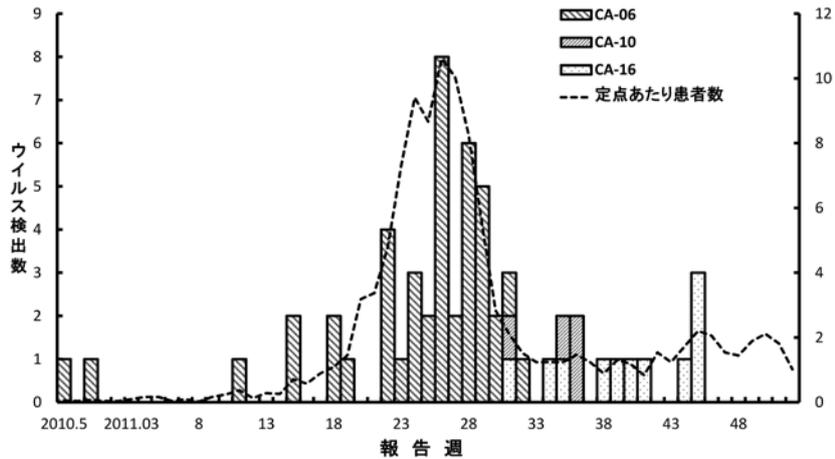


図4 A群コクサッキーウイルスの検出状況

CA16が主に検出され、CA10は、2つの流行の境界時期に検出された。

### 3.3 CA6の遺伝子系統解析

最も検出数の多かったCA6について、構造タンパク質をコードするVP4-VP2領域の一部約470bpの塩基配列に基づき系統解析した。検出株10株とデータベース登録株6株（過去の国内流行株3株；AB120263, AB244327, AB282805, 2011年国内流行株；AB663320, 2009年中国株；HQ005435, CA6 reference株；AY421764）の系統樹を図5に示す。検出株はいずれも2009年中国株の

HQ005435と最も高い相同性を示し、同一クラスターを形成したが、過去の国内流行株3株とは異なるクラスターであった。また、検出株のうち、2011年4月および5月に検出された2株は、他の8株とは別のサブクラスターを形成した。

## 4 考察

2011年県内におけるHFMDの流行は、5～8月の大規模流行とピークの不明瞭な10～12月の小規模流行の二峰性であった。これまでHFMDは、夏季に中規模以上の流行が見られたシーズンには秋季以降に再度流行が見られたことは

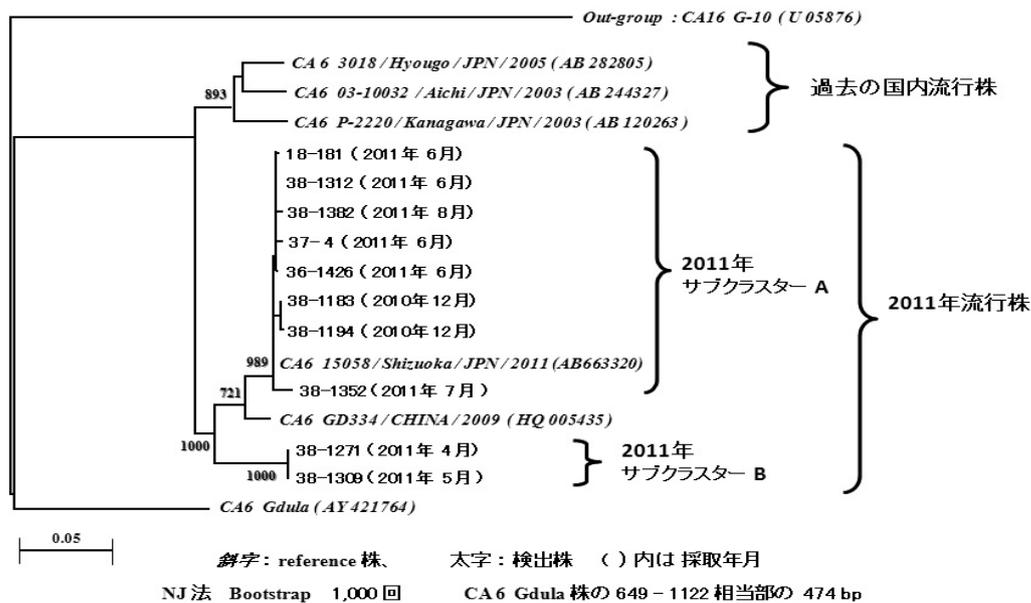


図5 検出CA6のVP4-VP2領域系統樹

なかったが、2011年は再度流行が見られ、流行の開始時期の早さ、過去最大になった夏季の流行規模とともに異例の状況であった。流行拡大のパターンも対照的で、5～8月の流行では、岡山市、倉敷市及び津山市を含む地域が先行し周辺に拡大するパターンであったのに対して、10～12月の流行では、県北部から県南部へ拡大するパターンであった。

患者発生状況とウイルスの検出時期から、5～8月の流行はCA6、10～12月の流行はCA16によるものと考えられた。CA6は、これまで主にヘルパンギーナから検出されることの多かったウイルスであり<sup>3)</sup>、県内におけるCA6によるHFMDの流行は初めてで、過去にほとんど検出例がなかったため、感受性者が多かったと推察され、今回の大規模流行の一因になったと考えられた。また、2011年は西日本を中心に同様の流行が見られており、臨床家からも従来とは違う症状や経過が指摘され<sup>4)・5)</sup>、ウイルス自体の変異の可能性も考えられた。このため、CA6検出株の遺伝子系統解析を行った結果、過去の国内株とは異なるクラスターを形成したことから、今年の検出株は従来のCA6国内株とは別系統のウイルスであることが明らかになった。今回のCA6検出株は、さらに2つのサブクラスターに分かれた(図5)が、これは、2011年国内流行株が2つの系統に分かれるとする増本らの報告<sup>3)</sup>とも一致していた。また、他県(静岡県)で検出された2011年国内株が、県内検出株の多くが属するサブクラスターAに属していることから、このサブクラスターに属する同一系統のウイルスが、県内のみならず国内広範囲に流行していたものと推察された。

今回流行した系統のCA6は、HFMDの流行が始まる4ヶ月以上前の2010年末にすでに県内に侵入していたことが明らかになっており、今回の流行は、冬季に県内に侵入した従来とは異なるCA6が5～8月に感受性者間で急速に広がって大規模な流行を引き起こしたのに続いて、通常のHFMDの起因ウイルスであるCA16による10～12月の流行が連続して起こったが、冬季に入ったこともあり小規模流行にとどまったものと考えられた。

HFMDは、これまでCA16とEV71を主要な原因ウイルスとして、夏季の中規模一峰性流行又は秋の小規模持続流行を繰り返してきたが、今回のCA6のように、CA16とEV71以外のエンテロウイルスでも大規模流行が起こることが明らかとなった。流行時期や症状等、従来とは異なる点も見られたことから、患者発生報告を注意深く監視することにより通常と異なる状況を早期に把握するとともに、病原体情報に加え臨床家等からの情報も参考にすることで感染症の流行状況の正確な解析を行い、流行拡大防止に努めていくことが今後さらに重要となる。

## 5 参考文献

- 1) 清水博之：東アジアにおけるエンテロウイルス71型感染症の流行，病原微生物検出情報 (IASR)，30，9-10，2009
- 2) 地方衛生研究所全国協議会，国立感染症研究所：病原体検出マニュアル，手足口病，17-19，2003
- 3) 増本久人，南 亮仁，野田日登美，江口正宏，古川義朗ら：国内外における手足口病流行に関与するコクサッキーウイルスA6型の遺伝子解析，病原微生物検出情報 (IASR)，33，60-61，2012
- 4) 小野博通，濱野雅子，中瀬克己：岡山市における手足口病の症状とコクサッキーウイルスA6型の検出，感染症発生動向調査 週報 (IDWR)，26，16，2011
- 5) 国立感染症研究所感染症情報センター：注目すべき感染症「手足口病」感染症発生動向調査 週報 (IDWR)，26，7-9，2011



【調査研究】

## 県内におけるインフルエンザ流行の疫学的解析 (2010～2011年シーズン)

Epidemiological Analysis of Influenza in Okayama Prefecture during 2010 to 2011 season

葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志, 羽原 誠\* (ウイルス科)

\*岡山県保健福祉部健康推進課

Mitsutaka Kuzuya, Masako Hamano, Kouji Kida, Ritsushi Fujii and Makoto Habara\*

(Department of Virology)

\*Public Health Policy Division, Department of Health and Social Welfare,

Okayama Prefectural Government

### 要 旨

2010～2011年シーズンにおける県内のインフルエンザ流行は、2011年第5週（2月上旬）及び第11週（3月中旬）をピークとする2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などから、第1波がAH1pdm09型インフルエンザウイルスの流行により、第2波が主にAH3型インフルエンザウイルスの流行によりそれぞれ引き起こされたものと考えられた。流行の状況を過去10年間で比較すると患者発生状況などから、規模の大きな部類に属することがわかったが、この原因として2009～2010年シーズンに引き続きAH1pdm09型が流行したことに加え、2010～2011年シーズン後半に流行したAH3型がワクチン株とは抗原性が異っていたこと、さらにビクトリア系B型がシーズンを通じて流行していたことなどが考えられた。なお、2009～2010年シーズンに引き続きAH1pdm09型が流行した要因として、2009～2010年シーズンは未成年者が流行の中心であったものが、2010～2011年シーズンは成人にも波及したことが、ひとつの要因ではないかと考えられた。

[キーワード：岡山県, インフルエンザウイルス, インフルエンザ様疾患集団発生, 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

今シーズンの2010～2011年（以下「今シーズン」という。）の本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（以下「flu集発」という。）の患者発生状況及び岡山県感染症発生動向調査事業（以下「発生動向調査」という。）に基づき、定点医療機関におけるインフルエンザ患者の発生状況を調査した。また、患者から採取された咽頭拭い液等についてインフルエンザウイルス（以下「Inf.V」という。）の検出・分離を行うとともに、分離されたウイルスについて抗原性解析等を行った。

## 2 材料及び方法

### 2.1 インフルエンザ患者発生状況

flu集発患者数については、県保健福祉部健康推進課がとりまとめた「インフルエンザ様疾患施設別発生状況報告」をもとに集計した。また、発生動向調査の週別患者情報に基づき、定点医療機関当たりのインフルエンザ患者数

（1週間に1ヵ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 ウイルス検査材料

2010年11月～2011年4月にflu集発が発生した16施設の患者44人及び2010～2011年度の発生動向調査期間中に確認されたインフルエンザ様疾患患者のうち101人の、合わせて145人から採取した咽頭拭い液等をウイルス検査材料とした（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（以下「感染研」という。）から示された「病原体検出マニュアル H1N1新型インフルエンザ（2009年11月 ver.2）」に従って実施した。すなわち、検体140 $\mu$ Lから市販のRNA抽出キット（QIAamp Viral RNA Mini Kit：株式会社キアゲン）を用いてウイルスRNAを60 $\mu$ Lの緩衝液に抽出後、前記マニュアルに従い作成したプライ

表1 インフルエンザウイルス分離成績

	検体採取状況				ウイルス分離・同定			
	施設 No.	施設名	所在地	検体採取 年月日	分離	同定		
						AH1pdm09型 (新型)	AH3型 (A香港)	B型 (Victoria系)
集団 発生例	1	A小学校	井原市	2010.11.2	3/3*	3	0	0
	2	B小学校	岡山市	2010.12.21	2/3	0	0	2
	3	C小学校	岡山市	2011.1.14	0/1	0	0	0
	4	D小学校	岡山市	2011.1.15~17	3/3	3	0	0
	5	E小学校	玉野市	2011.1.17	2/2	2	0	0
	6	F小学校	矢掛町	2011.1.17	1/1	1	0	0
	7	G小学校	総社市	2011.1.17	1/1	1	0	0
	8	H小学校	鏡野町	2011.1.17	5/5	0	5	0
	9	I小学校	赤磐市	2011.1.24	4/4	4	0	0
	10	J小学校	真庭市	2011.1.25	2/4	2	0	0
	11	K中学校	備前市	2011.2.1~3	3/3	0	0	3
	12	L小学校	美作市	2011.2.7	0/1	0	0	0
	13	M小学校	岡山市	2011.2.5~7	2/2	0	0	2
	14	N小学校	岡山市	2011.3.24~26	3/3	0	3	0
	15	O小学校	新見市	2011.4.14	0/5	0	0	0
	16	P小学校	勝央町	2011.4.18	0/3	0	0	0
		小計				31/44 (70.5%)	16 (39.4%)	8 (18.2%)
散发例	所管保健所名		検体採取年月日					
	岡山市保健所	2010.12.13 ~12.20		7/7	0	0	7	
		2011.1.5 ~ 1.28		29/30	26	2	1	
		2.3 ~ 2.24		5/5	1	2	2	
		4.25 ~ 5.17		0/3	0	0	0	
	備前保健所	2010.12.22 ~2011.1.14		4/4	3	0	1	
	倉敷市保健所	2010.10.7 ~10.25		1/2	1	0	0	
		2011.1.7 ~ 1.31		3/4	3	0	0	
		2.1 ~ 2.24		8/9	7	1	0	
	備中保健所	3.3 ~ 4.20		6/8	1	5	0	
		2011.1.14 ~ 1.28		3/4	3	0	0	
		2.2 ~ 3.24		2/6	1	0	1	
	美作保健所	4.15 ~ 6.1		3/3	0	2	1	
		2010.12.6 ~12.28		2/3	0	1	1	
		2011.1.11 ~ 1.25		7/8	4	3	0	
	備北保健所	3.1 ~ 3.22		4/4	0	3	1	
		2011.1.14		1/1	1	0	0	
	小計				85/101 (84.2%)	51 (50.5%)	19 (18.8%)	15 (14.9%)
合計					116/145 (80%)	67 (46.2%)	27 (18.6%)	22 (15.2%)

\* 陽性数/検体数

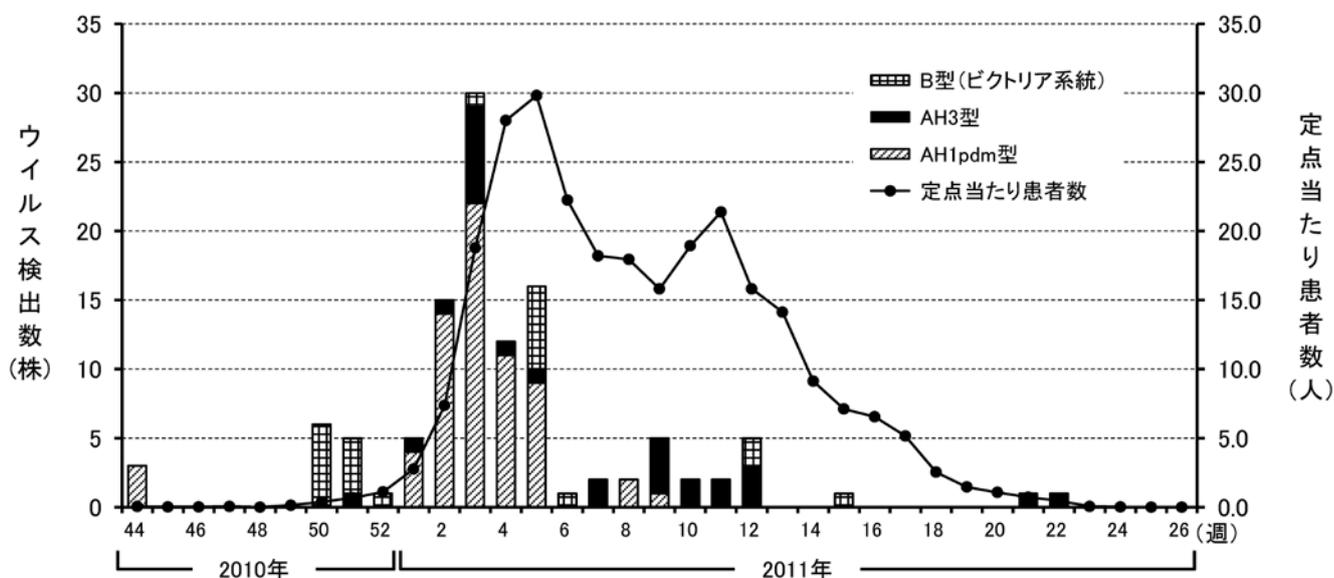


図1 週別のインフルエンザウイルス検出状況

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当たり（定点当たり）患者数を示す。

マー及びプローブを用いた逆転写PCR（以下「RT-PCR」という。）法によりウイルス遺伝子を増幅し、マイクロチップ電気泳動装置（MultiNA：株式会社島津製作所）で特異バンドを検出した。遺伝子検査法によりA型のM遺伝子と各亜型のHA遺伝子が同時に検出された場合を各亜型ウイルス陽性と判定し、M遺伝子のみが検出された場合はA型（型別不能）とした。

## 2.4 Inf.Vの分離及び抗原性解析

Inf.Vの分離はMDCK細胞を使用して行った<sup>1)</sup>。採取した咽頭拭い液等をMDCK細胞に接種後、盲継代2～3代後に細胞変性効果がみられた検体について、モルモット赤血球を用いて定法に従い<sup>2)</sup>赤血球凝集（以下「HA」という。）試験を実施し、HAが観察された場合を分離陽性とした。Inf.Vの存在が確認された検体について、AH1pdm09型ワクチン株〔A/California/7/2009 (H1N1pdm09)〕、AH3型ワクチン株〔A/Victoria/210/2009 (H3N2)〕、山形系統<sup>3)</sup>に属するB型Inf.V（山形系B型Inf.V）標準株（B/Bangladesh/3333/2007）及びビクトリア系統<sup>3)</sup>に属するB型Inf.V（ビクトリア系B型Inf.V）ワクチン株（B/Brisbane/60/2008）に対する抗血清（いずれも感染研より分与）を用いた赤血球凝集阻止（以下「HI」という。）試験<sup>2)</sup>により型別及び抗原性解析を行った。

## 2.5 AH1pdm09型Inf.V株のオセルタミビル耐性変異の検出

感染研が作成した「H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出実験プロトコル（2010年11月 ver.1）」に基づき、AH1pdm09型株のイラミニダーゼ遺伝子についてオセルタミビル耐性マーカー（H275Y）の検出を行った。すなわ

ち、市販キットにより抽出したウイルスRNA又はウイルス培養上清を滅菌蒸留水で10倍希釈したものを検査材料とし、2種類の異なる蛍光色素（FAM：耐性株Y275、VIC：感受性株H275）で標識されたTaqManプローブを用い、リアルタイムPCR装置（StepOne Plus：ライフテクノロジーズ株式会社）によりリアルタイムRT-PCRを行った。反応終了時の蛍光強度をグラフにプロットし、プロットの位置から、耐性株（Y275）、感受性株（H275）、耐性・感受性混合株（Y275とH275のMix）の判定を行った。

## 3 結果

### 3.1 患者発生状況

発生動向調査における県全体の定点医療機関当たり（以下「定点当たり」という。）のインフルエンザ患者数の推移を図1に示した。2010年第52週（12月下旬）に定点当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、しだいに患者数が増加しはじめ、2011年第2週（1月中旬）には注意報レベルにあたる定点当たり5.0人を上回った。その後、患者は急激に増加して第5週（2月上旬）にピーク（29.8人）に達した。それ以後患者数は一端減少に転じたものの、第10週（3月上旬）には再び増加し始め、翌週に第2のピーク（21.4人）を形成したのち患者数は漸減し、第21週（5月下旬）には定点当たり1.0人を下回り、流行はほぼ収束した。地区別の患者数推移をみると（図2）、いずれの地区においても2011年第5週頃と第11週頃をピークとする2峰性の流行パターンが認められた。地区別では、県南部地域の定点当たり患者数が県北部地域のそれに比べて全般的に多く、当該地域で流行が拡大していたことがうかがわれた。次に、流行規模の目安となる

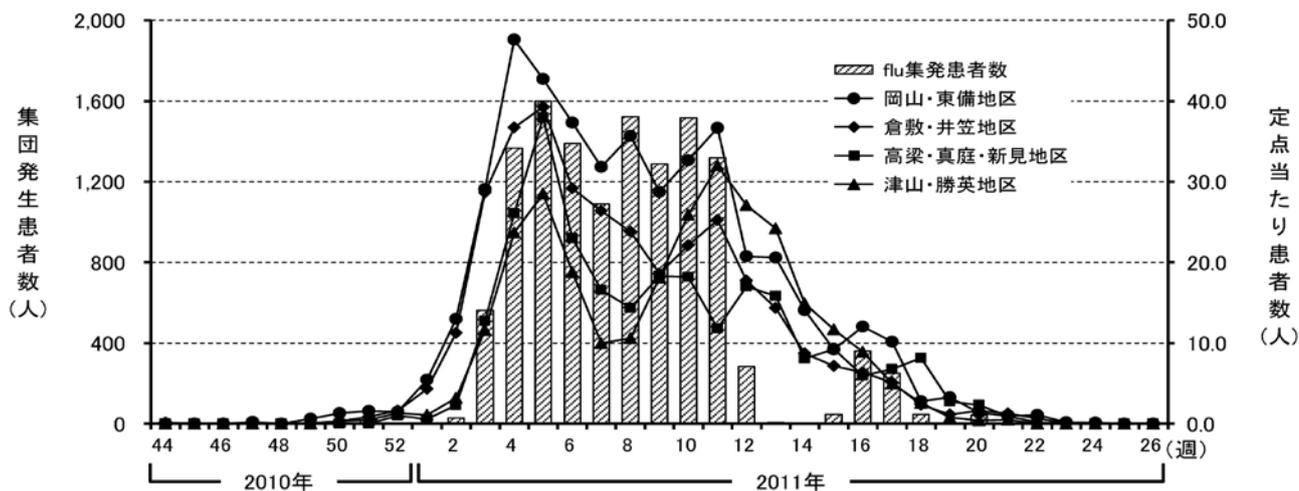


図2 週別のインフルエンザ患者発生状況

カラムが学校等におけるインフルエンザ様疾患の集団発生（Infl.集団）患者数を、折れ線が発生動向調査における地区別の定点医療機関当たり（定点当たり）患者数を示す。

定点当たりシーズンの患者総数（前年の第26週から翌年の第27週までの患者数）を集計したところ、268.3人と過去10シーズンでは<sup>4)</sup> 3番目に多い値であり、比較的大規模な流行であったことが明らかになった。

一方、flu集発患者発生状況をみると（図2）、インフルエンザ流行前の2010年11月2日（第44週）に、井原市内の小学校でflu集発が初めて確認（患者数5名）されたものの、その後年明けまではほとんど集団発生はみられなかった。しかしながら、県内がインフルエンザ流行期に入った2011年第2週（1月中旬）からは報告患者数が急激に増加しはじめ、第5週（2月上旬）にピーク（1,601人/週）に達した。その後、患者数はいったん減少に転じたものの、再び第8週（2月下旬）に患者数が1,521人/週を記録すると、第11週（3月中旬）頃まで週間の患者数が1,300人程度で推移した。それ以降は患者は急激に減少し、第14週（4月上旬）には患者は認められなくなったが、第16～17週（4月中旬～下旬）にかけて再び小ピークを形成し、第21週（5月下旬）にflu集発は終息した。最終的に届出患者総数は12,741人に達し、過去10年間では<sup>4)</sup> いわゆる新型（H1pdm09型）インフルエンザが猛威をふるった昨シーズンの2009～2010年（以下「昨シーズン」という。）に次ぐ患者数であった。

### 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とウイルス検出状況を表1及び図1に示す。flu集発が認められた16施設中12施設の患者31人（70.5%）からInf.Vが検出されたが、その内訳はAH1pdm09型が16件（39.4%）、AH3型が8件（18.2%）及びビクトリア系B型が7件（15.9%）であった。一方、散发例では101人中85人（84.2%）から

Inf.Vが分離・検出されたが、その内訳はAH1pdm09型が51件（50.5%）、AH3型が19件（18.8%）及びビクトリア系B型が15件（14.9%）であった。ウイルス株全体ではAH1pdm09型が67件（46.2%）と最も多く、次いでAH3型（27件：18.6%）、ビクトリア系B型（22件：15.2%）の順であった。

週別のウイルス検出状況は図1に示すように、AH1pdm09型は流行前半に相当する2010年第44週～2011年第9週にかけて検出された。一方、AH3型及びビクトリア系B型は流行期間全般にわたって検出されていたが、AH3型については第2のピーク頃に相当する2011年第9週～12週に集中する傾向が認められた。なお、型別の検出状況に明らかな地域差は認められなかった（表1）。さらにflu集発が発生した施設のうち、いずれの患者からもInf.Vが分離または検出されなかった4施設の10検体、及び散发例101検体中Inf.Vが分離されなかった16検体について、FL細胞及びVero細胞を用いたウイルス分離を実施したが、いずれも分離陰性であった。

### 3.3 流行年齢層の解析

昨シーズンにおいて、大規模な流行を引き起こしたAH1pdm09型が、今シーズンも流行前半を中心に検出された。そこで、今回のAH1pdm09型流行がどのような年齢層に広がっていたのかを明らかにするため、流行シーズン前半にあたる2010年第44週～2011年第9週の年齢群別の定点当たり患者数をもとに、年齢群別の構成割合を求めた（図3）。なお比較対象として、昨シーズンの構成割合についてもあわせて示した。その結果、5～19歳の主に学齢期を中心とした年齢層では、昨シーズンに比べ割合が減少していたのに対し、20歳以上ではいずれの年齢群においても、

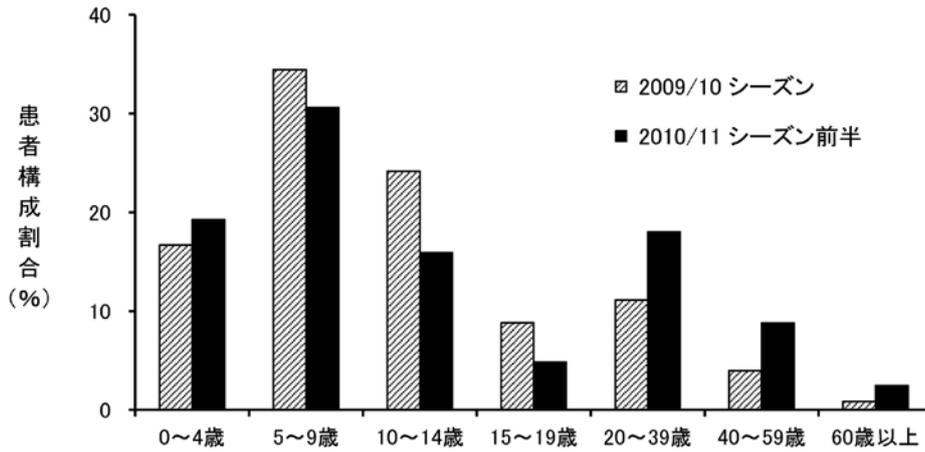


図3 シーズン別患者年齢構成割合の比較

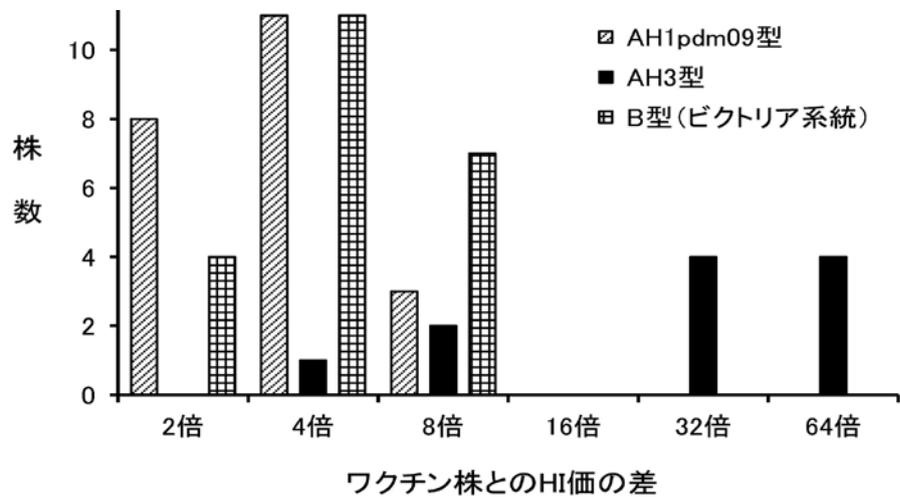


図4 インフルエンザウイルス分離株の抗原性解析結果

AH1pdm09型はワクチン株のA/California/7/2009 (H1N1pdm09)を、AH3型はワクチン株のA/Victoria/210/2009 (H3N2)を、及びビクトリア系B型はワクチン株のB/Brisbane/60/2008をそれぞれ比較対象として、HI試験により解析を行った。

その割合が1.6~3倍と大きく増加していることがわかった。

### 3.4 ウイルスの抗原性解析

搬入された検体のうち、75検体についてMDCK細胞を用いてウイルス分離を試みたところ、AH1pdm09型Inf.Vが22株、ビクトリア系B型Inf.Vが22株及びAH3型Inf.Vが11株それぞれ分離された。まず最初にAH1pdm09型分離株の抗原性について、ワクチン株であるA/California/7/2009 (H1N1pdm09)を比較対象としてHI試験により解析を行ったところ、22株中19株(86.4%)がその分離時期にかかわらずワクチン株とほぼ類似した抗原性(HI価で4倍以内の差)であることがわかった(図4)。次に、ビクトリア系B型についても同様に、ワクチン株のB/Brisbane/60/2008と比較したところ、22株中15株(68.2%)がワクチン株とHI価で4倍以内の抗原性の差

にとどまっていたが、7株については8倍の差が認められた(図4)。さらに分離時期別にみると、流行前半の2010年第50~51週に分離された株は、いずれもワクチン株とHI価で4倍以内の差にとどまっていたのに対し、今シーズン中盤~後半にあたる2011年第1~15週に分離された株については、HI価で8倍の差の株が全体の6割以上を占めていた。最後にAH3型分離株についても同様に解析したところ、ワクチン株のA/Victoria/210/2009 (H3N2)とHI価で8倍以上異なる株が11株中10株と大部分を占め、またHI価で32倍以上と大きく抗原性が異なる株も8株認められた(図4)。

### 3.5 AH1pdm09型Inf.Vのオセルタミビル耐性変異の有無

2010年10月~2011年2月に検出されたAH1pdm09型Inf.V計52株についてオセルタミビル耐性変異の有無について検査したところ、2011年1月に岡山市保健所管内の医療機

関で採取された検体より分離された1株のみが、耐性・感受性混合変異を有することが明らかになった（出現頻度：1.9%）。なお医療機関への聞き取り調査の結果、耐性株が分離された検体はオセルタミビル（商品名：タミフル）治療投与開始5日目に採取されたものであることがわかった。さらに感染研における詳細な解析の結果、当該株のオセルタミビル及びペラミビルに対するIC50の値は、それぞれ1.69nM（感受性株：1.04nM）及び0.09nM（感受性株：0.04nM）であり、当該薬剤に対し若干の感受性低下が認められた。なお、ザナミビル及びラニナミビルについてはいずれも感受性を有していた。

#### 4 考 察

今シーズンにおける県内のインフルエンザは、患者発生状況から2011年第5週（2月上旬）を第1番目の、同年第11週（3月中旬）を第2番目のピークとする2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などから、第1波がAH1pdm09型の流行により、第2波が主にAH3型の流行によりそれぞれ引き起こされたものと考えられた。全国の流行状況を見ると<sup>5)・6)</sup>、2011年第4週に第1番目の、第11週に第2番目の及び第16週に第3番目のピークがそれぞれ確認されており、ウイルス検出状況などから第1のピークはAH1pdm09型、第2のピークはAH3型、第3のピークはビクトリア系B型によると思われるなど、本県状況とほぼ類似していた。

昨シーズンは、特に学齢期にあたる5～19歳を中心にAH1pdm09型の大規模な流行が確認されたが<sup>4)</sup>、今シーズンも、前半を中心に引き続きAH1pdm09型の流行が確認された。このようにAH1pdm09型が両シーズンにわたり流行した要因を明らかにするため、患者の年齢構成について今シーズン前半と昨シーズンで比較を行った。その結果、今シーズンは5～19歳の構成割合が減少した一方で、20歳以上ではいずれもその割合が増加するなど、流行年齢層に違いがみられた。すなわち昨シーズンは未成年者が流行の中心であったものが、今シーズンは成人にもその流行が波及したことが、連続して流行した要因のひとつではないかと推察された。

今シーズンの流行は、過去10年間と比較すると<sup>4)</sup>、患者発生状況などから、比較的大規模な部類に属することがわかった。このように流行規模が拡大した要因として、AH1pdm09型が昨シーズンに引き続き流行したことに加え、今シーズン後半に流行したAH3型がワクチン株とは抗原性が異っていたこと、さらにビクトリア系B型がシーズンを通じて流行していたことなどが考えられた。いずれにしても、AH1pdm09型の流行の有無が今後の流行規模を左

右すると考えられることから、同ウイルスの流行状況には今後とも注意する必要がある。

今シーズンに県内で検出されたAH1pdm09型Inf.V株のオセルタミビル（商品名：タミフル）耐性変異について調べたところ、耐性株が1件確認された（耐性株出現頻度：1.9%）。この出現頻度は昨シーズンの値（1.28%）とほぼ同様であり<sup>4)</sup>、耐性株が増加する傾向は特にみられていない。しかしながら、両シーズンの耐性株は、タミフルの治療投与により出現した可能性が強く示唆されたことから、同薬剤の使用にあたっては耐性株の出現に注意を払う必要があると思われる。

#### 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) 小田切孝人、進藤奈邦子、奥野良信、竹内可尚、今井正樹ら：インフルエンザ、病原体検出マニュアル、853-895、国立感染症研究所監修、2006
- 3) Nerome, R., Hiromoto, Y., Sugita, S., Tanabe, N., Ishida, M., Matsumoto, M., Lindstrom, S. E., Takahashi, T., Nerome, K.: Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism. Arch. Virol., 143, 1569-1583, 1998.
- 4) 葛谷光隆、濱野雅子、木田浩二、藤井理津志、川井睦子：岡山県における2009～2010年シーズンのインフルエンザ流行について、岡山県環境保健センター年報、35、99-105、2011
- 5) 国立感染症研究所 感染症情報センター：インフルエンザ 2010/11シーズン、病原微生物検出情報、32、314-316、2011
- 6) 岸田典子、高下恵美、藤崎誠一郎、徐 紅、伊東玲子ら：2010/11シーズンのインフルエンザ分離株の解析、病原微生物検出情報、32、317-323、2011

【調査研究】

## 胃腸炎ウイルスの疫学的研究

— 下水を用いたヒトC群ロタウイルスサーベイランスの有効性—  
Studies on Epidemiology of Viral Gastroenteritis in Okayama Prefecture  
— Efficiency of the survey of human group C rotaviruses by using sewage water —

葛谷光隆, 木田浩司, 溝口嘉範, 濱野雅子, 藤井理津志 (ウイルス科)

Mitsutaka Kuzuya, Kouji Kida, Yoshinori Mizoguchi, Masako Hamano, and Ritsushi Fujii  
(Department of virology)

### 要 旨

本県におけるヒトC群ロタウイルス (ヒトCRV) の流行実態の解明を目的とし, 2009年1月~2011年8月に県南部の下水処理場で採取された60検体の下水について, リアルタイムPCR法を用いてヒトCRVを定量的に検査するとともに, 同時期に採取された胃腸炎患者糞便1,019検体を対象としたヒトCRV検索を実施した。その結果, ヒトCRVは概ね1月~7月にかけて下水から検出され, 2009年3月には, 1mLあたり最大で4,146コピーという多量のウイルスが存在することがわかった。また, 2010年にはピーク時のウイルス量が2009年の1/10程度となり, 2011年にはさらにウイルス量が減少して明瞭なピークが確認できなくなるなど, 年によりウイルス量に差がみられることも明らかになった。一方, 下水調査期間中に採取された胃腸炎患者糞便からはヒトCRVは1例も検出されなかったが, 全国の検出状況から2009年にはヒトCRVの全国的流行があったものと推察された。したがって, 2009年の下水から多量のウイルスが検出されたことは, この全国流行が本県にも波及していたことを示すものであり, 下水調査に基づくサーベイランスがヒトCRVの流行状況の正確な把握に有効であることが示唆された。

[キーワード: ヒトC群ロタウイルス, Real-time RT-PCR, 定量的検出, 下水, 岡山県]

[Key words: human group C rotavirus, Real-time RT-PCR, quantitative detection, sewage water, Okayama Prefecture]

### 1 はじめに

ヒトC群ロタウイルス (以下「ヒトCRV」という。) は日本をはじめ世界各地に広く分布しており, しばしば食中毒様の集団胃腸炎を引き起すため公衆衛生上問題視されている。国内におけるヒトCRV集団発生事例は, 1988年に福井県で発生した大規模事例以降, 2006年までに計19例が報告されている<sup>1)</sup>。推定感染経路については, ヒト→ヒト感染が大部分を占めるものの, 食品等が原因と思われるケースも散見される。一方, 散発性胃腸炎患者からのヒトCRVの検出頻度は約1%前後と<sup>2), 3)</sup>, 小児等で広く流行しているA群ロタウイルスの頻度 (25~30%) に比べて低率であるにもかかわらず, 住民の半数近くがヒトCRVに対する抗体を保有しているなど<sup>4), 5)</sup>, その流行実態については未だ不明な点が多い。

主にし尿などの生活排水が流れ込む下水には, 患者のみならず不顕性感染者等から排泄されたウイルスが流入するため, その地域におけるウイルス流行の有効な指標となりうることが指摘されている<sup>6)</sup>。実際, これまで多くの機関により下水や河川等の環境水を用いたウイルスサーベラ

ンスが実施されており, ポリオウイルス野生株の監視やエンテロウイルス及びノロウイルス等の流行実態の解明に一定の成果を上げている<sup>6)~9)</sup>。したがって, ヒトCRVについても下水等の調査によりその流行の解明が期待できるが, 環境水を用いたサーベイランスに関しては, Melegら<sup>10)</sup> がハンガリーにおいて行っているのみで, 国内ではほとんど実施されていない。

我々は平成22年度の調査研究において, ヒトCRVを特異的かつ高感度に検出できるリアルタイムRT-PCR法を確立した<sup>11)</sup>。本法は糞便のみならず, 環境水中のヒトCRVを定量的に検出可能であることが明らかになった。そこで, このリアルタイムRT-PCR法を用いて下水中のヒトCRVを定量的に検査するとともに, 県内医療機関を受診した胃腸炎患者糞便を対象としたヒトCRV検索もあわせて行うことで, 本県におけるヒトCRVの流行実態を明らかにすることを試みた。

## 2 材料及び方法

### 2.1 検査材料

下水検体としては、2009年1月～2011年8月に県南部のA下水処理場で概ね2週間毎に採取された60検体の流入下水を、片山らが報告している陰電荷膜濃縮法<sup>12)・13)</sup>により1,250倍に濃縮したものを検査材料とした。一方、胃腸炎患者検体については、下水検査実施期間中に(独)国立病院機構岡山医療センター小児科で採取された15歳以下の小児胃腸炎患者糞便1,019検体を対象とした。なお、年別検体数は2009年が282検体、2010年が398検体、及び2010年が339検体であり、また年齢構成は5歳未満が835名、5歳以上が184名であった。

### 2.2 ヒトCRV検出用リアルタイムRT-PCR法

ヒトCRV検出用リアルタイムRT-PCR法については既報<sup>11)</sup>の方法に従って実施した。すなわち、市販キット(QIAamp Viral RNA mini kit:株式会社キアゲン)により検体からウイルスRNAを抽出後、DNA分解酵素で処理し、VP7遺伝子の両端に相補的なプライマーを用いてcDNAを合成した。合成されたcDNAを鋳型として、ヒトCRVに特異的なプライマー及びTaqManプローブを用いてStepOnePlus(ライフテクノロジーズ株式会社)によりリアルタイムRT-PCRを行った。結果の解析はStepOne Software v2.1(ライフテクノロジーズ株式会社)を用いた。なおウイルスコピー数については、既知のコピー数のコントロールプラスミドとの比較により算出し、2回の測定結果を平均して下水1mLあたりのコピー数を求めた。

### 2.3 ノロウイルス検出用リアルタイムRT-PCR法

ノロウイルス(NoV)検出用リアルタイムRT-PCR法は、平成15年(2003年)11月5日付け食安監第1105001号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知に準拠し、NoV遺伝子群Ⅱ型についてのみ実施した。すなわち、下水より抽出したRNAを鋳型としてoligo-dT primer(ライフテクノロジーズ株式会社)とrandom hexamer(タカラバイオ株式会社)により逆転写を行い、cDNAを合成した。リアルタイムRT-PCRは、StepOne Plus(ライフテクノロジーズ株式会社)とGene Expression Master Mix(同)でTaqMan法<sup>14)</sup>に基づいて実施した。なお下水1mLあたりのウイルスコピー数は、ヒトCRVの場合と同様の方法により算出した。

### 2.4 ヒトCRV検出用酵素抗体(ELISA)法

ヒトCRV検出用ELISA法については既報<sup>3)</sup>の方法に従い、糞便の10%乳剤上清を検体として測定し、吸光度が0.15を上回った場合を陽性と判定した。

## 3 結果

### 3.1 下水中のヒトCRVコピー数の推移

下水中のヒトCRVコピー数の推移を表1及び図1に示す。ヒトCRVは概ね1月から7月にかけて検出され、それ以外の期間は2010年10月20日を除いていずれも検出限界以下であった。コピー数のピークは2009年3月頃に、2010年5月頃にそれぞれ認められたが、2011年については明瞭なピークはみられなかった。下水中のヒトCRVコピー数の推移を年ごとに比較すると、検出期間及びコピー数とも

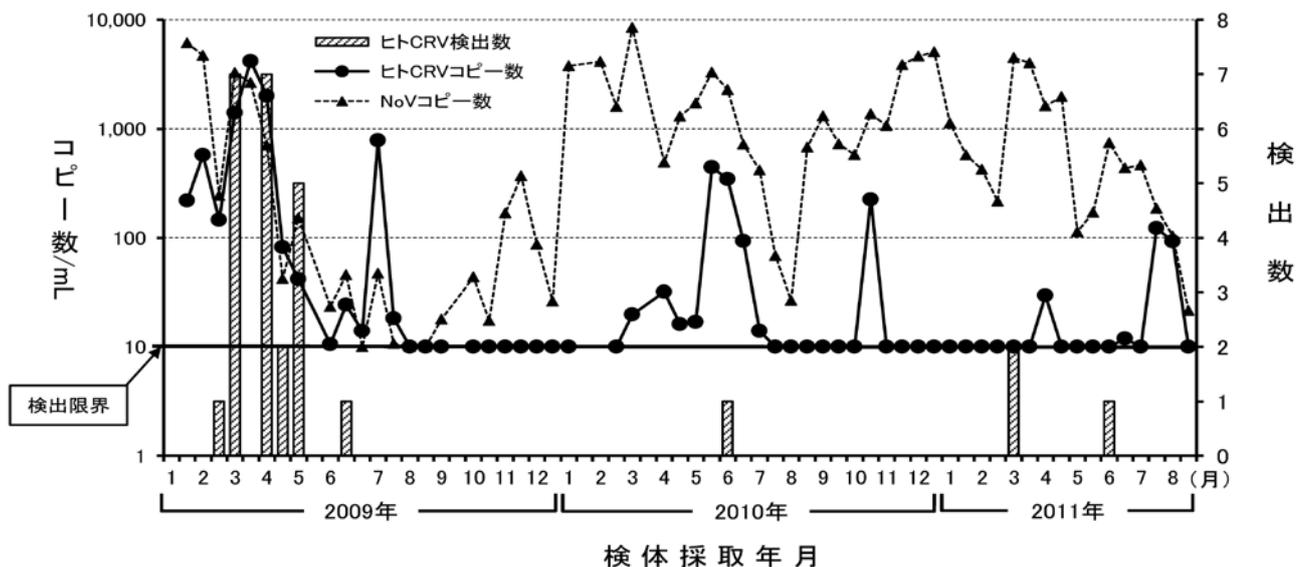


図1 下水のヒトCRV及びNoVコピー数と胃腸炎患者からのヒトCRV検出状況  
折れ線が下水のヒトCRV及びNoVのウイルス量を、  
カラムが全国おける胃腸炎患者からのヒトCRV検出数を示す。

表1 下水中のヒトCRVコピー数および検体採取日前の降水量

採取年月日	コピー数/mL	降水量(mm)*		採取年月日	コピー数/mL	降水量(mm)*				
		前々日	前日			前々日	前日			
2009年	1月27日	220	0	0	2010年	6月8日	344	0	0	
	2月10日	572	0	2.0		6月22日	93	29.0	0	
	2月25日	146	5.5	1.5		7月6日	14	0	1.0	
	3月10日	1,408	0	0		7月21日	≤10	0	0	
	3月24日	4,146	4.0	0		8月10日	≤10	0	0	
	4月7日	2,006	0	0		8月24日	≤10	0	0	
	4月21日	82	0	2.0		9月7日	≤10	0	0	
	5月19日	42	4.5	0		9月22日	≤10	1.5	0	
	6月2日	11	0	0		10月5日	≤10	17.0	1.5	
	6月16日	24	0	0		10月20日	225	0	0	
	6月30日	14	0	14.5		11月10日	≤10	1.0	0	
	7月14日	781	0	0		11月22日	≤10	0	0	
	7月28日	18	8.5	0.5		12月7日	≤10	0	0	
	8月11日	≤10	76.5	50.5		12月21日	≤10	0	1.5	
	8月25日	≤10	0	0		2011年	1月12日	≤10	0	0
	9月8日	≤10	0	0			1月26日	≤10	0	0
10月13日	≤10	0	0	2月7日	≤10		0	0		
10月27日	≤10	0	3.0	2月22日	≤10		0	0		
11月10日	≤10	0	0	3月8日	≤10		6.5	3.0		
11月24日	≤10	2.5	0	3月23日	≤10		10.5	1.0		
12月8日	≤10	0	0	4月4日	30		0	0		
12月22日	≤10	0	0	4月20日	≤10		11.5	2.0		
2010年	1月19日	≤10	0	0	5月9日		≤10	11.5	0	
	2月2日	≤10	2.5	13.0	5月23日		≤10	0	8.0	
	2月24日	≤10	0	0	6月6日		≤10	0	0	
	3月9日	20	5.5	0	6月22日		≤10	8.5	6.5	
	4月13日	32	51.0	0	7月4日		≤10	6.5	6.0	
	4月21日	16	4.5	9.0	7月20日		123	7.5	27.5	
	5月11日	17	0	20.0	8月9日		93	0	0	
5月25日	444	102.0	16.0	8月23日	≤10		28.0	0.5		

\*岡山市における降水量（気象庁ホームページより）

違いが認められた。すなわち、2009年では1月～7月に最大で4,146コピー/mL検出されたのに対し、2010年には3月～7月に最大で444コピー/mL、さらに2011年には4月～8月に最大で123コピー/mLと検出期間及びコピー数とも年々減少していく傾向が認められた。そこで、この減少傾向が下水中の阻害物質等の影響によるものかどうかを確かめるため、毎年冬期に流行することがわかっているNoVについてウイルスコピー数を測定した。その結果、NoVに関しては冬期～春期をピークとした検出パターンが毎年認められ、ウイルスコピー数の最大値にも大きな変動は認められなかった（図1）。したがって調査期間については、下水中に測定系を阻害するような物質等の混在はなかったものと推察された。また、下水採取前日及び前々日の降水量と検出コピー数との比較を行ったが（表1）、両者間に特に明確な関連性は認められず、下水のウイルス定量値は降水の影響をほとんど受けないものと考えられた。

### 3.2 胃腸炎患者からのヒトCRV検出状況と下水のコピー数との関連性

下水調査期間中に小児胃腸炎患者から採取された糞便1,019検体について、ELISA法によりヒトCRVの検索を行ったが陽性例は1件も認められなかった。また、調査期間中に県内でヒトCRVによる集団胃腸炎事例の発生もみられなかった。そこで、全国の地方衛生研究所等における散发性胃腸炎患者からのヒトCRV検出状況について、国立感染症研究所感染症情報センター発行の病原微生物検出情報（2009年～2011年発行分）をもとに調査したところ、東日本～九州の8府県から合計27例が検出報告されていた。検出状況は図1に示すように、2009年は2月～6月に計23例（埼玉県、神奈川県、三重県、大阪府、愛媛県で検出）、2010年は6月に1例（熊本県で検出）、2011年は3月に2例及び6月に1例（石川県、山口県で検出）が報告されており、2009年にヒトCRVの検出が集中していることがわかった。さらに、ヒトCRVによる集団発生事例について

も同様に調べたところ、2009年の3月～6月に4事例（静岡県、大阪府で発生）、2011年3月に1事例（山口県で発生）が報告されており、散発例の多い時期に集団発生が多発する傾向が認められた。以上の結果について、下水のヒトCRVコピー数との比較を行ったところ（図1）、患者からの検出数が多くなる時期に一致して、下水のヒトCRVコピー数も増加する傾向が認められた。

#### 4 考 察

本研究により、県内の下水におけるヒトCRVの動態について詳細に明らかにすることができた。ヒトCRVは概ね1月～7月にかけて下水から検出され、また1 mLあたり最大で4,146コピーという多量のウイルスが存在することがわかった。Melegら<sup>10)</sup>は、ハンガリーにおいて下水中のヒトCRVを定量的に検査し、ウイルスは2月～8月にかけて検出され、ピーク時期の2月～4月には最大で1 mLあたり $10^5$ コピーのウイルスが検出されたことを報告しているが、我々の2009年の調査結果はこれにほぼ一致していた。その一方で、下水中にヒトCRVが継続的に検出されるものの、年により検出ウイルス量及び検出期間に大きな差があることも明らかになった。2009年には、毎年大きな流行を引き起こすNoVに匹敵する量が存在していたが、2010年にはピーク時のウイルス量が1/10程度となり、検出時期も短くなった。2011年にはさらにウイルス量が減少し、明瞭なピークが確認できなくなった。これまでの胃腸炎患者におけるサーベイランス結果から、ヒトCRVが数年ごとに流行を繰り返すことが示唆されたが<sup>3), 15)</sup>、今回の結果はこの知見と一致するものであった。

今回の調査期間中に、県内の医療機関で採取された胃腸炎患者糞便からはヒトCRVは1例も検出されなかったが、全国的レベルでは少数ながらも散発例及び集団発生例からヒトCRVが検出された。特に検出状況から、2009年にはヒトCRVの全国的流行があったものと推察された。したがって、2009年に県内で採取された下水から多量のヒトCRVが検出されたことは、この全国流行が本県にも波及していたことを示すものと考えられた。一方、2010年～2011年にはヒトCRV検出数が全国的に少なかったが、県内でも当該時期の下水中ヒトCRVコピー数も2009年のレベルに比べて減少していた。以上のことから、下水中のウイルス量はヒトCRV流行規模をほぼ反映しているものと思われ、下水調査に基づくサーベイランスがヒトCRVの正確な流行状況の把握に有効であることが示唆された。

下水調査結果及び全国の検出状況から、2009年に県内でヒトCRVが広く流行していたことがわかったが、同時期に採取した小児胃腸炎患者糞便からはヒトCRVは全く検出

されなかった。このように患者サーベイランスだけではヒトCRV流行が探知し得なかったのは、ヒトCRV感染症の好発年齢と考えられる5歳以上の小児<sup>2), 3)</sup>の検体が184検体と、全体の18%程度とどまっていたことが原因の一つではないかと推察された。一方Melegら<sup>10)</sup>は、流入下水から多量のウイルスが検出されながら、調査期間中にヒトCRV感染者はわずか1名しか確認されなかったことから、ヒトCRVに感染しても明らかな症状を示さない場合が多いのではないかと考察している。今回の結果でも、2009年においてはNoVとほぼ同量のウイルスが下水中に存在していたが、同年における小児胃腸炎患者からのNoV検出率が6.5%<sup>16)</sup>に対し、ヒトCRV陽性者は1名も確認されなかった。したがって、ヒトCRVに感染しても明らかな症状を示さないか、軽症で経過するため医療機関等を受診せず、結果として感染者が探知されなかったという可能性も考えられる。いずれにしても、ヒトCRVの流行実態をより明らかにするためには、胃腸炎患者サーベイランスのみならず、下水の継続的な調査が有効であると思われる。

#### 文 献

- 1) 葛谷光隆：ロタウイルス感染症，公衆衛生，71，991-993，2007
- 2) Castello, A. A., Arguelles, M. H., Villegas, G. A., Olthoff, A., Glikmann, G.: Incidence and prevalence of human group C rotavirus infections in Argentina, *J. Med. Virol.*, 67, 106-112, 2002
- 3) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nishijima, M., Ogura, H.: Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture, Japan, between 1986 and 2005, *J. Med. Virol.*, 79, 1219-1228, 2007
- 4) James, V. L., Lambden, P. R., Caul, E. O., Cooke, S. J., Clarke, I. N.: Seroepidemiology of human group C rotavirus in the UK, *J. Med. Virol.*, 52, 86-91, 1997
- 5) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Ohata, R., Ogura, H., et al.: Seroepidemiology of human group C rotavirus in Japan based on a blocking enzyme-linked immunosorbent assay, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 161-165, 2001
- 6) 矢野一好：下水中のウイルスの消長とその疫学的意味，臨床とウイルス，36，134-140，2008
- 7) 岩井雅恵，松浦久美子，滝澤剛則：富山県における環境水ウイルスサーベイランスの疫学的意味，臨床とウイルス，36，127-133，2008

- 8) 佐藤 卓, 斎藤幸一, 小林良雄, 白藤周司: 下水中の  
病因ウイルスの動態に関する研究, 岩手県衛生研究所  
年報, 43, 19-24, 2000
- 9) 藤浦 明, 小林慎一, 山下照夫, 椛島由佳, 伊藤 雅  
ら: 矢作川浄化センターに流入する下水からのウイル  
ス分離について, 愛知県衛生研究所年報, 53, 21-25,  
2003
- 10) Meleg, E., Banyai, K., Martella, V., Jiang, B.,  
Kocsis, et al.: Detection and quantification of group  
C rotaviruses in communal sewage, *Appl. Environ.  
Microbiol.*, 74, 3394-3399, 2008
- 11) 葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志: 胃腸炎  
ウイルスの疫学的研究— Real-time RT-PCR法による  
ヒトC群ロタウイルス検査法の開発—, 岡山県環  
保七  
年報, 35, 93-97, 2011
- 12) Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K.,  
Ohgaki, S.: Application of cation-coated Filter  
Method to Detection of Noroviruses, Enteroviruses,  
Adenoviruses, and Torque Teno Viruses in  
the Tamagawa River in Japan, *Appl. Environ.  
Microbiol.*, 71, 2403-2411, 2005
- 13) 片山浩之: 新たなウイルス濃縮方法の開発と水道水  
および水道水源調査への適用, *モダンメディア*, 52,  
185-190, 2006
- 14) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M.,  
Uchida, K., Fukushi, S. et al.: Broadly reactive and  
highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based  
on real-time quantitative reverse transcription-PCR,  
*J. Clin. Microbiol.* 41 : 1548-1557, 2003
- 15) Schnagl, R. D., Boniface, K., Cardwell, P.,  
McCarthy, D., Ondracek, C., et al.: Incidence of  
group C human rotavirus in central Australia and  
sequence variation of the VP7 and VP4 genes, *J.  
Clin. Microbiol.* 42, 2127-2133, 2004
- 16) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 木田浩司, 榎原  
幸二, 濃野 信ら: 胃腸炎ウイルスの疫学的研究—  
岡山県の散発性胃腸炎患者におけるノロウイルス,  
サポウイルスおよびアストロウイルスの流行疫学  
(2008/2009シーズン~2009/2010シーズン)—, 岡山  
県環  
保七  
年報 35, 85-91, 2011



【調査研究】

## 感染症流行予測調査（平成23年度ポリオ感染源調査）

Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases  
Surveillance of Poliovirus in Okayama Prefecture (2011-2012)

溝口嘉範, 木田浩司, 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 羽原 誠\* (ウイルス科)  
\*保健福祉部健康推進課

Yoshinori Mizoguchi, Koji Kida, Masako Hamano, Ritsushi Fujii, Mitsutaka Kuzuya,  
Makoto Habara\* (Department of Virology)

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

### 要 旨

麻痺性ポリオは、ポリオウイルス感染によってまれに発症し、筋力低下、筋緊張低下、筋肉萎縮等の後遺症が残る重篤な感染症である。我が国では、昭和39年から生ポリオワクチンによる定期接種が開始され、平成12年にポリオの根絶をWHOに報告した。しかし、野生株の侵入及びワクチン株が変異したワクチン由来ポリオウイルス（VDPV）によるポリオ流行の可能性が依然として存在する。このため、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た感染源調査を実施した。調査は平成23年8月に岡山市の健康な保育園児60名を対象に、糞便検体を採取し、ポリオウイルスの分離を試みた。その結果、1検体からポリオウイルス3型が分離されたが、詳細な解析の結果ワクチン株と判明し、野生株の国内侵入及びVDPVの伝播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, Poliovirus]

## 1 はじめに

ポリオは急性灰白髄炎とも呼ばれ、エンテロウイルス属のポリオウイルスによって引き起こされる感染症である。ポリオウイルスには1型, 2型及び3型という3種類の血清型が存在する。免疫を持たないヒトがポリオウイルスに感染すると、多くは風邪様症状を呈した後に回復するが、まれに麻痺性ポリオを発症する。ポリオウイルスは運動神経細胞で増殖し細胞を破壊することにより、感染した神経細胞支配下の筋肉に恒久的な麻痺をもたらす<sup>1)</sup>。現在のところ、ポリオに対する特異的な治療薬は存在しないため、流行制御の基本はワクチンによる予防接種である。我が国では生ポリオワクチンの導入後、患者数は激減し、野生株によるポリオ患者は昭和55年を最後に発生していない。しかし、海外との交易によりポリオ流行地域からポリオウイルス野生株が国内に侵入する可能性があることから継続的な監視が必要である。また、生ポリオワクチン株が変異し毒性を回復したことでポリオを引き起こす可能性があるワクチン由来ポリオウイルス（Vaccine-Derived Poliovirus : 以下「VDPV」という。）の監視も継続的に行う必要がある。VDPVはワクチン株がヒトの間で感染を繰り返すうちにカプシドVP1領域の塩基配列が1.0%~15%変異したポリ

オウイルスと定義され、諸外国ではVDPVによるアウトブレイクも数多く報告されている<sup>2)~5)</sup>。

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さまざまな感染症に対する集団免疫の把握（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、総合的に感染症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。ポリオウイルス感染源調査（以下「感染源調査」という。）はその一環であり、ポリオ流行地域からのポリオウイルス野生株の輸入及びVDPVの伝播を監視することを目的にしている。本県では昭和55年から感染源調査を継続的に実施しているが、平成23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M保育園の健康な園児60人（男性：30人、女性：30人、0~1歳20人、2~3歳20人、4~6歳20人）を対象に、生ポリオワクチン接種時期（4月から5月）から2ヶ月以上経過した平成23年8月2日~8月11日の期間に糞便を採取し、試験に供した。

## 2.2 ウイルス分離試験

感染症流行予測調査実施要領（平成23年度）及び伝染病流行予測検査術式（平成7年度）<sup>6)</sup>に従い、FL細胞及びRD18S細胞を使用した。24穴培養プレートに単層培養した各細胞について維持培養液に交換後、10%糞便上清を100 $\mu$ L接種し、35℃で7日間観察した。7日間観察しても細胞変性効果（cytopathic effect：以下「CPE」という。）が現れない時は、凍結融解後、培養上清100 $\mu$ Lを新しい細胞に継代し、さらに7日間観察した。計14日間観察してCPEが現れない場合はウイルス分離陰性とした。観察期間中にCPEが出現した検体についてウイルス分離陽性とし、同定試験に供した。

## 2.3 ウイルス同定試験

分離されたウイルスの同定は中和試験により行った。抗血清はエンテロウイルスNT試薬「生研」（デンカ生研）、エコーウイルス中和用プール血清（EP-95）（国立感染症研究所分与）及びアデノウイルスNT試薬「生研」（デンカ生研）を用いた。

中和試験によって同定されたポリオウイルスについては国立感染症研究所に型内鑑別試験を依頼した。

中和試験で同定できなかった分離株のうち、CPEの形態からエンテロウイルス属であると推測されたものは、病原体検出マニュアル<sup>7)</sup>の「ヘルパンギーナ」の項に従い、VP4-VP2部分領域を逆転写PCRにより増幅した。また、アデノウイルス属と推測されたものは、病原体検出マニュアル<sup>7)</sup>の「アデノウイルス性結膜炎」の項に従い、ヘキソン蛋白をコードする遺伝子のHVR4、HVR5及びHVR7部分領域を逆転写PCRにより増幅した。次に、Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザ（life technologies社）を用いたダイレクトシークエンス法で塩基配列を決定し、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のBLAST検索により型の同定を行った。

## 3 結果

表1に今回の感染源調査で分離されたウイルスを年齢別に示した。1歳の男児からポリオウイルス3型が分離された。検出されたポリオウイルスのカプシドVP1全領域の塩基配列についてワクチン株（Sabin株）遺伝子との相同性解析を行った。その結果、ポリオウイルス3型ワクチン株と99.6%の相同性であったため、ポリオウイルス3型ワクチン株と最終判定された。その他のウイルスとしてコクサッキーウイルスA10型（以下「CA10」という。）4株（0歳児1人、1歳児1人、2歳児2人）、コクサッキーウイルスB1型（以下「CB1」という。）9株（1歳児2人、3歳児2人、4歳児3人、5歳児2人）、アデノウイルス1型（以下「AD1」という。）2株（4歳児2人）、アデノウイルス5型（以下「AD5」という。）2株（1歳児2人）が分離された。

## 4 考察

感染源調査はポリオ流行地域からのポリオウイルス野生株の輸入及びVDPV伝播の可能性を調査する病原体サーベイランスとして毎年実施されている。本県では昭和55年から感染源調査を実施しているが、今回初めてポリオウイルスを検出した。国立感染症研究所による型内鑑別試験の結果、検出されたポリオウイルスはワクチン株であり、野生株の侵入及びVDPVの伝播は認められなかった。

当該ウイルスが検出された1歳男児は過去に生ポリオワクチンの予防接種を受けておらず、予防接種受診者の腸管内で増殖したワクチン株から感染したと考えられる。生ポリオワクチンは弱毒化されたものであるが、腸管内で感染を繰り返すうちに元の毒性を回復し、VDPVに変異することが指摘されている<sup>2)</sup>。今回の感染源調査ではワクチン接種時期から2ヶ月後に採便を行っていたため、当該児からVDPVが検出されることが危惧された。しかし、今回検出されたポリオウイルスはワクチン株と比較して1.0%未満の変異であり、VDPVではなかった。保育園のような集団生活を送る0歳児、1歳児においては糞口感染が繰り返し起

表1 年齢別ポリオウイルス及びその他のウイルス分離成績

年齢 (歳)	検体数	ポリオウイルス			コクサッキーウイルス		アデノウイルス		合計
		1型	2型	3型	A10型	B1型	1型	5型	
0	4	—	—	—	1	—	—	—	1
1	16	—	—	1	1	2	—	2	6
2	10	—	—	—	2	—	—	—	2
3	10	—	—	—	—	2	—	—	2
4	11	—	—	—	—	3	2	—	5
5	8	—	—	—	—	2	—	—	2
6	1	—	—	—	—	—	—	—	0
合計	60	0	0	1	4	9	2	2	18

こりやすく、ワクチン株がVDPVに変異し、その感染によりポリオを発症する可能性がある。したがって、集団生活に入る前の乳幼児に対しポリオの予防接種を徹底することが極めて重要である。

ポリオウイルス以外にコクサッキーウイルスではCA10が4株、CB1が9株検出された。CA10は県内の感染症発生動向調査においても8月に8株分離されていることから、CA10の広範な浸淫があった可能性が高いと考えられる。一方、CB1は今回の感染源調査で最も多く分離されたにもかかわらず、県内の感染症発生動向調査においては全く分離されていなかった。一般にエンテロウイルスは不顕性感染が多く、感染者の多くは医療機関を受診しないと考えられる。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、感染源調査は基本的に健康者を対象としていることが一因として考えられる。全国的にはCB1はコクサッキーウイルスB群では最も報告数が多かったこと<sup>8)</sup>を勘案すると、本県にもCB1の広範な浸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AD1及びAD5が2株ずつ検出された。AD1は県内の感染症発生動向調査でも8月に2株検出されていることから、AD1の広範な浸淫があった可能性が高いと考えられる。一方、AD5は岡山県内の感染症発生動向調査においては全く分離されていなかった。しかし、全国的には通年で検出され、アデノウイルスの中では4番目に報告数が多かったこと<sup>8)</sup>を勘案すると、本県にも年度を通じたAD5の広範な浸淫があった可能性が高いと考えられる。

感染源調査は健常児を対象としており、患者を対象とする感染症発生動向調査では掴みきれないウイルスの浸淫状況を推察できる点で意義深く、今後も継続的な調査が必要である。

また、平成24年秋には不活化ポリオワクチンの導入が予定されているため、生ポリオワクチンの接種控えによる接種率の低下が問題となっている。実際に全国の生ポリオワクチンの予防接種率は平成22年度（春：99.4%、秋：90.8%）に比べ平成23年度（春：83.5%、秋：75.6%）は大きく低下しており<sup>9)</sup>、平成24年春の接種率はさらに低下すると予想される。接種率の低下によって集団免疫の維持が困難になると、未接種者が野生株又はVDPVに感染することが危惧される。このため、平成24年度のポリオウイルス感染源調査において検出動向の把握が例年以上に重要となる。

## 文 献

- 1) 清水博之, 吉田弘, 宮村達男: 野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関するWHO世界的行動計画第2版, ウイルス, 55, 1, 161-178, 2005
- 2) Kew OMV, Morris-Glasgow M, Landaverde C, Burns J, Shaw Z, et al. : Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccinederived poliovirus, Science, 296 (5566), 356-9, 2002
- 3) Estivariz CF, Watkins MA, Handoko D, Rusipah R, Deshpande J, et al. : A large vaccine-derived poliovirus outbreak on Madura Island-Indonesia, 2005, J Infect Dis, 197, 3, 347-54, 2008
- 4) Liang X, Zhang Y, Xu W, Wen N, Zuo S, et al. : An outbreak of poliomyelitis caused by type 1 vaccine-derived poliovirus in China, J Infect Dis, 194, 5, 545-51, 2006
- 5) Aylward B and Yamada T : The polio endgame, N Engl J Med, 364, 2273-2275, 2011
- 6) 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課・国立予防衛生研究所流行予測事業委員会: 伝染病流行予測検査術式, 1995
- 7) 国立感染症研究所他: 病原体検出マニュアル
- 8) 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.33, No.3, 81, 2012
- 9) 厚生労働省健康局結核感染症課: ポリオ(急性灰白髄炎)の予防接種の状況調査結果, ポリオワクチンに関する広報及び急性弛緩性麻痺患者の正確な診断に係る周知について, 平成24年3月15日, 事務連絡, 2012



【資 料】

## 胃腸炎ウイルスの疫学的研究

—電子顕微鏡を用いた胃腸炎ウイルスの検出(2010/11シーズン)—

Studies on Epidemiology of Viral Gastroenteritis in Okayama Prefecture

— Detection of Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis by Electron Microscopy in the 2010/11 season —

藤井理津志, 葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 溝口嘉範,

植原幸二\*, 濃野 信\*\*, 金谷誠久\*\*\* (ウイルス科)

\*岡山赤十字病院小児科, \*\*のうの小児科,

\*\*\* (独) 国立病院機構 岡山医療センター小児科

Ritsushi Fujii, Mitsutaka Kuzuya, Masako Hamano, Kouji Kida, Yoshinori Mizoguchi,  
Kouji Narahara\*, Shin Nouno\*\* and Tomohisa Kanadani\*\*\* (Department of Virology)

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

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

### 要 旨

本県における感染性胃腸炎の流行状況と電子顕微鏡(EM)法による胃腸炎ウイルスの検出状況の関連性を検討するため、県内で2010年9月～2011年8月に採取した散発患者糞便(合計524件)についてEM法によるウイルス検索を行ったところ、ロタウイルス(RV)様粒子128件(24.4%), アデノウイルス様粒子4件(0.8%), 小型球形ウイルス(SRSV)様粒子24件(4.6%)が観察された。感染性胃腸炎の流行状況と胃腸炎ウイルスの検出状況を対比させたところ、RV様粒子とSRSV様粒子の検出状況は感染性胃腸炎の流行状況を反映していた。

[キーワード: 小型球形ウイルス, ロタウイルス, アデノウイルス, 感染性胃腸炎, 電子顕微鏡法]

[Key words: Small Round Structured Virus, Rotavirus, Adenovirus, Infectious Gastroenteritis, Electron Microscopy]

### 1 はじめに

A群ロタウイルス, C群ロタウイルス, 及びノロウイルス(以下「NoV」という。), サポウイルス(以下「SV」という。), 及びアストロウイルス(以下「AstV」という。)等の小型球形ウイルス(以下「SRSV」という。)は感染性胃腸炎の主要原因ウイルスであり, 毎年多くの患者が発生している<sup>1)~9)</sup>。これらのウイルスの流行状況を解明することは, 予防対策上必要であり欠かせないものである。

また, 感染性胃腸炎は感染症発生動向調査事業に基づき, 5類感染症として患者定点での患者数が把握されているが, 原因となる病原体の検査は限定的である。

そこで, 感染性胃腸炎起因ウイルスを検査し, 感染性胃腸炎患者数との関連性を把握することを目的に, 協力医療機関を受診した散発性感染性胃腸炎患者から網羅的に採取した糞便から, 電子顕微鏡法(以下「EM法」という。)による胃腸炎ウイルスの検索を行っている。

平成23年度は2010年9月～2011年8月(以下「2010/11シーズン」という。)に散発した感染性胃腸炎患者の糞便について, ロタウイルス(以下「RV」という。), アデノ

ウイルス(以下「ADV」という。)及びSRSVを検出するためEM法によるウイルス検索を行った。また, 感染性胃腸炎の流行状況と対比させることによって, ウイルスの検出状況と感染性胃腸炎患者数との関連性を調査した。

### 2 材料と方法

#### 2.1 感染性胃腸炎患者発生状況

岡山県感染症発生動向調査事業に基づき, 2010/11シーズンの定点医療機関当たりの感染性胃腸炎患者数(1週間に1カ所の定点医療機関を受診した感染性胃腸炎患者数の平均値)を週別に集計した。

#### 2.2 EM法によるウイルス検索

2010/11シーズンに岡山地区(岡山赤十字病院, 独立行政法人国立病院機構 岡山医療センター)及び玉野地区(のうの小児科)の感染性胃腸炎患者各々73名, 440名及び11名の合計524名から糞便を採取した。

RV, ADV及びSRSVのEM法による検索は既報と同様にネガティブ染色法で行った<sup>10)</sup>。

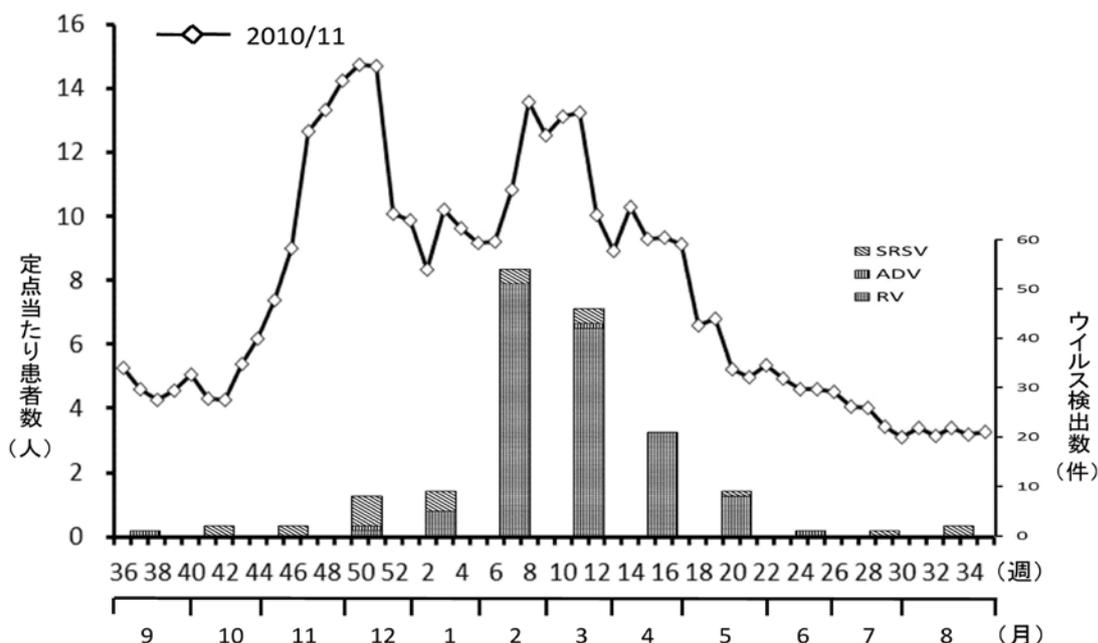


図1 感染性胃腸炎の週別定点当たり患者数と月別ウイルス検出状況  
折れ線：定点当たり患者数，コラム：ウイルス検出数

### 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基づく、2010/11シーズンにおける本県の感染性胃腸炎の週別定点当たり患者数は図1に示すとおりであった。

2010/11シーズンでは、第47週（11月）に急増し、第50週（12月）にはピークの14.74人に達した。第51週（12月）以後は減少したものの、第7週（2月）には再び上昇に転じ、第8週（2月）には二番目のピークとして13.56人に達し、その後は漸減傾向となった（図1）。

#### 3.2 ウイルス検出状況

表1に示すとおり、合計524件の散発患者糞便からRVが128件（24.4%）、ADVが4件（0.8%）、SRSVが24件

（4.6%）の計156件（29.8%）のウイルス様粒子がEM法により観察された。また、各機関からの検体採取状況及びウイルス検出状況は表1に示すとおりであった。

ウイルスの検出は、RVが2011年1月～5月に多く、ADVはシーズンを通して、SRSVは2010年12月～2011年3月に多く検出された。

### 4 考察

冬期を中心とするウイルス性胃腸炎患者の発生ピークは12月をピークとするSRSVと2、3月をピークとするRVにより、二峰性の発生曲線を持つ傾向が指摘されており<sup>1)</sup>、2010/11シーズンは12月と2月をピークとする標準的な二峰性の発生パターンを示した。（図1）。

ウイルス検出状況と患者発生状況の関係は、SRSVが12

表1 採取年月別・採取機関別ウイルス検出状況（電子顕微鏡法）

採取年月	検出数					岡山赤十字病院				国立病院機構岡山医療センター				のうの小児科						
	検体数	検出数				検出数				検出数				検出数						
		RV	ADV	SRSV	陰性	RV	ADV	SRSV	陰性	RV	ADV	SRSV	陰性	RV	ADV	SRSV	陰性			
2010.9	12	0	1(8.3)	0	11(91.7)	1	0	0	0	1	11	0	1	0	10	-	-	-	-	
10	15	0	0	2(12.5)	13(86.7)	-	-	-	-	-	15	0	0	2	13	-	-	-	-	
11	19	0	0	2(10.5)	17(89.5)	1	0	0	0	1	18	0	0	2	16	-	-	-	-	
12	47	1(2.1)	1(2.1)	6(12.8)	39(83.0)	11	0	0	2	9	35	1	1	4	29	1	0	0	1	
2011.1	38	5(13.2)	0	4(10.5)	29(76.3)	5	1	0	1	3	33	4	0	3	26	-	-	-	-	
2	89	5(5.7)	0	3(3.4)	35(39.3)	10	6	0	0	4	76	44	0	3	29	3	1	0	0	2
3	106	42(39.6)	1(0.9)	3(2.8)	60(56.6)	11	3	0	1	7	92	37	0	2	53	3	2	1	0	0
4	68	21(30.9)	0	0	47(69.1)	4	1	0	0	3	62	20	0	0	42	2	0	0	0	2
5	49	8(16.3)	0	1(2.0)	40(81.6)	6	0	0	0	6	41	8	0	1	32	2	0	0	0	2
6	34	0	1(2.9)	0	33(97.1)	8	0	1	0	7	26	0	0	0	26	-	-	-	-	-
7	20	0	0	1(5.0)	19(95.0)	9	0	0	1	8	11	0	0	0	11	-	-	-	-	-
8	27	0	0	2(7.4)	25(92.6)	7	0	0	0	7	20	0	0	2	18	-	-	-	-	-
合計	524	128(24.4)	4(0.8)	24(4.6)	368(70.2)	73	11	1	5	56	440	114	2	19	305	11	3	1	0	7

( )：検出率 (%)

～3月に、RVは1～5月に多く検出されていたことから、12月、2月をピークとする二峰性の患者発生状況と一致していた(図1)が、SRSVの検出数は、2005/06～2009/10の5シーズンのうち2009/10シーズンと同様に少なかった<sup>12)</sup>。

2010/11シーズンにSRSVの検出数が少なかったことは、岡山県内のNoVが原因と推定される集団食中毒発生件数・患者数が、2007～2011年で最も少なかったことと一致していると考えられる<sup>13)</sup>。

11月から2月頃までの感染性胃腸炎の流行シーズンでは、SRSVの検出状況は患者数の増減を反映している可能性が高いため、この時期にSRSVの検査を行うことで感染性胃腸炎の流行を予測できる可能性が示唆されている<sup>12)</sup>が、さらに、NoVが原因と推定される集団食中毒発生件数の傾向を推定できる可能性があるため、今後もEM法により胃腸炎ウイルスの流行状況を把握する必要があると考えられる。

さらに、EM観察でSRSV様粒子が観察された検体については、今後、NoV、SV、AstVの同定を行い、同定不能な検体については、同定法を検討するための検査材料として収集していく必要がある。

## 文 献

- 1) Matsumoto, K., Hatano, M., Kobayashi, K., Hasegawa, A., Yamazaki, S., Nakata S., Chiba, S., Kimura, Y. : An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren, *J. Infect. Dis.*, 160, 611-615, 1989
- 2) Oishi, I., Yamazaki, K., Minekawa, Y. : An occurrence of diarrheal cases associated with group C rotavirus in adults, *Microbiol. Immunol.*, 37, 505-509, 1993
- 3) Otsu, R. : A mass outbreak of gastroenteritis associated with group C rotaviral infection in schoolchildren, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 21, 75-80, 1998
- 4) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇, 中山俣槻, 結縁栄次, 片山健一, 光信泰昇, 井上康二郎: 岡山県内で初めて確認されたヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 岡山県環境保健センター年報, 24, 55-59, 2000
- 5) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉 肇: 教育研修施設において発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, 病原微生物検出情報, 21, 169-170, 2000
- 6) 国立感染症研究所 感染症情報センター: ノロウイルスの流行 2006/07シーズン, 病原微生物検出情報, 28, 277-278, 2007
- 7) 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 西島倫子, 榎原幸二, 濃野 信, 金谷誠久: 胃腸炎ウイルスの研究 (2007年度), 岡山県環境保健センター年報, 32, 115-127, 2008
- 8) 吉田徹也, 粕尾しず子, 畔上由佳, 内山友里恵, 薩摩林一代, 白石 崇: アストロウイルス血清型8型の検出-長野県: 病原微生物検出情報, 30, 14-15, 2009
- 9) 小林慎一, 藤原範子, 水谷恵美, 安達啓一, 伊藤雅, 安井善宏, 山下照夫, 平松礼司, 下岸 協, 皆川洋子, 大島誠司, 林 克巳, 野田耕平, 丹羽哲久, 子安春樹: 給食弁当を原因としたサポウイルスによる大規模食中毒事例-愛知県, 病原微生物検出情報, 31, 322-323, 2010
- 10) 藤井理津志, 葛谷光隆, 濱野雅子, 小倉 肇: C群ロタウイルスの免疫学的検査法による検出, 岡山県環境保健センター年報, 24, 42-45, 2000
- 11) 上羽 修, 藤井理津志, 谷本浩一: ウイルス下痢症に関する研究 第2報 1988/87年冬期の検出ウイルスについて, 岡山県環境保健センター年報, 11, 132-135, 1987
- 12) 藤井理津志, 葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 榎原幸二, 濃野 信, 金谷誠久: 胃腸炎ウイルスの疫学的研究 -電子顕微鏡を用いた胃腸炎ウイルスの検出 (2005/06～2009/10シーズン) -, 岡山県環境保健センター年報, 35, 79-84, 2011
- 13) 岡山県保健福祉部生活衛生課: 最近の食中毒発生状況 (平成19年～23年, 岡山県) 岡山県ホームページ, <http://www.pref.okayama.jp/page/detail-88301.html>



【資 料】

厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価（第2報）

Validity Evaluation of Simultaneous Method of Residual Veterinary Drugs by Guideline of The Ministry of Health, Labor and Welfare (II)

浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 山本 淳 (衛生化学科)  
 Toyohiro Urayama, Kanae Koeduka, Masaaki Akaki, Jun Yamamoto  
 (Department of Food and Drug Chemical Research)

要 旨

既報においてサルファ剤を主とする動物用医薬品21種についてLC/MS/MSを用いた一斉分析法を検討し、その妥当性について厚生労働省ガイドラインに基づき評価を実施した。今回、既報と同じ分析法を用い、対象物質追加の検討を行ったので、その概要を報告する。

[キーワード：動物用医薬品, 妥当性評価, LC/MS/MS法]

[Key words : Veterinary Drugs, Validity Evaluation, LC/MS/MS]

1 はじめに

動物用医薬品は、家禽等を病気や寄生虫から守るために用いられているが、その食品への残留基準については、食品衛生法で設定されているが、個別の基準が設定されていないものについては、平成18年5月29日付けのポジティブリスト施行以降0.01ppmの一律基準を超えて残留してはならないとされている。

このような経緯や食への安全・安心に対する県民の意識高まりを踏まえ、残留動物用医薬品の検査を平成22年度から実施している。

動物用医薬品の分析法としては、厚生労働省からLC/MS/MSを用いる一斉分析法<sup>1)</sup>が示されているが、同分析法は水系溶媒であるメタリン酸を多く用いて抽出を行った後、これを濃縮する作業があるなど煩雑で時間がかかる難

点があった。そのため、既報<sup>2)</sup>において、文献を参考に有機溶媒と二種類の固相カラムを用いることにより簡単かつ確実にクリーンアップを行える一斉分析法を開発した。

今回、22物質を追加候補として既報と同じ分析法により分析し、厚生労働省通知のガイドライン<sup>3)</sup>（以下「妥当性ガイドライン」という。）に基づき妥当性評価を実施した。

2 実験方法

2.1 検討対象物質

和光純薬製動物用医薬品混合標準液PL-1-3に含まれている21物質及び22年度に国が実施した輸入食品監視指導結果で違反のあった項目の1つであるラサロシドの計22項目について検討を行った。（表1）

表1 検討対象物質

既報の対象物質	エトパベート、オルメトプリム、酢酸メレンゲステロール、スルファキノキサリン、スルファクロルピリダジン、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファジメトキシム、スルファチアゾール、スルファドキシム、スルファニトラン、スルファピリジン、スルファメトキサゾール、スルファメトキシピリダジン、スルファメラジン、スルファモノメトキシム、ゼラノール、チアベンダゾール、チアンフェニコール、トリメトプリム、レバミゾール	
追加検討物質	殺虫剤	アレスリン、エマメクチンB1a、テメホス、トリクロルホン、ファミフル、フェノブカルブ
	抗生物質	チアムリン、チルミコシン、モネンシン、ラサロシド、リンコマイシン
	合成抗菌剤	スルファセタミド、ダノフロキサシン、ピリメタミン、フロルフェニコール
	ステロイド系消炎剤	デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン
	寄生虫駆除剤	2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール、クロルスロン
	鎮静剤	キシラジン
	成長促進剤	クレンプテロール

## 2.2 試料

妥当性ガイドラインによる妥当性評価には、肉類、魚類、その他の魚介類の代表として、市販の鶏肉（もも）、さけ及びイカを用いた。

また、添加回収試験は、今回の妥当性評価未実施の豚肉、えび、かに、たこ、アカニシ貝及びカラフトシシャモに対して行った。

## 2.3 試薬

- 1) 動物用医薬品混合標準液PL-2-1（各20 μg/mlメタノール溶液）：和光純薬工業社製
- 2) 動物用医薬品混合標準液PL-1-3（各20 μg/mlメタノール溶液）：和光純薬工業社製
- 3) ラサロシッドA ナトリウム塩（100 ppm）：Dr.Ehrenstorfer社製
- 4) 超純水：ELGA社製超純水製造装置PURELAB flexで精製
- 5) 酢酸、アセトニトリル：LC/MS用

## 2.4 装置及び測定条件

### 1) LC

HPLC：島津製 LC-20A 高圧グラジエントシステム  
 カラム：Waters社製 XTerra MS C18 3.5 μm (2.1mm I.D.x15cm)  
 カラム温度：40℃

移動相：A液（0.1%酢酸水溶液）とB液（0.1%酢酸アセトニトリル）

グラジエント条件：A/B=99/1（0min）→20/80（35min）→2/98（40-45min）→99/1（50-60min）

移動相流量：0.2mL/min

試料注入量：5 μL

保持時間：表2に示した

### 2) MS/MS

MS：Applied Biosystems製 API3200 QTrap

インターフェース：Turbo V source

測定法：MS/MSモード

条件1（ポジティブイオン化）—

イオン化モード：ESI positive mode

イオン源温度：600℃

イオン化電圧：5500V

測定イオン（precursor ion/product ion）：表2に示した

条件2（ネガティブイオン化）—

イオン化モード：ESI negative mode

イオン源温度：500℃

イオン化電圧：-4500V

測定イオン（precursor ion/product ion）：表2に示した

表2 保持時間及び測定イオン(追加検討物質)

化合物名	イオン化モード	保持時間 (min)	測定イオン		dwell time (ms)
			定量 (amu)	定性 (amu)	
2-アセチルアミノ-5-クロロアゾール	Neg	14.3	185.9/138.9	185.9/95.9	20
アレスリン	Pos	34.6	303.3/135.2	303.3/91.0	30
キシラジン	Pos	11.0	221.1/90.1	221.1/164.1	20
クレンブテロール	Pos	11.3	277.2/203.2	277.2/132.1	50
クロルスロン	Neg	16.3	379.8/343.9	379.8/342.0	100
スルファセタミド	Pos	7.48	215.1/156.2	215.1/92.0	30
チアムリン	Pos	17.9	494.3/192.1	494.3/119.2	20
チルミコシン	Pos	14.6	435.5/88.1	435.5/174.1	50
デキサメタゾン	Pos	19.9	393.4/147.0	393.4/91.1	50
テメホス	Pos	35.2	467.1/125.0	467.1/418.9	30
トリクロルホン	Pos	12.4	257.0/109.1	257.0/127.1	50
ヒドロコルチゾン	Pos	17.9	363.4/121.2	363.4/91.2	50
ピリメタミン	Pos	13.4	249.1/177.2	249.1/198.2	20
ファミフル	Pos	25.0	326.2/93.1	326.2/217.2	20
フェノバルブ	Pos	24.7	208.2/95.1	208.2/152.1	20
プレドニゾン	Pos	17.8	361.3/343.2	361.3/147.4	30
	Neg	17.8	359.2/329.3	359.2/295.2	100
フロルフェニコール	Neg	14.4	356.0/185.0	356.0/336.0	20
ラサロシッド	Neg	40.8	589.5/235.1	589.5/121.0	30
リンコマイシン	Pos	8.50	407.4/126.3	407.4/82.0	20

(precursor ion/product ion)

表3 イオン化温度とピーク面積

	350℃	400℃	500℃	600℃
アレスリン	107	119	100	87.7
キシラジン	82.0	84.4	100	111
クレンブテロール	77.9	87.0	100	124
スルファセタミド	99.1	98.0	100	103
チアムリン	77.0	85.0	100	107
チルミコシン	105	98.2	100	109
デキサメタゾン	88.1	99.1	100	97.5
テメホス	33.5	44.9	100	142
トリクロルホン	100	101	100	114
ヒドロコルチゾン	79.1	88.0	100	110
ピリメタミン	89.3	93.9	100	121
ファミフル	97.2	101	100	106
フェノブカルブ	118	108	100	99.4
プレドニゾン	96.4	100	100	113
リンコマイシン	83.5	89.9	100	112
平均	88.9	93.2	100	110

(500℃でのピーク面積を100とした値)

## 2.5 前処理操作

大月らの操作<sup>2)</sup>に基づき試験溶液を調製したが、濃縮過程において泡立ちにより試料をロスすることが懸念されたので、最終液量を2mlに変更した。

## 2.6 検量線

検量線は、2.3の1)～3)を等濃度になるよう混合した後、10%アセトニトリル水溶液を用いて順次希釈し、0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 $\mu$ g/mLの混合標準液を調製し、ピーク面積法により検量線を作成した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 条件の最適化の結果

検討項目のうち、エマメクチンB1a, ダノフロキサシン及びモネンシンの3物質は、質量分析計の最適化をすることができなかつたため、測定対象から外すこととした。

### 3.2 測定回数とtimeの調整

今回の検討でポジティブイオン化で測定するものは36物質であり、dwell timeを全て20msとすればポジティブイオン化での測定を1回とすることも可能と考えられたが、感度の悪い物質ではdwell timeを長くする必要があり、ポジティブ2回、ネガティブ1回の計3回の測定とした。dwell timeは感度に応じて20ms～50ms(ネガティブイオン化では物質数が少ないため20～100ms)で設定した。(表2参照)

### 3.3 新規追加物質のイオン化温度の検討

ESIのイオン化温度を350℃, 400℃, 500℃, 600℃と変更し比較したところ(表3), イオン化温度が高いほどピーク面積が大きくなる物質が多かつたため、既報と同じ600℃とした。

### 3.4 妥当性評価試験

添加量は試料1gに対し定量限界(一律基準濃度)である0.01 $\mu$ g添加の低濃度と、高濃度として0.1 $\mu$ g添加の2種類で実施した。

妥当性評価試験の結果は表4のとおりで、その概要は次のとおりであった。

- 1) 2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール, スルファセタミド, チアムリン, ヒドロコルチゾン, ピリメタミン, ファムフル, フェノブカルブ及びフロルフェニコールの8物質は、真度(回収率), 平行精度, 室内精度のいずれも妥当性ガイドラインの目標値を満たしていた。
- 2) リンコマイシンは、鶏肉及びさけへの低濃度添加試料(0.01 $\mu$ g添加)で真度(回収率)が目標よりやや低めのそれぞれ68.7%, 67.4%であったが、平行精度及び室内精度は妥当性ガイドラインの目標値を満たしており、できるだけ多くの項目を一斉分析できるよう、モニタリング対象項目に加えることとした。
- 3) アレスリンは、鶏肉の低濃度添加試料(0.01 $\mu$ g添加)において夾雑物質のピークが重なって定量不能となり、選択性の目標を満たさなかつた。
- 4) クロルスロン及びラサロシドは、不規則に回収率が変動する傾向にあり、目標値を満たさなかつた。
- 5) クレンブテロール, デキサメタゾン及びプレドニゾロンは、基準値が低いか不検出であり、0.01ppmでは下限値として十分でない項目である。
- 6) キシラジン及びトリクロルホンは、多くの検体で回収率が10%未満となり、検討した方法では十分に回収できないものと判断された。(表4には未掲載)
- 7) チルミコシン及びテメホスは、検量線が直線にならず定量性に問題があつた。(表4には未掲載)

### 3.5 添加回収試験

添加回収試験(n=1)の結果を表5に示した。豚肉, えび, アカニシ貝及びカラフトシシャモは、試料1gに対し0.1 $\mu$ g添加と0.01 $\mu$ g添加の2濃度で実施, かに及びたこは0.1 $\mu$ g添加のみを行った。

ピリメタミンは、3.4では妥当性ガイドラインの目標値を

表4 妥当性評価試験結果

	添加量	鶏肉(もも)			さけ			イカ			
		回収率 (真度) (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	回収率 (真度) (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	回収率 (真度) (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	
目標値	0.1 μg	70~120	15 >	20 >	70~120	15 >	20 >	70~120	15 >	20 >	
	0.01 μg	70~120	25 >	30 >	70~120	25 >	30 >	70~120	25 >	30 >	
2-アセチルアミノ-5-ニコチンアザール	0.1 μg	89.6	7.5	5.4	88.8	3.5	3.9	80.9	4.7	12.6	
	0.01 μg	87.2	9.2	15.1	90.2	15.0	5.1	76.9	7.4	7.6	
アレスリン	0.1 μg	85.8	6.7	19.1	99.9	4.4	3.6	84.0	5.9	5.1	
	0.01 μg	—	—	—	81.8	13.3	46.0	91.0	6.7	17.2	
クレンブテロール	0.1 μg	81.3	8.5	19.2	91.9	3.5	4.5	86.9	3.9	9.1	
	0.01 μg	63.4	11.5	27.6	71.9	8.3	7.7	76.9	9.4	7.0	
クロルスロン	0.1 μg	74.5	10.4	39.0	91.3	2.2	3.6	83.1	4.1	8.3	
	0.01 μg	77.5	29.0	46.1	104.1	15.8	10.7	87.0	8.1	15.1	
スルファセタミド	0.1 μg	101.6	7.0	14.8	107.4	3.1	1.0	92.0	6.2	5.9	
	0.01 μg	81.9	13.8	24.5	97.9	7.0	11.7	75.1	16.1	14.1	
チアムリン	0.1 μg	90.4	7.2	18.2	97.8	6.2	8.9	91.2	9.2	16.3	
	0.01 μg	82.0	9.6	28.7	98.2	10.9	15.7	92.4	9.8	21.8	
デキサメタゾン	0.1 μg	98.1	8.5	19.4	108.5	7.8	6.4	100.0	9.8	8.8	
	0.01 μg	99.7	28.3	28.4	110.8	10.2	18.4	90.3	6.0	17.0	
ヒドロコルチゾン	0.1 μg	94.1	7.7	17.6	107.4	3.6	5.1	93.2	5.2	9.0	
	0.01 μg	102.1	13.2	22.6	107.5	10.4	17.8	79.9	10.3	18.0	
ピリメタミン	0.1 μg	88.0	7.7	17.0	96.5	3.8	2.7	91.7	4.8	11.3	
	0.01 μg	73.0	4.8	27.9	70.8	8.3	6.8	75.4	5.0	21.7	
ファムフル	0.1 μg	93.1	5.4	16.0	106.7	3.3	6.4	94.6	6.5	3.1	
	0.01 μg	93.5	8.4	19.5	111.3	14.0	24.3	83.3	8.3	5.5	
フェノプロカルブ	0.1 μg	89.4	3.4	20.0	103.5	2.2	4.0	92.9	4.5	8.9	
	0.01 μg	93.0	7.3	11.8	85.6	14.5	11.9	90.6	9.2	10.9	
プレドニゾン	Pos	0.1 μg	99.2	4.9	17.0	109.2	3.8	1.9	97.0	8.7	9.6
		0.01 μg	83.9	14.9	28.7	94.8	9.6	16.0	84.2	12.2	10.3
	Neg	0.1 μg	87.7	7.6	7.2	92.8	7.4	5.5	85.3	4.0	10.0
		0.01 μg	88.8	15.2	14.7	96.6	17.8	5.9	88.9	7.8	11.6
フロルフェニコール	0.1 μg	105.9	6.5	7.5	103.7	5.2	11.3	98.2	8.9	14.9	
	0.01 μg	112.6	14.6	7.5	113.0	9.9	14.8	83.2	14.3	12.0	
ラサロシド	0.1 μg	82.1	19.8	46.7	57.9	6.4	35.2	68.6	6.0	7.2	
	0.01 μg	77.5	3.8	62.7	47.0	11.0	41.3	68.7	5.8	14.7	
リンコマイシン	0.1 μg	80.4	10.0	14.5	85.3	7.1	15.0	88.4	3.6	11.0	
	0.01 μg	68.7	4.2	16.1	67.4	6.1	23.8	80.1	7.2	8.8	

網掛け部は、ガイドラインの目標値を満足していない。ヒドロコルチゾンの下線部は、添加元の検体の含有量(さけ: 0.002 μg/g)を減じた値。

満たしていたが、豚肉への0.01  $\mu$ g添加試料で回収率38%となったため、今回は対象項目への追加を見送った。

### 3.6 既報の対象物質の確認

既報において豚肉、えび及びさけを用いて妥当性評価済である21物質について、最終液量を1mlから2mlに変更したため選択性と真度の確認が必要になったことから、今回の追加対象項目と併せて鶏肉（もも）、さけ、イカを用いて妥当性評価を実施した。

結果を表6に示す。レバミゾール、オルメトプリム、スルファジアジン及びトリメトプリムについては、妥当性ガイドラインの目標値を満たさなかった。なお、レバミゾールでは、同位体標準物質（サロゲート）を用いた場合でも満たす必要のある回収率40%も満たさない検体が複数あり、表7に示すとおり回収率が低い検体は添加から測定までの日数が長いほど多い傾向にあったので、分解性によるものと考えられた。

既報においては、妥当性ガイドラインの目標値を満たさなかった項目もサロゲートの使用により妥当な分析法と判断されているが、今回はサロゲートを使用しなくても目標値を満たす項目に限定することとし、23年度の報告項目から4項目を外した。

## 4 まとめ

既報のLC/MS/MSを用いた動物用医薬品21種の一斉分

析法を用い、同じ分析法で分析可能な動物用医薬品の追加を検討した。厚生労働省ガイドラインに基づき妥当性評価を実施し分析法の妥当性を確認したところ、8項目が追加可能と判断されたが、既報の項目のうち4項目を対象から外したため、25項目の一斉分析法となった。

今後も、一斉分析できる動物用医薬品の検査項目を増加させるため、クリーンアップ法等の前処理法を見直したり、新たな物質の同時分析を検討する予定である。

## 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) 大月史彦、肥塚加奈江、前田大輔、山本 淳：厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価、岡山県環境保健センター年報、35、109-113、2011
- 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について、食安発第1115001号、平成19年11月15日、2007

表5 添加回収試験結果（回収率%）（n=1）

添加量(試料1gに対し)	0.1 $\mu$ g						0.01 $\mu$ g				
	えび	かに	たこ	豚肉	アカニシ貝	カラフトシヤモ	えび	豚肉	アカニシ貝	カラフトシヤモ	
2-アセチルアミノ-5-ニトロアゾール	89	89	83	89	90	69	102	105	98	117	
アレスリン	63	78	74	79	64	95	59	64	63	108	
クレンプテロール	54	89	76	66	86	79	77	53	92	79	
クロルスロン	83	83	82	90	91	86	71	84	103	56	
スルファセタミド	105	92	86	69	64	88	84	110	82	60	
チアムリン	63	93	77	67	81	110	75	58	85	135	
デキサメタゾン	77	93	95	87	85	108	100	132	152	151	
ヒドロコルチゾン	102	90	79	74	96	82	134	97	96	53	
ピリメタミン	58	85	69	64	79	92	68	38	80	70	
ファムフル	94	92	86	85	87	88	83	71	120	117	
フェノプカルブ	83	91	83	83	84	88	110	93	107	79	
プレドニゾン	Pos	82	92	85	81	98	94	100	62	110	81
	Neg	95	106	95	90	88	88	125	77	96	66
フロルフェニコール	92	102	96	92	94	120	121	83	92	93	
ラサロシド	80	67	70	74	41	47	53	75	4	34	
リンコマイシン	70	93	71	59	94	72	79	58	94	59	

※ヒドロコルチゾンの下線部は、添加元の検体の含有量（豚肉：0.012  $\mu$ g/g、カラフトシヤモ：0.031  $\mu$ g/g）を減じた値。

表6 既報の物質の妥当性評価試験結果

	添加量	鶏肉(もも)			さけ			イカ			
		回収率 (真度) (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	回収率 (真度) (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	回収率 (真度) (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	
目標値	0.1 μg	70~120	15 >	20 >	70~120	15 >	20 >	70~120	15 >	20 >	
	0.01 μg	70~120	25 >	30 >	70~120	25 >	30 >	70~120	25 >	30 >	
エトパベート	0.1 μg	95.3	3.7	2.6	98.5	1.8	1.3	90.6	5.1	6.9	
	0.01 μg	99.2	2.8	12.6	96.1	4.7	7.5	99.3	6.9	11.2	
オルメプリム	0.1 μg	81.9	7.1	16.5	81.8	4.3	8.7	91.7	5.7	6.9	
	0.01 μg	58.3	14.0	11.0	69.8	12.2	9.7	96.5	10.1	11.1	
酢酸トレン ボロン(*)	α-トレン ボロン	0.1 μg	86.9	3.8	15.1	92.2	3.4	9.4	87.6	3.4	8.6
		0.01 μg	91.0	29.6	22.2	98.3	10.0	29.5	93.5	24.8	20.8
	β-トレン ボロン	0.1 μg	85.6	9.1	9.5	88.1	2.0	7.9	91.7	6.6	4.7
		0.01 μg	77.8	19.6	11.2	81.9	17.0	16.8	75.8	22.9	50.8
酢酸メレンゲステロール	0.1 μg	83.1	4.6	7.1	88.1	4.9	3.6	83.0	4.4	5.3	
	0.01 μg	77.1	14.7	18.3	86.4	6.0	8.0	89.1	3.2	9.4	
スルファキノキサリン	0.1 μg	90.3	3.4	7.3	90.9	2.0	6.2	84.3	2.5	3.3	
	0.01 μg	98.4	7.0	21.5	104.9	4.3	20.8	90.3	12.8	10.5	
スルファクロルピリダジン	0.1 μg	89.5	4.9	7.2	94.4	4.8	1.9	86.8	4.3	7.7	
	0.01 μg	90.6	10.1	4.3	90.3	4.1	4.4	94.2	4.1	8.2	
スルファジアジン	0.1 μg	80.6	7.0	4.1	85.2	3.0	4.7	80.0	4.7	9.3	
	0.01 μg	65.5	9.9	6.7	84.1	3.5	10.7	79.3	14.8	13.6	
スルファジミジン	0.1 μg	86.6	3.6	7.2	93.8	2.0	3.7	89.9	5.7	6.5	
	0.01 μg	79.0	9.5	8.2	97.7	5.7	6.5	102.9	3.4	5.2	
スルファジメトキシ	0.1 μg	97.7	5.3	5.2	100.4	3.4	3.8	94.2	2.5	4.7	
	0.01 μg	94.8	5.8	12.3	100.4	4.3	8.0	96.5	8.2	4.9	
スルファチアゾール	0.1 μg	85.5	5.5	6.7	91.4	4.3	5.3	90.0	4.9	2.5	
	0.01 μg	76.9	7.3	12.8	91.9	6.2	8.3	96.5	4.2	9.8	
スルファドキシ	0.1 μg	90.1	3.7	7.4	93.2	1.9	2.9	91.1	3.4	4.4	
	0.01 μg	86.5	8.1	12.1	99.3	3.7	6.5	98.1	3.8	5.2	
スルファニトラン	0.1 μg	95.9	5.9	9.2	90.9	4.6	4.2	95.3	2.9	6.3	
	0.01 μg	109.3	21.7	19.6	90.6	10.2	14.5	97.9	18.2	8.5	
スルファピリジン	0.1 μg	84.0	2.6	6.3	88.8	5.4	2.3	92.4	4.4	3.9	
	0.01 μg	79.4	10.0	6.9	98.1	6.7	11.9	94.1	5.2	6.7	
スルファメキサゾール	0.1 μg	90.9	3.8	7.9	92.1	2.1	4.0	91.3	7.5	7.6	
	0.01 μg	87.2	6.6	3.7	88.1	5.0	7.1	82.4	5.8	14.5	
スルファメキシピリダジン	0.1 μg	89.7	1.9	6.7	93.1	1.3	5.0	88.5	6.8	2.3	
	0.01 μg	89.0	5.8	10.8	95.2	9.5	7.8	101.9	6.4	8.2	
スルファメラジン	0.1 μg	93.2	4.3	3.4	92.8	5.2	5.2	91.6	2.0	6.1	
	0.01 μg	81.0	11.9	5.7	108.0	10.4	7.4	104.5	6.0	8.3	
スルファモノメトキシ	0.1 μg	89.8	5.7	12.1	89.4	3.3	2.6	90.4	3.5	3.2	
	0.01 μg	95.6	5.9	12.1	92.8	5.3	8.1	91.5	7.3	9.2	
チアベンダゾール	0.1 μg	82.5	5.8	6.7	84.6	1.6	2.9	87.7	4.0	5.3	
	0.01 μg	78.7	8.9	16.5	80.6	4.2	6.8	89.5	4.8	7.2	
トリメトプリム	0.1 μg	82.4	4.7	15.5	91.0	7.3	2.8	86.4	5.3	4.8	
	0.01 μg	64.6	7.7	16.9	80.8	8.8	11.8	82.8	3.6	12.6	
レバミゾール	0.1 μg	52.6	27.5	50.3	54.5	19.7	25.3	84.8	3.7	4.3	
	0.01 μg	35.6	21.6	65.3	47.2	30.3	48.3	85.1	4.4	9.5	

網掛け部は、ガイドラインの目標値を満足していない。

酢酸トレンボロンは基準値が“不検出”であり、0.01ppmでは下限値として十分でないため、分析可能項目としていない。

表7 レバミゾールの回収率と標準品添加から測定までの日数の比較

	添加量	鶏肉(もも)、回収率(真度)(%)									
		①-1	①-2	②-1	②-2	③-1	③-2	④-1	④-2	⑤-1	⑤-2
レバミゾール	0.1 μg	17.7	28.3	23.3	27.7	63.9	90.8	37.4	88.4	79.2	69.7
	0.01 μg	10.6	50.9	13.4	15.4	40.2	39.3	16.7	22.7	75.8	70.6
標準品添加から測定までの日数		28日	28日	28日	28日	14日	14日	14日	14日	5日	5日

網掛け部は、サロゲートを用いた場合でも満たす必要のある40%も満たさない検体

【資 料】

## 健康食品からの医薬品成分検出事例について

The Pharmaceutical Products Ingredient Detection Example from a Health Food

浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 山本 淳 (衛生化学科),

鎌倉浩之\*, 合田幸広\* (国立医薬品食品衛生研究所)

Toyohiro Urayama, Kanae Koeduka, Masaaki Akaki, Jun Yamamoto,

Hiroyuki Kamakura\*, Yukihiro Goda\*

(Department of Food and Drug Chemical Research) \*National Institute of Health Sciences

### 要 旨

近年, 「無承認無許可医薬品」に該当する医薬品成分が含まれたいわゆる「健康食品」中の医薬品成分の分析について検討を行った。抽出液を希釈して測定し, 類似物質の標準品との保持時間の比較, 文献の標準品スペクトルとの比較などにより, 対象物質の含有を確定した。

[キーワード: 健康食品, 医薬品成分, アミノタダラフィル, ヒドロキシホモシルデナフィル, LC/MS/MS]

Key words: Health Food, Pharmaceutical Products Ingredient, Aminotadalafil, Hydroxyhomosildenafil, LC/MS/MS

### 1 はじめに

近年, 「無承認無許可医薬品」に該当する医薬品成分が含まれたいわゆる「健康食品」が全国で発見されている。当該成分は国内や海外で承認されている医薬品と同一又は構造が類似しているため, 健康被害が発生するおそれが否定できない。県内でも健康食品から勃起不全治療薬 (ED治療薬) の主成分であるシルデナフィルの類似成分が検出されたので, その概要について報告する。

### 2 実験方法

#### 2.1 試料

試料は, 岡山市が住民からの通報を受け, 同市南区の薬店で販売されていた商品 (商品名 レックス) を買い取ったものを使用した。

#### 2.2 試薬等

タダラフィル標準品, シルデナフィル標準品: 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課薬事監視第一係から平成21年に供与

アミノタダラフィル標準品, ヒドロキシホモシルデナフィル標準品: 国立医薬品食品衛生研究所から供与

超純水: ELGA社製超純水製造装置PURELAB flexで精製

ギ酸アンモニウム: 和光純薬製特級

アセトニトリル: LC/MS用

#### 2.3 試料の前処理

##### 1) 抽出原液の調製

厚生労働省事務連絡<sup>1)</sup>に基づき, 次のとおり抽出原液を調製した。

カプセル内容物200mgに1%ギ酸溶液/CH<sub>3</sub>CN (1/4) 2ml加え, 超音波下5分間抽出した後, 遠心分離を1500rpmにて3分間行った。この上澄液1mlに5mMギ酸アンモニウム緩衝液 (PH3.5) /CH<sub>3</sub>CN (3/1) 1ml加え膜ろ過 (MILLEX-LCR, 0.45 μm filter unit, MILLIPORE製) を行った。

##### 2) 抽出液の希釈

1) で調製した測定用抽出原液を1%ギ酸溶液/CH<sub>3</sub>CN (1/4) : 5mMギ酸アンモニウム緩衝液 (PH3.5) /CH<sub>3</sub>CN (3/1) = 1:1を用いて希釈し, 1,000倍希釈液及び10,000倍希釈液を調製した。

#### 2.4 装置及び測定条件

##### 1) LC

HPLC: 島津製 LC-20A 高圧グラジエントシステム

カラム: Waters 社製 XTerra MS C18 3.5 μm (2.1mm I.D.×15cm)

カラム温度: 40°C

移動相: A液: 5mMギ酸アンモニウム緩衝液 (PH3.5), B液: アセトニトリル

グラジエント条件: A/B=80/20 (0min)

→5/95 (25-45min) →80/20 (47-60min)

移動相流量：0.2mL/min

試料注入量：5 $\mu$ L

## 2) MS

MS：Applied Biosystems製 API3200 QTrap

インターフェース：Turbo V source

測定法：scan

イオン化モード：ESI positive mode

イオン源温度：600 $^{\circ}$ C

イオン化電圧：5500V

## 3 結果及び考察

### 3.1 希釈抽出液の測定結果

2.3 2) で調製した1000倍希釈抽出液をscan測定したマスキロマトグラムを図1に示す。2本のシャープなピークが現れ、岡山市への通報において健康食品に含まれているとされたアミノタダラフィル及びヒドロキシホモシルデナフィル（以下「分析対象物質」という。）のプロトン付加分子と同じm/zを持つ物質を大量に含有していることがわかった。

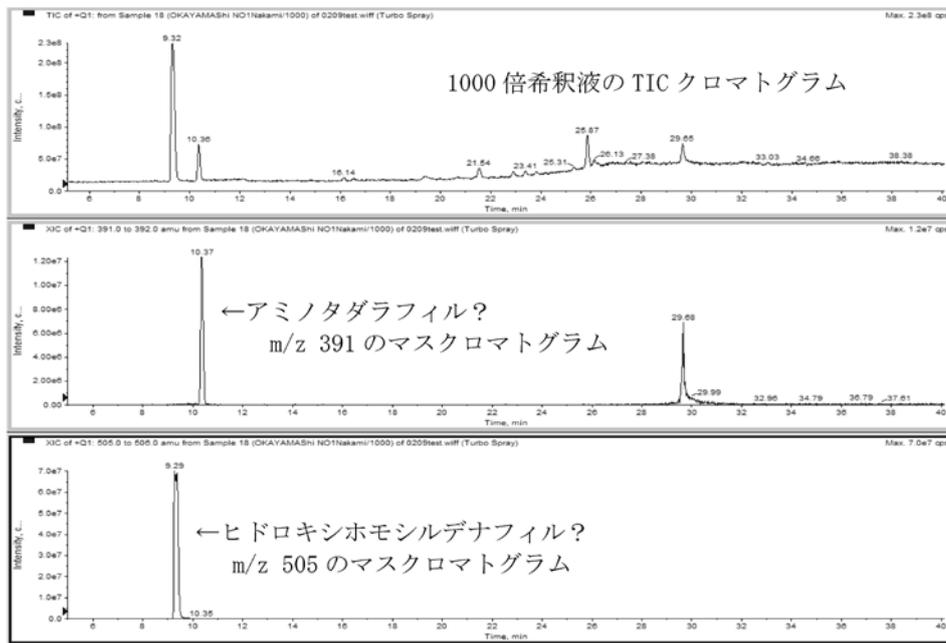


図1 1000倍希釈液のマスキロマトグラム

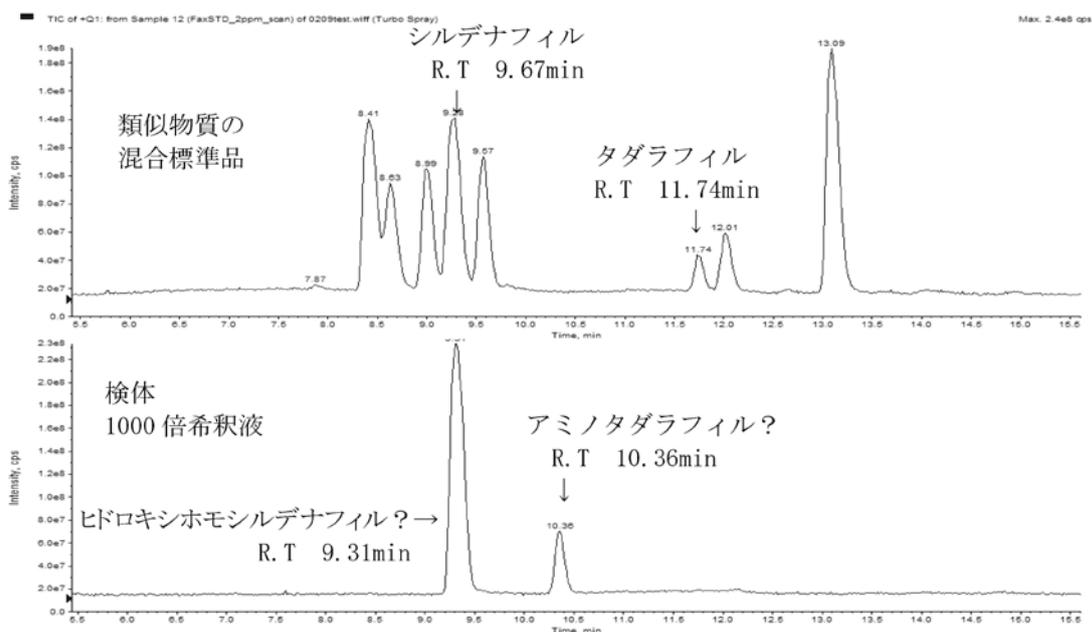


図2 類似物質との保持時間の比較

### 3.2 類似物質との保持時間の比較

分析依頼を受けた時点では対象物質の標準品を所持していなかったため、類似物質の標準品と保持時間を比較した。(図2)

抽出液の1000倍希釈液から検出された2本のピークは、いずれも類似物質の保持時間より少し早い時間となっており、厚労省からの通知資料<sup>2)・3)</sup>と一致していた。

### 3.3 イオンスペクトルの厚生労働省通知との比較

厚生労働省通知<sup>2)・3)</sup>のマススペクトル(図3, 4)と検体のマススペクトル(図5)を比較したところ、ヒドロキシホモシルデナフィルと思われるピークのマススペクトルは通知と類似していたが、アミノタダラフィルと考えられるピークのマススペクトルは検体ではm/z 269が強いのに対し、通知ではm/z 262及び268が強い点が異なっていた。

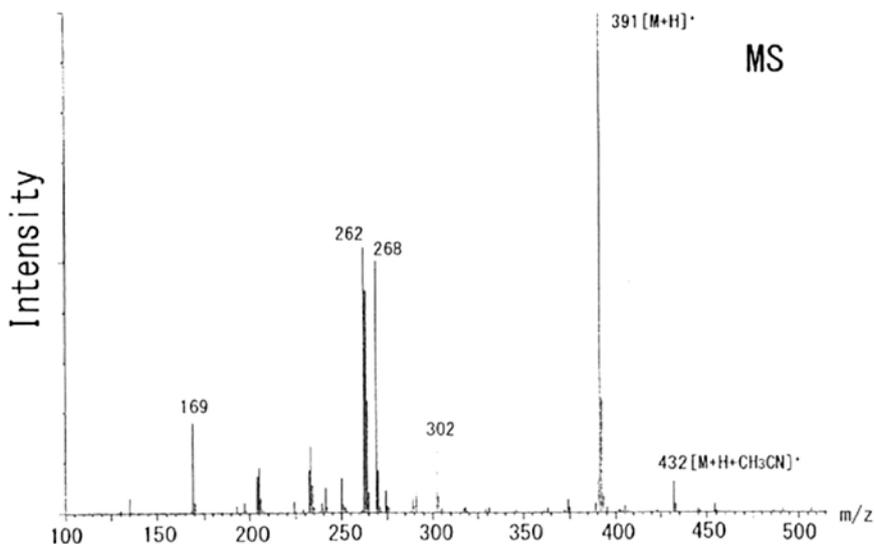


図3 アミノタダラフィルの厚生労働省通知のマススペクトル

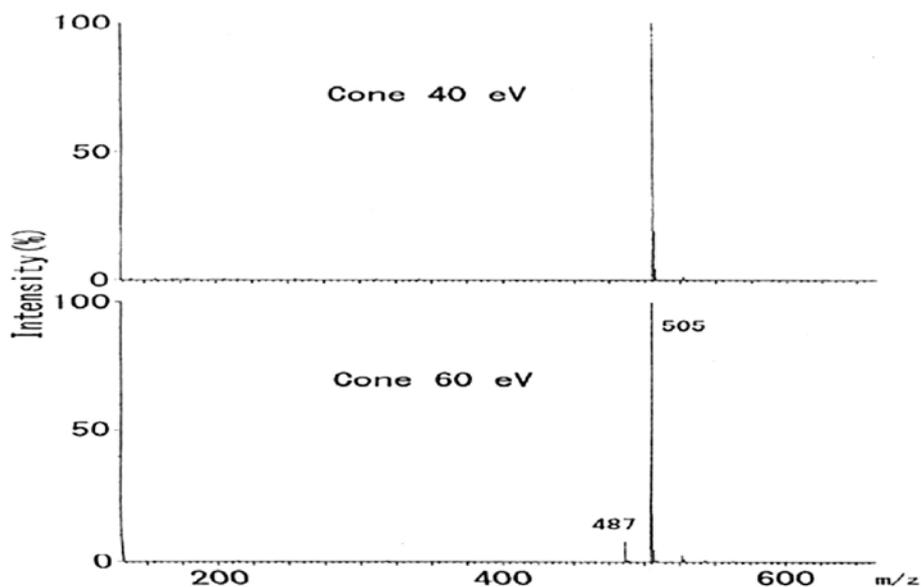


図4 ヒドロキシホモシルデナフィルの厚生労働省通知のマススペクトル

しかし、フラグメントイオンは測定機器の機種により異なる場合があるので、アミノタダラフィルである可能性も否定できなかった。

以上のデータを国立医薬品食品衛生研究所に提供し、ヒドロキシホモシルデナフィル及びアミノタダラフィルの標準品の供与を依頼した。

### 3.4 標準品との比較（保持時間及びマススペクトル）

国立医薬品食品衛生研究所から供与された両物質の標

準品と検体の保持時間及びマススペクトルを比較したところ、いずれも一致した。（図6、7）

### 3.5 標準品との比較（プロダクトイオンスペクトル）

保持時間とマススペクトルが一致したことから、同一物質であると判断可能であったが、念のためプロダクトイオンスペクトルを測定（図8、9）し比較したところ、こちらも一致したため同一物質であると判断した。

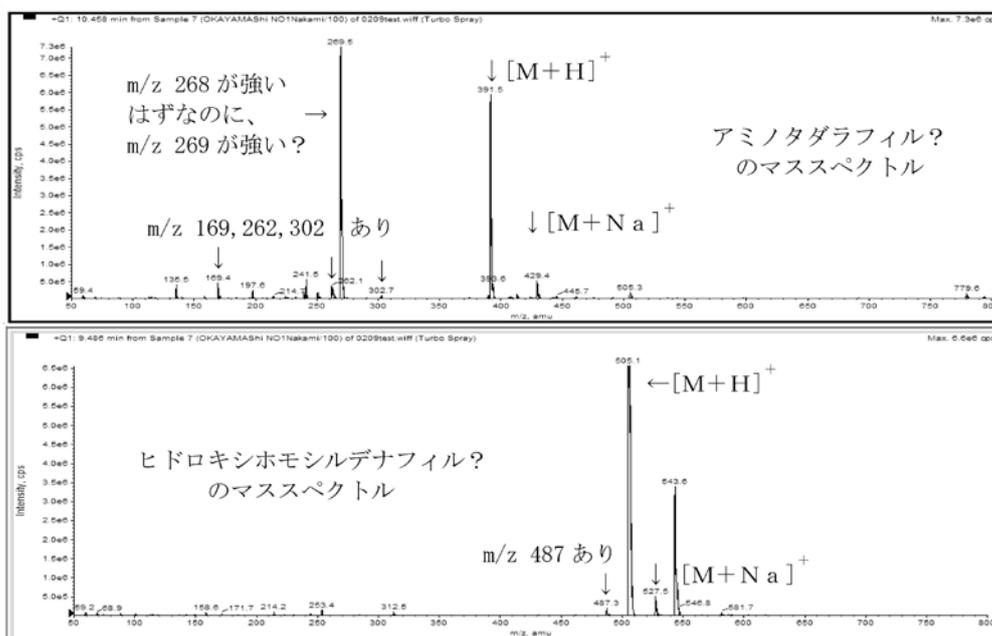


図5 検体のマススペクトル

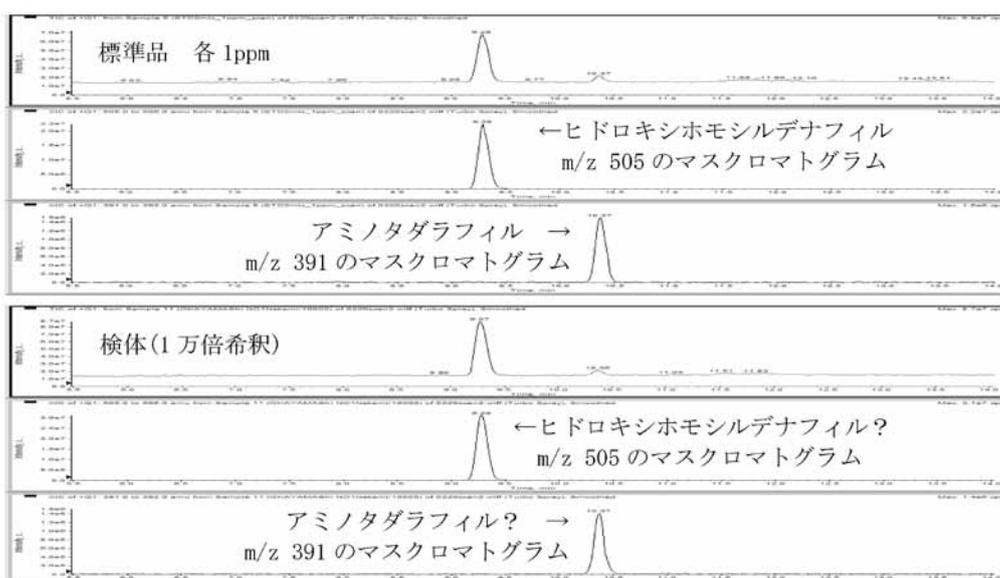


図6 標準品と検体のマスクロマトグラムの比較

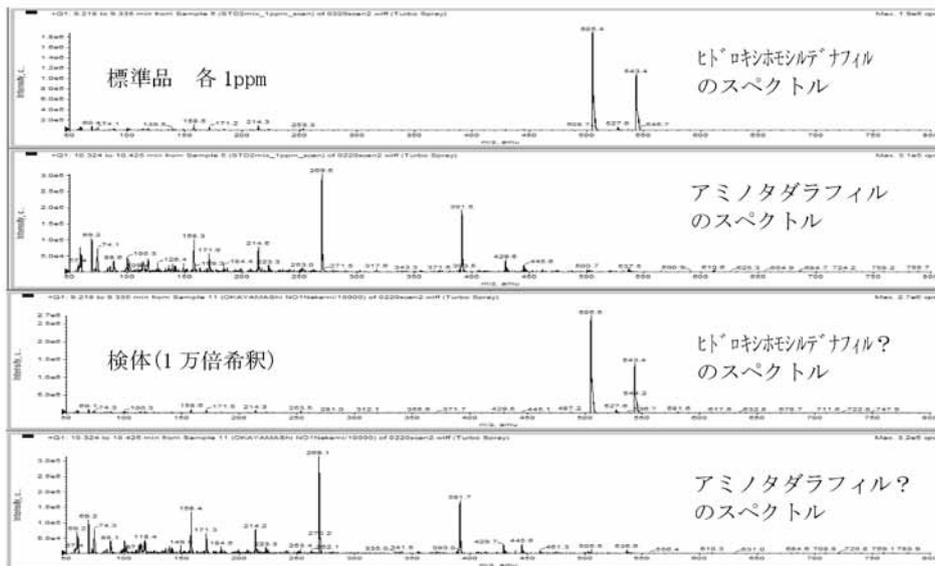


図7 標準品と検体のマスペクトルの比較

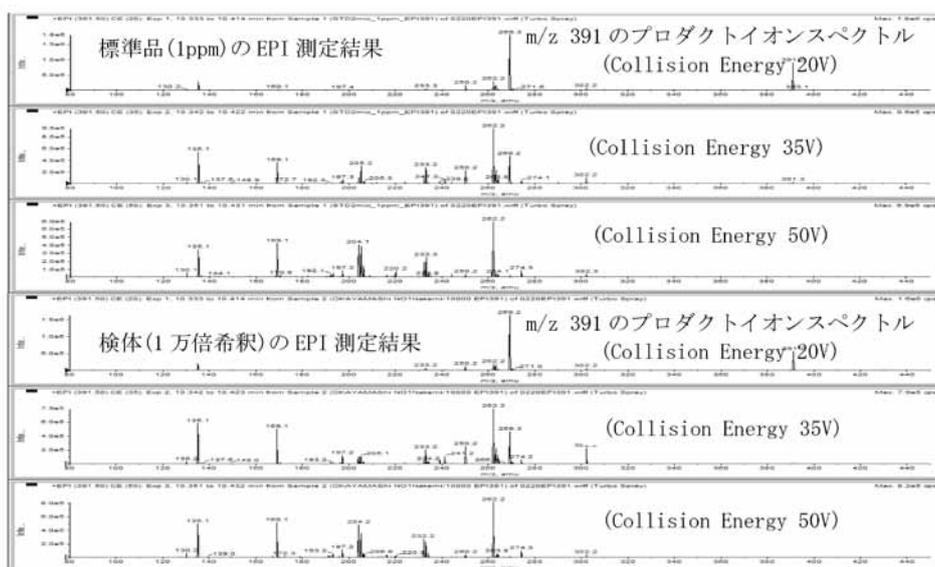


図8 標準品と検体のプロダクトイオンスペクトルの比較 (m/z 391)



図9 標準品と検体のプロダクトイオンスペクトルの比較 (m/z 505)

### 3.6 検量線

検量線を図10,11に示す。

アミノタダラフィルは0.5~10 $\mu$ g/mL, ヒドロキシホモシルデナフィルは0.1~2 $\mu$ g/mLの範囲で直線性を示した。

### 3.7 未知試料測定時の留意点

2.3 1) で調製した抽出原液を希釈せずにscan測定したマスクロマトグラムを図12に示す。

図上段のTICでは雑多な成分が混合されている状態に見え、特定の成分が多く入っている様子は読み取れない。ま

た、分析対象物質のプロトン付加分子と同じm/z 391, m/z 505のマスクロマトグラム(同図中段・下段)を確認しても、形状の悪いブロードなピークが確認されるだけで、特定の成分のピークを表していることは読み取れない。

このように、含有濃度が高すぎることで逆に含有を見落とす可能性があるため、注意が必要である。見落としを防止するためには、図の左側に示されたスケールが同じ値であることを注目することや、飽和した時のピーク形状の特徴を把握しておくことが有効であると考えられる。

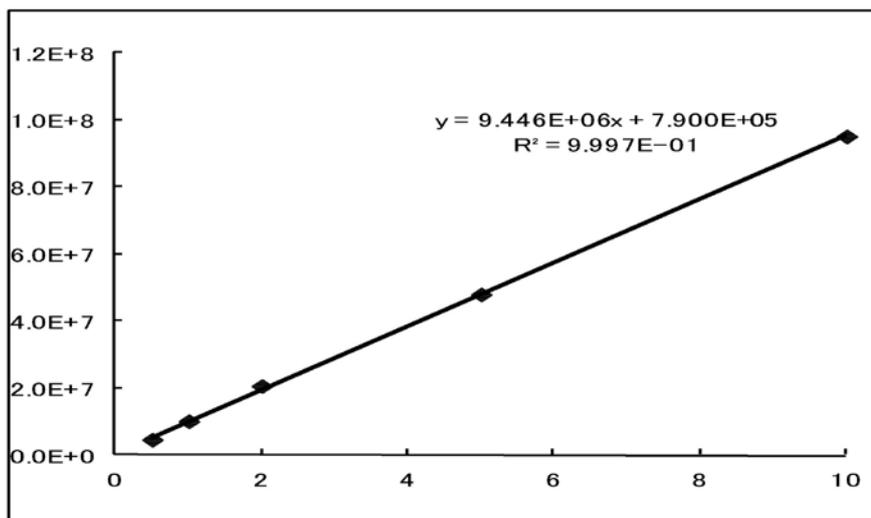


図10 アミノタダラフィルの検量線 (0.5~10 $\mu$ g/mL)

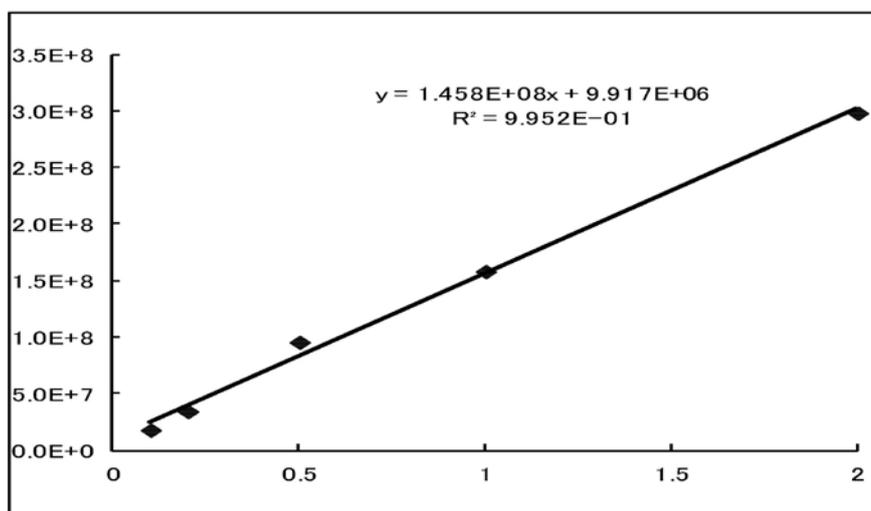


図11 ヒドロキシホモシルデナフィルの検量線 (0.1~2 $\mu$ g/mL)

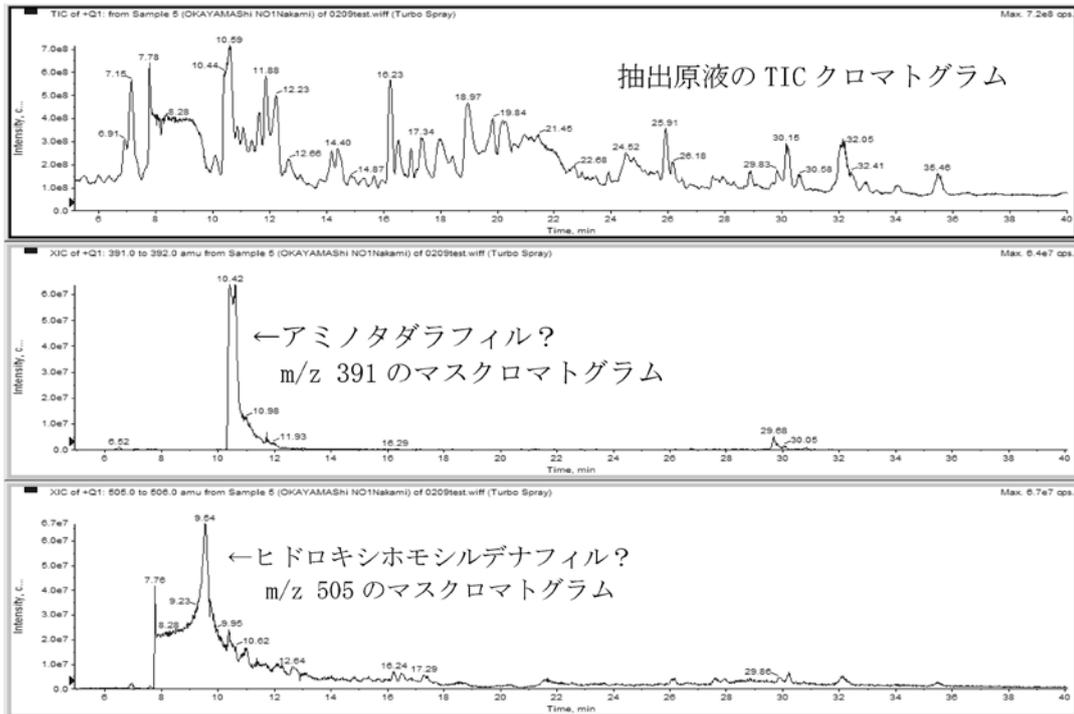


図12 抽出原液のマスクロマトグラム

#### 4 まとめ

- 1) 抽出液を1000倍に希釈して測定することで、マスクロマトグラム上に良好なピークとマススペクトルが得られた。
- 2) 対象物質の標準品を所持していない状態で、類似物質の標準品との保持時間の比較、厚生労働省通知のスペクトルとの比較から対象物質の含有を推定することが可能であった。
- 3) 標準品を入手後、推定どおりであったことが確認された。

ヒドロキシホモシルデナフィルの分析方法について、平成16年3月8日付け薬食監麻第0308001号

#### 謝 辞

分析方法等に対して助言を下さいました国立医薬品食品衛生研究所 生薬部第3室長 花尻瑠璃様に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課薬事監視第一係通知，平成20年度無承認無許可医薬品買上げ調査の分析結果について（追加），平成21年6月22日付け事務連絡
- 2) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知，アミノタダラフィルの分析方法について，平成17年8月25日付け薬食監麻第0825001号
- 3) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知，



## 他誌発表論文抄録

### リケッチア感染症の現状と課題

岸本壽男, 木田浩司

感染症, Vol.41 157-168 2011

#### 抄録

日本におけるリケッチア感染症の現状と課題について以下の項目に従い紹介した。1) リケッチアについて(分類の変化とリケッチア症の多様性), 2) つつが虫病(疫学と病態, 臨床像: カラー頁図3), 3) 日本紅斑熱(疫学と病態, 臨床像: カラー頁図4・5), 4) その他のリケッチア症の確認(紅斑熱性リケッチア症, ヒトアナプラズマ症, 発疹チフス), 5) 輸入リケッチア症例の増加(バリ島帰国者の発疹熱, モザンビーク帰国者のAfrican

tick bite fever), 6) 治療の現状と課題(つつが虫病: テトラサイクリン系抗菌薬・クロラムフェニコール, 日本紅斑熱: テトラサイクリン系抗菌薬とニューキノロン系抗菌薬, 発生時期の汚染地域への立ち入り禁止など地域ごとの発生状況の情報提供と感染症情報センターのホームページ利用), 7) 診断についての現状と課題(つつが虫病: 間接蛍光抗体法または間接免疫ペルオキシダーゼ法による血清抗体価, 日本紅斑熱: 血清検査・遺伝子検査)。

# Molecular analyses of a potentially novel *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* detected in sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan

Adrian P. Ybanez, Kotaro Matsumoto, Toshio Kishimoto, Hisashi Inokuma

Veterinary Microbiology, Vol.157, 232-236, 2012

An *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* detected in sika deer in Hokkaido, Japan was molecularly analyzed using 16S rRNA, citrate synthase (*gltA*), and heat-shock operon (*groEL*) gene sequences. Genome walking was performed to determine its complete *gltA* and *groEL* sequences (1233 bp and 1650 bp, respectively). Percent identities to the closest *A. phagocytophilum* sequences from the US and European strains were 98.6-98.8%, 76.5%, and 80.3-80.8% for 16S rRNA, *gltA*, and *groEL* genes, respectively. For deduced

amino acid sequences, percent identities to the closest *A. phagocytophilum* sequences were 66.7% and 97.6% for *gltA* and *groEL* genes, respectively. Phylogenetic analyses revealed divergence from any known *A. phagocytophilum* strain. The lower identities and the divergent phylogenetic position of the *Anaplasma* sp. detected from sika deer in Japan with established *A. phagocytophilum* strains provide evidence of its potential novelty.

## 感染症 現状の問題点と未来への展望 ボツリヌス症

小熊恵二, 山本由弥子, 鈴木智典, 中嶋 洋

臨床と微生物, vol.39 : 170-176, 2012

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は芽胞を形成する嫌気性の大桿菌であり, 強力な神経毒素を産生し, 食中毒や乳児ボツリヌス症を起こす。近年, 毒素の構造と機能

が解明されるとともに, 毒素を治療に応用することがなされてきた。我が国での中毒の現状・注意点などの他, 毒素の治療への応用について記した。

# 日本で分離されたOP354株類似P[8] (P[8]bサブタイプ) 型 ヒトA群ロタウイルスの分子学的解析

Molecular characterization of OP354-like P[8](P[8]b subtype) human rotaviruses A species isolated in Japan

Mitsutaka Kuzuya, Ritsushi Fujii, Masako Hamano, Kouji Kida, Tomohisa Kanadani, Keiko Nishimura, and Toshio Kishimoto

Journal of Medical Virology, vol.84:697-704, 2012

2006～2009年に実施した岡山県におけるA群ロタウイルス (GARV) サーベイランスにおいて、OP354株類似P[8] (P[8]b) 型GARVを日本で初めて分離した。GARV陽性患者糞便236検体のうち、逆転写PCR法により2検体がG1P[8]b型であることがわかった。P[8]b型株は2008年5月のみに検出され、また同株に感染した小児はともに同一市内に在住していたことなどから、県内における本ウイルスの流行は極めて限定的だったものと推察された。次に、P[8]b型株の4種類の遺伝子 (VP4, VP6, VP7, 及びNSP4

遺伝子) について分子学的解析を行ったところ、日本のP[8]b型株のVP4遺伝子は東南アジア及びインド由来P[8]b型株のVP4遺伝子と密接に関連していることがわかった。その一方で、日本のP[8]b型株のVP6, VP7, 及びNSP4遺伝子は、同時期に県内で流行していたG1P[8]a型株と高い相同性が認められた。これらのことから、今回分離されたP[8]b型株は日本のG1P[8]a型ウイルスとP[8]b型のVP4遺伝子を持つ未知のウイルスと間のリアソータント (遺伝子組み換え体) である可能性が考えられた。

## Outbreak of *Salmonella* Braenderup Infection Originating in Boxed Lunches in Japan in 2008

Yoshinori Mizoguchi, Etsuji Suzuki, Hiroaki Tsuchida, Toshihide Tsuda,  
Eiji Yamamoto, Katsumi Nakase, and Hiroyuki Doi

Acta Medica Okayama, Vol.65 (2) : 63-69, 2011

There have been only 2 reports of a large-scale foodborne outbreak arising from *Salmonella* enterica serotype Braenderup infection worldwide. On August 9, 2008, an outbreak originating in boxed lunches occurred in Okayama, Japan. We conducted a cohort study of 786 people who received boxed lunches from a particular catering company and collected 644 questionnaires (response rate : 82%). Cases were defined as those presenting with diarrhea ( $\geq 4$  times in 24h) or fever ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) between 12 am on August 8 and 12 am on August 14. We identified 176 cases (women/men : 39/137); younger children (aged  $< 10$  years) appeared

to more frequently suffer severe symptoms. Three food items were significantly associated with higher risk of illness; *tamagotoji* (soft egg with mixed vegetables and meat) (relative risk (RR):11.74, 95% confidence interval (CI):2.98-46.24), pork cooked in soy sauce (RR:3.17, 95% CI:1.24-8.10), and vinegared food (RR:4.13, 95% CI:1.60-10.63). Among them, only the RR of *tamagotoji* was higher when we employed a stricter case definition. *Salmonella* Braenderup was isolated from 5 of 9 sampled cases and 6 food handlers. It is likely that unpasteurized liquid eggs contaminated by *Salmonella* Braenderup and used in *tamagotoji* caused this outbreak.

## 単行本

### 食中毒の疫学講座

鹿嶋小緒里, 津田敏秀, 槌田浩明, 土橋酉紀, 中瀬克己, 溝口嘉範, 山本英二, (五十音順),

社団法人日本食品衛生協会 (編集), 2012.1 発刊

食中毒事件の調査において重要な疫学の解説書である。実際の疫学研修の演習や多数の事例を用いて調査手法を説明している。疫学概論, 必要な統計学, 疫学統計ソフト

Epi Infoの使い方, メディア対策, 平常時の調査監視等, 食中毒の探知から対策まで網羅している。

# 報 告 書 等

## フルオランテンの分析法

吉岡敏行

平成22年度化学物質分析法開発調査報告書（環境省環境安全課），148-174，2011

水質試料中のフルオランテンの分析法を開発した。水質試料1Lをヘキサン抽出し，シリカゲルカートリッジカラムでクリーンアップし，GC/MS-SIMで定量した。本法により

水質試料中のフルオランテンを0.18ng/Lで定量可能であった。

## オキサミル，フルフェノクスロン，フルアジナムの分析法

浦山豊弘，前田大輔，劔持堅志

平成22年度化学物質分析法開発調査報告書（環境省環境安全課），558-576，2011

水質試料中のオキサミル，フルフェノクスロン，フルアジナムの分析法を開発した。水質試料100mLをpH2に調整し，固相カートリッジカラムで抽出し，アセトニトリルで溶出した後，LC/MS/MS-SRMで定量した。本法により

水質試料中のオキサミル，フルフェノクスロン，フルアジナムをそれぞれ4.4ng/L，2.4ng/L，1.3ng/Lで定量可能であった。

# 「リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の総合的対策に関する研究」 総括研究報告書

岸本壽男

リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の総合的対策に関する研究  
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)  
平成23年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 1-13, 2012

## 抄録

本研究では、リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症に対して総合的対策を実施することを目指している。具体的には、疫学的研究、臨床的研究、検査・診断的研究、基礎的研究、予防・啓発的研究の5本柱をたてて、総合的に有機的に進めてきた。3年目は(1)疫学的研究としては、リケッチア症に関する疫学の実態解明を、患者、ベクター、病原体、動物の分野でさらに進めた。(2)臨床的研究としては、多医療施設での症例解析をもとにした臨床像や重症化の病態解析、将来の治療指針等の作成や有効薬剤の保険適応に向けた治療のエビデンス蓄積を行った。(3)検

査・診断的研究としては、リケッチア症の診断とレファレンス体制構築における課題の改善に努めた。(4)基礎的研究としては、発症や重症化、複数のダニ媒介性細菌の共感染等のメカニズム解析や、細胞レベルでの宿主の免疫応答。またゲノム情報の応用等をした治療薬のメカニズム解析と新たな治療法の開発を検討した。(5)予防・啓発的研究としては、疫学情報の医療関係者、行政、メディア、一般社会への適切な情報提供と、啓発による感染予防を目指し、HPを作成・公開した。

## Q熱コクシエラの生態系における感染リスク評価に関する研究

岸本壽男, 木田浩司, 葛谷光隆, 濱野雅子, 溝口嘉範, 中嶋 洋, 藤井理津志 他

ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成23年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 11-16, 2012

### 抄録

本邦におけるQ熱は4類感染症として重要であるが、不明な点が多く、感染経路や実態の解明はほとんどなされていない。特に、*Coxiella burnetii*の生態系での存在様式については全く不明であるため、家畜を含む動物並びに環境、ヒトでの実態について調査を行い、国内における本病原体の存在様式を明らかにすることを目的とした。すなわち①ヒト、ペット、家畜、野生動物、環境におけるQ熱コクシエラ感染の実態調査。②国内における本病原体の存在様式、感染源、感染経路の解明。③過去の疫学データとの比較検証と現在の感染リスクの評価。これまでにヒト、ペットとしてのイヌ、ネコ、家畜としてのウシを対象に疫学調査を実施している。本年度は、昨年を引き続き、

全国の食用ウシ125頭の全血から抽出したDNAを用いて realtime PCRで遺伝子検出を試みたが、全て陰性であった。追加調査として、平成20年度の調査で未実施であった、ネコ1762頭の全血から同様に遺伝子検出を試みたが、全て陰性であった。また、ベクターと考えられているマダニについて、岡山県全域で捕獲した622個体から遺伝子検出を試みたが、全て陰性であった。これまでの調査で、ヒト、ペットとしてのイヌ、ネコ、家畜としてのウシについては、感染リスクが低いことが明らかとなってきたが、本邦における野生動物への侵淫実体や、ベクターと考えられているマダニ種など、不明な点が多く存在しており、今後の課題である。

## 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究 (平成23年度)

中嶋 洋, 大島律子, 石井 学 他

食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成23年度厚生労働科学研究費補助金 総括・研究分担報告書及び

平成21～23年度厚生労働科学研究費補助金 総合研究報告書, 87-99, 2012

### 研究要旨

中四国ブロックでは、平成23年度にパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE法) およびIS-printing System による腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157菌株の精度管理を実施した。ほとんどの施設は、両法による解析結果がほぼ一致し良好であったが、一部施設では、PFGEおよびIS-printing Systemの泳動像が不明瞭であった。精度管理は、事例対応において正確で安定した結果を得るために、今後も継続して実施することが必要である。各県で発生した事

例に分子疫学手法を応用し、IS-printing Systemの解析結果およびPFGE型を含む疫学情報を中四国ブロックの各施設が共有して、中四国地域の発生状況を把握できるよう試みた。本年度は、メールにより情報を回収したのち、それらをまとめてブロック内の各施設に還元した。発生事例をタイムリーに把握するためには、将来的にデータベースによる疫学情報の管理と、それへの個別のアクセスを可能にすることが必要である。

# 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究（平成21～23年度）

中嶋 洋, 大島律子, 石井 学 他

食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究

（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

平成23年度厚生労働科学研究費補助金 総括・研究分担報告書及び

平成21～23年度厚生労働科学研究費補助金 総合研究報告書, 277-297, 2012

## 研究要旨

平成21年度は、前年度まで検討してきたIS-printing Systemによる検査法を用いて、中四国地域で分離された腸管出血性大腸菌O157株について迅速な疫学解析を行い、感染予防や感染拡大防止に役立てた。同時に、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法による型別結果やMultiple-locus variable-number tandem repeat analysis（MLVA）法を用いた疫学解析結果とも比較を行った。これらの結果から、IS-printing Systemにより、疫学情報と一致した迅速な疫学解析を行うことが出来た。また、マイクロチップ電気泳動装置を使用したIS-printing Systemの迅速化やMLVA法への応用を検討した結果、IS-printing Systemでの使用は今後さらに検討が必要であり、MLVA法においては現状では、同一施設内での解析に限定すれば使用可能であることが示された。平成22～23年度は、PFGE法およびIS-printing Systemによる腸管出血性大腸菌O157菌株の精度管理と、各県で発生した事例においてこ

れらの分子疫学手法を応用して解析し、その有用性を評価した。精度管理では、各施設とも両方法によりほぼ同様の結果を示し、おおよそ良好であった。IS-printing Systemは、簡単・迅速な疫学解析ツールとして有用性が確認され、特殊な機器も不要なことから、応用の場が広がるものと考えられる。精度管理は、事例対応において正確で安定した結果を得るために、今後も継続して実施することが必要である。各県で発生した事例に分子疫学手法を応用し、IS-printing Systemの解析結果およびPFGE型を含む疫学情報を中四国ブロックの各施設が共有して、中四国地域の発生状況を把握できるよう試みた。将来的にデータベースによる疫学情報の管理と、それへの個別のアクセスを可能にすることが必要である。一部の県で検討しているシーケンサーを用いたMLVA法については、特別な機器が必要であるため、今後機器等の整備ができた県を加えながら、順次検討していく予定である。

## 感染源不明クラスターに関連した環境，菌株調査について（平成23年度）

中嶋 洋

公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究  
（健康安全・危機管理対策総合研究事業）  
平成23年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書，165-170，2012

### 研究要旨

岡山県内のレジオネラ症散発患者から分離された *L.pneumophila* のうち，血清群 3 の株は 2008 年～2011 年までに 7 株あり，これらすべての株が sequence-based typing (SBT) 法による型別の結果，sequence type (ST) 93 に型別された。このことから，7 名の患者は同一の感染源，あるいは環境中に分布している同一 ST の株から感染した可能性が示唆された。そこで，その感染源を究明するため，平成 23 年度は浴槽水等 49 検体を調査して，レジオネラを分離した。また，保健所の調査で分離されたレジオネラ

菌株を収集した。これらの菌株と患者株を用いて分子疫学的解析を行った結果，パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を用いた分子疫学解析でも，患者由来の 7 株は同じ PFGE パターンを示した。一方，浴槽水等から分離された *L.pneumophila* 血清群 3 の 11 株は，患者の ST あるいは PFGE パターンと異なっていた。したがって，患者の感染源や感染経路は現状では不明であるが，過去に分離・収集した菌株や，今後多種類の検体についてさらに調査を行い，感染源を究明していく必要がある。

## 病原性大腸菌血清型と「他の下痢原性大腸菌」の検出報告状況， 2001 年～2011 年 8 月

伊藤健一郎，伊豫田 淳，八柳 潤，甲斐明美，  
磯部順子，勢戸和子，中嶋 洋，村上光一

病原微生物検出情報 IASR, Vol.33, 3-4, 2012

病原性大腸菌の分類について見直しを行っており，現在までの病原大腸菌血清型 (EPEC) および「他の下痢原性大腸菌」についてまとめた。2001 年 1 月 1 日～2011 年 8 月

31 日までの病原体検出情報システムへの報告に IASR 掲載の国内情報または速報を加えた。

## 倉敷市における腸管毒素原性大腸菌O153:H12による集団感染事例

山口紀子, 香川真二, 杉村一彦, 小川芳弘, 中嶋 洋

病原微生物検出情報IASR, Vol.33, 69-70, 2012

2011年9月, 倉敷市内で腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) による感染事例が3事例発生し, これらの事例のすべてからETEC O153:H12 (*STh* 遺伝子陽性) が検出された。3事例は同一菌による感染であることが示唆されたが, 疫学

調査の結果等からは当該菌が検出された食品が共通の感染源である可能性は低く, 感染源, 感染経路の究明には至らなかった。

## コリネバクテリウムに関する研究

山本明彦, 中嶋 洋 他

ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究  
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成23年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 34-43, 2012

今年度, 新たにジフテリア様症状を呈する1名の患者からジフテリア毒素産生性*Corynebacterium ulcerans* (*Culcerans*<sup>Tox+</sup>) が分離された。患者の環境調査において飼いネコ, イヌ及びヤギから*Corynebacterium*属菌が分離された。

10カ所の地方自治体の動物愛護センターに搬入されたイヌまたはネコの咽頭スワブ等について菌分離調査及び血清ジフテリア抗毒素抗体価測定を実施した結果, 4カ所の愛護センターのネコとイヌ10検体より*Culcerans*<sup>Tox+</sup>が分離さ

れ, また抗毒素は1カ所2検体が陽性を示した。

今年度までの調査結果では, 野外活動時間の多いイヌやネコは本菌を保菌または本菌に感染している可能性が高い。感染した動物からは動物への菌の伝播がおり, 感染が成立する。感染動物では排菌量が多いために, 免疫力が低下している人はイヌ, ネコからの感染リスクが高いことが考えられる。また, 畜産動物の検体については血清ジフテリア抗毒素価測定を実施した結果, 2検体で陽性を示した。

## 結膜炎患者からのヒトアデノウイルス56型の分離－岡山県

木田浩司, 濱野雅子, 葛谷光隆, 溝口嘉範, 藤井理津志 他

病原微生物検出情報IASR, Vol.32, No.10, 12-13, 2011

### 抄録

ヒトアデノウイルス56型 (HAdV-56) は, 2011年 Robinsonらによって新たに提唱された新型HAdVである。2011年2月および3月, 岡山市において流行性角結膜炎

と診断された患者2名 (30歳男性および50歳女性) から HAdV-56を分離したのでその概要を報告した。

## 山口県における日本紅斑熱初発事例の感染源調査

木田浩司, 岸本壽男, 中本 敦, 溝口嘉範, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志 他

リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の総合的対策に関する研究  
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成23年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 107-111, 2012

### 抄録

日本紅斑熱は、紅斑熱群リケッチア (spotted fever group rickettsia : SFGR) に属する *Rickettsia japonica* を保有するマダニによって媒介される熱性発疹性疾患である。2010年4月、山口県東部で、県内初めての日本紅斑熱患者が報告された。そこで、患者発生地域における *R. japonica* の感染源を特定することを目的として調査を行った。昨年度、我々は患者の臨床経過と疫学調査の実施について報告したが、今回はその調査の詳細に加え、2011年5月に追加調査した結果について報告する。本調査では、患者居住地含む半径7キロメートルの範囲で4地点を設定し、野ネズミ及びマダニを捕獲した。L929細胞を用い、野ネズミの全血からSFGRの分離を試みた。血清抗体価は、*R. japonica* を含む紅斑熱群リケッチア6種を抗原とした間接蛍光抗体法で測定した。マダニについては、種の同定と同時に、生

存個体の一部について同様に微生物分離を試みた。また、DNAを抽出し、リケッチアの種特異抗原である17kDa領域についてnested PCRによる遺伝子検索を実施した。陽性検体については遺伝子配列を決定し、系統解析を実施した。その結果、患者宅周辺で捕獲したアカネズミ2頭の微生物分離は全て陰性であった。*R. japonica* に対する血清抗体価は、それぞれ320倍及び1280倍と高かった。しかし、6種のリケッチアに対する抗体価の違いは無かった。捕獲したマダニ492匹のうち、検査に供した215匹における微生物分離は全て陰性であったが、PCRについては2地点で捕獲されたキチマダニ4匹が陽性であった。4匹から検出されたりケッチア遺伝子17kDa領域394塩基の相同性は100%であった。系統解析の結果、SFGRであると考えられたが、既知種ではなかった。

## ふき取り検体のノロウイルス検査法の改良

溝口嘉範, 木田浩司, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 安原広己, 上間 匡, 野田 衛

病原微生物検出情報IASR, Vol.32, 358-359, 2011

ノロウイルスによる食中毒の原因究明の一助としてふき取り検査が有用であるため、ふき取り検査法の検討を行った。その結果、カット綿で対象区画をふき取ってウイルスを回収し、その回収液にBeef extractを0.5%になるよう添加してポリエチレングリコール (PEG) によるウイルス濃

縮を行うことで、通常実施されている綿棒によるふき取り検査と比較して高感度なふき取り検査が実施できた。操作的にも簡便であり、またコストも安価であることから、現場でのふき取り検査に利用できると考えられる。

## 腸管出血性大腸菌感染症O157のアトリビューション算出の検討

八幡裕一郎, 春日文字, 岩渕香織, 戸来小太郎, 大島直子, 竹ヶ原陽一, 松下 愛,  
槌田浩明, 溝口嘉範, 小宮 智

食中毒調査の精度向上のための手法等に関する調査研究  
(食品の安全確保推進研究事業)

平成23年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 21-47, 2012

欧米では腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症対策に Attributable risk percent (アトリビューション) を算出し, 対策を行なっている。しかし, 我が国ではアトリビューションを用いたEHEC感染症対策は行われていないため, アトリビューション調査実施の試みと, 適応についての検討を行った。協力の得られた自治体から散发事例のEHEC O157患者の症例の調査とインターネットによる対照群調査を実施した。対照群は年齢および居住地をマッチングさせ, 男女それぞれ10人以上インターネット調査登録されている場合はランダムに10人ずつ抽出し, 10人に満たない場合は全員に調査を実施した。調査内容は環境との接触および食品の喫食とした。解析はConditional logistic regression analysisを実施した。有意な粗のオッズ比 (cOR) は (cOR=0.292, 95% CI: 0.101-0.840), 十分に加熱した豚肉 (cOR=0.310, 95% CI: 0.136-0.709), 十

分に加熱した鶏肉 (cOR=0.427, 95% CI: 0.201-0.909), 牛ホルモン (cOR=0.207, 95% CI: 0.070-0.611), 大根 (cOR=3.458, 95% CI: 1.023-11.686), もやし (cOR=0.347, 95% CI: 0.136-0.883), 漬物 (cOR=3.868, 95% CI: 1.422-10.521) の喫食が関連していた。アトリビューションの算出では肉類の喫食 (aOR [調整オッズ比] =11.354, 95% CI: 1.898-67.926) でアトリビューションが8.0%, もやしの喫食 (aOR=11.955, 95% CI: 2.277-62.778) でアトリビューションが1.2%であった。アトリビューションの算出結果, 肉の喫食やもやしの喫食がアトリビューションの高い食品であると考えられた。今後, 対策に利用が期待できると共に, 実施のために最低限の質問項目で最大限の情報収集が出来るよう検討が必要であると考えられる。

# 岡山県内の野ネズミにおけるリケッチア侵淫調査

中本 敦, 岸本壽男, 木田浩司, 溝口嘉範, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志 他

リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の総合的対策に関する研究  
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成23年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 93-106, 2012

## 抄録

岡山県における現在のリケッチアの侵淫状況を把握するとともに、日本紅斑熱の発生メカニズム及び伝播様式を明らかにするために、2010年10月～2011年12月に岡山県全域を対象とした小型哺乳類とマダニ類の生息状況調査、採集されたネズミ類の脾臓及びマダニ類からのPCRによるリケッチアの検出、ネズミ類の全血からのリケッチアの分離及びネズミ類の血清抗体価の測定を行った。遺伝子陽性検体については遺伝子配列の決定後、系統解析を実施した。食虫目2種、齧歯目6種、計135個体を捕獲した。優占種はアカネズミで(61.5%)、その生息密度は年2回の繁殖によって大きく変動していた。マダニ属3種、チマダニ属6種の計1783個体が採集された。マダニ類の生息密度には種ごとに異なった季節的な消長が見られた。マダニ類は山地で多く採集された。小型哺乳類とマダニ類から病原

性リケッチアは検出されなかった。5種の紅斑熱群リケッチアに対する抗体陽性率にはネズミ種による違いが見られた。抗体価の中央値はアカネズミで全ての株に対して1280～2560倍、ヒメネズミで*Rickettsia asiatica*に対して320倍と高い値を示した。アカネズミの成獣は亜成獣よりも高い抗体価を示した。アカネズミ個体群の抗体価は繁殖による新規個体の加入により減少した。今回の調査では病原性リケッチアは検出できなかったが、いくつかのネズミ種は紅斑熱群リケッチアに対する高い抗体価を示した。このことから、岡山県内では広範囲に紅斑熱群リケッチアが侵淫しているが、病原性リケッチアは低い密度で潜在していると思われる。また、アカネズミの生息密度は季節や年によって大きく変動しており、紅斑熱群リケッチアの動態に係わっていると考えられる。

## 学 会 発 表

No.	題 名	発 表 者	学 会 名
1	岡山県のヌートリアにおけるリケッチャ保有状況調査	木田浩司, 中本 敦, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 城ヶ原貴道, 小林秀司	第63回日本衛生動物学会 大会
2	岡山県におけるG2型A群ロタウイルスの流行状況について	葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志	第52回日本臨床ウイルス 学会
3	ヌートリアの寄生マダニ相とリケッチャ保有状況	木田浩司, 中本 敦, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 城ヶ原貴道, 小林秀司	第26回中国四国ウイルス 研究会
4	小型球形ウイルス：正体不明の小型球形ウイルス	葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 木田浩司, 岸本壽男, 西村恵子, 金谷誠久	衛生微生物技術協議会第 32回研究会
5	岡山県の河川及び海域の有機フッ素化合物の環境実態調査	浦山豊弘, 吉岡敏行	第20回環境化学討論会
6	LC/MSによる化学物質分析法の基礎的研究 (50)	浦山豊弘	第20回環境化学討論会
7	ウシにおけるQ熱コクシエラ感染実態	木田浩司, 中本 敦, 溝口嘉範, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 福士秀人, 大屋賢司, 松本千聖, 猪熊 壽	平成23年度岡山県獣医三 学会
8	岡山県で確認された乳児ボツリヌス症の1事例について	大島律子, 石井 学, 中嶋 洋, 岸本壽男	平成23年度岡山県獣医三 学会
9	IS-printing systemを用いた志賀毒素産生性大腸菌感染症事例の分子疫学的解析	石井 学, 大島律子, 中嶋 洋	第57回中国地区公衆衛生 学会
10	PM2.5中の多環芳香族炭化水素類について	中桐未知代, 吉岡敏行, 林 隆義, 中桐基晴	第57回中国地区公衆衛生 学会
11	多量排出化学物質の水環境実態調査	吉岡敏行, 山辺真一, 浦山豊弘 剣持 堅志	第14回日本水環境学会シ ンポジウム

No.	題 名	発 表 者	学 会 名
12	ふきとり検体からのノロウイルス検出法に関する検討	溝口嘉範, 木田浩司, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 安原広己, 上間 匡, 野田 衛	第32回日本食品微生物学会学術総会
13	岡山県で確認された乳児ボツリヌス症の1事例について	大島律子, 石井 学, 中嶋 洋, 岸本壽男	平成23年度獣医学術中国地区学会
14	ウシにおけるQ熱コクシエラ感染実態	木田浩司, 中本 敦, 溝口嘉範, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 福士秀人, 大屋賢司, 松本千聖, 猪熊 壽	平成23年度獣医学術中国地区学会
15	岡山県のリケッチア症の動向	木田浩司, 中本 敦, 溝口嘉範, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 森光亮太, 小林秀司, 清水慶子, 藤田博己	第19回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー
16	2011年岡山県における手足口病の大規模流行とコクサッキーウイルスA6型の検出	濱野雅子, 葛谷光隆, 木田浩司, 藤井理津志, 岸本壽男	第81回日本感染症学会西日本地方会学術集会
17	児島湖の水質シミュレーション	藤田和男, 難波 勉, 鷹野 洋, 板谷 勉, 劔持堅志	日本水処理生物学会第48回大会
18	微少粒子状物質PM2.5の自動測定とマニュアル測定の質量濃度比較と成分分析について	林 隆義, 中桐未知代, 野村 茂, 小川 登, 片岡敏夫, 中桐基晴	第38回環境保全・公害防止研究発表会
19	オキサミル, フルフェノクスロン, フルアジナム (水質) の一斉分析	浦山豊弘	平成23年度化学物質環境実態調査 環境科学セミナー
20	フルオランテン (水質) の分析	吉岡敏行	平成23年度化学物質環境実態調査環境科学セミナー
21	2011年5月に岡山県内で発生した日本紅斑熱の感染源調査	木田浩司, 中本 敦, 溝口嘉範, 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 森光亮太, 小林秀司, 清水慶子	第4回日本リケッチア症臨床研究会・第18回リケッチア研究会合同研究発表会
22	児島湖底質における汚濁物質の変化	鷹野 洋, 坂本祐基, 板谷 勉	第46回日本水環境学会年会

---

## 岡山県環境保健センター年報 第36号

(平成23年度)

平成24年11月30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. (086) 298-2681 (代表) FAX. (086) 298-2088  
ホームページ <http://www.pref.okayama.jp/soshiki/185/>

---