

岡山県環境保健センター年報

第37号
(平成24年度)

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

No.37

2013

ま え が き

当センターは、県民の生活環境の保全と健康の保持増進に資するため、昭和51年4月に設置され、環境保全及び保健衛生に関する「試験検査」、「調査研究」、「研修指導」、及び「情報の収集・解析・提供」の役割を担い、総合的な試験研究機関として業務を実施しています。

平成24年度、環境科学分野においては、大気中の微小粒子状物質（PM2.5）の自動測定の結果をリアルタイムでホームページに公開し、行政及び県民に情報提供を図ってきました。また、福島第一原発事故を契機として、平常時における一般環境の環境放射能レベルの把握を目的に、県内の環境放射能バックグラウンド調査を開始しました。

一方、保健科学分野においては、風しんの流行や、中東呼吸器症候群（MERS）、重症熱性血小板症候群（SFTS）等の感染症の発生への備え、また、いわゆる健康食品・違法ドラッグ等の検査対応の要望に伴い、更なる迅速な対応と検査精度が求められるようになったことから、緊急時に対応可能な検査体制の整備を行ってまいりました。また、12月に県内で腸管出血性大腸菌O157が断続的に発生し、他県にまたがる広域的な調査も実施いたしました。

こうした県内外で発生するさまざまな社会問題や県民の関心の高い事案について、センターが行った調査研究を含む有益な情報を広く県民に伝えられるよう、平成25年度3月から県民を対象とした「公開講座」を開催しました。この公開講座は今後も引き続き定期的に開催する予定です。

このように環境及び保健分野における県民の安全・安心を科学的・技術的側面から保証する機関として県行政の推進に務めており、今後とも関係機関と緊密な連携を図り、行政・県民のニーズに応える機関でありたいと切望いたします。

このたび、平成24年度に実施した調査研究等の成果について取りまとめました。ご高覧いただき忌憚のないご意見をお寄せいただきますとともに、なお一層のご支援、ご鞭撻を賜りますようお願いいたします。

平成25年12月

岡山県環境保健センター

所 長 岸 本 壽 男

目 次

調査研究・資料

環境科学部

大気科

【調査研究】

1. 岡山県におけるPM2.5に係る平成23年度の観測結果について
中野温朗, 深見武史, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋 1

【資 料】

2. 2010-2012年度におけるオキシダント前駆物質と高濃度オキシダントの関係について
喜多真帆, 深見武史, 中野温朗, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋 9

水質科

【調査研究】

3. 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4メチルベンジリデンカンファーの分析法の検討—
大月史彦, 吉岡敏行, 山辺真一, 新 和大, 山本 淳 17
4. 有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究
—GC/MSを用いた水質中脂肪酸メチルエステル (FAME) 等の多成分分析法の検討—
吉岡敏行, 山辺真一, 大月史彦, 新 和大 29
5. 七区における汚濁負荷量調査
藤田和男, 難波あゆみ, 河野裕明, 山本 淳 41
6. 児島湖流域の水質シミュレーション計算 (2)
藤田和男, 難波あゆみ, 河野裕明, 山本 淳 51

【資 料】

7. LC/MS/MSを用いた水質中マラカイトグリーンの分析
大月史彦, 吉岡敏行, 山辺真一, 新 和大, 山本 淳 61

放射能科

【調査研究】

8. 岡山県内における環境放射能バックグラウンド調査
森上嘉亮, 畑 陽介, 清水光郎, 片岡敏夫, 小川 登 65

【資 料】

9. 同一地域に生育する松葉中ラジウム濃度調査
森上嘉亮, 畑 陽介, 清水光郎, 片岡敏夫, 小川 登 69
10. 金剛川水系における河川水中ラドン濃度調査
畑 陽介, 清水光郎, 小川 登, 森上嘉亮, 片岡敏夫 73
11. 大気浮遊塵中の全 α 放射能濃度と土壌水分, 地中温度との関係
片岡敏夫, 小川 登, 清水光郎, 森上嘉亮, 畑 陽介 77

保健科学部

細菌科

【調査研究】

12. 牛由来検体等からのリステリア及びサルモネラの検出状況と
パルスフィールドゲル電気泳動法を用いた*Listeria monocytogenes*の型別解析について
河合央博, 大島律子, 仲 克巳, 植原幸二, 中嶋 洋 83
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 (5)
大島律子・河合央博・中嶋 洋 89
14. 岡山県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24年度)
中嶋 洋, 大島律子, 河合央博, 植原幸二, 仲 克巳 93

ウイルス科

【調査研究】

15. 胃腸炎ウイルスの疫学的研究
—岡山県で検出されたG2型ヒトロタウイルスの分子疫学的解析—
葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 溝口嘉範, 藤井理津志, 金谷誠久 99
16. ノロウイルス検査におけるエコーウイルス9型Hill株を用いた核酸検出効率の評価
木田浩司, 溝口嘉範, 濱野雅子, 葛谷光隆, 藤井理津志 107
17. 感染症流行予測調査 (平成24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, 島村琢自 111
18. 岡山県におけるインフルエンザ流行の疫学的解析 (2011~2012年シーズン)
木田浩司, 葛谷光隆, 溝口嘉範, 濱野雅子, 藤井理津志, 島村琢自 115

【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 (2011/12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 121

衛生化学科

【調査研究】

20. LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討
(1) 植物毒リコリンの迅速分析
浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美 125
21. LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討
(2) アトロピン, スコポラミン, アコニチン及びメサコニチンの同時分析
浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美 129
22. LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討
(3) ふぐ毒の機器分析
浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美, 大島律子, 石井 学 133

【資 料】

23. 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3報)
浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美 137

- 他誌発表論文抄録 145
報告書等 149

【調査研究】

岡山県におけるPM2.5に係る平成23年度の観測結果について

A Study on PM2.5 Mass Concentrations Observed in Okayama Prefecture in 2011

中野温朗, 深見武史, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋 (大気科)

Atsurou Nakano, Takeshi Fukami, Maho Kita, Shigeru Nomura,

Tatsuya Nobumori, Hiroshi Takano (Department of Atmosphere)

要 旨

岡山県は、微小粒子状物質（以下「PM2.5」という。）について、平成23年度から茂平・早島・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の4測定局体制で、自動測定機による質量濃度の常時監視を行っている。平成23年度の観測結果によると、いずれの測定局についても環境基準を超過していた。日平均値 $35\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超過した観測日には、4測定局にまたがって広域に、かつ数十時間にわたり高濃度になる事例がみられた。各測定局の日平均値は通年で相関性をもって変動する事象が観測され、PM2.5は県南地域に広く拡散していたと推察された。また、日平均値はPM2.5と浮遊粒子状物質に高い相関性を有しており、浮遊粒子状物質の自動測定機による観測値からPM2.5の質量濃度を推定できることが示唆された。

[キーワード：微小粒子状物質, 浮遊粒子状物質, 大気環境測定局, 質量濃度]

[Key words: PM2.5, SPM, Monitoring Station, Mass Concentration]

1. はじめに

微小粒子状物質（以下「PM2.5」という。）については、人の健康への影響が懸念されるために、平成21年9月環境省告示により環境基準（年平均値 $15\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下であり【長期基準】、かつ、日平均値 $35\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下であること【短期基準】）が設定された。岡山県では、平成21年度から環境省試行事業として、早島一般環境大気測定局（以下「早島局」という。）においてPM2.5自動測定機による常時監視を開始した。さらに、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。）にそれぞれPM2.5自動測定機を整備し、平成23年度から計4測定局で質量濃度について常時監視を行っている。

また、本県は、PM2.5の構成成分の分析を平成19年度から取り組んでおり、主要な構成成分であるイオン成分、無機元素成分、炭素成分に加えて、多環芳香族炭化水素類及びレボグルコサンの実態解明を試み、成果を報告してきた^{1)~8)}。

過年度までの報告は、県下の特定の地点で各季節の一定期間において観測された結果に基づくものであったが、各地にPM2.5自動測定機が整備されたことで、年間を通してより広域にPM2.5の挙動を観測し、評価することが可能になった。そこで、本報では、PM2.5質量濃度の常時監視に

ついて4測定局体制となった平成23年度の観測結果を解析したので報告する。

2. 調査方法

2.1 調査地点

調査地点を図1及び表1に示す。茂平局は、笠岡市の西端に位置し、小高い丘に囲まれた田園の中にあり、南方には瀬戸内海に面した工業地帯がある。総社局は、周辺を住宅地で囲まれた公園内に設置され、測定地点から約1km離れると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号線と本州と四国を結ぶ瀬戸中央自動車道が交わる幹線道路沿道に設置されている。早島局は、当センターの西方4kmにあって岡山市と倉

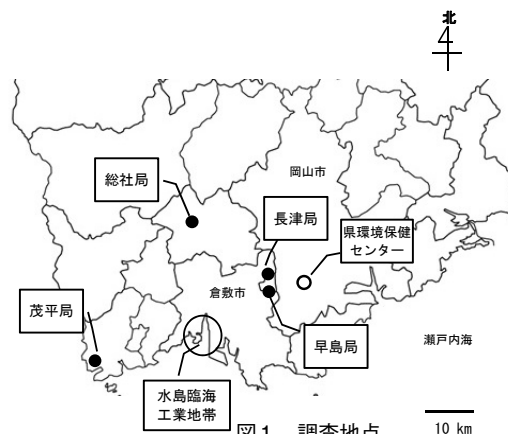


図1 調査地点

敷市に挟まれた都窪郡早島町の中心部に位置し、周囲は住宅地や水田に囲まれているが、その南部に瀬戸内海に面した工業地帯がある。

2.2 対象期間

平成23年4月1日から平成24年3月31日までの観測値を解析対象とした。

2.3 測定方法

各測定局のPM2.5自動測定機及びその測定方法を表1に示す。自動測定機は、いずれも環境省が標準測定法と等価性を有すると認定した機器（FPM-377, Model 5030 SHARP）を用いた。また、浮遊粒子状物質（以下「SPM」という。）については、県下の大気汚染常時監視システムで観測された結果を用いた。

3. 結果及び考察

3.1 年間の質量濃度の状況

平成23年度におけるPM2.5質量濃度の観測結果のまとめを表2に示す。年平均値は、茂平局21.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、総社局15.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、長津局22.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、早島局18.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。茂平局・総社局・早島局は一般環境大気測定局の全国年平均値15.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を、長津局は自動車排出ガス測定局の全国年平均値16.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ をそれぞれ上回った⁹⁾。また、日平均値（98パーセントイル値）は、茂平局54.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、総社局38.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、長津局57.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、早島局48.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。従って、平成23年度の観測結果は、いずれの測定局においても環境基準を超過していた。

環境基準の短期基準とされる日平均値35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超過した観測日（以下「環境基準超過観測日」という。）は、有

効観測日のうち4～13%に当たり（茂平局45日、総社局14日、長津局46日、早島局26日）、全国平均（一般環境大気測定局13日、自動車排出ガス測定局12日）と比較して同等以上に頻出した。

各測定局の日平均値の出現頻度を図2に示す。総社局・早島局においては $\sim 15\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度で、茂平局・長津局においては10～20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度でそれぞれ出現頻度が高く、これらの区画より高濃度側では緩やかに出現頻度が低くなる傾向であった。

月別の環境基準超過観測日の出現頻度を図3に示す。総社局・早島局・長津局では7～9月に、茂平局では9月と12月に環境基準超過観測日はみられなかった。

環境基準超過観測日となった測定局数毎の状況を表3に示す。4測定局すべてで同日に環境基準超過観測日となった日数は、総日数（58日）のうちの約19%に当たる11日あった。また、複数測定局で同日に環境基準超過観測日となった日数は、総日数のうちの約65%に当たる38日あった。茂平局及び長津局に偏りがみられたものの、いずれかの測定局で環境基準超過となった観測日には、他の測定局の日平均値についても高濃度になる傾向がみられた。なお、各測定局で観測された日平均値の相関については、3.2で述べる。

複数測定局で環境基準超過となった観測日における質量濃度の時間変化の事例として、平成24年2月5～6日にわたる約3日間に観測された1時間値の推移を図4に示す。各測定局の質量濃度は、2月5日午前0時頃から上昇し始め、35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超過した状況を約50時間にわたり継続し、2月7日午前0時過ぎに環境基準を下回った。その他の環

表1 調査地点

測定局	局区分	緯度	経度	サンプラー型式	測定方法
茂平局	一般環境大気測定局	34° 29' 38"	133° 27' 39"	FPM-377	β 線吸収法
総社局	一般環境大気測定局	34° 40' 26"	133° 44' 39"	FPM-377	β 線吸収法
長津局	自動車排出ガス測定局	34° 36' 16"	133° 49' 6"	FPM-377	β 線吸収法
早島局	一般環境大気測定局	34° 35' 54"	133° 49' 30"	Model 5030 SHARP	β 線吸収法・光散乱法ハイブリッド法

表2 平成23年度の観測結果

測定局	有効測定日数	年平均値	日平均値（98%値）	日平均値 35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の超過日数	
				日数（ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）	割合（%）
茂平局	363	21.8	54.3	45	12
総社局	346	15.9	38.7	14	4
長津局	360	22.6	57.6	46	13
早島局	348	18.2	48.3	26	7
一般環境大気測定局（全国平均）*	351	15.4	38.7	13	4
自動車排出ガス測定局（全国平均）*	341	16.1	38.0	12	4

*環境省、微小粒子状物質（PM2.5）測定データ、平成23年度より算出

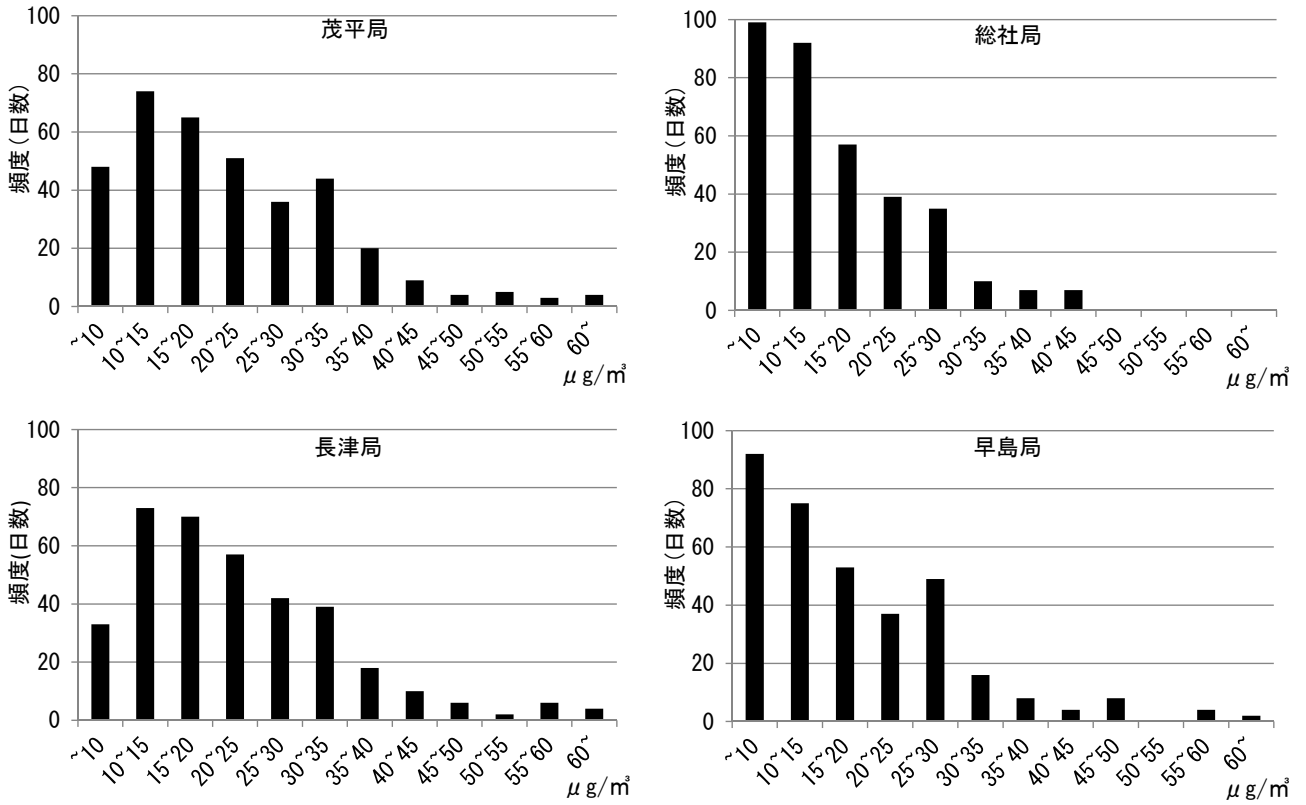


図2 質量濃度の日平均値の出現頻度

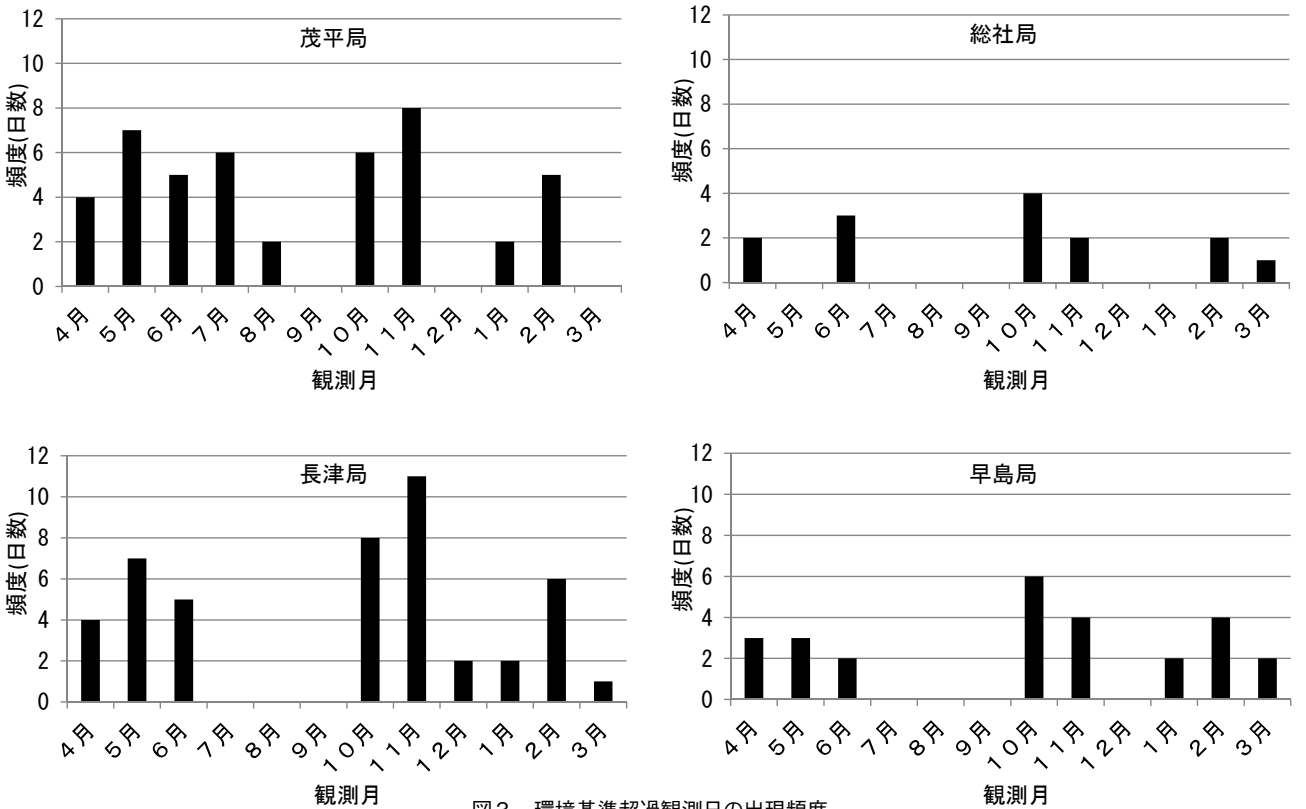


図3 環境基準超過観測日の出現頻度

境基準超過観測日においても、当該事例と同様に質量濃度の1時間値が4測定局にまたがる程度に広域に数十時間にわたり $35\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超過した状況を継続した事例が複数みられた。

3.2 各測定局の質量濃度の相関

平成23年度に各測定局で観測されたPM2.5質量濃度の月平均値の推移を図5に示す。長津局及び茂平局の月平均値は、通年で総社局及び早島局のものより高い値で推移した。月平均値の全体的な傾向は、春季から初夏（4～6月）にかけて、また晩秋から初冬季（11月頃）に濃度が高くなり、環境省により報告された近畿・中国地方の観測結果とよく一致した¹⁰⁾。

各測定局で観測されたPM2.5質量濃度の日平均値について、総社局に対する他の測定局の相関を図6に示す。各測定局の間には通年で高い相関 ($R>0.80$) が認められ、県南地域の広い範囲にPM2.5が拡散していたと推察される。なお、既報において、長津局及び総社局で採取されたPM2.5を成分分析したところ、イオン成分や無機元素成分などに結果の類似性がみられたことを報告している⁹⁾。

3.3 SPMとの相関

平成23年度におけるPM2.5及びSPM質量濃度それぞれの日平均値の相関係数を表4に示す。ただし、両者の質量濃度について捕集流量の差異を考慮していない。

いずれの測定局においても、通年で高い相関 ($R>0.80$)

表3 環境基準を同日に超過した測定局数毎の状況

測定局数	日数	割合 (%)	内容	
			測定局	日数
1 測定局	20	34	茂平局	9 日
			長津局	10 日
			早島局	1 日
2 測定局	14	24	茂平・長津局	12 日
			茂平・早島局	1 日
			総社・早島局	1 日
3 測定局	13	22	茂平・総社・長津局	1 日
			茂平・総社・早島局	1 日
			茂平・長津・早島局	11 日
4 測定局	11	19		

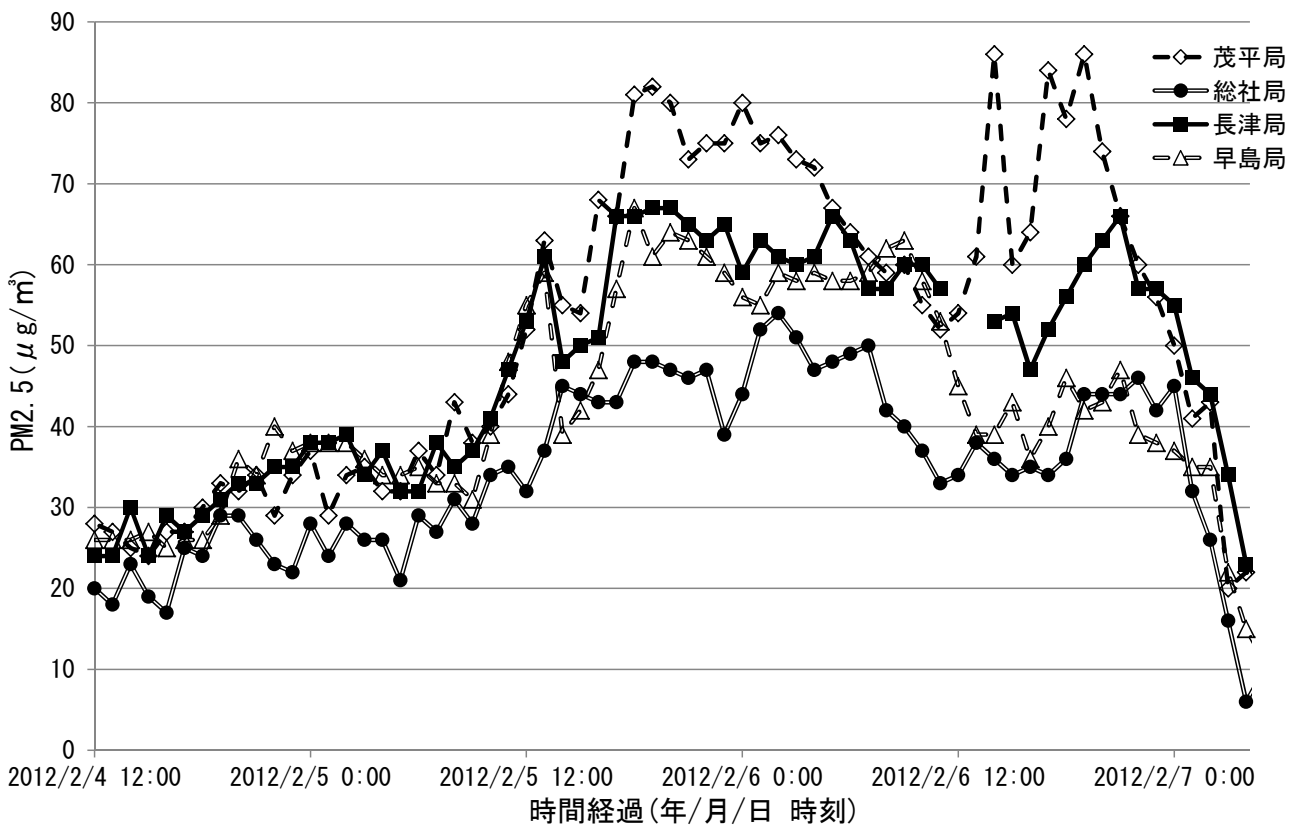


図4 環境基準を超過した日における1時間値の推移

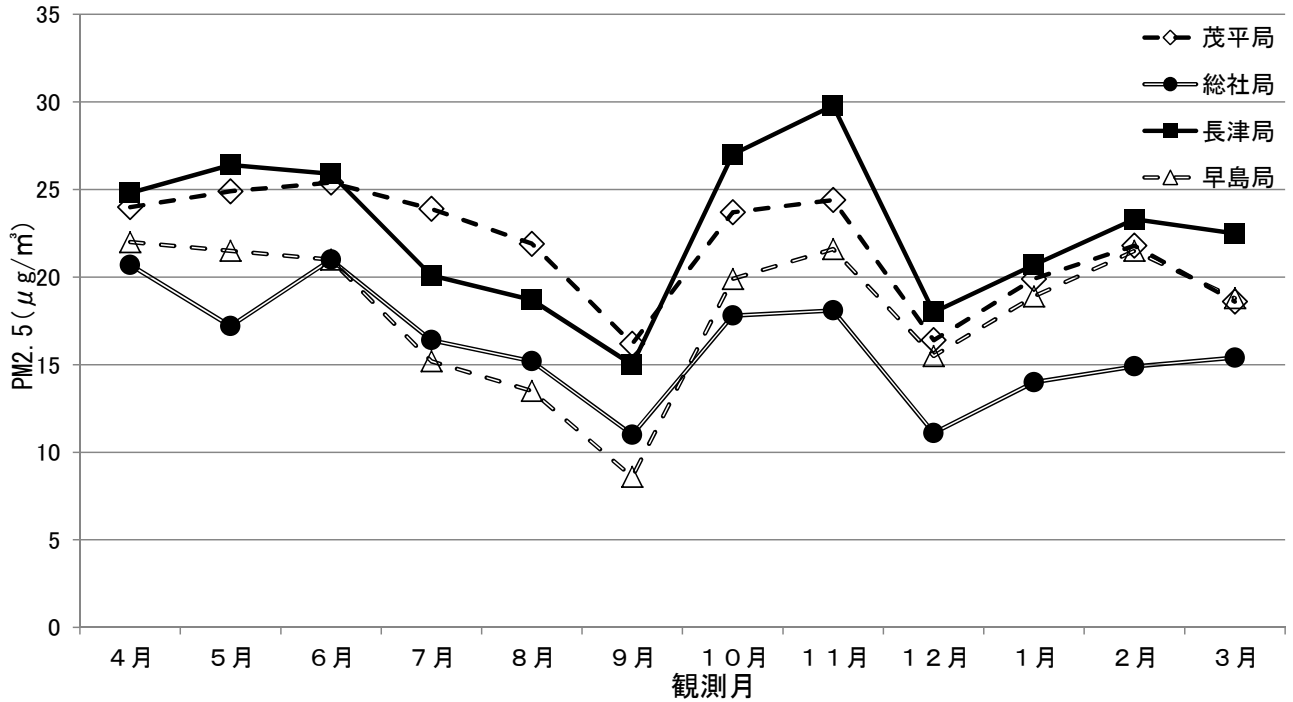
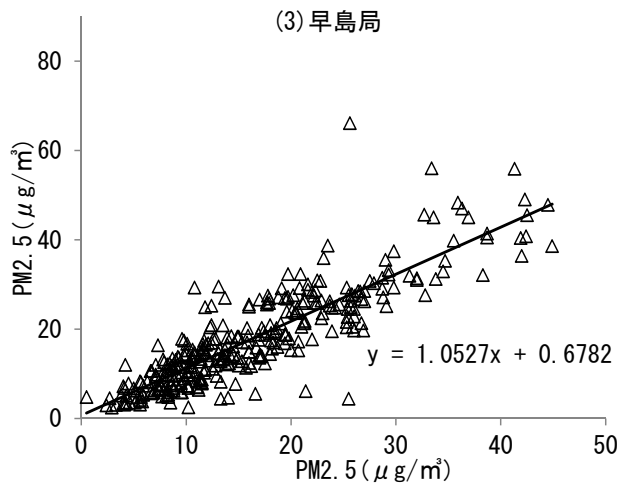
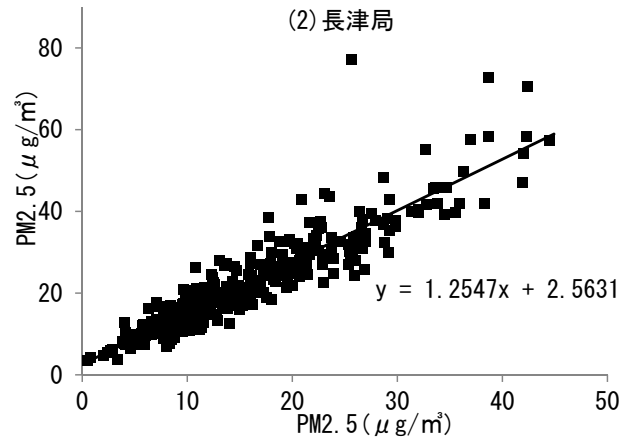
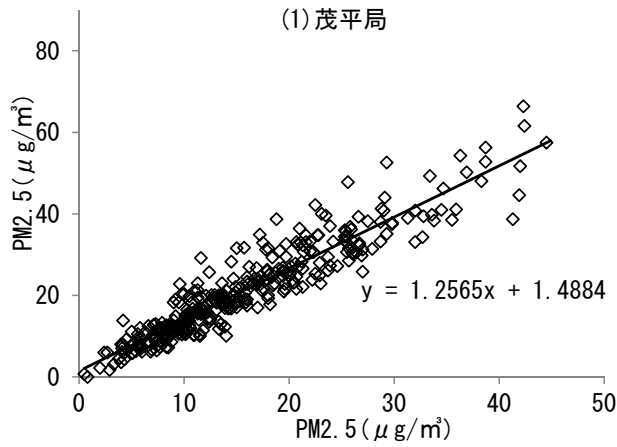


図5 各測定局の質量濃度の月平均値の推移



各測定局間の相関係数 (R)

	総社局	茂平局	長津局	早島局
総社局	1	0.94	0.92	0.87
茂平局		1	0.92	0.87
長津局			1	0.94
早島局				1

図6 総社局の質量濃度の日平均値に対する茂平局・長津局・早島局の日平均値の相関

が認められ、過去に報告したマニュアルサンプリングによる観測結果とよく一致した^{1), 7)}。次に、SPMに対するPM2.5日平均値の相関を図7に示す。いずれの測定局においても、通年で評価した場合、PM2.5はSPMに対して6～7割程度を占める割合となった。SPMに占めるPM2.5の割合は、測定局間で差異はみられるものの概ね同様の傾向を

もっており、PM2.5質量濃度はSPM自動測定機による観測値から推定できると考えられた。

SPMに対するPM2.5質量濃度の日平均値の単相関の傾きについて、各月のまとめを表5に示す。両者の相関を月単位で評価した場合、PM2.5の占める割合は0.4～1.3まで幅をもって変動した。

表4 PM2.5質量濃度の日平均値とSPM質量濃度の日平均値の相関係数

測定局	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	年間
茂平局	0.96	0.94	0.94	0.95	0.94	0.97	0.95	0.99	0.91	0.98	0.96	0.88	0.89
総社局	0.93	0.96	0.93	0.94	0.97	0.96	0.98	0.98	0.99	0.99	0.99	0.95	0.93
長津局	0.97	0.93	0.93	0.97	0.96	0.95	0.98	0.93	0.97	0.98	0.96	0.94	0.84
早島局	0.94	0.97	0.93	0.91	0.94	0.57	0.95	0.94	0.97	0.95	0.99	0.94	0.86

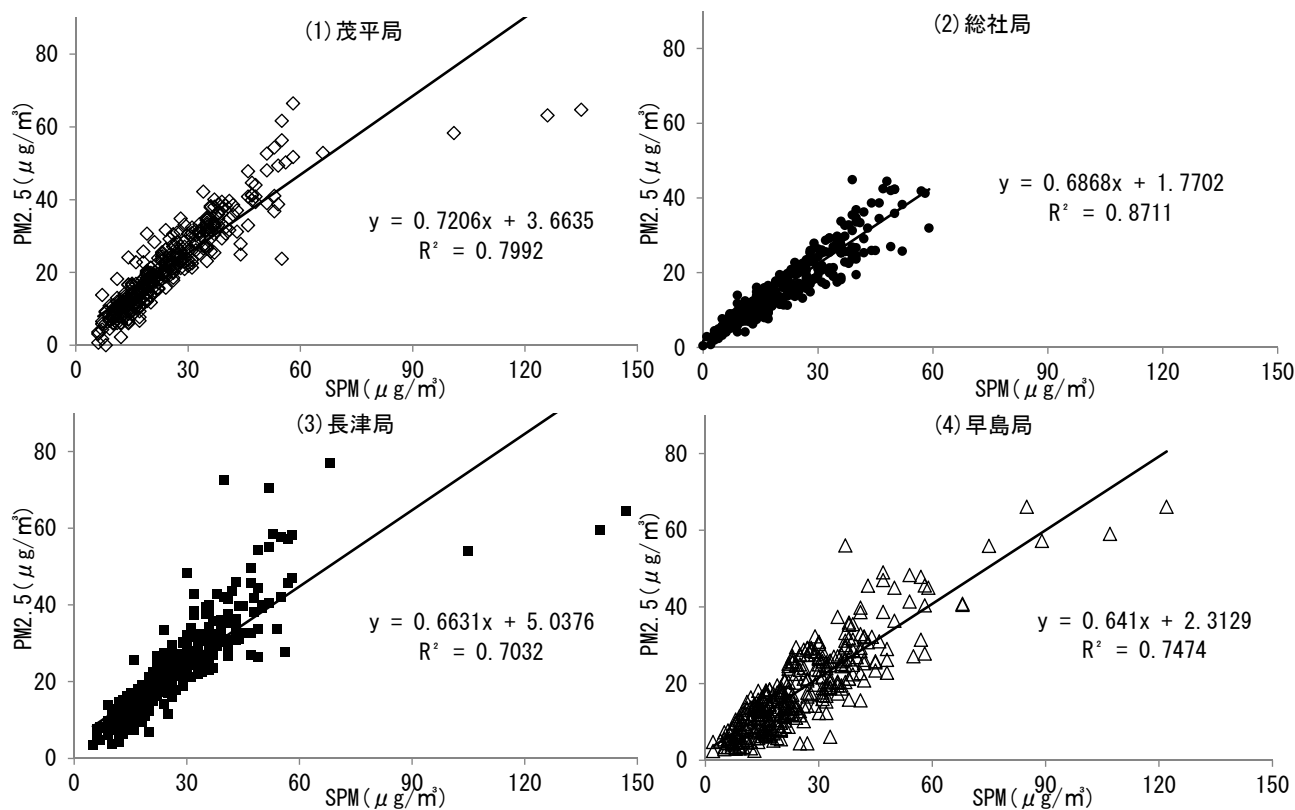


図7 SPMに対するPM2.5質量濃度の日平均値の相関

表5 SPMに対するPM2.5質量濃度の日平均値の単相関の傾き

測定局	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	年間
茂平局	0.87	0.50	0.96	0.76	0.81	1.08	0.86	1.18	1.04	0.94	1.08	0.93	0.72
総社局	0.68	0.66	0.64	0.58	0.59	0.74	0.86	0.84	0.82	0.79	0.80	0.98	0.69
長津局	0.75	0.40	0.81	0.75	0.82	1.09	1.09	1.31	1.02	0.89	0.98	0.85	0.66
早島局	0.85	0.57	0.70	0.57	0.70	0.46	0.79	0.68	0.97	1.20	0.98	1.00	0.75

4. まとめ

- ・平成23年度にPM2.5自動測定機により県下の4測定局で質量濃度を観測したところ、茂平局、総社局、長津局及び早島局のいずれにおいても、環境基準（長期基準及び短期基準）を超過していた。
- ・日平均値 $35\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超過した観測日には、4測定局にまたがって広域に、かつ数十時間にわたり高濃度になる事例がみられた。
- ・4測定局で観測された日平均値は通年で互いに相関性をもっており、PM2.5は県南地域に広く拡散していた。
- ・PM2.5質量濃度の日平均値は、SPMに対して、4測定局とも通年で高い相関性をもち、6～7割程度を占めており、PM2.5質量濃度は、SPM自動測定機の観測値から推定できることが示唆された。

参考文献

- 1) 杉山広和, 信森達也, 野村 茂, 前田 泉: 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2報 -, 岡山県環境保健センター年報32, 7-10, 2008
- 2) 杉山広和, 信森達也, 前田 泉: 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3報 -, 岡山県環境保健センター年報32, 11-16, 2008
- 3) 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) - 第4報 -, 岡山県環境保健センター年報33, 1-5, 2009
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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PM2.5による大気汚染) - 第7報 -, 岡山県環境保健センター年報35, 9-18, 2011
- 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) - 第8報 -, 岡山県環境保健センター年報36, 1-8, 2012
- 8) 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(微小粒子状物質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, 9-16, 2012
- 9) 環境省: 大気汚染状況について
<http://www.env.go.jp/air/osen/index.html>
- 10) 環境省: 微小粒子状物質暴露影響調査報告書, 平成19年7月

【資料】

2010—2012年度におけるオキシダント前駆物質と 高濃度オキシダントの関係について

The relation between the oxidant precursor and oxidant high concentration region
in the 2010 to 2012

喜多真帆, 深見武史, 中野温朗, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋 (大気科)

Maho Kita, Takeshi Fukami, Atsurou Nakano, Shigeru Nomura,

Tatsuya Nobumori, Hiroshi Takano (Department of Atmosphere)

要 旨

オキシダント前駆物質（窒素酸化物及び非メタン炭化水素）と高濃度オキシダントの現状傾向を明らかにするために、2010年度からの3年間について2000年度から3年間と比較しながら検討をおこなった。その結果、2000—2002年度と2010—2012年度ではO_x前駆物質と高濃度O_xとの関係に変化があり、NMHC/NO_x濃度比2以上6未満の範囲での4—5月のO_x高濃度域の増加及びNMHC/NO_x濃度比2未満及び6以上の範囲での増加が、近年のO_x高濃度域の増加に影響しているのではないかと考えられた。

[キーワード：オキシダント, 気象条件, 窒素酸化物, 非メタン炭化水素]

[Key words : Oxidant, Climate condition, Nitrogen oxide, Nonmethane hydrocarbon]

1. はじめに

岡山県では近年オキシダント情報・注意報の発令回数が増え、平成25年度は岡山県の光化学オキシダント夏期対策開始以来過去3番目の発令回数となった。年月とともに岡山県の大気環境の状態も変化してきていると考えられる。そこで、オキシダント前駆物質（窒素酸化物及び非メタン炭化水素）と高濃度オキシダントの現状傾向を明らかにするために、2010年度からの3年間について2000年度から3年間と比較しながら検討をおこなった。

2. 解析方法

東京都の報告書¹⁾では気象要素以外の要因が光化学オキシダントの濃度上昇に与える影響を指摘している。そこで一般環境大気測定局である早島局（都窪郡早島町早島）について気象的要因をできるだけ排除した場合における、午前6時から午前9時（以下「午前6—9時」）までのオキシダント前駆物質（窒素酸化物及び非メタン炭化水素）に着目し解析を行った。早島局を選定した理由は、オキシダント測定機を設置している一般環境大気測定局の中で、当県のはほぼ中央に位置し「昼間の1時間値の年平均」「昼間の1時間値が0.06ppmを超えた日数と時間数」「昼間の1時間値の最高値」等7つの項目において岡山県の各一般環境大気測定局の中央値に近い値を示したからである。

2-2 解析期間

解析にあたっては、オキシダントが高濃度となる4月から9月とし、2000年度から2002年度までの3年間（以下「2000—2002年度」）と2010年度から2012年度までの3年間（以下「2010—2012年度」）とについて解析を行った。また、オキシダント前駆物質について2000年度から2012年度までの全期間における経年変化についても解析を行った。

2-2 気象要素

気象要素の影響を限定的なものとするため、日積算日射量、日最高気温、午前5時から昼12時（以下「午前5—12時」）までの平均風速、午前5—12時までの平均湿度について、一定範囲となった日に限定してデータを解析した。

2-3 解析項目

2-2で整理したデータをもとに、午前6—9時の窒素酸化物平均濃度及び非炭化水素とオキシダント濃度日最高値を比較した。

2-4 データ収集局

オキシダント濃度（以下「O_x濃度」）及び風速については早島局の環境大気観測装置のデータを用いた。窒素酸化物濃度（以下「NO_x濃度」）及び非メタン炭化水素濃度（以下「NMHC濃度」）については、早島局から約1.0km離れた長津局（都窪郡早島町長津）の環境大気測定装置のデータを用いた。日射量、気温、湿度については、早島局から約3.5km離れた岡山県環境保健センター（岡山市南区内尾）に設置されている気象観測装置のデータを用いた。

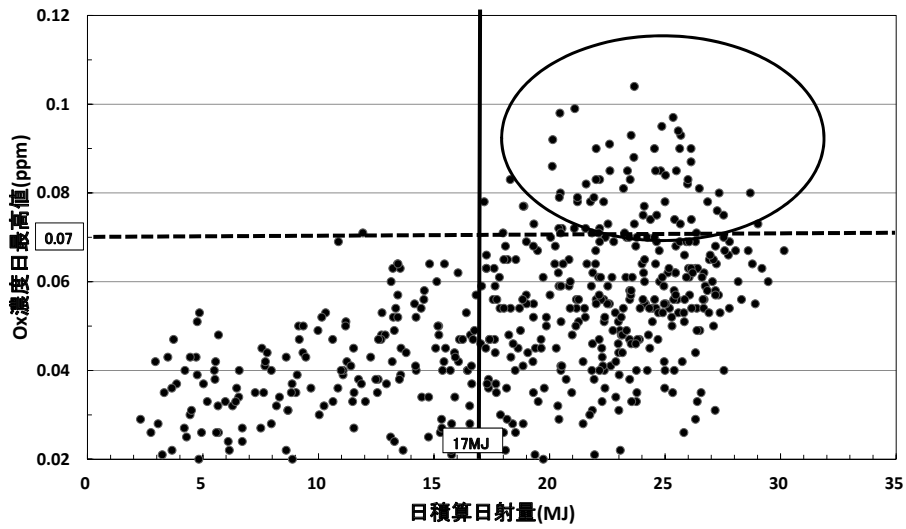


図1 2000-2002年度 日積算日射量とOx濃度日最高値との関係

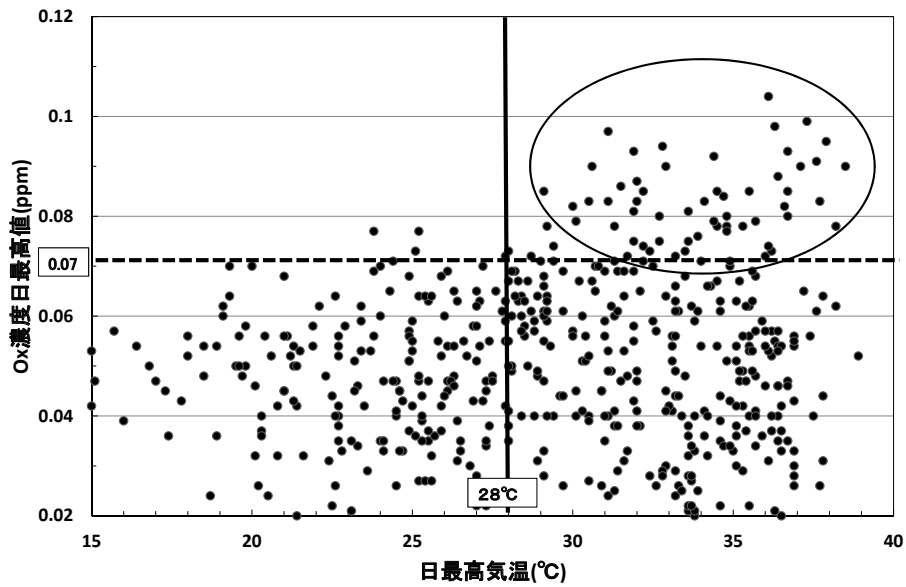


図2 2000-2002年度 日最高気温とOx濃度日最高値との関係

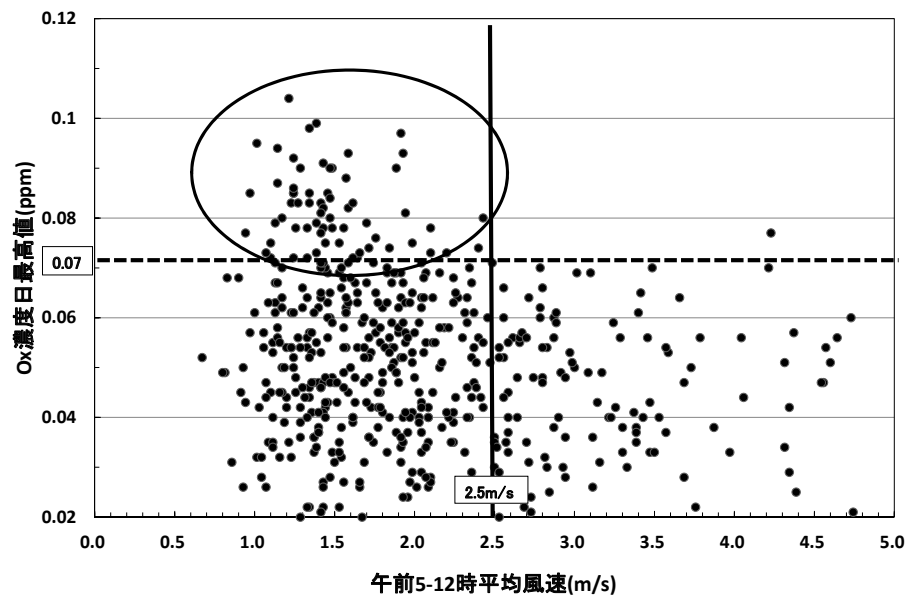


図3 2000-2002年度 午前5-12時平均風速とOx濃度日最高値との関係

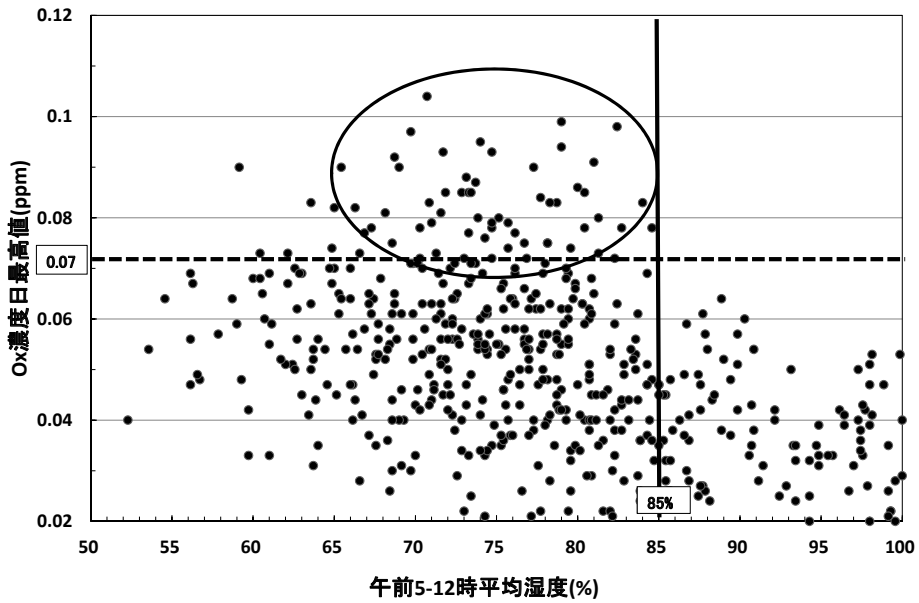


図4 2000-2002年度 午前5-12時平均湿度とOx濃度日最高値との関係

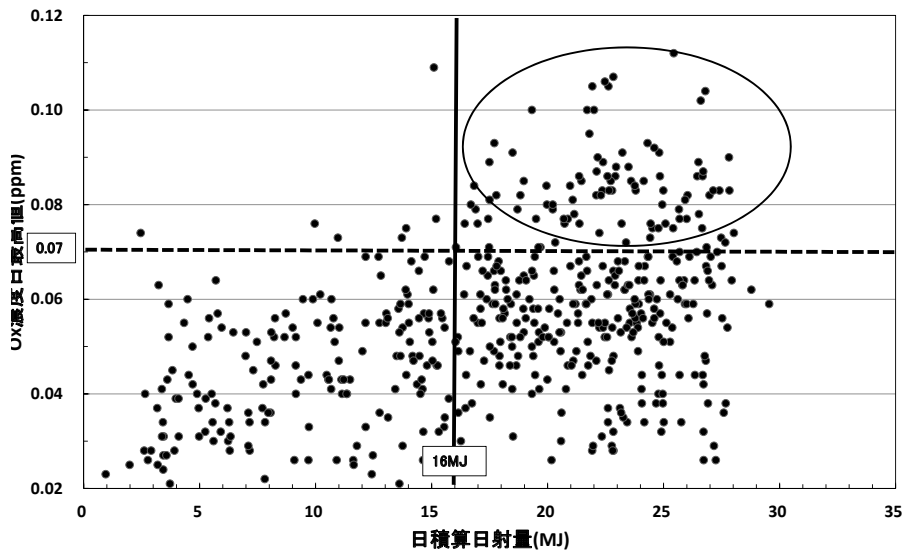


図5 2010-2012年度 日積算日射量とOx濃度日最高値との関係

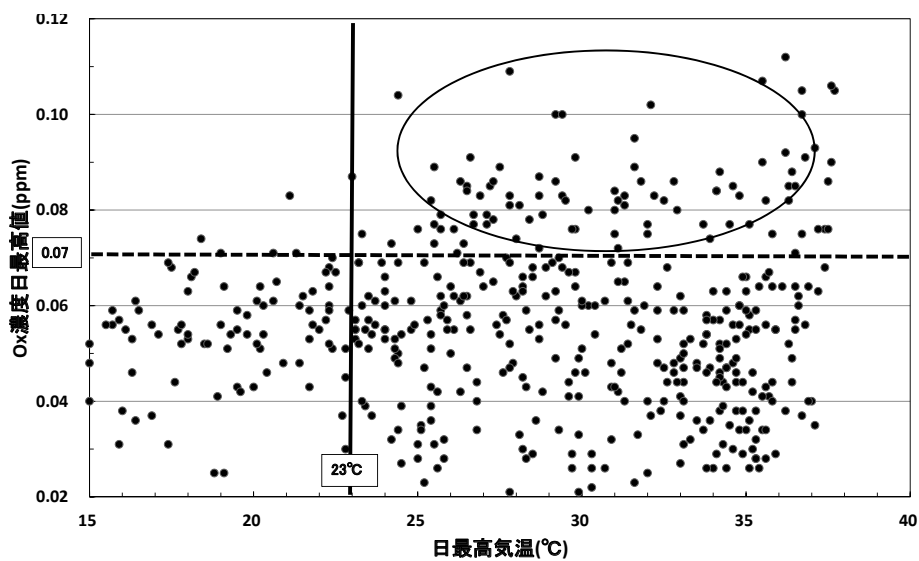


図6 2010-2012年度 日最高気温とOx濃度日最高値との関係

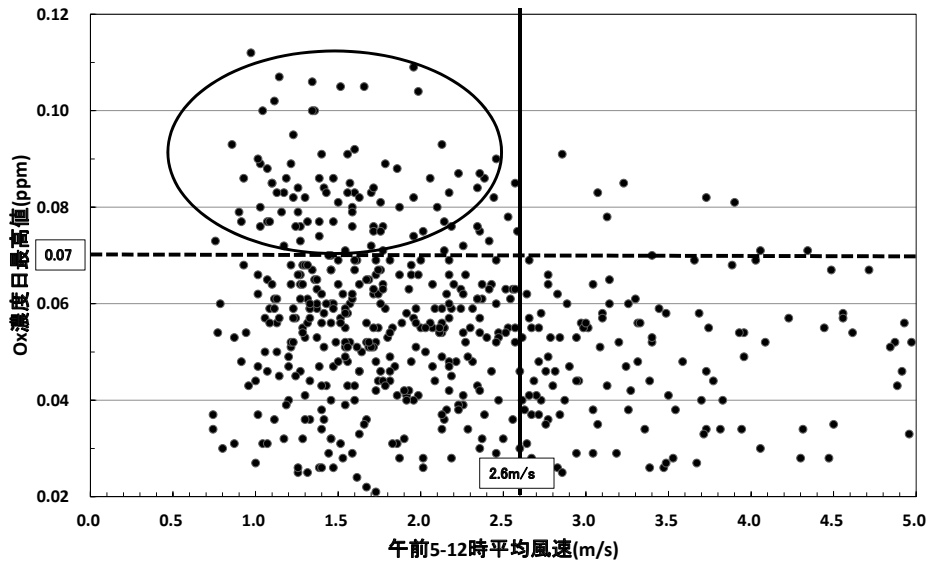


図7 2010-2012年度 午前5-12時平均風速とOx濃度日最高値との関係

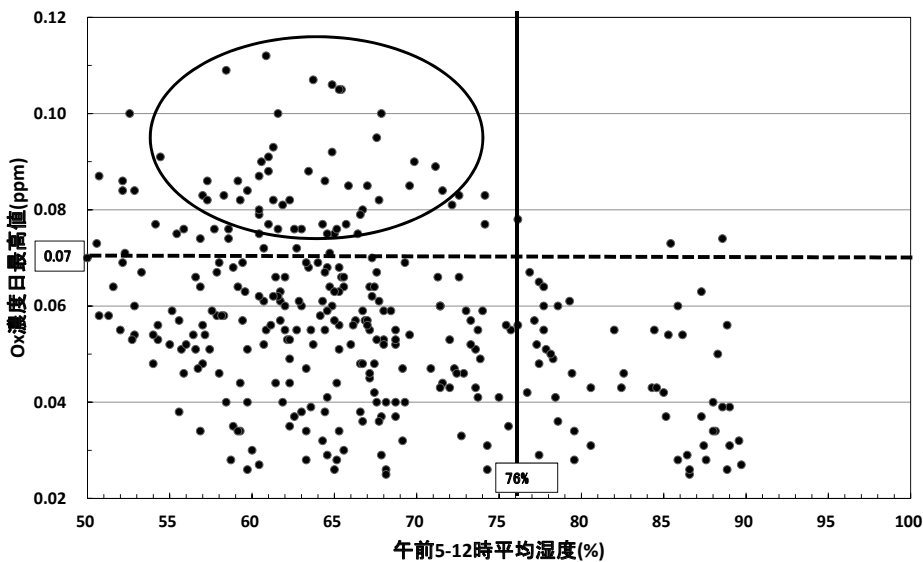


図8 2010-2012年度 午前5-12時平均湿度とOx濃度日最高値との関係

3. 結果及び考察

3-1 気象条件の限定

日積算日射量, 日最高気温, 午前5-12時の平均風速及び午前5-12時の平均湿度とオキシダント濃度日最高値について, 2000-2002年度と2010-2012年度ごとのその優位性について解析を行った。なお, オキシダント高濃度域は環境基準である0.06ppmを上回る「0.07ppm以上」とした。

2000-2002年度について解析をしたところ, 日積算日射量「17.0MJ以上」(図1), 日最高気温「28℃以上」(図2), 午前5-12時平均風速「2.5m/s以下」(図3), 午前5-12時平均湿度「85%以下」(図4)のときにオキシダント高濃度域が出現することがわかった。2010-2012年度について解析したところ, 日積算日射量「16.0MJ以上」(図5), 日最高気温「23℃以上」(図6), 午前5-12時平均風速「2.6m/s以下」(図7), 午前

5-12時平均湿度「76%以下」(図8)のときにオキシダント高濃度域が出現することがわかった。なお, 日最高気温が2000-2002年度「28℃」から2010-2012年度「23℃」への低下は, 2007年度より低温期の4月からオキシダント高濃度域が発生するようになったことが原因であると考えられた。

近年の傾向として「日射量16.0MJ以上」「日最高気温23℃以上」「午前5-12時平均風速2.6m/s以下」「午前5-12時平均湿度76%以下」がオキシダント高濃度域出現の一つの目安となっていると考えられた。

3-2 午前6-9時Ox前駆物質平均濃度とOx日最高値の関係

2000-2002年度と2010-2012年度における3-1で限定した気象条件に該当した日について, 午前6-9時NOx平均濃度及び午前6-9時NMHC平均濃度に対するOx濃度日最高値が0.07ppm以上となる日について解析した。

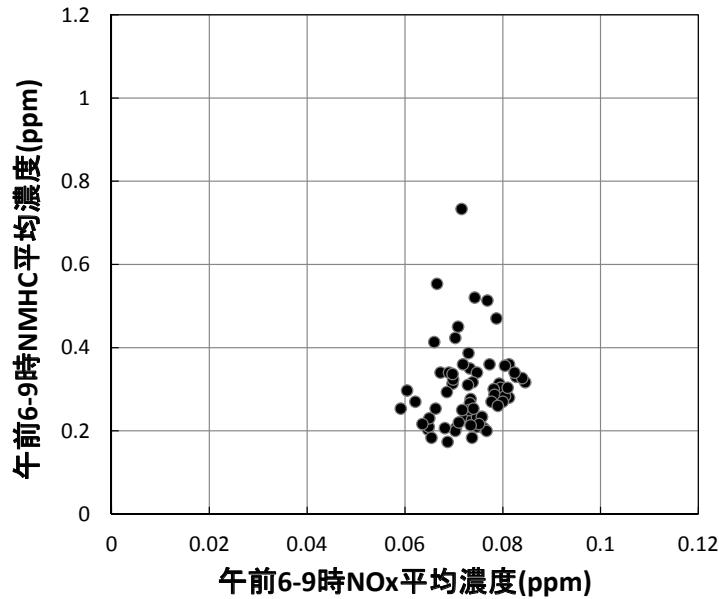


図9 2000-2002年度Ox前駆物質とOx濃度日最高値 (0.07ppm \leq Ox)

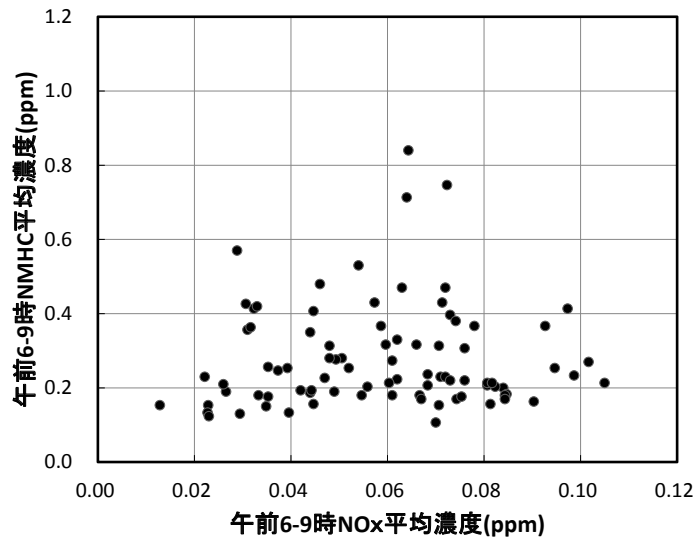


図10 2010-2012年度Ox前駆物質とOx濃度日最高値 (0.07ppm \leq Ox)

Ox高濃度域となる午前6-9時NMHC平均濃度は、2000-2002年度は0.2ppm-0.6ppm(図9)に多く、2010-2012年度は0.1ppm-0.6ppm(図10)の範囲にほとんど含まれていた。午前6-9時NOx平均濃度については、2000-2002年度は0.06ppm-0.09ppm(図9)の範囲であったが、2010-2012年度は0.02ppm-0.10ppm(図10)の広範囲にばらついていた。

午前6-9時NMHC平均濃度及び午前6-9時NOx平均濃度共に2000-2002年度に比べ2010-2012年度は下限範囲が下がる傾向にあり、これはNMHC排出量及びNOx排出量減量の取組がなされてきたこと²⁾が影響していると考えられた。

3-3 NMHC/NOx濃度比とOx濃度日最高値の関係

次にNMHC/NOx濃度比とOx濃度日最高値の出現割合について整理した。

NMHC/NOx濃度比については、NMHC/NOx濃度比が2未満のグループ(以下「NMHC/NOx<2」)、NMHC/NOx濃度比が2以上4未満のグループ(以下「2 \leq NMHC/NOx<4」)、NMHC/NOx濃度比が4以上6未満のグループ(以下「4 \leq NMHC/NOx<6」)、NMHC/NOx濃度比が6以上8未満のグループ(以下「6 \leq NMHC/NOx<8」)、NMHC/NOx濃度比が8以上10未満のグループ(以下「8 \leq NMHC/NOx<10」)及びNMHC/NOx濃度比が10以上のグループ(以下「10 \leq NMHC/NOx」)の6グループにわけた。Ox日最高値については3-2と同様とした。

2000-2002年度においてNMHC/NOx<2、6 \leq NMHC/NOx<8、8 \leq NMHC/NOx<10、10 \leq NMHC/NOxの4グループでは2000-2002年度のプロット数(n)が少なく(図11)、2010-2012年度との比較が困難であったため、2

\leq NMHC/NO_x<4, 4 \leq NMHC/NO_x<6の範囲で両者を比較したところ、O_x高濃度域は2 \leq MHC/NO_x<4の範囲では、2000-2002年度は37.1%であり(図11)、2010-2012年度は10.6ポイント上昇して47.7%であった(図12)。4 \leq NMHC/NO_x<6の範囲では、2000-2002年度は32.1%であり(図11)、2010-2012年度は8.3ポイント上昇して40.4%であった(図12)。

2 \leq NMHC/NO_x<4のO_x高濃度域を月別にみると、4-5月は2000-2002年度は1日であり、2010-2012年度は9日あった。4 \leq NMHC/NO_x<6のO_x高濃度域を月別にみると、4-5月は2000-2002年度は3日であり、2010-2012年度は11日あった。2 \leq NMHC/NO_x<4及び4 \leq NMHC/NO_x<6のO_x高濃度域の上昇には春先のO_x高濃度事象が影響していると考えられた。

また、NMHC/NO_x濃度比が2未満及び6以上の範囲でサンプル数(n)が増加していることは2010-2012年度の特徴であると考えられた。

3-4 O_x前駆物質の2000-2012年度の全期間平均濃度の経年変化について

次に、NMHC/NO_x \geq 6の範囲について、3-2でNMHC濃度及びNO_x濃度ともに下限範囲が下がっていることから、どちらがより減少傾向にあるのか2000-2012年度の全期間における平均濃度を用いて比較した。NO_x平均濃度の減少割合は「-0.0076」(図13)であり、NMHC平均濃度の減少割合は「-0.0038」(図14)であった。

NMHC/NO_x濃度比が6以上となる範囲は、NO_x平均濃度がNMHC平均濃度より減少傾向が強いため出現したのではないかと考えられた。

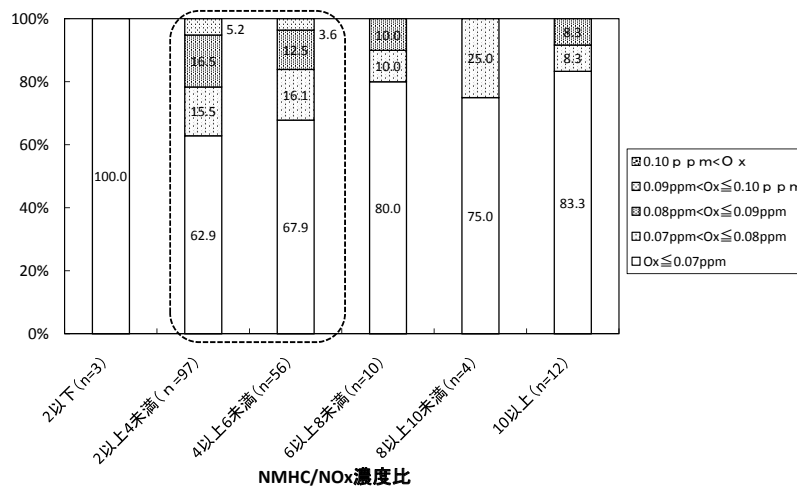


図11 2000-2002年度 NMHC/NO_x濃度比とO_x濃度日最高値の出現割合

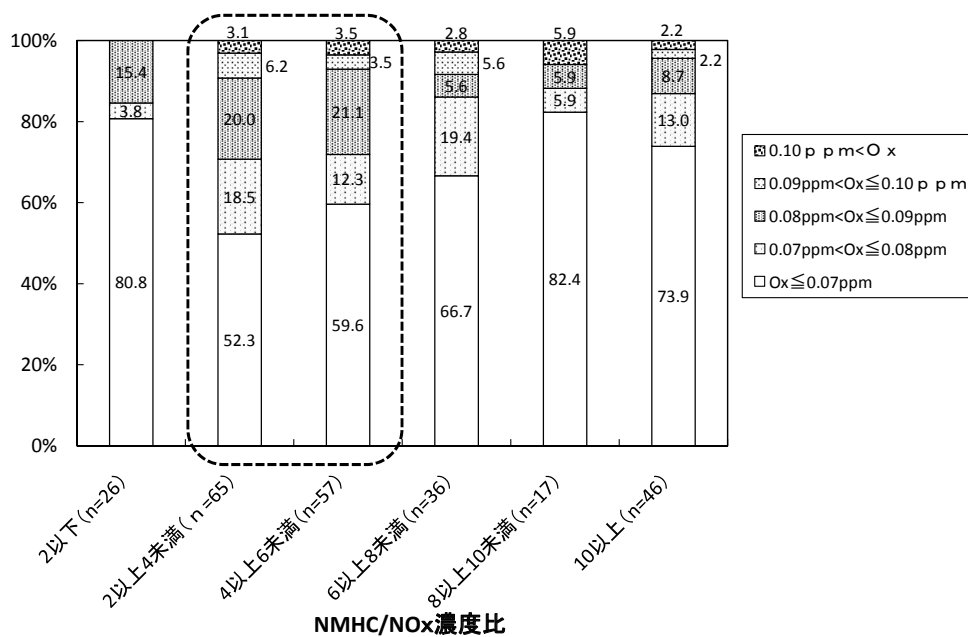


図12 2010-2012年度 NMHC/NO_x濃度比とO_x濃度日最高値の出現割合

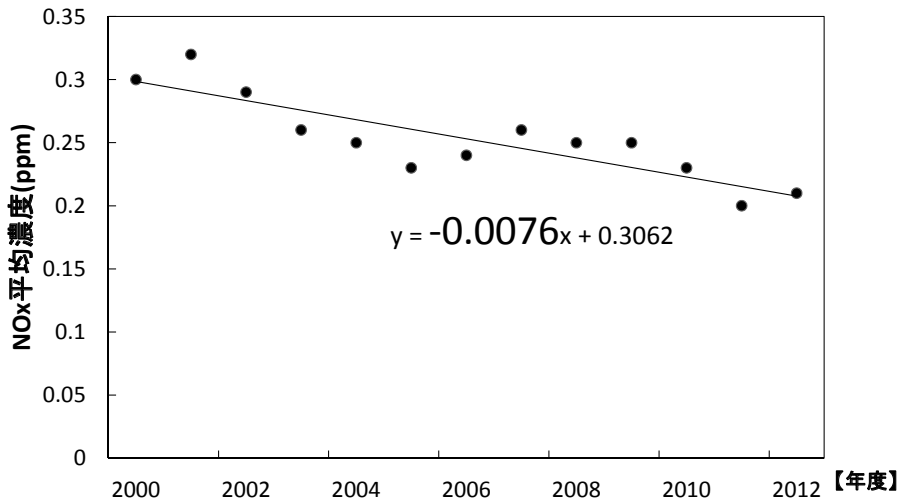


図13 2000-2012年度におけるNOx平均濃度

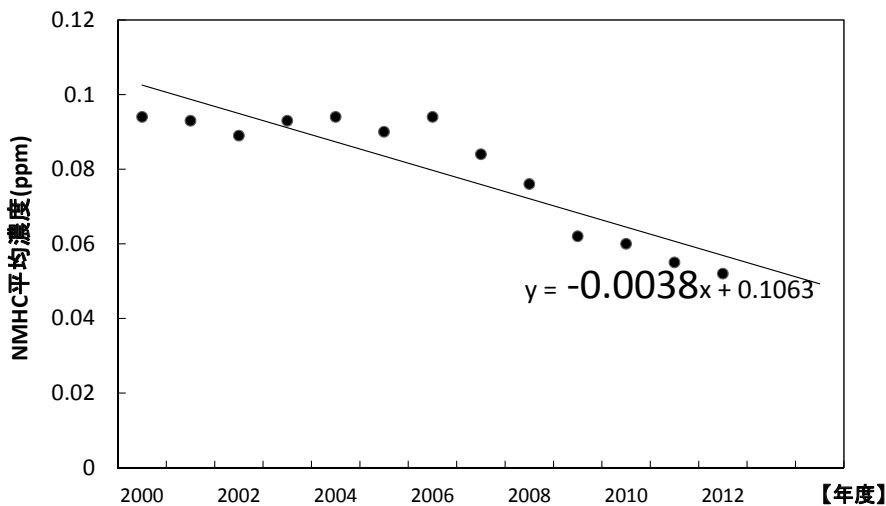


図14 2000-2012年度におけるNMHC平均濃度

4. まとめ

- 1) 観測データをOx濃度日最高値が0.07ppm以上となりやすい一定の気象条件の日に限定し、2000-2002年度の3年間と2010-2012年度の3年間について検討をおこなった。
 - 2) Ox前駆物質である午前6-9時NOx平均濃度と午前6-9時NMHC平均濃度は、2000-2002年度と2010-2012年度ではOx日最高値の出現傾向に違いがあった。
 - 3) NMHC/NOx濃度比とOx日最高値の関係について解析したところ、NMHC/NOx濃度比2以上6未満の範囲ではOx高濃度域は8.3~10.6ポイント上昇しており、4-5月のOx高濃度域となる日数が増加していた。また、NMHC/NOx濃度比2未満及び6以上の範囲では、2000-2002年度に比べ2010-2012年度ではサンプル数(n)が大幅に増加していた。
- 2000-2002年度と2010-2012年度ではOx前駆物質と高

濃度Oxとの関係に変化があった。NMHC/NOx濃度比2以上6未満の範囲での4-5月のOx高濃度域の増加及びNMHC/NOx濃度比2未満及び6以上の範囲の増加が近年のOx高濃度域の増加に影響しているのではないかと考えられた。

参考文献

- 1) 東京都環境局：光化学オキシダント対策検討会報告書，40-49，2005
- 2) 岡山県HP：揮発性有機化合物規制の概要
<http://www.pref.okayama.jp/page/detail-79612.html>
- 3) 大原利真編：光化学オキシダントと粒子状物質等の汚染特性解明に関する研究，国立環境研究所報告，203，2010
- 4) 岡山県：年報，2000-2012年度

【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4-メチルベンジリデンカンファールの分析法の検討—

Study for Analysis Method of 4-Methylbenzylidene camphor in Water by LC/MS/MS

大月史彦, 吉岡敏行, 山辺真一, 新 和大, 山本 淳 (水質科)

Fumihiko Otsuki, Toshiyuki Yoshioka, Shinichi Yamabe, Kazuhiro Atarashi, Jun Yamamoto
(Department of Water)

要 旨

環境試料(水質中)の4-メチルベンジリデンカンファールの分析法について検討した。分析法は固相カートリッジで濃縮後、固相をアルカリ、酸、有機溶媒の順に洗浄した後、アセトニトリルで溶出し、LC/MS/MS(SRM法)で測定する方法とした。対象物質は紫外線吸収剤でもあり、紫外線による構造異性体化が起こるため、注意が必要であった。開発した分析法では、要求感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。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: 4-メチルベンジリデンカンファール, LC/MS/MS法, 紫外線吸収剤]

[Key words: 4-Methylbenzylidene camphor, LC/MS/MS, Ultraviolet absorber]

1 はじめに

4-メチルベンジリデンカンファールは紫外線を吸収する能力が高く、日焼け止めや化粧品に用いられているが、内分泌かく乱作用の可能性も想定されている物質であり、その環境中で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、岡山県に分析法の開発が委託されたことから、当該物質をLC/MS/MSを用いて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

4-メチルベンジリデンカンファール

: AccuStandard製 (輸入元: 和光純薬工業)

4-メチルベンジリデン-d₄カンファール

: CDN Isotopes製 (輸入元: セントラル薬品)

ベンザルカンファール

: MP Biomedicals製 (輸入元: 和光純薬工業)

塩酸

: 1 mol/Lに調製済みの市販品

水酸化ナトリウム水溶液

: 1 mol/Lに調製済みの市販品

アセトニトリル, メタノール

: LC/MS用 和光純薬工業製

精製水

: ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調製

固相カートリッジ

: Waters製 Oasis HLB Plus LP (225mg)

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, 3 μm (Waters製)

移動相: A (5mM酢酸アンモニウム水溶液)

: B (アセトニトリル)

0~0.1min A : B = 80 : 20

0.1~9min A : 80→2 B : 20→98 linear gradient

9~20min A : B = 2 : 98

20~20.5min A : 2→80 B : 98→20 linear gradient

20.5~33min A : B = 80 : 20

流量: 0.2mL/min

カラム温度: 40℃

注入量: 5.0 μL

(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 Positive (4-メチルベンジリデンカンファー)
- : ESI Positive (4-メチルベンジリデン-d₄カンファー)
- : ESI Positive (ベンザルカンファー)

コーン電圧

- : 30V (4-メチルベンジリデンカンファー)
- : 30V (4-メチルベンジリデン-d₄カンファー)
- : 30V (ベンザルカンファー)

コリジョンエネルギー

- : 10eV (255.17>255.17のみ), 20eV (それ以外)
(4-メチルベンジリデンカンファー)
- : 10eV (259.19>259.19のみ), 20eV (それ以外)
(4-メチルベンジリデン-d₄カンファー)
- : 10eV (241.16>241.16のみ), 20eV (それ以外)
(ベンザルカンファー)

モニターイオン

- : 255.17>255.17, 255.17>237.16, 255.17>227.18,
255.17>212.12, 255.17>195.12, 255.17>185.13,
255.17>171.12, 255.17>157.10, 255.17>145.07,
255.17>119.09, 255.17>111.12, 255.17>97.10
(4-メチルベンジリデンカンファー)
 - : 259.19>259.19, 259.19>241.18, 259.19>231.20,
259.19>216.14, 259.19>199.14, 259.19>189.15,
259.19>175.14, 259.19>161.12, 259.19>149.09,
259.19>123.11, 259.19>111.12, 259.19>97.10
(4-メチルベンジリデン-d₄カンファー)
 - : 241.16>241.16, 241.16>223.15, 241.16>213.16,
241.16>198.10, 241.16>181.10, 241.16>171.12,
241.16>157.10, 241.16>143.09, 241.16>131.05,
241.16>111.12, 241.16>105.07, 241.16>97.10
(ベンザルカンファー)
- (下線部は本分析で定量に用いたモニターイオン)

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10ng/ μ Lのサロゲートを100 μ L添加

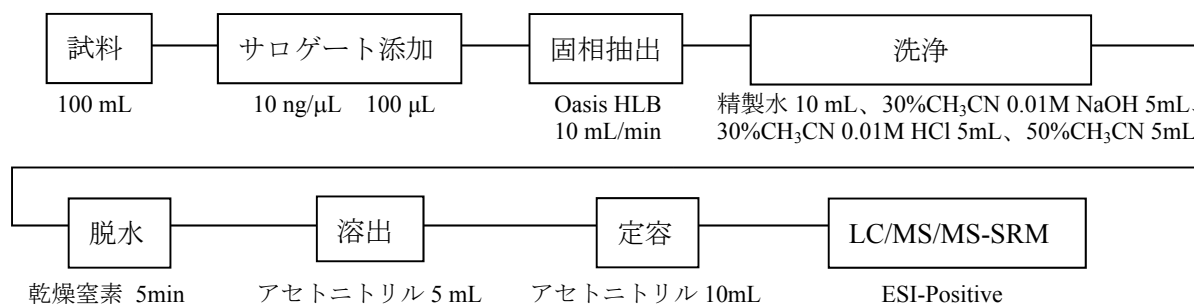


図1 分析法のフローチャート

し混合する。これを固相カートリッジ (HLB) に10mL/minの速さで通水し捕集する。固相カートリッジを水10mL, 30%アセトニトリル含有0.01mol/L水酸化ナトリウム水溶液5mL, 水5mL, 30%アセトニトリル含有0.01mol/L塩酸5mL, 水5mL, 50%アセトニトリル水溶液5mLの順に洗浄し, 乾燥窒素を5分間通気する。これをアセトニトリル5mLで溶出し, アセトニトリルで10mLに定容し, 試験液とする。なお, 懸濁物がある場合にはフィルターでろ過を行い, 試験液とする。試験液をLC/MS/MS-SRMにて分析する。

光に対して分解性 (異性体化) があるため, 操作はなるべく手早く暗めの部屋で行う。暗室を使用する必要はないが, ブラインドを下ろし直射日光を避ける, 必要以上の蛍光灯は点灯しない等の配慮が必要である。目安として, 照度500lux未満で1~2時間程度の作業の場合, 著しい分解は生じない。

3 結果及び考察

3.1 各種条件の検討結果

3.1.1 質量分析条件の検討

MS条件の検討を行った結果を図2に示す。各種条件を変化させ, イオン化の強度を測定したところ, 図に示すデータが得られ, これをもとに最適な条件を設定した。なお, 図には4-メチルベンジリデンカンファーとベンザルカンファーの代表的なイオンをそれぞれ3つ示している。

12種類のイオンを測定に用いることができ, 感度やブランクやバラつき等を考慮して, 最適なイオンを選択することが可能である。

3.1.2 移動相溶媒の検討

移動相溶媒の検討を行った結果を図3に示す。5mM程度の酢酸アンモニウムを入れることにより, 2.5倍程度感度がよく, また, 装置安定性等が良くなったため, 酢酸アンモニウムを入れた移動相を用いることとした。

3.1.3 前処理法の検討 (固相カートリッジ)

前処理法の検討を行った。各種の評価を実施し, 次のようなことがわかった。

- ① HLBとPLS-3ではHLBの方が10%弱程度回収率良好だが、マトリックスも多かった。
- ② 回収率は通液pHに依存せず、酸やアルカリでの洗浄が可能であった。
- ③ 50%アセトニトリルまでは保持され、同溶媒による洗浄が可能であった。

これらの結果をもとに、前処理法を決定した。

3.1.4 前処理法の検討（マトリックス効果）

前処理法の検討を行った。各種の評価を実施し、次のようなことがわかった。

- ① HLBとPLS-3どちらにおいても、20倍濃縮以上で負のマトリックス効果が見られた。また、移動相にバッファーがあった方が、マトリックス効果が抑えられた。
- ② 酸やアルカリや有機溶媒で洗浄することにより、マトリックスは除去されているものの、マトリックス効果の程度に大きな違いは見られなかった。
- ③ 酢酸アンモニウムバッファーの有無で、マトリックス効果が著しく異なる場合があった。
- ④ 汚水によっては、いくつかのモニターイオンで、妨害

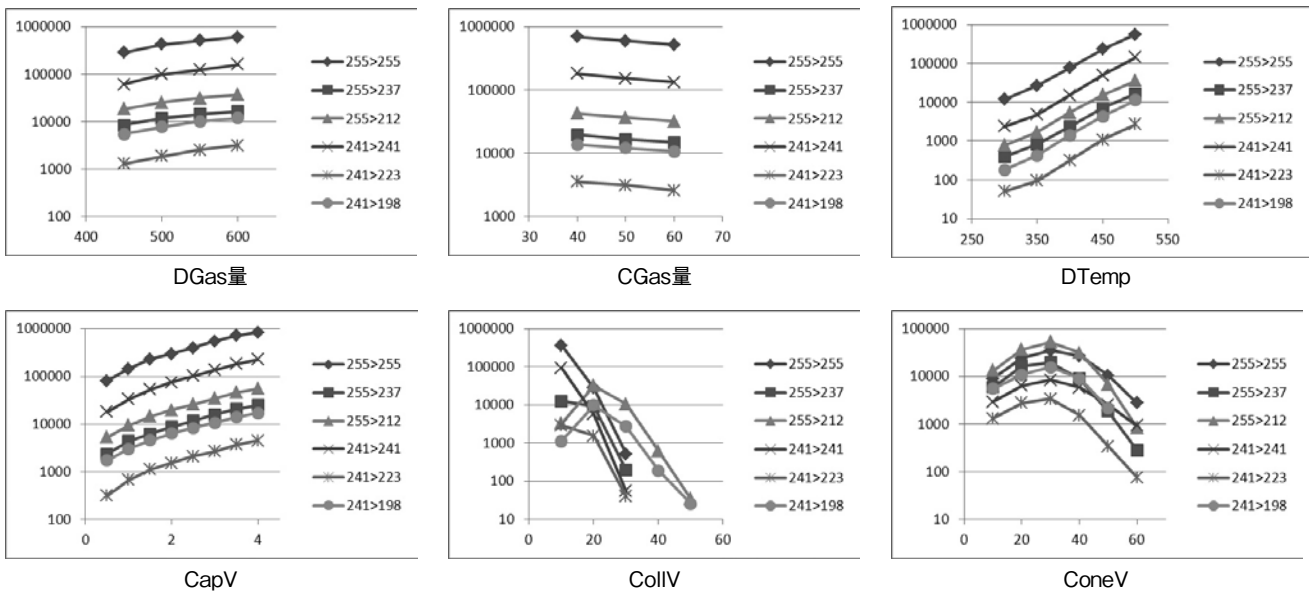


図2 質量分析条件の検討結果

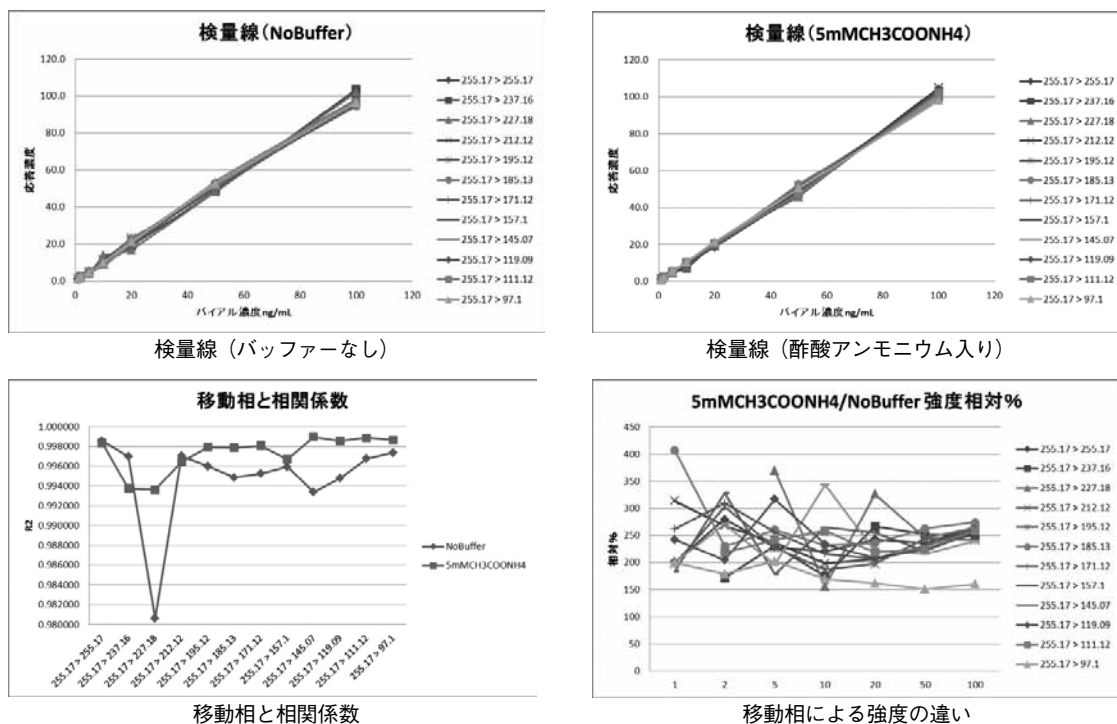
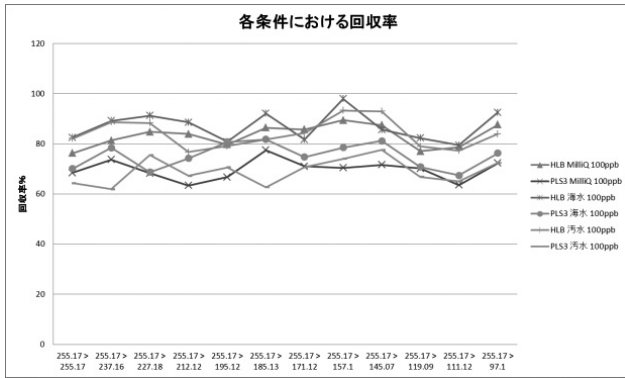
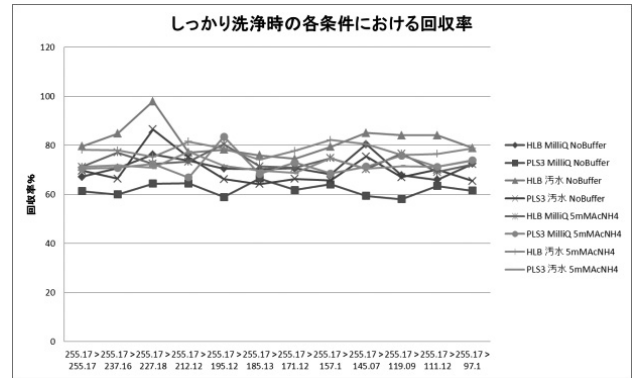


図3 移動相溶媒の検討結果

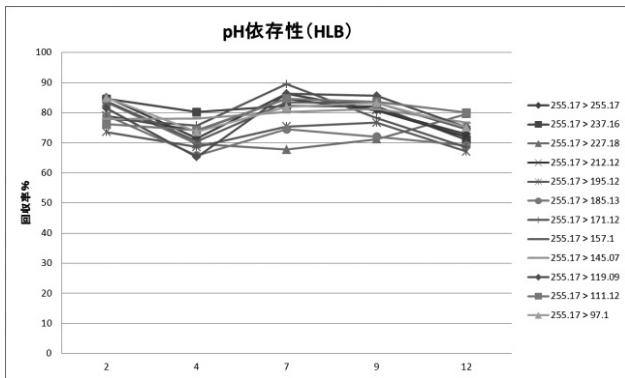


普通洗浄時の回収率

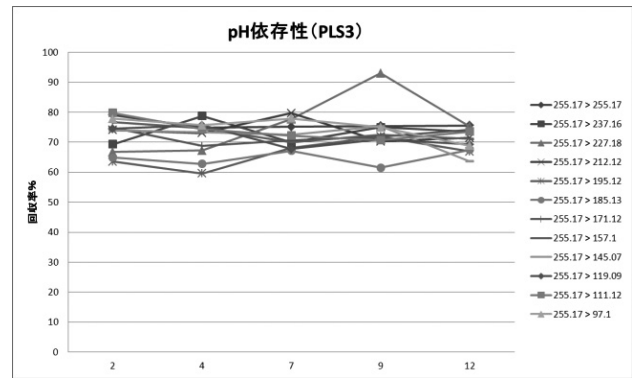
(普通洗浄は水のみ、しっかり洗浄は酸やアルカリや有機溶媒で洗浄。)



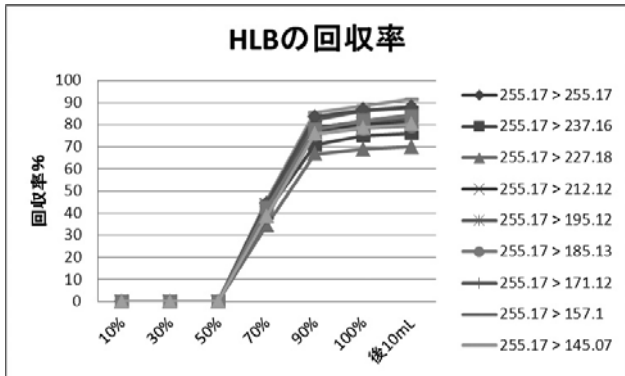
しっかり洗浄時の回収率



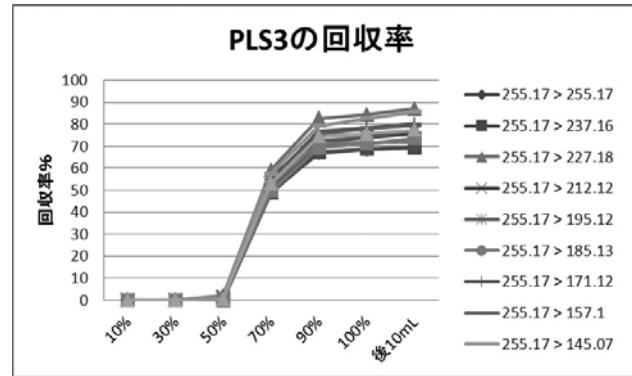
HLB使用時の通液pH依存性



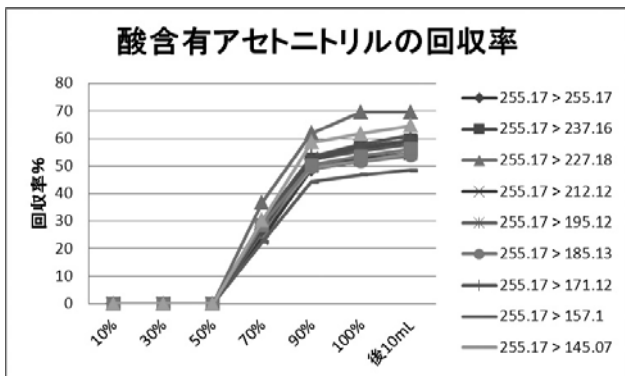
PLS-3使用時の通液pH依存性



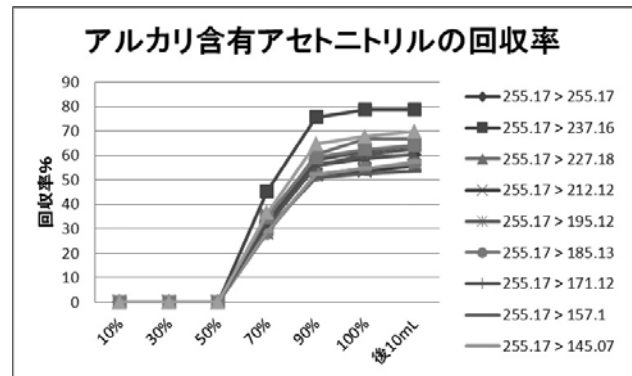
HLB使用時の積み上げ回収率



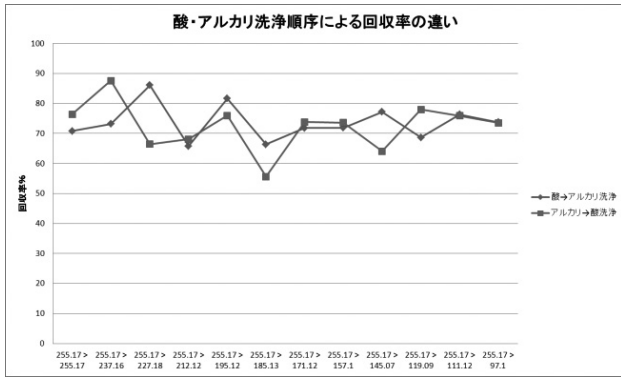
PLS-3使用時の積み上げ回収率



HLB酸洗浄時の積み上げ回収率

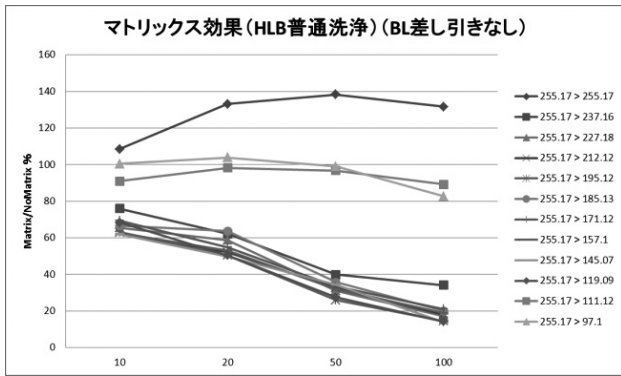


HLBアルカリ洗浄時の積み上げ回収率



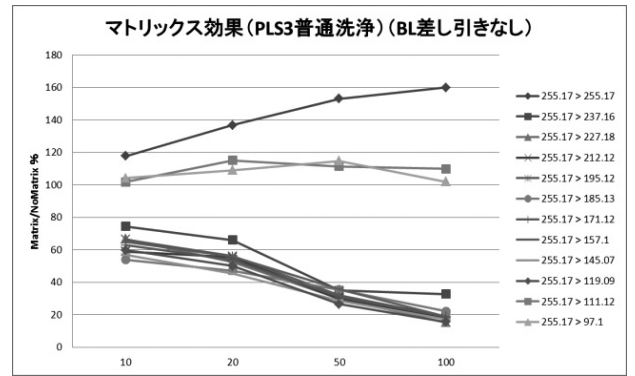
洗浄順序による回収率の違い

図4 前処理法の検討結果 (固相カートリッジ)

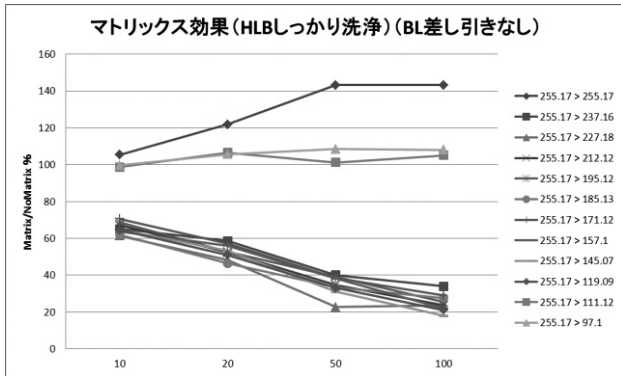


HLB使用時のマトリックス効果

(移動相にバッファーなし、酸やアルカリや有機溶媒での洗浄なし。)

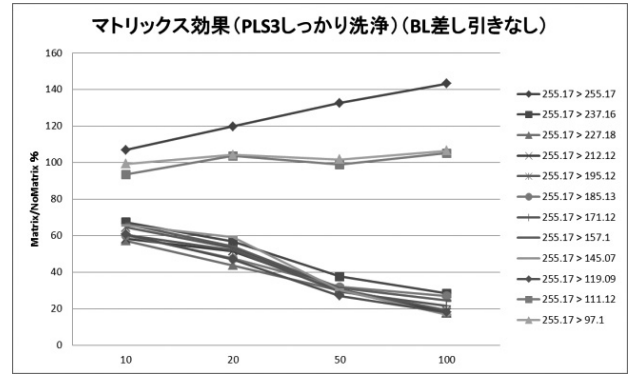


PLS-3使用時のマトリックス効果

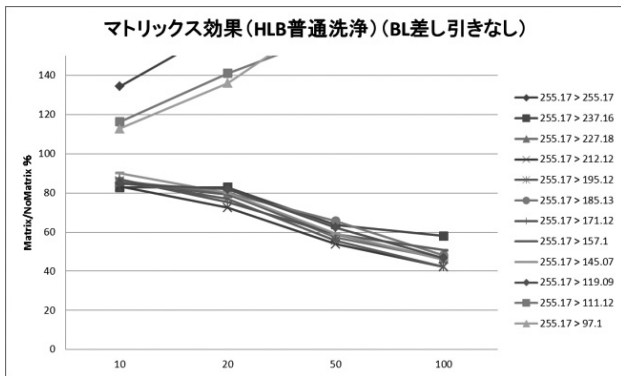


HLB使用時のマトリックス効果

(移動相にバッファーなし、酸やアルカリや有機溶媒での洗浄あり。)

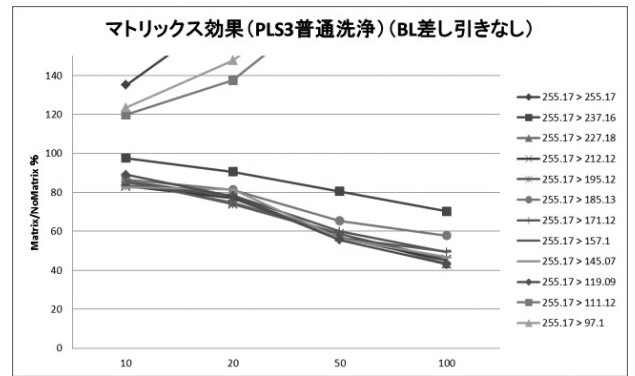


PLS-3使用時のマトリックス効果

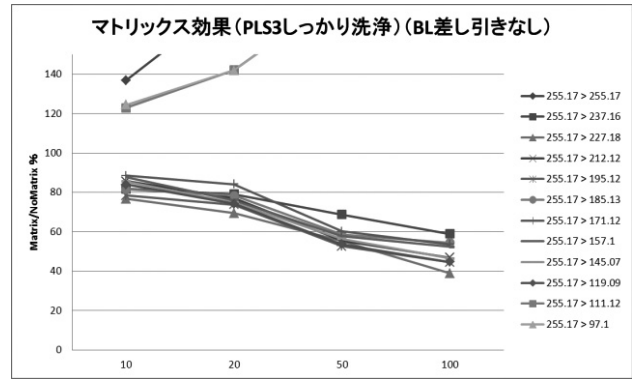
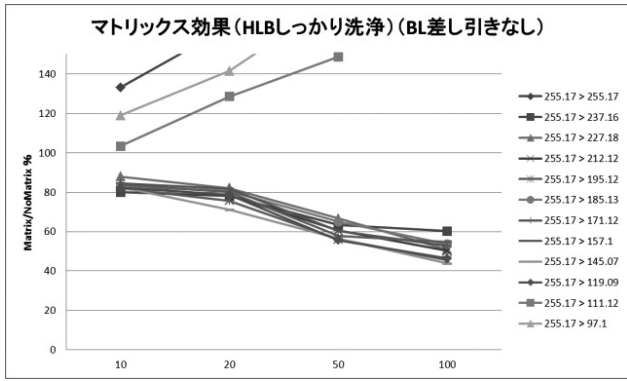


HLB使用時のマトリックス効果

(移動相にバッファーあり、酸やアルカリや有機溶媒での洗浄なし。)



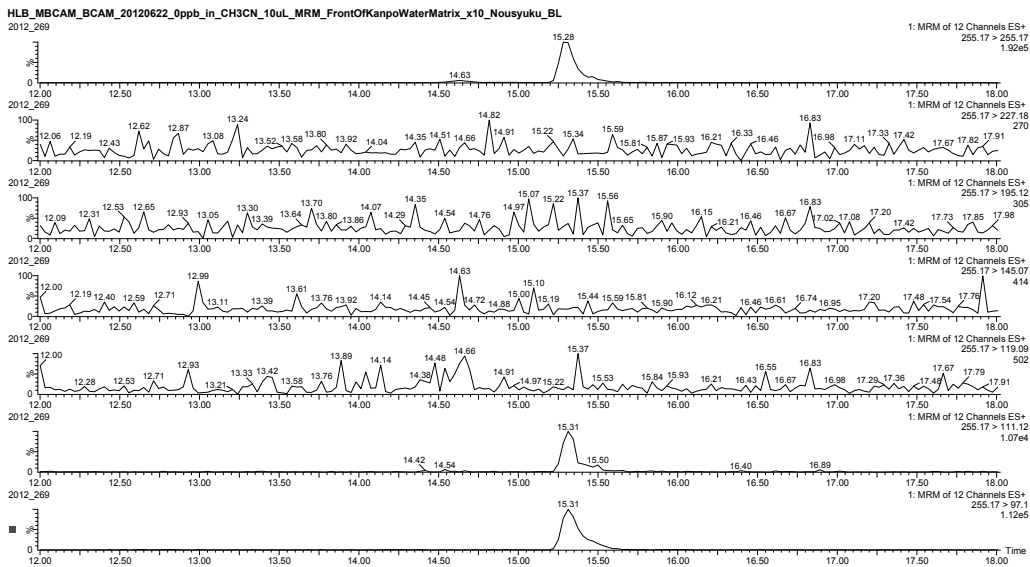
PLS-3使用時のマトリックス効果



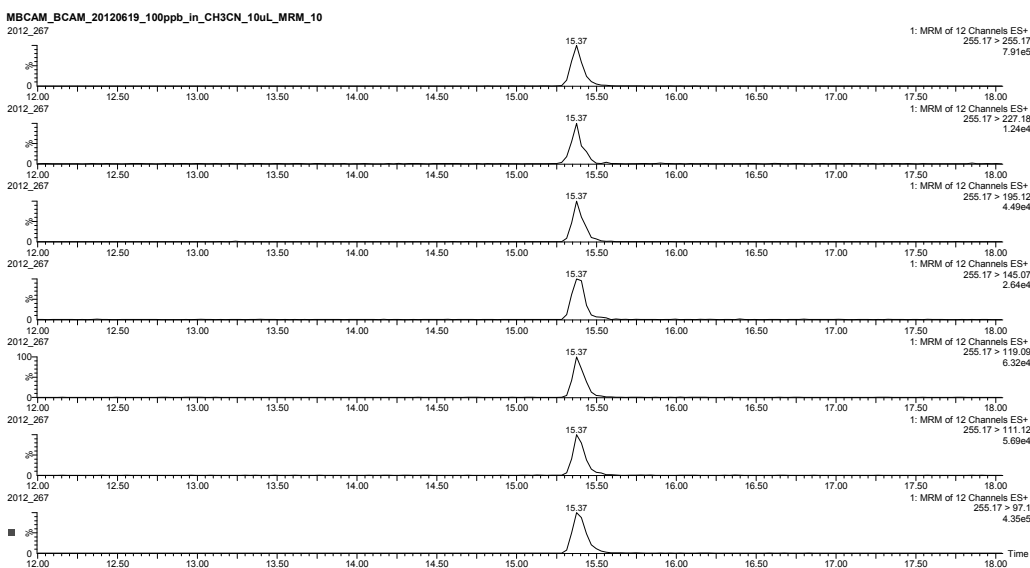
HLB使用時のマトリックス効果

PLS-3使用時のマトリックス効果

(移動相にバッファーあり、酸やアルカリや有機溶媒での洗浄あり。)



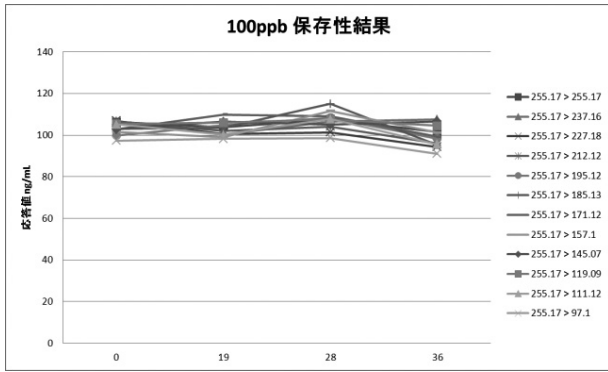
汚水でのブランク検出例



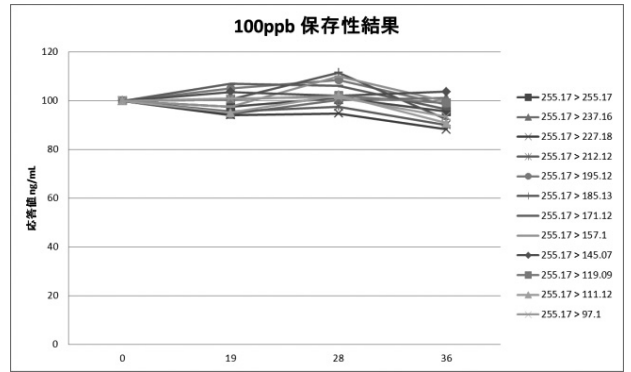
標準液

(12のモニターイオンのうち、3つにブランクが検出された例。図は7イオンを抜粋。)

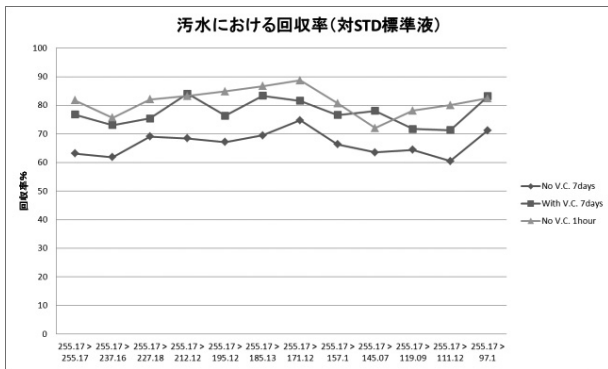
図5 前処理法の検討結果 (マトリックス効果)



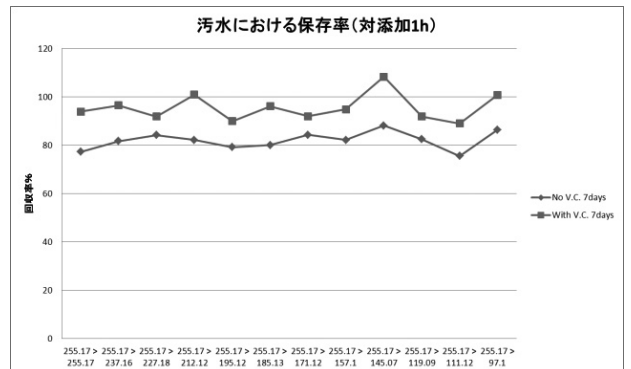
標準溶液の保存性



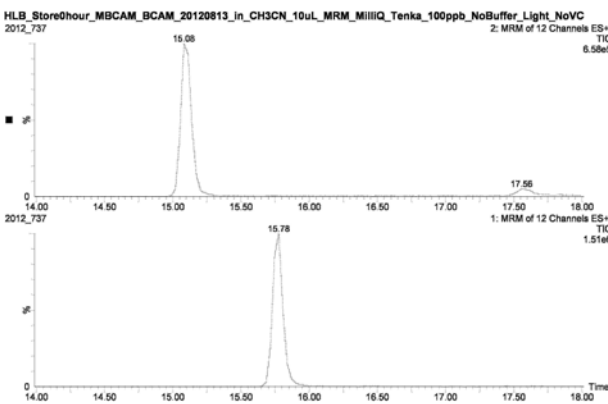
標準溶液の保存性 (0日を100%)



河川水 (汚水) での保存性

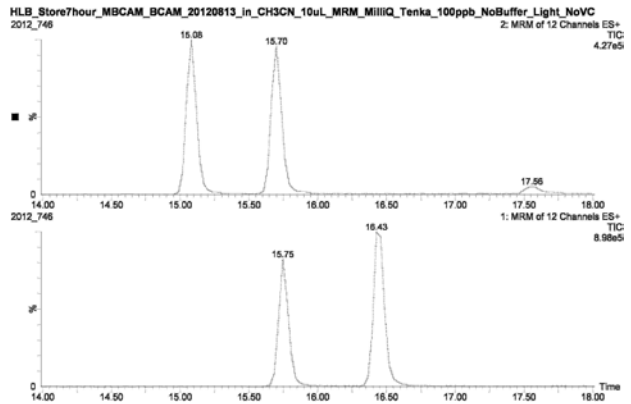


河川水での保存性 (対添加直後%)

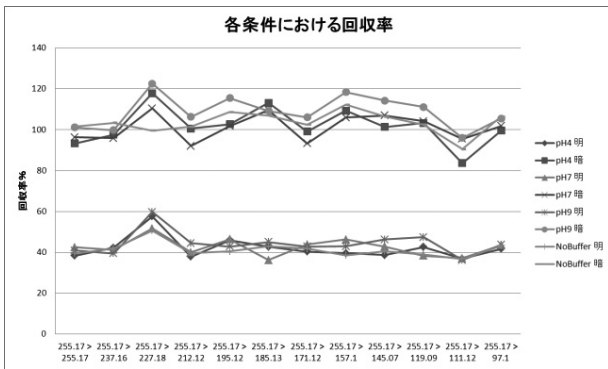


光照射前のクロマト

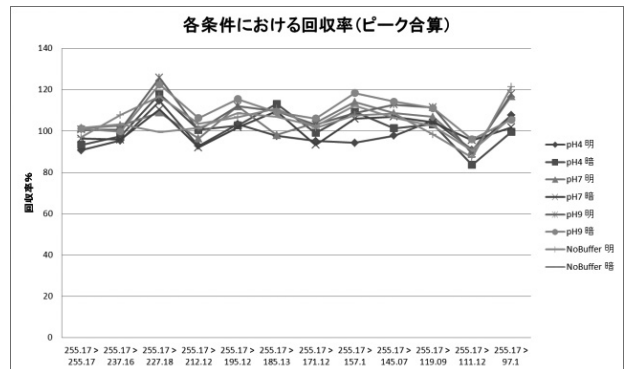
(上段はベンザルカンファー, 下段は4-メチルベンジリデンカンファー。)



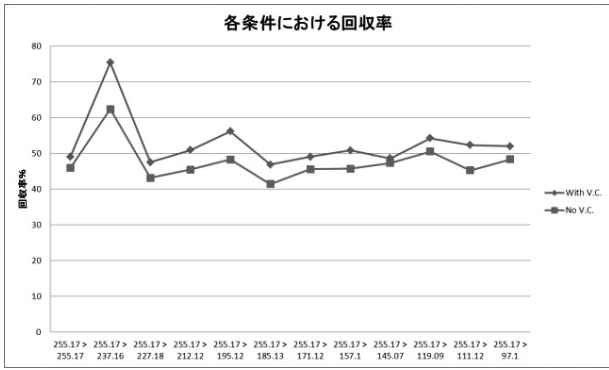
光照射 (7時間) 後のクロマト



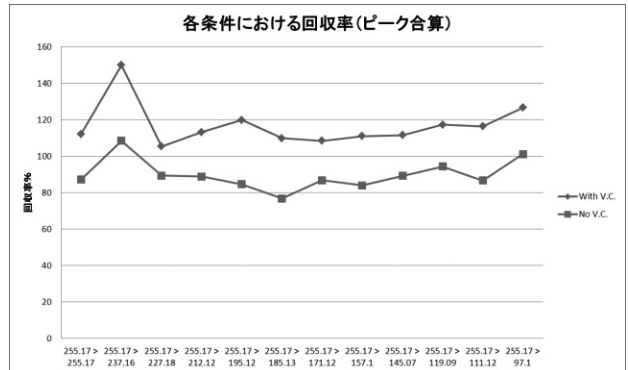
各pH条件での7日光照射



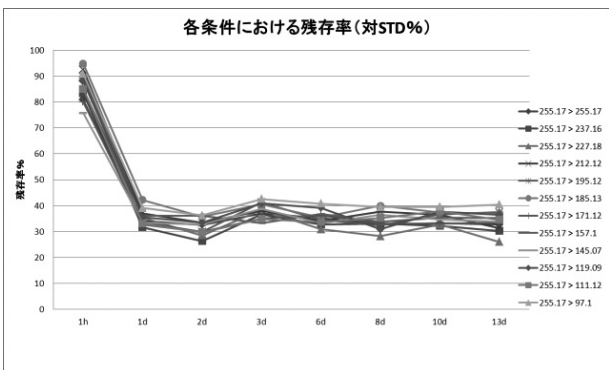
各pH条件での7日光照射 (合算)



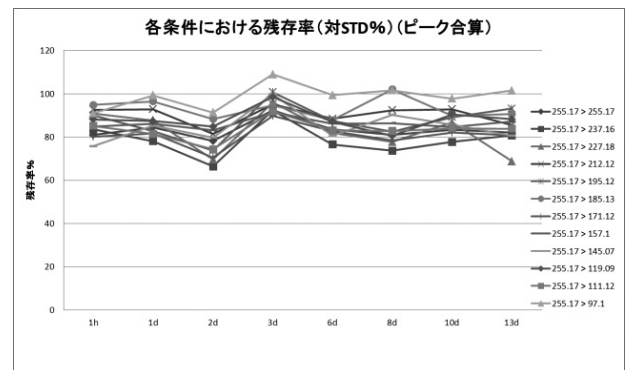
V.C.有無での7日照射



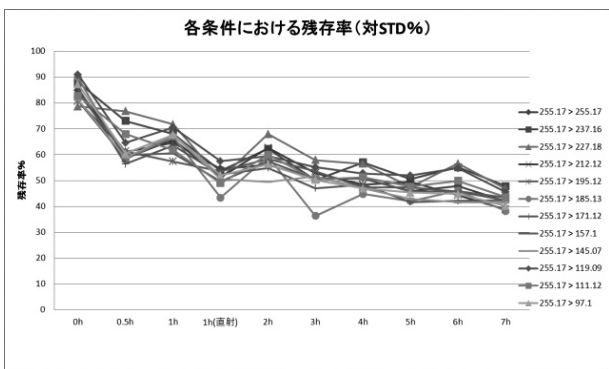
V.C.有無での7日照射 (合算)



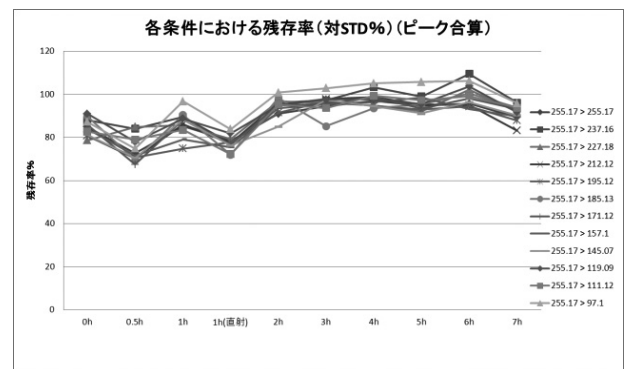
長期間照射時の残存率



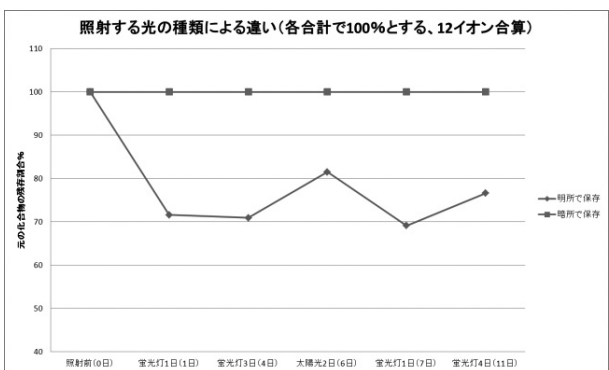
長期間照射時の残存率 (合算)



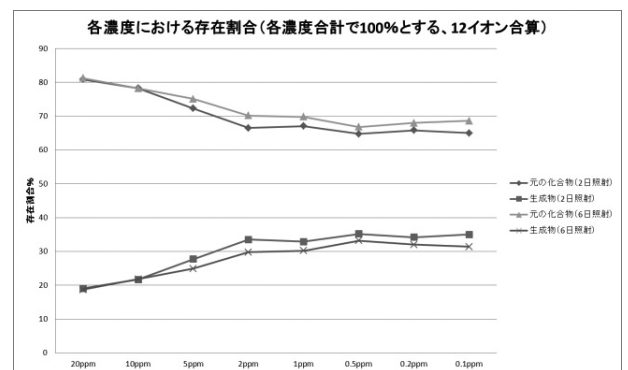
短期間照射時の残存率



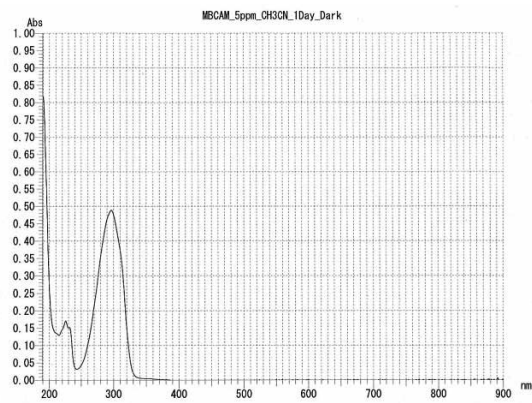
短期間照射時の残存率 (合算)



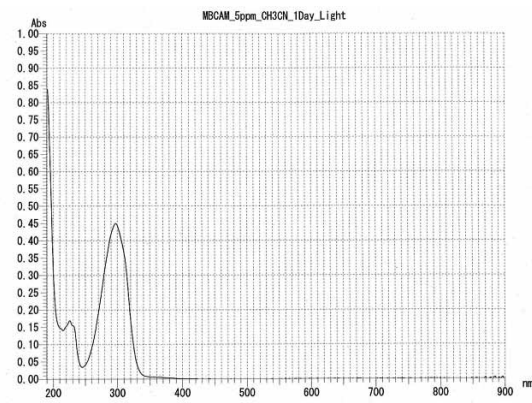
照射光と経過日数



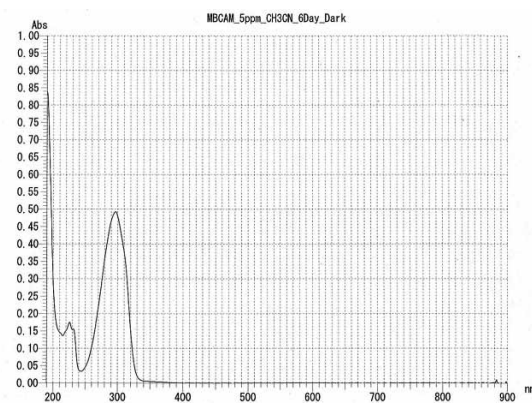
濃度と異性化の程度 (CH₃CN中)



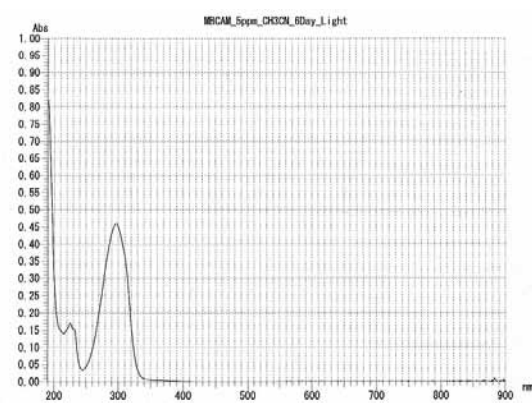
暗所1日経過の吸収スペクトル



明所1日経過の吸収スペクトル



暗所6日経過の吸収スペクトル



明所6日経過の吸収スペクトル

図6 保存性と分解性（光による構造異性体化）の検討結果

表1 添加回収試験結果

物質名	試料名	試料量 (mL)	添加量 (μg)	試験数	検出濃度 (μg/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	サロゲート回収率 (%)
4-メチルベンジルピペロン カンファー	河川水	100	無添加	1	ND	—	—	74.6
		100	1.00	5	9.23	92.3	6.8	81.7
	海水	100	無添加	1	ND	—	—	75.9
		100	1.00	5	9.31	93.1	7.3	81.3

表2 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 (μg/L)	1時間後の残存率(%)	7日後の残存率(%) ^{*1}	
					暗所	明所
4-メチルベンジルピペロン カンファー	5	2	10	97	100	51
	7	2	10	90	110	52
	9	2	10	99	93	49
4-メチルベンジルピペロン カンファー(ピーク合算)	5	2	10	(97) ^{*2}	(100)	108
	7	2	10	(90)	(110)	110
	9	2	10	(99)	(93)	102

*1 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。

*2 カッコは生成物のピークがなかったため、合算しても変わらなかったもの。

表3 保存性試験結果

物質名	試験対象	試料名	初期濃度 (ng/mL)	残存率(%)		
				9日後	15日後	84日後
4-メチルベンジリデン カンファー	試料	河川水	5	99	—	—
		河川水(V.C.有)	5	93	—	—
		海水	5	88	—	—
	粗抽出液	河川水	5	—	94	—
		海水	5	—	97	—
	標準液	標準液(低)	10	—	—	98
		標準液(高)	100	—	—	101

イオンが出ることがあった。

これらの結果をもとに、前処理法を決定した。

3.1.5 保存性と分解性（光による構造異性体化）の検討

保存性と分解性の検討を行ったところ次のようなことがわかった。

- ①暗所、冷蔵の有機溶媒中で1か月以上安定であった。
- ②暗所、冷蔵の汚水中では1週間以上安定に保存される。酸化防止剤（ビタミンC）の有無で、著しい違いは見られなかった。
- ③光に対して分解性（構造異性体化）があり、数時間の光で異性体化する。異性体化はpHには依存しなかった。酸化防止剤（ビタミンC）の有無で、異性体化に著しい違いは見られなかった。元化合物と異性体化生成物を足し合わせると、元化合物の初期濃度とほぼ一致した。
- ④照射光の種類（蛍光灯、太陽光）では異性化の程度に著しい違いは見られなかった。
- ⑤十分に光を照射すると、異性体化前と異性体化後の比は、濃度に応じて一定の割合となった後に安定する。
- ⑥UV領域の300nm付近に強い吸収があるが、可視領域には吸収はほぼなかった。光で異性体化しても吸収極大波長や吸収スペクトルの形に大きな変化は生じないが、異性化生成物はモル吸光係数が元の物質の2/3程度であった。

3.2 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表1に示す。添加回収試験には河川水は旭川の乙井手堰、海水は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2に示す。pHに対しては安定性が高いが、光で構造異性体化する。元の物質と生成物のピークを合算すると、ほぼ100%の残存率となった。

3.4 保存性試験結果

保存性試験結果を表3に示す。保存性は良好であった。河川水試料については、酸化防止剤（ビタミンC）を1g/L添加したものを合わせて確認したが、違いは見られなかった。

3.5 環境試料の分析結果

平成24年10月に採取した河川水（旭川乙井手堰）及び海水（水島沖）からは、対象物質は検出されなかった。定量下限は1.1 μg/Lであった。

4 まとめ

4-メチルベンジリデンカンファーの分析法を検討し、次の結果を得た。

- 1) 対象物質はESI Positive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。12種類のイオンを測定に用いることができ、感度やブランクやバラつき等を考慮して、最適なイオンを選択することができた。
- 2) 移動相溶媒に酢酸アンモニウム／アセトニトリルを用いると、良好な感度と装置安定性等を得ることができた。
- 3) 固相抽出による前処理方法を検討し、アルカリ、酸、有機溶媒の順に洗浄することで、クリーンアップ効果を持たせつつ、良好な回収率が得られた。
- 4) マトリックス効果が大きく、また試料の汚れの程度によっては妨害イオンがあることから、複数のイオンをモニターする等の注意が必要ことがわかった。
- 5) 添加回収試験結果は、河川水、海水ともに良好であった。
- 6) 分解性スクリーニング試験結果は、pHに対しては安定性が高いが、光で構造異性体化し、また元の物質と生成物のピークを合算すると、ほぼ100%の残存率となることがわかった。
- 7) 保存性試験結果は、保存性は良好であった。
- 8) 河川水（旭川乙井手堰）及び海水（水島沖）からは、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24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) 宮本道子，中村義昭，横山敏郎，伊藤弘一，寺島 潔，鈴木淳子，浜野朋子，萩野周三：医薬部外品および化粧品中の紫外線吸収剤の分析に関する研究（第2報）ビスエチルヘキシルオキシフェノールメトキシフェニルトリアジン，ホモサレートおよびメチルベンジリデンカンファを含む17成分同時分析法，東京都健康安全研究センター研究年報，60，97-102，2009
- 3) 松本比佐志，足立伸一，鈴木定彦：紫外線吸収剤及びその関連化合物によるエストロゲン様作用，薬学雑誌，125(8)，643-652，2005
- 4) Agilent technologies, Inc. Application Note : Agilent 1290 Infinity LC with Agilent Poroshell columns for simultaneous determination of eight organic UV filters in under two minutes, Publication Number 5990-6861EN, 2010 December 1, 2010
- 5) 横山敏郎，森謙一郎，中村義昭，寺島 潔，大貫奈穂美，宮本道子，萩野周三，齊藤和夫：医薬部外品及び化粧品中の紫外線吸収剤同時分析法についての改良，東京都健康安全研究センター研究年報，57，145-150，2006

【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を用いた水質中脂肪酸メチルエステル (FAME) 等の多成分分析法の検討—

Study for Simultaneous Analysis Method of Fatty acid methyl ester
(FAME) in Water by GC/MS

吉岡敏行, 山辺真一, 大月史彦, 新 和大 (水質科)

Toshiyuki Yoshioka, Shinichi Yamabe, Fumihiko Otsuki, kazuhiko Atarashi
(Department of Water)

要 旨

「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」において生態影響の観点から優先評価物質に指定されたメチル＝ドデカノアートを含む脂肪酸メチルエステル (FAME) 等14物質の水質分析法を検討した。対象物質は加水分解性があり、試料の保存ができなかったことから、試料採取時に現場であらかじめ、ヘキサン抽出を行う方法とした。抽出液はシリカゲルカラムでクリーンアップし、GC/MS-SIM測定する方法とした。検討の結果、分析法の検出下限値は0.26～1.9ng/L、定量下限値は0.66～4.9ng/Lとなり、高感度な多成分分析方法が確立できた。

[キーワード：脂肪酸メチルエステル, 加水分解, GC/MS, 多成分分析]

[Key words : Fatty acid methyl ester, Hydrolysis, 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を開発し、環境中の濃度の把握に努めている。今回、平成24年度化学物質環境実態調査でメチル＝ドデカノアート (別名、ラウリン酸メチル) を含む脂肪酸メチルエステル等の水質分析法について検討した。

文献調査の結果、脂肪酸メチルエステル類の分析は、食品やバイオディーゼル燃料中の脂肪酸類をメチル化して分析する事例¹⁾はあったが、環境水中の脂肪酸メチルエステル類の分析方法はほとんど情報が得られなかった。GC/MS測定の事例は数多くあり、脂肪酸メチルエステル専用の異性体分離可能なGCカラム等も販売されている²⁾。

対象物質の異性体と同族体の合計14物質について、抽出は対象物質の物性等を考慮し、固相抽出及び液液抽出を検討した。また、クリーンアップとしてシリカゲルカートリッジカラムとグラファイトカーボンブラックによる方法を検討し、高感度多成分分析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 試薬

ラウリン酸メチル：和光純薬工業製、デカン酸メチル：和光純薬工業製、デカン酸イソプロピル：東京化成工業

製、n-オクタン酸イソアミル：東京化成工業製、n-ウンデカン酸メチル：東京化成工業製、n-オクタン酸アミル：東京化成工業製、デカン酸プロピル：東京化成工業製、ウンデカン酸エチル：東京化成工業製、ミリスチン酸メチル：和光純薬工業製、パルミチン酸メチル：和光純薬工業製、ステアリン酸メチル：和光純薬工業製、アラキジン酸メチル：和光純薬工業製、ベヘン酸メチル：和光純薬工業製、テトラコ酸メチル：MP Biomedicals製、ナフタレン-d₈：環境分析用 和光純薬工業製、ポリエチレングリコール200：東京化成工業製、ヘキサン、アセトン：残留農薬・PCB試験用 (5000倍濃縮品) 和光純薬工業製、無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用 関東化学製、LC-Si (1g/6mL) : Glass Tube w/PTFE Frits SUPELCO製、ワコーゲル (R) C-200 : 和光純薬工業製、スベルクリンENVI-Carb (25mg/6mL) : SUPELCO製、精製水：Milli-Q Advantage+EDE-Pak Merck Millipore製

2.2 GC/MSの測定条件

今回検討した対象物質を表1に、GC/MSの測定条件を表2に、モニターイオンを表3に示す。対象物質の定量は、保持時間の近いシリンジスパイク内標準を用いた。

2.3 前処理方法の検討

今回検討した分析フローを図1に示す。抽出方法は、液液抽出とディスク型固相抽出を比較検討した。また、クリーンアップは、シリカゲルについて市販カートリッジカラムと自家調製した5%含水シリカゲルカラム及び市販グラファイト

表1 対象物質

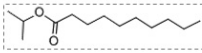

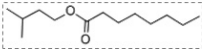

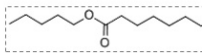
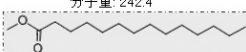
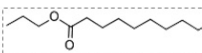

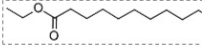

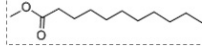



1 デカン酸イソプロピル 分子式: C ₁₃ H ₂₆ O ₂ 分子量: 214.34		1a デカン酸メチル C ₁₁ H ₂₂ O ₂ 分子量: 186.29	
2 n-オクタン酸 イソアミル 分子式: C ₁₃ H ₂₆ O ₂ 分子量: 214.34		2a n-ウンデカン酸 メチル C ₁₂ H ₂₄ O ₂ 分子量: 200.32	
3 n-オクタン酸アミル 分子式: C ₁₃ H ₂₆ O ₂ 分子量: 214.34		3a ミリスチン酸メチル C ₁₆ H ₃₀ O ₂ 分子量: 242.4	
4 デカン酸プロピル 分子式: C ₁₃ H ₂₆ O ₂ 分子量: 214.34		4a パルミチン酸メチル C ₁₇ H ₃₄ O ₂ 分子量: 270.45	
5 ウンデカン酸エチル 分子式: C ₁₃ H ₂₆ O ₂ 分子量: 214.34		5a ステアリン酸メチル C ₁₈ H ₃₆ O ₂ 分子量: 298.5	
6 ラウリン酸メチル 分子式: C ₁₃ H ₂₆ O ₂ 分子量: 214.34		6a アラキジン酸メチル C ₂₁ H ₄₂ O ₂ 分子量: 326.56	
		7a ベヘン酸メチル C ₂₃ H ₄₆ O ₂ 分子量: 354.61	
		8a テトラコ酸メチル C ₂₅ H ₅₀ O ₂ 分子量: 382.66	

表2 GC/MSの測定条件

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

表3 モニターイオン

	保持時間	定量イオン(Q)	参照イオン(I)
naphthalene-d ₈	0:10:19	136	-
acenaphthene-d ₁₀	0:16:35	164	-
phenanthrene-d ₁₀	0:25:53	188	-
fluoranthene-d ₁₀	0:32:27	212	-
デカン酸メチル	0:08:22	143	74
デカン酸イソプロピル	0:08:49	173	155
n-オクタン酸イソアミル	0:09:12	145	127
ウンデカン酸メチル	0:09:44	157	143
n-オクタン酸アミル	0:09:56	145	127
デカン酸プロピル	0:10:06	173	155
n-ウンデカン酸エチル	0:10:21	214	101
ラウリン酸メチル	0:11:17	214	171
ミリスチン酸メチル	0:14:45	242	199
パルミチン酸メチル	0:18:22	270	227
ステアリン酸メチル	0:21:52	298	143
アラキジン酸メチル	0:25:11	326	283
ベヘン酸メチル	0:28:18	354	143
テトラコ酸メチル	0:31:13	382	143

カーボンカートリッジカラムについて比較検討した。

5%含水シリカゲルの調製は、シリカゲルを130℃で一晩(約16時間程度)加熱後、透明すりあわせ共栓付き三角フラスコに入れ、密栓して室温まで放冷し、シリカゲル95gに対して精製水5mLを滴下した。密栓し、発熱が終了するまで、静かに混合し、その後、更に振とう器で約1時間振とうし、乾燥剤としてシリカゲルを入れたデシケーター中で1日以上放置した。内径1cmのガラスカラムに5%含水シリカゲル1gを、ヘキサンを用いて湿式充填し、この上部に無水硫酸ナトリウムを約1cm積層したものを使用した。

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)」³⁾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の試料水を作成し、対象物質の濃度が0.2μg/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0.1μg/Lになるように添加し、添加1時間後及び1日後、4日後、7日後(冷暗所に保存)にヘキサン抽出、シリカゲルクリーンアップを行い、GC/MSで測定した。

2.5 装置検出下限値及び分析法の検出下限値と定量下限値

装置検出下限値(IDL)及び測定方法の検出下限値

(MDL)と定量下限値(MQL)は、「化学物質環境汚染実態調査の手引き(平成20年度版)」³⁾に従って実施した。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、河川水1Lに標準物質5ngを添加した試料を7個作成し、分析フローに従い前処理を実施した後、GC/MSで測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。

2.6 添加回収試験

河川水は、旭川(乙井手堰)の水質試料1Lに一定量の標準物質(5~25ng)を添加し、海水は水島沖の水質試料1Lに一定量の標準物質(5~25ng)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

脂肪酸メチルエステル類のGC/MS測定にはWAX系カラムが使用されている例²⁾が多く見受けられることから、HP-INNOWAX(30m)を用いて対象物質の標準品を測定したところ、図2に示すように14物質が分離したため、以後このカラムで測定することとした。

対象物質の検量線を図3に示す。いずれの物質も2~500ng/mLの濃度範囲(シリンジスパイクとの濃度比で0.1~25の範囲)において、R²が0.996以上と良好な検量線が作成できた。

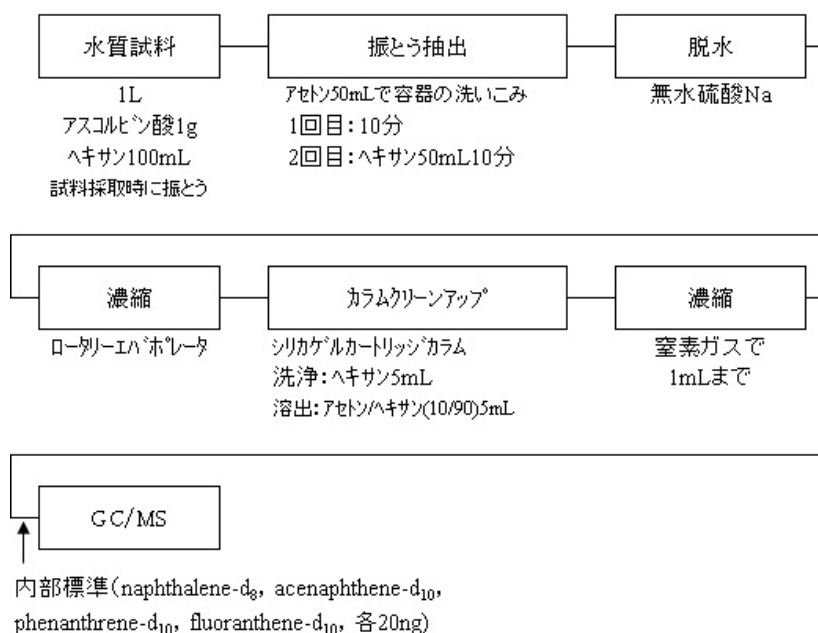


図1 分析フロー

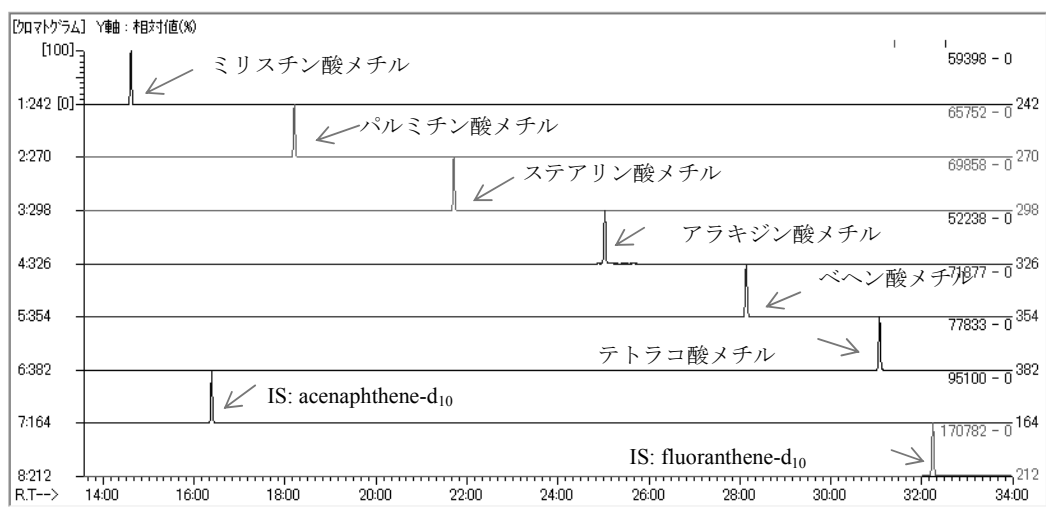
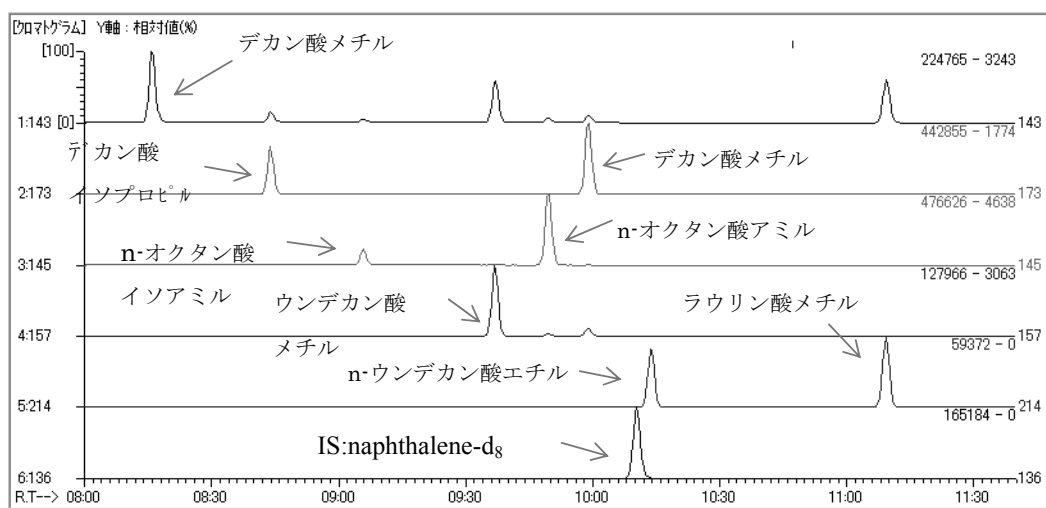
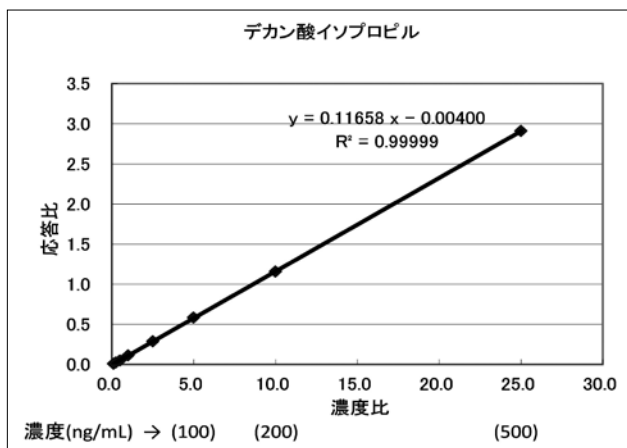
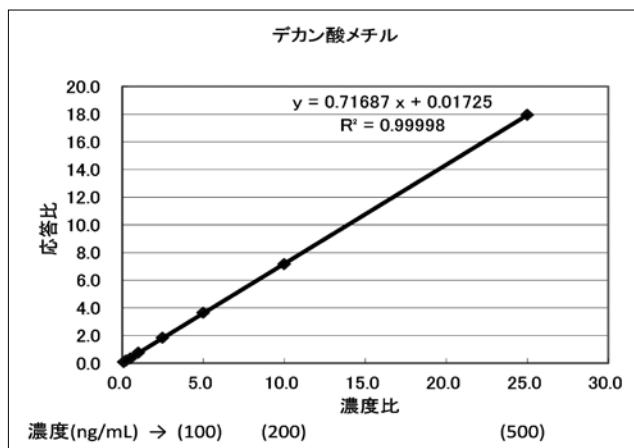
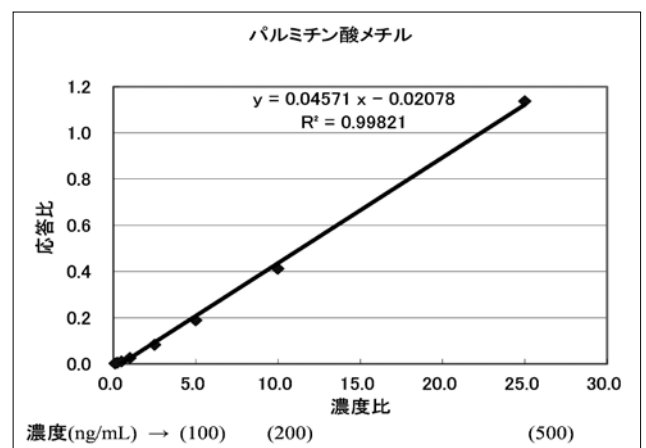
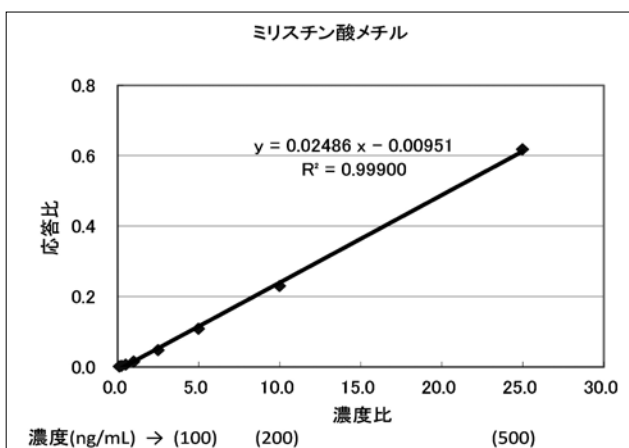
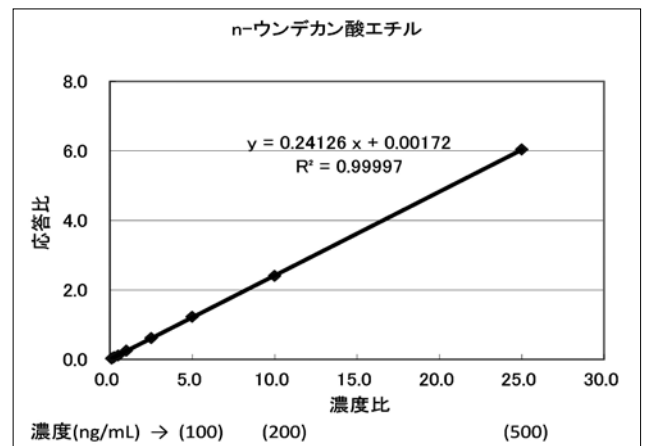
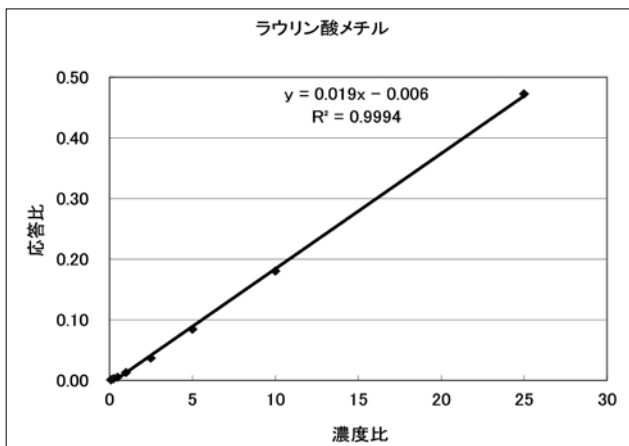
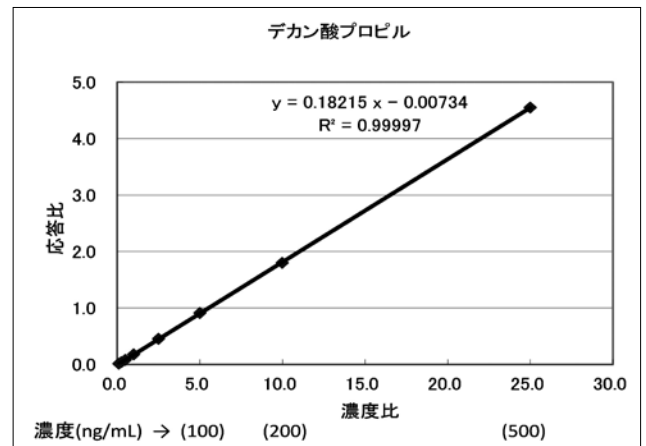
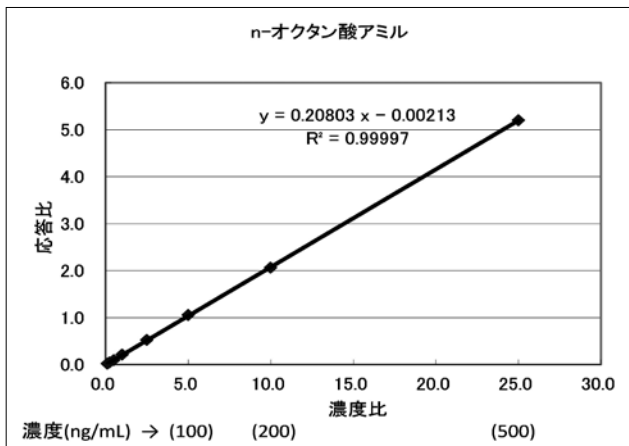
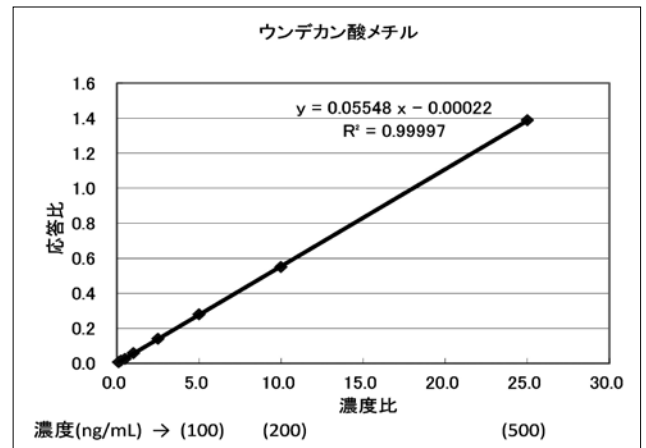
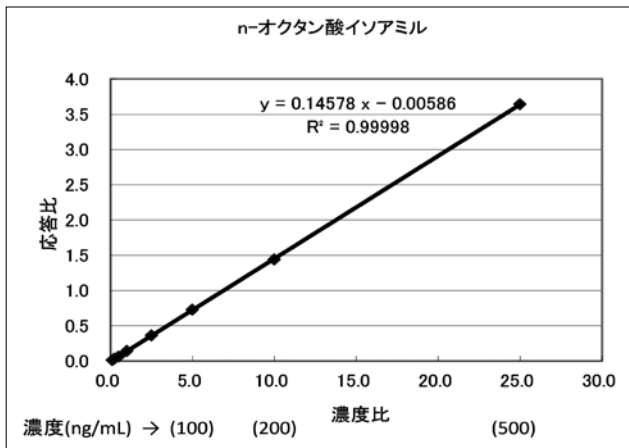


図2 標準物質のクロマトグラム





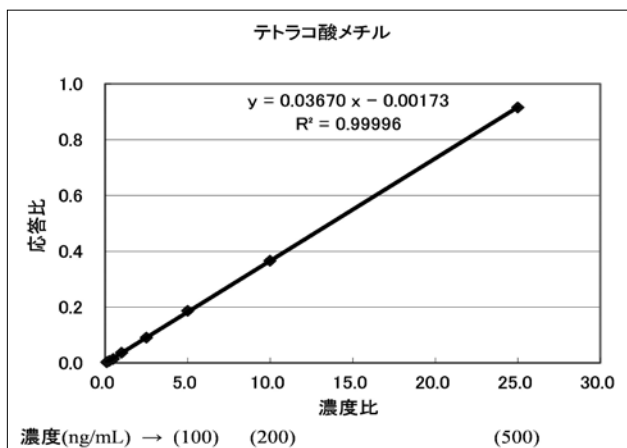
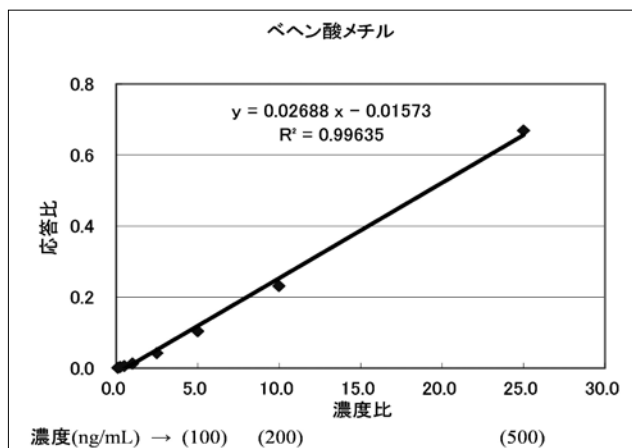
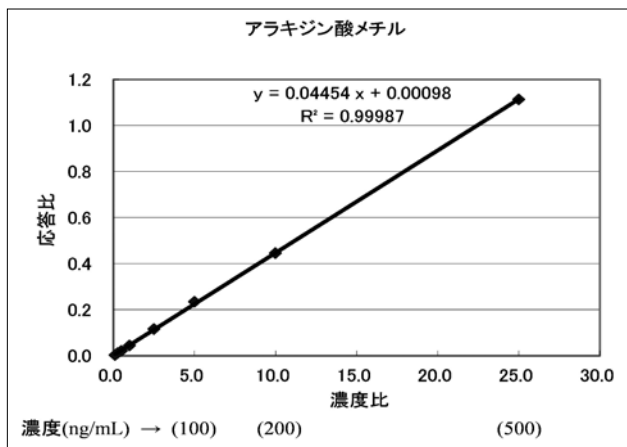
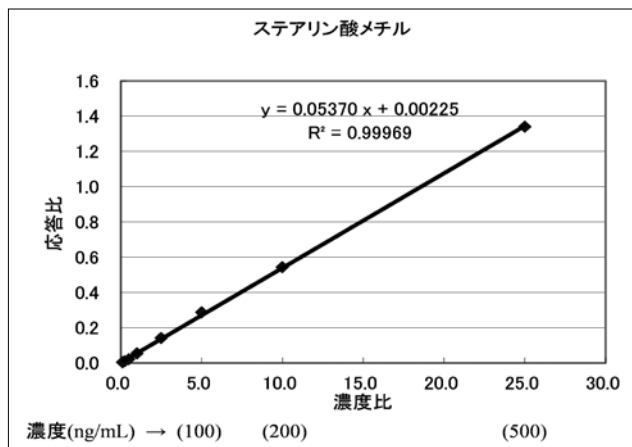


図3 検量線

マトリックスの影響を検討したところ、ラウリン酸メチル等は、正のマトリックス効果⁴⁾と考えられる測定値が異常に高くなる傾向があった。その対策としてPEG200の添加を検討した。クロマトグラムを図4に、GC/MSへの注入順の面積値の変動を図5に示す。河川抽出液に標準物質5ngを添加した試料は、標準物質5ngの面積値より約1.6倍程度大きくなった。標準物質にPEG200を0 μg, 4 μg, 10 μg, 20 μg, 50 μg添加し、面積値を比較したところ、PEG200を20 μg~50 μg添加した場合に面積値がほぼ一定となった。なお、PEG添加標準液の後にPEG無添加標準液を測定すると面積値はほぼ同じであったことから、注入順番によってもマトリックス効果を低減できる可能性があった。

3.2 抽出方法及びクリーンアップの検討結果

精製水1Lに標準物質40ngを添加し、アセトン50mLとアスコルビン酸1gの添加の有無の条件での、ヘキサン及びジクロロメタンによる液液抽出率を表4に示す。アセトンとアスコルビン酸を添加し、ヘキサン抽出した場合が最も安定した回収率が得られた

精製水0.5Lにアスコルビン酸0.5gと標準物質50ngを添加した際の、ディスク型固相カートリッジの抽出率を表5に示す。固相ディスクはメタノール、アセトン、精製水でコ

ンディショニング後、試料水0.5Lを負荷し、洗浄、通気脱水後、ヘキサンで溶出、脱水、濃縮した。試料を入れていたガラス容器はヘキサンで洗い込み、脱水、濃縮した。ろ液はヘキサン抽出し、脱水、濃縮した。固相ディスク抽出は液液抽出と比較して若干、回収率が低く、ガラス容器への吸着が見られることから、採取した試料は、全量を抽出する必要があると考えられた。また、固相ディスクの種類によってはステアリン酸メチルの汚染が見られたため、最終的には液液抽出を採用した。

試料採取瓶を手で振とうした際のヘキサン抽出率を表6に示す。ねじ口ガラス瓶に河川水1Lと標準物質50ng及びアスコルビン酸1gを添加し、十分振とうしたのち、ヘキサン100 mLを加え、所定の時間だけ手で激しく振り混ぜヘキサン層を分取し、脱水、濃縮した。ラウリン酸メチルは30秒間、ヘキサンと試料水を激しく振とうすれば抽出率が80%以上であった。同時分析物質のなかには2分間の振とうでは60%程度の抽出率しか得られない物質もあり、同族体のうち炭素数が長くなるほど抽出率が低下する傾向があった。しかし、これらの物質は他の物質と比較して分解し難いことから、試料採取時にすべてが抽出されていなくても問題がないと考えられた。

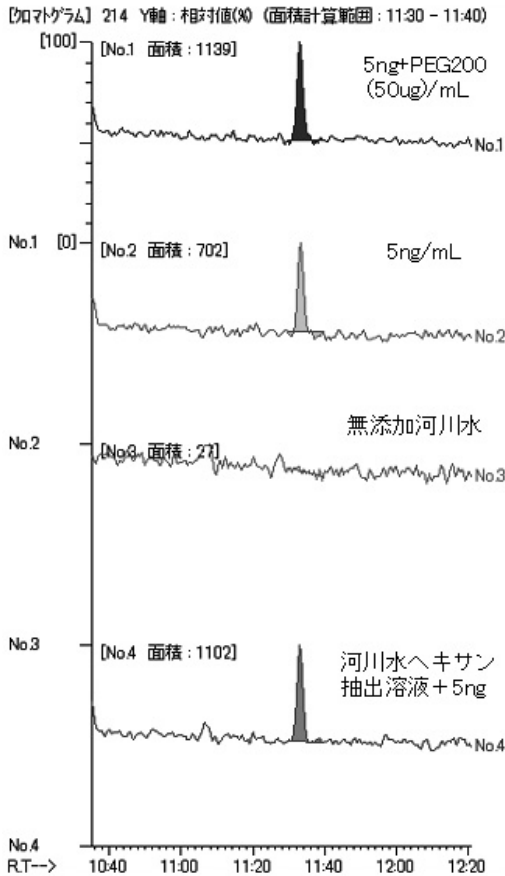


図4 ラウリン酸メチルのマトリックス効果

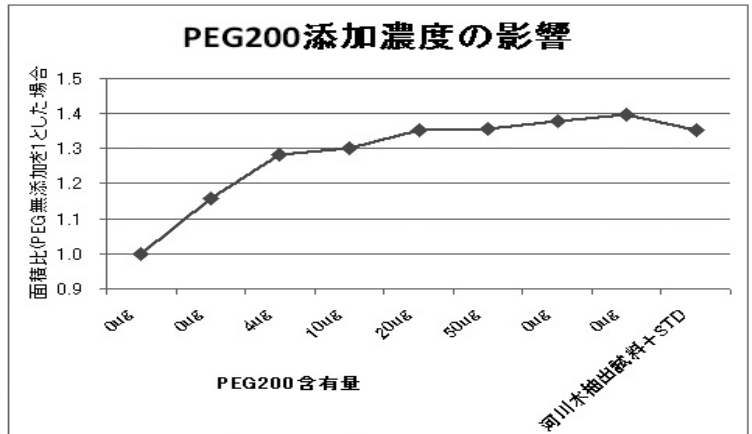


図5 PEG添加濃度の違いによる面積値の変動

表4 ヘキサン及びジクロロメタンによる液液抽出率 (%)

物質名	ヘキサン抽出			ジクロロメタン抽出		
	アセトン 添加	アセトン 添加	-	アセトン 添加	アセトン 添加	-
	アスコルビン酸 添加	-	-	アスコルビン酸 添加	-	-
ラウリン酸メチル	99	101	100	98	90	86
デカン酸イソプロピル	92	86	88	84	68	69
n-オクタ酸イソアミル	90	92	86	80	66	68
n-オクタ酸アミル	99	96	88	92	82	69
デカン酸プロピル	94	89	88	88	68	70
n-ウンデカン酸エチル	92	87	89	86	70	73
デカン酸メチル	92	88	89	86	71	72
ウンデカン酸メチル	92	86	85	89	71	72
ミリスチン酸メチル	94	83	91	94	75	86
パルミチン酸メチル	99	90	94	98	88	94
ステアリン酸メチル	97	88	92	105	92	99
アラキジン酸メチル	97	91	96	98	95	96
ベヘン酸メチル	99	97	96	104	102	102
テトラコ酸メチル	100	99	96	103	101	102

表5 ディスク型固相抽出法の抽出率 (%)

物質名	SDB-XC			SDB-XD			C18FF		
	ヘキサン 溶出	ガラス容器	ろ液	ヘキサン 溶出	ガラス容器	ろ液	ヘキサン 溶出	ガラス容器	ろ液
ラウリン酸メチル	77	8	0	77	7	0	55	6	0
デカン酸イソプロピル	56	17	0	60	18	0	48	20	0
n-オクタ酸イソアミル	60	23	0	72	14	0	55	19	0
n-オクタ酸アミル	60	12	0	71	14	0	51	16	0
デカン酸プロピル	60	21	0	70	17	0	53	19	0
n-ウンデカン酸エチル	57	18	0	63	16	0	50	20	0
デカン酸メチル	63	21	1	69	19	2	52	22	2
ウンデカン酸メチル	49	13	0	57	10	0	42	12	0
ミリスチン酸メチル	43	16	0	54	13	0	40	15	0
パルミチン酸メチル	68	47	1	112	19	1	55	9	3
ステアリン酸メチル	117	172	0	204	76	6	76	12	19
アラキジン酸メチル	76	5	0	88	2	0	62	0	11
ベヘン酸メチル	70	3	0	83	1	0	55	1	6
テトラコ酸メチル	69	6	0	91	3	1	52	2	6

表6 試料採取瓶を手で振とうした際のヘキサン抽出率 (%)

物質名	ヘキサン抽出(1回目)			ヘキサン抽出(2回目)		
	30秒	1分	2分	30秒	1分	2分
ラウリン酸メチル	83	88	84	2	0	1
デカン酸イソプロピル	97	92	92	1	0	0
n-オクタ酸イソアミル	89	95	92	0	0	0
n-オクタ酸アミル	89	95	92	0	0	0
デカン酸プロピル	85	87	88	3	0	0
n-ウンデカン酸エチル	92	95	93	6	5	4
デカン酸メチル	97	92	92	1	0	0
ウンデカン酸メチル	85	87	88	3	0	0
ミリスチン酸メチル	75	79	79	4	4	3
パルミチン酸メチル	72	78	88	7	7	6
ステアリン酸メチル	67	80	87	17	16	16
アラキジン酸メチル	71	74	84	12	15	8
ベヘン酸メチル	57	63	73	7	7	5
テトラコ酸メチル	47	55	64	8	7	4

市販シリカゲルカートリッジカラム (SUPELCO LC-Si (1 g)) と自家調製した5%含水シリカゲル (1 g) の溶出パターンを表7に示す。市販カートリッジカラムにはメーカーやロットによってラウリン酸メチルやパルミチン酸メチル、ステアリン酸メチルが含まれている場合があるのでアセトン洗浄等で除去できるか事前に確認する必要があった。

Supelclean ENVI-Carb (250mg/6 mL) の溶出パターンを表8に示す。ステアリン酸メチルは、ENVI-Carbをアセトンで十分洗浄しても操作ブランクが検出された。アラキジン酸メチルより炭素数が多い物質は、トルエンを流さないと溶出しなかった。シリカゲルクリーンアップを実施しても着色があり、測定に支障がある場合には、表7のラウリン酸メチルからパルミチン酸メチルまでの10物質は、ENVI-Carbとシリカゲルカートリッジカラムを連結して使用し、試料負荷、ヘキサン洗浄を行った後、ENVI-Carbは取り外し、シリカゲルカートリッジカラムをアセトン/ヘキサン (10:90) 5 mLで溶出すれば着色成分は除去可能で

あった。なお、通常的环境水の場合は、クリーンアップはシリカゲルだけで十分であると考えられた。

3.3 操作ブランク

操作ブランクのクロマトグラムを図6に示す。操作ブランクが検出されたのは、ミリスチン酸メチルとパルミチン酸メチル、ステアリン酸メチルであった。ミリスチン酸メチルは5%含水シリカゲルの使用により操作ブランクを低減することができるが、パルミチン酸メチルとステアリン酸メチルの操作ブランクはクリーンアップ工程以外からの検出が疑われるが、原因の特定はできていないが、特に、ステアリン酸メチルは操作ブランクを一定にコントロールすることが比較的困難であり、更なる検討が必要と考えられた。

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9に示す。7日後にpH7とpH9ではほとんど100%分解した物質もあった。pH5では、ある程度分解性が押さえられる傾向が確認された。

表7 SUPELCO LC-Si (1 g) と5%含水シリカゲル (1 g) の溶出パターン (%)

物質名	LC-Si(1g)				5%含水シリカゲル(1g)			
	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4
	ヘキサン 6mL	アセトン/ヘキサン (5/95) 5mL	アセトン/ヘキサン (10/90) 5mL	アセトン/ヘキサン (20/80) 5mL	ヘキサン 6mL	アセトン/ヘキサン (2/98) 5mL	アセトン/ヘキサン (5/95) 5mL	アセトン/ヘキサン (10/90) 5mL
ラウリン酸メチル	0	0	98	0	0	0	84	16
デカン酸イソプロピル	0	0	98	0	0	0	90	16
n-オクタタン酸イソアミル	0	0	87	0	0	0	93	16
n-オクタタン酸アミル	0	0	105	0	0	0	96	16
デカン酸プロピル	0	0	79	0	0	0	86	15
n-ウンデカン酸エチル	0	0	103	0	0	0	90	15
デカン酸メチル	0	0	100	0	0	0	86	12
ウンデカン酸メチル	0	0	114	0	0	0	91	12
ミリスチン酸メチル	0	0	107	0	0	0	88	10
パルミチン酸メチル	0	0	101	0	0	0	86	9
ステアリン酸メチル	0	0	96	0	0	0	93	14
アラキジン酸メチル	0	0	80	0	0	0	77	11
ベヘン酸メチル	0	0	81	0	0	0	90	9
テトラコ酸メチル	0	0	113	0	0	0	87	9

表8 ENVI-Carb (250mg/6 mL) の溶出パターン (%)

物質名	Envicarb(0.25g)		
	Fr1	Fr2	Fr3
	ヘキサン 5mL	アセトン 5mL	トルエン 5mL
ラウリン酸メチル	74	0	0
デカン酸イソプロピル	73	0	0
n-オクタタン酸イソアミル	63	0	0
n-オクタタン酸アミル	73	0	0
デカン酸プロピル	71	0	0
n-ウンデカン酸エチル	69	0	0
デカン酸メチル	72	0	0
ウンデカン酸メチル	64	0	0
ミリスチン酸メチル	69	0	0
パルミチン酸メチル	96	2	2
ステアリン酸メチル	229	29	68
アラキジン酸メチル	27	19	26
ベヘン酸メチル	0	0	68
テトラコ酸メチル	0	0	69

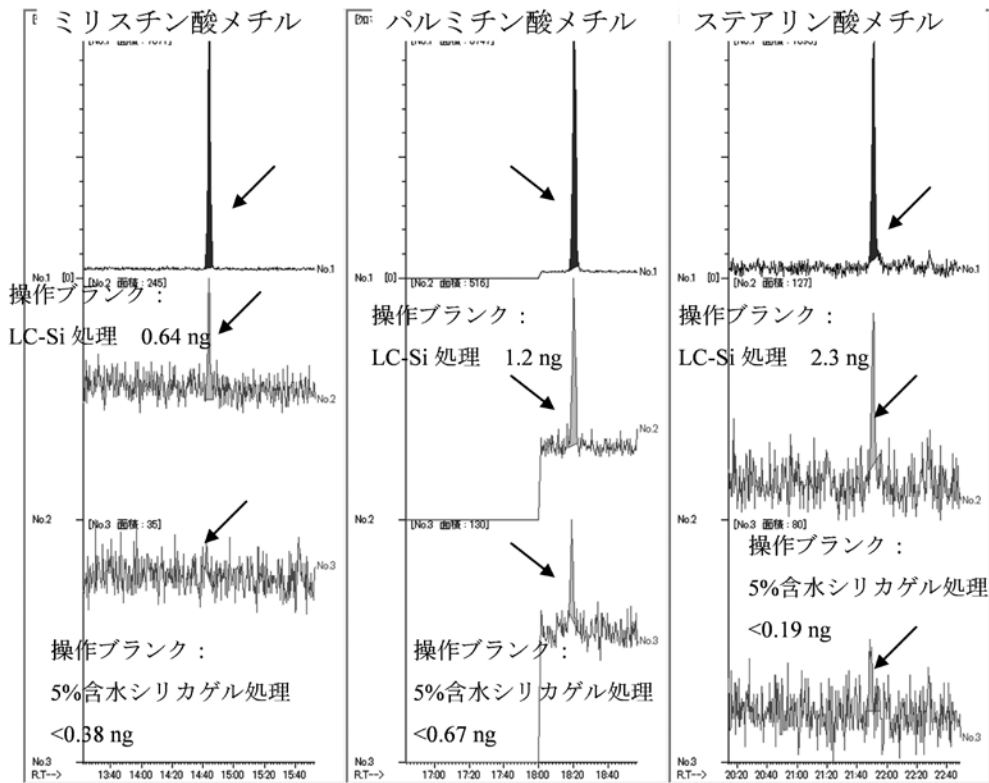


図6 操作ブランクのクロマトグラム

表9 分解性スクリーニング試験結果 (残存率 (%))

物質名	1時間後の 残存率(%)	7日後の残存率(%)	
		明所	暗所
ラウリン酸メチル	pH5	81	29
	pH7	79	0
	pH9	73	0
デカン酸イソプロピル	pH5	85	54
	pH7	79	0
	pH9	77	0
n-オクタン酸イソアミル	pH5	85	52
	pH7	79	1
	pH9	77	10
n-オクタン酸アミル	pH5	88	31
	pH7	83	0
	pH9	80	2
デカン酸プロピル	pH5	86	29
	pH7	81	0
	pH9	79	0
n-ウンデカン酸エチル	pH5	87	30
	pH7	82	0
	pH9	81	0
デカン酸メチル	pH5	80	46
	pH7	74	0
	pH9	73	0
ウンデカン酸メチル	pH5	84	45
	pH7	75	0
	pH9	74	0
ミリスチン酸メチル	pH5	91	8
	pH7	91	1
	pH9	85	0
パルミチン酸メチル	pH5	98	10
	pH7	98	3
	pH9	95	4
ステアリン酸メチル	pH5	99	17
	pH7	97	2
	pH9	97	36
アラキジン酸メチル	pH5	102	25
	pH7	102	7
	pH9	100	83
ベヘン酸メチル	pH5	97	24
	pH7	100	9
	pH9	96	117
テトラコ酸メチル	pH5	100	26
	pH7	100	10
	pH9	100	128

分解性があつたことからいくつかの条件で保存性試験を実施した。河川水1L当たりアルコールビン酸1g(試験溶液のpHは約3)、硫酸10mL(試験溶液のpHは約1)、10%硫酸銅10mLをそれぞれ添加し、保存性試験(標準物質100ng添加)を実施した。アルコールビン酸を添加したものは冷蔵保存、冷凍保存、ヘキササン添加、ヘキササン添加直後に振とう抽出したものを作成し、保存性試験を実施した。保存性試験結果を表10に示す。最も保存性が良かった条件は、アスコルビン酸とヘキササンを添加した直後に振とう抽出したものであつた。硫酸や硫酸銅では分解を抑制することはできず、1週間以上、試料を保存するためには、試料採取時にあらかじめヘキササン抽出を実施しなければなら

ないことが示唆された。

次に、試料採取時に現場で抽出することを想定して、試料瓶(1Lメジューム瓶: IWAKI製(テフロン®ライナーパッキン付キャップ))に河川水1L、アスコルビン酸1gと標準物質25ngを添加し、十分混合した後、ヘキササン100mLを加えて10分間振とうし、保存性試験を実施した。一定時間経過後に、2L分液ロートに試料を移し、試料瓶はアセトン50mLで洗いこみ、振とう抽出を行ったところ、19日経過後も80%以上残存していた。

3.5 IDL及び分析法のMDLとMQL

IDL及びMDL, MQLを表12に示す。IDLは0.13~0.67ng/L, MDLは0.26~1.9ng/L, MQLは0.66~4.9ng/Lとなり、

表10-1 保存性試験結果(残存率(%))

物質名	保存条件	1時間後	1日後	4日後	7日後
ラウリン酸メチル	無添加	62	1	0	0
	アスコルビン酸添加	94	60	47	45
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	65	66	67
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	63	46	49
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	71	73	74
	硫酸添加(pH=1)	101	49	18	9
硫酸銅添加	121	58	24	8	
デカン酸イソプロピル	無添加	81	17	4	0
	アスコルビン酸添加	88	65	64	71
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	64	64	62
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	65	55	59
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	78	83	85
	硫酸添加(pH=1)	94	47	22	13
硫酸銅添加	114	65	54	26	
α-オクタノ酸イソアミル	無添加	78	15	3	0
	アスコルビン酸添加	88	65	64	68
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	64	65	63
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	65	53	58
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	77	82	83
	硫酸添加(pH=1)	93	45	16	9
硫酸銅添加	114	66	56	29	
α-オクタノ酸アミル	無添加	74	7	1	0
	アスコルビン酸添加	91	68	64	68
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	69	70	69
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	69	57	59
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	75	81	81
	硫酸添加(pH=1)	-	50	19	10
硫酸銅添加	118	70	55	25	
デカン酸プロピル	無添加	69	5	1	0
	アスコルビン酸添加	91	67	61	61
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	68	70	68
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	67	55	56
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	74	79	79
	硫酸添加(pH=1)	97	49	19	9
硫酸銅添加	117	67	47	19	
α-ウンデカン酸エチル	無添加	60	5	1	0
	アスコルビン酸添加	83	68	62	62
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	69	71	69
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	68	56	58
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	73	78	79
	硫酸添加(pH=1)	72	50	20	10
硫酸銅添加	84	66	43	17	

表10-2 保存性試験結果(残存率(%))

物質名	保存条件	1時間後	1日後	4日後	7日後
デカン酸メチル	無添加	72	4	0	0
	アスコルビン酸添加	84	51	47	50
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	44	46	43
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	44	36	38
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	72	79	80
	硫酸添加(pH=1)	85	30	14	6
硫酸銅添加	105	38	30	18	
ウンデカン酸メチル	無添加	66	1	0	0
	アスコルビン酸添加	88	56	49	49
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	56	55	53
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	55	42	43
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	70	75	76
	硫酸添加(pH=1)	91	40	17	8
硫酸銅添加	110	50	31	16	
ミリスチン酸メチル	無添加	74	11	1	0
	アスコルビン酸添加	99	68	43	51
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	76	77	85
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	72	51	63
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	78	79	80
	硫酸添加(pH=1)	112	71	42	37
硫酸銅添加	123	64	21	1	
パルミチン酸メチル	無添加	78	34	7	1
	アスコルビン酸添加	132	85	61	62
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	81	82	89
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	84	67	77
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	96	93	89
	硫酸添加(pH=1)	99	89	72	73
硫酸銅添加	93	83	42	16	
ステアリン酸メチル	無添加	83	73	36	25
	アスコルビン酸添加	135	98	92	97
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	88	89	91
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	93	93	101
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	102	98	90
	硫酸添加(pH=1)	100	99	89	91
硫酸銅添加	90	91	62	46	
アラキジン酸メチル	無添加	82	88	57	45
	アスコルビン酸添加	137	99	98	108
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	88	93	94
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	94	99	109
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	104	99	88
	硫酸添加(pH=1)	101	101	95	99
硫酸銅添加	90	90	69	52	
ベヘン酸メチル	無添加	80	93	71	48
	アスコルビン酸添加	133	94	91	110
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	89	89	94
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	92	93	107
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	104	95	85
	硫酸添加(pH=1)	99	102	90	98
硫酸銅添加	92	91	70	54	
テトラコ酸メチル	無添加	84	102	87	62
	アスコルビン酸添加	135	95	97	115
	アスコルビン酸添加(冷凍)	-	95	95	96
	アスコルビン酸・ヘキササン添加	-	91	97	108
	アスコルビン酸・ヘキササン添加⇒振とう抽出	-	100	96	79
	硫酸添加(pH=1)	98	100	93	95
硫酸銅添加	89	92	77	60	

高感度な多成分分析法が確立できた。

3.6 添加回収試験

添加回収試験結果を表13に示す。回収率は67~108%と比較的良好な結果であった。変動係数(CV%)は1.4~23.8%であり、パルミチン酸メチルとステアリン酸メチルが20%前後と若干高い値であったが、その他の物質は特に問題がなかった。

3.7 環境試料の分析

環境試料のクロマトグラムを図7に示す。生活排水の影響を受けている笹ヶ瀬川(笹ヶ瀬橋)と吉野川(鷺湯橋)からラウリン酸メチルがMDLをわずかに上回る濃度で検出された。また、ミリスチン酸メチルは倉敷川(下灘橋)から検出され、パルミチン酸メチルとステアリン酸メチルは笹ヶ瀬川(比丘尼橋)と倉敷川(下灘橋)から検出された。検出された地点はいずれも人口が集中した地域であるが、物質の分解性等を考慮すれば、定常的な排出源がある

ものと推察された。

4 まとめ

ラウリン酸メチルを含む脂肪酸メチルエステル等14物質の水質分析法について検討し、次の結果を得た。

- 1) 水質試料1Lをヘキサン抽出し、シリカゲルカラムでクリーンアップ後、最終液量1mLとし、GC/MS法で測定する方法で、MDLは0.26~1.9ng/L、MQLは0.66~4.9ng/Lであった。
- 2) 添加回収試験の結果、回収率は67~108%、変動係数は1.4~23.8%であった。
- 3) いずれの物質も加水分解性が認められ、試料を保存することができなかった。そのため、試料採取時に現場であらかじめヘキサン抽出する条件で保存性試験を実施したところ、2週間以上の保存が可能であった。
- 4) ミリスチン酸メチルとパルミチン酸メチル、ステアリン

表11 あらかじめヘキサン抽出実施時の保存性試験結果(残存率(%))

物質名	1日後	2日後	5日後	7日後	19日後
ラウリン酸メチル	91	101	91	91	107
デカン酸イソプロピル	103	100	100	98	85
n-オクタノ酸イソアミル	104	102	106	100	84
n-オクタノ酸アミル	100	98	104	95	89
デカン酸プロピル	105	103	107	92	89
n-ウンデカン酸エチル	102	98	104	92	89
デカン酸メチル	105	100	100	98	85
ウンデカン酸メチル	101	87	93	97	81
ミリスチン酸メチル	95	99	94	95	107
パルミチン酸メチル	110	138	109	115	148
ステアリン酸メチル	123	185	137	148	185
アラキジン酸メチル	113	111	108	98	97
ベヘン酸メチル	109	109	101	101	104
テトラコ酸メチル	110	112	101	103	94

表12 IDL及び分析法のMDLとMQL

物質名	試料量(L)	最終液量(mL)	IDL 試料換算値 (ng/L)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
ラウリン酸メチル			0.35	1.1	2.9
デカン酸メチル			0.13	0.45	1.2
デカン酸イソプロピル			0.34	0.43	1.1
n-オクタノ酸イソアミル			0.17	0.29	0.74
ウンデカン酸メチル			0.28	0.55	1.4
n-オクタノ酸アミル			0.18	0.26	0.66
デカン酸プロピル			0.28	0.38	0.99
n-ウンデカン酸エチル			0.17	0.39	0.99
ミリスチン酸メチル	1	1	0.38	1.3	3.3
パルミチン酸メチル			0.67	1.9	4.9
ステアリン酸メチル			0.19	0.46	1.2
アラキジン酸メチル			0.31	0.97	2.5
ベヘン酸メチル			0.58	1.8	4.7
テトラコ酸メチル			0.45	1.0	2.6

表13-1 添加回収試験結果

物質名	試料	添加量 (ng)	検対数	検出濃度 (ng/L)	添加 回収率(%)	変動係数 (%)
ラウリン酸メチル	河川水	無添加	2	<0.35	-	-
		25.0	6	26.1	104	6.3
	海水	無添加	2	<0.35	-	-
		25.0	6	21.9	88	4.9
デカン酸イソプロピル	河川水	無添加	2	<0.34	-	-
		10.0	6	10.1	101	6.4
	海水	無添加	2	<0.34	-	-
		10.0	6	8.4	84	4.3
n-オクタノ酸イソアミル	河川水	無添加	2	<0.17	-	-
		5.0	6	4.7	95	1.4
	海水	無添加	2	<0.17	-	-
		5.0	6	4.5	89	6.4
n-オクタノ酸アミル	河川水	無添加	2	<0.18	-	-
		5.0	6	5.0	100	5.1
	海水	無添加	2	<0.18	-	-
		5.0	6	4.2	84	4.2
デカン酸プロピル	河川水	無添加	2	<0.28	-	-
		5.0	6	5.1	102	7.0
	海水	無添加	2	<0.28	-	-
		5.0	6	4.1	82	4.9
n-ウンデカン酸エチル	河川水	無添加	2	<0.17	-	-
		10.0	6	10.3	103	6.2
	海水	無添加	2	<0.17	-	-
		10.0	6	8.3	83	5.5
デカン酸メチル	河川水	無添加	2	<0.13	-	-
		5.0	6	5.2	103	4.4
	海水	無添加	2	<0.13	-	-
		5.0	6	4.5	89	4.7

表13-2 添加回収試験結果

物質名	試料	添加量 (ng)	検対数	検出濃度 (ng/L)	添加 回収率(%)	変動係数 (%)
ウンデカン酸メチル	河川水	無添加	2	<0.28	-	-
		10.0	6	9.6	96	4.1
	海水	無添加	2	<0.28	-	-
		10.0	6	8.1	81	5.0
ミリスチン酸メチル	河川水	無添加	2	<0.35	-	-
		25.0	6	27.0	108	6.3
	海水	無添加	2	<0.35	-	-
		25.0	6	20.5	82	10.4
パルミチン酸メチル	河川水	無添加	2	<0.67	-	-
		25.0	6	24.2	97	4.6
	海水	無添加	2	<0.67	-	-
		25.0	6	16.8	67	23.8
ステアリン酸メチル	河川水	無添加	2	<0.19	-	-
		5.0	6	5.2	104	3.2
	海水	無添加	2	<0.19	-	-
		5.0	6	3.6	72	19.7
アラキジン酸メチル	河川水	無添加	2	<0.31	-	-
		25.0	6	26.2	105	4.1
	海水	無添加	2	<0.31	-	-
		25.0	6	18.1	72	8.9
ベヘン酸メチル	河川水	無添加	2	<0.58	-	-
		25.0	6	26.3	105	10.0
	海水	無添加	2	<0.58	-	-
		25.0	6	19.4	77	9.7
テトラコ酸メチル	河川水	無添加	2	<0.45	-	-
		10.0	6	10.6	106	12.1
	海水	無添加	2	<0.45	-	-
		10.0	6	7.8	78	12.0

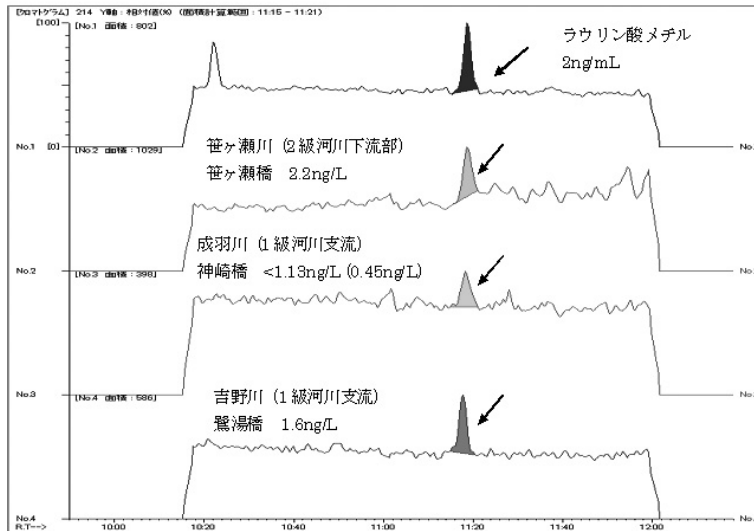


図7-1 環境試料のクロマトグラム

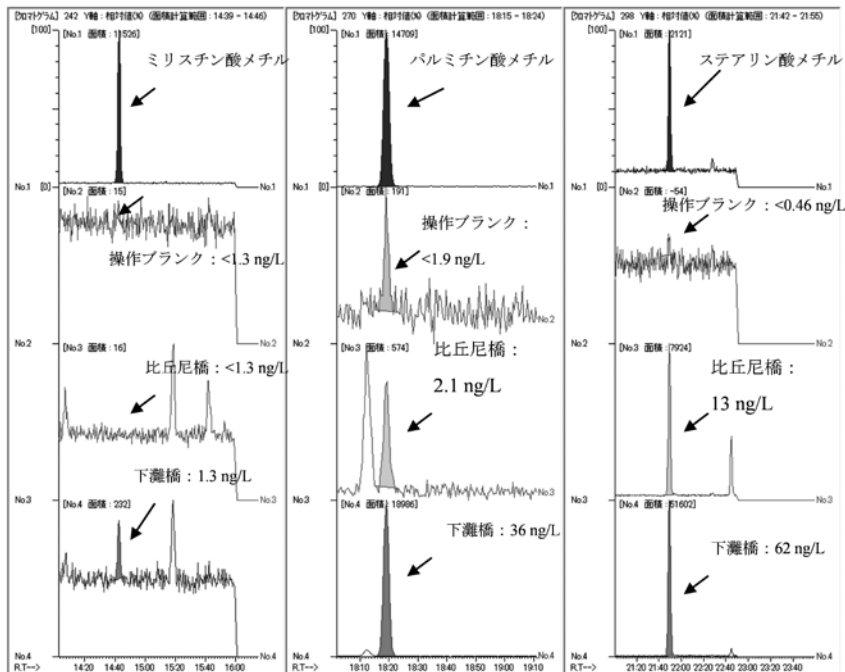


図7-2 環境試料のクロマトグラム

ン酸メチルは操作ブランクが検出され、汚染源の特定と低減化についてさらなる検討が必要と考えられた。

- 5) 環境試料を分析した結果、ラウリン酸メチルは生活排水の影響を受ける地点から1.6~2.2ng/L検出された。ミリスチン酸メチルとパルミチン酸メチル、ステアリン酸メチルは、1.3~62ng/L検出された。

なお、本研究は環境省委託の平成24年度化学物質環境実態調査と連携して実施した。

文 献

- 1) シグマアルドリッチジャパンHP：脂肪酸/FAMEsアプリケーションガイド

http://www.sigma-aldrich.co.jp/up_catalog/SAJ1357.pdf

- 2) シグマアルドリッチジャパンHP：脂肪酸メチルエステル分析用カラム

<http://www.sigmaldrich.com/japan/analytical-chromatography/gas-chromatography/fame.html>

- 3) 環境省総合環境政策局環境保険部環境安全課：化学物質環境実態調査実施の手引き（平成20年度版），平成21年3月，2009

- 4) 奥村為男：キャピラリー・GC/MSによる水質中の農薬類及びその酸化生成物の定量－標準液のPEG注入法－，環境化学，Vol5，No.3，575-583，1995

【調査研究】

七区における汚濁負荷量調査

Estimation of Pollution Load from Nanaku

藤田和男, 難波あゆみ, 河野裕明, 山本 淳 (水質科)

Kazuo Fujita, Tsutomu Nanba, Ayumi Nanba, Hiroaki Kouno, Jun Yamamoto (Department of Water)

要 旨

児島湖流域の岡山市南区北七区及び西七区において水田から流出する汚濁負荷量の調査を行った。平成19～24年度における負荷量の平均値はCODが330 (g/ha/日), T-Nが55 (g/ha/日), T-Pが20 (g/ha/日)であり, いずれの値も流入水量や降水量が大きい月に負荷量大きい傾向が見られた。

[キーワード: COD, 窒素, リン, 七区, 汚濁負荷量]

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

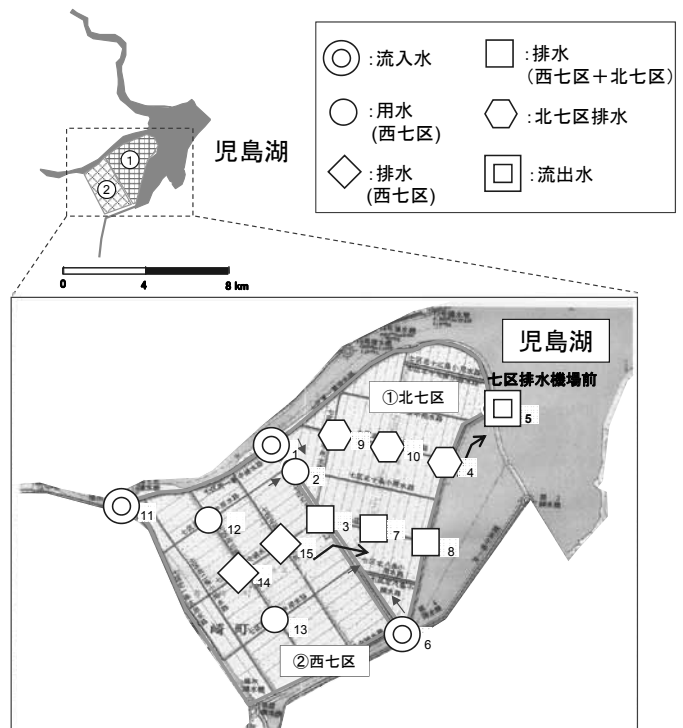
1 はじめに

児島湖の水質汚濁については, 湖沼水質保全計画等に基づき, 過去25年間にわたり様々な水質保全施策を実施してきたが, いまだ環境基準は達成されていないため, 更なる水質改善が課題となっている。

本県では, 平成24年3月に「児島湖に係る第6期水質保全計画」を策定し, その中で水質汚濁メカニズムの解明に向けた様々な調査を推進することとしており, 依然として水質汚濁が問題となっている児島湖の環境基準の達成に向けて, 水質汚濁メカニズムの解明が必要となっている。

岡山市南区灘崎町北七区(以下「北七区」とする)は, 湖沼水質保全特別措置法に基づき, 流出水対策地域として指定されているが, 当地域及び岡山市南区灘崎町西七区(以下「西七区」とする)を合わせた区域(以下「西・北七区」とする)においてCOD, 窒素及びリンの物質収支の調査を行い, これまで未解明となっていた農地に起因する汚濁負荷量を解明することを目標とする。このために七区に流入, 及び七区から流出する用排水路等に調査地点を設定し, 当該調査地点の採水を実施するとともに, その水質を詳細に調査する。また調査結果に基づき, CODや窒素, リン等の汚濁物質の物質収支のシミュレーション計算等を行い, 汚濁メカニズムのモデル解析を行う。

区: 地点11~15の5地点)とした。現地で気温, 水温, 水深を測定し, 流速を電磁流速計(東邦電探製TK-106X)で測定した。流速は原則として1地点につき5回測定した平均値を計算した。水路の形状, 付近の水門の開閉状況, 橋



2 材料および方法

調査期間は平成24年4月～平成25年3月までの12ヶ月で灌漑期に12回(6月は月4回, 7～10月は月2回)非灌漑期に7回(4～5月及び11～3月は月1回), 合計19回, 現地測定及び採水を行った。調査地点(図1)は北七区及び西七区の15地点(北七区: 地点1～10の10地点, 西七



図1 採水地点

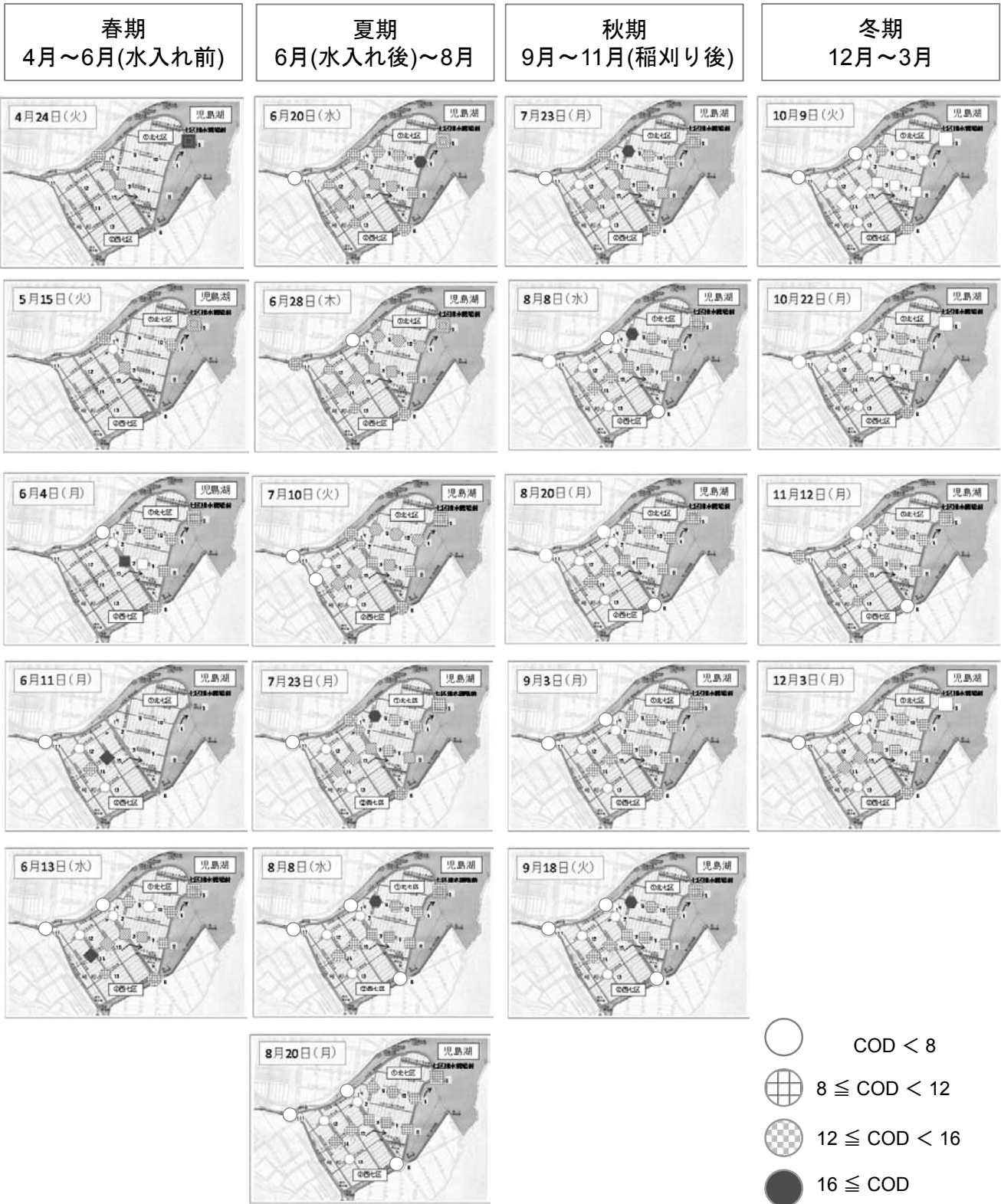


図2 COD

春期 4月～6月(水入れ前)	夏期 6月(水入れ後)～8月	秋期 9月～11月(稲刈り後)	冬期 12月～3月
--------------------------	--------------------------	---------------------------	---------------------



図3 T-N

春期
4月～6月(水入れ前)

夏期
6月(水入れ後)～8月

秋期
9月～11月(稲刈り後)

冬期
12月～3月

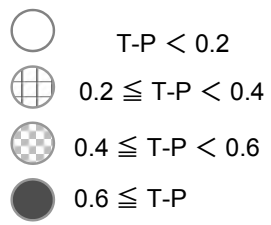
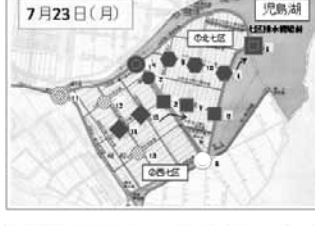
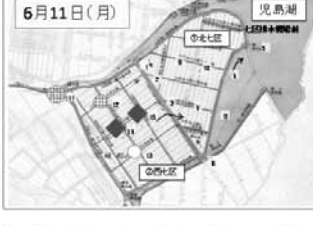
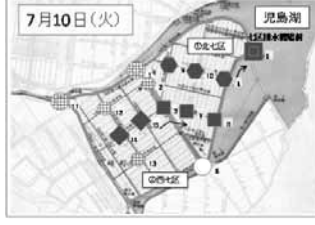
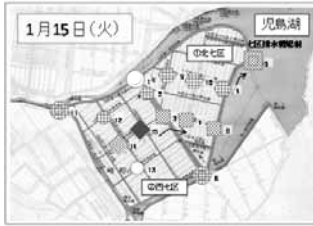
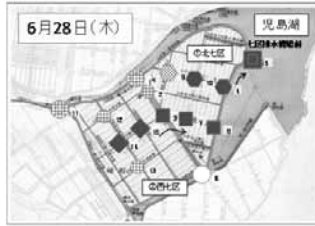


図4 T-P

中央の支柱の構造や表面浮遊物の流れの現地観察等により左右の流速が異なると判断される場合には中央から右岸及び左岸側に移動した2地点で各5回測定した。

採取した検体についてpH, COD, T-N, T-P, EC(原則として地点①～⑯の16地点分), D-COD, D-N, D-P, NO₃-N, NO₂-N, NH₄-N, PO₄-P, Cl, SS, DOC(地点①～⑤の5地点分)を測定した。流量を流速と水路断面(幅×水深)から推算した。pHはpH計(堀場製作所製F-51), COD, 全窒素(T-N), 全リン(T-P), SSは工場排水試験法K0102²⁾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)および懸濁態リン(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。

流量について, 北七区排水機場からの流入水量及び降水量(児島湖樋門)は文献値³⁾, 蒸発散量は以下の式³⁾で求めた。

$$E_p = 0.00491 \cdot PSD^2 \cdot (1.06)^{Temp}$$

ただし, E_p:蒸発散量(mm/day), PSD:日照時間(hr/day), Temp:気温。

3 結果および考察

3.1 水質および負荷量

図2～4に各地点のCOD, T-N及びT-Pの測定結果を示す。CODは水入れ(6月17日)後に値が高くなり, 1ヶ月程度値が高い状態が継続した。T-Nは水入れ直後に値が高くなったが, 10日程度で値が低下した。T-Pは3ヶ月程度高い値が継続していた。

図5に最近6年間(平成19～24年度)の西・北七区の流入水及び流出水の水質を示す。水質は季節的に変動しており1年間を周期とする以下の近似式³⁾で表された。

$$C = \sum_i b_i \cdot \sin(2\pi t/T + \theta_i)$$

流出水の水質(6年間の平均値)はCODが11.9(mg/L), T-Nが2.3(mg/L), T-Pが0.40(mg/L)であった。これに対し流入水の水質(地点11及び地点1の水質及び流量から計算した平均値)はCODが7.9(mg/L), T-Nが1.7(mg/L), T-Pが0.25(mg/L)で, 西・北七区を通過することにより平均でCODが4.0(mg/L), T-Nが0.61(mg/L), T-Pが0.15(mg/L)増加していた。

図6に6年間分の西・北七区の流入水及び流出水の流量²⁾を示す。西・北七区の流入水の大半は七区用排水機場(地点11)により用水として流入する倉敷川の河川水であり, 加えて5号排水機場付近の樋門(地点1)から北七区へ用水として流入する倉敷川の河川水, 及び降水量から蒸発散量を差し引いたものであり, 以下で表す。

$$Q_{in} = Q_1 + Q_2 + (Q_{rain} - Q_{ep})$$

$$Q_{out} = Q_{in}$$

ただし, Q_{in}:西・北七区への流入水量, Q₁:七区用排水機場(地点11)からの流入水量, Q₂:5号排水機場付近の樋門(地点1)からの流入水量, Q_{rain}:降水量, Q_{ep}:蒸発散量, Q_{out}:西・北七区から児島湖への流出水量。

各地点の水質をCとすると, 負荷量Lは以下で示される。

$$L_1 = Q_1 \cdot C_1$$

$$L_2 = Q_2 \cdot C_2$$

$$L = Q_{out} \cdot C_{out} - (L_1 + L_2)$$

ただし, L₁及びL₂:地点1及び地点5から流入する負荷量, C₁及びC₂:地点1及び地点5の水質, L:西・北七区から児島湖へ流出する負荷量。

これに基づき水質及び流入水量から求めた最近6年間の負荷量を図7に示す。6年間の平均値はCOD負荷量が330(g/ha/日), T-N負荷量は55(g/ha/日), T-P負荷量は20(g/ha/日)であった。また年度毎のCOD負荷量は176～514(g/ha/日), T-N負荷量は29～101(g/ha/日), T-P負荷量は11～34(g/ha/日)の範囲にあり, いずれの年度においても流入水量や降水量が大きい月に負荷量が大きい傾向が見られた。治多等⁴⁾は汚濁負荷量に関する過去の報告(425件)を整理し慣行農法の水田(水田群・一筆水田)の負荷量(灌漑期と非灌漑期の平均値)はCOD負荷量が456(g/ha/日), T-N負荷量が100(g/ha/日), T-P負荷量が15(g/ha/日)を述べている。今回の結果を文献値と比較するとCOD及びT-N負荷量が28%及び45%低く, T-Pが33%高かった。

図8に流入水が西・北七区を通過することによる水質汚濁の増加分及び正味の負荷量を示す。農耕スケジュールと比較すると, COD負荷量は水入れ後に値が高くなり, 1ヶ月程度値が高い状態が継続する。T-N負荷量は灌漑期の6月, 9月及び非灌漑期の3月に高いが, 冬期(12月～翌年6月まで)には農地の大半で麦が栽培されており⁵⁾, 降雨による肥料の流出等の影響が生じていることが考えられる。T-P負荷量は6月から3ヶ月程度高い値が継続している。

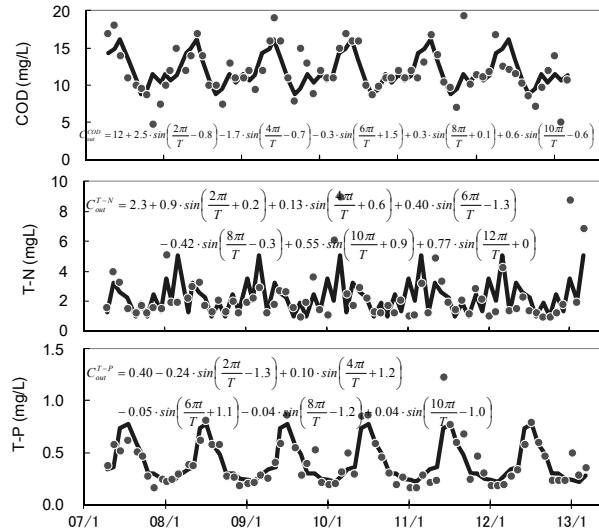
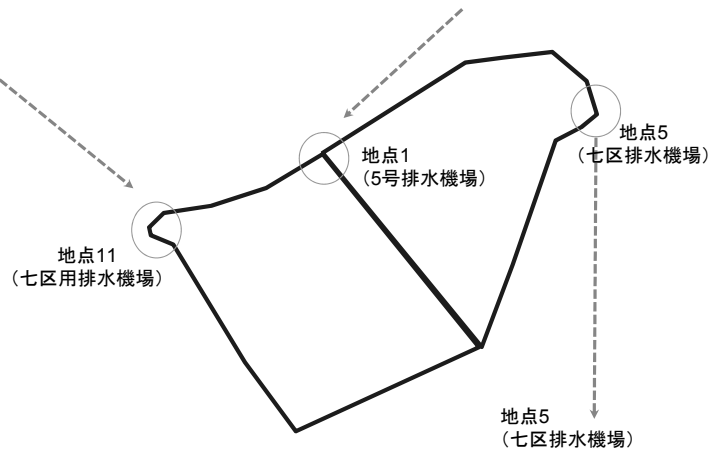
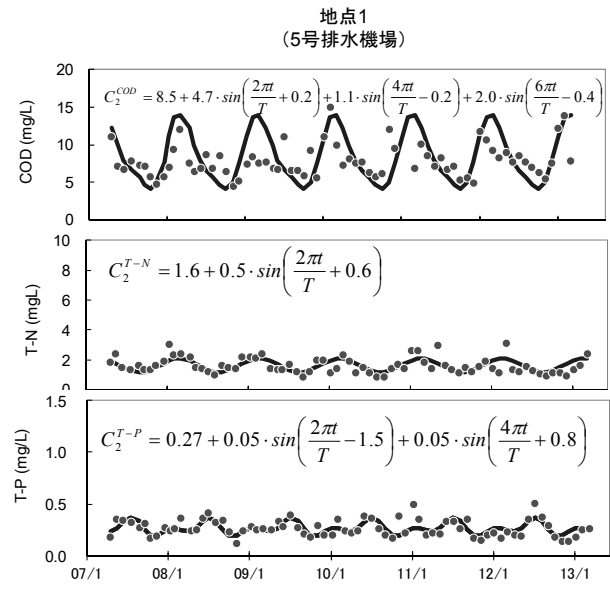
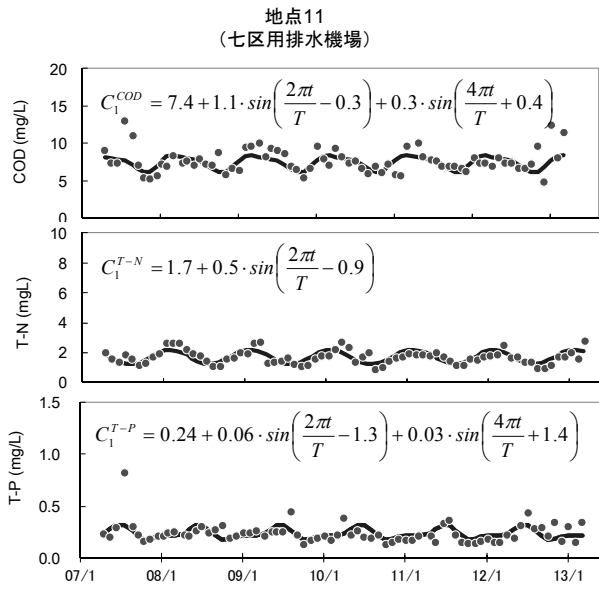
3.2 シミュレーション計算

流入水や降水が農地を通過する際に汚濁負荷(COD, T-N及びT-P)となる成分が農地から水中に混ざり流出してゆく状況を仮定して, 降水量及び流入水量(七区用排水機場および5号排水機場からの流入水量から降水量及び蒸発散量を除いた値)Q_{in}と負荷量Lの関係が

$$L = \sum_i a_i \cdot Q_i$$

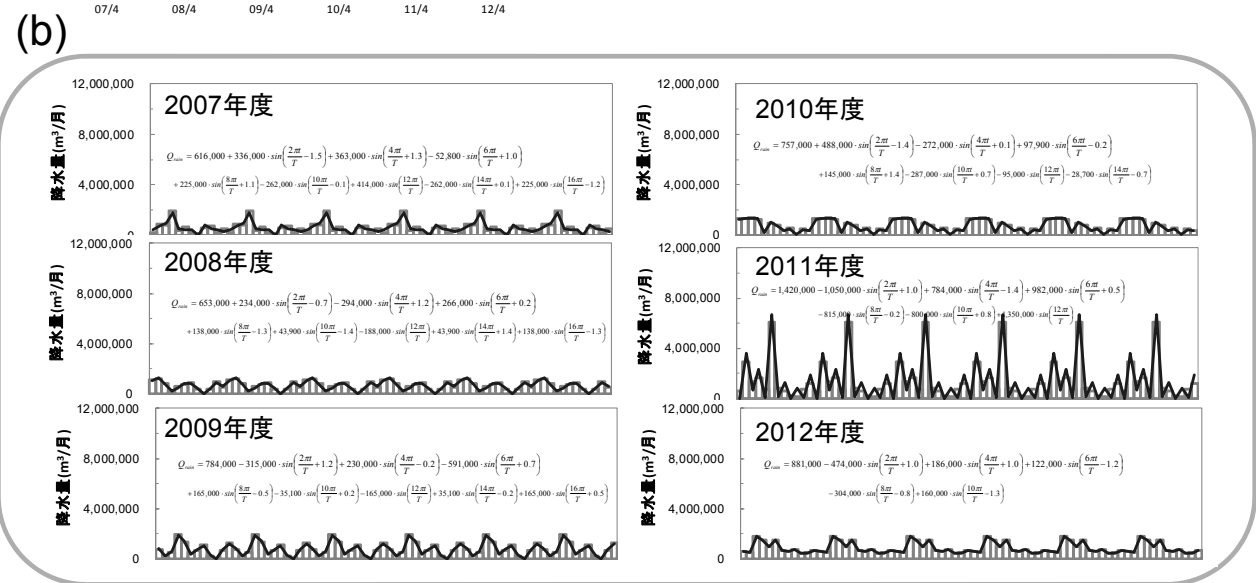
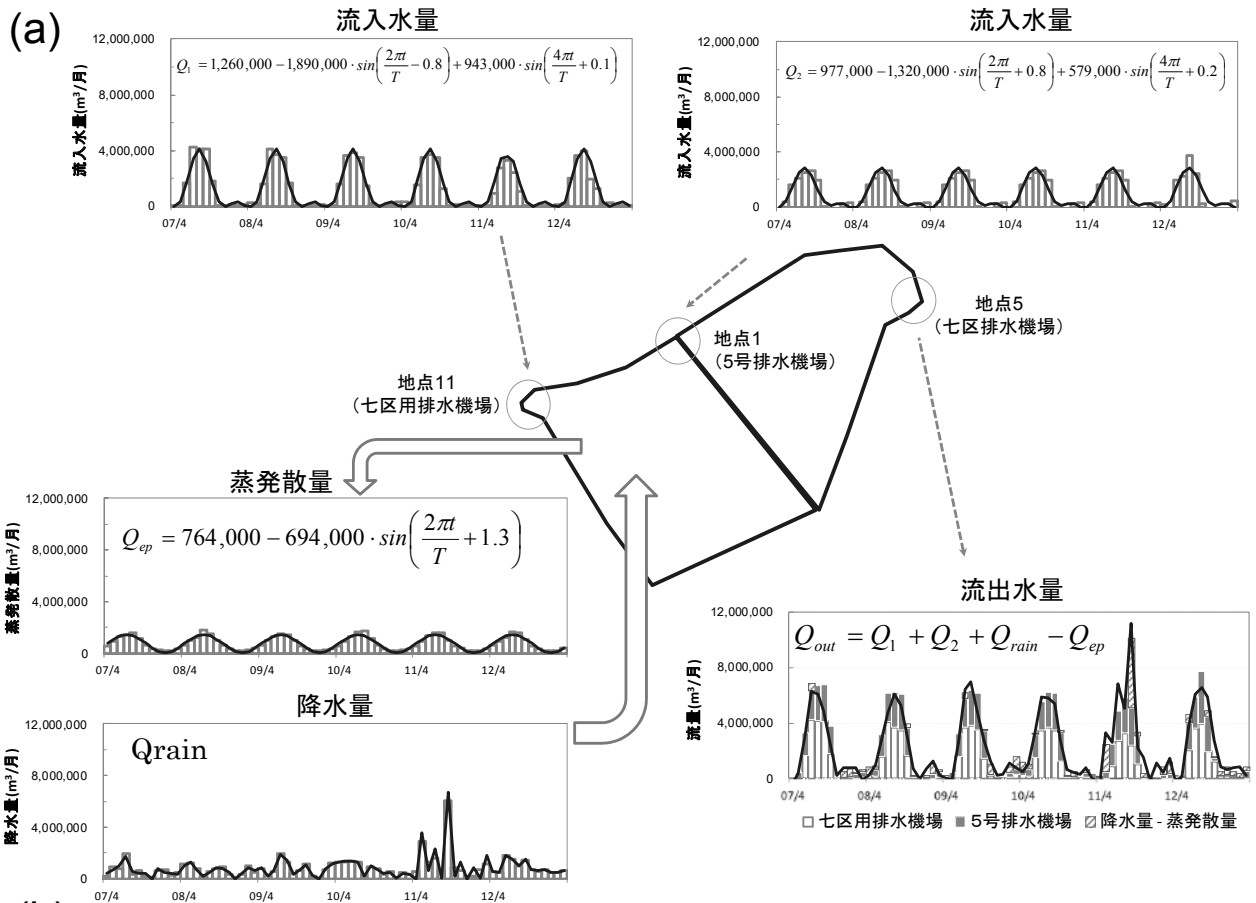
$$= a_1 \cdot (Q_1 + Q_2 - Q_{ep}) + a_2 \cdot (Q_{rain})$$

の式で表されるとして重回帰分析により検討し, 汚濁負荷量を以下の式で表した。



● : COD、T-N及びT-P(実測値)
 — : 近似値

図5 水質測定結果



(a) 各地点の流入量、流出量及び降水量、蒸発散量
□ : 流量、降水量及び蒸発散量²⁾
— : 近似値

(b) 各年度の降水量のパターン

図6 流量

6月では,

$$L^{COD} = 70 (Q_1 + Q_2 - Q_{ep}) + 90 (Q_{rain})$$

$$L^{T-N} = 6.2 (Q_1 + Q_2 - Q_{ep}) + 25 (Q_{rain})$$

$$L^{T-P} = 3.2 (Q_1 + Q_2 - Q_{ep}) + 4.9 (Q_{rain})$$

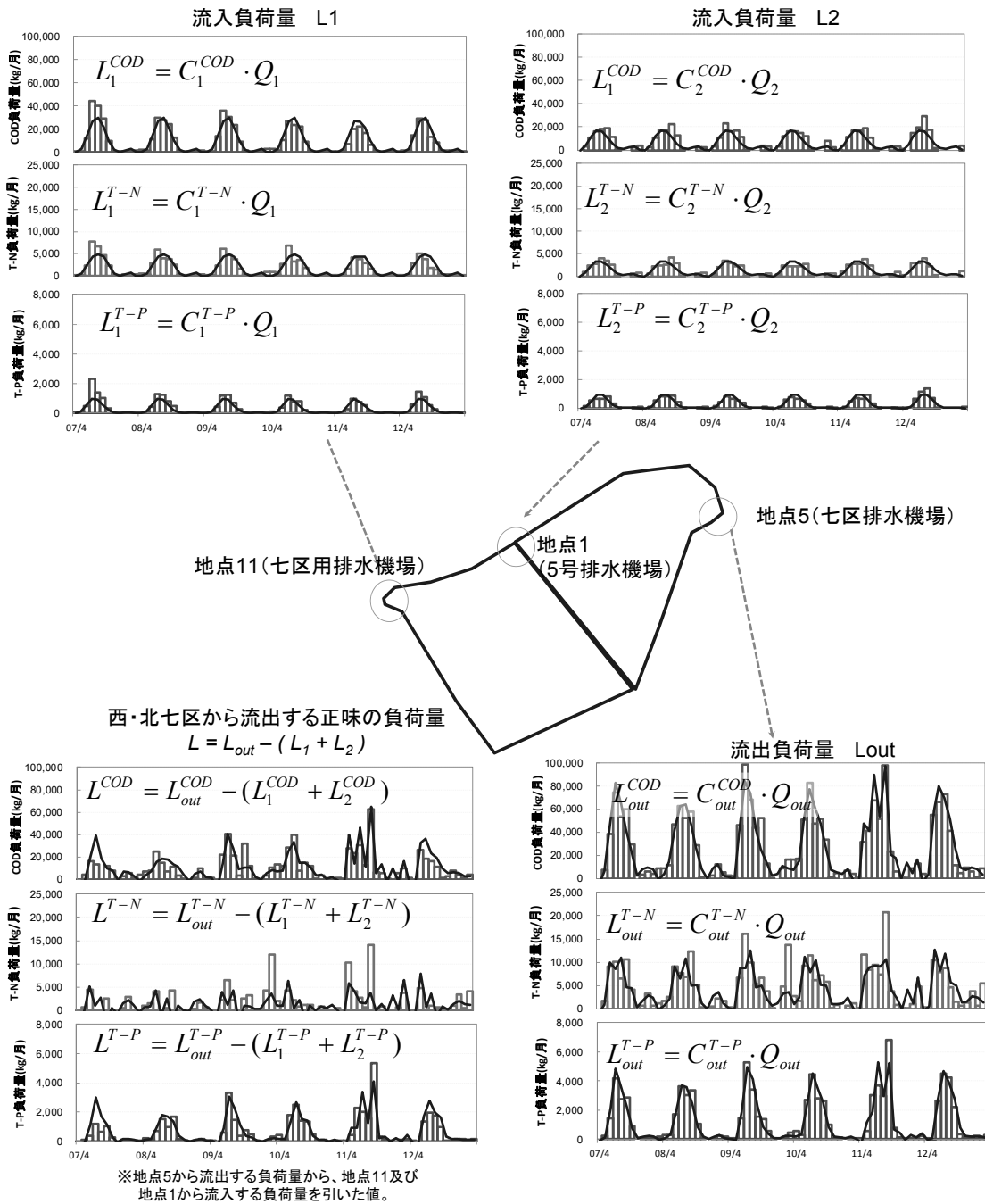
6月以外では,

$$L^{COD} = 15 (Q_1 + Q_2 - Q_{ep}) + 90 (Q_{rain})$$

$$L^{T-N} = -3.0 (Q_1 + Q_2 - Q_{ep}) + 25 (Q_{rain})$$

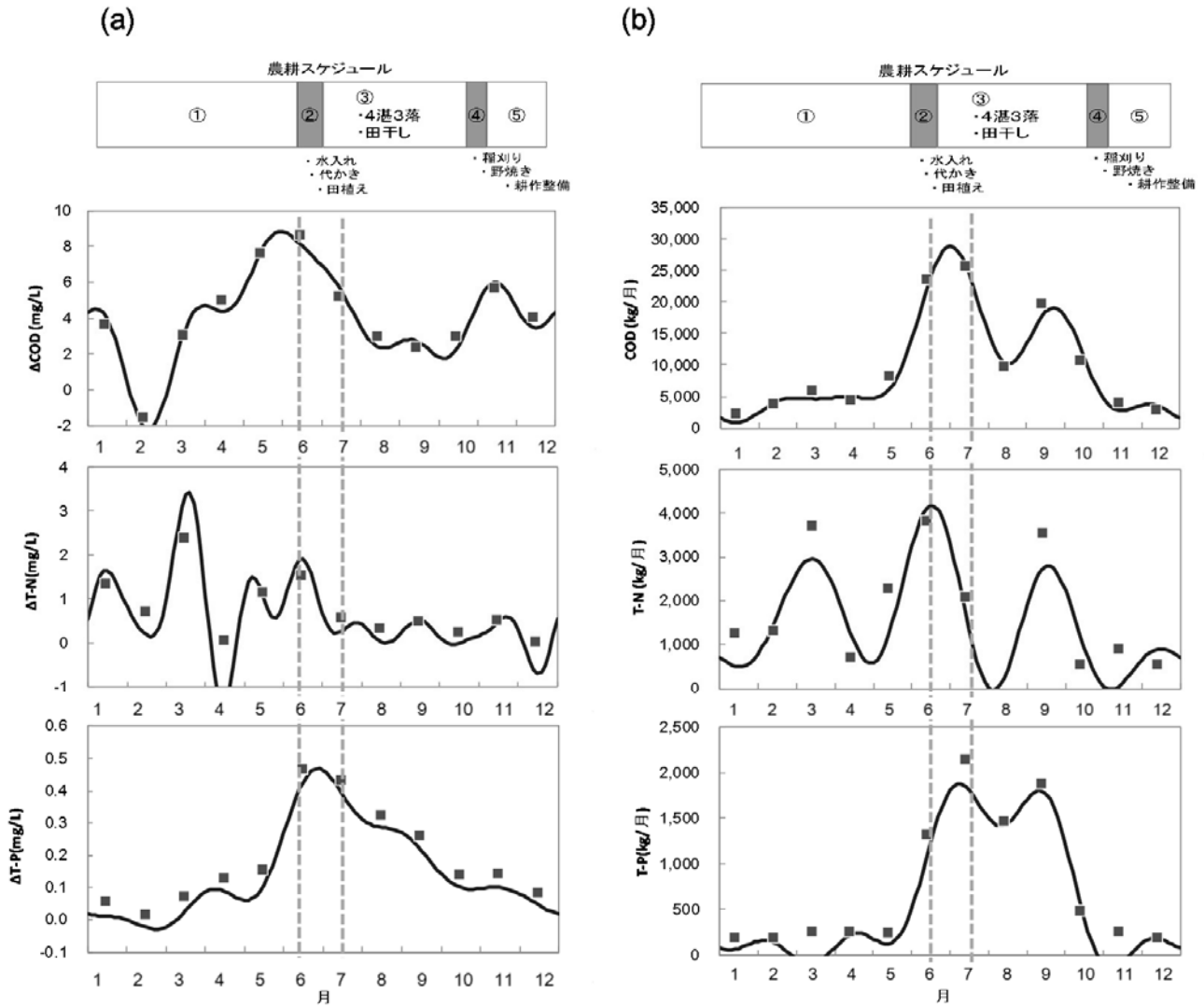
$$L^{T-P} = 2.1 (Q_1 + Q_2 - Q_{ep}) + 4.9 (Q_{rain})$$

ただし, L^{COD} , L^{T-N} 及び L^{T-P} : 西・北七区から排出される正味の負荷量 (kg), Q_1 , Q_2 : 地点11及び地点1からの流入量 (m³/月), Q_{ep} : 蒸発散量 (m³/月), Q_{rain} : 降水量 (m³/月)。



□ : 文献値²⁾からの計算値
 — : 近似値からの計算値

図7 負荷量

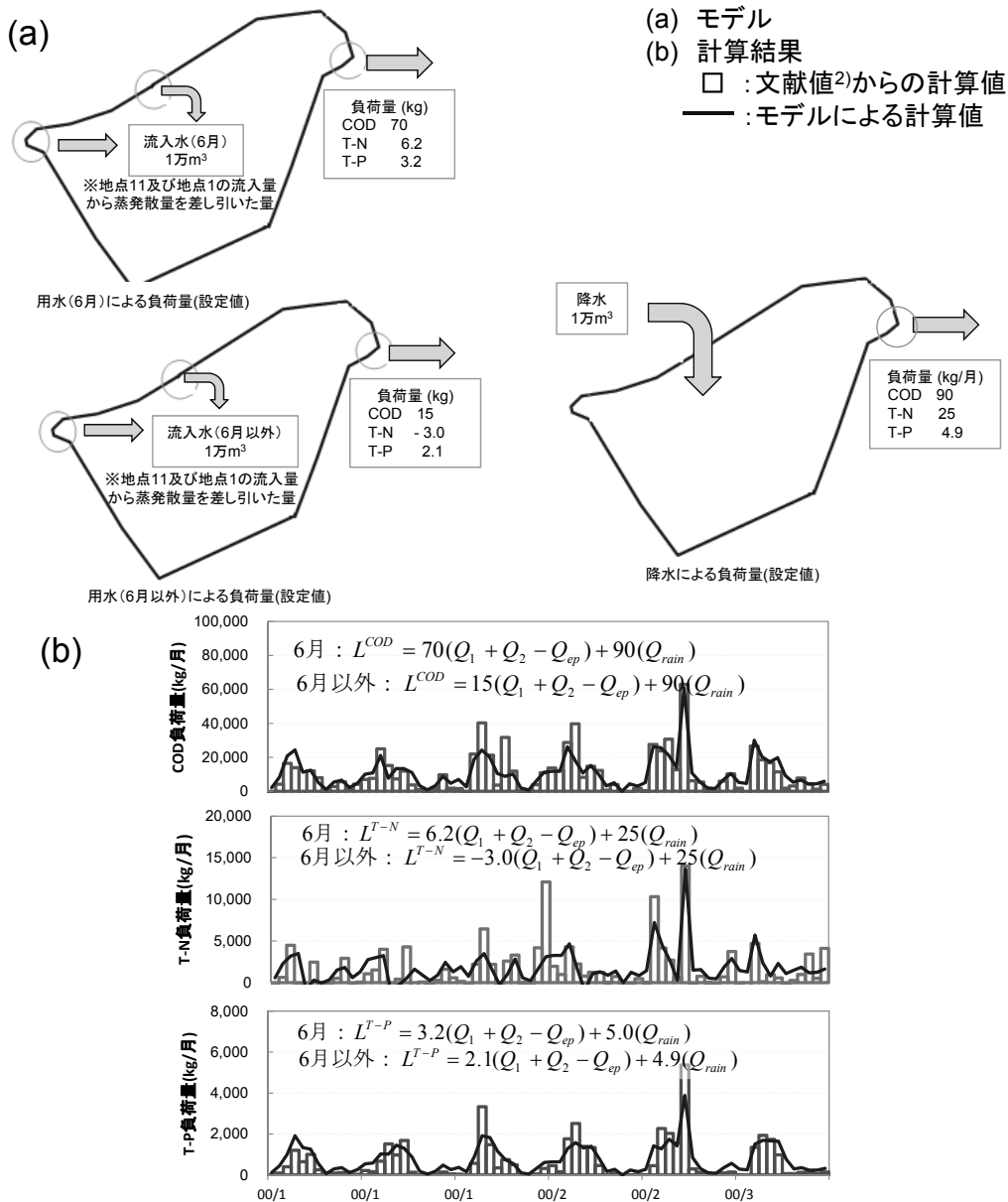


■ : 測定値（流出水と流入水の差、平成19～24年度平均値）
 — : 近似計算値
 (a) 水質（流入水が西・北七区を通過するときの水質の変化分）
 (b) 負荷量（西・北七区の正味の負荷量）

図8 西・北七区の水質変化及び負荷量

これに基づき最近6年間分のデータを用いてシミュレーション計算を行った。計算に必要な入力値は用水が流入する2地点（地点11：七区用排水機場，地点1：5号排水機場）の水質（図5）及び水量（図8），降水量及び蒸発散量であり，降水量以外は6年間の実測値及び文献値²⁾から計算した値であり毎年同じパターンの繰り返しで表される。降水量は文献値²⁾から年度毎に異なるパターンとした。負荷量の計算結果を図9に示す。負荷量は夏期に高く冬期に低く，シミュレーション計算では6年間の負荷量の

季節変動の様子が概ね表された。6年間分の月毎の計算結果と実測値から得られた結果の相関係数はCODが0.88，T-Nが0.78，T-Pが0.91であった。シミュレーション計算では水温の影響（水温上昇による溶出量の増加等）は含まれておらず，また農耕スケジュールとの関連については6月の用水のみを他の時期と異なる要因として考慮しているが，他の工程（稲刈り，裏作等）と負荷量との関連についてはさらに検討が必要と考えられる。



4 まとめ

岡山市南区灘崎町西・北七区で水田から流出する汚濁負荷量の調査を行った。

- 1) 負荷量は夏期に高く冬期に低い傾向があった。平成19～24年度の西・北七区からの負荷量の平均値はCODが330 (g/ha/日), T-Nが55 (g/ha/日), T-Pが20 (g/ha/日)であった。
- 2) 平成19～24年度において年度毎のCOD負荷量は176～514 (g/ha/日), T-N負荷量は29～101 (g/ha/日), T-P負荷量は11～34 (g/ha/日)の範囲にあった。流入水量や降水量が大きい月に負荷量が多い傾向が見られた。
- 3) シミュレーション計算では6年間の負荷量の季節変動の様子が概ね再現された。

文 献

- 1) 島弘志編：工場排水試験法 JIS-K0102, 日本規格協会, 東京, 2010
- 2) 岡山県：平成24年度指定湖沼汚濁負荷量削減状況調査報告書, 2013
- 3) 大石進一：フーリエ解析, 7, 岩波書店, 東京, 1989
- 4) 治多伸介, 須戸 幹, 江口定夫, 大久保卓也, 黒田久雄, 武田育郎, 藤原 拓, 山本忠男, 嶋 栄吉, 人見忠良, 白谷栄作, 横田久里子, 井上隆信：水田からの流出負荷量の実態と検討課題. 第15回日本水環境学会シンポジウム講演集, 60, 2012
- 5) 岡山県：平成23年度児島湖流域流出水実態把握調査事業農作業状況調査報告書, 2012

【調査研究】

児島湖流域の水質シミュレーション計算（2）

Simulation Calculation of Water Quality of Lake Kojima Catchment (2)

藤田和男, 難波あゆみ, 河野裕明, 山本 淳 (水質科)

Kazuo Fujita, Tsutomu Nanba, Ayumi Nanba, Hiroaki Kouno, Jun Yamamoto
(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、30年間（1982～2012年度）の測定結果から、シミュレーション計算を行った。笹ヶ瀬川およ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（1982～2012年度）は8.6mg/Lで報告値（公共用水域）の平均値8.7mg/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

児島湖の将来水質の計画の策定やこれまでの施策による水質改善効果の検証のためには、これまでの水質調査のデータを元にした数値シミュレーションシステムの構築が必要である。

これまで児島湖の計算モデルを作り現況再現のためのシミュレーション計算^{1)~6)}およ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を算定できれば、ある因子に対してどのような浄化施策を行えばどれだけの水質改善効果があるかについて推算でき、現状の評価および将来の予測が可能となる。

本報では児島湖流域を8つの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、30年間分の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。



図1 児島湖流域

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⁷⁾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^{8)~37)}等を用いて計算した。また児島湖の平均滞留時間⁸⁾、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）, NO₃-N, NO₂-N, NH₄-N, PO₄-Pは工場排水試験法K010240）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）および懸濁態リン（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は報告値^{7)~4)}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⁹⁾を用いた（図3）。計算プログラムを図4に示す。

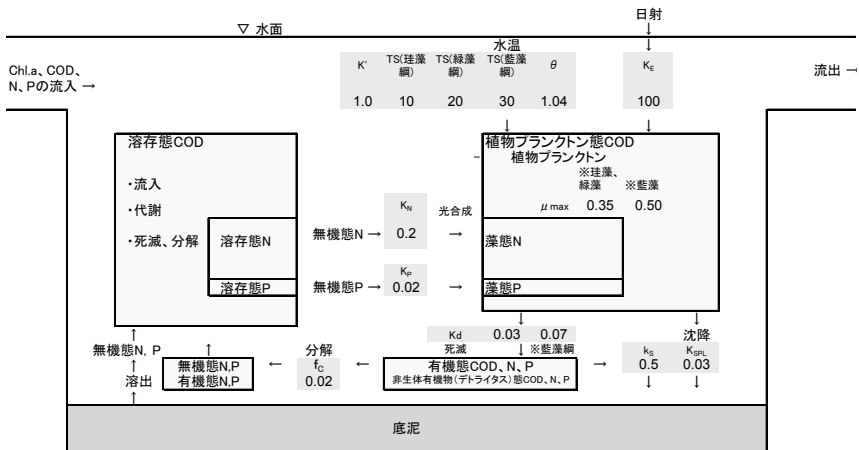


図2 計算モデル (概念図)

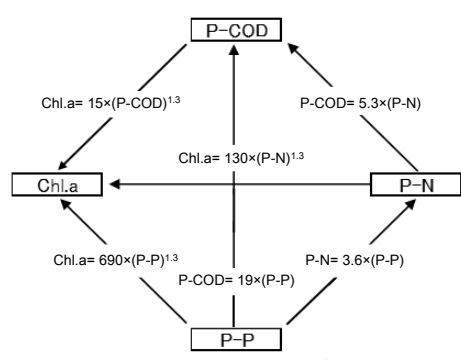
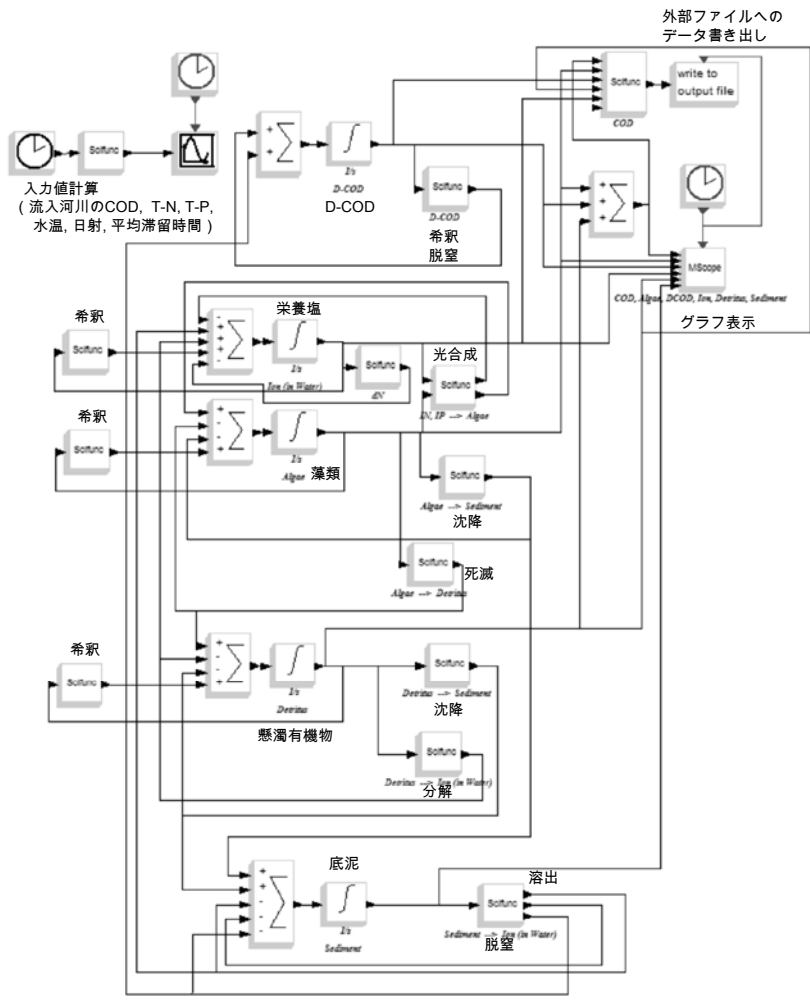


図3 P-COD, T-N, T-PおよびChl.aの関係



数値計算ソフトScilabのブロック線図
 図中の記号 \int 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)、 \sum 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。

図4 計算プログラム

植物プランクトンの増殖をCODで表すこととし、以下の式⁷⁾により計算した。

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

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

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

ここで、A-COD：植物プランクトン態COD (mg/L)，A-COD_{in}：流入水の植物プランクトン態COD (mg/L)，μ：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 (-)，θ：水温に係る定数1.04 (-)，T：水温 (°C)，k_{SPL}：植物プランクトン沈降速度 (m/day)，H：水深 (m)，τ：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μ (比増殖速度) は以下の式⁷⁾で定義した。

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

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

ここで μ_{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/cm²/day)，K_E：日射量半飽和定数 (cal/cm²/day)，T_S：増殖に最適な水温 (°C) である。

窒素については、以下の式⁷⁾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)

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

ここで、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 (NO₃-N + NO₂-N + NH₄-N) (mg/L)，I-N_{in}：流入水の無機態窒素 (mg/L)，ξ_N：植物プランクトンと窒素の換算係数 (-)，k_{SN}：有機態窒素沈降速

度 (m/day)，f_N：有機態窒素分解速度 (1/day)，D_N：底泥からのI-N溶出速度 (g/m²/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、以下の式で定義した。

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

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

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

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

ここで、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 (PO₄-P) (mg/L)，I-P_{in}：流入水の無機態リン (mg/L)，ξ_P：植物プランクトンとリンの換算係数 (-)，k_{SP}：有機態リン沈降速度 (m/day)，f_P：有機態リン分解速度 (1/day)，D_P：湖底からのI-P溶出速度 (g/m²/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。

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

ここで、C_{in}：流入水の水質 (mg/L)，L_{S1}~L_T：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_{in}：湖への流入水量 (m³/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°C⁷⁾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⁴³⁾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。

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

ここで y：水温 (°C)，平均滞留時間 (day) または P-COD (mg/L)，t：時間 (day)，a₀：平均値 (振幅の中心となる値，°C，dayまたはmg/L)，a_i：振幅 (°C，dayまたはmg/L)，T：周期 (day)，b_i：位相 (day)，i：近似式の次数 (-) である。

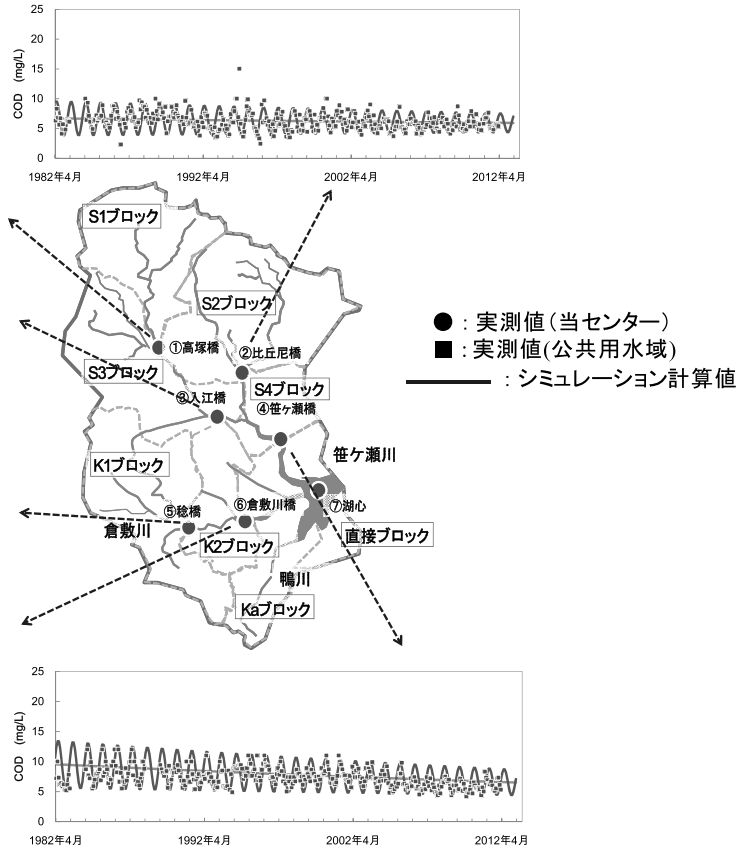
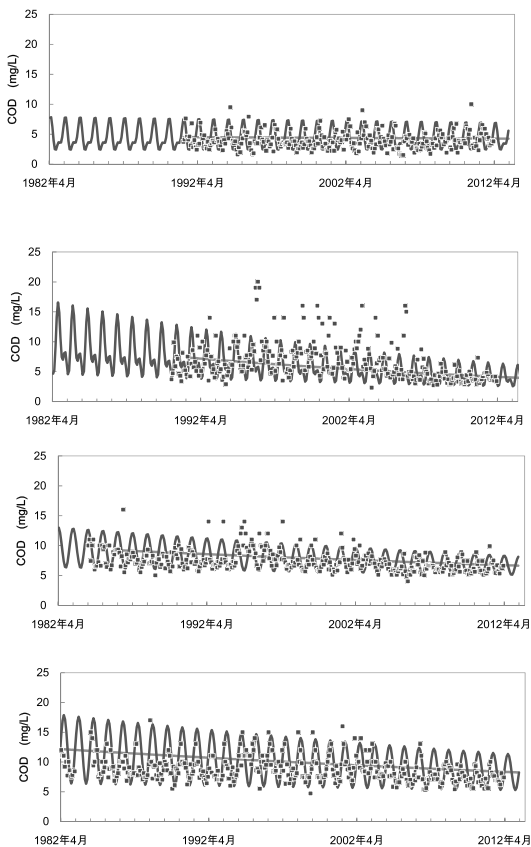


図5 児島湖流域のCOD

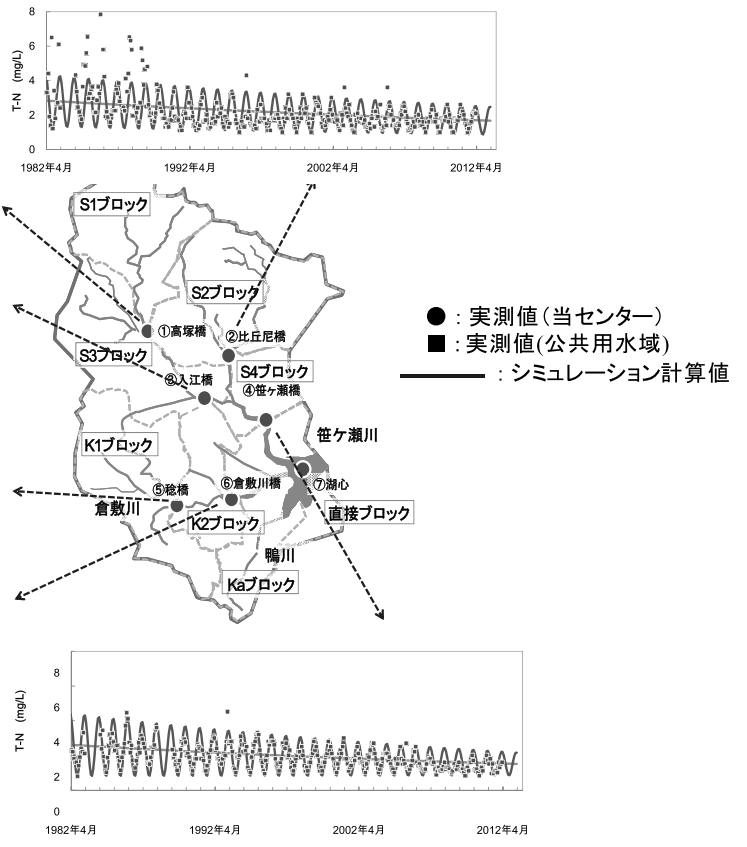
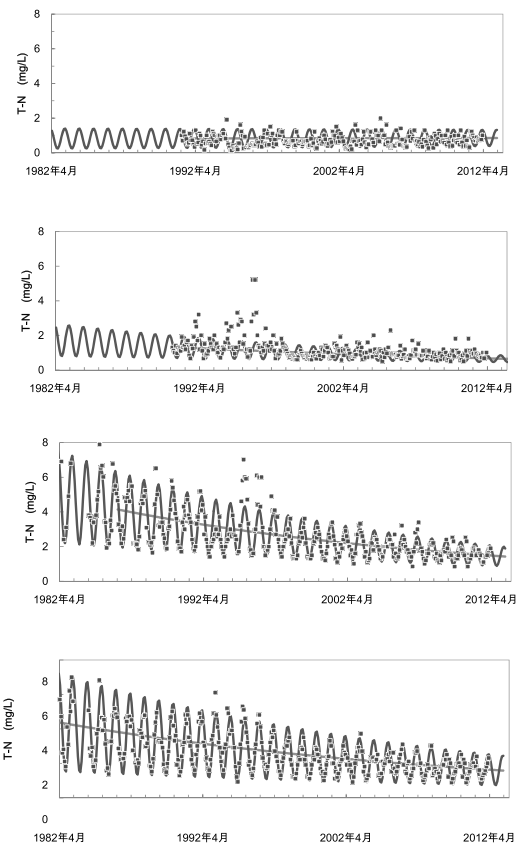


図6 児島湖流域のT-N

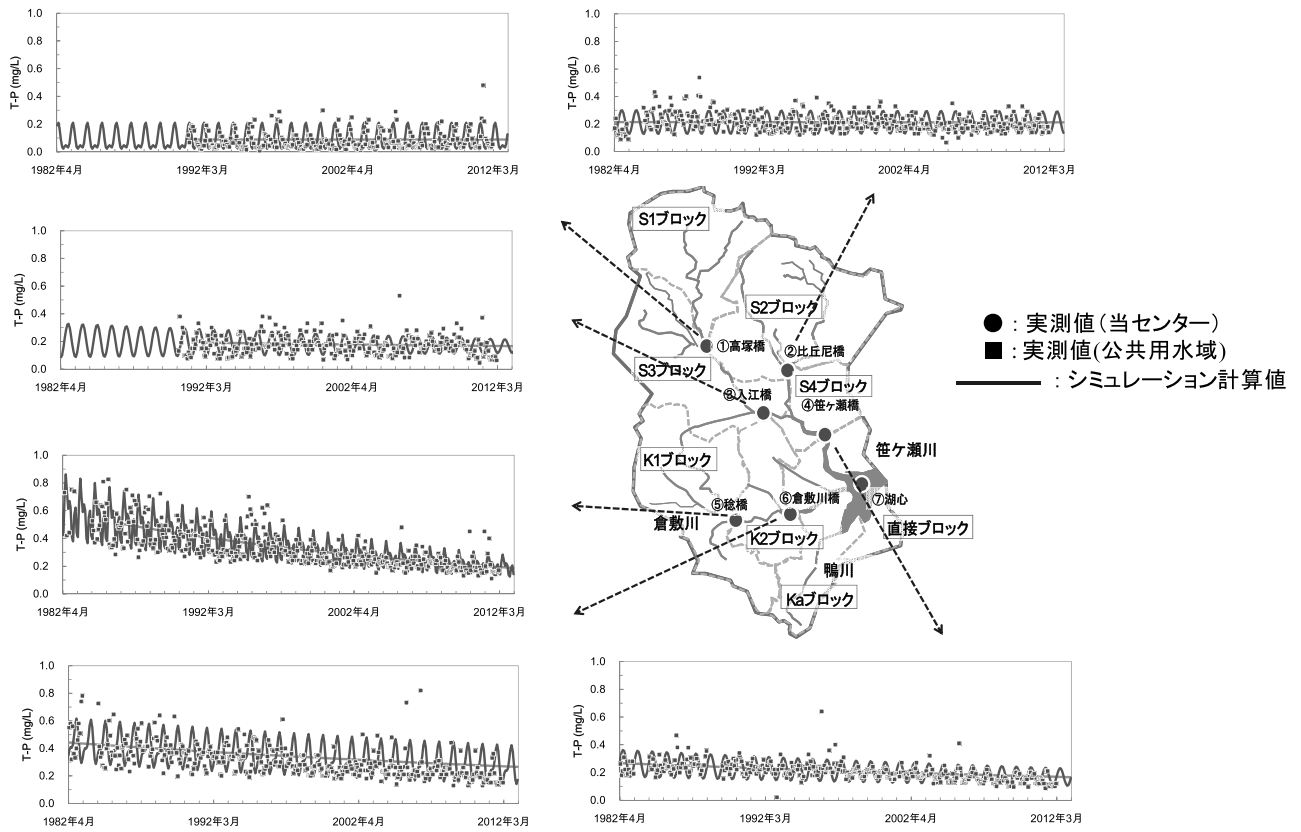


図7 児島湖流域のT-P

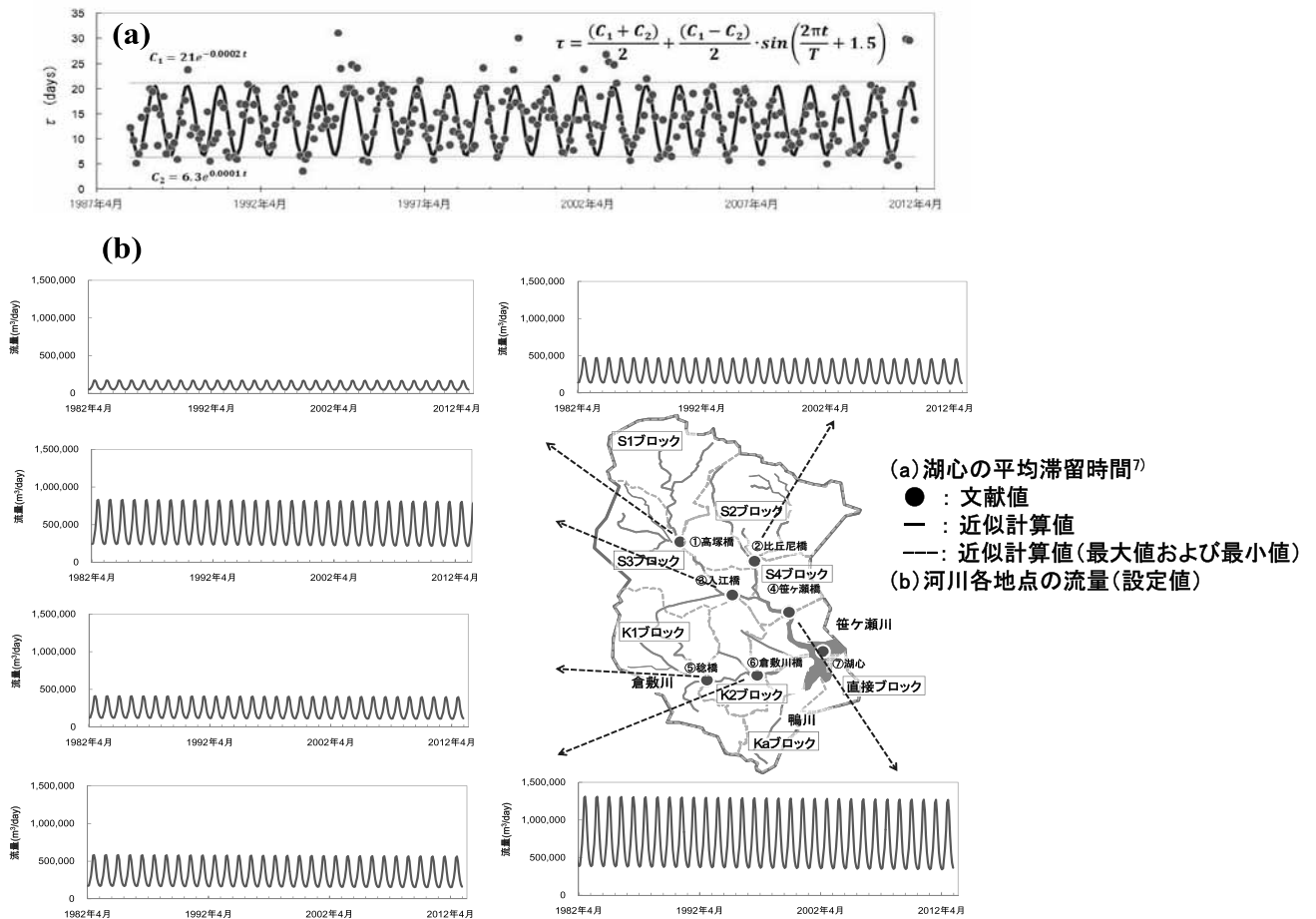


図8 児島湖流域の流量（設定値）

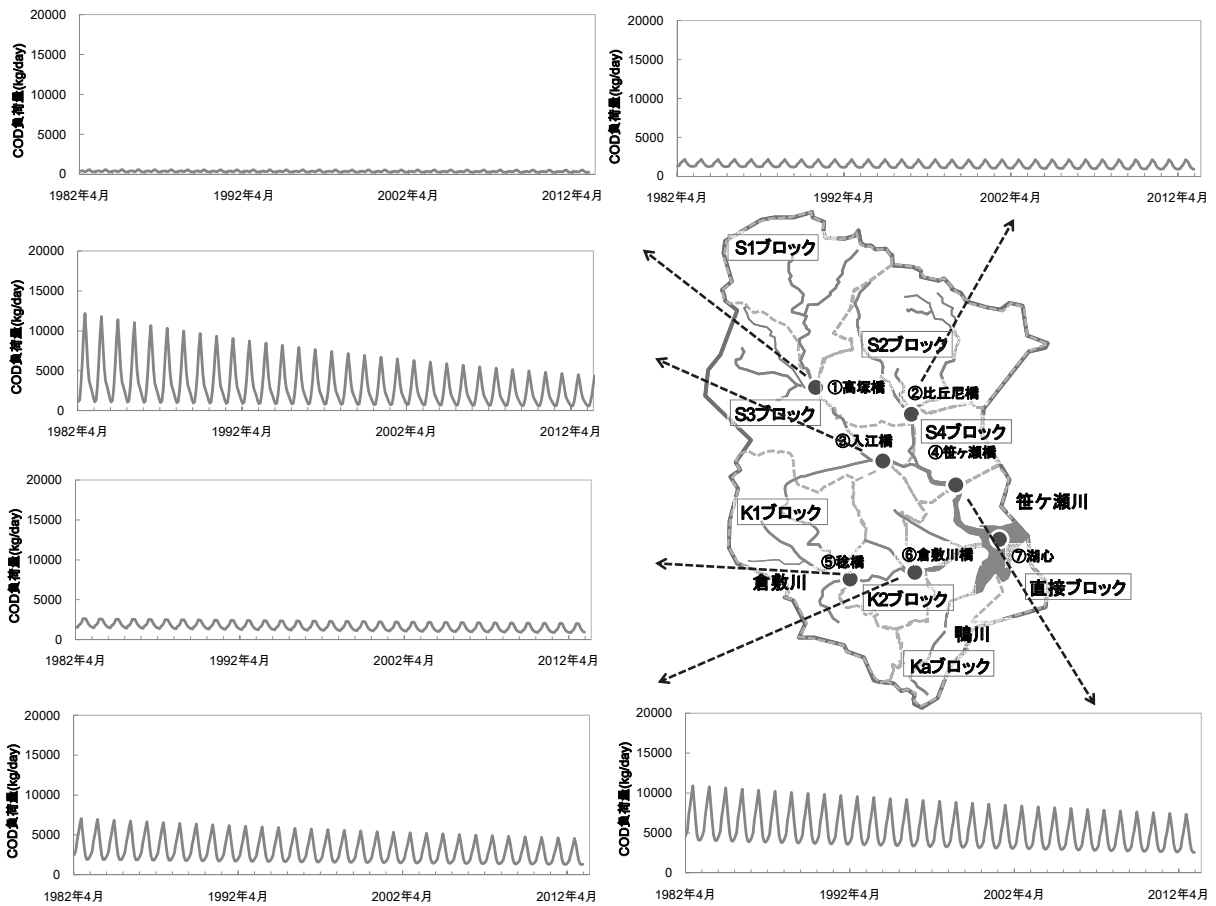


図9 児島湖流域のCOD負荷量（設定値）

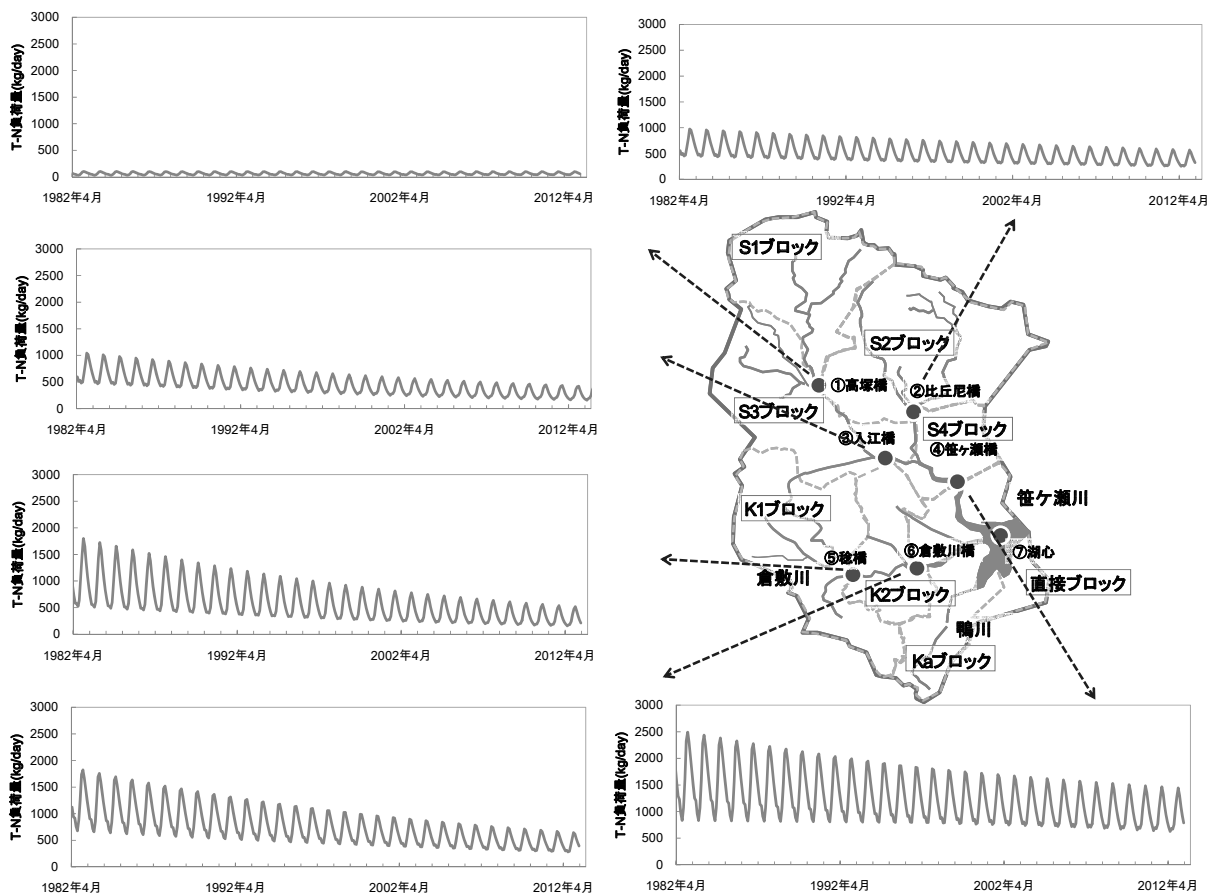


図10 児島湖流域のT-N負荷量（設定値）

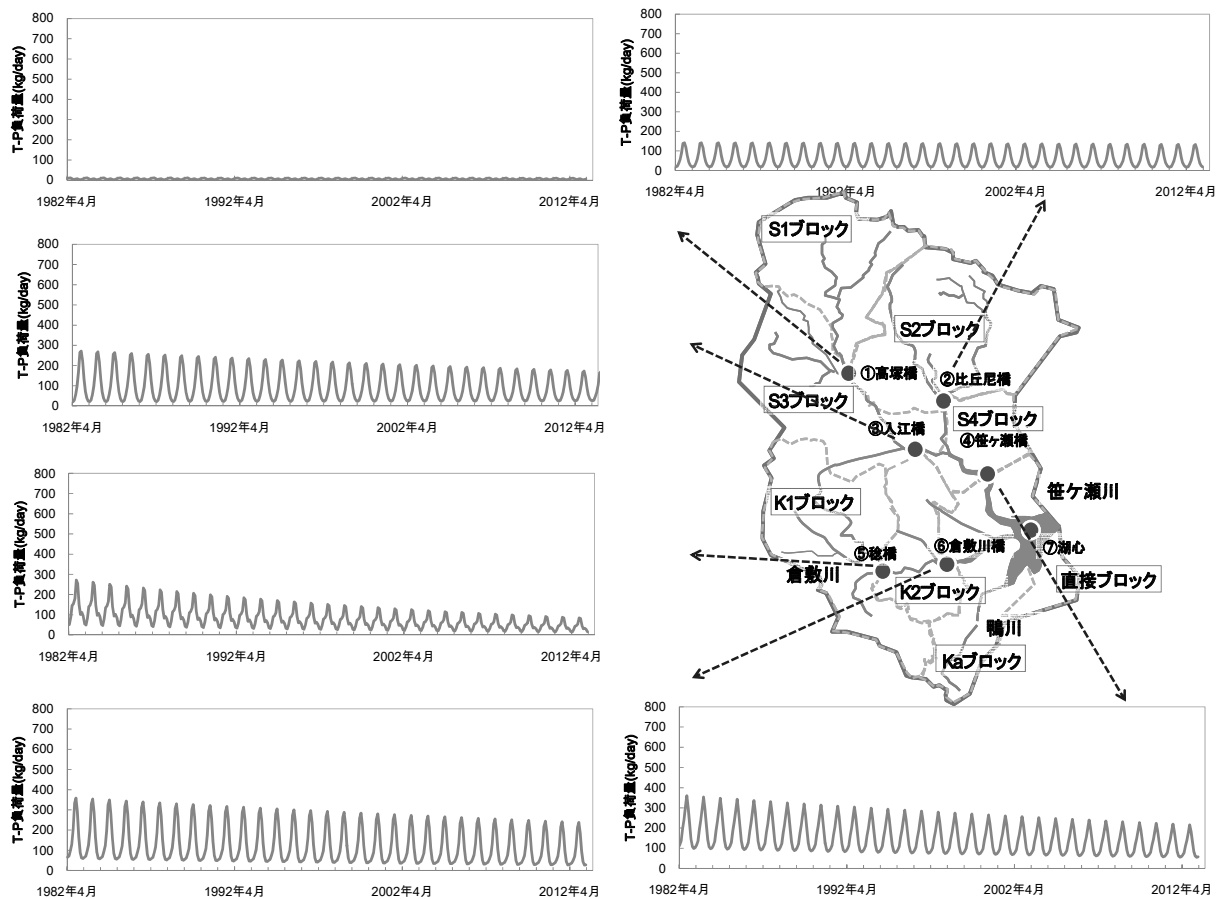


図11 児島湖流域のT-P負荷量（設定値）

3 結果および考察

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および公共用水域調査結果^{31)~37)}およびを用い、正弦曲線により近似させた。図5~7にCOD, T-NおよびT-Pを示す。笹ヶ瀬川の4地点および倉敷川の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、流量および汚濁負荷量の関係から各ブロックの流量およ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およびT-N）流入量を水質（図5~7）と流量（図8）を掛けて計算した（図9~11）。負荷量はCOD, T-Pおよび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。

3.2 湖心のシミュレーション計算

図12に最近30年間（1982~2012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およびT-P）のシミュレーション計算（図中の実線）および実測値を示す。児島湖湖心のCODおよびP-CODは実測値及びシミュレーション計算値において春期から夏期に高く秋期から冬期にかけて低い傾向がみられた。シミュレーション

計算の結果と実測値を比較すると、報告値（公共用水域、（1982~2012年度）^{31)~37)}でのCODの平均値は8.7mg/Lであったがシミュレーション計算値は8.6mg/Lであった。T-Nはシミュレーション計算の平均値が1.8mg/Lで公表されている公共用水域のT-N平均値（1982~2012年度）1.6mg/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0.22mg/Lで公表されている公共用水域T-P平均値（1982~2012年度）0.20mg/Lと近い値であった。

このシミュレーション計算を用い汚濁要因と将来の目標を達成するために必要な事業等の検討の一助とする。第6期湖沼水質保全計画⁷⁾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⁷⁾。この削減分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7.3mg/L（5.8%減少）、T-Nは年平均1.4mg/L（7.3%減少）、T-Pは年平均0.18mg/L（4.8%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。

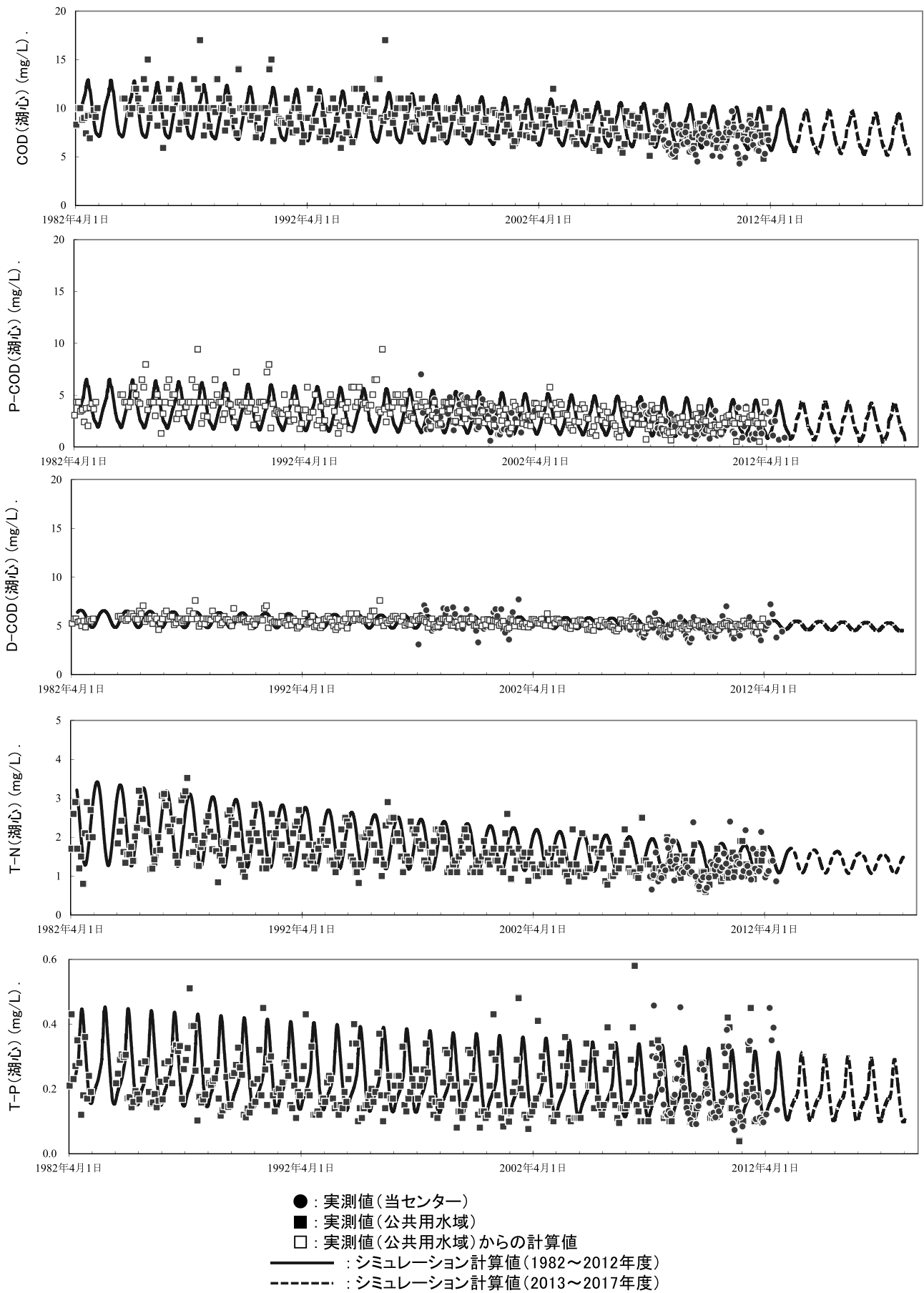


図12 児島湖湖心のCOD, T-N及びT-Pの実測値及び計算値

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、30年間（1982～2012年度）のシミュレーション計算を行った。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。湖心のCOD実測値及び計算結果は夏期に高く冬期に低い値で、COD（1982～2012年度平均値）が8.6mg/Lで実測値の8.7mg/Lと同等の値であった。T-Nは計算結果の平均値が1.8mg/Lで実測値の1.6mg/Lと同等の値であった。T-Pは計算結果の平均値が0.22mg/Lで実測値の0.20mg/Lと同等の値であった。

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) 藤田和男, 難波 勉, 難波あゆみ, 鷹野 洋, 板谷勉: 児島湖流域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, 36, 25-34, 2012
- 7) 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
- 8) 岡山県: 昭和57年度公共用水域水質測定結果, 1983
- 9) 岡山県: 昭和58年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1984
- 10) 岡山県: 昭和59年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1985
- 11) 岡山県: 昭和60年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1986
- 12) 岡山県: 昭和61年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1987
- 13) 岡山県: 昭和62年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1988
- 14) 岡山県: 昭和63年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1989
- 15) 岡山県: 平成元年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1990
- 16) 岡山県: 平成2年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1991
- 17) 岡山県: 平成3年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1992
- 18) 岡山県: 平成4年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1993
- 19) 岡山県: 平成5年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1994
- 20) 岡山県: 平成6年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1995
- 21) 岡山県: 平成7年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1996
- 22) 岡山県: 平成8年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1997
- 23) 岡山県: 平成9年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1998
- 24) 岡山県: 平成10年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 1999
- 25) 岡山県: 平成11年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2000
- 26) 岡山県: 平成12年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2001
- 27) 岡山県: 平成13年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2002
- 28) 岡山県: 平成14年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2003
- 29) 岡山県: 平成15年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2004
- 30) 岡山県: 平成16年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2005
- 31) 岡山県: 平成17年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2006
- 32) 岡山県: 平成18年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2007
- 33) 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, 2008
- 34) 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, 2009

- 35) 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, 2010
- 36) 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, 2011
- 37) 岡山県：平成23年度公共用水域及び地下水の水質測定結果, 2012
- 38) 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
- 39) 岡山県：児島湖ハンドブック, 52, 2013
- 40) 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
- 41) 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
- 42) 橋本洋志：Scilab/Scicosで学ぶシミュレーションの基礎, 5, オーム社, 東京, 2008
- 43) 大石進一：フーリエ解析, 7, 岩波書店, 東京, 1989

【資 料】

LC/MS/MSを用いた水質中マラカイトグリーンの分析

Analysis of Malachite green in Water by LC/MS/MS

大月史彦, 吉岡敏行, 山辺真一, 新 和大, 山本 淳 (水質科)

Fumihiko Otsuki, Toshiyuki Yoshioka, Shinichi Yamabe, Kazuhiro Atarashi, Jun Yamamoto
(Department of Water)

要 旨

水質苦情に伴い、環境試料（水質中）のマラカイトグリーンの分析法について検討した。

分析法は陽イオン交換カートリッジで濃縮後、カートリッジを水、有機溶媒の順に洗浄した後、アンモニア含有アセトニトリルで溶出し、LC/MS/MS（SRM法）で測定する方法とした。

苦情の環境試料を分析したところ、マラカイトグリーンが50 μ g/L程度検出された。参考として合わせて実施した添加回収試験や操作ブランク試験も良好な結果であった。

[キーワード：マラカイトグリーン, LC/MS/MS法]

[Key words : Malachite green, LC/MS/MS]

1 はじめに

平成24年4月、当県内で「河川が緑色に着色している」との苦情が寄せられた。採水に当たった職員が、水の色がマラカイトグリーンに似ていると証言したことから、マラカイトグリーンの分析を実施した。

マラカイトグリーンは、繊維等の染色や観賞魚の水カビ病の治療などに使用されているが、養殖水産動物への使用は禁止されており、過去には輸入の養殖鰻加工品などから検出された化合物である。

マラカイトグリーンの水質分析法は公定法がないため、文献^{1),2)}等を参考に独自法で実施したところ、マラカイトグリーンが50 μ g/L程度検出された。また、合わせて添加回収試験や操作ブランク試験を実施し、検討を行ったところ、若干の知見を得たので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

マラカイトグリーン : 林純薬工業製
塩酸 : 1 mol/Lに調製済みの市販品
ギ酸アンモニウム : 和光純薬工業製
濃アンモニア水溶液 : 25% 有害金属測定用和光純薬工業製
アセトニトリル : LC/MS用 和光純薬工業製
精製水 : ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調製
強酸性陽イオン交換カートリッジ : VARIAN MEGA BE SCX (1g, 6mL)

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 \times 2.1mm, 3 μ m
(Waters製)

移動相 : A (10mMギ酸アンモニウム水溶液) : B
(アセトニトリル)

0~0.1min A : B = 80 : 20

0.1~9 min A : 80 \rightarrow 0 B : 20 \rightarrow 100 linear gradient

9~20min A : B = 0 : 100

20~20.5min A : 0 \rightarrow 80 B : 100 \rightarrow 20 linear gradient

20.5~33min A : B = 80 : 20

流量 : 0.2mL/min

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

注入量 : 10 μ L

(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 $^{\circ}$ C

デゾルベーション温度 : 500 $^{\circ}$ C

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

コーン電圧 : 40V

コリジョンエネルギー : 25eV

モニターイオン

: 329.20 $>$ 329.20, 329.20 $>$ 313.17, 329.20 $>$ 208.11

(下線部は本分析で定量に用いたモニターイオン)

2.3 前処理操作

分析法のフローを図1に示す。

水質試料100mLを1 mol/Lの塩酸を用いてpH 3程度に調整する。これを、あらかじめアセトニトリル5 mL、水5 mLの順にコンディショニング済みの強酸性陽イオン交換カートリッジ (SCX) に10mL/minの速さで通水し捕集する。カートリッジを水10mL、アセトニトリル5 mLの順に洗浄する。これを、アセトニトリル：25%濃アンモニア水溶液 = 9：1 溶液10mLで溶出し、40℃以下で窒素を吹き付け、0.5mL程度に濃縮する。アセトニトリルで1 mLに定容し、試験液とする。なお、懸濁物がある場合にはフィルターでろ過を行い、試験液とする。試験液をLC/MS/MS-SRMにて分析する。

なお、検量線は1～100ng/mLの範囲であるため、試験液の濃度が範囲を外れる場合は適宜アセトニトリルで希釈し、範囲に入るように調製する。

2.4 検量線

マラカイトグリーン3mgを正確に量り取り、アセトニト

リルで10mLに定容し、300mg/Lの標準原液とした。

これを、アセトニトリルを用いて希釈し、1, 2, 5, 10, 20, 50, 100ng/mLの標準液を調製し、その10 μ LをLC/MS/MSに注入し、ピーク面積法により図2の検量線を作成した。

3 結果及び考察

3.1 質量分析条件の検討

MS条件の検討を行った。マラカイトグリーンは、容易にPositiveイオン化し、コリジョンの結果、そのまま(329.20)、脱メチル(313.17)、脱ジメチルフェニルアミン(208.11)等のイオンを生成する。

本測定における条件では、そのまま(329.20>329.20)のイオンが最も良い感度を示したが、脱ジメチルフェニルアミン(329.20>208.11)のイオンは、検量線の直線性が良く安定してイオン化することと、質量数が離れていることから選択性が良いと考えられたので、定量イオンは当該イオンを採用した。

また、上記3種類のイオンを同時にモニターし、同程度

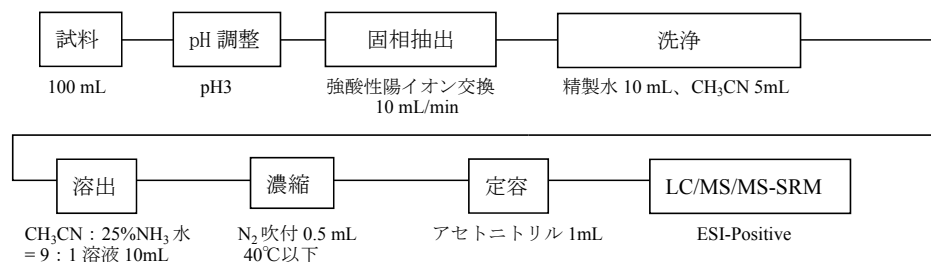


図1 分析法のフローチャート

Compound name: MalachiteGreen(329>208)
Correlation coefficient: $r = 0.999430$, $r^2 = 0.998861$
Calibration curve: $652.821 \cdot x + -170.81$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

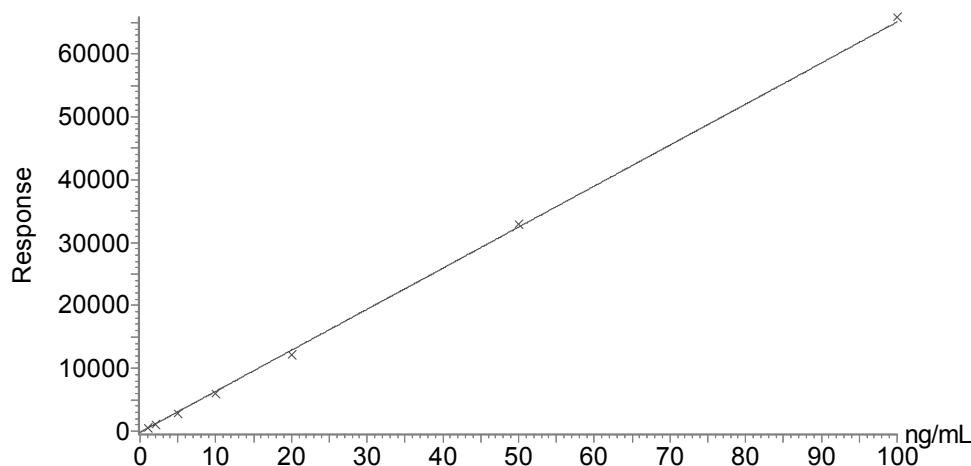


図2 検量線 (329.20>208.11のイオン)

の定量値となることを確認することで、より選択性が高くなるように留意した。

3.2 前処理法の検討

前処理法の検討を行った。食品中のマラカイトグリーン分析法¹⁾が厚生労働省から通知されており、これを参考にした。

マラカイトグリーンは容易に陽イオンになることから、塩酸性にしたのち、強酸性陽イオン交換カートリッジを用いて精製を行う方法とした。

本前処理により、十分な精製効果が得られるとともに、100倍の濃縮が可能となった。

3.3 添加回収試験結果

添加回収試験を実施したところ、76.6%と良好な回収率が得られた。標準液と添加回収試験のクロマトグラムを図3、4に示す。

添加回収試験は、市販のミネラルウォーター（ボルヴィックスティルウォーター）を用い、添加濃度は150 μ g/Lとした。添加濃度は苦情（50 μ g/L）よりやや濃い着色になるように調整し、オーバーロード等により破過が生じてないことを確認した。

なお、試験液は検量線の範囲内に入るように100倍濃縮の前処理後に1000倍希釈したため、測定溶液では15ng/mL

であった。

3.4 ブランク試験結果

ブランク試験を実施したところ、妨害となるピークは見られなかった。ブランク試験のクロマトグラムを図5に示す。

ブランク試験は、市販のミネラルウォーター（ボルヴィックスティルウォーター）を用いた。

なお、試験液は100倍濃縮の前処理後に若干の残渣が生じたため、10倍希釈したが、他のサンプルは1000倍希釈を行っていることから、十分な濃縮率となっていた。

3.5 河川水試験結果

河川水の試験を実施したところ、52.8 μ g/Lのマラカイトグリーンが検出された。河川水のクロマトグラムを図6に示す。

なお、試験液は検量線の範囲内に入るように100倍濃縮の前処理後に1000倍希釈したため、測定溶液では5.28ng/mLであった。

検量線の最低濃度の1ng/mLが十分な感度であることから、河川水中のマラカイトグリーンを10ng/L程度まで検出できることがわかった。

一般的に、マラカイトグリーンは50 μ g/L程度の濃度で魚の治療等に使用されることから、本事象は、使用済みあるいは不要となったものが何らかの原因で環境中に流出し

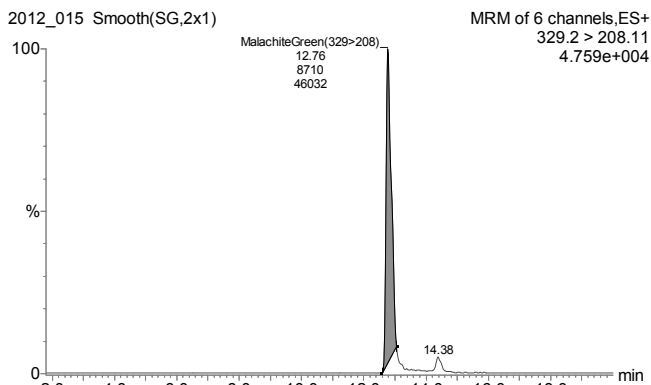


図3 標準液のクロマトグラム (添加回収試験濃度15ng/mL)

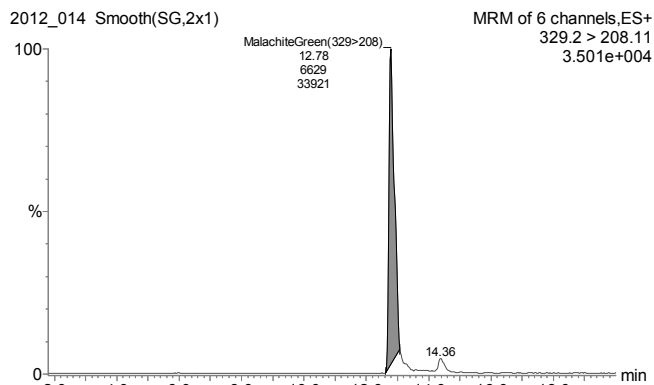


図4 添加回収試験液のクロマトグラム (1000倍希釈)

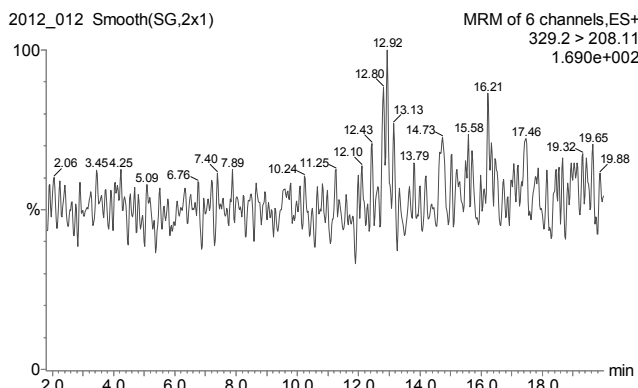


図5 ブランク試験液のクロマトグラム (10倍希釈)

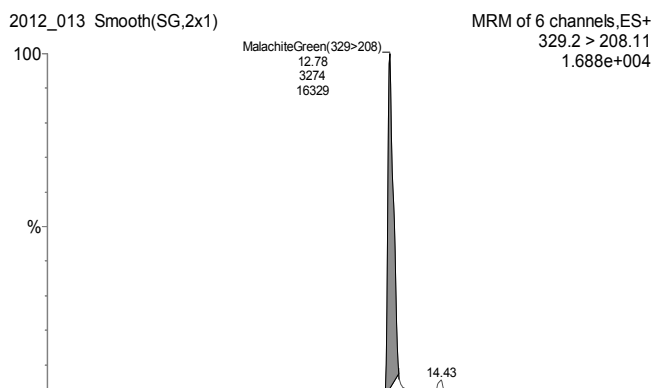


図6 河川水のクロマトグラム (1000倍希釈)

た可能性が考えられたが、発生源等の特定には至らなかった。

4 まとめ

河川の着色苦情に伴い河川水のマラカイトグリーンを分析を実施し、次の結果を得た。

- 1) 河川水から52.8 $\mu\text{g/L}$ のマラカイトグリーンが検出された。検出下限は10ng/L程度であった。
- 2) 強酸性陽イオン交換カートリッジによる前処理方法を検討し、76.6%の良好な回収率が得られた。
- 3) 市販のミネラルウォーターを用いてブランク試験を実施したところ、妨害となるピークは見られなかった。

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「個別試験法、マラカイトグリーン試験法」、食安発第0124001号、平成17年1月24日、2005
- 2) 日本ウォーターズ株式会社：マラカイトグリーンとその代謝物のLC/MS/MS分析、LC/MS/MS Application Notes, MSMSJ009

【調査研究】

岡山県内における環境放射能バックグラウンド調査

Survey of Environmental Radiation Background Level in Okayama Prefecture

森上嘉亮, 畑 陽介, 清水光郎, 片岡敏夫, 小川 登 (放射能科)
 Yoshiaki Morikami, Yousuke Hata, Mitsuo Shimizu, Noboru Ogawa
 (Department of Environmental Radiation)

要 旨

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）の事故発生後における県内の環境放射能レベルをメッシュ調査したところ、事故発生前の全国調査結果と同レベルであり、Cs-134等の原発事故由来と推測される核種の検出は見られなかった。

[キーワード：環境放射能, バックグラウンド, 原子力事故]

[Key words : Environmental Radiation, Background, 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福島第一原発の事故を契機として、著者らは緊急時モニタリング¹⁾を行った。それを契機に、平常時における一般環境における環境放射能レベルの把握が重要視されることとなった。平成24年度において、県内の環境放射能バックグラウンド調査を実施したので、概要を報告する。

2 調査方法

測定地点は、岡山県を図1に示す16メッシュに区切り、このうち、当センターが人形峠周辺の環境放射線等監視事業で測定を行っている地点を除き、サンプリングが可能な12メッシュについて表1に示す地点で平成24年度にサンプリング測定を行った。なお、測定手法は文部科学省放射能測定法シリーズに準じて行った。詳細については、次のおりである。また、各調査区内における調査地点は河川水については「環境基準法に定める水質汚濁に係る環境基準点」から、その他の項目については長期にわたり周辺環

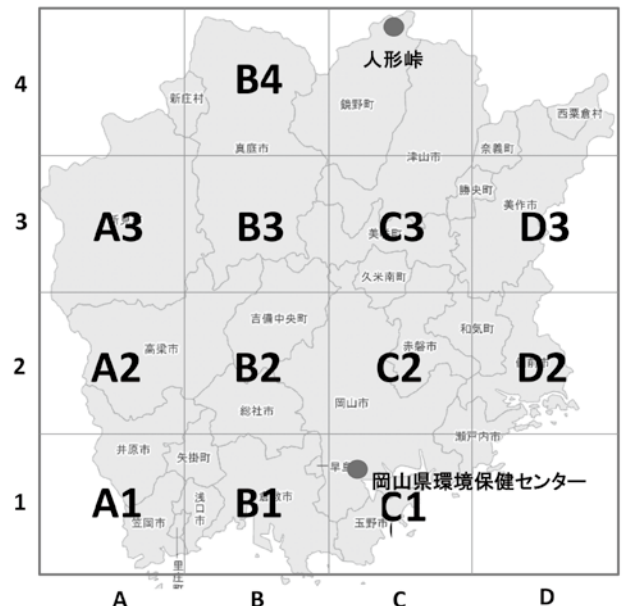


図1 広域エリア調査区

表1 広域エリア調査区一覧

測定エリア	空間線量率, 土壌調査地点	河川水調査地点
A1	笠岡市 岡山県笠岡地域事務所内	里見川 鴨方川合流点付近
A2	高梁市 岡山県高梁地域事務所内	高梁川中流 中井橋付近
A3	新見市 岡山県新見地域事務所内	高梁川上流 一中橋付近
B1	倉敷市 岡山県備中県民局内	小田川下流 福松橋付近
B2	加賀郡吉備中央町 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所内	宇甘川 箕地橋付近
B3	真庭市 岡山県真庭地域事務所内	新庄川 大久奈橋付近
B4	真庭市 岡山県農林水産総合センター農業研究所高冷地研究室内	旭川上流 野田橋付近
C1	岡山市 岡山県環境保健センター内	倉敷川 倉敷川橋付近
C2	岡山市 岡山県備前県民局内	旭川下流 桜橋付近
C3	津山市 岡山県美作県民局内	吉井川上流 嵯峨堰付近
D2	和気郡和気町 岡山県備前県民局東備地域事務所内	金剛川 宮橋付近
D3	美作市 美作県民局勝英地域事務所内	滝川 三星橋付近

境の変化が比較的少ないと考えられる公共施設から選定した。

2-1 空間 γ 線線量率

2-1-1 積算線量計法

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

2-1-2 サーベイメータ法

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

2-2 放射性核種及びふっ素濃度

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

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

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

2-2-1 土壌

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

2-2-2 河川水

河川水を採取し、F測定用試料とした。また、採水後にU-238測定用試料には硝酸を、Ra-226測定用試料には塩酸を加え試料とした。

3 結果及び考察

3-1 空間 γ 線線量率

3-1-1 積算線量計（RPLD）及びサーベイメータによる測定結果

RPLD測定結果を表2に、サーベイメータ測定結果を表3に示した。測定範囲はRPLDが0.046～0.109 μ Gy/h、サーベイメータが0.022～0.106 μ Gy/hであり、地域差が大きく、特にB4地域においては火山灰土壌であることから、他の地域に比べても低い傾向であることが分かった。また、県北においては、冬期において積雪によって地表面からの放射線が遮へいされることから、線量率の減少が見られたが、最大値は、岡山県が過去に行った県内広域サーベイ結果³⁾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 土壌

土壌中各種測定項目濃度の結果について、表4に示した。全ての検体でセシウム134（以下「Cs-134」）は検出されず、福島第一原発事故の影響は認められなかった。また、セシウム137（以下「Cs-137」）はB4地域において最大53.6Bq/kgが検出された。これは、平成24年度環境放射線等監視事業として人形峠周辺において検出された11～19Bq/kg³⁾を上回っていたが、当該地域は中国山地に位置し、標高が高く降雨の多い地域であり、事故発生前である平成18年度～平成22年度の全国の測定値ND～77Bq/kgの範囲⁴⁾内であることから、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、大きなばらつきがあるものと考えられる。

天然核種であるU-238濃度は0.008～0.036Bq/g乾、Ra-226濃度は0.024～0.078Bq/g乾であり、土質の違いによるばらつきと考えられた。

F濃度は150～310mg/kg乾であり、概ね、県北部に比べて県南部がより高い傾向であった。

3-2-2 河川水

河川水中各種測定項目濃度の結果について、表5に示した。全ての検体でCs-134は検出されず、福島第一原発事故の影響は認められなかった。また、U-238、Ra-226及びCs-137についても全ての検体で検出されなかった。F濃度は土壌と同様、概ね県南部が県北部に比べて高い傾向であった。Rn-222濃度はND～9.61Bq/Lであり、地域によって大きくばらつきがあることが認められた。

表2 積算線量計 (RPLD) 測定結果

単位: $\mu\text{Gy/h}$

測定エリア	第1四半期	第2四半期	第3四半期	第4四半期	範囲
A1	0.105	0.109	0.106	0.101	0.101 ~ 0.109
A2	0.097	0.103	0.099	0.090	0.090 ~ 0.103
A3	0.069	0.070	0.071	0.068	0.068 ~ 0.071
B1	0.069	0.070	0.069	0.069	0.069 ~ 0.070
B2	0.094	0.095	0.096	0.090	0.090 ~ 0.096
B3	0.078	0.080	0.075	0.075	0.075 ~ 0.080
B4	0.052	0.052	0.052	0.046	0.046 ~ 0.052
C1	0.086	0.089	0.087	0.086	0.086 ~ 0.089
C2	0.089	0.087	0.086	0.085	0.085 ~ 0.089
C3	0.079	0.079	0.076	0.074	0.074 ~ 0.079
D2	0.079	0.080	0.076	0.077	0.076 ~ 0.080
D3	0.090	0.093	0.088	0.087	0.087 ~ 0.093

表3 サーベイメータ測定結果

単位: $\mu\text{Gy/h}$

測定エリア	第1四半期(6月)	第2四半期(9月)	第3四半期(12月)	第4四半期(3月)	範囲
A1	0.086	0.096	0.090	0.096	0.086 ~ 0.096
A2	0.082	0.080	0.084	0.106	0.080 ~ 0.106
A3	0.044	0.050	0.050	0.050	0.044 ~ 0.050
B1	0.054	0.054	0.058	0.054	0.054 ~ 0.058
B2	0.076	0.074	0.074	0.100	0.074 ~ 0.100
B3	0.066	0.068	0.069	0.092	0.066 ~ 0.092
B4	0.032	0.034	0.022	0.036	0.022 ~ 0.036
C1	0.072	0.076	0.100	0.076	0.072 ~ 0.100
C2	0.078	0.076	0.084	0.070	0.070 ~ 0.084
C3	0.070	0.072	0.073	0.068	0.068 ~ 0.073
D2	0.070	0.070	0.065	0.066	0.065 ~ 0.070
D3	0.072	0.078	0.071	0.080	0.071 ~ 0.080

表4 土壌測定結果

測定エリア	採取年月日	U-238 (Bq/g乾)	Ra-226 (Bq/g乾)	F (mg/kg乾)	Cs-134 (Bq/kg乾)	Cs-137 (Bq/kg乾)
A1	H24.8.27	0.028 \pm 0.002	0.074 \pm 0.009	310	ND	ND
A2	H24.8.29	0.029 \pm 0.002	0.052 \pm 0.006	230	ND	2.16 \pm 0.29
A3	H24.8.27	0.016 \pm 0.001	0.034 \pm 0.004	180	ND	5.90 \pm 0.45
B1	H24.8.27	0.009 \pm 0.001	0.027 \pm 0.004	210	ND	2.57 \pm 0.29
B2	H24.8.29	0.036 \pm 0.002	0.078 \pm 0.009	280	ND	ND
B3	H24.8.29	0.024 \pm 0.002	0.044 \pm 0.005	290	ND	3.05 \pm 0.28
B4	H24.8.29	0.008 \pm 0.001	0.024 \pm 0.003	150	ND	53.6 \pm 0.95
C1	H24.8.28	0.029 \pm 0.002	0.056 \pm 0.007	300	ND	ND
C2	H24.8.29	0.017 \pm 0.001	0.027 \pm 0.004	310	ND	1.86 \pm 0.20
C3	H24.8.27	0.013 \pm 0.001	0.031 \pm 0.004	200	ND	4.77 \pm 0.39
D2	H24.8.29	0.008 \pm 0.001	0.029 \pm 0.004	290	ND	1.76 \pm 0.22
D3	H24.8.28	0.013 \pm 0.001	0.036 \pm 0.005	200	ND	1.16 \pm 0.21

ND:不検出の略(計数誤差の3倍未満とする。)

表5 河川水測定結果

測定エリア	採取年月日	U-238 (mBq/cm ³)	Ra-226 (10 ⁻² mBq/cm ³)	F (mg/L)	Rn-222 (Bq/L)	Cs-134 (Bq/L)	Cs-137 (Bq/L)
A1	H24.8.27	ND	ND	0.30	0.05±0.01	ND	ND
A2	H24.8.29	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A3	H24.8.27	ND	ND	0.06	0.14±0.02	ND	ND
B1	H24.8.27	ND	ND	0.27	0.40±0.03	ND	ND
B2	H24.8.29	ND	ND	0.27	1.26±0.06	ND	ND
B3	H24.8.27	ND	ND	0.07	0.28±0.03	ND	ND
B4	H24.8.29	ND	ND	ND	0.25±0.03	ND	ND
C1	H24.8.28	ND	ND	0.18	ND	ND	ND
C2	H24.8.28	ND	ND	0.15	ND	ND	ND
C3	H24.8.27	ND	ND	ND	0.07±0.02	ND	ND
D2	H24.8.27	ND	ND	0.11	9.61±0.16	ND	ND
D3	H24.8.28	ND	ND	0.09	0.19±0.02	ND	ND

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

4 まとめ・今後の展開

今回の広域調査により、平常時における各項目の濃度レベルを把握することができた。また、福島第一原発の事故によって岡山県内に飛来した放射性物質¹⁾は、局所的な高濃度集積はされていないと考えられた。

今後とも、岡山県内における空間 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たいと考えている。

文 献

- 1) 森上嘉亮, 西村佳恵, 清水光郎, 片岡敏夫:東京電力(株)福島第一原子力発電所事故に起因する県内における環境放射能調査, 岡山県環境保健センター年報, 36, 65-68, 2012
- 2) 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
- 3) 岡山県環境保健センター編:平成24年度人形峠周辺の環境放射線等測定報告書(2013)
- 4) 原子力規制庁:“環境放射線データベース”.
<http://search.kankyo-hoshano.go.jp/top.jsp>, (参照2013-04-01) .

【資 料】

同一地域に生育する松葉中ラジウム濃度調査

Survey of Radium Concentration in Pine Needle

森上嘉亮, 畑 陽介, 清水光郎, 片岡敏夫, 小川 登 (放射能科)
 Yoshiaki Morikami, Yousuke Hata, Mitsuo Shimizu, Noboru Ogawa
 (Department of Environmental Radiation)

要 旨

同一地域に生育する松葉及び土壌中のウラン238 (以下「U-238」という) 及びラジウム226 (以下「Ra-226」という) 濃度を調査したところ、松葉はRa-226をU-238に比べて選択的に吸収していることが認められた。また、松葉中Ra-226のTF値 (植物体中濃度/土壌中濃度) は約7倍の範囲であり、大きなバラツキが認められた。また、上下の生育部位により最大で約2倍の濃度差が認められた。

[キーワード: ラジウム, 松葉, 移行係数]

[Key words: Radium, Pine Needle, TF Value]

1 はじめに

岡山県では独立行政法人日本原子力研究開発機構人形峠環境技術センター周辺の環境放射線等の監視測定 (以下「人形峠センター周辺監視」という) を行っている。施設周辺の土壌, 樹葉, 野菜などを採取し, Ra-226やU-238濃度を測定しているが, 平成17年度に人形峠南部で松葉が生育不良により採取不能となったためサンプリングポイントを変更した際に, 過去の測定データに比べて若干高いRa-226が検出された (図1)。同一試料について, U-238は高い値が検出されなかった¹⁾ ことから, この原因は個体差によるものと推察された。また, 国際原子力機関が出版したTechnical Reports Series No.364 [Handbook of parameter values for the prediction of radionuclide transfer in temperate environments] によると²⁾, 農作物

におけるU-238やRa-226のTF値は95%信頼区間で2桁ほどのバラツキがあることが知られている。また, 採取部位の濃度差についても疑われたが, 著者が調べたところ, 同一樹木での葉の生育部位によるこれらの核種濃度のバラツキについては十分な知見がない。そこで, 同一と認められる対照地点で松葉及び土壌をサンプリング測定し, 自然変動によるバラツキを調査し, そのTF値について比較検討したのでその概要を報告する。

2 調査方法

岡山市北区に位置する後楽園を対照地点として, 園内で偏りのない地点となるように6本の松を選定した。松の高さ2分の1の上部及び下部に分け, それぞれの松葉と松が生育している土壌 (0~5cm) をサンプリング測定し, TF

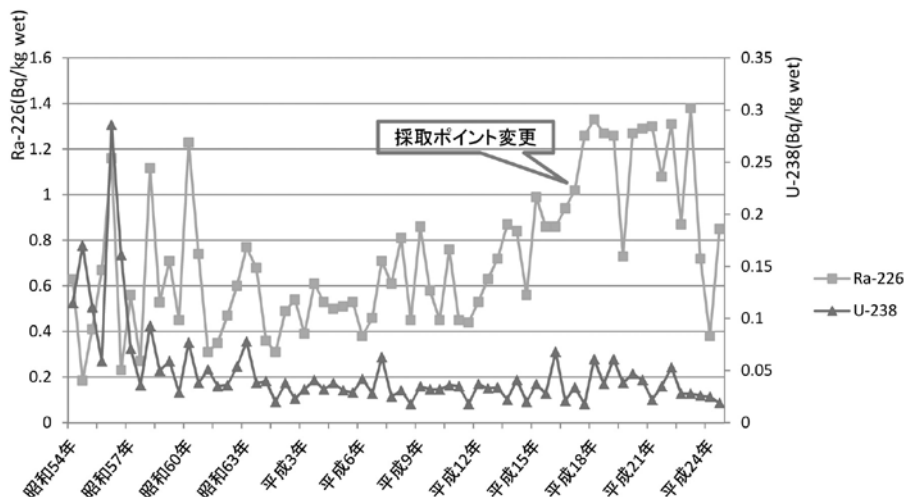


図1 人形峠南部における松中Ra-226, U-238濃度の経年変化

値を計算した。また、鏡野町上齋原人形峠南部における新旧両ポイントにおける土壌をサンプリング測定し、これまでの人形峠センター周辺監視結果¹⁾をもとに新旧両ポイントにおける松葉中Ra-226濃度の平均値から求めたTF値と比較検討した。なお、採取及び測定手法は文部科学省測定法シリーズに準じて行った。詳細については、次のとおりである。

2-1 試料採取

2-1-1 松葉

採取した松葉を灰化し、すりつぶしたものをポリ瓶に詰めて試料とした。

2-1-2 土壌

表土（0～5 cm）を採取し、2 mmの篩を通したものをU-238濃度測定用、300 μmの篩を通したものをRa-226測定用とし、ポリ瓶に詰め測定試料とした。

2-2 測定

2-2-1 Ra-226

2πガスフロー自動測定装置（LBC-4311-R）を用い、文部科学省測定法シリーズNo19ラジウム分析法に準じて測定した。

2-2-2 U-238

α波高分析装置（α-Analyst）を用い、文部科学省測定法シリーズNo14ウラン分析法に準じて測定した。

3 結果及び考察

人形峠南部でのサンプリング測定結果を表1に示す。旧ポイントにおいて、松葉中Ra-226濃度（平成10年度から平成16年度平均値）は0.71Bq/kg wetであり、新ポイントにおける松葉中Ra-226濃度（平成17年度から平成23年度平均値）は1.15Bq/kg wetであった。これらのTF値は1.1E-02及び1.6E-02であり、約1.5倍の差があった。対照地区でのサンプリング測定結果を表2に示す。TF値は1.5E-03～1.5E-02であり、約10倍の範囲においてバラツキが見られた。また、人形峠南部の松のTF値は対照地点の松のTF値の範囲内であり、新旧ポイント間における濃度差は個体差によるものと認められた。また、佐々木らの報告によると³⁾、農作物におけるRa-226のTF値は<7.8E-04～4.0E-03であり、松葉中R-226のTF値は一般的な農作物に比べてやや高い傾向であることが認められた。

また、同一樹木から採取した松葉であっても、Ra-226濃度には最大で約2倍程度の差が見られたことから、サンプリング部位によっても濃度に違いが生まれる可能性が認められた。

U-238についても、最大で、TF値については約6倍、同一樹木内における濃度は約3倍のバラツキが認められ、Ra-226と同様の傾向であった。

土壌中Ra-226及びU-238濃度は放射平衡にあることから、それらの濃度はほとんど違いがなかった。一方、人形

表1 人形峠南部新旧採取ポイントにおける松葉中Ra-226

NO	採取ポイント	松葉中濃度 対象期間	Ra-226			TF 値	
			土壌中濃度 (Bq/kg dry)		松葉中濃度 (Bq/kg wet)		
1	旧ポイント	平成10～16年度	65	±	6	0.71 ± 0.02	1.1E-02
2	新ポイント	平成17～23年度	70	±	7	1.15 ± 0.03	1.6E-02

表2 対照地点における松葉中Ra-226, U-238濃度に係る測定結果

NO	採取ポイント	松葉部位	Ra-226				U-238			
			土壌中濃度 (Bq/kg dry)	松葉中濃度 (Bq/kg wet)	TF 値	上/下比	土壌中濃度 (Bq/kg dry)	松葉中濃度 (Bq/kg wet)	TF 値	上/下比
1	A	上	26 ± 4	0.40 ± 0.09	1.5E-02	1.8	14 ± 1	0.019 ± 0.002	1.4E-03	0.5
2		下		0.22 ± 0.06	8.6E-03			0.041 ± 0.004	2.9E-03	
3	B	上	42 ± 5	0.06 ± 0.03	1.5E-03	0.7	22 ± 2	0.014 ± 0.002	6.4E-04	0.4
4		下		0.09 ± 0.04	2.2E-03			0.036 ± 0.003	1.6E-03	
5	C	上	28 ± 4	0.17 ± 0.06	6.1E-03	1.7	16 ± 1	0.021 ± 0.002	1.3E-03	0.7
6		下		0.10 ± 0.04	3.6E-03			0.030 ± 0.003	1.9E-03	
7	D	上	21 ± 3	0.13 ± 0.04	6.4E-03	0.6	18 ± 1	0.013 ± 0.002	7.2E-04	0.4
8		下		0.23 ± 0.06	1.1E-02			0.036 ± 0.004	2.0E-03	
9	E	上	22 ± 3	0.09 ± 0.04	4.1E-03	1.2	14 ± 1	0.010 ± 0.002	7.1E-04	1.4
10		下		0.07 ± 0.03	3.3E-03			0.007 ± 0.001	5.0E-04	
11	F	上	20 ± 3	0.10 ± 0.04	5.2E-03	0.8	13 ± 1	0.006 ± 0.001	4.6E-04	0.5
12		下		0.14 ± 0.05	6.8E-03			0.011 ± 0.002	8.5E-04	

峠南部及び後楽園に生育する松葉中のU-238濃度はRa-226濃度に比べて大幅に低い。このことから、通常に生育している松葉中Ra-226濃度は土壌の直接付着による寄与は少なく、根からの吸収によるものが主であると考えられた。

4 まとめ・今後の展開

今回の対照調査により、人形峠センター周辺監視における重要項目である松葉中Ra-226濃度についてのTF値の範囲を採取部位別で把握することができた。また、緊急時には樹葉への直接付着などによりRa-226及びU-238に係るTF値が大きく変動することが予想されるため、今後の監視測定の一助としたい。

文 献

- 1) 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（1979～2011）
- 2) IAEA：Handbook of parameter values for the prediction of radionuclide transfer in temperate environments, Technical Reports Series No.364, 14-26（1994）
- 3) 佐々木朋三，田代純利，藤永英司，石井友章，軍司康義：土壌から農作物へのウラン，トリウム，ラジウム及び鉛の移行係数と線量評価，保健物理，37(3)，208-221，2002

【資料】

金剛川水系における河川水中ラドン濃度調査

Investigation of the concentration of radon in river water in Kongo river

畑 陽介, 清水光郎, 小川 登, 森上嘉亮, 片岡敏夫 (放射能科)

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

要 旨

平成23年度及び平成24年度に岡山県内における環境放射能バックグラウンド調査として、県内12地点について河川水中のRn-222濃度（以下、ラドン濃度）の測定を実施したところ、金剛川（宮橋）において採取した河川水のラドン濃度が他地点と比較して若干高い値であった。そこで、金剛川水系のラドン濃度の調査を行った結果、数地点において湧水が確認され、湧水周辺の水からは比較的高濃度のラドンが検出された。金剛川の河川水は湧水によるラドンの供給と、揮散や希釈を繰り返しながら流下しており、宮橋は湧水地点直近の下流に位置することから、湧水の影響を受けて他地点よりもラドン濃度が高かったと考えられた。

[キーワード：ラドン, 湧水, 金剛川]

[Key words : Radon, Spring water, Kongo river]

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)福島第一原発の事故を契機として、平常時における環境放射能レベルの把握が重要視されていることから、岡山県内の環境放射能バックグラウンド調査を実施した。河川水中のラドン濃度調査はその調査の一環として行った。図1に平成23年度及び平成24年度において実施した県内メッシュ調査の区割りを示す。表1に結果を示すが、D2エリアの金剛川（宮橋）で採取した河川水中のラドン濃度が、県内の他地点に比べて高い値であったので

表1 県内における河川水中ラドン濃度調査結果

測定エリア	採取地点	ラドン濃度(Bq/L)	
		平成23年度	平成24年度
A1	里見川(鴨方川合流点)	0.49	0.05
A2	高梁川中流(中井橋)	0.30	0.00
A3	高梁川上流(一中橋)	0.15	0.14
B1	小田川下流(福松橋)	0.51	0.40
B2	宇甘川(箕地橋)	0.64	1.26
B3	新庄川(大久奈橋)	0.38	0.28
B4	旭川上流(野田橋)	-	0.25
C1	倉敷川(倉敷川橋)	0.11	0.01
C2	旭川下流(桜橋)	0.46	0.00
C3	吉井川上流(嵯峨堰)	0.15	0.07
D2	金剛川(宮橋)	7.00	9.61
D3	滝川(三星橋)	0.20	0.19

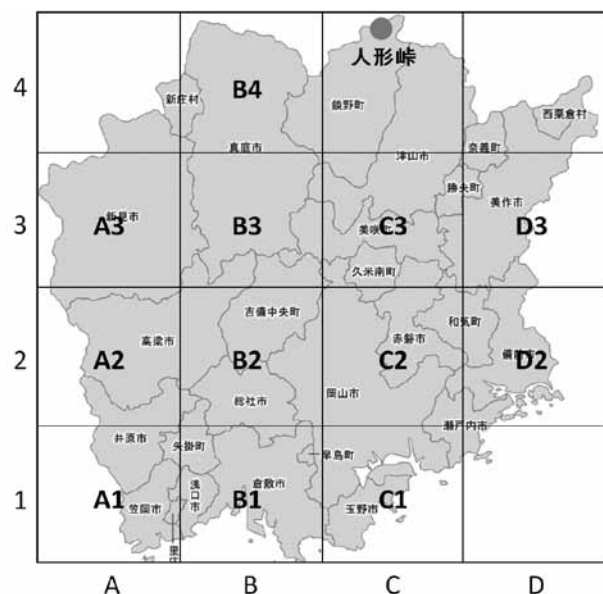


図1 広域エリア調査区

詳細調査を行った。

金剛川は岡山県南東部を流れる二級河川であり、岡山県の三大河川の一つである吉井川の支流である。金剛川上流には金・銀・銅・ろう石等の鉱山や鉱山跡地が数多く存在するため、これらの鉱床の周辺を流れる支流から金剛川本流への影響について調査を実施した。また、従来より湧水のラドン濃度は河川水に比べて高い^{1) 2)}ことが知られており、金剛川にも写真1に示す「金剛の湧水」が存在することが判明したことから、湧水による金剛川本流のラドン濃度への影響調査も行ったので、その概要を報告する。

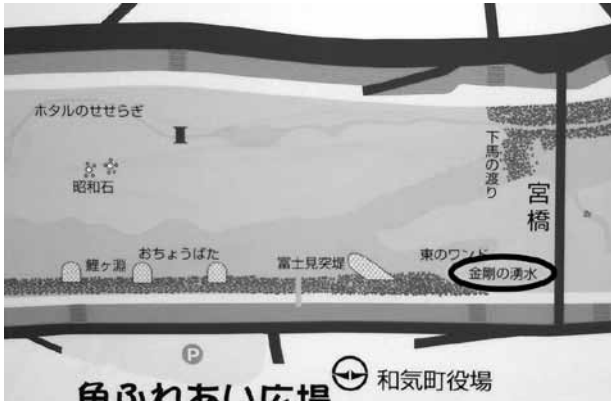


写真1 案内板(金剛の湧水)

2 調査方法

2-1 調査日

平成24年11月30日及び12月26日

2-2 試料採取方法

1 L 保存びん (SIBATA製 SPC保存びん 1722-291) に、ラドンが揮散しないよう静かに河川の表層水等を満水採取し、空気が入らないようにゴム栓を閉めて検体とした。

2-3 測定方法

トルエン抽出法³⁾を用いて測定を行った。水流アスピレーターを用いて1 L 保存びんの標線まで水を抜き取り、試料水を1 Lとし、トルエンシンチレータ (同仁化学研究所製 Scintisol AL-1) 50mLを加えて7分間振とうして抽出を行った。その後、ホールピペットを用いて有機相を20mL取り、バイアル瓶に静かに移して測定試料とし、液体シンチレーションカウンター (ALOKA製 Accu FLEX LSC 7400) を用いて10分間測定を行った。

3 結果及び考察

3-1 金剛川支流調査

金剛川支流調査の結果を図2及び表2に示す。金剛川に流入する支流のラドン濃度は0.36~2.55Bq/Lの範囲で

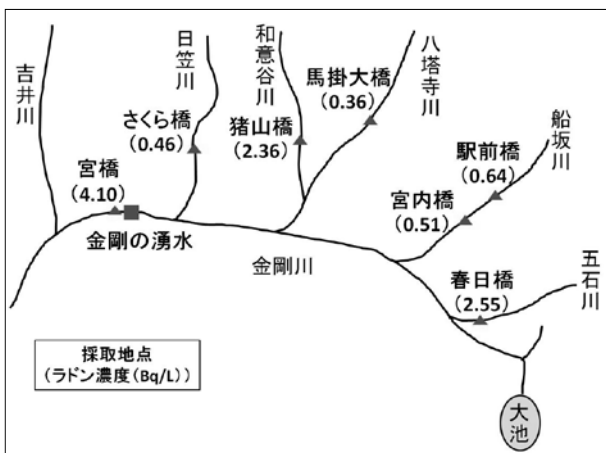


図2 金剛川支流のラドン濃度

表2 金剛川支流調査結果

調査日 平成24年11月30日		
採水地点	水温 (°C)	ラドン濃度 (Bq/L)
五石川(春日橋)	10.4	2.55
船坂川(駅前橋)	9.3	0.64
船坂川(宮内橋)	9.3	0.51
八塔寺川(馬掛大橋)	9.7	0.36
和意谷川(猪山橋)	11.9	2.36
日笠川(さくら橋)	11.8	0.46
宮橋	12.4	4.10

あり、日本における河川水のラドン濃度の範囲⁴⁾ (<0.1~14.6Bq/L) と同程度であった。また、県内の他地点と比べても同程度であった。鉱山や鉱山跡地が点在する支流については、ラドン濃度の高い地点は認められなかった。

なお、ラドンは希ガスであるため揮散しやすく、流下するにつれてラドン濃度は低下する傾向がある。そのため支



写真2 セリ科の植物と湧水場所(吉永)

表3 金剛川本流調査結果

調査日 平成24年11月30日及び12月26日			
採水地点	採取日	水温 (°C)	ラドン濃度 (Bq/L)
河川水			
大池	平成24年12月26日	4.8	0.12
大池の下流	平成24年12月26日	2.6	0.84
オノ谷川	平成24年12月26日	5.3	0.27
愛宕橋	平成24年12月26日	7.1	2.23
渡瀬歩道橋	平成24年12月26日	5.4	1.66
野谷金剛川橋梁	平成24年12月26日	6.3	1.67
海洋センター	平成24年11月30日	11.6	2.66
大五郎橋	平成24年12月26日	7.6	4.43
吉田堰	平成24年11月30日	13.6	6.32
小松原橋	平成24年12月26日	7.9	2.30
平病院	平成24年11月30日	11.8	1.83
和気町体育館前	平成24年12月26日	7.3	2.72
湧水			
湧水(吉永)	平成24年11月30日	13.4	12.46
湧水(金剛の湧水)	平成24年12月26日	13.3	16.13

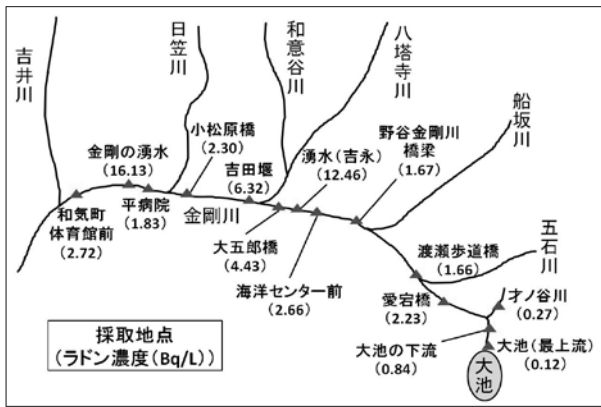


図3 金剛川本流のラドン濃度

流のラドン濃度が低いこと及び流下する間の揮散効果や水量の増加に伴う希釈効果により、宮橋でのラドン濃度に対する影響は小さいと考えられた。

3-2 金剛川本流調査

金剛川本流の最上部から下流域までの調査結果を表3及び図3に示す。中流域である大五郎橋が4.43Bq/Lで若干高い傾向であった。その付近の詳細調査をすると、写真2のようにセリ科の植物が群生する地点があり、水温も13.4℃と周辺より高く、湧水の存在が疑われてたため周囲を詳細に調査すると、目視により湧水が確認された。また、その周辺のラドン濃度は12.46Bq/Lと比較的高い値であり、湧水からのラドンが供給源となり⁵⁾、大五郎橋のラドン濃度を高めていると考えられた。

また、中流域の吉田堰は6.32Bq/Lと比較的高い値であるが、河川流量が多かったため湧水は確認できなかった。

3-3 「金剛の湧水」調査

「金剛の湧水」周辺の調査結果を表4及び図4に示す。

本流調査同様にセリ科の植物が群生する地点があり、護岸工事が行われた川岸付近で目視により湧水が確認された。

湧水が確認された場所周辺のB, C, D地点のラドン濃度は8.06~16.53Bq/Lであり、ラドン濃度が高い傾向であった。一方、中洲を挟んだ反対側のE地点では1.48Bq/Lと明



写真3 セリ科の植物と湧水場所(金剛の湧水)

らかに低い値を示しており、湧水場所よりも上流のA地点と同程度であった。日本における湧水のラドン濃度は12.98~1281Bq/Lの報告⁴⁾があり、「金剛の湧水」はこれと比較しても特段高い値ではなかった。

これらのことから、宮橋は金剛川本流と湧水が合流した約150m下流に位置するため、湧水による影響で4.10Bq/Lという比較的高い値が検出されたものと考えられた。

表4 金剛の湧水調査結果

調査日 平成24年11月30日		
採水地点	水温 (°C)	ラドン濃度 (Bq/L)
A	11.9	1.89
B	12.0	8.06
C	16.1	16.53
D	15.7	16.16
E	11.8	1.48
宮橋	12.4	4.10

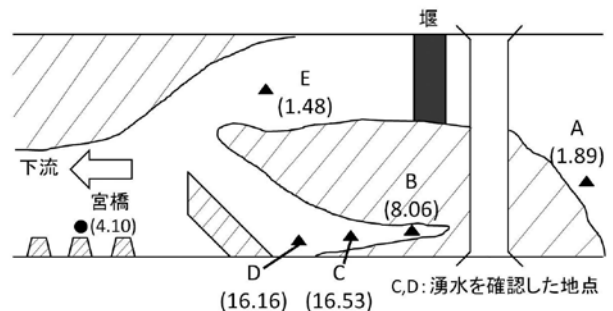


図4 金剛の湧水周辺の拡大図

4 まとめ

金剛川水系のラドン濃度は河川水が0.12~6.32Bq/L、湧水が8.06~16.53Bq/Lの範囲であった。金剛川に流入する支流のラドン濃度は0.36~2.55Bq/Lの範囲であり、鉱山や鉱山跡地からの影響によるラドン濃度の高い支流は認められなかった。平成14~23年度における岡山県北部の人形峠周辺の河川水中ラドン濃度は0.04~9.38Bq/L⁶⁾であり、金剛川水系のラドン濃度は同程度であった。温泉法では鉱泉の基準をラドン濃度が74Bq/L以上、療養泉の基準を111Bq/L以上と定めている。また、WHOのガイドラインでは、飲料水中のラドン濃度が100Bq/Lを超える場合は何らかの制限を求めているが、金剛川水系のラドン濃度はそれらと比較しても十分に低い値であった。今回の調査により、河川水中のラドン濃度を測定することは湧水地点を確かめる一つの指標として有用であることが確認できた。また、金剛川本流においてラドン濃度の高い湧水が数地点存在することが明らかとなった。宮橋においてラドン濃度が高かったのは、上流に存在する「金剛の湧水」の影響を強く受けたためであると考えられた。

文 献

- 1) 榑崎幸範, 石川徹夫: 水中ラドンに起因する被ばく, 水中ラドンに関する専門研究会活動報告書, 54-65, 2004
- 2) 金井豊: 福島県における温泉・湧水中の天然放射性核種, 地質調査研究報告, 53, 559-571, 2002
- 3) 野口正安: 液体シンチレーターによるRadonの放射能測定, Radioisotopes, 13, (5), 362-367, 1964
- 4) 安岡由美, 堀内公子: 日本における天然水中のラドン濃度, 水中ラドンに関する専門研究会活動報告書, 5-15, 2004
- 5) 石井聡, 東一樹, 土原健雄, 吉本周平, 今泉眞之: 河川水中のラドン濃度測定による地下水湧出の推定, 農工研技報, 209, 7-15, 2009
- 6) 岡山県環境保健センター: 人形峠周辺の環境放射線等測定報告書, 2003-2012

【資 料】

大気浮遊塵中の全 α 放射能濃度と土壤水分、地中温度との関係

Relation between gross α activity concentration and soil moisture, soil temperature

片岡敏夫, 小川 登, 清水光郎, 森上嘉亮, 畑 陽介 (放射能科)

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

要 旨

人形峠周辺の放射線監視において、大気中に放出されるウランを監視するため、大気浮遊塵中全 α 放射能濃度（主にトロンの子孫核種の寄与）を測定している。土壤水分及び地中温度が大気浮遊塵中全 α 放射能濃度へ与える影響を検討するため、2003年度から10年間3観測局において地表面近傍の土壤水分と地中温度の測定を行った。測定結果の検討から、土壤水分が多い場合に全 α 放射能濃度は低く測定される傾向があり、過去の研究報告と整合していることがわかった。一方、全 α 放射能濃度と地中温度の間には相関関係が認められなかった。

[キーワード：全 α 放射能濃度, 土壤水分, 地中温度, 降水, 大気安定度]

[Keywords : Gross α activity concentration, Soil moisture, Soil temperature, Precipitation, Atmospheric stability]

1 はじめに

人形峠周辺の放射線監視において、大気中に放出されるウランを監視するため、大気浮遊塵中全 α 放射能濃度（以下「全 α 放射能濃度」と記す）を測定している。バックグラウンドとして測定される全 α 放射能は、主に地表面から供給されるトロン（ ^{220}Rn ）の崩壊生成物（子孫核種）によるものである¹⁾。

地表面薄層の土壤状態（土壤水分及び地中温度）が地表面から大気中へのトロンの供給量を変動させるといわれており²⁾、その変動が全 α 放射能濃度に与える影響を検討するため2003年度から2012年度までの10年間、人形峠観測局、赤和瀬観測局、天王観測局の3観測局（図1）において、地下20cmの土壤水分と地下15cmの地中温度の測定を行ない、それらと全 α 放射能濃度の関係についてとりまとめたので報告する。

2 測定方法及び測定条件

全 α 放射能濃度の測定は、富士電機(株)製NAD23803型を使用して大気浮遊塵を流速約250N m^3/min で3時間濾紙HE-40T上に捕集し、捕集終了後7時間経過した後、50mm ϕ のZnS (Ag) シンチレーション検出器により α 線を測定している。測定方法の詳細については、柚木他³⁾に記述されている。

土壤水分の測定は、Macaulay土地利用研究所とDelta-T Devices社が共同開発したプロファイルプローブPR1型（電磁波の反射の測定により評価された土壤誘電率を土壤含水

量に変換）を使用した。この報告では、土壤水分は体積含水率（%）⁴⁾で表す。地中温度の測定は、(株)池田計器製作所製PT-100G型（測定された白金測温抵抗体の抵抗値を温度に変換）を使用した。それらの測定条件を以下に示す。

土壤水分 深さ：20cm（土壤水分1）及び100cm（土壤水分2）

地中温度 深さ：15cm（地中温度1）及び40cm（地中温度2）

3観測局とも、降水等による土壤の流出を防ぐため、地表面は砂利（バラス）である。人形峠観測局及び赤和瀬観測局では地表面から深さ約40cmまではバラス、天王観測局



図1 観測局の配置

では10cm厚のバラスの下に5cm厚の真砂土（花崗岩風化土壌），その下はいずれの観測局も黒ボク様の土であるという圃場の制約がある。本来ならば周辺土壌と同一の環境で地表面薄層の測定を行うことが望ましい²⁾が，定性的傾向を知るために上記条件下で測定を行った。

このとりまとめにあたって，土壌水分2及び地中温度2は参考として測定しているのので，以下の解析は土壌水分1及び地中温度1の測定データのみを使用しそれぞれ土壌水分及び地中温度と表記する。

また，気象データについては，赤和瀬観測局に設置されている気象観測機器による観測結果を用いた。降水については，降水量が0.5mm未満の場合感雨によって降水の有無を評価した。

3 結果及び考察

2003年度から2012年度の10年間の3観測局の全 α 放射能濃度，土壌水分及び地中温度（各年平均値）の経年変化を図2に示す。全 α 放射能濃度は2006年度と2008年度に3観測局とも高い傾向が見られた。しかし，土壌水分と地中温度はこのような傾向は見られなかった。地中温度は3観測局とも年度によるレベルの変動はほとんどみられなかった。土壌水分については，人形峠観測局の測定値はやや安定している（10年間で約10%上昇）が，赤和瀬観測局（10

年間で約80%上昇）及び天王観測局（10年間で約20%変動）は測定値が不安定であった。不安定の原因は，主として土壌水分計の経年劣化が考えられる。また，3観測局で土壌水分が異なるのは，地下水面の深さや設置状況等に起因すると考えられる。

土壌水分が3観測局とも比較的安定している2005年度の前後を含めた3年間で最近の3年間の人形峠局における全 α 放射能濃度と土壌水分（各時間値）の関係を年度別に図3に示す。各年とも類似したパターンを示しているのので，単年度の解析で十分と考えられる。

以下，設置時近辺で3観測局とも土壌水分の測定値が比較的安定している2005年度について記述する。

2005年度の全 α 放射能濃度，土壌水分及び地中温度（各月平均値）の年変化を図4に示す。全 α 放射能濃度（月平均）については，人形峠観測局では6月にピークがあり8月～11月はやや高くなっており，赤和瀬観測局では5月，8月，11月にピークがあり，天王局では6月と11月にピークがある。このピークの現れる月は毎年変わっている。土壌水分（月平均）については，3局でレベルの差はあるが，各観測局ともおおむね1年を通じて同レベルで推移している。地中温度（月平均）については，いずれの観測局も夏高く冬低い傾向を示している。

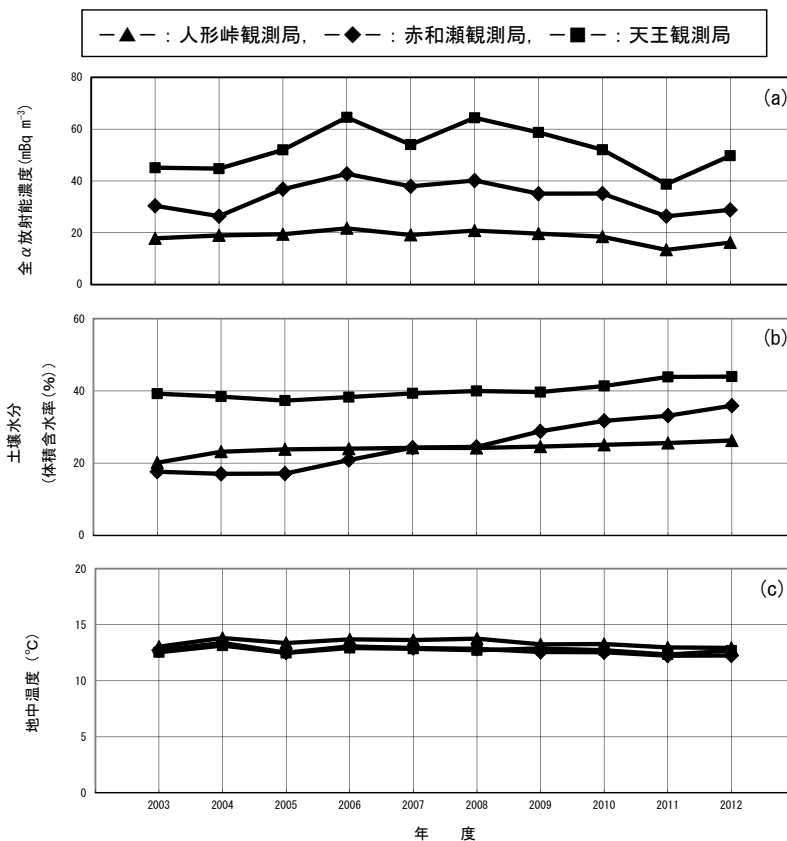


図2 全 α 放射能濃度，土壌水分及び地中温度（各年平均値）の経年変化
(a)：全 α 放射能濃度，(b)：土壌水分，(c)：地中温度

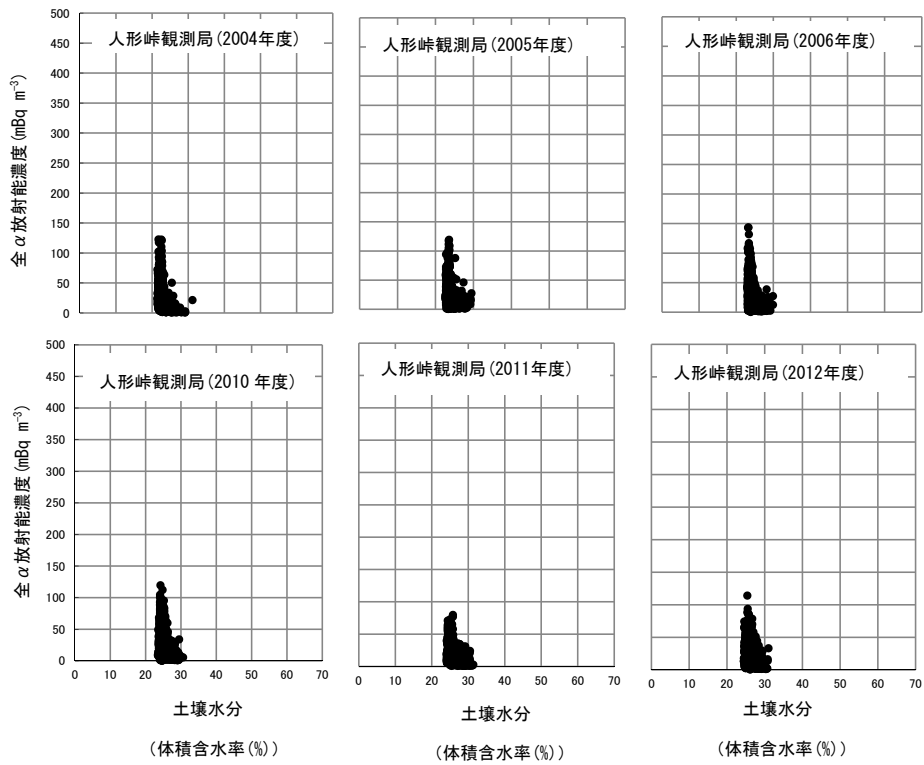


図3 人形峠観測局の全 α 放射能濃度と土壌水分(各時間値)の関係(年度別)

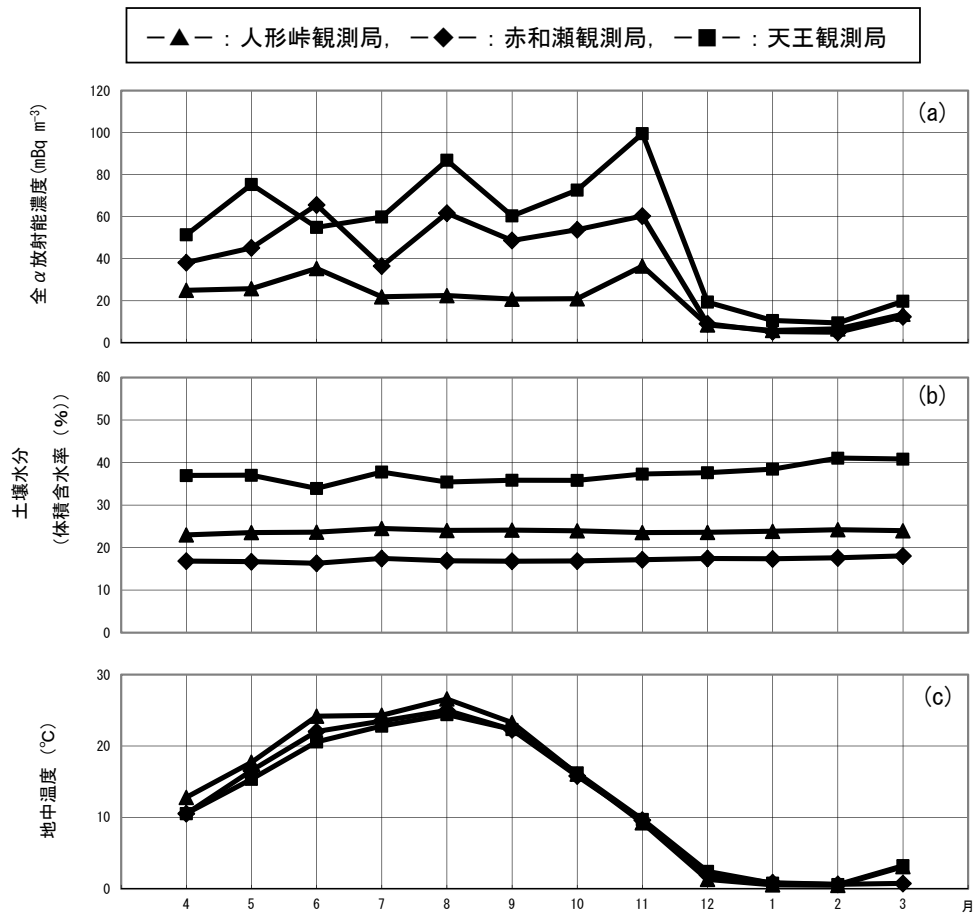


図4 全 α 放射能濃度, 土壌水分及び地中温度(各月平均値)の年変化グラフ(2005年度)
(a): 全 α 放射能濃度, (b): 土壌水分, (c): 地中温度。

より短期間の変動を見ると、降水と土壌水分、全 α 放射能濃度の関係がわかりやすい。降水が無い場合に全 α 放射能濃度の変動幅が大きく、降水があり土壌水分が多くなった場合にその変動幅が小さい傾向があることが分かる具体例として、図5に2005年9月1日から9月7日までの赤和

瀬観測局の全 α 放射能濃度、大気安定度、降水量、土壌水分及び地中温度（各時間値）の経時変化を示す。全 α 放射能濃度は大気が不安定の場合低濃度となり安定の場合高濃度となる^{5, 6)}が、9月3日の降水直後の夜間は大気安定度E（安定¹⁰⁾であるが降水による減少が回復しつつある時で

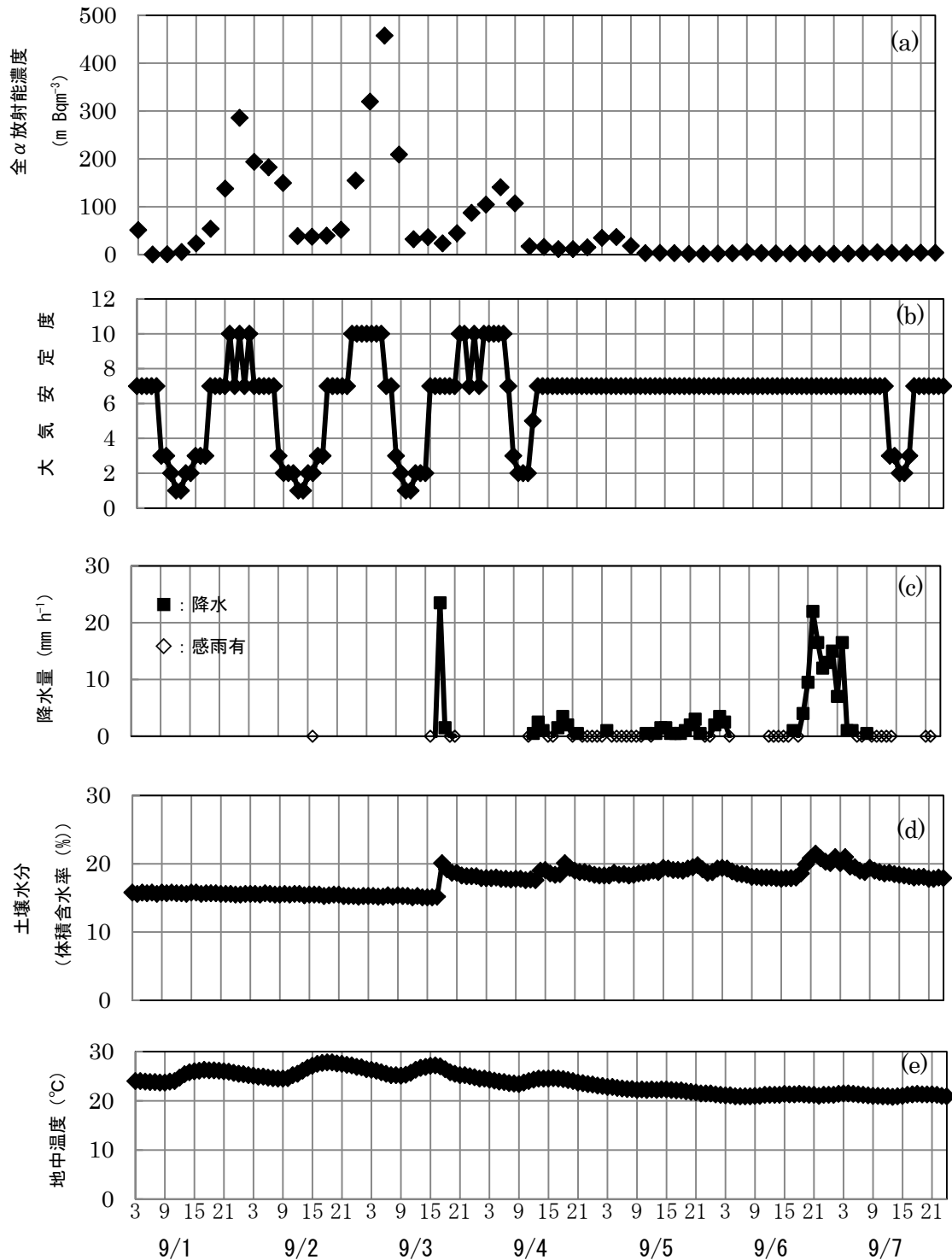


図5 赤和瀬観測局の全 α 放射能濃度、大気安定度、降水量、土壌水分及び地中温度（各時間値）の時間変動（2005年9月1日～9月7日）(a) 全 α 放射能濃度、(b) 大気安定度(1:A, 2:A-B, 3:B, 4:B-C, 5:C, 6:C-D, 7:D, 8:E, 9:F, 10:G)、(c) 降水量、(d) 土壌水分、(e) 地中温度

あり、9月4日から7日の明け方にかけての夜間は大気安定度D（中立¹⁰）でかつ降水があり（9月4日の夜間は降水後感雨があるため降水とする）、それぞれの夜間で濃度が上昇しておらず、降水の影響がある場合は夜間でも濃度が高くないという報告^{6, 7}と一致している。

全 α 放射能濃度は12月から3月にかけて低い値で推移しているが、これは地表面から出たトロンが短い半減期により積雪の中で崩壊してしまうため、その大気中への放出量が減少することによる⁷と考えられる。従って、これ以後は積雪のない5月から11月までのデータを用いて解析した。また、この期間の土壌水分の体積含水率の上昇は全て降水時に起こっているので、これ以後体積含水率が高い場合は降水時として取り扱う。

2005年度の全 α 放射能濃度、土壌水分及び地中温度（各月平均値）の季節別（夏（6月～8月）、秋（9月～11月））における日変化を図6に示す。全 α 放射能濃度は昼間に低く夜間に高い傾向を示し、3観測局とも夏及び秋ともにほぼ同レベルで推移している。土壌水分は、3観測局

でレベルの差はあるが、ほとんど変動が認められない。地中温度は、3観測局でレベルの差が若干あるが、各観測局とも昼間に上昇し夜間に低下しており、日射の影響で変動している⁸。

2005年度の全 α 放射能濃度と地中温度（各時間値）の関係を図7に示す。これらの間には相関関係が認められない。

2005年度の全 α 放射能濃度と土壌水分（各時間値）の関係を図8に示す。全 α 放射能濃度は土壌水分の少ない非降水時には全 α 放射能濃度は低濃度から高濃度まで分布するが、降水時及びその直後の土壌水分が多い場合には低い濃度に集まる傾向があり、特に天王観測局で顕著である。これは、降水時及びその直後には、土壌からの²²⁰Rnの散逸率が²²²Rn同様減少すること^{7, 9}、washoutによりトロン子孫核種が大気中から除去されること⁷及び降水中の大気安定度はDの状態即ち中立¹⁰が多くトロン子孫核種が地表面近傍に集まらないことが考えられる、というこれまでの研究と整合的である。

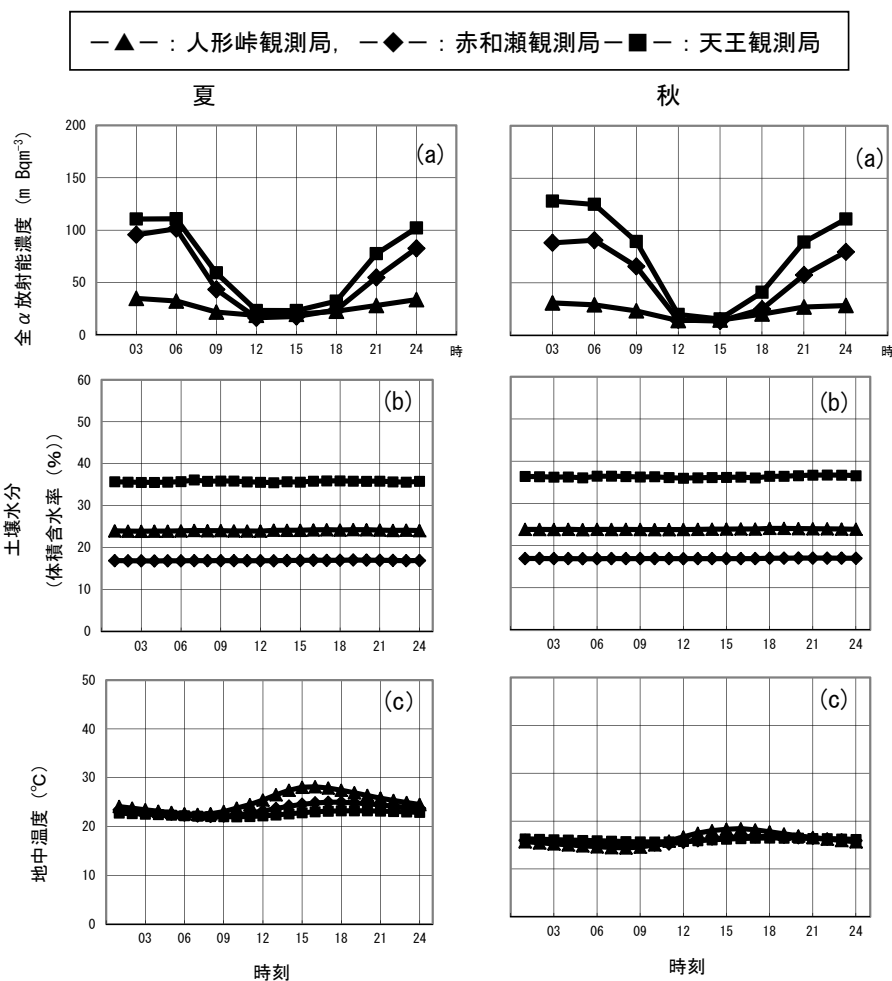


図6 全 α 放射能濃度、土壌水分及び地中温度（各月平均値）の季節別（夏、秋）日変化（2005年度）。(a)：全 α 放射能濃度、(b)：土壌水分、(c)：地中温度

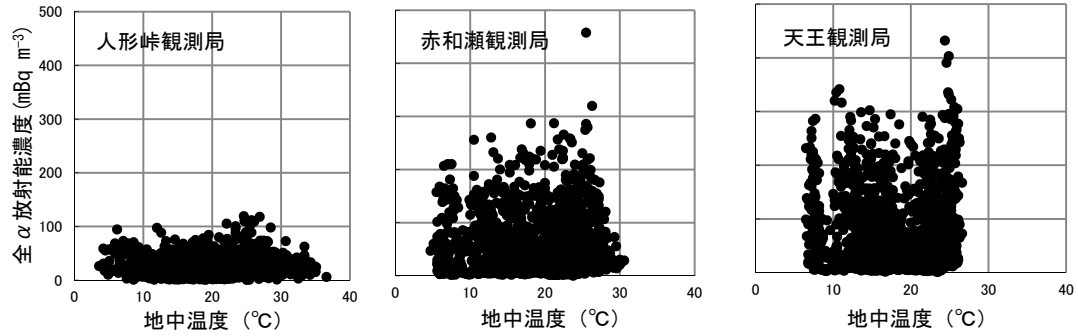


図7 全 α 放射能濃度と地中温度（各時間値）の関係（2005年度）

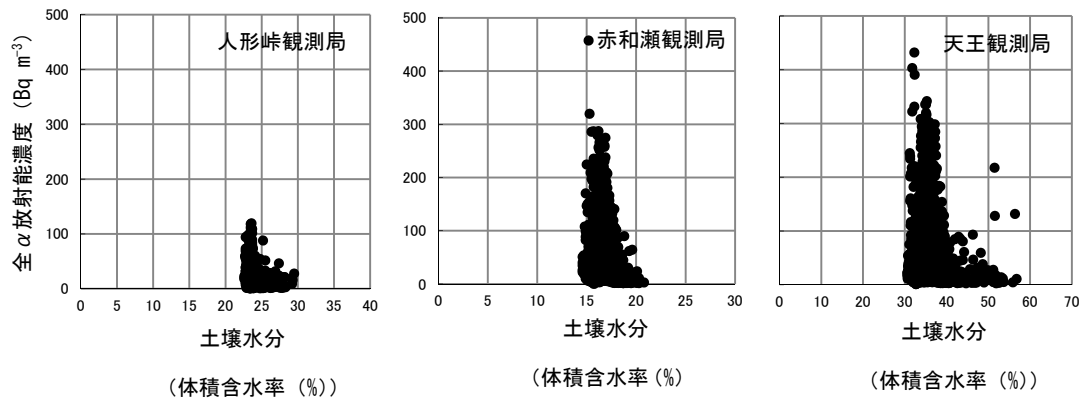


図8 全 α 放射能濃度と土壌水分（各時間値）の関係（2005年度）

4 まとめ

以上のことから次のことが明らかとなった。

- 1) 全 α 放射能濃度は、無降水などの土壌水分の少ない場合には低濃度から高濃度まで分布するが、降水時及びその直後などの土壌水分が多い場合には、土壤からの ^{220}Rn の散逸率の減少、washoutによる大気中のトロン子孫核種の除去、大気安定度が中立的な場合が多いこと等のため、低濃度に集まる傾向がある。
- 2) 全 α 放射能濃度と地中温度には相関関係が認められなかった。

文献

- 1) 柚木英二, 片岡敏夫, 道広憲秀, 杉山広和: 全アルファ放射能濃度の原因核種, 岡山県環境保健センター年報, 9, 285-286, 1985
- 2) K. Megumi and T. Mamuro: Radon and Thoron Exhalation from the Ground, J. Geophys. Res. 78, 1804-1808, 1973
- 3) 柚木英二, 片岡敏夫, 道広憲秀, 杉山広和: 人形峠周辺の全アルファ放射能濃度の変動原因について, 岡山県環境保健センター年報, 9, 189-195, 1985

- 4) 土壤物理学会編: 新編土壌物理用語事典, p.51, (株)養賢堂, 東京, 2002
- 5) 岡山県環境保健センター: 昭和54年度人形峠周辺の環境放射線等測定報告書, 1980
- 6) 山崎興樹, 笠原 貢, 昆 信芳, 藤巻広司, 坂上央存: 柏崎刈羽地域における浮遊塵の全ベータ放射能の変動状況と屋外ラドン濃度, 新潟県保健環境科学研究所年報, 3, 21-30, 2005
- 7) 山崎興樹, 霜鳥達雄, 藤巻広司, 坂上央存, 殿内重政: 浮遊塵の全ベータ放射能の季節変動に及ぼす遠方起源ラドンの影響, 新潟県保健環境科学研究所年報, 4, 21-27, 2006
- 8) 松中照夫: 土壌学の基礎-生成・機能・肥沃土・環境-, p.105, 農山漁村文化協会, 東京, 2003
- 9) 土田智宏, 大野峻史, 黒崎裕人, 霧島達雄, 山崎興樹: 柏崎刈羽地域と佐渡関岬におけるラドン濃度の季節変動要因, 新潟県保健環境科学研究所年報, 8, 38-47, 2010
- 10) F. Pasquill and F. P. Smith (横山長之 訳): 大気拡散, p.371, 近代科学社, 1995

【調査研究】

牛由来検体等からのリステリア及びサルモネラの検出状況と パルスフィールドゲル電気泳動法を用いた*Listeria monocytogenes*の型別解析 について

Detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* from Rectum Contents of Bovine and Molecular Typing of *Listeria monocytogenes* by Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)

河合央博, 大島律子, 仲 克巳*, 檜原幸二**, 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

**岡山赤十字病院 第一小児科

Hisahiro Kawai, Ritsuko Ohata, Katsumi Naka*, Kouji Narahara**, and Hiroshi Nakajima
(Department of Bacteriology)

*The Department of Contemporary Food Culture, Kurashiki Sakuyo University

**Department of Pediatrics, Okayama Red Cross General Hospital

要 旨

リステリア及びサルモネラ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, 岡山県内の動物等の保菌状況を調査した。平成24年度に, 県内の牛飼育施設10ヶ所から採取した牛直腸便50検体と, 県内の病院で採取された腸管感染症疑いの患者便235検体について, リステリア及びサルモネラの分離を試みた。リステリアは牛直腸便2検体から*Listeria monocytogenes*が検出されたが, 患者便からは検出されなかった。血清型は2検体とも1/2bであった。一方, サルモネラは牛直腸便及び患者便ともに検出されなかった。また, *Listeria monocytogenes*について, 平成22年度から平成24年度の間に当センターで分離した126株と, 他所からの分与菌1株の127株についてパルスフィールドゲル電気泳動法を用い, 解析を試みた。得られたバンドパターンを解析した結果, 牛飼育施設におけるリステリアの相互感染, あるいは牛糞堆肥による牛飼料のリステリア汚染が示唆された。

[キーワード: リステリア, サルモネラ, 牛, パルスフィールドゲル電気泳動, 疫学]

[key words: *Listeria*, *Salmonella*, Cattle, Pulsed-field Gel Electrophoresis, Epidemiology]

1 はじめに

Listeria monocytogenes (以下, *L.m.*) は食中毒や, 人の髄膜炎, 死産, 敗血症等の起原菌である他, 主として反芻畜にも脳炎, 死産等を引き起こす人畜共通感染症起原菌である。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。欧米では食品による集団事例が多数報告されているが, 日本では平成13年にナチュラルチーズを原因とした北海道での集団事例1件以外, 確認されていないが, 日本におけるリステリア症発生数は, 年間83件と推定した報告がある¹⁾。一方, *L.m.*は動物や土壌等の環境に広く常在しているため, 食肉や乳製品, 魚介類加工品など食品からの分離が多数報告されている¹⁾。当センターの調査においても, 食肉の平均20%が汚染されていたことが判明しているが²⁾, 食品からしばしば*L.m.*が分離される事実と, リステリア症の発症の因果関係は不明である。これらを踏ま

え, *L.m.*について感染源・感染経路の究明や感染症の発生予防に役立てることを目的として, 食品の汚染状況や動物の保菌状況の調査を継続して行っている。また, サルモネラによる食中毒は一時期に比べ近年は減少したものの, 本菌はいまだ食中毒の主要な原因菌であるため, *L.m.*の調査と併せて動物等の保菌状況について調査を行うとともに, 分離株を収集し, 食品や動物から検出された菌株も併せて疫学解析を行い, 流行株の把握に努めている。

今回は, 牛の直腸便及び腸管感染症疑い患者便 (以下, 患者便) から*L.m.*及びサルモネラの分離を試みた。また, 今までに当センターで分離した*L.m.*菌株を用いてパルスフィールドゲル電気泳動法 (以下, PFGE) を実施し, DNAの制限酵素 (*Apa* I, *Asc* I) 切断パターンによる型別により, 菌株間の関連性等について疫学解析を行った。

2 材料

2.1 *L.m.*及びサルモネラの保菌状況調査

平成24年度に県内の牛飼育施設10ヶ所の牛から採取した直腸便50検体と、県内の病院で採取された患者便235検体について、*L.m.*及びサルモネラの検査を行った。

2.2 *L.m.*のPFGE解析

平成22年度から平成24年度の間に当センターで分離した*L.m.*126株と、県内の医療機関から分与を受けたリステリア症患者由来*L.m.*菌株1株の計127株を用いた。その内訳及び使用した菌株の血清型は、表1のとおりである。

牛等の由来株は、県内4か所の牛飼育施設等で採取した牛直腸便由来の100株と、施設Aで採取した牛糞堆肥由来株14株及び牛飼料由来株2株である。施設Aで採取した牛糞堆肥は同施設で作製したものであり、牛飼料はこの堆肥を肥料の一部に用いて栽培し加工したものであった。ヒト由来の2株は、当センター及び県内の医療機関が分離した株であるが、患者の症状、喫食状況等詳細については不明であった。牛肉由来株9株は、県内の異なる販売店で購入した牛肉から分離された菌株である。

3 方法

3.1 *L.m.*及びサルモネラの保菌状況調査

*L.m.*及びサルモネラの分離培養、生化学的性状試験、血清型別試験及びPCR法を用いた*L.m.*のhlyA遺伝子の検出は、既報³⁾のとおり行った。

3.2 *L.m.*のPFGE解析

PFGEは、アメリカのPulseNetが示した*L.m.*のPFGEプロトコル（CDC 2009 Section5.3）、並びに平成15年に国立感染症研究所が示した腸管出血性大腸菌O157のPFGEプロトコルを参考にして実施した。制限酵素は*Apa* I（TaKaRa）及び*Asc* I（New England Biolabs）を用いた。電気泳動はCHEF-DRⅢ（BioRad）を使用し、泳動条件は以下のとおりとした。

（泳動条件）

緩衝液：×0.5TBE

アガロース：SeaKemGold Agarose 1%

Voltage：6V

Included Angle：120°

Switch time：4.0sec～40.0sec

Run time：19h

泳動後、ゲルを0.2～0.5μg/mlのEthidium bromide水溶液で染色し、脱色を行い紫外線下で写真撮影した。PFGEバンドパターンは、目視並びに解析ソフトBioNumerics ver6.5（APPLIED MATHS）を用いて解析した。

4 結果及び考察

4.1 *L.m.*及びサルモネラの保菌状況調査

牛直腸便及び患者便からの*L.m.*及びサルモネラの検出状況は、表2のとおりであった。*L.m.*は、牛直腸便50検体中2検体（4%）から検出されたが、患者便からは検出されなかった。検出された2検体ともhlyAを保有していた。また、血清型は2検体とも1/2bであった。

表1 *L.monocytogenes*のPFGE解析に用いた菌株一覧

内容	菌株数	内訳等	血清型
牛直腸便由来株	100	施設A由来 97株	1/2b 96株、4e 1株
		施設B由来 1株	4b 1株
		施設C由来 1株	1/2b 1株
		施設D由来 1株	1/2b 1株
牛糞堆肥由来株	14	施設A由来 14株	1/2b 14株
牛飼料由来株	2	施設A由来 2株	1/2b 2株
ヒト由来株	2	腸管感染症疑い患者便由来 1株	1/2b 1株
		リステリア症患者由来(分与菌株) 1株	1/2a 1株
牛肉由来株	9	異なる販売店で購入した牛肉由来 9株	1/2a 5株、1/2b 3株、1/2c 1株
計	127		

表2 牛直腸便及び患者便からの*L.monocytogenes*及びサルモネラの検出状況

検体名	<i>L.monocytogenes</i>		サルモネラ	
	牛直腸便	患者便	牛直腸便	患者便
検体数	50	235	50	235
検出数(率)	2(4.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
血清型	1/2b:2(100%)	-	-	-

一方、サルモネラは牛直腸便及び患者便とも検出されなかった。

4.2 L.m.のPFGE解析

4.2.1 PFGEバンドパターンの分類と系統樹の作成

L.m.全127株のPFGEバンドパターンを目視により比較したところ、*Apa* Iによる切断では22種類に、*Asc* Iでは20種類に分類された。これらのバンドパターンをBioNumerics ver6.5により解析を行い、*Apa* I、*Asc* Iの各制限酵素処理によるバンドパターンについて、系統樹を作成した(図1)。*Apa* Iによる系統樹(以下、*Apa* I系統樹)で類似度が80%以上を同一タイプとして分類すると、9種類のタイプに分類された。これらのタイプをP1~P9とし、さらに、そのタイプに含まれるサブタイプをa, b,

c, d...と区別し、P3a, P3b...と表現した。*Asc* Iによる系統樹(以下、*Asc* I系統樹)についても類似度80%以上で分類を行うと、8種類(S1~S8)のタイプに分類された。また、サブタイプは同様にS1a, S1b...と表現した。

さらに、*Apa* Iと*Asc* Iのバンドパターンを組み合わせで分類すると、26通りに分類された(表3)。これらの組み合わせによる類似度を表した系統樹(以下、*Apa* I + *Asc* I系統樹)を作成するため、BioNumerics ver6.5で再度解析を行った(図2)。*Apa* I + *Asc* I系統樹には、構成する*Apa* I及び*Asc* Iのバンドパターンタイプ、血清型、菌株の種類及び菌株数を併記した。

4.2.2 *Apa* I + *Asc* I系統樹を用いた疫学解析

① *Apa* I + *Asc* I系統樹について

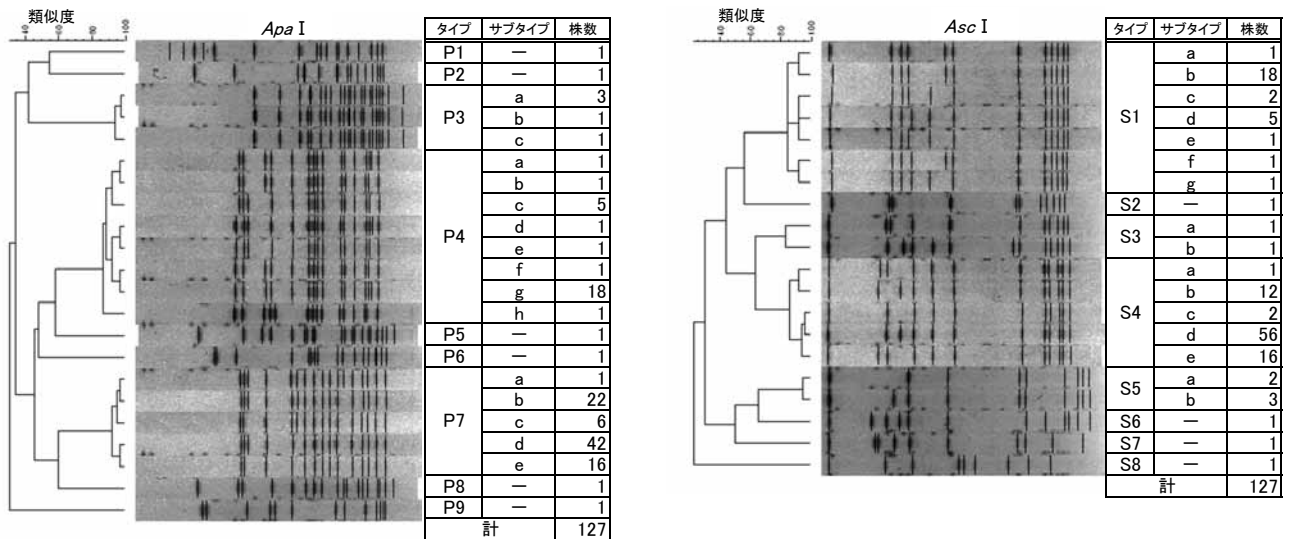


図1 *L.monocytogenes*のPFGEバンドパターンと系統樹1

(左) *Apa* I系統樹 (右) *Asc* I系統樹

表3 *Apa* Iバンドパターンと*Asc* Iバンドパターンの組み合わせによる株数の分布

		<i>Asc</i> I																				株数計						
		S1							S2	S3		S4					S5		S6	S7	S8							
		a	b	c	d	e	f	g		a	b	a	b	c	d	e	a	b										
<i>Apa</i> I	P1																									1		
	P2																										1	
	P3	a																								2	1	3
		b																										1
		c																										1
	P4	a																										1
		b																										1
		c																										5
		d																										1
e																											1	
f																											1	
g																											18	
h																											1	
P5																										1		
P6																										1		
P7	a																										1	
	b																										22	
	c																										6	
	d																										42	
	e																										16	
P8																										1		
P9																										1		
株数計	1	18	2	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12	2	56	16	2	3	1	1	1	1	1	127		

Apa I + *Asc* I 系統樹では、組み合わせNo.1～8, No.12～19及びNo.20～23の3つのグループの類似度が高く、それぞれをグループⅠ、グループⅡ、及びグループⅢとした。グループⅠ内の類似度は85%程度であり、グループⅡ内では85%程度、そして、グループⅢ内では95%程度と非常に高かった。また、グループⅠは*Apa* I 系統樹のタイプP4と*Asc* I 系統樹のタイプS1のみで構成され、同様にグループⅡはP7とS4、そしてグループⅢはP3とS5で構成されていた。さらに、同一グループ内の菌株の血清型はすべて一致していた。これらのことから、同一グループ内の菌株には関連性が考えられた。

②牛飼育施設等から分離された菌株について

施設Aの牛直腸便由来株、牛糞堆肥由来株及び牛飼料由来株は、組み合わせNo.1～7, 12～19及び26の16種類に分類された(図2)。血清型で見ると、No.26の4eである1株を除いたすべてが1/2bであり、施設Aにおける*L.m.*汚染は1/2bが主と考えられた。これらの菌株はグループⅠに含まれるNo.1～7とグループⅡに含まれるNo.12～19の2グループに分別され、2種類の遺伝子型及びその類似型の*L.m.*による汚染が主であることが示唆された。このことから、施設Aでは外部からの*L.m.*混入の可能性よりも、これらの菌が施設内部で長期間継続して汚染している可能性が高いと考えられた。

一方、施設Aの牛直腸便由来株、牛糞堆肥由来株及び牛飼料由来株で同一バンドパターンを示す組み合わせが確認された。No.14には牛直腸便由来株と牛飼料由来株が分類され、No.18では牛直腸便由来株、牛糞堆肥由来株及び牛

飼料由来株が分類された。これらの菌株のバンドパターンの一例を図3に示す。

牛直腸便由来株-牛飼料由来株間、並びに牛直腸便由来株-牛糞堆肥由来株-牛飼料由来株間で同一バンドパターンが確認されたことにより、牛飼料が施設内の牛の便または牛糞堆肥から*L.m.*に汚染され、牛が感染する経路の存在が疑われた。さらに、同施設で作製した牛糞堆肥を肥料の一部に使用して牛飼料を栽培し加工していたことから、*L.m.*の汚染は牛糞堆肥→牛飼料→牛への感染の可能性が高いと考えられた。

施設Bから採取した牛直腸便由来菌株はNo.9に分類されたが、唯一の血清型4bの菌株であり、また、バンドパターンも他の菌株とは異なったため、他の菌株との関連性は認められなかった(図2)。

施設C及びDから採取した牛直腸便由来株はそれぞれNo.13, No.18に分類された(図2)。共にグループⅡに含まれる菌株で施設Aから分離された菌株と同じバンドパターンが確認された。しかし、施設Aと施設C及びDの関連性は不明であり、同じバンドパターンの菌株が分離された原因は不明であった。

③牛肉由来株について

牛肉由来株9株は、血清型1/2aの5株がNo.20,21,23及び25の4種類に、血清型1/2bの3株はNo.8, 10, 11の3種類、そして血清型1/2cの1株はNo.24に分類された(図2)。このうち、No.20, 21, 23の血清型1/2aの4株はグループⅢに属しており、関連性を示した。これらの牛肉は、全て異なる販売店で購入した物であったが、販売以前

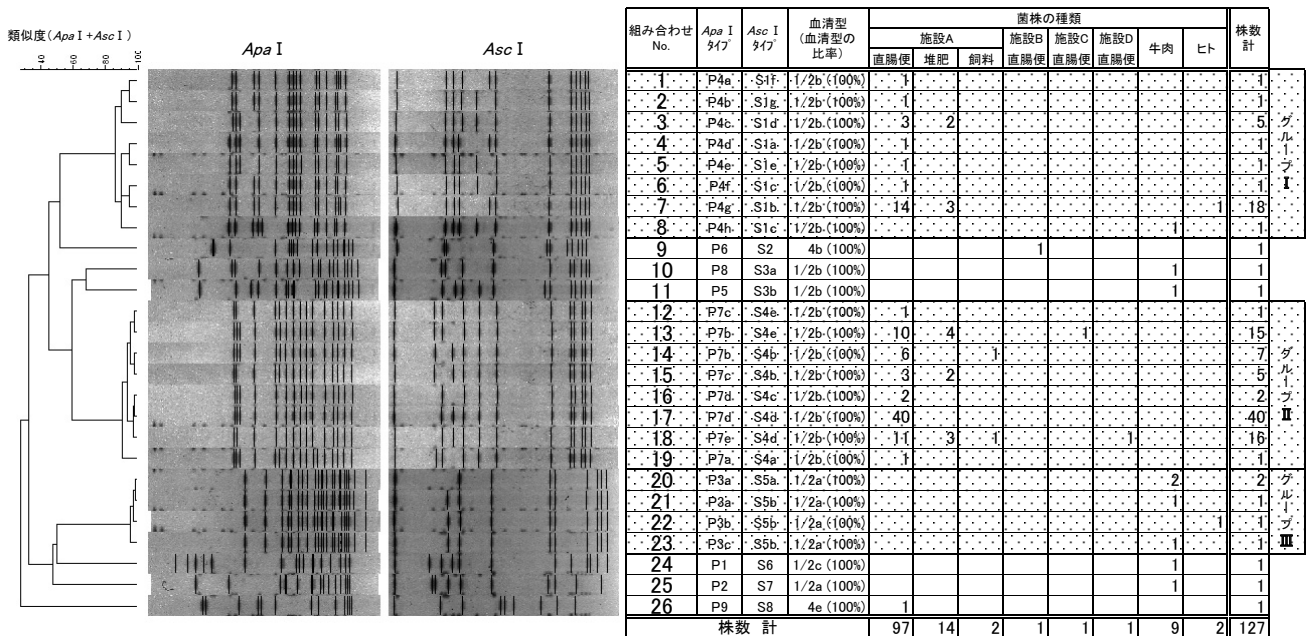


図2 *L.monocytogenes*のPFGEバンドパターンと系統樹2
Apa I + *Asc* I 系統樹

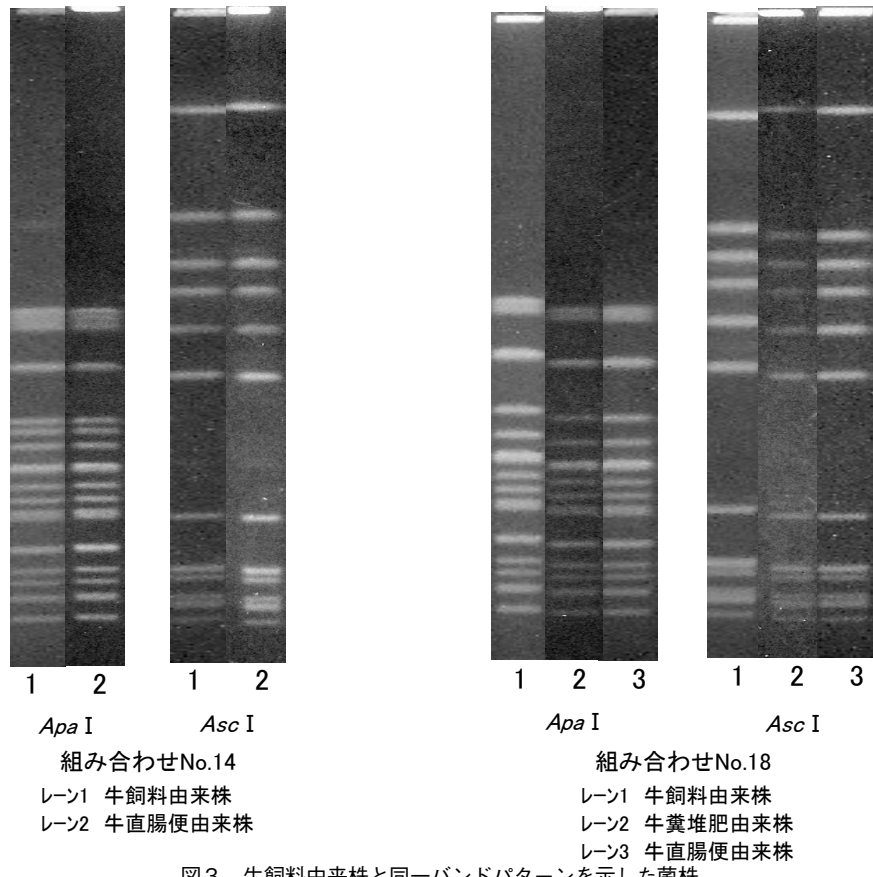


図3 牛飼料由来株と同一バンドパターンを示した菌株

の流通経路等詳細については不明であった。数種類の食肉が同一もしくは酷似したバンドパターンを示したことから、飼育段階で牛が同一遺伝子型あるいはその類似型の *L.m.* に感染していたこと、あるいは、牛肉の加工施設等流通経路で汚染された可能性が考えられた。一方、No.8に分類された血清型1/2bの牛肉由来株は、グループIに含まれていたが、その原因は不明であった。

④ヒト由来株について

ヒト由来株2株は、No.7及びNo.22に分類された(図2)。No.7の血清型1/2bの患者便由来株は、牛直腸便由来株等と同一バンドパターンが見られた。このバンドパターンの一例を図4に示す。また、No.22の血清型1/2aのリストeria症患者便由来株は、グループIIIに属しており、No.20, 21, 23に分類された牛肉由来株と酷似したバンドパターンを示した。このバンドパターンの一例を図5に示す。

ヒト由来株と牛直腸便由来株並びに牛肉由来株で関連性が考えられたことから、牛肉等牛由来食品を介した人への感染に注意が必要と思われる。

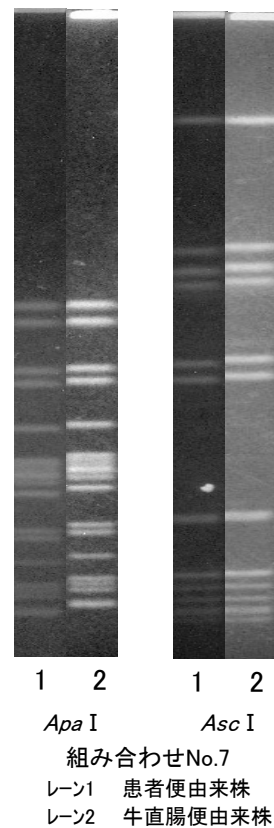
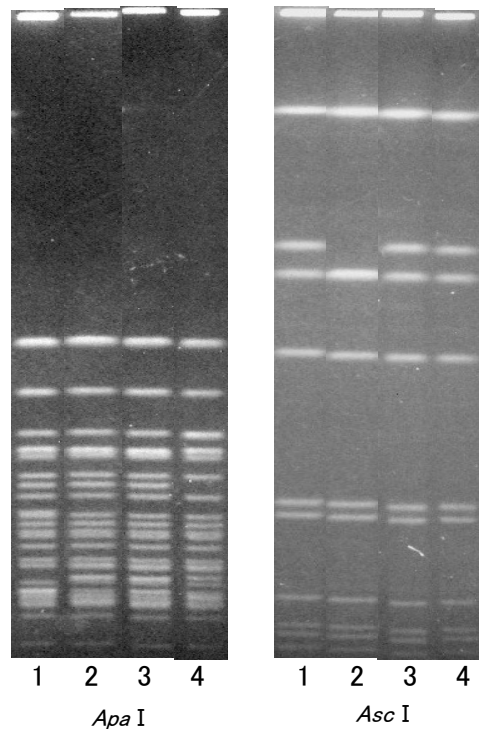


図4 患者便由来株と牛直腸便由来株のPFGEバンドパターン



レーン1 リステリア症患者由来株(組み合わせNo.22)
 レーン2 牛肉由来株(組み合わせNo.20)
 レーン3 牛肉由来株(組み合わせNo.21)
 レーン4 牛肉由来株(組み合わせNo.23)

図5 リステリア症患者由来株と牛肉由来株のPFGEバンドパターン

5 まとめ

*L.m.*の保菌状況調査では、牛直腸便から*L.m.*が4%検出された。当センターの過去の調査では、牛直腸便から分離した*L.m.*の血清型1/2b検出率は87.5%と高かったが³⁾、今回も検出された*L.m.*はすべて1/2bであり、同様の結果となった。一方、サルモネラは今回の調査では検出されなかったため、より広く汚染実態を把握するためにも検査対象を拡大するなど工夫が必要であると思われた。

*L.m.*のPFGE解析では、同一牛飼育施設において同じ遺伝子型の*L.m.*及びその類似型の継続した汚染が示唆された。また、牛肉由来株間では同じ遺伝子型の*L.m.*及びその類似型の汚染が確認され、ヒト由来株-牛直腸便由来株間や患者便由来株-牛肉由来株間では関連性が考えられた。これらのことから、人のリステリア感染症の予防対策として、牛飼育施設での牛の*L.m.*感染防止や牛肉等加工施設における食品の汚染防止等の衛生管理の徹底が重要であり、特に牛飼育施設における牛の*L.m.*感染防止対策の一つとして、牛糞堆肥の完熟化による菌の殺菌と飼料への汚染防止が、重要と考える。

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に関する研究，厚生労働科学研究費補助金 食品・化学物質安全総合研究事業 平成14年度 総括・分担研究報告書，2005
- 2) 狩屋英明，大畠律子，中嶋 洋，国富泰二：動物を含めた環境中及び調理用食肉のリステリア汚染状況，岡山県環境保健センター年報，28, 73-77, 2004
- 3) 石井 学，大畠律子，仲 克巳，中嶋 洋：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，岡山県環境保健センター年報，36, 79-81, 2012

【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 (5)

Application to epidemiological investigation with
DNA database of *Mycobacterium tuberculosis* (5)

大畠律子・河合央博・中嶋 洋 (細菌科)

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

要 旨

岡山県では、平成11年度から結核蔓延状況の把握及び感染源・感染経路の究明、二次感染の予防等、結核対策に資するため、県内の結核新登録患者から分離された結核菌のDNA解析を実施し、その結果を菌株情報と融合させてデータベース化している。平成24年度は、Variable number of tandem repeats (VNTR) 解析法により、散発事例や家族内感染疑い1事例および大学内の感染疑い1事例について、感染源究明のための解析を行った。

[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

岡山県では、結核の感染源・感染経路の究明や二次感染予防を目的に、結核菌のDNA解析を行い、菌株情報と融合させたデータベースを構築して感染事例の疫学調査に活用している^{1), 2)}。結核菌の遺伝子型別法については、JATA(12)-VNTR解析法（以下JATA(12)-VNTR）が平成20年に確立され³⁾、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）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）が報告されている^{4), 5)}。本県でも平成20年度にJATA(12)-VNTRを導入し、平成23年度には JATA(15)-VNTRとHV-VNTRを導入して、JATA(12)-VNTRで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を確認した²⁾。

今回、VNTR解析結果のデータベースを活用して、結核の散発事例や、家族内感染疑い1事例および大学内の感染疑い1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24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、大学内の感染疑い事例の2株および家族内感染疑い事例の2株と、以下の条件に該当した散発事例50株の

計54株が搬入され、VNTR解析を実施した。

- (1) 60歳以下の塗抹陽性患者（結核予防法第29条適用者）の菌株
- (2) 保健所から依頼のあった菌株
 - ・社会福祉施設等（集団生活等）で発生した患者（利用者、職員）の菌株
 - ・接客業、看護師、保健師、保育士、教員、医師等の菌株
 - ・その他保健所長が必要と判断した患者の菌株

2.2 安全対策

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（平成10年法律第114号）（以下「感染症法」と略す）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54株でJATA(12)-VNTR³⁾を実施し、JATA(12)-VNTR型が54株中または723株のJATA(12)-VNTR型が登録されているデータベース中の株と一致した場合は、JATA(15)-

VNTR及びHV-VNTRを追加し、解析結果をデータベースに登録した。VNTR解析及びデータベース作成には、解析ソフトBioNumerics ver6.5 (APPLIED MATHS) を用いた。

2.5 事例の感染源究明

表1に平成24年度に調査した事例の概要について示した。

家族内感染疑い1事例(事例1)および大学内の感染疑い1事例(事例2)の2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24年度に解析した結核菌54株のVNTR型を、図1に示した。

54株のVNTR解析の結果、JATA(12)-VNTRでは2～5株を含む6組のクラスターが形成され、15株が含まれた(クラスター形成率27.8%) (図1 ①～⑥)。これらのクラスターを、JATA(15)-VNTR及びHV-VNTRで解析したところ、JATA(15)-VNTRのみではクラスター②と⑤で一部増幅されない部位があった他は全て一致したが、HV-VNTRを加えると、クラスター③と⑤が異なった(クラスター形成率20.4%)。なお、クラスター②(事例1)に含まれるNo.1461は、JATA(12)-VNTRのprimer 5領域、JATA(15)-VNTRのprimer QUB 11aおよびETRA領域が増幅されなかったが、HV-VNTRで一致し、No.1460とNo.1461が分離された患者は家族であるという疫学的背景から、同一型株と判断した。

54株のVNTR型をデータベース中の他株と比較したところ、JATA(12)-VNTRでは54株中14組16株で一致する株があったが、JATA(15)-VNTR及びHV-VNTRを加えて解析すると、クラスター⑤と⑥を含む6組7株がデータベース中の13株と一致した(図1 矢印i～vi)。これらの解析により、平成24年度末現在のデータベース登録株数は、JATA(12)-VNTR型が777、JATA(15)-VNTR型及びHV-

VNTR型が421となった。

i～viの中で、特にiとivは、大阪市などで報告されている多発性大規模感染株のJATA(12)-VNTR型と一致した⁴⁾。iは発病当時県南部に居住していた54歳の患者から分離された結核菌株であるが、いずれも県南部に居住していた平成17年発病の45歳患者分離株及び平成21年発病の46歳患者分離株と一致した。ivは発病当時県南部居住の86歳の患者分離株であるが、同じ市内に居住していた平成12年発病の62歳患者分離株と一致した。iiは発病当時県北居住の59歳の患者分離株であるが、平成17年発病の34歳患者分離株及び平成20年発病当時県南部居住の55歳の患者分離株と一致した。iiiは発病当時県南部居住の54歳の患者分離株であるが、平成16年発病当時県南部居住の73歳の患者分離株と一致した。vは発病当時県北部居住の82歳と83歳の患者分離株であるが、平成17年発病当時県南居住の28歳の患者分離株と一致した。viは発病当時県南部居住の55歳の患者分離株であるが、いずれも県南部に居住していた平成15年発病の58歳、平成15年発病の50歳、平成15年発病の年齢不詳、平成18年発病の56歳、平成19年発病の45歳および平成23年発病の81歳患者分離株の計6株と一致した。これらi～viの6組7株と一致したデータベース中の13株とは、いずれも菌が分離された患者間の接点を見出すことができなかった。

3.2 事例の検討結果

結果は、表1に示すとおりであった。

事例1は家族内感染が疑われた事例で、患者a、bから分離された結核菌DNAのVNTR型が一致したため、家族内感染と推測された。事例2は、同じ大学で学年・学部も同じ学生c、dが同時期に結核を発病し、大学内での感染が疑われたため、両者から分離された結核菌DNAのVNTR解析を実施したところ、VNTR型が一致した。しかし、疫学調査からは両者の接点を見出すことはできなかった。

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	1460	K	a	88	2011/2/15	2011/1/4	一致	患者aとbは家族で、両者から分離された結核菌DNAのVNTR型が一致したため、両者間の感染が判明した。
	1461		b	62	2011/6/21	不明		
2	1476	O	c	22	2012/2/23	不明	一致	患者cとdは同じ大学の学生で学年・学部が同じで、両者から分離された結核菌DNAのVNTR型が一致したが、他に接点が見つからず、両者間の感染と断定することはできなかった。
	1477	O	d	23	2012/5/23	症状無し		

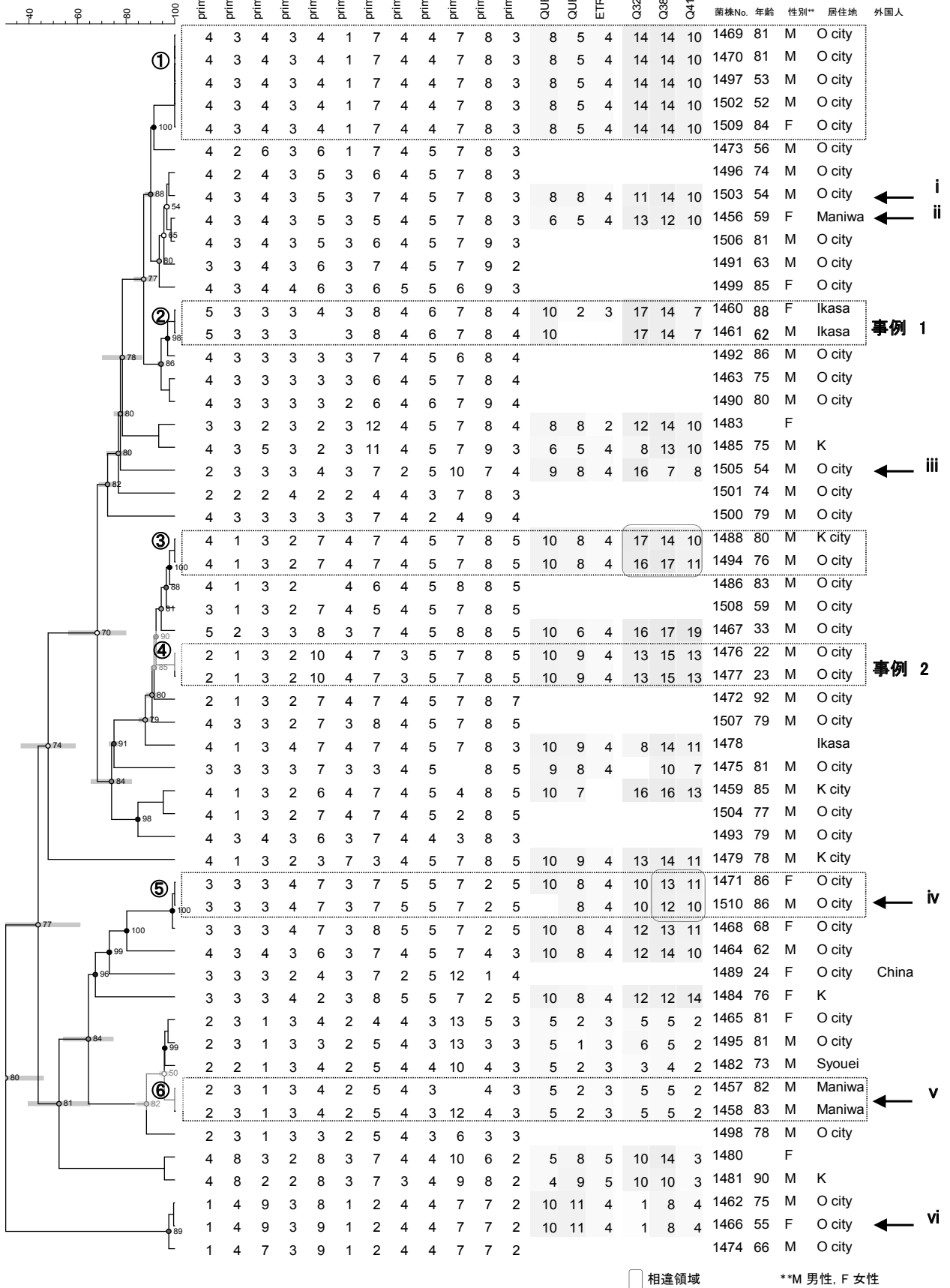


図1 平成24年度に解析した結核菌54株のVNT-R型

4 考 察

54株のVNTR解析の結果、JATA(12)-VNTR単独ではクラスター形成率は27.8%であったが、JATA(15)-VNTRとHV-VNTRを加えると20.4%になったことから、JATA(12)-VNTRにJATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加える方法の有用性が再確認された。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、事例1および2を除いたクラスター①と⑥では、患者間の関連性が不明であった。これらの患者はクラスター①の2名以外は80歳以上の高齢者であり、過去の再燃なども考えられ、感染源は不明であった。

54株のVNTR型とデータベース中の他株との比較について、i～viの6組7株とデータベース中の13株とが一致し、いずれも患者間の接点が見出せなかったが、ivで高齢の患者同士であった以外は、20～50歳代の患者を含んでおり、これらの患者は過去の再燃ではなく最近感染したと考えられるため、何等かの接点が潜んでいる可能性が考えられた。しかし、空気感染という特殊な感染様式をとり、感染から発病までの期間が長い結核では、このような潜在的な接点を見出して感染源を究明することの困難さが改めて認識され、疫学調査の大きな課題であると思われた。

感染事例の感染源を究明した結果、事例1ではVNTR型が一致して家族内感染が裏付けられたが、事例2では、VNTR型一致により保健所の疫学調査で詳細な検討がなされたにもかかわらず、患者間に同じ大学の学年・学部が同じという以外の接点が見出せず、患者間の感染を確定できなかった。この事例についても、何等かの共通の感染源が潜んでいる可能性が高いが、空気感染という感染様式が感染源究明を困難にさせていると思われた。

以上のことから、結核菌のDNA解析では、JATA(12)-VNTRにJATA(15)-VNTRとHV-VNTRの両法を加える方法の有用性が再確認されたが、この方法でVNTR型が一致しても、患者間の関連性を見出すことはかなり難しいことが判った。この課題を克服するためには、結核の特殊な感染様式を考慮に入れた実地疫学調査が重要であると思われた。

今後も、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(4), 岡山県環境保健センター年報, 36, 75-78, 2012
- 3) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗 聡, 菅原 勇, 加藤 誠: 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型(VNTR)分析システム, 結核, 83, 673-678, 2008
- 4) 和田崇之, 長谷 篤: 結核菌の縦列反復配列多型性(VNTR)解析に基づく分子疫学とその展望, 結核, 85, 845-852, 2010
- 5) 前田伸司, 和田崇之, 岩本朋忠: 国内結核菌を効率よく型別するための標準反復配列多型(VNTR)分析法: 日本細菌学雑誌, 65, 201, 2010

【調査研究】

岡山県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24年度）
Epidemiological Studies on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*,
Legionella and *Corynebacterium ulcerans* in Okayama Prefecture (FY2011)

中嶋 洋, 大島律子, 河合央博, 檜原幸二*, 仲 克巴** (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）感染症およびレジオネラ症の予防対策に資するため、平成24年度に県内で分離されたSTEC、レジオネラの疫学調査を実施した。STECは、散発事例の減少から株数の減少傾向が見られ、ヒト由来株57株を収集した。このうちの32株、56.1%がO血清群157で、例年どおり分離株において多数を占めた。県内でヒトから分離され、その遺伝子型に地域特異性が見られた*L.pneumophila*血清群3の感染源究明のために、浴槽水等101検体についてレジオネラの汚染実態を調査した。また、保健所等で分離されたレジオネラ菌株133株を収集し、血清型別を行った。分離あるいは収集した*L.pneumophila*血清群3の遺伝子解析の結果、いずれもヒト由来株と遺伝子型が異なっており、感染源の究明には至らなかったことから、継続して汚染実態調査を実施する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、PFGE、疫学]

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

1 はじめに

岡山県下で発生した志賀毒素産生性大腸菌（以下STEC）感染症やレジオネラ症の感染源・感染経路の究明や発生予防を目的として、長期間の調査を実施している。本報告では、平成24年度に収集したヒト由来株と、動物および浴槽水等から分離した菌株を用いて疫学解析を実施したので、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24年度にヒトから分離されたSTEC株57株と、牛直腸便50検体を用いた。

レジオネラの検査には浴槽水等101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株および患者由来株3株を用いた。

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）及び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

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

4) パルスフィールドゲル電気泳動法によるDNAパターンの解析

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

5) IS-printing systemによる疫学解析

STEC O157株の疫学解析は、IS-printing system（TOYOBO）を用いて実施した。

6) Sequence-Based Typing (SBT)

レジオネラ株のSBT法を用いた型別 (Sequence Type (ST))^{4), 5)}は、国立感染症研究所細菌第一部に依頼して実施した。

3 結果及び考察

3.1 岡山県内で分離されたSTECの疫学調査

平成24年度にヒトから分離されたSTECの月別検出状況を、表1に示した。

本年度収集した57株は、4月と2、3月を除いたすべての月で検出された。6月～8月はいずれも17.5%と高率に検出され、9月も14.0%と検出率が高かった。本年度は7月に倉敷市保健所管内の保育園でO26:H11 STX1による集団事例が発生し、菌陽性者は105名にのぼった (集計は医療機関分離株のみ)。また、12月を中心にO157:H7 STX1, 2による患者が県下の複数の地域で同時多発的に発生したため、この時期には珍しく検出率が14.0%と高い値を示した。

ヒトから検出されたSTECの血清型・毒素型を、表2に示した。

STECの血清型・毒素型は17種類に分類され、O血清群157は32株 (56.1%)、O血清群26は9株 (15.8%)で、これらが分離株全体の71.9%を占めた。また、本年度もこれら以外のO血清群が多数検出され、O103, O111, O113,

O121, O145, O165, O174, O91, OUTであった。

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3種類に型別され、特にO157:H7は多種類のPFGE型に分類された。12月を中心に多発したO157:H7 STX1, 2による感染事例において、IS-printing systemおよびPFGE法を用いて菌の分子疫学解析を行った結果、すべての株がIS-printing systemで同じ遺伝子パターンを示し、PFGE型も1株 (未実施)を除いてすべてh426で同じであった。このことから、何らかの共通した感染源の存在が考えられたが、疫学調査の結果からは共通の感染源と考えられるものはなく、原因は究明できなかった。7月に保育園で発生したO26:H11 STX1による集団事例由来株のPFGE型は、h68であった。

牛直腸便から検出されたSTECの血清型・毒素型を、表4に示した。

牛直腸便50検体中18検体 (36.0%) からSTECが検出されたが、ヒトから高率に検出されるO血清群157および26は検出されず、多くはOUT (O血清群型別不能)であった。

今までの調査でも、牛のO血清群157および26保菌状況は調査年により変動が見られ、検出率は低率であった。一方、OUTは例年どおり牛の保菌するSTECのなかで主な血清群であり、本年度も例年同様の傾向を示した。

表1. ヒト由来STEC月別検出状況

月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	計
分離株数	0	1	10	10	10	8	4	4	8	2	0	0	57
(%)	0.0	1.8	17.5	17.5	17.5	14.0	7.0	7.0	14.0	3.5	0.0	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:H-	1	1	1.8
O103:H2	1	2	3.5
O103:H11	1	1	1.8
O111:H-	1	1	1.8
O113:H21	2	1	1.8
O121:H19	2	1	1.8
O145:H-	1	2	3.5
O157:H-	1,2	1	1.8
O157:H7	2	7	12.3
	1,2	24	42.1
O165:H-	1,2	2	3.5
O174:H8	2	1	1.8
O26:H11	1	9	15.8
O91:H49	2	1	1.8
OUT:H5	2	1	1.8
OUT:HUT	1	1	1.8
	2	1	1.8
計		57	

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	h61	1	
O157:H7	2	h173	1	
		h408	1	
		h409	1	
		h410	2	
		h62	2	家族由来株
		g107	1	
	1,2	g332	4	
		h107	1	
		h305	1	
		h412	1	
		h416	1	
		h426	12	11月～1月に同時多発した株 (感染源不明)
		h63	1	
		h64	1	
計		未実施	1	
計			32	

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:H11	1	h13	1	
		h139	1	
		h68	7	保育園集発株
計			9	

3.2 浴槽水等のレジオネラ汚染調査

浴槽水等101検体について実施したレジオネラ汚染調査結果を、表5に示した。

培養法により検査した結果、浴槽水67検体中6検体(9.0%)、原水6検体中2検体(33.3%)、冷却塔水6検体中5検体(83.3%)から、レジオネラが検出された。浴槽水は*L.pneumophila* (以下、*Lp*) 血清群2、3、5、6、10とレジオネラ属菌が、原水は*Lp*血清群1、6が、冷却塔水では*Lp*血清群1、13とレジオネラ属菌が検出された。浴槽水由来株は多様な血清群の*Lp*が分離されたが、冷却塔水では*Lp*血清群1の検出率が高かった。

保健所の検査で浴槽水等から検出されたレジオネラ菌株133株を収集し、血清群別を実施した結果を、表6に示した。

浴槽水由来株は、*Lp*血清群1、2、3、5、6、8、9、10、12群とUTおよびレジオネラ属菌、原水由来株は*Lp*血清群1、3、プール水およびフローミル水由来株は*Lp*血清群3、冷却

塔水由来株は*Lp*血清群1、13であった。

*Lp*血清群3のうち、44株についてPFGE法による解析を行った結果を、表7に示した。

PFGEパターンは14パターンに分類され、同時期に同一施設の複数の検体から分離された株同士は、同じPFGEパターンを示す傾向が見られた。一方、これら44株のPFGEパターンは、本年度県内で発生したレジオネラ症患者のうち、1名から分離された*Lp*血清群3のパターンと異なっていた。また、過去に分離された患者由来の*Lp*血清群3も含め、これらすべての*Lp*血清群3株が同一のPFGEパターンで、同じST93に型別された。さらに、他県では今のところ同じ遺伝子型株の分離例がなく、地域特異的な菌株であるため、感染源の究明に向けて継続した汚染実態調査を行う必要があると考える。

なお、レジオネラの調査については、平成24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

表4. 牛直腸便由来STECの血清型・毒素型

血清型	毒素型	陽性検体数	検出率(%)
O8:H19	2	3	6.0
O103:H2	1	1	2.0
O124:H19	2	1	2.0
OUT:H-	2	3	6.0
OUT:H-	1,2	1	2.0
OUT:H2	2	2	4.0
OUT:H11	2	1	2.0
OUT:H18	2	1	2.0
OUT:H19	2	2	4.0
OUT:H21	2	1	2.0
OUT:HUT	1	1	2.0
OUT:HUT	2	1	2.0
計		18	

表5. 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	67	6(9.0)	<i>L.pneumophila</i>	2	1
				3	2
				5	2
				6	2
			10	2	
			<i>Legionella spp.</i>		1
原水	6	2(33.3)	<i>L.pneumophila</i>	1	1
				6	1
プール水	7	0			
冷却塔水	6	5(83.3)	<i>L.pneumophila</i>	1	3
				13	1
			<i>Legionella spp.</i>		1
下水処理場合流水	3	0			
水たまりの水	1	0			
池水	3	0			
堰水	1	0			
患者宅付近の用水の水	4	0			
ホテル内の噴水の水	1	0			
谷川水	1	0			
湧水	1	0			
計	101	13(12.9)			17

表6. 保健所等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	12
		2	4
		3	29
		5	4
		6	27
		8	1
		9	7
		10	10
		12	1
		UT	1
	<i>Legionella spp.</i>		1
原水	<i>L.pneumophila</i>	1	1
		3	6
プール水	<i>L.pneumophila</i>	3	10
フローミル水	<i>L.pneumophila</i>	3	9
冷却塔水	<i>L.pneumophila</i>	1	9
		13	1
計			133

表7. 浴槽水等由来*L.pneumophila*血清群3株の分子疫学解析結果

No	採取年月日	検体名	地域一施設No	菌数cfu/100ml	PFGE型
12-2	H24.6.4	浴槽水	MA-1	20	12i
12-3	H24.6.4	浴槽水	MA-5	40	11e
12-4	H24.5.30	浴槽水	OC	20	12g
12-5	H24.7.4	浴槽水	OC	15	11b
12-6	H24.7.4	浴槽水	OC	<10?	12e
12-7	H24.7.4	浴槽水	OC	10	12e
12-8	H24.7.4	浴槽水	OC	5300	12d
12-9	H24.7.4	浴槽水	OC	5500	12d
12-10	H24.7.4	浴槽水	OC	3000	12b
12-11	H24.7.24	浴槽水	BI-2	200	12a
12-12	H24.7.18	浴槽水	OC		12b
12-14	H24.9.24	浴槽水	MA-1	10	11e
12-15	H24.9.25	浴槽水	MI-3	240	12u
12-16	H24.9.25	浴槽水	MI-2	30	12b
12-17	H24.11.21	浴槽水	KC-3	6250	12i
12-13	H24.8.27	浴槽水	MA-2	230	12c
LZ 12-1	H24.8.20	浴槽水	OC	10	12e
LZ 12-10	H24.9.25	フローミル水	OC-2	170	12s
LZ 12-11	H24.9.25	フローミル水	OC-2	170	12s
LZ 12-12	H24.9.25	フローミル水	OC-2	170	12s
LZ 12-13	H24.10.5	フローミル水	OC	10	12s
LZ 12-14	H24.10.10	浴槽水	OC	430	12t
LZ 12-15	H24.10.10	プール水	OC	10	12r
LZ 12-16	H24.10.10	プール水	OC	10	12r
LZ 12-17	H24.10.16	原湯	MA	60	11e
LZ 12-18	H24.10.16	原湯	MA	60	12i
LZ 12-19	H24.10.16	原湯	MA	60	12m
LZ 12-2	H24.8.20	浴槽水	OC	10	11b
LZ 12-20	H24.11.5	ろ過水	OC-3	170	12r
LZ 12-21	H24.11.5	ろ過水	OC-3	170	12r
LZ 12-22	H24.11.5	ろ過水	OC-3	170	12r
LZ 12-23	H24.11.5	ろ過水	OC-3	170	12r
LZ 12-24	H24.11.8	プール水	OC-1	30	12r
LZ 12-25	H24.11.8	プール水	OC-1	30	12r
LZ 12-26	H24.11.8	プール水	OC-1	30	12r
LZ 12-3	H24.8.20	浴槽水	OC	10	11b
LZ 12-4	H24.8.24	プールろ過水	OC-1	10	12r
LZ 12-5	H24.9.25	フローミル水	OC-2	170	12s
LZ 12-6	H24.9.25	フローミル水	OC-2	170	12s
LZ 12-7	H24.9.25	フローミル水	OC-2	170	12s
LZ 12-8	H24.9.25	フローミル水	OC-2	170	12s
LZ 12-9	H24.9.25	フローミル水	OC-2	170	12s
研 12-20	H24.6.11	浴槽水	BH-2	60	12b
研 12-59	H24.7.23	浴槽水	BI-3	640	12a

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」の研究班による調査の一環として実施したものである。

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、菌株の分与や検体採取にご協力いただきました関係機関の先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) 小林一寛：腸管出血性大腸菌の同定法 2. PCR法. 臨床検査, 36, 1334~1338, 1992
- 2) 寺嶋 淳, 泉谷秀昌, 三戸部治郎：食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究. 新興・再興感染症研究事業平成15年度総括・分担研究報告書2004, 10~21, 2004
- 3) 常 彬, 前川 純子, 渡辺 治雄：レジオネラを解析するパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法の改良. IASR 2008 : 29 : 333-334.
- 4) Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, and Harrison TG. : Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*, J.Clin.Microbiol., 43, 2047-52, 2005
- 5) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. : Addition of neuA, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains, J.Clin.Microbiol., 45, 1965-1968, 2007

【調査研究】

胃腸炎ウイルスの疫学的研究

—岡山県で検出されたG2型ヒトロタウイルスの分子疫学的解析—

Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama

— Molecular epidemiological analysis of genotype G2 human Rotaviruses isolated in Okayama Prefecture —

葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 溝口嘉範, 藤井理津志, 金谷誠久* (ウイルス科)

* (独) 国立病院機構 岡山医療センター小児科

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

*Department of Pediatrics, National Hospital Organization Okayama Medical Center

要 旨

岡山県におけるG2型ロタウイルスA (RVA) の流行状況及び流行株の性状を明らかにするため、2000年9月～2010年8月の10シーズンに県内で採取されたRVA陽性の胃腸炎患者糞便720検体についてG型別を実施したところ、50検体(7.0%)がG2型と同定された。G2型は、調査10シーズン中6シーズンで断続的に検出されたが、シーズン毎のG2型相対頻度(RVA全体に占めるG2型割合)には15.4～47.4%と比較的高い場合と、1～3%と低い場合とが認められた。次に、県内で検出されたG2型の代表株について遺伝子解析を実施したところ、VP4及びVP6遺伝子には大きな違いはみられなかったが、VP7及びNSP4遺伝子についてはそれぞれ大きく2系統が存在し、それらの組み合わせにより、分離株はVP7遺伝子クラスターIV及びVで代表される2つのグループに分類されることがわかった。さらに、シーズンごとのG2型相対頻度と流行株のVP7遺伝子クラスターとの比較から、クラスターの異なる株間において、その伝播性などに違いがあることが示唆された。

[キーワード: ロタウイルス, G2型, 疫学調査, 遺伝子相同性, 系統解析]

[Key words: Rotavirus A, Genotype G2, Epidemiological analysis, Nucleotide sequence identity, Phylogenetic analysis]

1 はじめに

ロタウイルスA (RVA) は、レオウイルス科に属する2本鎖RNAをゲノムとして持つウイルスであり、外殻糖蛋白 (VP7) および外殻スパイク蛋白 (VP4) をコードする遺伝子に基づき、それぞれG (Glycoproteinの略号) 遺伝子型 (G型) 及びP (Protease sensitiveの略号) 遺伝子型 (P型) に分類される¹⁾。現在までのところ、G型についてはG1～G27型が、P型についてはP[1]～P[35]型がそれぞれ確認されており²⁾、さらに両者の組み合わせによって多くの遺伝子型が存在しうるが、そのうちヒトから検出される頻度が高いのは、G1P[8]型、G2P[4]型、G3P[8]型、G4P[8]型、およびG9P[8]型である^{1), 3)}。

RVAは小児急性胃腸炎の重要な病原体であることから、本ウイルスの感染予防を目的とした生ワクチンが複数メーカーで開発され、その導入が世界的に進められている⁴⁾。主なものとしては、ヒトRVA株 (G1P[8]型) 由来の単価ワクチンであるRotarix[®] (グラクソ・スミスクライン社製)、及びヒトRVAのG1～G4型のVP7遺伝子とP[8]型のVP4遺伝子を組み込んだ、ウシRVA遺伝子組み換え株に

由来する5価ワクチンのRotaTeq[®] (メルク社製) が知られている。我が国においては、Rotarix[®] が2011年7月に、RotaTeq[®] が2012年1月にそれぞれ製造承認され導入が開始された。しかしながら、既にこれらのワクチンを導入した一部の国においては、RVA検出率低下の一方で、G2型の相対頻度の急増が報告されている⁵⁾。したがって、我が国においても同様な現象の発生が危惧されることから、ワクチンの本格的な普及を前に、G2型の流行状況やウイルス性状を把握しておくことは極めて重要と思われる。そこで、2000年～2010年の11年間に県内で検出されたG2型RVAについて分子疫学的解析を実施した。

2 材料及び方法

2.1 糞便検体

2000年9月～2010年8月の10シーズン(前年9月～翌年8月までを1シーズンとする)に(独)国立病院機構 岡山医療センター小児科で採取され、市販のRVA検査キットで陽性となった胃腸炎患者糞便720検体を検査対象とした。糞便の10%乳剤を調整後、8,000rpm 15分間の遠心分

離を行った上清を以下の試験に用いた。

2.2 G型及びP型別方法

市販キット (QIAamp Viral RNA mini kit, 株式会社キアゲン) により糞便乳剤から抽出したRNAを用いて、Gouveira⁶⁾の報告に基づき逆転写PCR (RT-PCR) 法を実施することでG型別を行った。さらにG2型と同定された場合には、Wuら⁷⁾の方法に従いRT-PCR法によりP型を決定した。

2.3 遺伝子配列決定法

G型及びP型の同定検査時に増幅したVP7及びVP4遺伝子産物について、アガロース電気泳動を行って特異バンド部分を切り出し、DNA gel extraction kit (日本ミリポア株式会社) によりPCR産物の抽出・精製を行った。さらに、内殻蛋白VP6及び非構造蛋白NSP4をコードする遺伝子についても、それぞれの遺伝子分節の両端に相補的なプライマーを用いて増幅した産物を同様に精製した。精製DNAについて、PCRに使用したプライマーを用いてオートシーケンサー (3500 ジェネティックアナライザ, 株式会社アプライド・バイオシステムズ) により塩基配列を決定した。

2.4 塩基配列データの解析

塩基配列の解析は市販ソフトウェア (Genetyx WIN ver.11, ソフトウェア開発株式会社) を用いて実施した。また、遺伝子系統解析はClustal W (フリーソフト) を用い、RVA標準株を参照 (outgroup) 株として近隣結合法により実施した。なお系統解析については、同様の解析を1,000回繰り返した場合に、同一結果が得られる回数 (ブートストラップ値) でその信頼性を評価した。

3 結果

3.1 G2型RVA検出状況及びP型別結果

G型別の結果、720検体すべてが型別可能であった。G2型についてみると、単独で検出されたのが50検体 (6.9%)、及びG1型との混合が1検体の計51検体 (7.0%) から検出された (表1)。シーズン別の検出状況では、調査10シーズン中6シーズン (2000/01, 2001/02, 2005/06, 2006/07, 2007/08及び2009/10シーズン) でG2型が検出された。また、シーズン毎のG2型相対頻度 (RVA陽性全体に占めるG2型の割合) は図1に示すとおりで、相対頻度が15.4~47.4%と比較的高いシーズン (2000/01, 2001/02及び2006/07シーズン) と、1~3%と低いシーズン (2005/06, 2007/08及び2009/10シーズン) とが認められた。さらに、RVA陽性患者年齢の中央値 (メジアン) をG型別に算出したところ、G2型が1.5歳と、他のG型 (いずれも1.0歳) に比べやや高いことがわかった (データを示さず)。なお、G2型と同定された50検体 (混合感染の1例を除く) について、P型の同定を試みたところ、すべてP[4]型であることがわかった。

3.2 VP7遺伝子及びアミノ酸配列解析結果

G2P[4]型代表株として2000/01シーズンの2株、2001/02シーズンの2株、2005/06シーズンの1株、2006/07シーズンの3株、2007/08シーズンの1株及び2009/10シーズンの3株の計12株について、VP7遺伝子のオープン・リーディング・フレーム (ORF) に相当する部分 (981bp) の塩基配列を決定し、データベース上の既知株の配列とともに近隣結合法により系統解析を行った。結果は図2 Aに示すように、今回検出されたG2P[4]型株のVP7遺伝子は、92.6%

表1 RVAのG型別成績 (2000/01~2009/10シーズン)

G型	流行シーズン										合計 (%)
	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10	
G 1	8	8	35	20	29	26	46	12	8	31	223 (31.0)
G 2	9	7	0	0	0	1	29	1	0	3	50 (6.9)
G 3	2	12	33	60	31	14	12	8	66	57	295 (41.0)
G 4	0	6	14	0	2	0	0	0	0	0	22 (3.1)
G 9	0	14	4	0	0	52	1	53	0	0	124 (17.2)
G12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.1)
G1 & G2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1 (0.1)
G1 & G3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.1)
G1 & G9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1 (0.1)
G2 & G3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.1)
G3 & G9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.1)
合計	19	50	86	80	62	93	89	75	75	91	720

以上という高いブートストラップ値をもって2つの異なるクラスターに分類された。すなわち2000/01、2001/02及び2006/07シーズンの7株はいずれも、Paulらの報告⁸⁾によるクラスターIVに、残りの5株(2005/06、2007/08及び2009/10シーズン株)はクラスターVにそれぞれ属することがわかった。また、遺伝子及びアミノ酸配列の相同性比較では、同一クラスター内では遺伝子で99.1%以上、アミノ酸で98.8%以上という高い相同性を有していたのに対し、異なるクラスター間では遺伝子で95.9~96.1%及びアミノ酸で96.9~98.2%の相同性であり、クラスター分類に一致した相同性の差異が認められた。なお、これらのクラスターには、近年世界的な流行が確認されている、いわゆる再流行タイプ株が多く属することが報告されている⁹⁾。

次に、異なるクラスターの株間における抗原性の差異について明らかにするため、VP7アミノ酸配列についても比較検討を行ったところ、クラスターの相違と一致したアミノ酸置換部分が計5か所(15、45、87、129及び287番目のアミノ酸残基部分)で認められた(データを示さず)。そのうち87番目のアミノ酸残基部分は、G型特異的中和エピトープを構成する領域に位置することが明らかになっている¹⁾。

3.3 VP4遺伝子解析結果

VP7遺伝子の比較を行った12株について、VP4遺伝子配列(ORFの5'側1,005bp部分)を決定し、既知のP[4]型株の配列とともに系統解析を行った(図2B)。その結果、12株のVP4遺伝子はいずれも、VP7遺伝子の場合のような明瞭なクラスターには分けられず、近年に検出されたG2P[4]型株とともに、Paulらの報告⁸⁾によるクラスターⅢに分類されることがわかった。

3.4 VP6及びNSP4遺伝子解析結果

VP7遺伝子クラスターの異なる株間相互の関係についてさらに詳しく解析するため、各クラスターから3株ずつ計6株をピックアップして、そのVP6及びNSP4遺伝子のORF部分の塩基配列を決定し、既知の株の配列とともに系統解析を実施した。その結果、6株のVP6遺伝子は互いに極めて近縁であり、他のG2P[4]型株と同じくgenotype I2に分類されることがわかった(図3A)。

一方、6株のNSP4遺伝子についてはいずれも、G2P[4]型株の多くが属するgenotype E2に分類されたが、99.8%以上という高いブートストラップ値をもって2グループに分類しうることがわかった(図3B)。さらにVP7遺伝子クラスターとの関係では、一方のグループにはクラスターIVの株のみが、他方のグループにはクラスターVの株のみがそれぞれ属しており、VP7遺伝子とNSP4遺伝子とが密接な関連性を有することが明らかになった。

NSP4については、それ自体でエンテロトキシン様活性を有するなど、RVAの病原性に重要な役割を持つことが示唆されている¹⁰⁾。そこで、異なるNSP4遺伝子グループに属する6株について、そのアミノ酸配列をG2P[4]型の標準株であるDS-1株の配列とともにアライメントし比較を行った。結果は図4に示すように、6株のNSP4には計7カ所に置換部位が認められたが、エンテロトキシン活性に関与する領域(115~135番目のアミノ酸残基部分)にはグループ間で大きな違いはみられなかったが、ウイルス構成蛋白結合領域部分にグループの相違に一致した置換部位が2カ所(137及び140番目のアミノ酸残基部分)認められた。このうち137番目のアミノ酸残基部分は、抗NSP4抗体が認識す

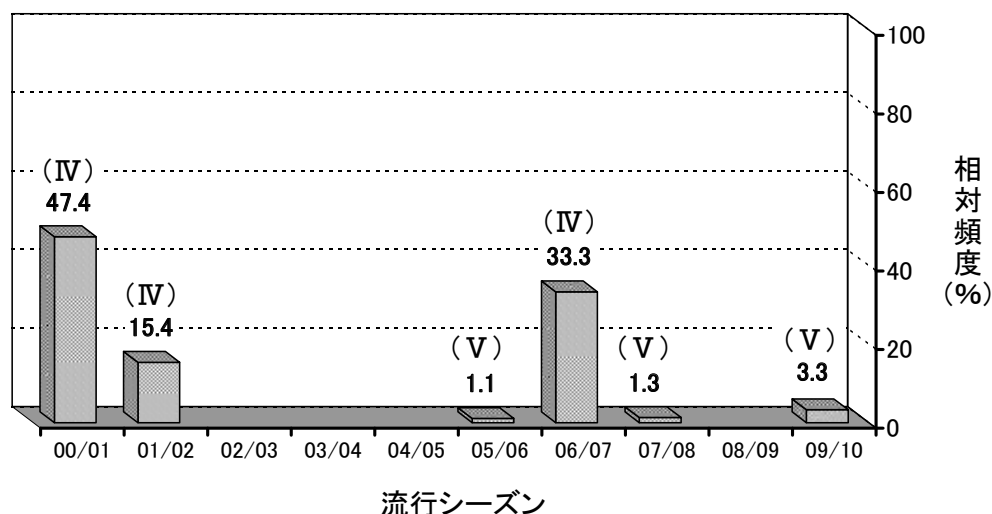


図1 G2型相対頻度とVP7遺伝子クラスターとの関連性

グラフ及びグラフ上の数値は各シーズンのG2型の相対頻度を、括弧内は流行株のVP7遺伝子クラスター名をそれぞれ示す。

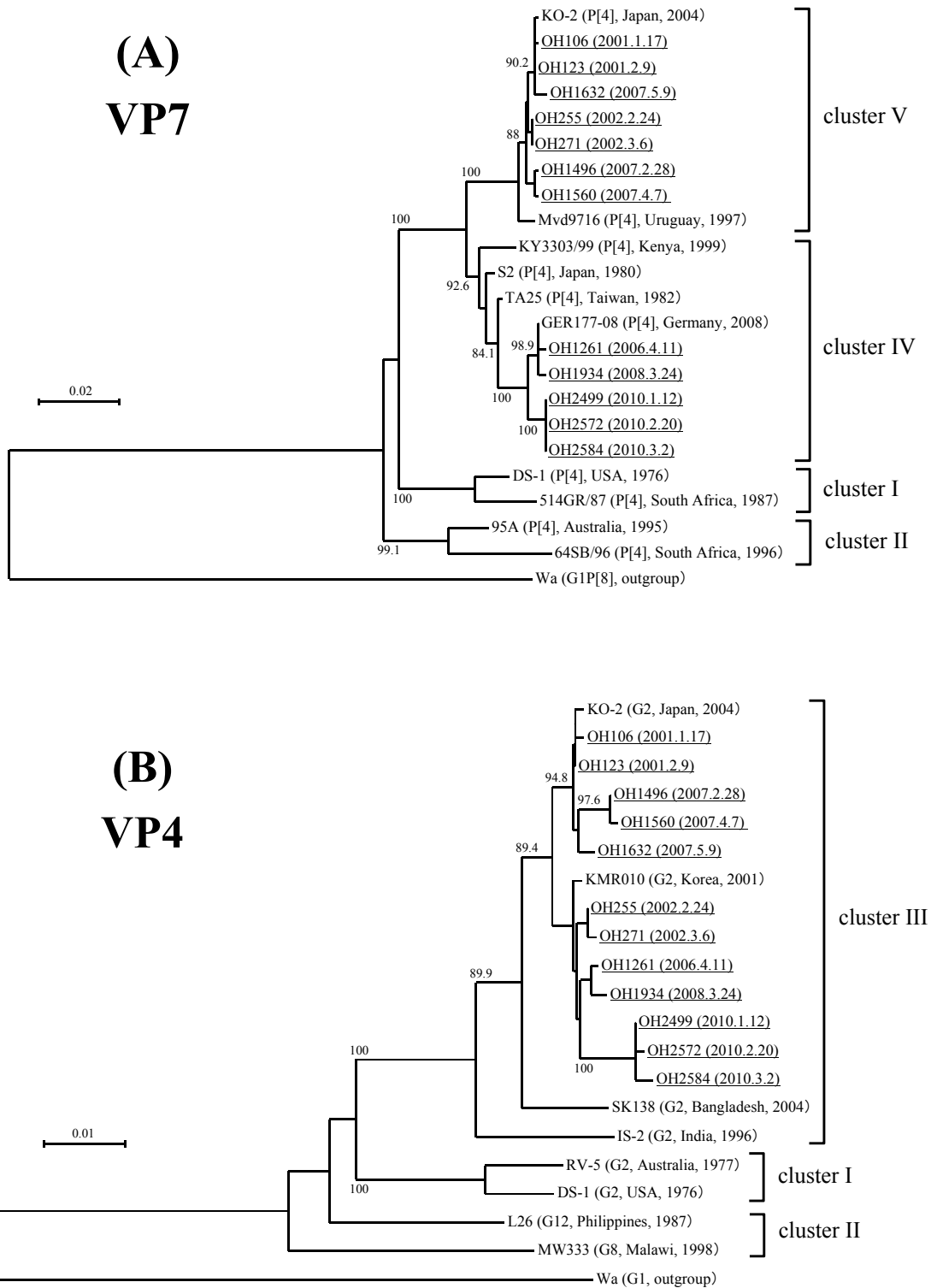


図2 VP7及びVP4遺伝子の系統解析結果

ヒトRVAのWa株 (G1P[8]型) を参照株として、VP7遺伝子 (パネルA) 及びVP4遺伝子 (パネルB) について近隣結合法により系統解析を実施した (1,000回のブートストラップを行い、800以上の数値をパーセントで系統樹上に示す)。県内で検出された株はアンダーラインで示し、括弧内に検出年月日を記した。既知の株については、G型またはP型、由来国及び分離年を括弧内に示す。なお、遺伝的距離 (サイトあたりの塩基置換期待数) をスケールバーで示した。VP7及びVP4遺伝子のクラスター分類はPaulらの報告⁹⁾にしたがった。

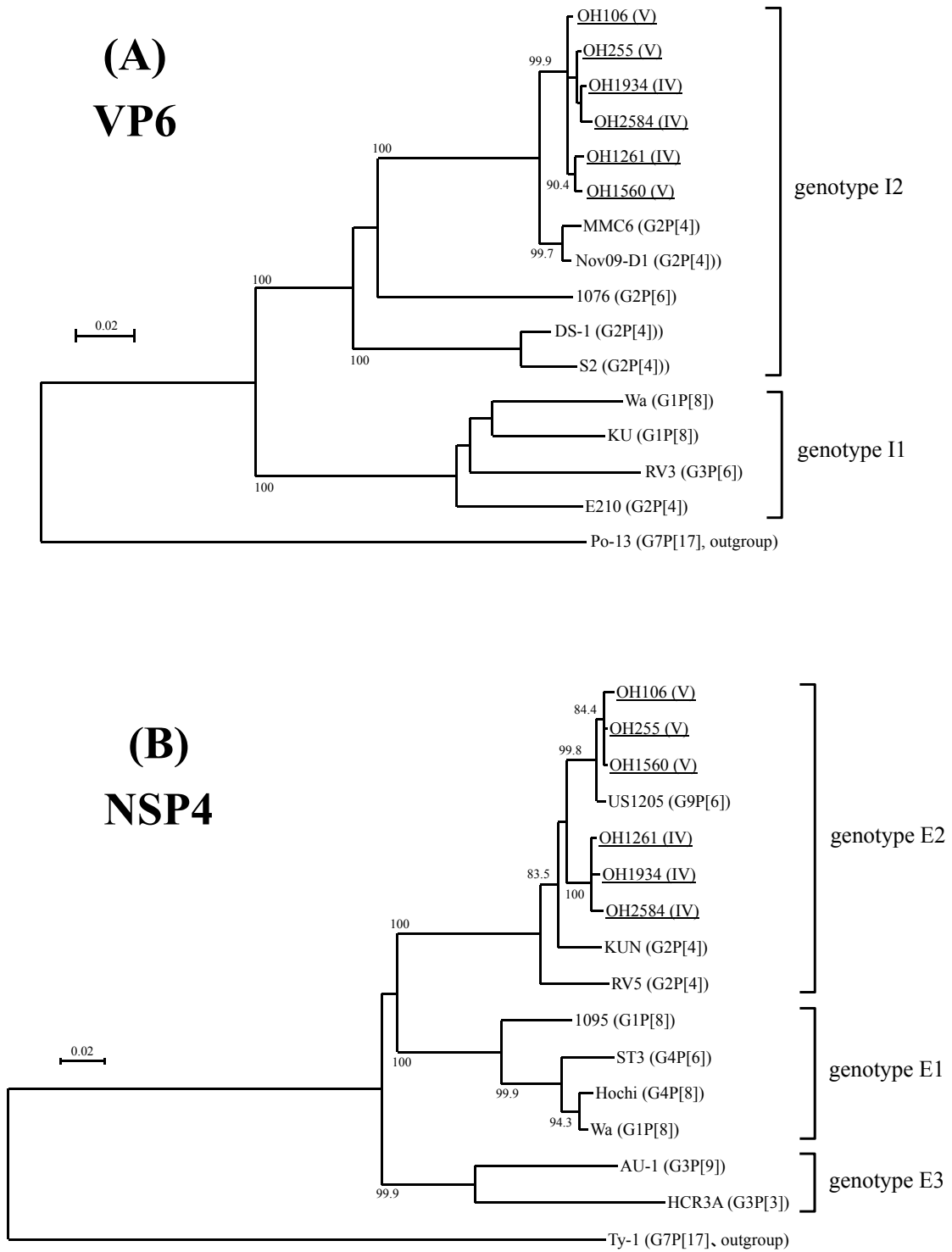


図3 VP6及びNSP4遺伝子の系統解析結果

トリRVAのPo-13株 (VP6遺伝子) 及びTy-1株 (NSP4遺伝子) を参照株として、VP6遺伝子 (パネルA) 及びNSP4遺伝子 (パネルB) について近隣結合法により系統解析を実施した (1,000回のブートストラップを行い、800以上の数値をパーセントで系統樹上に示す)。県内で検出された株はアンダーラインで示し、括弧内にVP7遺伝子クラスター名を記した。既知の株については、G型及びP型を括弧内に示す。なお、遺伝的距離 (サイトあたりの塩基置換期待数) をスケールバーで示した。VP6及びNSP4遺伝子のgenotype分類はMatthijnsensらの報告²⁾にしたがった。

DS-1	1:MEKLTDLNYSVITLMNNTLHTILEDPGMAYFPYIASVLTVLFALHKASIPTMKIALKT	60
OH106 (V)	1:..F.....S.....T.....	60
OH255 (V)	1:..F.....S.....T.....	60
OH1560 (V)	1:..F.....S.....T.....	60
OH1261 (IV)	1:..F.....S.....T.....	60
OH1934 (IV)	1:..F.....S.....T.....	60
OH2584 (IV)	1:..F.....S.....T.....	60
▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼		
DS-1	61:SKCSYKVVKYCIVTIFNTLLKLAGYKEQITTKDEIEKQMDRVVKEMRRQLEMIDKLTTR	120
OH106 (V)	61:.....L.....D.....	120
OH255 (V)	61:.....L.....	120
OH1560 (V)	61:.....L.....	120
OH1261 (IV)	61:.....L.....	120
OH1934 (IV)	61:.....L.....	120
OH2584 (IV)	61:.....L.....R.....	120
▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼ ▼		
DS-1	121:IEQVELLKRIYDKLMVRSSTDEIDMTKEINQKNVRTLEEWENGKNPYEPKEVTAAM	175
OH106 (V)	121:.....I.....S.....	175
OH255 (V)	121:.....I.....G.....S.....	175
OH1560 (V)	121:.....I.....S.....	175
OH1261 (IV)	121:.....C.....I..Q..G.....S.....	175
OH1934 (IV)	121:.....I..Q..G.....S.....	175
OH2584 (IV)	121:.....I..Q..G..I.....S.....	175

図4 NSP4アミノ酸配列アライメント結果

VP7遺伝子クラスターの異なる株（括弧内にクラスター名を示す）の予測アミノ酸配列について、G2P[4]型標準株のDS-1株の配列とともにアライメントを行った。ウイルス構成蛋白結合領域を灰色で示し、エンテロトキシン活性部位を枠で囲んだ。また、抗NSP4抗体により認識されるアミノ酸残基部分を矢印（▼）で示した。

るエピトープの一つであることが明らかにされている¹¹⁾。

3.5 相対頻度とVP7遺伝子クラスターとの関連性

これまでの遺伝子解析結果から、遺伝的に異なる2種類の株が県内で流行していたこと、及びそれらがVP7遺伝子クラスターによって区別可能であることが明らかになった。そこで、流行株の属するVP7遺伝子クラスターと相対頻度との関係をシーズンごとにみたところ（図1）、2000/01及び2001/02シーズンはクラスターIVの株が連続して流行したものの、2005/06シーズンはクラスターVの株が、次シーズンには再びクラスターIVの株が、その後はクラスターVの株が流行するなど、シーズンによって流行株がめまぐるしく変化していることがわかった。さらに、クラスターIVの株が流行したシーズンには相対頻度が15.4～47.4%と比較的高く、逆にクラスターVの株が流行したシーズンには1.1～3.3%と低いことも明らかになった。

4 考 察

本研究により、2000年～2010年までの10シーズン中6シーズンでG2型の流行が確認されるなど、本型が県内にお

いて断続的に流行している実態が明らかになった。10シーズンに検出されたRVA株のうち、G2型の占める割合は全体で7%と低率であったものの、G2型の相対頻度が15.4～47.4%と比較的高いシーズンと、1～3%と低いシーズンがあるなど、相対頻度にはばらつきのあることがわかった。我が国においてRVAの継続的な流行調査を行っている例はあまり多くないものの、牛島らのグループが全国5ヵ所の病院（北海道、東京、舞鶴、大阪、佐賀）で行った調査によると^{12)～14)}、2000年～2009年にG2型の相対頻度が10%を超えていたのは2000/01、2001/02、2004/05及び2006/07シーズンの計4シーズンで、その他のシーズンでは相対頻度がいずれも0～5%と低率であり、本県と類似した傾向が認められている。さらに、相対頻度が10%を超えていた4シーズンのうち2000/01、2001/02及び2006/07シーズンについては、本県でも相対頻度が高かったシーズンにあたっており、当該シーズンにはG2型が全国的に広く流行していたことが推察された。

2000年～2010年に県内で検出されたG2型の代表株について遺伝子解析を行ったところ、VP7遺伝子クラスターIV

及びVで代表される遺伝的に異なる2種類の株が、断続的に流行していたことが明らかになった。これら遺伝的に異なる株間においては、VP4及びVP6遺伝子には大きな違いはみられなかったものの、VP7及びNSP4遺伝子については数カ所にわたってアミノ酸置換部位が認められた。特にVP7については、あわせて5か所のアミノ酸置換部位が存在し、さらにそのうち1カ所は、G型特異的中和エピトープを構成する領域に位置するなど、これらの株間でVP7の抗原性が異なる可能性が強く示唆された。また、2000/01及び2001/02シーズンを除いて、同じVP7遺伝子クラスターの株が連続して流行することがなかったという事実も、このことを裏付けるものではないかと思われた。

シーズンごとのG2型相対頻度について、VP7遺伝子クラスターⅣの株が流行したシーズンは15.4~47.4%と高く、それに対してクラスターⅤの株が流行したシーズンは1.1~3.3%と低くなるなど、VP7遺伝子クラスターの異なる株間において、伝播性などに違いがあることが示唆された。本研究におけるNSP4遺伝子の比較・解析結果から、VP7遺伝子クラスターⅣとⅤの株間で、ウイルス構成蛋白結合部位に2か所のアミノ酸置換部位が認められ、しかもそのうち1か所は抗体認識部位に位置するなど、両者のNSP4には機能的及び抗原的差異のあることが示唆された。したがって、NSP4の機能的な違いがウイルスの増殖性に何らかの影響を及ぼしている可能性も考えられるが、NSP4の機能的差異のみで増殖性等の違いを結論づけることはできないため、他の遺伝子の比較・解析が必要と思われる。また今回は、流行株の一部について解析を行っているに過ぎないため、さらに多くの株についての解析結果も必要である。

我が国では2012年よりRVAワクチンの導入が開始されたが、今のところ全国レベルにおけるG2型相対頻度の上昇等は確認されていない(国立感染症研究所 片山私信)。これは、RVAワクチンが導入後間もないことや、我が国ではRVAワクチンが任意接種の対象であるため、RVA流行に対するワクチンの影響がさほど出ていないことによるのかもしれない。今後、摂取率の上昇に伴ってブラジルで確認されたようなG2型相対頻度の上昇⁹⁾も危惧されるが、その際より伝播力の優れるVP7遺伝子クラスターⅣの株が流行した場合には、流行がさらに拡大する可能性も考えられる。その危険性を事前に察知するためにも、G2型流行株の遺伝子レベルにおける継続的な監視が必要ではないかと思われる。

文 献

- 1) 小林宣道, 浦沢正三: ロタウイルス, ウイルス, 50: 157-172, 2000
- 2) Matthijssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Banyai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gomara, M., Johne, R., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P., Nakagomi, O., Parreno, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J. T., Desselberger, U., Van Ranst, M.: Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.*, 156: 1397-413, 2011
- 3) Santos, N. and Hoshino, Y.: Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 15: 29-56, 2005
- 4) 中込とよ子, 中込 治: ロタウイルスワクチンの現状と展望, 病原微生物検出情報, 26, 14-16, 2005
- 5) Gurgel, R. Q., Cuevas, L. E., Vieira, S. C., Barros, V. C., Fontes, P. B., Salustino, E. F., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Dove, W., Cunliffe, N., Hart, C. A.: Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis.*, 10: 1571-1573, 2007.
- 6) Gouvea, V., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B. and Fang, Z. Y.: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens, *J. Clin. Microbiol.*, 28: 276-282, 1990
- 7) Wu, H., Taniguchi, K., Wakasugi, F., Ukae, S., Chiba, S., Ohseto, M., Hasegawa, A., Urasawa, T., Urasawa, S.: Survey on the distribution of the gene 4 alleles of human rotaviruses by polymerase chain reaction., *Epidemiol. Infect.*, 112: 615-622, 1994
- 8) Paul, S. K., Kobayashi, N., Nagashima, S., Ishino, M., Watanabe, S., Alam, M. M., Ahmed, M. U., Hossain, M. A., Naik, T. N.: Phylogenetic analysis of rotaviruses with genotypes G1, G2, G9 and G12 in Bangladesh: evidence for a close relationship between rotaviruses from children and adults. *Arch. Virol.*, 153: 1999-2012, 2008
- 9) Doan, Y. H., Nakagomi, T., Cunliffe, N. A., Pandey, B. D., Sherchand, J. B., Nakagomi, O.: The occurrence of amino acid substitutions D96N and S242N in VP7

- of emergent G2P[4] rotaviruses in Nepal in 2004-2005 : a global and evolutionary perspective. *Arch. Virol.*, 156 : 1969-1978, 2011
- 10) Ball, J. M., Tian, P., Zeng, C. Q., Morris, A. P., Estes, M. K. : Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*, 272 : 101-104, 1996
 - 11) Hyser, J.M., Zeng, C. Q., Beharry, Z., Palzkill, T., Estes, M. K. : Epitope mapping and use of epitope-specific antisera to characterize the VP5* binding site in rotavirus SA11 NSP4. *Virology*, 373 : 211-228, 2008
 - 12) Phan, T. G., Khamrin, P., Quang, T. D., Dey, S. K., Takanashi, S., Okitsu, S., Maneekarn, N., Ushijima, H. : Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. *J. Virol.*, 81 : 4645 - 4653, 2007
 - 13) Dey, S. K., Thongprachum, A., Ota, Y., Phan, T. G., Nishimura, S., Mizuguchi, M., Okitsu, S., Ushijima, H. : Molecular and epidemiological trend of rotavirus infection among infants and children in Japan. *Infect. Genet. Evol.*, 9 : 955-961, 2009
 - 14) Chan-it, W., Thongprachum, A., Dey, S. K., Phan, T. G., Khamrin, P., Okitsu, S., Nishimura, S., Kobayashi, M., Kikuta, H., Baba, T., Yamamoto, A., Sugita, K., Hashira, S., Tajima, T., Ishida, S., Mizuguchi, M., Ushijima, H. : Detection and genetic characterization of rotavirus infections in non-hospitalized children with acute gastroenteritis in Japan, 2007-2009. *Infect. Genet. Evol.*, 11 : 415-422, 2011

【調査研究】

ノロウイルス検査におけるエコーウイルス9型Hill株を用いた 核酸検出効率の評価

Evaluation of Nucleic acid Detection Efficiency by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Using Echovirus Type 9 strain Hill for Diagnosis of Norovirus Infection

木田浩司, 溝口嘉範, 濱野雅子, 葛谷光隆, 藤井理津志 (ウイルス科)

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

要 旨

ノロウイルス (NoV) 検査における内部対照ウイルスであるエコーウイルス9型 (E9) Hill株の遺伝子配列の一部をプラスミドベクターに組換えたコントロールプラスミドを作成し, 2010年に開発したE9 Hill株のリアルタイムRT-PCR法の指標とすることで定量性のある検査系を構築した。食中毒事件の主要原因であるノロウイルス (NoV) のPCR法による検査では, 検体の種類によって検出感度が著しく異なることが知られているが, E9 Hill株の定量値から核酸検出効率を算定することで, 間接的にNoVの検出感度の検証が可能となった。そこで, 食中毒5事例21名から採取した糞便検体を対象として核酸検出効率の評価を試みたところ, 核酸検出効率は2~109%であり, 検体による差が大きいことが確認された。本法は迅速性に優れるだけでなく, 感度検証も可能であり, 応用範囲は広い。今後, 検出感度が低いとされる様々な食品検体でも核酸検出効率を検証することで, NoV検査法改良への一助としたい。

[キーワード: ノロウイルス, エコーウイルス, リアルタイムRT-PCR, TaqMan MGB probe]

[Key words: Norovirus, Echovirus, Real-time RT-PCR, TaqMan MGB probe]

1 はじめに

感染性胃腸炎や冬期食中毒の主要原因の1つであるノロウイルス (NoV) は, カリシウイルス科ノロウイルス属に分類され, 直径30-38nmで+鎖の一本鎖RNAを有するウイルスであるが, 培養細胞・実験動物により人工的に増殖させる技術は, いまだ確立されていない¹⁾。そのため, 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知NoV検査法 (通知法)²⁾は, 逆転写酵素 (reverse transcriptase: RT) を利用したRT-PCR法により実施される。しかし, 検査材料である糞便, 食品等は酵素反応を阻害する夾雑物を多量に含み, また一本鎖RNAはDNAと比較して不安定であるため, NoVの検査において, 検査自体の成立の確認は特に重要である。通知法では, 内部対照ウイルスとして検体に加えたエコーウイルス9型 (E9) Hill株が正しく検出されることで間接的にNoVの検査成立を保証している。しかし, 藤本らによって開発され, 通知法に示されたE9 Hill株のコンベンショナルRT-PCR法³⁾は定量性が無く, 検出感度の検証ができない。そこで我々は, E9 Hill株の遺伝子配列の一部をプラスミドベクターに組換え, 2010年に開発したE9 Hill株のリアルタイムPCR法⁴⁾の指標とすることで定量性のある検査系を構築した。また, 臨床検体における本

法の有用性を検討するため, 食中毒5事例21名の糞便検体を対象として核酸検出効率の評価を試みた。

2 材料と方法

2.1 E9 Hill株及び糞便検体の調製

E9 Hill株をヒト羊膜由来株化細胞のFL細胞に接種して培養し, 上清中の力価をBehrens-KärBer法で測定して 2.6×10^3 TCID₅₀/2 μ Lに調製し, 試験に供した。

食中毒5事例 (事例A~E) における糞便 (事例A 9名, 事例B 1名, 事例C 7名, 事例D 2名及び事例E 2名) について, PBS(-)を用いて10%乳剤を調製した後, 4℃で15,000rpm, 10分間遠心後, 上清を前処理糞便検体として試験に供した。

2.2 ウィルスRNAの抽出

E9 Hill株の培養上清140 μ Lをコントロールプラスミド作成用の試験液とした。食中毒事例については, 通知法²⁾に準じ, 前処理糞便検体138 μ LにE9 Hill株を2 μ L加えて検体試験液とした。また, PBS(-)138 μ LにE9 Hill株を2 μ L加え, 抽出対照試験液とした。RNA抽出は市販のキット (QIAamp Viral RNA mini kit Qiagen社製) を用い, カラムからのRNAの溶出にはRT bufferを用いた以外は添付マ

マニュアルに従って実施した。RNA抽出液60 μ Lに、DNase I (5U/ μ L Takara社製) 1.2 μ L及びRNase Inhibitor (40U/ μ L Takara社製) 0.4 μ Lを加え、37°C 10分間消化した。次に75°C 5分間加熱処理し、DNaseIを失活させた。

2.3 逆転写反応によるcDNAの合成

逆転写反応は、RevaTra Ace (100U/ μ L Toyobo社製)を用いた。DNase処理RNA抽出液5 μ Lに、pd(N)6 random hexamer (0.5 μ g/ μ L Takara社製) 1 μ L及びnuclease free water 3 μ Lを加え、70°Cで10分間加熱後ただちに水中に移して急冷した。次に5x RT buffer 3 μ L, 10mM dNTPs 2 μ L, Recombinant RNase Inhibitor (40U/ μ L Takara社製) 0.5 μ L, nuclease free water 4.5 μ L及びRevaTra Ace 1 μ Lを加えて20 μ Lとし、30°C 10分間、42°C 60分間及び98°C 5分間反応させた。

2.4 コントロールプラスミドの作成

E9 Hill株から作成したcDNAについて、酵素としてEX-Taq (Takara社製)、プライマーとしてE9 Hill-F及びE9 Hill-R (表1)を用いたPCR法で増幅した。反応条件は、酵素活性化95°C 1分間、熱変成94°C 1分間、アニーリング50°C 1分間及び伸長反応72°C 2分間を行い、熱変成から伸長反応のサイクルを40回繰り返した後、最終伸長反応を72°C 15分間行った。PCR増幅産物をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用い、添付マニュアルに従ってpCR2.1-TOPO vectorにクローニングした。挿入した遺伝子配列を、キット添付のM13プライマーセットを用いたダイレクトシーケンス法により確認した後、PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)を用い、添付マニュアルに従って組換えプラスミドを精製した。得られた組換えプラスミド溶液のOD値から、TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH8.0)にて 10^7 copies/ 2μ Lに調製したものをコントロールプラスミド原液とした。

2.5 リアルタイムPCR法

リアルタイムPCR法には、TaqMan Universal Master mix (life technologies社)を用いた。プライマー及びMGBプローブの配列を表1に示した。反応試薬18 μ LにcDNA

または10倍階段希釈したコントロールプラスミド溶液 ($1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ copies/ 2μ L) 2 μ Lを加えて20 μ L (各プライマー0.4 μ M, TaqMan MGBプローブ0.2 μ M)とした後、StepOnePlus (life technologies社)を用いて増幅反応を行った。反応条件は、50°C 2分間、95°C 10分間の後、熱変性95°C 15秒間及び伸長反応56°C 1分間を行い、熱変性から伸長反応のサイクルを45回繰り返した。解析は、StepOne Software v2.1 (life technologies社)を用いて行った。

3 結果

3.1 コントロールプラスミドを利用した定量性の検証試験

10倍階段希釈したコントロールプラスミド溶液を用いて、リアルタイムPCR法における増幅効率及び検量線の検討を行った。その結果、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^1$ copies/tubeの範囲内で、PCRサイクル数に比例した遺伝子の増幅が認められた。また、X軸にコントロールプラスミドのコピー数、Y軸にThreshold cycle (Ct)をプロットした検量線を作成したところ、直線性、傾きともに良好であった(図1)。このことから、本法によるコントロールプラスミドを用いた定量が可能であることが明らかとなり、その感度は 1×10^1 copies/tubeであると推定された。

3.2 糞便検体における核酸検出効率の評価試験

食中毒5事例(事例A~E)における21名の糞便(事例A 9名, 事例B 1名, 事例C 7名, 事例D 2名及び事例E 2名)について検討した。核酸検出効率の評価試験においては、誤差を少なくするため、PBS(-)にE9 Hill株を添加した抽出対照及び糞便検体について3 tubeずつリアルタイムRT-PCR法で定量し、平均値を算定した。次に抽出対照の定量平均値を核酸検出効率100%と仮定し、糞便検体の核酸検出効率を算定した。その結果、糞便検体の核酸検出率は2~109%の範囲であった(表2)。また、検体提供者の年齢、性別及び便性状(水様便~性状便)と核酸検出効率との間に、特に相関性は認められなかった(データは示していない)。

表1 プライマー及びプローブ

	塩基長 (base)	塩基配列	部位*	文献
E9Hill-F	20	5'-GTT AAC TCC ACC CTA CAG AT-3'	5192-5211	2)
E9Hill-R	20	5'-TGA ACT CAC CAT ACT CAG TC-3'	5459-5440	2)
E9-real-F	20	5'-CGT CTC AGT GGC TGG AAT CA-3'	5263-5282	4)
E9-real-R	21	5'-CCC TGT GTA TGC TCC TTG GAA-3'	5312-5332	4)
E9MGB	22	5'-(FAM)-ACA TAA TCT ACA AAC TCT TTG C-(NFQ)-(MGB)-3'	5286-5307	4)

* E9 Hill株の全塩基配列7420base (Accession No. X84981)における部位

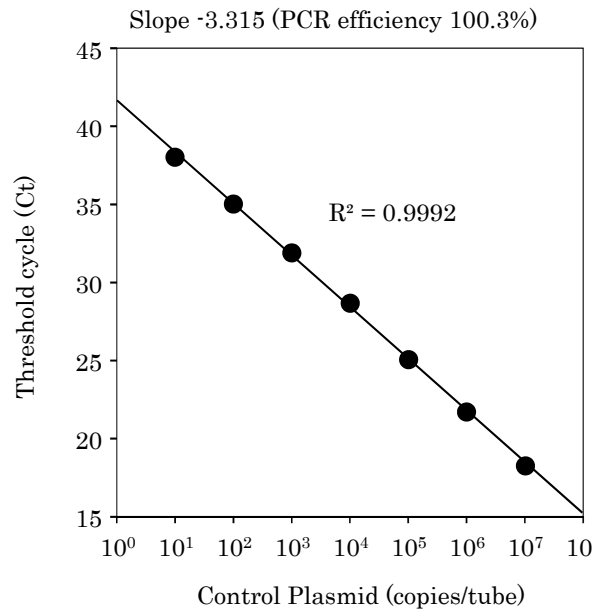


図1 E9 Hill株のリアルタイムRT-PCR法におけるコントロールプラスミドによる検量線

表2 食中毒事例の糞便検体におけるE9 Hill株の核酸検出効率

事例	検体	定量値 (copies/well)		核酸 検出効率 (%)
		平均値 (n = 3)	抽出対照 (PBS + E9)	
A	A-1	14,225		65
	A-2	4,714		21
	A-3	14,696		67
	A-4	21,182		96
	A-5	6,181	22,052	28
	A-6	4,636		21
	A-7	10,472		47
	A-8	9,145		41
	A-9	10,997		50
B	B-1	158	9,907	2
C	C-1	23,848		87
	C-2	23,077		84
	C-3	29,891		109
	C-4	19,844	27,376	72
	C-5	20,835		76
	C-6	26,133		95
	C-7	11,934		44
D	D-1	8,275	32,669	25
	D-2	14,677		45
E	E-1	31,195	31,203	100
	E-2	19,132		61

4 考察

NoVの検査では、検体の種類によって検出感度が著しく異なることが知られており、近年では、斎藤らの開発したパンソルビン・トラップ法⁵⁾等、NoVの検出感度向上のための様々な検体処理法が考案されている。しかし、検出感度の検証には、患者糞便を希釈して添加するなど、煩雑な操作が必要である。今回我々は、内部対照ウイルスであるE9 Hill株のコントロールプラスミドを作成し、2010年に開発したリアルタイムRT-PCR法⁴⁾における定量性を検証した。

その結果、本法は 1×10^1 copies/tube以上のE9 Hill株が存在すれば、検出と定量が可能であることが確認された。このことから、NoV検査におけるE9 Hill株の定量値から核酸検出効率を算定することで、間接的にNoVの検出感度を検証できると考えられた。

実検体を用いた検証試験として、食中毒5事例21名の糞便検体について、E9 Hill株の核酸検出効率を算定したところ、2~109%の範囲で様々であった。核酸検出効率100%を超える検体が存在するのは、リアルタイムRT-PCR

による定量は、原理上誤差が大きいためであると考えられた。糞便検体は、食品検体と比較してNoVの検出感度が高いとされているが⁵⁾、E9 Hill株においては20名中5名の核酸検出効率が30%以下であった。このことから、糞便検体にも一定の割合で検出感度の悪い検体が存在し、これはNoV検出においても同様であると考えられた。また、本試験では、抽出対照として検体と同量のE9 Hill株を添加したPBS(-)を設定し、この定量値を核酸抽出効率100%と仮定して評価を行ったが、抽出対照の定量値は9,907~3,120copies/tubeの範囲で変動しており、事例によって3倍程度の差が確認された。これは、定量に至るまでの多くの検査行程の中で、反応条件の僅かな差が積み重なるためであると考えられた。従って、本法による核酸抽出効率を算定する場合、試験ごとに抽出対照を設定することが重要であると考えられた。

リアルタイムRT-PCR法は、迅速性や定量性など、多くの利点を併せ持つ検査法であり、今後様々な分野で応用されると考えられる。今回、NoV検査における内部対照ウイルスであるE9 Hill株の定量が可能となったことで、間接的にNoV核酸の検出効率の評価が可能となった。ただし、本法は、エコーウイルスの多くに交差反応を示すと推測されることから、NoVとの混合感染をおこしている患者便では正確な評価が不可能になることを念頭に置く必要がある。一方、食品は糞便よりもNoVの検出感度が低いとされているが、食品の種類ごとの検出感度の評価はほとんどなされていない。今後、本法を応用し、様々な食品検体における核酸検出効率を検証することで、NoVの新たな検査法開発の一助としたい。

文 献

- 1) 西尾 治, 秋山美穂, 愛木智香子, 杉枝正明, 福田伸治, 西田知子, 植木 洋, 入谷展弘, 篠原美千代, 木村博一: ノロウイルスによる食中毒について, 食品衛生学雑誌, 46(6), 235-245, 2005
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知: ノロウイルスの検出法について, 食安監発第1105001号, 平成15年11月5日
- 3) 藤本嗣人, 近平雅嗣, 秋山美保, 西尾 治: ノロウイルス検査におけるRNA抽出コントロールとしてのエコーウイルス9型Hill株の適用について, 兵庫県立健康環境科学研究センター年報, 2, 107-110, 2003
- 4) 木田浩司, 濱野雅子, 葛谷光隆, 藤井理津志: ノロウイルス検査における抽出コントロールとしてのエコーウイルス9型Hill株のReal-time RT-PCR法による検出, 岡山県環境保健センター年報, 34, 73-76, 2010
- 5) 斎藤博之: 食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発, 日本食品微生物学会雑誌, 29(1), 32-37, 2012

【調査研究】

感染症流行予測調査（平成24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, 島村琢自* (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,
Takuji Shimamura* (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24年秋には不活化ポリオワクチンが導入された。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、感染症流行予測調査の一環として、ポリオウイルスの感染源調査を実施した。平成24年7月から8月に岡山市の健康な保育園児60名を対象に、採取した糞便検体からポリオウイルスの分離を試みたが、全て陰性であり、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3種類の血清型（1型～3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、多くは不顕性感染もしくは、かぜ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¹⁾。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。我が国では昭和39年の生ポリオワクチン導入後、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。平成24年秋には不活化ポリオワクチンが導入され、引き続き集団免疫の維持に努めている。しかし、海外との交流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、なお継続的な監視が必要である。また、ワクチン由来ポリオウイルス（Vaccine-Derived Poliovirus : 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る。生ポリオワクチン株が変異し、毒性を回復したVDPVによってポリオを発症することがある。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^{2)~5)}ため、野生株と同様に監視の必要がある。

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。ポリオウイルスの感染源調査はその一環であり、ポリオ流行地域からのポリオウイルス野生株の侵入及びVDPVの伝播を監視することを目的にしている。岡山県では昭和55年から本調査を継続的に実施しているが、平成24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：26人，女性：34人，0～1歳20人，2～3歳20人，4～6歳20人）

から、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24年7月30日～8月3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24年度）及び感染症流行予測調査事業検査術式（平成14年6月）⁶⁾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 μ L接種し、35 $^{\circ}$ Cで7日間観察した。7日間観察しても細胞変性効果（cytopathic effect：CPE）が現れない時は、凍結融解後、培養上清100 μ 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）及び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）を用いた。

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⁷⁾の「ヘルパンギーナ」の項に従い、VP4-VP2部分領域の遺伝子をRT-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に本調査で分離されたウイルスを年齢別に示した。ポリオウイルスはいずれの検体からも分離されなかった。

その他のウイルスとしてエコーウイルス9型（E9）18株（1歳児6人、2歳児2人、3歳児6人、4歳児3人、5歳児1人）、コクサッキーウイルスA4型（CA4）2株（2歳児1人、5歳児1人）が分離された。

4 考察

本調査は、ポリオ流行地域からのポリオウイルス野生株の侵入及び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。岡山県では昭和55年から本調査を実施しているが、平成23年度に初めてワクチン株のポリオウイルスが検出された⁸⁾。また、平成24年秋に不活化ポリオワクチンの導入が予定されたため、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た。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%）及び平成24年度（春：67.2%）は大きく低下した^{9)、10)}。接種率の低下によって集団免疫の維持が困難になると、未接種者の間で野生株やVDPVが流行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になったが、本県では検出されなかった。これは対象集団の生ポリオワクチン未接種者が3名のみで、集団免疫が維持されていたことが一因と考えられた。

本調査ではエコーウイルスのうち、E9が18株検出された。E9は岡山県内の感染症発生動向調査においても6月に6株分離されていた。また、6月から8月中四国地方の検出状況によると、E9はエコーウイルスの中で最も多く検出されていることから、本ウイルスの広範な侵淫があった可能性が高いと考えられる。

一方、CA4は2株分離されたが、平成24年の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。これは、一般にエンテロウイルスは不顕性感染が多

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			エコーウイルス	コクサッキーウイルス	合計
		1型	2型	3型	9型	A4型	
0	3	—	—	—	—	—	0
1	17	—	—	—	6	—	6
2	6	—	—	—	2	1	3
3	14	—	—	—	6	—	6
4	6	—	—	—	3	—	3
5	12	—	—	—	1	1	2
6	2	—	—	—	—	—	0
合計	60	0	0	0	18	2	20

く、感染者の多くは医療機関を受診しないためと考えられる。さらに、感染症発生動向調査が医療機関受診者を対象とするのに対し、本調査は基本的に健康者を対象にしていることも一因として考えられる。また、中四国地方で6月から8月に検出されたコクサッキーウイルスA群の中で、CA4の報告が最も多かった。このことから、本県にも本ウイルスの広範な侵淫があった可能性が高いと考えられた。本調査は健康児を対象にしており、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侵淫状況を推察できる点で意義深い。

ポリオ伝播を広域的に監視するために、フランス、オランダ、フィンランド等では下水中のポリオウイルス検査を実施している。下水中のポリオウイルス検査は、高感度に野生株やVDPVを検出でき、迅速な対策に資すると考えられるため、我が国でも平成25年度に一部の自治体において導入が検討されている。今後、本県においても下水中のポリオウイルス検査の実施について検討する必要がある。

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) 厚生労働省健康局結核感染症課・国立感染症研究所感染症流行予測調査事業委員会: 感染症流行予測調査事業検査術式, 2002
- 7) 国立感染症研究所他: 病原体検出マニュアル
- 8) 溝口嘉範, 木田浩司, 濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 羽原 誠: 感染症流行予測調査(平成23年度ポリオ感染源調査), 岡山県環境保健センター年報, 36, 101-103, 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
- 10) 厚生労働省健康局結核感染症課: 平成24年度春 急性灰白髄炎(ポリオ)予防接種率の調査結果まとめ, 平成24年11月1日, プレスリリース, 2012

【調査研究】

岡山県におけるインフルエンザ流行の疫学的解析 (2011～2012年シーズン)

Epidemiological Analysis of Influenza in Okayama Prefecture during 2011 to
2012 Season

木田浩司, 葛谷光隆, 溝口嘉範, 濱野雅子, 藤井理津志, 島村琢自* (ウイルス科)

*岡山県保健福祉部健康推進課

Kouji Kida, Mitsutaka Kuzuya, Yoshinori Mizoguchi, Masako Hamano, Ritsushi Fujii and
Takuji Shimamura*
(Department of Virology)

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

要 旨

2011～2012シーズンの岡山県におけるインフルエンザは、岡山県感染症発生動向調査事業における患者発生状況から、2011年第48週(11月下旬)に流行がはじまり、2012第18週(4月中旬)に終息したものと考えられた。患者発生状況を2010～2011シーズンと比較した結果、20～29歳を除く全ての年齢群で患者が増加していた。ウイルス検査成績から、今シーズンはAH3型を主流行としたB型との混合流行であると推察された。シーズンを通じてAH3型が検出されたが、2012年に入り、B型の検出比率が高くなった。分離株の抗原性解析の結果、シーズン後半に分離されたAH3型はワクチン株と抗原性が大きく異なっており、これがAH3型の流行をシーズン全期間にわたって長期化させた一因と考えられた。

[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

2011～2012年シーズンの岡山県におけるインフルエンザ流行の詳細を明らかにするため、学校等におけるインフルエンザ集団発生事例の患者発生状況及び岡山県感染症発生動向調査事業の定点医療機関におけるインフルエンザ患者発生状況を解析した。また、患者から採取された咽頭拭い液等からインフルエンザウイルス(Inf.V)の検索を行い、分離されたウイルスについては抗原性解析を行った。

2 材料及び方法

2.1 インフルエンザ患者発生状況

集団発生事例患者数については、岡山県保健福祉部健康推進課がとりまとめた「インフルエンザとみられる学校等の臨時休業」をもとに集計した。また、岡山県感染症発生動向調査事業の週別患者報告に基づき、定点医療機関あたりのインフルエンザ患者数(1週間に1カ所の定点医療機関を受診したインフルエンザ患者数の平均値)を算出・集計した。

2.2 Inf.V検査材料

2011年10月～2012年4月にインフルエンザ集団発生が認められた8施設の患者22人及び平成23年7月～24年6月に発生動向調査で確認されたインフルエンザ患者47人(合計69人)から採取した咽頭拭い液等をInf.V検査材料とした(表1)。

2.3 遺伝子検出法に基づくA型Inf.V検査

遺伝子検出法に基づくA型Inf.Vの検査については、国立感染症研究所から示された「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、QIAamp Viral RNA Mini Kit(株式会社キアゲン)を用い、検体からウイルスRNAを抽出後、前記マニュアルに従って逆転写PCR(RT-PCR)法を実施し、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。

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¹⁾。Inf.V検査材料をMDCK細胞に接種し、盲継代2～3代後に細胞

表1 インフルエンザウイルス検査成績

	検体採取状況				ウイルス検出・同定			
	施設 No.	施設名	所在地	検体採取 年月日	検出	同定		
						AH3型	B型 (ビクトリア系統)	B型 (山形系統)
集団 発生事例	1	A小学校	倉敷市	2011.10.31	3/3*	3	0	0
	2	B小学校	浅口市	2011.11.30	3/3	3	0	0
	3	C小学校	和気町	2011.12.5	1/1	1	0	0
	4	D小学校	玉野市	2011.12.19	3/3	3	0	0
	5	E小学校	岡山市	2012.1.10	2/4	2	0	0
	6	F小学校	美咲町	2012.1.16	4/5	4	0	0
	7	G小学校	岡山市	2012.1.19	2/2	0	2	0
	8	H小学校	岡山市	2012.4.18	0/1	0	0	0
	小計					18/22 (81.8%)	16 (72.7%)	2 (9.1%)
散発事例	所管保健所名		検体採取年月日					
	岡山市保健所	2011.12.16 ~ 12.26		2/2	2	0	0	
		2012.1.5 ~ 1.24		15/15	13	1	1	
		2.28 ~ 3.7		6/7	0	5	1	
		3.13 ~ 4.19		2/2	2	0	0	
	備前保健所	2012.3.6		3/3	0	3	0	
	倉敷市保健所	2012.2.16 ~ 2.24		7/7	7	0	0	
	備中保健所	2011.10.31 ~ 12.26		0/2	0	0	0	
		2012.1.2 ~ 2.4		1/5	0	1	0	
	美作保健所	3.1 ~ 4.9		2/2	1	1	0	
		2012.1.25		0/1	0	0	0	
備北保健所	2012.2.10		1/1	0	0	1		
小計					39/47 (83%)	25 (53.2%)	11 (23.4%)	3 (6.4%)
合計					57/69 (82.6%)	41	13	3

* 陽性数/検体数

変性効果のみられた検体について、モルモット赤血球を用いて赤血球凝集（HA）試験²⁾を実施し、HAが観察された場合を分離陽性とした。分離株については、AH1pdm09型ワクチン株（A/California/7/2009（H1N1pdm09））、AH3型ワクチン株（A/Victoria/210/2009（H3N2））、山形系統³⁾に属するB型Inf.V（B型山形系統Inf.V）標準株（B/Bangladesh/3333/2007）及びビクトリア系統³⁾に属するB型Inf.V（B型ビクトリア系統Inf.V）ワクチン株（B/Brisbane/60/2008）に対する抗血清（いずれも国立感染症研究所より分与）を用いた赤血球凝集阻止（HI）試験²⁾により型別及び抗原性解析を行った。

3 結果

3.1 患者発生状況

岡山県発生動向調査事業における県全体の定点医療機関あたり（定点あたり）のインフルエンザ患者数の推移を図1に示した。2011年第48週（11月下旬）に、定点あたり患者数がインフルエンザ流行開始の目安とされる1.0人を

超えた後、第50週（12月中旬）には注意報レベルにあたる定点あたり5.0人を上回った。患者数の増加は2012年第2週（1月中旬）まで緩やかであったが、第3週に急激に増加して警報レベル（定点あたり30人）を超え、第4週（1月下旬）にはピーク（35.8人）に達した。その後、患者数は漸減し、第18週（4月下旬）には定点あたり1.0人を下回り、流行はほぼ終息した。地区別の患者数推移をみると（図2）、津山・勝英地区では2012年第4週（1月下旬）と第11週（3月中旬）をピークとする二峰性の流行パターンが認められたが、他の地区では2012年第4週をピークとした一峰性の流行パターンであった。倉敷・井笠地区では、他の地区と比較して4週程度早い2011年第48週（11月下旬）から患者が急激に増加していた。また、ピーク時（第4週）の定点あたり患者数（49.6人）も、他の地区と比較して高かった。年齢群別の定点あたり患者数を昨シーズンと比較したところ、20～29歳で僅かに減少したものの、他の年齢群では全て増加していた（図3）。

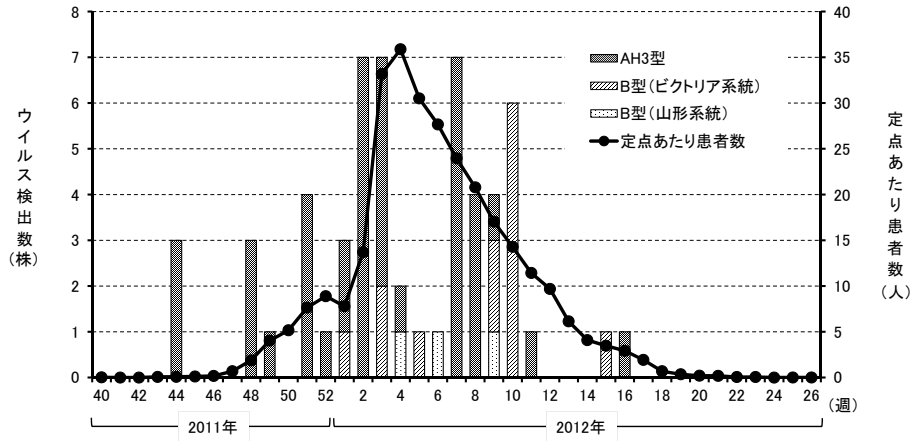


図1 週別のインフルエンザ患者数及びウイルス検出状況

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

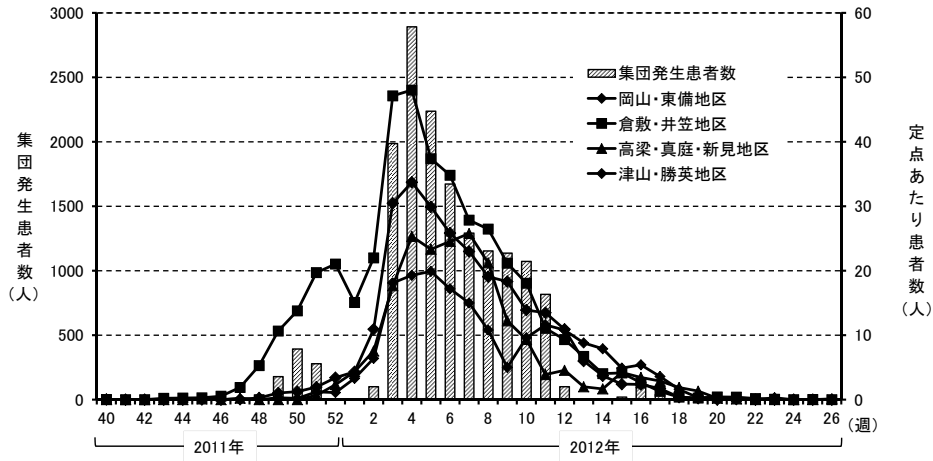


図2 週別のインフルエンザ患者発生状況

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あたり(定点あたり)患者数を示す。

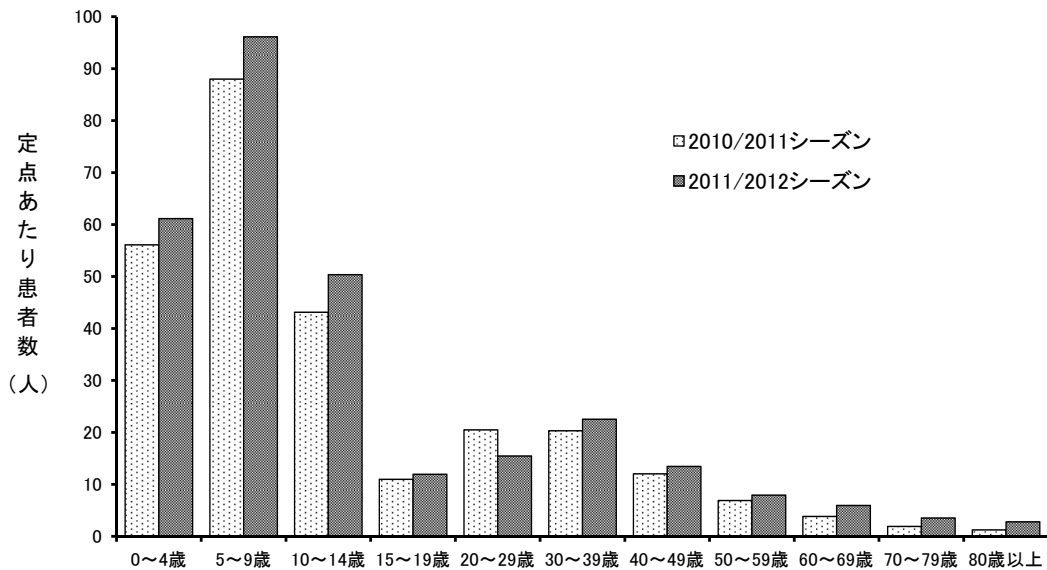


図3 年齢群別定点あたりインフルエンザ患者数の比較

3.2 ウイルス検査成績

インフルエンザ患者からの検体採取状況及びウイルス検出状況を表1及び図1に示した。インフルエンザ集団発生が認められた8施設中7施設の患者18人(81.8%)からInf.Vが検出されたが、その内訳はAH3型16件(72.7%)及びB型ビクトリア系統2件(9.1%)であった。一方、散发例では47人中39人(83%)からInf.Vが検出されたが、その内訳はAH3型25件(53.2%)、B型ビクトリア系統11件(23.4%)及びB型山形系統3件(6.4%)であった。ウイルス株全体ではAH3型(41件:59.4%)が最も多く、次いでB型ビクトリア系統(13件:18.8%)、B型山形系統(3件:6.4%)の順であった。

週別のウイルス検出状況を図1に示した。AH3型は流行期間全般にわたって検出されたが、B型ビクトリア系統は2012年第1週(1月上旬)から検出されはじめ、第10週(3月上旬)に最も多くなり、流行が終息しつつあった第

15週にも1株が検出された。またB型山形系統は第4、6及び9週にそれぞれ1株のみ検出された。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)。

3.3 ウイルスの抗原性解析

69件の患者検体についてMDCK細胞を用いてInf.Vの分離を試みたところ、AH3型 22株、B型ビクトリア系統 13株及びB型山形系統 3株がそれぞれ分離された。AH3型分離株について、ワクチン株であるA/Victoria/210/2009(H3N2)とHI価を比較したところ、20株中5株(25%)で8倍、6株で16倍、4株で32倍、5株で64倍の差が認められた。さらに分離時期別にみると、流行前半の2011年第48~52週に分離された4株は、いずれも16倍以下の差にとどまっていたのに対し、流行の中盤にあたる2012年第1~3週に分離された8株のうち2株及び第7~9週に分離された8株のうち3株については、64倍の差が認められた(図4)。

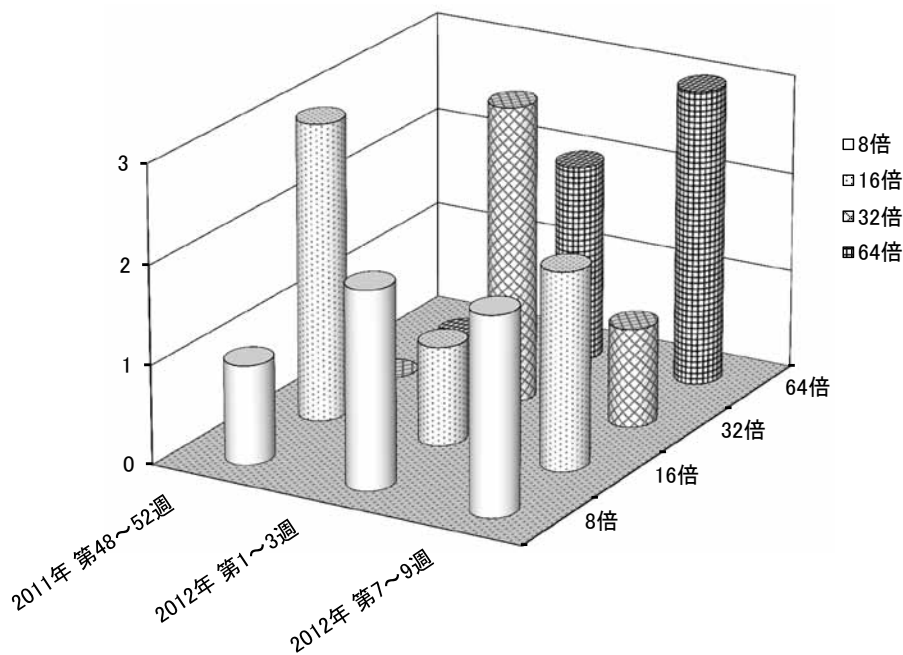


図4 分離時期別のAH3型インフルエンザウイルスの抗原性比較

AH3型ワクチン株であるA/Victoria/210/2009株を基準とし、HI試験により抗原性を比較した。

4 考 察

今シーズンの岡山県におけるインフルエンザは、患者発生状況から2012年第4週（1月下旬）をピークとする一峰性の流行パターンが認められた。また、ウイルス分離成績等から、今シーズンはAH3型を主流行としたB型との混合流行であると推察された。流行時期別では、シーズンを通じてAH3型が、シーズン後半には主にB型ビクトリア系統が検出され、昨シーズン前半の流行原因と推察されたAH1pdm09型は検出されなかった⁴⁾。年齢群別の定点あたり患者数を昨シーズンと比較したところ、20～29歳で僅かに減少したものの、他の年齢群では全て増加しており、流行の規模は昨シーズンよりも大きかったと考えられた。全国の流行状況を見ると⁵⁾、⁶⁾、2012年第5週をピークとする一峰性の流行パターンが認められた。分離成績では、AH1pdm09型は全体の0.2%しか分離されていないが、AH3型はシーズン当初から分離され、流行のピークを過ぎるまでは分離株の大半を占めており、2012年第9週以降、B型の分離報告数がA型を上回っていた。これらは本県の今シーズンの状況と類似していた。

HI試験による抗原性解析では、一般にワクチン株とのHI価の差が8倍以上で「変異株」とされる。今シーズンのAH3型分離株は、ワクチン株とのHI価の差が全て16倍以上の変異株であり、これは変異株の比率が34%であった全国⁶⁾の状況と比較して高い。また、シーズン中盤以降（2012年第1～9週）では、5/16株（31.2%）でワクチン株と64倍の差が認められ、シーズン前半と比較して抗原性変異の大きいAH3型による流行が示唆された。これらのことから、本県では、シーズン序盤からAH3型変異株が流行していたものと思われる。シーズン中盤から、より抗原性変異の大きい株の流行比率が大きくなったことが、AH3型の流行をシーズン全期間にわたって長期化させた一因と考えられた。

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，木田浩司，藤井理津志，川井睦子：岡山県における2010～2011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，36，89-94，2012
- 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 2011/12シーズン，病原微生物検出情報，33，285-287，2012
- 6) 岸田典子，高下恵美，藤崎誠一郎，徐 紅，伊東玲子ら：2011/12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，33，288-294，2012

【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 (2011/12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 2011/12 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

岡山県内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、岡山県内で2011年9月～2012年8月に採取した散発患者糞便 (合計730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 111件 (15.2%), アデノウイルス様粒子 11件 (1.5%), 小型球形ウイルス (SRSV) 様粒子 24件 (3.3%) 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

ロタウイルスA, ロタウイルスC, 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。), 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原因ウイルスであり, 毎年多くの患者が発生している^{1)~9)}。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24年度は2011年9月～2012年8月 (以下「2011/12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, 2011/12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

2011/12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270名, 434名及び26名の合計730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¹⁰⁾。

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、2011/12シーズンにおける岡山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。

2011/12シーズンでは、第48週（12月）に急増し、第51週（12月）にはピークの11.41人に達した。第52週（12月）以後は減少したものの、第13週（4月）には再び上昇に転じ、第15週（4月）には二番目のピークとして12.15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730件の散発患者糞便よりRV 111件（15.2%）、ADV 11件（1.5%）、SRSV 24件（3.3%）、計146件（20.0%）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。

RVは2012年2月～5月に多く検出され、ADVはシーズンを通して検出され、SRSVは2011年11月～2012年1月に最も多く検出された。

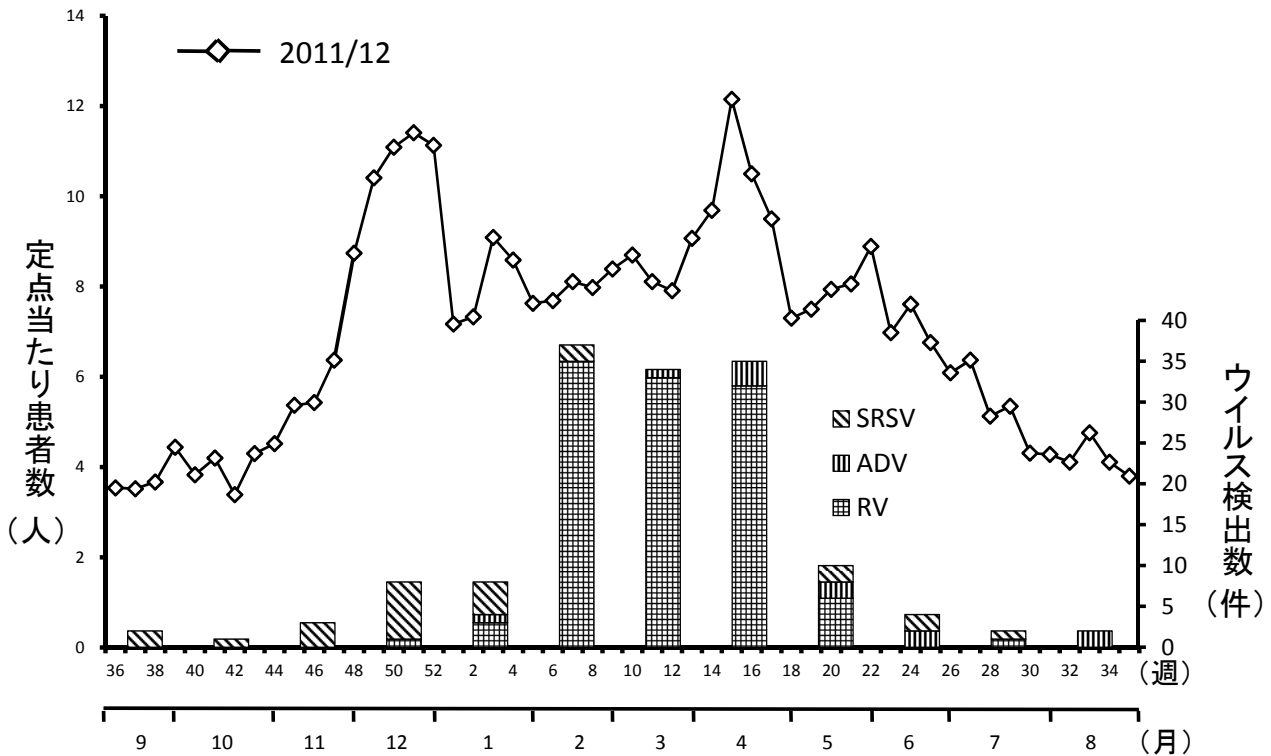


図1 感染性胃腸炎の週別定点当たり患者数と月別ウイルス検出状況

折れ線: 定点当たり患者数、カラム: ウイルス検出数

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			
2011.9	18	0	0	2(11.1)	16(88.9)	4	0	0	0	4	14	0	0	2	12	-	-	-	-	
10	21	0	0	1(4.8)	20(95.2)	10	0	0	0	10	9	0	0	0	9	2	0	0	1	1
11	32	0	0	3(9.4)	29(90.6)	12	0	0	1	11	16	0	0	0	16	4	0	0	2	2
12	54	1(1.9)	0	7(13.0)	46(85.2)	15	1	0	0	14	38	0	0	7	31	1	0	0	0	1
2012.1	64	3(4.7)	1(1.6)	4(6.3)	56(87.5)	21	0	0	1	20	42	3	0	3	36	1	0	1	0	0
2	103	35(34.0)	0	2(1.9)	66(64.1)	38	14	0	1	23	63	21	0	0	42	2	0	0	1	1
3	111	33(29.7)	1(0.9)	0	77(69.4)	38	17	1	0	20	71	15	0	0	56	2	1	0	0	1
4	115	32(27.8)	3(2.6)	0	80(69.6)	44	14	2	0	28	67	16	0	0	51	4	2	1	0	1
5	82	6(7.3)	2(2.4)	2(2.4)	72(87.8)	34	3	1	0	30	46	3	1	2	40	2	0	0	0	2
6	49	0	2(4.1)	2(4.1)	45(91.8)	19	0	0	1	18	27	0	2	0	25	3	0	0	1	2
7	42	1(2.4)	0	1(2.4)	40(95.2)	24	0	0	0	24	16	1	0	1	14	2	0	0	0	2
8	39	0	2(5.1)	0	37(94.9)	11	0	1	0	10	25	0	1	0	24	3	0	0	0	3
合計	730	111(15.2)	11(1.5)	24(3.3)	584(80.0)	270	49	5	4	212	434	59	4	15	356	26	3	2	5	16

(): 検出率(%)

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¹¹⁾、本シーズンは12月と4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11～1月に多く検出され、RVは2～5月に多く検出されていたことから、12月、4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)。

2005/06, 2006/07, 2007/08, 2008/09, 2009/10, 2010/11シーズンのSRSV検出数は、83, 71, 52, 47, 18, 24件であったが、本シーズンは24件であったため、2009/10シーズン以降、少ない検出数で推移していることが判明した^{12, 13)}。

本シーズンに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、平成19年～24年では平成23年に次いで少なく¹⁴⁾、全国的にも平成15年以降では、平成21, 23年に次いで少なかったことと一致していると考えられる¹⁵⁾。

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ことから、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を示唆している¹²⁾。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もあることから、今後もEM法による胃腸炎ウイルスの流行状況の把握を行う必要がある。

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と考えられる。

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) 藤井理津志, 葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 溝口嘉範, 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 (2010/11シーズン) -, *岡山県環境保健センター年報*, 36, 105-107, 2012
- 14) 岡山県保健福祉部生活衛生課: 岡山県の食中毒発生状況 (平成20年～24年, 岡山県) [岡山県ホームページ](#),

<http://www.pref.okayama.jp/page/detail-88301.html>

- 15) 厚生労働省：食中毒事件一覧速報（年次別食中毒発生状況）厚生労働省ホームページ, <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#j4-2>

【調査研究】

LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討

(1) 植物毒リコリンの迅速分析

Study for Rapid Analysis Method of Natural Poisons by LC/MS/MS

(1) Rapid Analysis of Plant Poison Lycorine

浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美 (衛生化学科)

Toyohiro Urayama, Kanae Koeduka, Masaaki Akaki, Masami Kitamura
(Department of Food and Drug Chemical Research)

要 旨

食中毒発生時には、原因究明のため早く検査結果を出すことが求められており、毎年発生している自然毒による食中毒に対し、LC/MS/MSを用いた迅速分析を検討したので報告する。

[キーワード：自然毒, リコリン, LC/MS/MS法]

[Key words : Natural Poisons, Lycorine, LC/MS/MS]

1 はじめに

スイセンの葉の誤食などの植物性自然毒による食中毒は毎年発生している。

自然毒による食中毒は致死率の高いものも多く、迅速な原因究明が求められている。しかし、通常の検査方法では抽出液の精製等に長時間を要し、迅速な対応は困難である。

そこで、今回、LC/MS/MSを用いた機器分析により、前処理工程を短縮した迅速分析法を検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 分析対象物質

厚生労働省が公表している過去の食中毒発生事件一覧¹⁾を参考に、事故が毎年発生しているリコリンを分析対象項目として選定した。

植物性自然毒であるリコリンは、ヒガンバナ、スイセンなどのヒガンバナ科の植物に含まれる有毒成分で、スイセンの葉をニラと間違えて調理してしまう食中毒が全国では毎年発生している。

2.2 試料

添加回収試験には、市販のニラを用いた。(写真1)

濃度測定用の試料として、当センター周辺の道路脇に自生するヒガンバナ(写真2~6)と、当センターにおいて生育させたスイセン(写真7~8)の葉と球根を12月に採取し使用した。なお、ヒガンバナは、晩夏から初秋に枝も葉も節もない花茎が地上に突出し花が咲き、花茎が消えて晩秋に葉が出てくる性質があり、花茎と葉を分析対象とし

たほか、球根は花期(9月採取)と葉期(12月採取)をそれぞれ分析することとした。



写真1
ニラ(市販品)(添加用)



写真2
ヒガンバナ(花期)



写真3
ヒガンバナ(葉期)



写真4
ヒガンバナ(葉と球根)



写真5
ヒガンバナ・花茎



写真6
ヒガンバナ・球根



写真7 スイセン



写真8 スイセン

2.3 試薬等

- 1) リコリン塩酸塩標準品：BIOMOL社製(自然毒共同研究²⁾で配布されたもの)
- 2) 超純水：ELGA社製超純水製造装置PURELAB flexで精製

- 3) メタノール：LC/MS用
- 4) 酢酸アンモニウム：試薬特級
- 5) 0.20 μ mメンブランフィルター：Millex-LG, 0.20 μ m, 4 mm (Millipore社製)

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 XBridge C18 3.5 μ m (2.1mm ID.x15cm)

カラム温度：40℃

移動相：A液（5 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液），

B液（5 mmol/L酢酸アンモニウムメタノール溶液）

グラジエント条件：A/B=85/15（0-0.1min）→15/85（10-20min）→85/15（20.1-35min）

移動相流量：0.2mL/min

試料注入量：5 μ L

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

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）：

（定量）288.1>147.1（確認）288.1>119.3, 288.1>91.1

2.5 前処理操作

自然毒共同研究²⁾で示された操作を参考に次のとおり前処理した。

粉碎した試料約5gを50mLポリプロピレン遠沈管に取り、メタノール20mLを加え3分間ホモジナイズした。

3000rpmで5min遠心分離後、上清をGFPろ紙で減圧ろ過した。残渣が残ったポリプロピレン遠沈管にメタノール20mLを加え3分間ホモジナイズし、GFPろ紙で減圧ろ過し、先のろ液に合わせた。更に、ろ紙上の残渣をメタノール5mL×3回で洗浄・減圧ろ過し、先のろ液に合わせた。ろ液にメタノールを加えて100mLに定容し、抽出溶液とした。

抽出溶液から200 μ L分取し、メタノールを加えて100mLに定容し、そこから約2mLを分取し0.20 μ mメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

2.6 標準液の調製

リコリン塩酸塩標準品5.63mg（リコリン5mg相当）をメタノールで10mLにメスアップしたものを500 μ g/mL標準液とした。

2.7 検量線溶液の調製

リコリン標準液をメタノールで順次希釈し、0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100ng/mLの検量線溶液を調製した。

なお、50及び100ng/mLは直線性が無かったため棄却し、0.1~20ng/mLの検量線とした。

3 結果及び考察

3.1 クロマトグラムと検量線

LC/MS/MSクロマトグラムを図1に、検量線を図2に示す。シャープなピークのクロマトグラムが得られ、0.1~20ng/mLの範囲で $r^2=0.9996$ の良好な直線が得られた。なお、50ng/mL及び100ng/mLは、直線から外れていることが確認されたため、検量線から外すこととした。

3.2 添加回収試験結果

結果を表1に示す。厚生労働省の妥当性評価ガイドライン³⁾で目標値とされる回収率（真度）70~120%及び相対標

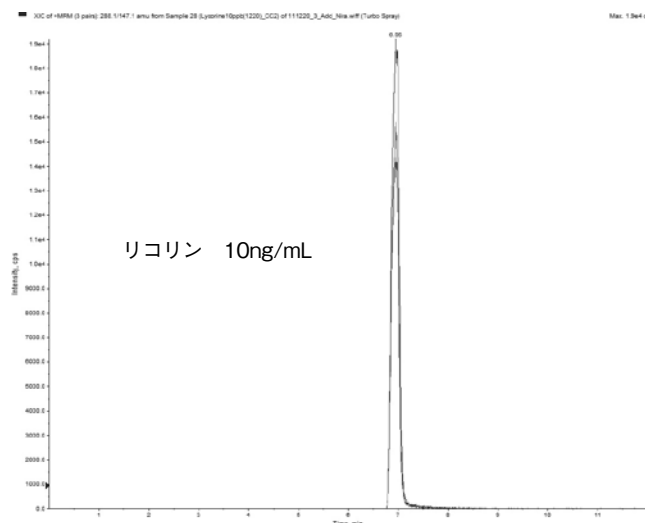


図1 リコリンのLC/MS/MSクロマトグラム

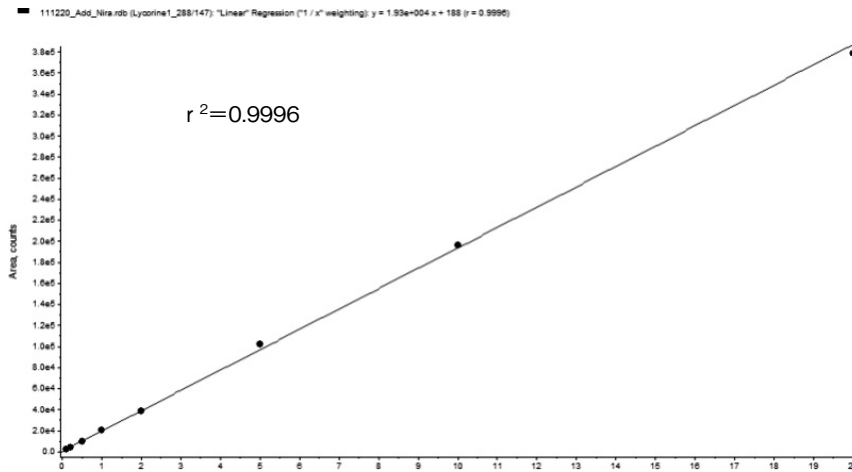


図2 リコリンの検量線 (0.1~20ng/mL)

準偏差 (併行精度) 10%以下のいずれも満たしており、良好な結果であった。

表1 リコリンの添加回収試験結果

	平均回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
50 μ g/g添加 (n=5)	95.8	2.2
5 μ g/g添加 (n=2)	98.7	2.4

3.3 実試料の濃度測定

結果を表2に示す。ヒガンバナの球根及び葉の測定結果は、(独)農業環境技術研究所の研究報告⁴⁾「ヒガンバナの生の鱗茎(球根)中に0.5mg/g (=500 μ g/g)、生葉中に0.3mg/g (=300 μ g/g)」とほぼ一致していた。また、球根中のリコリン濃度は、花期と葉期で違いは見られなかった。

表2 リコリンの実試料測定結果

(n=2)

		定量値 (ng/mL)	試料量 (g)	最終液量 (mL)	平均濃度 (μ g/g)	相対標準 偏差 (%)
ヒガンバナ	茎(花下)	9.10~9.42	5.07~5.12	50,000	90.9	1.75
	葉	4.56~4.64	5.00~5.01	250,000	230	1.09
	球根(花期)	9.29~9.34	5.09~5.12	250,000	456	0.04
	球根(葉期)	8.81~8.98	5.02~5.17	250,000	436	0.73
スイセン	葉	16.9~18.1	5.02~5.16	50,000	172	2.91
	球根	4.37~4.68	5.05~5.13	250,000	222	5.95

4 まとめ

植物毒リコリンについて、LC/MS/MSを用いた迅速分析法を検討し、次のことがわかった。

- 1) リコリンを高感度かつ迅速に分析でき、添加回収試験結果も厚生労働省の妥当性評価ガイドラインの目標値を満足する良好な結果であった。
- 2) 実際のヒガンバナの濃度測定をしたところ、測定値は文献値とほぼ一致しており、本分析法が実試料にも適用可能と推察された。

今後も、対象物質の追加、定量性の向上等について研究していく予定である。

文 献

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 2) 地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立とその精度管理の実施及び疫学機能の強化に関する研究・分担研究健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業), 平成23年度総括・分担研究報告書, 47-57, 2012
- 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
- 4) ヒガンバナの他感作用とその作用物質リコリンおよびクリニンの同定,
http://www.niaes.affrc.go.jp/sinfo/result/result15/result15_16.html

【調査研究】

LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討

(2) アトロピン, スコポラミン, アコニチン及びメサコニチンの同時分析

Study for Rapid Analysis Method of Natural Poisons by LC/MS/MS

(2) Simultaneous Analysis of Atropine, Scopolamine, Aconitine and Mesakonichin

浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美 (衛生化学科)

Toyohiro Urayama, Kanae Koeduka, Masaaki Akaki, Masami Kitamura

(Department of Food and Drug Chemical Research)

要 旨

食中毒発生時には、原因究明のため早く検査結果を出すことが求められており、毎年発生している自然毒による食中毒に対し、LC/MS/MSを用いた迅速分析を検討したので報告する。

[キーワード：自然毒, アトロピン, スコポラミン, アコニチン, LC/MS/MS法]

[Key words : Natural Poisons, Atropine, Scopolamine, Aconitine, LC/MS/MS]

1 はじめに

チョウセンアサガオの根の誤食などの植物性自然毒による食中毒は毎年発生している。

自然毒による食中毒は致死率の高いものも多く、迅速な原因究明が求められている。しかし、通常の検査方法では抽出液の精製等に長時間を要し、迅速な対応は困難である。

そこで、今回、LC/MS/MSを用いた機器分析により、前処理工程を短縮した迅速分析法を検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 分析対象物質

厚生労働省が公表している過去の食中毒発生事件一覧¹⁾を参考に、アトロピン, スコポラミン, アコニチン及びメサコニチンを分析対象項目として選定した。

アトロピン及びスコポラミンはチョウセンアサガオ, ハシリドコロ, ヒヨス, ベラドンナなどの有毒成分であり、チョウセンアサガオの根をゴボウと間違えて調理してしまうなどによる食中毒が当県でも過去に発生している。また、アコニチン及びメサコニチンはトリカブトの有毒成分で、トリカブトによる食中毒は当県での発生はないが、全国では過去に死亡事例もある。

2.2 試料

添加回収試験には、チョウセンアサガオの根をゴボウと間違えて調理する食中毒が起こっていることから、ゴボウ (市販品) に添加することとし、同時分析するトリカブト毒も同様にゴボウで添加回収試験することとした。

2.3 試薬

1) アコニチン標準品：SIGMA製 (自然毒共同研究²⁾で配布されたもの)

2) メサコニチン標準液 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) , アトロピン標準液 (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及びスコポラミン標準液 (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) : 自然毒共同研究で配布されたものを使用

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 (2.1 mmI.D.x15cm)

カラム温度 : 40°C

移動相 : A液

(5 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液) ,

B液

(5 mmol/L酢酸アンモニウムメタノール溶液)

グラジエント条件 : A/B=85/15 (0 min) →

50/50 (3 min) →5/95 (11-15min)

→85/15 (18-30min)

移動相流量 : 0.2mL/min

試料注入量 : 5 μL

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

イオン化モード : ESI positive mode

イオン源温度 : 600°C

イオン化電圧 : 5500V

測定イオン (precursor ion>product ion) :

アトロピン: (定量) 290.2>124.1,
(確認) 290.2> 93.0,290.2>77.0

スコポラミン: (定量) 304.0>138.1,
(確認) 304.0>103.0,304.0>156.1

アコニチン: (定量) 646.4>105.0,
(確認) 646.4>77.2,646.4>586.3

メサコニチン: (定量) 632.3>105.2,
(確認) 632.3>76.9,632.3>572.2

2.5 前処理操作

自然毒共同研究で示された操作を参考に、次のとおり前処理した。

粉碎した試料約5gを50mLポリプロピレン遠沈管に取り、メタノール20mLを加え3分間ホモジナイズし、GFPろ紙で減圧ろ過した。ろ紙上の残渣をポリプロピレン遠沈管に戻しメタノール20mLを加え3分間ホモジナイズし、GFPろ紙で減圧ろ過し、先のろ液に合わせた。更に、ろ紙上の残渣をメタノール5mL×3回で洗浄・減圧ろ過し、先のろ液に合わせた。ろ液にメタノールを加えて100mLに定容し、抽出溶液とした。

抽出溶液から200μL分取し、メタノールを加えて50mLに定容し、そこから約2mLを分取し0.20μmメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

2.6 アコニチン標準液の調製

アコニチン標準品5mgをメタノールで10mLにメスアップしたものを500μg/mL標準液とした。

2.7 検量線溶液の調製

2.3 2) の3標準液及び2.6のアコニチン標準液を等濃度となるよう混合し、混合標準液を調製した。混合標準液をメタノールで順次希釈し、0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10,

20, 50, 100, 200ng/mLの検量線溶液を調製した。

2.8 マトリックス効果の確認

添加していないゴボウの抽出溶液(試料5gを2.3.4に従い抽出操作し、100mLに定容したもの)を40μL分取し、2.7で調製した200ng/mL検量線溶液を400μL加え、メタノールを加えて10mLに定容し、そこから約2mLを分取し0.20μmメンブランフィルターでろ過したものをマトリックス標準液(8ng/mL)とした。溶媒標準液(8ng/mL)は、200ng/mL検量線溶液を400μL分取し、メタノールを加えて10mLに定容して調製した。

マトリックス標準液と溶媒標準液を交互に測定し、ピーク面積比からマトリックス効果を確認した。

3 結果及び考察

3.1 HPLC条件の検討とクロマトグラム

山辺らの報告^{3) 4)}でチョウセンアサガオ等の有毒成分(アトロピン及びスコポラミン)の分析に有効とされているHilic系のDiscovery HS F5カラムを試したところ、チョウセンアサガオ等の有毒成分及び別報で検討したりコリンでは、良好なクロマトグラムが得られたものの、トリカブト毒(アコニチン及びメサコニチン)のピークを確認することができなかった。

そこで、著者らが残留農薬や残留動物用医薬品の多成分同時分析に用いているC18系のLCカラムを用い、グラジエントを行うことにより、対象とした5物質全てでシャープなピークを得ることができた。(図1)

3.2 検量線

検量線を図2~5に示す。0.2~100ng/mL又は0.2~200ng/mLの範囲で $r^2=0.999$ の良好な直線が得られた。なお、スコポラミン及びメサコニチンでは200ng/mLは、直

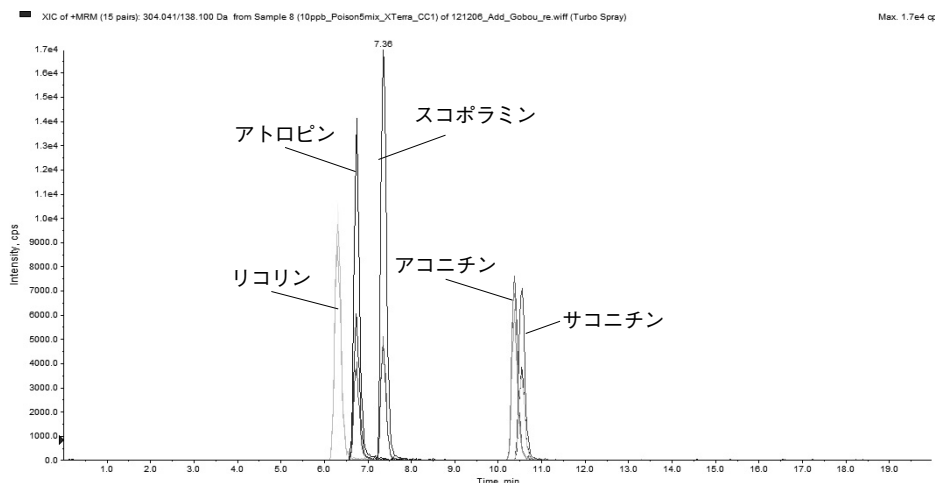


図1 5物質のLC/MS/MSクロマトグラム

線から外れていることが確認されたため、検量線から外すこととした。

3.3 添加回収試験結果

結果を表1に示す。アトロピンの4 $\mu\text{g/g}$ 添加の回収率を除き、妥当性評価ガイドライン⁹⁾で目標値とされる回収率(真度)70~120%及び相対標準偏差(併行精度)10%以下のいずれも満たしており、良好な結果であった。

なお、別報で検討したリコリンについては、改めての添

加回収試験は行っていないが、ほぼ同一の前処理法であり、チョウセンアサガオ等の有毒成分及びトリカブト毒と同時分析可能であると考えられた。

3.4 マトリックス効果の確認結果

結果を表2に示す。アトロピンでは、マトリックス効果によりピーク面積値が大きくなることが確認され、添加回収試験で同物質の4 $\mu\text{g/g}$ 添加の回収率が123%となったのはマトリックス効果が大きな原因であると考えられた。

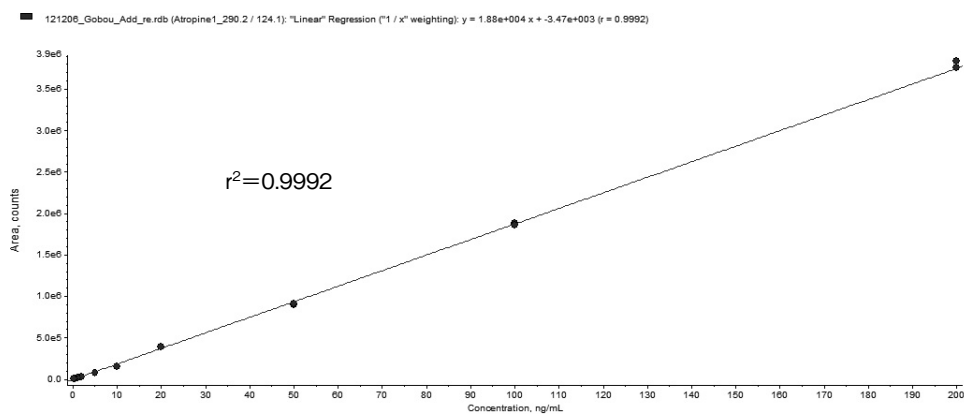


図2 アトロピンの検量線 (0.2~200ng/mL)

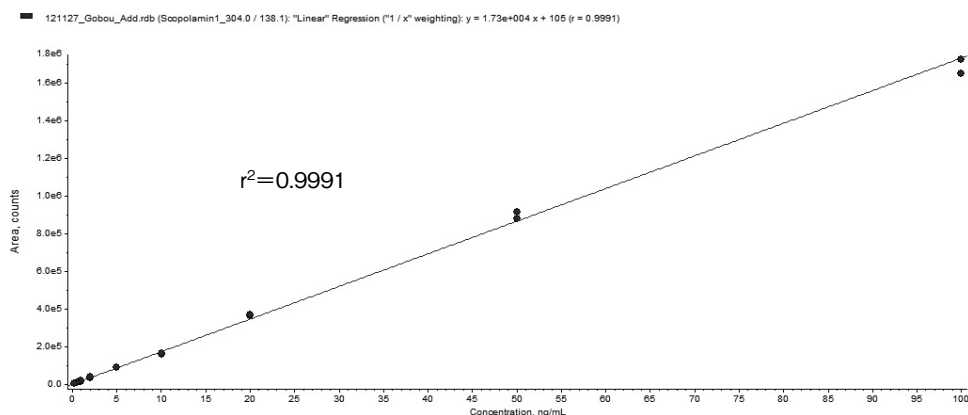


図3 スコポラミンの検量線 (0.2~100ng/mL)

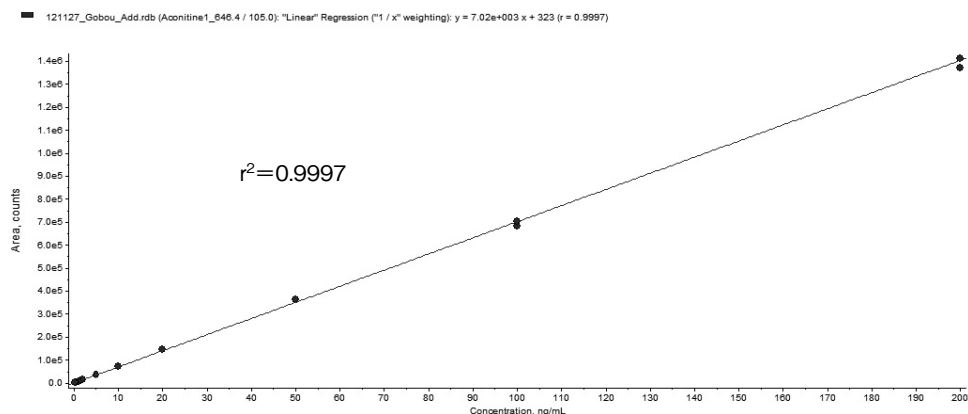


図4 アコニチンの検量線 (0.2~200ng/mL)

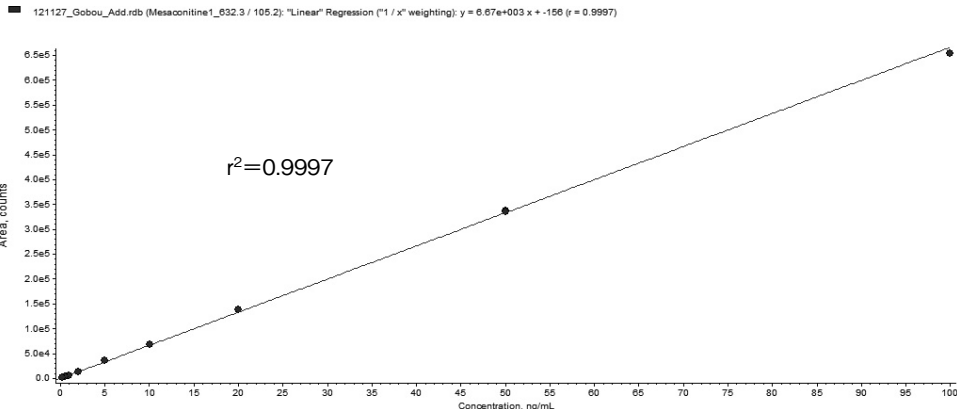


図5 メサコニチンの検量線 (0.2~100ng/mL)

表1 チョウセンアサガオ毒及びトリカブト毒の添加回収試験結果

	40 μ g/g添加(n=5)		4 μ g/g添加(n=2)	
	平均回収率(%)	相対標準偏差(%)	平均回収率(%)	相対標準偏差(%)
アトロピン	102	3.3	123	1.6
スコポラミン	99.4	1.2	101	0.87
アコニチン	95.5	3.7	101	8.9
メサコニチン	97.6	2.2	98.8	1.4

表2 マトリックス効果

	ピーク面積比 (マトリックス標準 /溶媒標準)(%)
アトロピン	118
スコポラミン	100
アコニチン	96
メサコニチン	101

4 まとめ

アトロピン、スコポラミン、アコニチン及びメサコニチンについて、LC/MS/MSを用いた多成分同時かつ迅速分析法を検討し、次のことがわかった。

- 1) C18系のLCカラムを用いグラジエントを行うことにより、4物質ともにシャープなピークを得ることができた。
- 2) 添加回収試験では、アトロピンが高めの回収率になりマトリックス効果が原因であると推定されたが、ほかの3物質は厚生労働省の妥当性評価ガイドラインの目標値を満足する良好な結果であった。

今後も、対象物質の追加、定量性の向上等について研究していく予定である。

文 献

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 2) 地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立とその精度管理の実施及び疫学機能の強化に関する研究・分担研究健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究, 厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業), 平成24年度総括・分担研究報告書, 25-42, 2013

- 3) 山辺真一, 肥塚加奈江, 田邊英子, 北村雅美, 今中雅章: LC/MS/MSによる食品中のアトロピン, スコポラミンの迅速定量, 岡山県環境保健センター年報, 31, 127-132, 2007
- 4) 山辺真一, 肥塚加奈江, 山本 淳, 石井 学, 今中雅章: LC/MS/MSによる尿中のアトロピン, スコポラミンの迅速定量, 岡山県環境保健センター年報, 32, 141-143, 2008
- 5) 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

【調査研究】

LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討

(3) ふぐ毒の機器分析

Study for Rapid Analysis Method of Natural Poisons by LC/MS/MS

(3) Instrumental Analysis of Blowfish Poison

浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美, 大島律子*, 石井 学** (衛生化学科),
*細菌科, **美作保健所

Toyohiro Urayama, Kanae Koeduka, Masaaki Akaki, Masami Kitamura,
Ritsuko Ohata*, Manabu Ishii** (Department of Food and Drug Chemical Research),

*Department of Bacteriology, **Mimasaka Health Center

要 旨

食中毒発生時には、原因究明のため早く検査結果を出すことが求められており、毎年発生している自然毒による食中毒に対し、LC/MS/MSを用いた迅速分析法を検討したので報告する。

[キーワード：自然毒、ふぐ毒、テトロドトキシン、LC/MS/MS法]

[Key words : Natural Poisons, Blowfish Poison, Tetrodotoxin, LC/MS/MS]

1 はじめに

ふぐの有毒部位の喫食などの動物性自然毒による食中毒は毎年発生している。

ふぐによる食中毒は致死率が高く、迅速な検査が求められている。しかし、食品衛生法に定められているフグ毒の分析法はマウス検定法¹⁾であり、当センターではマウスを常備していないため、迅速な対応は困難である。

そこで、今回、マウスを使用せずLC/MS/MSを用いた機器分析による迅速分析法を検討したので報告する。

筋肉、肝、皮を分離し、3体を部位毎に混合したものを使用した。(倉敷市提供試料①とする)

また、倉敷市から提供された倉敷市提供試料①と同種のフグ1体(玉野市沖で採取) (写真4)を筋肉、肝、卵巣に分離して分析した。(倉敷市提供試料②とする)

2 実験方法

2.1 分析対象物質

ふぐ中毒は、厚生労働省が公表している過去の食中毒発生事件一覧²⁾によると全国で毎年20件程度発生しており、県内でもほぼ毎年発生があり、当センターにおいても度々検査を実施している。

そこで、今回、マウスを使用しないふぐ毒の機器分析法の検討が必要なことから、その主成分であるテトロドトキシンを分析対象項目として選定した。

2.2 試料

添加回収試験には、有毒部位を除去して市販されているフグ(ショウサイフグ及びサバフグ)、トラフグの皮(市販品)を選定した。(写真1~3)

濃度測定用の実試料として、倉敷市から提供された食中毒(平成23年11月発生)の検査残品(フグ頭部3体)から



写真1 サバフグ (市販品)



写真2 ショウサイフグ (市販品)



写真3
トラフグの皮 (市販品)



写真4
玉野市沖合で採取したヒガンフグ (メス)
(倉敷市提供試料②) 12cm, 46.77g

2.3 試薬等

- 1) テトロドトキシン標準品：Latoxan社製（自然毒共同研究から提供されたもの）、和光純薬製（生化学用）
- 2) 0.45 μm メンブランフィルター：Millex-LH, 0.45 μm , 13mm（Millipore社製）
- 3) 限外ろ過フィルター：Amicon Ultra-4 遠心式フィルターユニット, 10kDa（Millipore社製）

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 Atlantis HILIC, 3 μm , 2.1mm \times 150mm

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：A液（0.1%ギ酸水溶液）、

B液（アセトニトリル）

グラジエント条件：A/B=5/95（0 min） \rightarrow 60/40
（0.1-6 min） \rightarrow 85/15（6.1-10min）
 \rightarrow 5/95（13-18min）

移動相流量：0.2mL/min

試料注入量：5 μL

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

イオン化モード：ESI positive mode

イオン源温度：600 $^{\circ}\text{C}$

イオン化電圧：5500V

測定イオン（precursor ion \gt product ion）：

（定量）320.1 \gt 302.1,

（確認）320.1 \gt 162.3, 320.1 \gt 284.1

2.5 前処理操作

自然毒共同研究³⁾で実施された操作を参考に、次のとおり前処理した。

粉碎した試料10gを100mL栓付ガラス遠沈管に取り、0.1%酢酸25mLを加え3分間ホモジナイズした。なお、皮試料は、試料10gを乳鉢で磨砕し、100mL栓付ガラス遠沈管に移し、0.1%酢酸25mLを加えた。また、倉敷市提供試料①及び②では、試料量が10gに満たなかったため2g以上を許容とした。

沸騰水浴中で、10分間加熱抽出した。冷却後吸引ろ過し（3,000rpmで10分間遠心分離し、上澄みを吸引ろ過した後、固形分を少量の0.1%酢酸で洗い込んで吸引ろ過し、更にろ紙を洗浄するために少量の0.1%酢酸を加えてろ過した）、0.1%酢酸を加えて50mLに定容し、抽出溶液とした。

抽出溶液から200 μL 分取し、0.1%酢酸を加えて5 mLとし、0.45 μm メンブランフィルターでろ過した後、3,500 \times g、5 $^{\circ}\text{C}$ で10分間限外ろ過し、0.20 μm メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

マウス試験は、マウス検定法⁴⁾により抽出溶液を適宜希釈し、体重20グラムのマウスに腹腔注射して毒力を求めた。

2.6 標準液の調製

テトロドトキシン標準品1mgを0.1%酢酸で10mLにメスアップしたものを100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準液とした。

2.7 検量線

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準液を0.1%酢酸で順次希釈し、0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500ng/mLの検量線溶液を調製した。

3 結果及び考察

3.1 クロマトグラムと検量線

LC/MS/MSクロマトグラムを図1に、検量線を図2に示す。シャープなピークのクロマトグラムが得られ、0.2~500ng/mLの範囲で $r^2=0.9996$ の良好な直線が得られた。

3.2 添加回収試験結果

結果を表1に示す。平均回収率はトラフグ皮への添加が66.8%であったが、サバフグ筋肉への添加は76.2%であり、サバフグ筋肉の結果は、厚生労働省の妥当性評価ガイドライン⁴⁾の値を参考にすると、真度の目標値である70~120%の範囲内であった。

3.3 標準品の違いによる定量値の違い

標準品の違いによる定量値の違いを確認するため、2社の標準品を用い、それぞれ検量線溶液を作成し測定した。

W社の標準品で作成した検量線でL社の標準品を定量したところ、W社製と比較してL社の標準品は約25%濃度が低いことが判明した。（表2）

原因として、L社製の方が購入が1年古いこと、L社製はクエン酸フリーなのに対しW社製がクエン酸緩衝剤含有であることが関係していると考えられたが、真の原因は不明であった。

なお、W社の標準品で定量した値がマウス検定法での値とほぼ一致していたことから、以下の結果はW社の標準品で定量した値で考察した。

3.4 無害とされる範囲内での検出について

添加用検体として購入した市販のショウサイフグの筋肉から低濃度のテトロドトキシンが検出された。LC/MS/MS法では10.7MU/gとなり、無毒とされる目安である10MU/gを上回ったが、マウス検定法では7.1MU/gであった。現在はマウス検定法を用いて判断するため、当該ふぐは無毒で

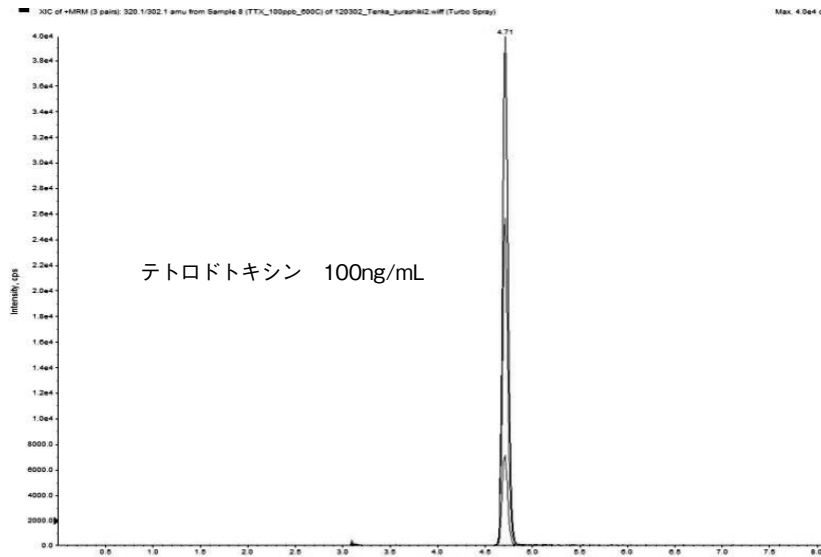


図1 テトロドトキシシのLC/MS/MSクロマトグラム

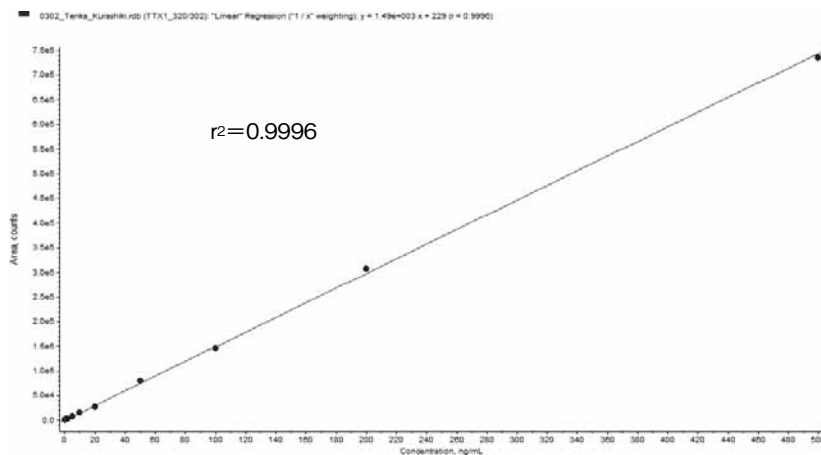


図2 テトロドトキシシの検量線(0.2~500ng/mL)

表1 テトロドトキシシの添加回収試験結果

	平均回収率(%)	相対標準偏差(%)
サバフグ筋肉・添加 (n=2)	76.2	3.2
トラフグ皮・添加 (n=2)	66.8	6.0

標準品添加量：10MU/g=2.2μg/g

表2 標準品の違いによる定量値の違い

	定量値 (ng/mL)		比(L/W)	平均
	L社標準品	W社標準品		
200ppb	153	195	0.78	0.75
100ppb	76.5	103	0.74	
50ppb	39.2	50.8	0.77	
20ppb	14.4	20.7	0.70	
10ppb	7.79	9.76	0.80	
5ppb	3.64	5.18	0.70	

あると判断されたが、添加回収試験のブランク試料としては適切でなかったため、添加回収結果は棄却し、検討に用いなかった。

3.5 部位別測定での筋肉からの検出について

部位別測定結果を表3に示す。倉敷市提供試料②では筋肉と肝がほぼ同等の濃度となった。これは、丸体のまま冷凍・解凍を繰り返したことで、有毒部位の毒が筋肉に移行したと考えられた。

3.6 マウス検定法との測定値の比較

結果を表3に示す。LC/MS/MS法とマウス検定法の比

は0.979~1.51倍であり、ほぼ同じ値かLC/MS/MS法が高くなる結果であった。

なお、今後検討が進み、無毒とされる目安である10MU/g付近ではLC/MS/MS法の方が高くなることが統計的に証明されれば、LC/MS/MS法で10MU/g以下であれば、マウス検定法を用いなくても無毒であると判断する活用方法が考えられた。

表3 テトロドトキシンの部位別濃度測定及びLC/MS/MS法とマウス法の濃度比較

		検体量 (g)	定容量 (mL)	抽出液毒力 (MU/mL)		LC/MS/MS /マウス法	検体の毒力(MU/g)	
				LC/MS/MS	マウス法		LC/MS/MS	マウス法
倉敷市 提供① (調理 残渣)	筋肉	5.20	50	1.92	1.75	110%	18.4	16.8
	肝	6.97	50	24.0	23.7	101%	172	170
	皮	10.04	50	9.89	10.1	97.9%	49.2	50.3
倉敷市 提供② (玉野 市沖)	筋肉	6.98	50	7.30	5.92	123%	52.3	42.4
	肝	2.28	50	2.54	2.34	109%	55.7	51.3
	卵巣	2.13	50	16.6	15.3	108%	390	359
ショウサイフグ・筋肉		10.00	50	2.14	1.42	151%	10.7	7.1
サバフグ・添加①		—	50	1.12	<1	—	—	—
標準品1.5MU		—	50	1.50	1.47	102%	—	—

(注) LC/MS/MS法での毒力は、テトロドトキシンの定量値を1MU/g=0.22 µg/gで換算した値。

4 まとめ

ふぐ毒テトロドトキシンについて、LC/MS/MSを用いた機器分析により、マウスを使用しない迅速分析を検討し、次のことがわかった。

- 1) テトロドトキシンを高感度かつ迅速に分析でき、筋肉への添加回収試験結果も良好な結果であった。
- 2) マウス検定法との毒力の比較で低濃度の一部の検体を除き、値はほぼ一致していた。
- 3) ふぐ毒の分析では、検体の保存において、検体の個体を丸体のまま冷凍してはいけないという従来の機器分析にはなかった注意が必要であった。

今後も、対象物質の追加、定量性の向上等について研究していく予定である。

文 献

- 1) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 理化学編，日本食品衛生協会，661-666，2005
- 2) <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 3) 地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立とその精度管理の実施及び疫学機能の強化に関する研究・分担研究健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究，厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業），平成22年度総括・分担研究報告書，47-57，2011
- 4) 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

【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3報)

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

浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美 (衛生化学科)

Toyohiro Urayama, Kanae Koeduka, Masaaki Akaki, Masami Kitamura
(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25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、ペットや家畜等を病気や寄生虫から守るために用いられる医薬品である。

食品への残留は、食品衛生法に基づく規格基準が定められており、平成18年5月29日のポジティブリスト制度施行により、個別の基準があるものを除き0.01ppmの一律基準を超えて残留してはならないとされた。

このような経緯や食の安全・安心に対する県民意識の高まりを踏まえ、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¹⁾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、第1報²⁾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するとともに、厚生労働省通知のガイドライン³⁾ (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、更に第2報⁴⁾において、同じ分析法で分析可能な項目の追加を行った。

今回、28物質を候補として、既報と同じ分析法により分析可能な項目の追加を検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 検討対象物質

林純薬工業製PL動物薬LC/MS Mix1に含まれている(和光純薬製動物用医薬品混合標準液PL-2-1又はPL-1-3に含まれている物質を除く)10物質及び同Mix2に含まれている(同)13物質、23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つであるテトラサイクリン系抗生物質3項目、過去(2001~2004年頃)に国が実施した輸入食品監視指導結果で違反があり備前保健所検査課が継続して検査している2項目の計28項目について検討を行った。(表1)

2.2 試料

妥当性ガイドラインによる妥当性評価には、肉類として市販の鶏肉(もも)、魚類としてさけ(銀鮭)、その他の魚介類としてえび(むきえび)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ものを中心に、市販のいか(花咲いか)、たこ(ゆでだこ)、かに(ボイルずわいがに)及びえび(ブラックライガー)に対して行った。

2.3 試薬

- 1) PL動物薬LC/MS Mix1 (各20 µg/mLアセトニトリル溶液) : 林純薬工業社製
- 2) PL動物薬LC/MS Mix2 (各20 µg/mLアセトニトリル溶液) : 林純薬工業社製
- 3) 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
- 4) 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

表1 検討対象物質

追加 検討 物質 (妥当性 試験も 実施)	林純薬工業製 PL 動物薬 LC/MS Mix1 (*)	ジアベリジン、スルファエトキシピリダジン、スルファグアニジン、スルファトロキサゾール、スルファニルアミド、スルファプロモメタジン、スルファベンズアミド、スルフィソキサゾール、スルフィソゾール、スルフィソミジン
	保健所検査課項目	クロピドール、ナイカルバジン
追加 検討 物質 (予備 検討 のみ)	林純薬工業製 PL 動物薬 LC/MS Mix2 (*)	エンロフロキサシン、オキシソリニック酸、オフロキサシン、オルビフロキサシン、サラフロキサシン、ジフロキサシン、シプロフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、ピロミド酸、フルメキン、マルボフロキサシン、ミロキサシン
	テトラサイクリン 系抗生物質	オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリン
既報 の 検討 物質	妥当性評価ガイド ラインの目標値を 満たしていた物質	2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール、エトパペート、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、スルファジミジン、スルファジメトキシシン、スルファセタミド、スルファチアゾール、スルファドキシシン、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シン、ゼラノール、チアベンダゾール、チアムリン、チアンフェニコール、ヒドロコルチゾン、ファミフル、フェノブカルブ、フロルフェニコール、リンコマイシン
	満たさない試料・ 濃度があった物質	オルメトプリム、スルファジアジン、トリメトプリム、クロルスロン

*：和光純薬製動物用医薬品混合標準液PL-2-1又はPL-1-3に含まれているものを除く。

5) クロピドール標準液：クロピドール標準品（和光純薬工業社製，HPLC用）10mgを秤量し，メタノールで溶解し100mLにメスアップして100 μg/mLの標準液を作成した。

6) ナイカルバジン標準液：ナイカルバジン標準品（和光純薬工業社製，HPLC用）10mgを秤量し，少量のジメチルホルムアミドに溶解後，アセトニトリルを加え100mLにメスアップして100 μg/mLの標準液を作成した。

7) 超純水：ELGA社製超純水製造装置PURELAB flexで精製

8) ギ酸，アセトニトリル，メタノール：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

(2.1 mmI.D.x15cm)

カラム温度：40℃

移動相：A液（0.1%ギ酸水溶液），

B液（0.1%ギ酸アセトニトリル）

グラジエント条件：

条件1（林純薬用，Positive）：

A/B=97/3（0-3min）→57/43（19min）

→2/98（24-33min）→97/3（38-48min）

条件2（和光純薬用，Positive）：

A/B=97/3（0-3min）→75/25（16min）

→1/99（21-30min）→97/3（35-45min）

条件3（Negative）：

A/B=97/3（0-3min）→28/72（15min）

→2/98（20-30min）→97/3（35-45min）

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, 2 (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3 (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

2.5 前処理操作

第1報の操作を基本として、第2報で最終液量を2mLに変更した。更に、今回は、遠心分離後の試料残渣中に対象物質が残留することが確認されたため、ホモジナイズに用いるアセトニトリル量を6mLとし、ポリトロンをアセトニトリル4mLで洗浄し、この洗浄液を用いて遠心分離後の残渣の再抽出するよう変更した。

また、今回からサロゲート (安定同位体標識標準品) として、スルファジアジン-d₄、スルファジミジン-¹³C₆、スルファジメトキシシン-d₆、スルファチアゾール-d₄、スルファドキシシン-d₃、スルファメトキサゾール-d₄の混合品を各0.2μg/gとなるよう試料に添加したのち前処理操作を行った。

2.6 検量線

第2報においては、和光純薬製の2つの混合標準液を混合したものを用いたが、今回は、林純薬製混合標準液と和光純薬製混合標準液で重複する物質があるため、全ての混合標準液を混合することはできず、2種類の検量線溶液を

作成することとした。

また、ネガティブイオン化で測定する物質は、和光純薬製PL-2-1又はPL-1-3に含まれているものと別途追加するナイカルバジンであり、林純薬製mix1のみに含まれている物質はなかったため、和光用検量線溶液をネガティブイオン化測定でも使用することとした。

林用検量線溶液 (2.3の1) 及び5) を等濃度と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, 0.2μg/mLの検量線溶液を調製した。

和光用検量線溶液 (ネガティブ測定でも使用)：2.3の3), 4) 及び6) を同じ濃度になるよう混合した後、同様に希釈し、同濃度の検量線溶液を調製した。

3 結果及び考察

3.1 前処理法の見直し

既報の前処理法の中で、回収ロスが考えられる2箇所について条件を再検討した。

3.1.1 クリーンアップ条件の見直し

既報においては、連結カラムから85%アセトニトリル溶液8mLを用いて溶出 (負荷液も採取) しているが、8mLでは溶出し切れていない可能性が考えられた。

そこで、さけを検体として標準品を添加後、既報どおりの方法で抽出し、連結カラムに負荷及び溶出した後、更に8mL加えて溶出し、追加溶出液を測定した。

結果を表3中央に示す。スルファメラジン、スルファセタミド、リンコマイシン、チアムリン及びスルファジアジンの5物質を除き1%未満の残留であり、溶出液量を増やすことで妨害物質が増えることが懸念されるため、クリーンアップ条件は変更しないこととした。

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)	
ジアベリジン	Pos	11.1	261.2 / 245.3	261.2 / 123.2	20
スルファエトキンピリダジン	Pos	16.2	295.1 / 156.1	295.1 / 92.1	20
スルファグアニジン	Pos	2.96	215.1 / 92.0	215.1 / 156.3	20
スルファトロキサゾール	Pos	15.8	268.2 / 92.1	268.2 / 156.1	20
スルファニルアミド	Pos	3.53	173.1 / 156.3	173.1 / 92.0	20
スルファプロモメタジン	Pos	21.0	357.2 / 92.2	357.2 / 108.1	20
スルファベンズアミド	Pos	17.4	277.1 / 156.2	277.1 / 92.3	20
スルフィソキサゾール	Pos	16.4	268.2 / 156.2	268.2 / 92.0	20
スルフィソゾール	Pos	12.9	240.1 / 156.3	240.1 / 92.1	20
スルフィソミジン	Pos	9.53	279.3 / 124.1	279.3 / 92.2	20
クロピドール	Pos	10.4	192.2 / 101.1	192.2 / 87.0	20
ナイカルバジン	Neg	15.6	301.0 / 136.9	301.0 / 107.0	20

保持時間は、Posイオン化では条件1, Negイオン化では条件3での値。

表3 前処理条件の検討結果

(単位：%)

		既報ど おりの 前処理	連結カラム から追加 で溶出	残渣を 再抽出		
追加検討物質	林純薬 mix1	ジアベリジン	84	0.6	8.0	
		スルファエトキシピリダジン	94	<0.5	5.3	
		スルファグアニジン	58	<0.5	6.3	
		スルファトロキサゾール	93	<0.5	5.9	
		スルファニルアミド	101	<0.5	10.3	
		スルファプロモメタジン	85	<0.5	5.0	
		スルファベンズアミド	85	<0.5	5.7	
		スルフィソキサゾール	86	<0.5	4.5	
		スルフィソゾール	92	<0.5	5.6	
		スルフィソミジン	87	<0.5	6.5	
	林純薬 mix2	エンロフロキサシン	<0.5	<0.5	<0.5	
		シプロフロキサシン	<0.5	<0.5	<0.5	
		オキシリニック酸	<0.5	<0.5	<0.5	
		オフロキサシン	<0.5	<0.5	<0.5	
		オルビフロキサシン	<0.5	<0.5	<0.5	
		サラフロキサシン	<0.5	<0.5	<0.5	
		ジフロキサシン	<0.5	<0.5	<0.5	
		ナリジクス酸	<0.5	<0.5	<0.5	
		ノルフロキサシン	<0.5	<0.5	<0.5	
		フルメキン	<0.5	<0.5	<0.5	
		マルボフロキサシン	<0.5	<0.5	<0.5	
		ピロミド酸	<0.5	<0.5	<0.5	
		ミロキサシン	<0.5	<0.5	<0.5	
	テトラ サイク リン系	オキシテトラサイクリン	<0.5	<0.5	<0.5	
		テトラサイクリン	<0.5	<0.5	<0.5	
		クロルテトラサイクリン	<0.5	<0.5	<0.5	
	その他	クロビドール	84	<0.5	8.2	
	既報の 検討物質	妥当性 評価ガ イドラ インの 目標値 を満 たした 物質	スルファチアゾール	90	<0.5	5.6
			スルファベリジン	85	<0.5	5.7
スルファメラジン			95	1.4	5.8	
スルファドキシ			90	<0.5	6.3	
スルファメトキサゾール			91	<0.5	5.5	
スルファジメトキシ			92	<0.5	5.2	
スルファキノキサリン			84	<0.5	5.4	
スルファニトラン			81	<0.5	4.8	
チアベンダゾール			86	<0.5	6.5	
スルファジミジン			97	<0.5	6.6	
スルファメトキシピリダジン			103	<0.5	7.7	
スルファモノメトキシ			90	<0.5	5.2	
スルファクロルピリダジン			93	<0.5	4.9	
エトバベート			88	<0.5	5.2	
酢酸メレンゲステロール			27	<0.5	4.5	
スルファセタミド			86	1.9	4.4	
リンコマイシン			73	1.9	5.2	
チアムリン			80	2.1	3.8	
ヒドロコルチゾン			78	<0.5	5.5	
フェノブカルブ			60	<0.5	4.8	
ファミフル			56	<0.5	5.3	
チアンフェニコール			151	<0.5	5.4	
満たさ なかつ た物質			オルメトプリム	81	0.7	8.4
	スルファジアジン	79	7.7	7.4		
	トリメトプリム	82	0.5	8.4		

3.1.2 抽出条件の見直し

既報においては、検体にアセトニトリル10mLを加えホモジナイズ後遠心分離し、上澄みに精製水1.8mLを加えたものをクリーンアップ用試料としているが、遠心分離後の残渣に対象物質が残留している可能性が考えられた。

そこで、さけを検体として、3.1.1で標準品添加、抽出及び遠心分離後の残渣を用い、アセトニトリル10mLを加え手で振とうして抽出し、同様に遠心分離し、上澄みに精製水1.8mLを加えてクリーンアップ操作をして測定した。

結果を表3右側に示す。多くの物質で遠心分離後の残渣に5~10%程度残留していることが判明したため残渣を再抽出するよう操作手順を変更した。但し、連結カラムへの負荷液は溶出液でもあり、溶出液量を増やすと妨害物質が増える懸念があり、ホモジナイズに用いるアセトニトリル量を10mLから6mLに変更し、遠心分離後の残渣をアセトニトリル4mLで再抽出することで、合計10mLになるようにした。

なお、表3のとおりキノロン系（林純薬製Mix2に含まれる物質）とテトラサイクリン系抗生物質は、既報の前処理では全く回収されないことが判明したため、これらの項目を検討対象から外すこととした。

3.2 測定グループ分けの検討

第2報では、感度の悪い物質のdwell timeを長くする必要があったため、ポジティブイオン化で測定する物質は2回に分けて測定することとし、測定グループ分けは和光PL-2-1測定と和光PL-1-3測定としていた。

今回は、林純薬製混合標準液と和光純薬製混合標準液で重複する物質があるため、林用と和光用の2種類の検量線溶液を作成することとなり、ポジティブイオン化の測定グループ分けは林用検量線溶液測定（条件1）と和光用検量線溶液測定（条件2）とした。

ここで、林用検量線溶液と和光用検量線溶液のいずれにも含まれている物質はいずれの検量線溶液を測定しても良いが、3.1の検討により林純薬製Mix2に含まれている物質を検討しないこと、また、和光PL-1-3に感度が悪くdwell timeを長くしている物質が多く、林純薬Mix1に含まれている物質（和光PL-2-1と重複するものを含む）は感度が悪くなくdwell timeが短くても支障のない物質のみであることから、重複する物質は林用検量線溶液測定（条件1）で測定することとした。

3.3 液体クロマトグラフのグラジエント条件の見直し

第2報において、一部の物質で前処理から測定までの日数により分解している可能性が示唆されたため、今回、分析時間短縮のため液体クロマトグラフのグラジエント条件の見直しを行い、分析時間を第1報及び第2報の60分から45~48分に短縮した。

なお、第1報及び第2報においては分析カラムへの保持を促すため初期条件をA/B=99/1としていたが、保持時間が最も短いスルファグアニジンにおいて、A/B=97/3とした方がピーク形状がシャープになり、他の物質においても保持時間が分散する傾向にあったので、初期条件をA/B=97/3に変更した。

3.4 妥当性評価試験

3.1の検討によりキノロン剤とテトラサイクリン系抗生物質が全く回収されないことが判明したため、今回は平成24年度の測定項目選定に目的を絞り、次のとおり行うこととした。

添加量は、一般に試料1gに対し定量限界（一律基準濃度）である0.01μg添加の低濃度と、高濃度として0.1μg添加の2種類で実施するが、定量作業の省力化のため、2倍量の0.02μg添加と0.2μg添加で行った。なお、えび（むきえび）のみ0.01μg添加と0.2μg添加で行った。

試験回数は、2併行5回が原則であり、妥当性評価された試験法を類似の食品に適用する場合に限り5併行が良いが、今回は、さけのみで2併行5回での試験を行い、鶏肉

及びえびでは5併行で行った。

追加候補の28物質からキノロン剤とテトラサイクリン系抗生物質を除いた12物質に対する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) クロピドール、スルファエトキシピリダジン、スルファトロキサゾール、スルファプロモメタジン、スルファベンズアミド、スルフィソゾール、スルフィソミジン及びナイカルバジンの8物質は、さけへの添加の2併行5回試験で、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) 鶏肉への添加で、スルフィソゾール及びナイカルバジンの0.02μg添加の併行精度が目標値を満たしてなかったが、5併行で実施したうちの1つの検体が全物質で濃度が低い傾向にあり、サロゲートの回収率（6物質平均）も、他の4検体は87.8～89.9%に対しその検体は73.4%と1検体のみ異なっていたことから、その検体で物理的なロスがあったものであり、物質特有の問題ではないと考えられた。

表4 妥当性評価試験結果

	さけ(2併行×5回)				鶏肉(もも)(5併行)			えび(むきえび)(5併行)		
	添加量 (μg/g)	回収率 (真度) (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	添加量 (μg/g)	回収率 (真度) (%)	併行 精度 (RSD%)	添加量 (μg/g)	回収率 (真度) (%)	併行 精度 (RSD%)
目標値	0.2	70-120	10 >	15 >	0.2	70-120	10 >	0.2	70-120	10 >
	0.02	70-120	15 >	20 >	0.02	70-120	15 >	0.01	70-120	25 >
ジアペリジン	0.2	83.6	3.2	5.3	0.2	83.8	1.8	0.2	89.4	2.8
	0.02	66.4	4.4	7.8	0.02	81.2	8.3	0.01	89.5	2.5
スルファエトキシピリダジン	0.2	100.7	4.5	3.8	0.2	100.9	2.2	0.2	90.1	4.6
	0.02	93.5	4.3	5.2	0.02	94.1	14.0	0.01	98.3	8.0
スルファグアニジン	0.2	46.9	4.6	5.0	0.2	37.0	4.0	0.2	81.2	4.7
	0.02	29.5	7.0	1.4	0.02	36.9	12.3	0.01	79.6	5.7
スルファトロキサゾール	0.2	91.8	5.1	3.6	0.2	97.0	2.0	0.2	89.9	3.8
	0.02	94.1	3.4	9.4	0.02	94.6	7.9	0.01	87.3	7.2
スルファニルアミド	0.2	56.1	8.3	14.4	0.2	67.1	9.2	0.2	102.7	11.2
	0.02	87.7	7.4	27.0	0.02	96.7	40.1	0.01	131.7	39.7
スルファプロモメタジン	0.2	83.7	5.3	2.8	0.2	96.9	3.5	0.2	83.4	5.8
	0.02	88.2	6.3	6.2	0.02	89.0	11.4	0.01	87.4	9.2
スルファベンズアミド	0.2	75.9	4.8	5.5	0.2	89.2	6.3	0.2	82.1	2.7
	0.02	76.6	2.8	4.7	0.02	86.6	9.0	0.01	90.1	5.8
スルフィソキサゾール	0.2	146.9	6.5	36.0	0.2	154.8	5.5	0.2	116.5	3.7
	0.02	108.0	2.6	10.5	0.02	96.1	8.3	0.01	103.1	6.3
スルフィソゾール	0.2	94.3	4.4	3.6	0.2	95.7	1.5	0.2	82.4	3.3
	0.02	92.8	2.8	6.7	0.02	94.6	16.4	0.01	87.9	17.6
スルフィソミジン	0.2	91.4	2.7	4.2	0.2	89.6	1.7	0.2	81.2	2.5
	0.02	72.0	2.0	7.5	0.02	82.7	10.4	0.01	84.4	4.2
クロピドール	0.2	91.6	3.8	2.9	0.2	91.7	5.3	0.2	91.3	2.6
	0.02	89.5	3.7	7.5	0.02	88.9	13.8	0.01	96.7	15.7
ナイカルバジン	0.2	110.6	4.8	5.0	0.2	84.8	8.5	0.2	81.3	8.5
	0.02	98.5	2.0	4.8	0.02	83.7	17.5	0.01	71.1	5.5

3) ジアベリジン, スルファグアニジン, スルファニルアミド及びスルフィソキサゾールの4物質は, さけへの添加の2併行5回試験で真度(回収率)が70~120%の目標値を満たしておらず, スルファニルアミド及びスルフィソキサゾールでは室内精度(相対標準偏差)も目標値を満たしてなかった。

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。いか, たこ, かに及びえび(ブラックタイガー)を用い, 試料1gに対し0.2μg添加と0.02μg添加の2濃度で実施した。

結果を表6に示す。3.4で妥当性ガイドラインの目標値を満たしていた8物質は, いずれも回収率(真度)が70~120%の目標値を満たしていた。

3.6 既報の対象物質の確認

既報において妥当性評価済である25物質及び一部の試料又は濃度において満たしてなかった4物質について, 今回の追加対象項目と併せて妥当性評価を実施した。

結果を表6に示す。第2報において一部の試料又は濃度

においてガイドラインの目標値を満たしてなかったオルメトプリム, スルファジアジン, トリメトプリム, クロルスロンの4物質は, 今回はガイドラインの目標値を満たしていた。

逆に, 第2報においてはガイドラインの目標値を満たしていた25物質のうち, 酢酸メレンゲステロール, ゼラノール, リンコマイシン, チアムリン, ファムフルの5項目が, 今回はガイドラインの目標値を満たさなかった。

フェノブカルブは, さけへの添加で真度(回収率)の目標値を満たさなかったが, 目標の70%~120%に対し65%以上であり, 室内精度及び併行精度も3%程度と良好な結果であったため, 項目から除外しなかった。

また, 鶏肉への添加において, スルファセタミド, ヒドロコルチゾン及びフロルフェニコールの0.02μg添加の併行精度が目標を満たしていなかったが, 5併行で実施したうちの3.4 2)と同じ1検体で濃度が低い傾向にあり, その検体で物理的なロスがあったものであり, 物質特有の問題ではないと考えられた。

表5 添加回収試験結果(回収率%) (n=1)

	添加量 (ug/g)	いか	たこ	かに	えび (ブラックタイガー)	平均
ジアベリジン	0.2	84.0	88.4	84.8	96.4	88.4
	0.02	87.2	61.5	72.5	11.6	58.2
スルファエトキシピリダジン	0.2	93.5	95.4	94.4	103.8	96.8
	0.02	102.6	89.2	94.8	91.0	94.4
スルファグアニジン	0.2	55.0	45.2	51.4	39.0	47.7
	0.02	40.9	19.1	34.9	19.2	28.5
スルファトロキサゾール	0.2	91.6	94.1	86.1	82.9	88.7
	0.02	88.9	87.9	88.9	86.0	87.9
スルファニルアミド	0.2	85.6	72.3	76.8	130.1	91.2
	0.02	149.0	179.7	145.4	172.6	161.7
スルファプロモメタジン	0.2	89.8	91.1	87.6	98.1	91.7
	0.02	103.9	102.2	92.1	94.7	98.2
スルファベンズアミド	0.2	97.1	79.7	88.2	85.5	87.6
	0.02	88.0	83.7	82.6	84.0	84.6
スルフィソキサゾール	0.2	92.0	93.8	93.4	100.2	94.8
	0.02	85.8	104.5	85.6	71.4	86.8
スルフィソゾール	0.2	91.3	93.6	88.7	92.3	91.5
	0.02	99.1	71.4	97.2	87.6	88.8
スルフィソミジン	0.2	86.7	85.2	80.2	92.5	86.1
	0.02	82.8	71.5	71.8	74.4	75.1
クロピドール	0.2	86.7	89.1	90.7	96.6	90.8
	0.02	85.9	79.3	76.3	79.3	80.2
ナイカルバジン	0.2	80.1	98.2	89.8	88.6	89.2
	0.02	84.9	83.9	92.0	82.3	85.8

表6 既報の物質の妥当性評価試験結果

	さけ(2併行×5回)				鶏肉(もも)×5併行)			えび(むきえび)×5併行)		
	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (真度) (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (真度) (%)	併行 精度 (RSD%)	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (真度) (%)	併行 精度 (RSD%)
目標値	0.2	70-120	10 >	15 >	0.2	70-120	10 >	0.2	70-120	10 >
	0.02	70-120	15 >	20 >	0.02	70-120	15 >	0.01	70-120	25 >
スルファチアゾール	0.2	100.0	3.9	2.8	0.2	101.7	2.3	0.2	97.6	6.4
	0.02	101.1	1.3	5.6	0.02	99.9	4.6	0.01	98.2	5.6
スルファピリジン	0.2	97.6	2.1	3.4	0.2	94.5	2.8	0.2	91.6	3.3
	0.02	84.9	8.2	8.5	0.02	91.2	6.4	0.01	104.4	6.4
スルファメラジン	0.2	101.9	1.9	4.2	0.2	94.0	2.6	0.2	85.9	6.4
	0.02	90.4	2.9	8.5	0.02	82.3	9.9	0.01	88.1	11.0
スルファドキシシ	0.2	101.8	1.5	1.8	0.2	107.9	2.7	0.2	102.8	4.2
	0.02	104.8	4.6	8.0	0.02	101.9	7.1	0.01	94.7	8.5
スルファメキサゾール	0.2	99.8	1.8	3.1	0.2	102.1	3.3	0.2	101.0	3.7
	0.02	101.6	4.8	8.6	0.02	97.5	5.9	0.01	99.5	12.8
スルファジメトキシシ	0.2	107.4	4.6	3.3	0.2	105.9	4.9	0.2	105.1	7.9
	0.02	99.1	5.0	5.0	0.02	106.5	8.6	0.01	105.2	8.4
スルファキノキサリン	0.2	92.2	2.1	5.1	0.2	97.6	4.1	0.2	86.8	2.6
	0.02	76.1	3.5	5.2	0.02	83.7	8.0	0.01	93.4	3.1
スルファジミジン	0.2	102.4	1.0	2.3	0.2	98.7	2.7	0.2	101.8	3.2
	0.02	102.9	2.7	1.7	0.02	95.5	6.0	0.01	94.5	8.7
スルファメキシピリダジン	0.2	111.3	1.9	3.5	0.2	100.3	2.0	0.2	88.4	3.8
	0.02	105.7	4.2	4.0	0.02	90.0	10.7	0.01	93.8	5.6
スルファモノメトキシシ	0.2	97.2	2.0	4.2	0.2	99.0	1.5	0.2	89.4	2.4
	0.02	95.5	3.0	4.3	0.02	95.3	9.7	0.01	97.9	5.4
スルファクロルピリダジン	0.2	106.9	3.5	10.0	0.2	104.9	2.4	0.2	89.6	2.6
	0.02	87.9	3.7	3.8	0.02	90.8	9.0	0.01	88.1	6.1
チアベンダゾール	0.2	89.0	1.7	2.8	0.2	93.7	2.9	0.2	86.0	4.8
	0.02	75.1	5.2	3.5	0.02	81.0	8.1	0.01	83.7	8.7
エトパベート	0.2	85.1	2.0	4.5	0.2	92.6	2.6	0.2	93.7	2.7
	0.02	82.5	6.7	2.6	0.02	87.4	10.0	0.01	98.8	6.6
酢酸メレンゲステロール	0.2	51.2	27.6	19.0	0.2	104.7	54.9	0.2	49.1	18.8
	0.02	55.0	16.3	20.9	0.02	79.5	16.7	0.01	94.9	17.5
スルファセタミド	0.2	90.6	6.3	5.5	0.2	93.7	3.1	0.2	80.3	4.8
	0.02	85.8	14.1	7.7	0.02	95.4	17.4	0.01	84.5	18.6
リンコマイシシ	0.2	77.9	9.3	17.0	0.2	81.8	2.4	0.2	90.2	5.5
	0.02	40.2	3.5	7.1	0.02	56.4	14.1	0.01	74.2	9.6
チアムリン	0.2	84.1	8.5	13.7	0.2	87.9	7.1	0.2	74.5	5.5
	0.02	65.4	9.8	8.8	0.02	68.5	22.0	0.01	57.1	34.2
ヒドロコルチゾン	0.2	84.1	3.7	8.9	0.2	91.1	7.8	0.2	85.3	4.2
	0.02	112.6	8.5	8.6	0.02	90.5	19.1	0.01	87.1	9.7
フェノブカルブ	0.2	66.1	3.8	2.7	0.2	88.4	13.2	0.2	83.2	4.2
	0.02	69.4	3.5	3.2	0.02	90.8	14.6	0.01	81.4	8.2
ファミフル	0.2	55.5	4.3	2.2	0.2	85.3	7.2	0.2	86.5	7.1
	0.02	66.1	4.4	7.6	0.02	77.6	10.6	0.01	81.8	18.2
スルファニトラン	0.2	89.2	3.7	4.4	0.2	100.3	5.5	0.2	91.5	3.4
	0.02	72.2	2.1	5.8	0.02	92.5	6.6	0.01	78.8	2.5
ゼラノール	0.2	35.6	5.1	4.3	0.2	86.5	5.5	0.2	85.5	3.5
	0.02	38.6	4.2	8.1	0.02	77.3	6.9	0.01	79.5	6.6
チアンフェニコール	0.2	109.1	2.8	3.1	0.2	100.5	3.3	0.2	103.1	3.9
	0.02	106.3	1.4	6.0	0.02	83.5	9.9	0.01	118.4	12.1
2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール	0.2	85.1	1.7	5.2	0.2	89.0	11.4	0.2	83.6	5.2
	0.02	91.5	4.5	6.6	0.02	101.0	10.9	0.01	85.1	8.2
フロルフェニコール	0.2	109.7	2.8	5.1	0.2	106.4	5.6	0.2	94.1	7.4
	0.02	102.8	5.3	6.6	0.02	91.7	15.3	0.01	114.3	11.6
(トリメブプリム)	0.2	87.0	4.4	3.8	0.2	91.8	4.2	0.2	94.2	4.0
	0.02	78.9	4.7	12.3	0.02	85.7	10.2	0.01	101.1	8.1
(スルファジアジン)	0.2	104.2	5.3	1.3	0.2	110.5	3.6	0.2	103.6	2.4
	0.02	100.1	3.7	4.5	0.02	110.6	7.0	0.01	94.5	5.9
(オルメブプリム)	0.2	86.8	3.5	4.8	0.2	84.7	3.2	0.2	93.3	4.6
	0.02	72.9	5.4	5.4	0.02	83.1	8.4	0.01	95.8	5.6
(クロルスロン)	0.2	88.0	3.9	1.5	0.2	83.7	8.1	0.2	97.1	6.6
	0.02	86.2	12.7	6.0	0.02	75.0	6.9	0.01	104.7	12.0

4 まとめ

既報のLC/MS/MSを用いた一斉分析法を用い、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。28物質を追加候補として厚生労働省ガイドラインに準じた試験を行い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5項目を対象から外し4項目を対象に追加したため、既報の25項目から7項目増加の32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、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
- 4) 浦山豊弘，肥塚加奈江，赤木正章，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（第2報），岡山県環境保健センター年報，36，109-114，2012

他誌発表論文抄録

Q熱

岸本壽男, 木田浩司

小児科, Vol.54, No.1, 73-80, 2013

Q熱は、Q熱コクシエラ (*Coxiella burnetii*) による人獣共通感染症であり、主に反芻動物やペット等の感染動物の胎盤や排泄物からのエアロゾルによる感染で、非定型肺炎や肝炎、不明熱を起こす。欧米では、しばしば集団発生等もあり、非定型病原体の一つとして一般に認知されてい

る。しかしわが国では、感染症発生動向調査で4類全数報告疾患として報告される数は、年に数例～40例程度でほとんどが散発例であり、感染源などまだ実態は不明な点が多い。本稿ではQ熱の概説をし、Q熱の疫学、臨床像、診断、予防について述べ、今後の課題を示す。

Human Granulocytic Anaplasmosis, Japan

Norio Ohashi, Gaowa, Wuritu, Fumihiko Kawamori, Dongxing Wu, Yuko Yoshikawa, Seizou Chiya, Kazutoshi Fukunaga, Toyohiko Funato, Masaaki Shiojiri, Hideki Nakajima, Yoshiji Hamauzu, Ai Takano, Hiroki Kawabata, Shuji Ando, and Toshio Kishimoto

Emerging Infectious Disease, Vol.19(2), 289-292

We retrospectively confirmed 2 cases of human *Anaplasma phagocytophilum* infection. Patient blood samples contained unique *p44/msp2* for the pathogen, and antibodies bound to *A. phagocytophilum* antigens

propagated in THP-1 rather than HL60 cells. Unless both cell lines are used for serodiagnosis of rickettsiosis-like infections, cases of human granulocytic anaplasmosis could go undetected.

ロタウイルス感染に関連した可逆性の脳梁膨大部病変を伴う 臨床的軽度脳症の4歳児の症例について

A 4-year-old girl with clinically mild encephalopathy with a reversible splenial lesion associated with rotavirus infection

Tatsuo Fuchigami*, Kosei Goto*, Maki Hasegawa*, Katsuya Saito*, Tomoko Kida*, Koji Hashimoto*,
Yukihiko Fujita*, Yasuji Inamo*, Mitsutaka Kuzuya**

*Department of Pediatrics and Child Health, Nihon University School of Medicine

**Department of Virology, Okayama Prefectural Institute for Environment Science and Public Health

Journal of Infection and Chemotherapy, vol.19 : 149-153, 2013.

ロタウイルスは重症小児胃腸炎の原因ウイルスとして広く知られている。またロタウイルス胃腸炎が、脳炎・脳症や痙攣発作などの中枢神経症状を伴う場合があることもわかっている。今回我々は、ロタウイルス感染に関連した可逆性の脳梁膨大部病変を伴う臨床的軽度脳症の4歳児の症例について報告する。患児は意識レベルの低下、痙攣発作、下痢及び嘔吐により我々の病院に搬送された。検査の結果、糞便中のロタウイルス抗原は陽性であったが、髄液中の細胞数は正常範囲で、初診時における患児の血清中Naレベルも正常であった。脳のコンピュータ断層撮影像では、脳浮腫等の所見は特に認められなかった。しかしながら、脳波は一般に高電位・徐波が認められ、そして拡散強調磁気共鳴画像法では脳梁膨大部に一過性の異常が観察された。これらの所見により、本症例をロタウイルス感染に関連した可逆性の脳梁膨大部病変を伴う臨床的軽度脳症と診断した。患児の予後は良好であり、神経性の後遺症も認められなかった。脳脊髄液中にロタウイルスRNAや抗原が検出されなかったことから、ウイルス感染に続発した中枢神経系異常の間接的影響によって、一過性の脳梁膨大部変性が生じたものと推察された。患児の血清中Naレベルが正常であったことは、本変性が低Na血症を伴わずに生じたことを示すものである。

Rotavirus is a common cause of severe gastroenteritis in children. It is known that rotavirus gastroenteritis may be accompanied by neurological manifestations, including encephalitis/encephalopathy and seizures. We report a case of a 4-year-old girl with clinically mild encephalopathy with a reversible splenial lesion associated with rotavirus infection. She was admitted to our hospital because of reduced level of consciousness, seizures, diarrhea, and vomiting. Fecal rotavirus antigen testing was positive. Cell counts in the cerebrospinal fluid (CSF) were normal. She had a normal serum sodium level on admission. Brain computed tomography showed no cerebral edema. However, electroencephalography showed generalized high-voltage slow waves, and diffusionweighted magnetic resonance imaging demonstrated a transient abnormality in the splenium of the corpus callosum. We diagnosed clinically mild encephalopathy with a reversible splenial lesion associated with rotavirus infection. She recovered well and exhibited no neurological sequelae. Rotavirus RNA and antigen were not detected in the CSF, suggesting that the reversible splenial change was caused by indirect effects on the central nervous system subsequent to viral infection. Her normal serum sodium level indicates that this change can occur without hyponatremia.

食品衛生分野における実践疫学教育

Field Epidemiology Training for Food Sanitation Health Officials

溝口嘉範

Yoshinori Mizoguchi

獣医疫学雑誌, 16(2):103-106, 2012

In Japan, foodborne outbreak investigations tend to rely on pathogen detection from suspected foods, and rarely depend on epidemiological findings when implementing control measures. This often leads to a delay in outbreak response. In the United States and many countries in Europe, results from epidemiological investigations are more frequently used to control the outbreak in a timely manner.

In June 1997, a major enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 foodborne outbreak struck Okayama city causing 125 illnesses. Despite a thorough investigation, health officials could not determine the direct cause of the outbreak due to insufficient epidemiological findings. Recognizing the need for epidemiological training, Okayama City Public Health Center, in collaboration with nearby universities, started hosting “Field Epidemiology Training” courses every year for food sanitation health officials not only of Okayama city, but also of other municipalities.

The training course provides two three-day classes, “basic” and “advanced”, according to the knowledge level of the trainees.

The “basic” class aims at understanding general concepts of epidemiology and mastering basic techniques in a foodborne outbreak investigation. An exercise session is held after each lecture, which helps the trainees to understand the concepts and how to implement them to foodborne outbreak investigations. The course is practical and trainees may use the techniques taught in this course as soon as they get back to their job, which is highly appreciated.

In the “advanced” class, trainees are divided into groups to each analyze outbreak investigation data brought from each trainee’s health centers. Each group makes a presentation at the end of the course on how they analyzed the data and the reason for their final decision to manage the outbreak. They discuss the methods used and their decisions with the trainers and other groups.

We believe that field epidemiology should play a more important role in foodborne outbreak investigation in Japan, and that field epidemiology training is becoming increasingly necessary.

報 告 書 等

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, 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24年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 印刷中

Q熱は、感染症法では4類感染症に分類される人獣共通感染症であるが、ヒトでは特異的な症状が認められず、インフルエンザ様疾患、肺炎、肝炎等、多彩な病状を示す一方、動物では一般に無症状とされる。感染症発生动向調査事業における患者数は2002年から2003年がピークで、それぞれ40人を超えていた。しかし、近年は発生が極めて稀で、起因菌である*Coxiella burnetii*の国内における実態は未だ不明な点が多い。そこで、本病原体の侵淫状況を明らかにし、ヒトへの感染リスクを評価するため、これまでにヒト、伴侶動物であるイヌ、ネコ、家畜であるウシ、さらに宿主と目されるマダニを対象に疫学調査を実施してきた。その結果、これらの抗体保有率及び*C. burnetii*遺伝子の検出率は、1990年代の報告と比較して全て低値を示した。

今回、血清疫学調査として、昨年に引き続き岡山県Tと畜場へ2011年から2012年に全国から搬入された食用ウシ299頭を対象に、*C. burnetii*に対する抗体を測定したところ、21頭が陽性を示した。また、遺伝子疫学調査として、Tと畜場へ2012年に搬入された食用ウシ150頭、北海道の

牧場ウシ205頭、北海道の牧場ウマ87頭、岡山県のヌートリア148頭、岡山県の野ネズミ133頭、岡山県のマダニ180匹及び北海道のマダニ563匹を対象として*C. burnetii*の遺伝子検索を実施したが、結果は全て陰性であった。

2009年から2012年まで、全国の食用ウシ565頭を対象として血清疫学調査及び遺伝子疫学調査を実施してきたが、*C. burnetii*に対する抗体保有率は3.7%であり、遺伝子は検出されなかった。これらの結果から、食用ウシにおいては、過去の感染が疑われる個体が存在するものの、調査時点では感染個体はいなかったと考えられた。これまでに、遺伝子疫学調査として家畜1313頭、ペット2748頭、野生動物281頭及びマダニ1365匹の合計5,707検体について*C. burnetii*の遺伝子検索を実施してきたが、感染個体は確認できなかった。これらのことを勘案すると、現時点において、国内の*C. burnetii*の侵淫度は低く、ヒトへの感染リスクは非常に低いものと考えられた。しかしながら、現在も毎年数名の患者が報告されており、海外の流行地域からの輸入感染も懸念されることから、今後も検査体制やサーベイランス体制を維持していくことが必要であると考えられる。

国内リケッチア症実験室診断に関する状況調査

岸本壽男, 安藤秀二, 木田浩司 他

ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる

技術・情報の体系化に関する研究

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成24年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 101-113, 2013

リケッチア症である「つつが虫病」及び「日本紅斑熱」は、感染症法で四類感染症に規定される重篤な熱性発疹性感染症である。医療機関が診断した場合は届出が義務づけられているが、実験室診断による確定が必須とされている。しかし、これらの実験室診断の主体施設である地方衛生研究所は、人事異動等による人員不足や技術の低下で診断が困難になる施設が報告されており、この問題に対応するためには、地域における協力体制の構築が急務である。そこで今回、全国的に診断体制に関する情報の共有化を図ることを目的として、地方衛生研究所全国協議会に加入している79施設を対象としたアンケート調査を実施した。そ

の結果、地方衛生研究所における実験室診断体制は、血清診断、遺伝子診断だけでなく病原体分離まで実施している施設がある一方、実験室診断を全く実施していない施設もあることが確認された。また、どちらの感染症においても、血清診断及び遺伝子診断の実施施設はともに50%を切っており、地域協力体制構築の必要性が浮き彫りとなった。アンケートを元に作成した地域ごとの診断体制、連絡先等ととりまとめた表については、地方衛生研究所、医療機関等に公表する予定であり、地域協力体制構築の一助となることが期待される。今後も継続的に同様のアンケート調査を実施し、診断体制の情報を共有していく予定である。

ラボネットワークの構築と課題に関する検討

岸本壽男, 安藤秀二, 木田浩司 他

ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる

技術・情報の体系化に関する研究

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成24年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 115-121, 2013

リケッチア症の診断・治療ネットワーク構築とその課題に関する検討を行うため、地方衛生研究所、国立感染症研究所、および関連研究機関との協力のもと、以下の活動を実施した。(1)リケッチア症に対する地域特性を考慮した調査及び検査法の開発に取り組んだ。具体的な対応は個々の地方衛生研究所を中心に進められた。(2)複数県参加型の地域ラボネットワーク構築活動として、①東北ブロックでは、Shimokoshi型の媒介種の探索、*Orientia* 培養技術研修を実施した。②中国四国ブロックでは、*R.*

*japonica*感染源調査及び検査技術研修として四国地方の4県の地方衛生研究所を対象とした日本紅斑熱の診断技術研修会を開催した。③九州ブロックでは、リケッチアに関する検査技術研修を行った。(3)リケッチア症検査体制に関するアンケート調査を、全国の地方衛生研究所79施設に対して実施し、検査体制の現状を把握し、問題点の抽出を行った。今後は各地方衛生研究所のリケッチア症検査体制の年度ごとのデータ更新と公表による医療機関への周知を進める予定である。

リケッチア感染症の調査技術の維持に関する検証

～埼玉県の高クビシンが保有するリケッチア類に関する研究～

山本徳栄, 岸本壽男, 安藤秀二 他

ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる

技術・情報の体系化に関する研究

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成24年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 131-132, 2013

リケッチア感染症の調査の一環として、埼玉県で有害獣として捕獲された高クビシンを対象としたリケッチア類の保有状況を調査した。つつが虫病, 日本紅斑熱, 発疹熱およびQ熱の各種病原微生物を用いて抗原プレートを作成し, 血清抗体価を測定した。429検体について測定した結果, *O. tsutsugamushi*は用いた抗原5型のうちKurokiに対して2検体 (0.4%), *R. japonica*では1検体 (0.2%) が, いずれも64倍を示した。*R. typhi*および*C. burnetii*ではすべ

て16倍未満であった。一方, 全血108検体について, 各種リケッチアの標的遺伝子の増幅を試みたが, すべて陰性の結果であった。なお, 遺伝子検査は抗体検査とのバランスからもさらに多くの検体について実施する必要がある。また, 今後はこのような調査を全県的に広げ, 県内に侵淫するリケッチア類を特定するとともに, 検査技術の維持の検証も随時併行させていく予定である。

フタル酸ノルマル-ブチル=ベンジル及びフタル酸ビス (2-エチルヘキシル) 等の分析法

吉岡敏行

平成23年度化学物質分析法開発調査報告書 (環境省環境安全課), 274-305, 2012

水質試料中のフタル酸エステル類8種類の分析法を開発した。水質試料0.1Lをヘキサン-スターラー抽出し, GC/

MS-SIMで定量した。本法により水質試料中のフタル酸エステル類8種類が2.2~85 ng/Lで定量可能であった。

フルフェノクスロン，フルアジナムの分析法

大月史彦，浦山豊弘，劔持堅志

平成23年度化学物質分析法開発調査報告書（環境省環境安全課），565-583, 2012

生物試料中のフルフェノクスロン，フルアジナムの分析法を開発した。生物試料10 gをアセトン/ヘキサンでホモジナイズし，濾過・濃縮後，酢酸エチル/アセトニトリル抽出，ヘキサン/アセトニトリル分配，Envi-Carb/LC-NH2

でクリンーンアップして，LC/MS/MS-SRMで定量した。本法により生物試料中のフルフェノクスロン，フルアジナムをそれぞれ0.025ng/g-wet，0.032ng/g-wetで定量可能であった。

2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールの分析法

大月史彦，劔持堅志

平成23年度化学物質分析法開発調査報告書（環境省環境安全課），600-618, 2012

水質試料中の2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールと3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノールの分析法を開発した。水質試料0.1Lに酸化防止剤としてアスコルビン酸を添加，ヘキサン抽出し，

LC/MS/MS-SRMで定量した。本法により水質試料中の2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールと3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノールが25～47ng/Lで定量可能であった。

平成24年度人形峠周辺の環境放射線等測定報告

小川 登，森上嘉亮，畑 陽介，清水光郎，片岡敏夫，中桐基晴，西平 強，岸本壽男

平成24年度人形峠周辺の環境放射線等測定報告書
（岡山県環境保健センター，環境企画課）

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

る。平成24年度における放射線，放射能，ふっ素等の測定結果に施設由来の異常値は認められなかった。

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24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24年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書，161-167, 2013

県内のレジオネラ症散発患者から分離された *L.pneumophila* (Lp) のうち，血清群 (SG) 3の株は平成20年～24年までに8株あり，これらすべての株が，sequence-based typing (SBT) 法による型別でsequence type (ST) 93に型別され，パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法でも同じパターンを示した。これらの患者の感染源あるいは原因菌は同一である能性が示唆されたので，感染源究明のためLp SG3の環境中での分布を調査した。浴槽水等101検体を調査した結果，13検体 (12.9%) からレジオネラが検出され，LP SG3は浴槽水2検体のみから検出された。

一方，浴槽水等から分離されたレジオネラ133株を収集し血清型別を実施した結果，Lp SG3は浴槽水由来の29株，原水由来の6株，プール水由来の10株およびフローミル水由来の9株の計54株であった。このうちの42株と，当センターで分離した浴槽水由来の2株の計44株についてPFGE法を行って，患者株のPFGEパターンと比較した。PFGEパターンは14パターンに分類されが，患者株と同じパターンを示す株はなかった。今後さらに調査を継続して，感染源を究明していく必要がある。

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24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
厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)

平成22～24年度 総合研究報告書，129-135, 2013

県内のレジオネラ症散発患者から分離された *L.pneumophila* (Lp) のうち，血清群 (SG) 3の株は平成20年～24年までに8株あり，これらすべての株が，sequence-based typing (SBT) 法による型別でsequence type (ST) 93に型別され，パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法でも同じパターンを示した。このことから，これらの患者は同一の感染源あるいは環境中に分布した同一の株により感染した可能性が，示唆された。そこで，その感染源を究明するため，Lp SG3の環境中での分布を調査した。浴槽水等150検体を調査した結果，22検体 (14.7%) からレジオネラが検出され，LP SG3は浴槽水2検体のみから検出された。一方，浴槽水等から分離されたレジオネラ266

株を収集し血清型別を実施した結果，Lp SG3は浴槽水由来の50株，原水由来の6株，プール水由来の13株およびフローミル水由来の9株の計78株であった。このうちの57株と，過去に収集した浴槽水等由来のLp SG3 12株，当センターで分離した浴槽水由来の2株および患者株7株の計78株についてPFGE法を行って，PFGEパターンを比較した。PFGEパターンは26パターンに分類され，患者株はすべて同一のPFGEパターンであったが，他の株とは一致しなかった。現状では患者の感染源は不明であるが，今後さらに多様な検体について調査を行って，感染源を究明していく必要がある。

レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み（平成24年度）

森本 洋, 中嶋 洋 他

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
厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
平成24年度 総括・分担研究報告書, 93-130, 2013

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

関を問わず検査精度の安定に向けた取り組みを検討した。プレ精度管理を行った結果、塗布時におけるコンラージ棒のタッチ力が集落発育に影響している可能性があった。

レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み （平成22～24年度）

森本 洋, 中嶋 洋 他

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
厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
平成24年度 総括・分担研究報告書, 63-81, 2013

地方衛生研究所のレジオネラレファレンスセンターを中心メンバーとしたレジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループを発足し、全国の77カ所の地方衛生研究所にレジオネラ属菌検査方法のアンケートを実施した。その結果、標準的な検査法の整理と提示、研修システムの構築、精度

管理の3点を柱とし、行政・民間の検査機関を問わず検査精度の安定に向けた取り組みが必要との認識に至り、これらについてワーキンググループ内で検討した。配付試料は、民間企業との協力を視野に入れ検討する必要があると思われた。

病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症 探知システムの構築に関する研究（平成24年度）

中嶋 洋, 大島律子, 河合央博 他

病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知
システムの構築に関する研究
厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
平成24年度 総括・研究分担報告書, 101-181, 2013

中四国ブロックの調査では、データベースの構築に不可欠なデータの精度を維持・向上させることを目的として、腸管出血性大腸菌（EHEC）O157菌株を用いたパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE法）およびIS-printing Systemによる精度管理を実施した。その結果、本年度はIS-printing systemによる解析で、異なった結果を報告した施設が例年より多かった。PFGE法による結果は、ほとんどの施設で良好であった。中四国地域のEHEC O157に

よる感染事例について、IS-printing systemによる解析データを利用して疫学解析を行った結果、同一ISコードの菌による感染で、複数の県で多数の患者が発生していたことが確認された。本年度から全国規模でのIS-printing systemデータベースの試行が始まったことにより、さらに広域な発生事例についても、迅速な解析が可能になるものと思われる。

2008年～2012年に倉敷中央病院において分離された *Mycoplasma pneumoniae*のマクロライド系薬剤耐性率と MIC値について

藤井寛之, 中嶋 洋, 見理 剛 他

病原微生物検出情報, 265-266 (33), 2012

2008年1月～2012年8月に当院において分離された *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) 74株（男性45株, 女性29株）のうち70株を対象にマクロライド系薬剤耐性23S rRNA遺伝子変異, *p1*遺伝子による菌型, VNTR P1_AGT, 各種薬剤MIC測定を行なった。当院における年次別 *M. pneumoniae* 分離株数は2008年22株, 2009年10株, 2010年8株, 2011年30株, 2012年9月6日現在4株であり, 2011年はマイコプラズマ感染症の流行年であった

と考えられる。今回検討した *M. pneumoniae* 70株中46株（65.7%）がマクロライド系薬剤耐性23S rRNA遺伝子変異株（A2063G）であった。70株中58株は20歳未満（最低年齢4ヶ月）で分離されておりA2063G変異がみられたのは43株（74%）であった。20歳以上（最高年齢86歳）の分離株は12株で変異がみられたのは3株（25%）のみであり, 若年齢層でのマクロライド系薬剤耐性化が進んでいることが示唆された。

飲食店を原因施設とする*Kudoa septempunctata*による 食中毒事例—倉敷市

小川芳弘, 香川真二, 杉村一彦, 山口紀子, 中嶋 洋

病原微生物検出情報, 102-103(33), 2012

2011年10月, 倉敷市内の飲食店において岡山県内初のヒラメに寄生する*K. septempunctata*を原因とする食中毒事例が発生した。今回, この事例について, 暫定検査法に従いリアルタイムPCR検査法による遺伝子検査および顕微鏡検査による孢子数計測を実施した。遺伝子検査において, すべての検体からカットオフ値 1.0×10^7 Kudoa rDNA

コピー数/g以上のコピー数が検出され, 平均値は 1.3×10^{11} Kudoa rDNAコピー数/gであった。顕微鏡検査においても, すべての検体から6~7極嚢を有する孢子を確認し, 計算板により算出した孢子数の平均値は, 3.2×10^7 孢子数/gであった。

岡山県における馬刺しによるザルコシスティス食中毒事例

大島律子 石井 学 木田浩司 中嶋 洋 岸本壽男
畑 ますみ 福井みどり 為房園実 八木田健司

病原微生物検出情報IASR, Vol.33, 158-159, 2012

2011(平成23)年9月9日, 備中保健所管内の住民から, 「熊本市内で購入した馬刺しを食べて複数名が嘔吐下痢を呈している」旨の連絡が備中保健所井笠支所にあり, 備中保健所が調査したところ, 馬刺しの残品から住肉孢子

虫が検出されたため, 馬刺しを原因食品とし, 住肉孢子虫を病因物質とする食中毒であることが判明した。馬刺しを販売した店は, 厚生労働省が通知した冷凍処理を実施していなかった。

四国地方における日本紅斑熱診断技術研修

木田浩司, 岸本壽男 他

ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる

技術・情報の体系化に関する研究

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成24年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 155-158, 2013

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、感染症法では四類感染症に分類される重篤な熱性発疹性感染症である。本感染症の実験室診断を実施しているのは一部の大学と地方衛生研究所のみであるが、これらの施設であっても人事異動等による技術の低下・喪失で診断が困難となるケースが問題となっている。そこで、2012年7月23日～24日に、四国地方の4県（香川県、高知県、愛媛県及び徳島県）を対象とした日本紅斑熱の診断技術研修会を開催し、患者血清からの

蛍光抗体法による抗リケッチア抗体の検出法及びreal-time PCR法を用いた *R. japonica* 遺伝子の検出法等について講義を行った。real-timePCR法については、血液検体を用い、核酸抽出から標的遺伝子検出・解析までの実習を行った。また、2012年8月16日～17日に、香川県における日本紅斑熱患者の感染推定地でマダニを捕獲し、形態学的な種同定法及びマダニからの *R. japonica* 遺伝子検出法についての技術研修会を実施した。採集したマダニ42匹については、real-timePCR法による *R. japonica* 遺伝子の検出を試みたが、全て陰性であり、感染源の特定はできなかった。

岡山県備前保健所東備支所管内で発生した 日本紅斑熱事例における感染源調査

木田浩司, 岸本壽男, 溝口嘉範, 藤井理津志, 葛谷光隆, 濱野雅子

ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる
技術・情報の体系化に関する研究

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成24年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究報告書, 159-165, 2013

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、感染症法では四類感染症に分類される重篤な熱性発疹性感染症である。岡山県では2009年10月に初めて患者が報告されて以来、5名の発症が確認されている。今回我々は、備前保健所東備支所管内の患者居住地域における *R. japonica* を含むSFGRの侵淫実態を明らかにし、感染源を特定することを目的として調査を行った。

調査は2011年6月、7月、2012年5月、6月及び7月の5回実施した。患者居住地を中心として、半径10kmにA (患者居住地) ~ Eの計5地点を設定してマダニを捕獲し、形態観察によって種を同定した。生存個体の一部についてはL929細胞及びVERO細胞を用いてリケッチアの分離を試みた。また、マダニから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PCRによる遺伝子検索を行った。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。このうち、既知種と一致したものは、クエン酸合成酵素 (gltA) 領域についても遺伝子配列を決

定し、既知種との比較を行った。

捕獲したマダニは11種900匹で、検査に供した391匹のうち39匹から17kDa遺伝子が検出された。系統解析の結果、これらはすべてSFGRに属しており、既知種との比較の結果、地点A (患者の居住地) のヤマアラシチマダニから検出された1株は *R. japonica* YH株、地点Bのヤマトマダニから検出された1株は *R. asiatica* IO-1株、地点Eのタカサゴキララマダニから検出された2株は *R. tamurae* AT-1株とそれぞれ100%の相同性を示した。gltA領域における既知種との相同性についても、それぞれ100%であった。また、ヤマアラシチマダニ及びタカサゴキララマダニからL929細胞及びVERO細胞による分離株も得られ、これらの遺伝子配列はPCR検出株と100%一致していた。

今回、ヤマアラシチマダニから *R. japonica* が検出されたことで、岡山県内における媒介種が初めて明らかになった。また、捕獲地点が患者居住地であったことから、その病因は *R. japonica* であることが強く示唆された。今後も患者発生地域の調査を実施することで、SFGRの侵淫実態を明らかにし、適切な治療及び予防啓発へ繋げたい。

ノロウイルス食中毒事例調査の精度向上のための塩基配列データと疫学情報の共有化—GⅡ/4 2012変異株の検出とその後の対応を中心として—

野田 衛, 濱野雅子, 溝口嘉範 他

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24年度厚生労働科学研究費補助金, 127-135, 2013

ノロウイルス等の食品媒介性ウイルスによる広域食中毒事例の探知など食中毒調査の精度向上に資することを目的として, 全国51地方衛生研究所, 国立感染症研究所等の協力の下, ノロウイルスおよびサポウイルスの塩基配列データおよび疫学データの共有等を実施し, 以下の結果を得た。

1. 2012年11月, 新潟県からの情報提供および沖縄県での集団発生事例等を発端として, GⅡ/4の新しい変異株(2012変異株, 仮称)の全国的な流行の可能性を察知した。その後, 厚生労働省等に情報提供するとともに全国的な検出状況の入手等の対応をとり, ノロウイルスの流行のピーク前(11月28日)に, 国立感染症研究

所・感染症情報センターのホームページをとおり, 病原微生物検出状況(IASR)の速報記事として情報提供することができた。本情報はマスコミ等を介し, 国民に対する予防対策への備えや流行への注意喚起等の一翼を担うとともに, 食品衛生監視員の食中毒調査時の判断材料として有用な科学的根拠を提供することができた。

2. 共有する塩基配列データを食中毒の被害実態推定等のために有効に活用することを目的として, ノロウイルス食中毒の原因物質におけるカキの寄与率の推定を試みた。

食中毒統計, NESFD情報および遺伝子型別結果を利用したノロウイルス食中毒事例の原因食品におけるカキの寄与率の推定

野田 衛, 濱野雅子, 溝口嘉範 他

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24年度厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究年度終了報告書, 137-144, 2013

ノロウイルス食中毒の原因食品におけるカキの正確な寄与率を明らかにすることを目的として, 2011年に発生したノロウイルス食中毒事例について, 食中毒統計, 食中毒調査支援システム(NESFD: National Epidemiological Surveillance of Foodborne Disease)の食中毒速報および遺伝子解析結果を総合的に分析した。解析可能な129事例の分析の結果, 食中毒統計でカキの関連性が示されていな

い事例のうち提供メニューにカキが含まれる事例は, ノロウイルスGIが多く検出される, 複数の遺伝子型が検出されるなど, カキが原因と特定あるいは推定された事例と同様のウイルス疫学的な特徴がみられ, その多くはカキが原因であった可能性が高いと考えられた。この結果から, 食中毒統計のノロウイルス食中毒の原因食品におけるカキの割合は, 実際の寄与率と比較して低いと考えられた。

パンソルビントラップ法の多機関評価試験結果

野田 衛, 斎藤博之, 筒井理華, 小和田和誠, 入谷展弘, 内野清子, 溝口嘉範, 飯塚節子, 山下育孝, 世良暢之, 原田誠也, 岩切 章, 上間 匡

食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究
(食品の安全確保推進研究事業)

平成24年度厚生労働科学研究費補助金 総括・研究分担報告書77-110, 2013

一般食品からの簡便、迅速なウイルス検出法として開発されたパンソルビントラップ法について、ノロウイルスG II/4を汚染させたきなこを汚染食品として11機関による評価試験を実施した。検査法の開発を行った機関を除き、他の10機関の検査結果は必ずしも満足できる結果ではなく、特にリアルタイムPCR法の検出率が低い傾向にあった。DNase処理を省き逆転写反応を厚生労働省の通知法に準じた方法に変更し、またリアルタイムPCRに使用するマス

ターミックス液を変更し、再試験を実施した結果、多くの検査機関で検査結果の改善が認められた。本法は得られたRNAの逆転写反応およびリアルタイムPCRの試薬等の影響を受けることから、各検査機関で本法を導入するためには、検出感度や試薬の有効性の確認等を実施する必要があると思われた。また、リアルタイムPCRの定量値が各検査機関で大きくばらついたことから、その精度管理の必要性が示唆された。

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, 砂川富正, 涌井 拓, 田渕文字, 三崎貴子, 柳樂真佐美, 岩渕香織, 岸本 剛, 尾関由姫恵, 杉下由行, 戸来小太郎, 岡部信彦, 丸山 絢, 槌田浩明, 溝口嘉範, 小宮 智, 小崎暢子

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24年度 厚生労働科学研究費補助金 総括・分担研究年度終了報告書, 25-42, 2013

我が国の腸管出血性大腸菌感染症の報告は年間約3000例～約4500例である。散発事例の対策はアウトブレイク発生時と異なり、その原因の推定が困難である。米国や豪州のようなアトリビューション (Attributable risk % : 寄与危険割合) 算出の試行を行い実用化へ向けた検討と、厚生労働省が実施した対策の効果について検討した。腸管出血性大腸菌 (O157) 感染症の発症例 (症例) は65例で対照は269例であった。十分に加熱した牛肉 (OR=2.1, 95%CI: 1.1-3.9), 十分に加熱した豚肉 (OR=4.0, 95%CI: 1.9-8.1), 十分に加熱した鶏肉 (OR=2.4, 95%CI: 1.3-4.6), 十分に加熱した牛ホルモン (OR=4.4, 95%CI: 1.4-14.1), トマト (OR=2.1, 95%CI: 1.0-4.1), キュウリ (OR=1.9, 95%CI: 1.0-4.3), ネギ (OR=1.9, 95%CI: 1.0-3.7), 玉ねぎ (OR=2.3, 95%CI: 1.3-4.2), ニンジン

(OR=2.1, 95%CI: 1.1-3.8), パセリ (OR=3.2, 95%CI: 1.2-8.4) が有意にEHEC O157発症と関連があった。アトリビューションの算出は十分に加熱した牛肉が25.7%, 十分に加熱した牛ホルモンが9.2%であった。今後、全国でのアトリビューション算出が可能であると考えられ、対策の評価ツールとしての可能性があると考えられ、自治体レベルでの算出可能性の検討が必要であると考えられた。生から半生の牛肉の喫食と牛生レバーの喫食が有意な腸管出血性大腸菌 (O157) 感染症のリスクではなくなっていたことから、ユッケの規格基準や生レバー禁止といった行政的な効果が得られたと考えられた。

岡山県環境保健センター年報 第37号

(平成24年度)
平成25年12月31日発行

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