

岡山県環境保健センター年報

第41号
(平成28年度)

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

No.41

2017

ま え が き

当センターは、県民の生活環境の保全及び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」の役割を担う、総合的な試験研究機関として業務を実施しています。

近年、科学技術や情報通信技術の発展、グローバル化の進展などに伴い、社会情勢の変化はスピードを増しており、次々と浮上してくる社会的な問題に当センターが関わる機会も増大しております。

例えば、平成28年度には、国外で核実験が実施された際に放射性物質の監視体制を強化し、県内に影響が及んでいないことを確認しました。また、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）などのダニ媒介感染症は、疑い症例も含め、検査の頻度が以前より着実に増えており、このほかにも、中東呼吸器症候群（MERS）などの新興感染症やジカ熱などの輸入感染症と言ったこれまでに検査する機会が少なかった多種多様な感染症にも迅速に対応してきました。

このような中、当センターが県民の安全・安心を科学的・技術的側面から支えていくためには、複雑化、多様化する社会問題への対応力をつけることがますます重要になっていると感じています。

当センターでは、平成28年度から新たな調査研究課題に取り組み始めたところですが、このたび、平成28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ので、御高覧いただき忌憚のない御意見をお寄せいただきますとともに、なお一層の御支援、御鞭撻を賜りますようお願いいたします。

平成30年2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 岡山県における自動車排出ガス測定局の微小粒子状物質の炭素成分の実態について
中野温朗, 間野遼太, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋…………… 1
- 2 岡山県下2地点の環境大気中微小粒子状物質の発生源解析について
中野温朗, 間野遼太, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋…………… 5

【資 料】

- 3 岡山県における大気浮遊粉じん中のイオン成分について
間野遼太, 喜多真帆, 中野温朗, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋…………… 11

水質科

【調査研究】

- 4 事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究
- 公共用水域における魚へい死時の農薬一斉分析法の検討 -
吉岡敏行, 浦山豊弘, 山本浩司, 肥塚加奈江, 難波順子…………… 17
- 5 事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究
- 4-ビニル-1-シクロヘキセンの水質分析法の検討 -
山本浩司, 浦山豊弘, 新 和大, 吉岡敏行…………… 23
- 6 倉敷川流域の水量及びリン負荷量の推定
藤田和男, 小川知也, 吉岡敏行…………… 29

【資 料】

- 7 カビ臭原因物質の分析法の検討
山本浩司, 吉岡敏行, 肥塚加奈江, 難波順子…………… 41

放射能科

【資 料】

- 8 岡山県内における環境放射能バックグラウンド調査-ヨモギ- (第2報)
木下浩行, 加藤大貴, 清水光郎, 片岡敏夫, 小川 登…………… 47

細菌科

【調査研究】

- 9 志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査 (平成28年度)
河合央博, 仲 敦史, 畑ますみ, 中嶋 洋…………… 51

ウイルス科

【調査研究】

- 10 Rapid Determination System of Viral RNA Sequence ver.3.1の検出感度の改善
木田浩司, 谷川徳行, 松岡保博, 磯田美穂子, 梶原香代子, 濱野雅子…………… 59
- 11 胃腸炎ウイルスの疫学的研究
－岡山県の散発胃腸炎患者におけるロタウイルスAの流行状況(2015/2016シーズン)－
梶原香代子, 濱野雅子, 木田浩司, 谷川徳行, 磯田美穂子, 松岡保博,
為房園実, 井上 勝, 濃野 信, 金谷誠久…………… 67
- 12 岡山県におけるインフルエンザ流行の疫学的解析(2015～2016年シーズン)
松岡保博, 木田浩司, 谷川徳行, 磯田美穂子, 梶原香代子, 濱野雅子, 為房園実, 森 勲…………… 73

【資料】

- 13 日本紅斑熱リケッチアを特異的に検出するReal-timePCR法に弱反応を示したリケッチア属菌の解析
松岡保博, 木田浩司, 谷川徳行, 磯田美穂子, 梶原香代子, 濱野雅子…………… 77

衛生化学科

【調査研究】

- 14 LC-MS/MSを用いた魚介類中有機スズ化合物の同時分析法の検討
難波順子, 肥塚加奈江, 赤木正章, 金子英史, 北村雅美, 吉岡敏行…………… 83

【資料】

- 15 ダイズ加工食品を対象とした遺伝子組換え食品の実態調査(平成28年度)
北村雅美, 赤木正章, 肥塚加奈江, 金子英史, 難波順子…………… 91

業務報告 …………… 97

他誌発表論文抄録 …………… 115

報告書等 …………… 117

学会発表 …………… 120

【調査研究】

岡山県における自動車排出ガス測定局の微小粒子状物質の炭素成分の実態について

A Study on Carbons Containing of PM2.5 at a Monitoring Station in Okayama Prefecture

中野温朗, 間野遼太, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋 (大気科)

Atsurou Nakano, Ryouta Mano, Maho Kita, Shigeru Nomura,

Tatsuya Nobumori, Hiroshi Takano (Atmosphere Section)

要 旨

岡山県下における自動車排出ガス測定局の微小粒子状物質の炭素成分の実態について、平成24～28年度の長津測定局で観測された結果を用いて解析した。炭素成分の濃度は、経年的に減少して粒子状物質全体の濃度低減に寄与しており、季節評価では元素状炭素が有機炭素より明らかな濃度減少傾向を示した。Positive Matrix Factorization (PMF) 解析による粒子状物質全体の発生源寄与割合の推定では、道路交通等因子が約31%を占めて主要な因子になり、その他にバイオマス等燃焼因子が約22%を占めて炭素成分の濃度への影響が考えられた。

[キーワード：微小粒子状物質,成分分析,PMF解析]

[Key words: PM2.5, Component Analysis, Positive Matrix Factorization]

1 はじめに

環境大気中の微小粒子状物質（以下「PM2.5」という。）については、構成成分の常時監視の観測結果により炭素成分が主要な成分の一つであることが分かっている¹⁾。炭素成分の発生源の一つとしてディーゼル車が挙げられるなかで²⁾、当県においても岡山県環境への負荷の低減に関する条例（以下「県条例」という。）によるディーゼル自動車に係る粒子状物質の削減対策が進められている。

前回の報告で、県内の自動車排出ガス測定局（以下「自排局」という。）の観測結果では、一般環境大気測定局（以下「一般局」という。）と比べて、炭素成分を構成する元素状炭素（以下「EC」という。）が高い濃度となり、有機炭素（以下「OC」という。）との濃度比（以下「[EC]:[OC]」という。）も大きかったことを指摘した³⁾。自排局では、炭素成分の実態に一般局にみられない特徴が観測されており、その解析を進める必要性が認められた。

本研究では、平成24～28年度の観測結果に基づき自排局での炭素成分の実態をまとめたので報告する。

2 調査方法

自排局である長津測定局の局舎屋上に設置したサンプラー（Thermo FRM-2000）で、捕集期間中数日間連続して環境大気中のPM2.5を石英繊維フィルタ（QRT-7000）に1日あたり23時間捕集し、フィルタから必要量をくり貫

いてカーボンアナライザー（Sunset LabModel）で炭素成分を測定した。長津測定局は、県南部の主要幹線道路沿いに設置された常時監視地点である。試料採取や成分測定、調査地点等の詳細は既報を参照されたい³⁾。

表1に示したとおり、解析対象は、平成24～28年度の季節ごとに7～15日間連続して観測できた結果とした。発生源寄与割合を推定するためのPositive Matrix

表1 解析対象期間

年度	期間	対象数
24	春季 H24/5/9(水) ～ H24/5/23(水)	15
	夏季 H24/7/26(水) ～ H24/8/1(火)	7
	秋季 H24/10/23(火) ～ H24/11/5(月)	14
	冬季 H25/2/13(火) ～ H25/2/19(月)	7
25	春季 H25/5/9(木) ～ H25/5/22(水)	13
	夏季 H25/7/29(火) ～ H25/8/4(月)	7
	秋季 H25/10/23(水) ～ H25/11/5(火)	14
	冬季 H26/1/27(月) ～ H26/2/2(日)	7
26	春季 H26/5/8(木) ～ H26/5/21(水)	14
	夏季 H26/7/28(月) ～ H26/8/3(日)	7
	秋季 H26/10/22(水) ～ H26/11/4(火)	14
	冬季 H27/1/26(月) ～ H27/2/1(日)	7
27	春季 H27/5/8(金) ～ H27/5/21(木)	14
	夏季 H27/7/27(月) ～ H27/8/2(日)	7
	秋季 H27/10/20(火) ～ H27/11/2(月)	14
	冬季 H28/1/25(月) ～ H28/1/31(日)	7
28	春季 H28/5/9(月) ～ H28/5/22(日)	14
	夏季 H28/7/25(月) ～ H28/7/31(日)	7
	秋季 H28/10/19(水) ～ H28/11/1(火)	14
	冬季 H29/1/23(月) ～ H29/1/29(日)	7
計		210

Factorization（以下「PMF」という。）解析には、米国環境保護庁が公開しているEPA-PMF5.0を利用した。PMF解析条件や因子数の決定、因子の推定等の詳細は別報を参照されたい⁴⁾。

3 結果

3.1 年間評価

図1に長津測定局における炭素成分の平成24～28年度の観測期間平均濃度の推移を示した。自動測定機によるPM2.5質量濃度の連続測定では、長津測定局の年平均値が平成25年度以降年々減少した（25年度23.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、26年度21.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、27年度18.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、28年度16.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）。炭素成分の観測期間は年間のうち限られた日数（最大でも平成24年度の43日分）にとどまるため、PM2.5質量濃度について自動測定機と秤量による測定値の間に差がある点に留意しなければならないものの、観測期間の炭素成分の平均濃度は年度間で変動しながら減少傾向を示した。

全国道路・街路交通情勢調査結果（昼間12時間自動車類交通量）では⁵⁾、長津測定局付近の主要な道路の交通量が平成22年度調査（一般国道2号:54,397台、山陽自動車道:20,649台）から27年度調査（一般国道2号:51,405台、山陽自動車道:21,451台）で約3%減少した。解析対象期間の交通量はほぼ横ばいで推移していたと推測され、交通量の変化によるPM2.5質量濃度の減少は考えられにくい結果であった。

炭素成分は観測期間のPM2.5構成成分の3割程度を占めて推移し、PM2.5質量濃度の低減に寄与していた。EC及び

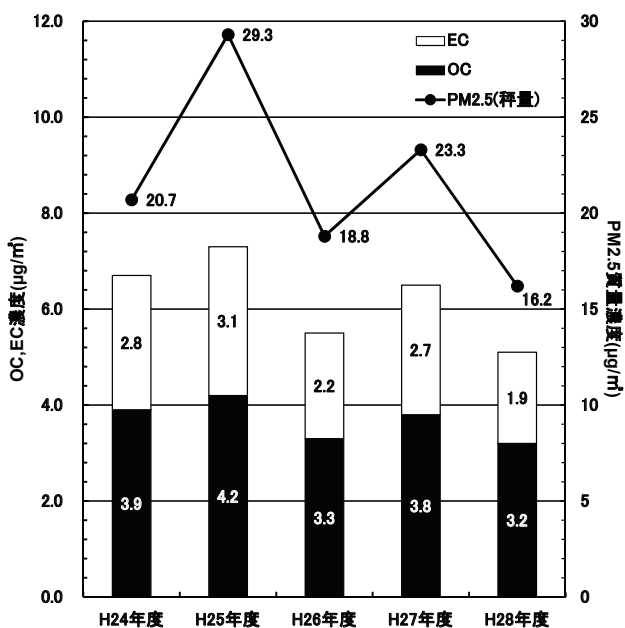


図1 炭素成分の観測期間平均濃度

OCの濃度推移は炭素成分全体と同様に年度間で変動しながらも減少した。ただし、[EC]:[OC]の濃度比の変動は概ね4.6で推移しており、両者の低減傾向には濃度比が変化するまでの差異は認められなかった。

ECの比率は上述したとおり約4割を占めており、県内の一般局の[EC]:[OC]の濃度比が2.5:7.5～3:7とECの比率が約3割であったのに比べて大きかった³⁾。平成27年度の全国における成分分析結果（自排局の[EC]:[OC]は3:7、一般局の[EC]:[OC]は2.5:7.5）と比べても¹⁾、長津測定局のECの比率は大きく、一般局との差も大きいままであった。OCは有機物を構成する炭素とされ、化石燃料やバイオマスの燃焼に排出されるものや人為起源・自然起源の揮発性有機化合物が大気中で反応し生成するものがあり、ECは化石燃料やバイオマスの燃焼によって生成・排出され、微小粒子への存在比率が高いとされる⁶⁾。ディーゼル車などEC発生源への対策が進めば、ECの低減により自排局と一般局の[EC]:[OC]の差が小さくなっていく可能性が考えられた。

3.2 季節評価

炭素成分の経年変化をより詳細に評価するために、季節ごとの結果を基に時系列で解析した。図2にEC、OC濃度の各季観測期間の最大値、平均値の推移を示した。最大値は各季の測定結果のなかで最大のもの、平均値は各季の測定

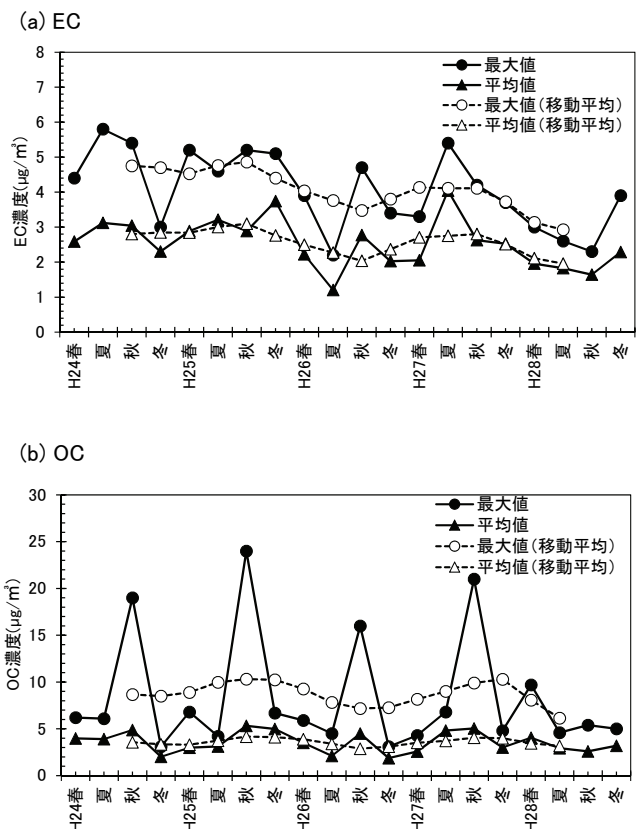


図2 EC、OCの各季観測期間最大濃度及び平均濃度の推移

結果を平均したものとし、移動平均は各季の最大値または平均値をそれぞれ四季節分で平均したものとした。

各季のEC濃度は、最大値、平均値ともに減少傾向で推移しており、最大値の方がより顕著であった。EC濃度の最大値及び平均値は、同期して変動し、季節間の変動も同じ程度（相対係数約30%）であり、特定の季節の上昇はみられなかった。

OC濃度の推移については、最大値、平均値ともに横ばい傾向で推移した。OC濃度の最大値は、平成28年度を除いて秋季に同一年度他季と比較して約3～6倍高くなった。自動車は年間を通じて定常的に影響することが推測されるため、秋季の濃度上昇には季節的な発生源の寄与が考えられた。平成23年度の調査では、長津測定局で秋・冬季にバイオマス燃焼などで排出されるレボグルコサンの濃度上昇が観測されている⁷⁾。

図3に県条例対象事業者自動車保有数と対策済車割合の推移を示した。自動車については、県条例に基づく届出によると、平成24～26年度の特定事業者のディーゼル車のPM対策車両数が増加しており⁸⁾、県内でもディーゼル車両の環境対策が進んでいることが示唆された。

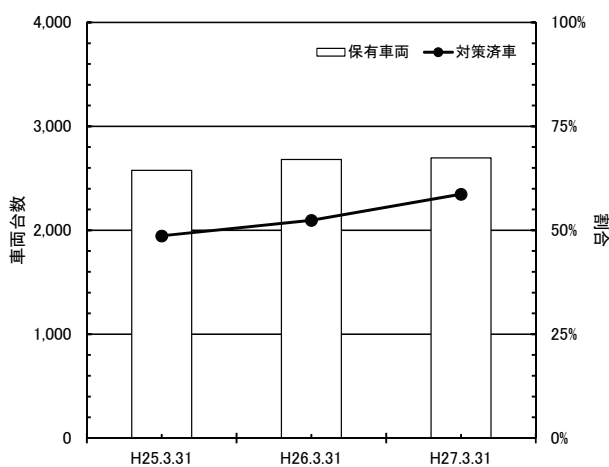


図3 県条例対象事業者自動車保有数と対策済車割合の推移

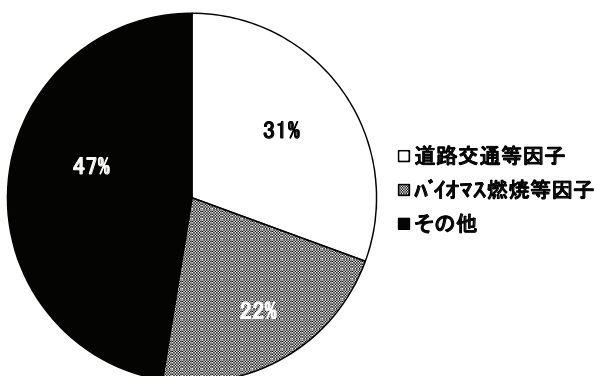


図4 PMF解析による発生源寄与割合の推定

3.3 発生源寄与割合の推定

発生源寄与割合を推定するため、平成24～27年度の観測結果を解析対象としてPMF解析を行った⁴⁾。自動車排気やタイヤ粉じんなど道路交通の寄与を表す因子（7.8μg/m³）が、解析対象期間のPM2.5質量濃度（25.5μg/m³）の約31%に寄与した結果になった（図4）。

バイオマスなどの燃焼の寄与を表す因子（5.6μg/m³）が約22%寄与しており、道路交通等因子と同程度に影響していた可能性が示唆された。3.2で述べた観測結果で秋季の季節的なOC濃度の上昇がみられ、炭素成分の濃度低減には自排局においても自動車以外の発生源について考慮する必要性が認められた。

4 まとめ

PM2.5を構成する炭素成分について自排局での実態把握を進めるため、平成24～28年度にかけて観測された結果を解析した。年間評価によると、県内の代表的な自排局である長津測定局の炭素成分の濃度には、経年的な減少傾向がみられ、PM2.5の濃度低減に寄与したことが推測された。季節評価によると、EC濃度の減少傾向はOCより明らかであった。OC濃度の最大値は、平成28年度を除いて秋季に同一年度他季と比較して約3～6倍高くなっており、季節的な発生源の寄与が考えられた。平成27年度の全国における成分分析結果と比べても、長津測定局のECの比率は大きく、一般局との差も大きいままだった。ディーゼル車などEC発生源への対策が進めば、ECの低減により自排局と一般局の比率差が小さくなっていく可能性が考えられた。ただし、これらの解析は年間のうち限られた日数（最大43日分/年度）の観測結果に基づいていることに留意しなければならない。

PMF解析による発生源寄与割合の推定では、道路交通等因子が解析対象期間のPM2.5質量濃度の約31%を占めて主要な因子になった。その他に炭素成分の発生源になり得るバイオマス等燃焼因子の寄与も推定され、炭素成分の濃度低減には自排局においても自動車以外の発生源について考慮する必要性が認められた。

文献

- 1) 環境省:大気汚染状況について
<http://www.env.go.jp/air/osen/index.html>
- 2) 微小粒子状物質（PM2.5）の成分分析ガイドライン、平成23年7月、環境省
- 3) 中野温朗,間野遼太,喜多真帆,野村茂,信森達也,鷹野洋：岡山県下における微小粒子状物質の成分の実態

について（第3報）,岡山県環境保健センター年報
40,1-12,2016

- 4) 中野温朗,間野遼太,喜多真帆,野村茂,信森達也,鷹野洋：岡山県下2地点の環境大気中微小粒子状物質の発生源解析について,岡山県環境保健センター年報41,5-10,2017
- 5) 国土交通省:平成27年度全国道路・街路交通情勢調査一般交通量調査集計表
<http://www.mlit.go.jp/road/census/h27/>
- 6) 長谷川就一:PM2.5-第2講PM2.5の測定・分析と実態-,大気環境学会誌45,A61-A68,2010
- 7) 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
- 8) 岡山県環境管理課
<http://www.pref.okayama.jp/soshiki/29/>

【調査研究】

岡山県下2地点の大気環境中微小粒子状物質の発生源解析について
Source Characterizations of PM2.5 at Two Sites in Okayama Prefecture

中野温朗, 間野遼太, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋 (大気科)

Atsurou Nakano, Ryouta Mano, Maho Kita, Shigeru Nomura,

Tatsuya Nobumori, Hiroshi Takano (Atmosphere Section)

要 旨

岡山県内2地点で観測された平成24～27年度までの環境大気中の微小粒子状物質の成分分析結果を用いて、Positive Matrix Factorization (PMF) 解析を行い、発生源の影響を推定した。推定発生源として8つの因子を抽出したところ、総社測定局では硫酸系二次粒子因子が全体濃度の過半近くを占め、長津測定局では道路交通等因子が最も寄与した結果になった。どちらの地点でもバイオマス等燃焼因子が主要な因子の一つになった。

[キーワード：微小粒子状物質, 発生源解析, PMF]

[Key words: PM2.5, Source Characterization, Positive Matrix Factorization]

1 はじめに

微小粒子状物質（以下「PM2.5」という。）については本県でも実態把握に取り組んでおり、観測結果を報告してきた^{1)～12)}。本報では、平成24～27年度までのPM2.5構成成分の分析結果を用いて、Positive Matrix Factorization（以下「PMF」という。）解析を行い、発生源の影響を推定したので報告する。

2 調査方法

2.1 調査地点

調査地点は、県中南部の総社測定局（総社市）、県南部の長津測定局（早島町）とした。総社測定局は大規模な事業場等の少ない市街地に設置された一般環境大気測定局（以下「一般局」という。）であり、長津測定局は幹線道路沿いに設置された自動車排出ガス測定局（以下「自排局」という。）である。図1に調査地点を示す。

2.2 試料採取及び成分測定

試料採取及び成分測定の詳細は既報に示したとおり¹¹⁾、「大気中微小粒子状物質成分測定マニュアル（環境省平成24年4月）」に準じている。試料採取数には季節間で偏りがある（基本的に春季・秋季14日間、夏季・冬季7日間）。構成成分の測定結果は有効数字2桁で取り扱い、検出下限値未満の場合は同値の1/2を、定量下限値未満の場合は有効数字2桁の測定値を用いて解析した。

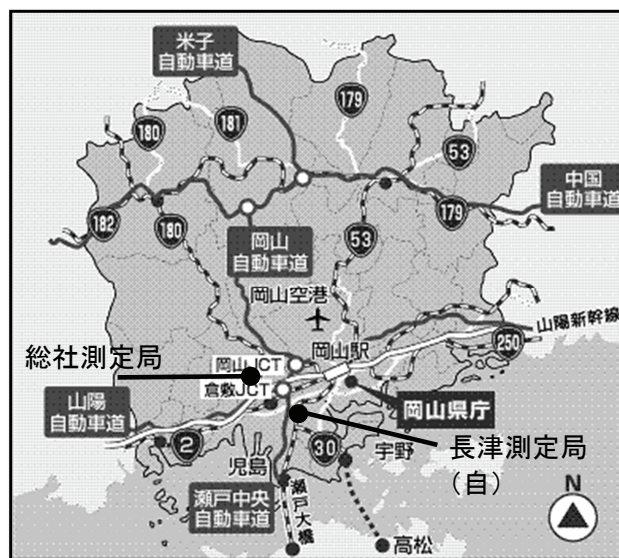


図1 調査地点

2.3 発生源寄与解析

発生源寄与の推定は、レセプターモデルであるPMF解析により行った。解析ソフトウェアは米国環境保護庁が公開しているEPA-PMF5.0を利用した¹³⁾。PMF解析は、多変量解析の一種で、成分濃度の時系列データセット (x) をいくつかの因子に分解し、それぞれの因子寄与 (g) と因子プロファイル (f) を求める手法である。

$$x_{ij} = \sum_{k=1}^p g_{ik} f_{kj} + e_{ij}$$

ここで、 x_{ij} は試料*i*中の成分*j*の観測値、 g_{ik} は試料*i*に対

する因子 k の相対寄与、 f_{kj} は因子 k における成分 j の濃度、 e_{ij} は試料 i 中の成分 j の観測値と計算値の残差である。モデルでは、任意の因子数 p について計算し、次式で定義される Q 値を最小にする g_{ik} 及び f_{kj} を求める。 u_{ij} は観測における試料 i 中の成分 j の測定に伴う不確かさである。

$$Q = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \left(\frac{e_{ij}}{u_{ij}} \right)^2$$

ここで、 n は試料数、 m は成分数を表す。なお、この Q 値の理論値は次式で算出される。

$$Q_{(theory)} = n \times m - p \times (n + m)$$

2.4に記述した不確かさの算出や各成分の重み付け、その他の実行手順はソフトウェアのユーザーガイドに準じた¹³⁾。

2.4 解析条件

表1に解析条件をまとめて示した。本報では、ソフトウェアで計算する前に、イオンバランス及びマスクロージャーモデルを利用してデータスクリーニングを行った。PM2.5構成成分の分析結果のなかで、イオン成分のイオンバランス（陽イオン/陰イオン式量比）が0.7～1.3の範囲から外れるデータを除外し、さらにマスクロージャーモデル（推定質量濃度=1.375[SO₄²⁻]+1.29[NO₃⁻]+2.5[Na⁺]+1.4[OC]+[EC]+9.19[Al]+1.4[Ca²⁺]+1.38[Fe]+1.67[Ti]、なおTi濃度は測定していないため、[Ti]=0.1[Fe]として算出した。）を用いた推定値が0.7～1.3の範囲から外れるデータを除外した。各成分で25%値から75%値の四分位範囲から3倍を超えるデータについても除外した。その他に、解析結果の統計的な安定性についてソフトウェアの評価ツール（3.1に記述したBootstrap runなど）により確認し、安定した解が得られるまでデータスクリーニングを行っ

た¹³⁾。

不確かさのデータマトリクスは各成分の検出下限値と誤差割合（20%）により算出して作成した。モデル全体に係る不確かさ（Extra Modeling Uncertainty）は0%に設定した。

各成分の重み付けについては、ソフトウェアで算出されたSignal/Noise（S/N）比が解析対象項目すべてで1以上になったため、検出下限値未満のデータ数の割合を基に行った。検出下限値未満の割合が3%を超過する項目（Ni、Mg²⁺、Ca²⁺、Cl⁻）はWeakに、それら以外の項目はStrongに設定した。なお、PM2.5（質量濃度）はWeak、Total Variableに設定した。上記の条件で解析後、予測値と実測値の決定係数が低かったAlをStrong からWeakに変更し、再解析した。

3 結果

3.1 因子数の決定

図2に因子数と Q 値の関係を示した。図中の両者の関係は、因子数を5から10の間で変化させて、繰り返し計算数20回で得られた Q （true）（外れ値を除外せずに算出した Q 値）と Q （robust）（外れ値を除外して算出した Q 値）の平均値及び相対標準偏差の変化を表している。表1の条件で解析したところ、因子数8において計算値 Q （true）と Q （robust）が理論値 Q （theory）に近づき、相対標準偏差RSD（True）とRSD（Robust）も最小になった。さらに因子数8としたときには、Bootstrap run（計算回数100回、Minimum Correlation R-Value 0.6）によるマッピングの当てはまりはいずれの因子も計算回数に近く良好な結果を示し（表2-1）、発生源の指標とした成分は概ね25%値から75%値の四分位範囲に入っていた（表2-2）。 Q 値、Bootstrap runのマッピング及び指標成分の四分位範

表1 解析条件

対象期間	平成24年度	平成25年度	平成26年度	平成27年度
春季/	H24/5/9～5/22	H25/5/9～5/22	H26/5/8～5/21	H27/5/8～5/21
夏季/	H24/7/26～8/1	H25/7/29～8/4	H26/7/28～8/3	H27/7/27～8/2
秋季/	H24/10/23～11/5	H25/10/23～11/5	H26/10/22～11/4	H27/10/20～11/2
冬季/	H25/2/13～2/19	H26/1/27～2/2	H27/1/26～2/1	H28/1/25～1/31
検出下限値未満の濃度データ	検出下限値の1/2で置換			
解析データ数	229			
解析対象項目	OC,EC,Mn,Cr,Ni,As,Al,Fe,Zn,Cu,V,Pb,Na ⁺ ,NH ₄ ⁺ ,K ⁺ ,Mg ²⁺ ,Ca ²⁺ ,Cl ⁻ ,NO ₃ ⁻ ,SO ₄ ²⁻ ,PM _{2.5}			
不確か率データ	検出下限値 誤差割合 20%, EMU 0%			
重み付け	Strong	OC,EC,Mn,Cr,As,Fe,Zn,Cu,V,Pb,Na ⁺ ,NH ₄ ⁺ ,K ⁺ ,NO ₃ ⁻ ,SO ₄ ²⁻		
	Weak	Ni,Al,Mg ²⁺ ,Ca ²⁺ ,Cl ⁻ ,PM _{2.5}		
	Bad	なし		

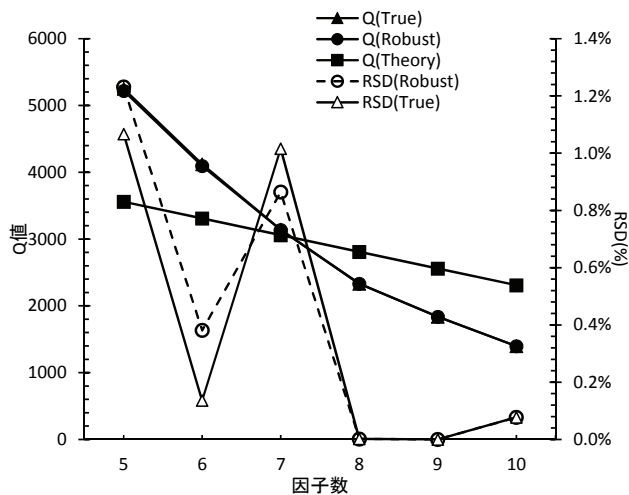


図2 因子数とQ値の関係

囲への適合状況から、因子数8とした解析結果が統計的に安定且つ堅牢な解であると判断した。

3.2 因子の推定

図3に表1の解析条件のもと繰り返し計算100回で抽出された8つの因子に占める各成分の相対比を示した。各成分は因子1～8の合計で100%になる。因子間の成分相対比の中で、負荷の大きい指標成分に着目し、調査地点周辺の状況を勘案した上で次のとおり発生源を推定した^{14)～18)}。

因子1は、 NH_4^+ や SO_4^{2-} の負荷が大きいため二次生成された硫酸系エアロゾルと解釈された。因子2は、重油燃焼の指標成分とされるNiやVの負荷が大きいため重油を燃料とする内燃機関の寄与を表す因子と解釈された。因子3は、Clや NO_3^- の負荷が大きいため二次生成された塩化物系エアロゾルや硝酸系エアロゾルを表す因子と解釈された。因子4は、自動車排気の指標成分とされるECの負荷が大きく、タイヤ粉じんやプレーキ粉じんの指標成分とされるCuの負荷もあったことから、道路交通等因子と解釈された。

因子5は、土壌粒子の指標成分とされるAlや Ca^{2+} の負荷が大きいうえに様々な無機元素の負荷があるため、土壌粒子などを含んだ粉じんの寄与を表す因子と解釈された。因子6は、バイオマス燃焼の指標成分とされるOCやEC、 K^+ の負荷が大きいため、バイオマス等燃焼の寄与を表す因子と解釈された。因子7は海塩の指標成分とされる Na^+ やClの負荷が大きいため海塩の寄与を表す因子と解釈された。因子8は石炭燃焼の指標成分とされるAsやPbの負荷が大きいため石炭燃焼の寄与を表すと解釈された。

3.3 地点別の因子の寄与濃度

PMF解析の結果に基づいて地点別に各因子寄与濃度を推定した結果を図4に示した。総社測定局では、因子1（硫酸系二次粒子）の寄与濃度がPM2.5質量濃度の1/3近くを占めて長津測定局よりも高くなった（総社 $7.6\mu\text{g}/\text{m}^3$ > 長津 $6.6\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）。幹線道路沿いに位置する長津測定局では、市街地にある総社測定局と比べて多くの因子で寄与濃度が高く推定されたなか、特に因子4（道路交通等）が高くなった（長津 $6.8\mu\text{g}/\text{m}^3$ > 総社 $1.7\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）。

総社測定局、長津測定局の両地点とも因子1に加えて因子6（バイオマス等燃焼）が主要な因子（総社 $5.8\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、長津 $5.0\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）の一つになった。両地点ともに周辺には耕作地が存在しており、バイオマス燃焼の発生する可能性があった。

4 まとめ

岡山県内2地点で観測された平成24～27年度までの環境大気中のPM2.5の成分分析結果を用いて、PMF解析を行ったところ、発生源として8つの因子（硫酸系二次粒子、重油燃焼、塩化物・硝酸系二次粒子、道路交通等、土壌等粉じん、バイオマス等燃焼、海塩、石炭燃焼）が推定された。抽出できた因子からは、総社測定局では、因子1の寄与濃度（総社 $7.6\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、長津 $6.6\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）がPM2.5質量濃度（総社 $21.0\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、長津 $25.5\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）の1/3近くを占めて長津測定局よりも高くなった。長津測定局では道路交通等因子が最も寄与した結果になった（因子4:総社 $1.7\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、長津 $6.8\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）。どちらの地点でもバイオマス等燃焼因子が主要な因子の一つになった（因子6:総社 $5.8\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、長津 $5.0\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）。

表2-1 Bootsrpの結果 (因子)

Base Bootstrap	因子1	因子2	因子3	因子4	因子5	因子6	因子7	因子8	Unmapped
因子1	100	0	0	0	0	0	0	0	0
因子2	0	100	0	0	0	0	0	0	0
因子3	0	0	100	0	0	0	0	0	0
因子4	0	0	0	95	0	5	0	0	0
因子5	0	0	0	0	100	0	0	0	0
因子6	0	0	0	0	0	100	0	0	0
因子7	0	0	0	0	0	1	98	1	0
因子8	0	0	0	0	0	0	0	100	0

表2-2 Bootsrpの結果 (因子内の成分)

成分	因子1	因子2	因子3	因子4	因子5	因子6	因子7	因子8
OC	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
EC	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Mn	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Cr	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
Ni	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
As	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Al	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Fe	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes
Zn	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Cu	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
V	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
Pb	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Na ⁺	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
NH ₄ ⁺	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
K ⁺	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Mg ²⁺	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Ca ²⁺	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Cl ⁻	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
NO ₃ ⁻	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
SO ₄ ²⁻	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
PM2.5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

*Base因子の各成分がBootstrap因子プロファイルの成分濃度分布の四分位範囲に入っているものはYes, 入っていないものはNoで示した

*発生源推定の指標となる成分は太字・網掛けで示した

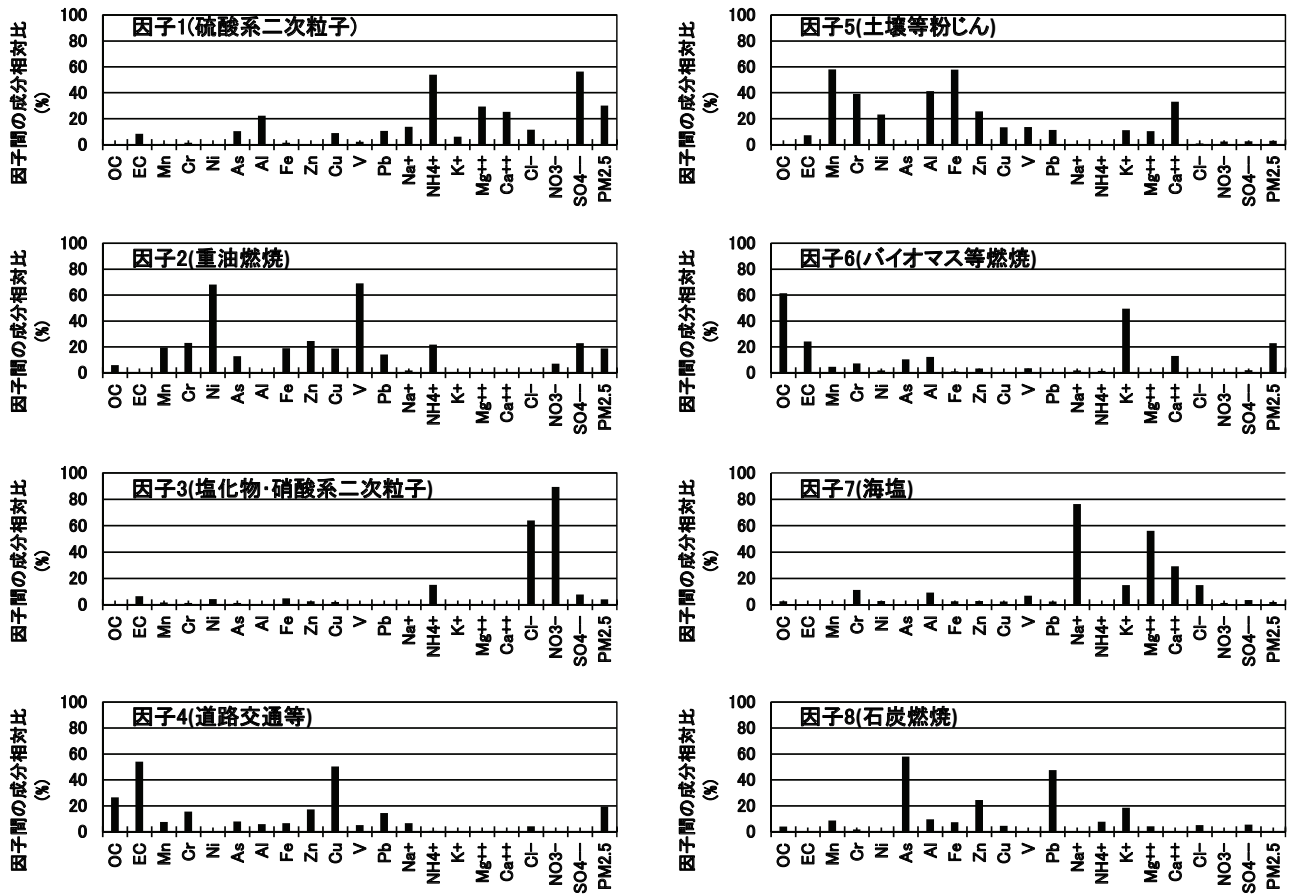


図3 抽出された因子間の成分相対比

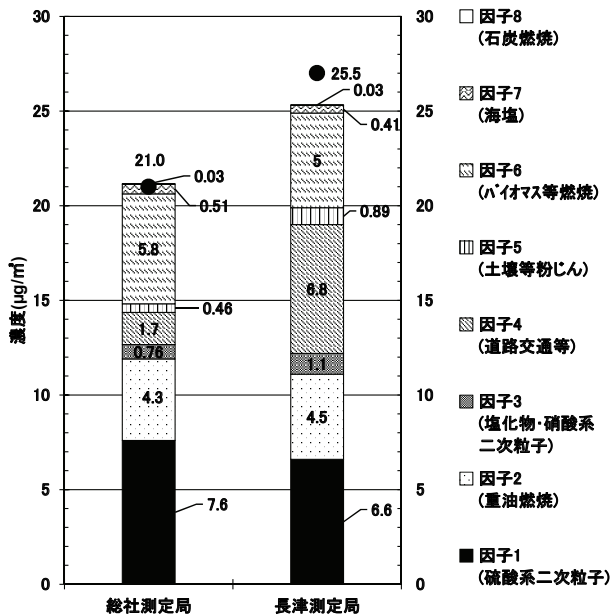


図4 地点別各因子寄与濃度の推定結果

文献

- 1) 喜多真帆, 中野温朗, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋: 自動測定機を用いたPM2.5 とSPM及びその他の物質の相関について, 岡山県環境保健センター年報38, 1-5, 2014
- 2) 中野温朗, 深見武史, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋: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, 岡山県環境保健センター年報37, 1-8, 2013
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 中野温朗, 間野遼太, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋:岡山県下における微小粒子状物質の成分の実態について, 岡山県環境保健センター年報39, 1-9, 2015
- 12) 中野温朗, 間野遼太, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋:岡山県下における微小粒子状物質の成分の実態について (第2報), 岡山県環境保健センター年報39, 11-19, 2015
- 13) U.S.EPA:Positive Matrix Factorization Model for environmental data and analyses (2014) <https://www.epa.gov/air-research/positive-matrix-factorization-model-environmental-data-analyses>
- 14) 微小粒子状物質 (PM2.5) の成分分析ガイドライン平成23年7月 環境省
- 15) 大気中微小粒子状物質成分測定マニュアル無機元素測定法 平成24年4月 環境省
- 16) 飯島明宏:大気モデル-第5講レセプターモデル-, 大気環境学会誌46, A53-A60, 2011
- 17) 大内伸保, 山内正信: PMF法を用いた微小粒子状物質 (PM2.5) の発生源寄与の推定, 愛媛県立衛生環境研究所年報18, 10-17, 2015
- 18) 中坪良平, 竹本智美, 平木隆年:兵庫県におけるPM2.5の発生源解析に関する研究-その1-, 兵庫県環境研究センター紀要7, 1-7, 2016

【資 料】

岡山県における大気浮遊粉じん中のイオン成分について Ion components of atmospheric total suspended particles in Okayama Prefecture

間野遼太, 喜多真帆, 中野温朗, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋 (大気科)

Ryouta Mano, Maho Kita, Atsurou Nakano, Shigeru Nomura,

Tatsuya Nobumori, Hiroshi Takano (Atmosphere Section)

要 旨

平成27年度における大気浮遊粉じん (TSP) 中のイオン成分の測定を行い, 結果をとりまとめた。TSPの年平均濃度は28.7 ~ 42.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であり, 県北の美作県民局 (津山市) が1番低く, 沿道の長津測定局 (早島町) が1番高かった。イオン成分はTSPの27 ~ 36%であった。特に SO_4^{2-} , NH_4^+ , NO_3^- がイオン成分の中でも主要な成分であり, これはPM2.5と同様であった。各月のTSP濃度と自動測定機で測定したPM2.5質量濃度の比 (PM2.5/TSP比) を求めたが, TSPに占めるPM2.5の割合は変動していた。各地点におけるTSP及びイオン成分の相関から, 県内広い範囲で NH_4^+ , K^+ , SO_4^{2-} がTSPの変動に影響していると考えられた。

[キーワード: 浮遊粉じん, イオン成分, 濃度]

[Key words: Total Suspended Particles, Ion Components, Concentration]

1 はじめに

大気中の浮遊粉じん (以下「TSP」という。) は, 呼吸によって気管支や肺に取り込まれ, 喘息や肺がんなどを引き起こすとされている¹⁾。特に, TSPのうち粒径が2.5 μm 以下と非常に小さい微小粒子状物質 (以下「PM2.5」という。) は肺の奥深くまで入りやすく, 呼吸器系への影響に加え, 循環器系への影響も懸念されている。このPM2.5や粒径が10 μm 以下とPM2.5よりも大きな粒子も含む浮遊粒子状物質 (以下「SPM」という。) については, イオン成分が主要な成分の1つであることが分かっている^{2~9)}。しかし, 当県において粒径が10 μm よりも大きな粒子を含むTSP中のイオン成分を測定した事例はなく, TSP中のイオン成分が占める割合などは分かっていない。他県などではTSP中のイオン成分を測定し, イオン成分濃度などの経月変化や経年変化を報告している事例がある^{10~12)}。

当県では有害大気汚染物質環境調査として, 月に1度, 重金属類やベンゾ(a)ピレン測定のためにTSPを採取している。そこで, 平成27年度に有害大気汚染物質環境調査で採取した試料の一部を用いて, TSP中のイオン成分の測定を行い, 結果をとりまとめたので報告する。

2 調査方法

2.1 試料採取方法

TSPはハイボリウムエアサンプラー (紀本電子工業製 MODEL-120BL, MODEL-123SL) を用いて, 石英繊維フィルタ (東京ダイレック製2500QAT-UP) に採取流量1,100L/minで連続24時間採取を行った。

2.2 分析方法

TSP濃度の算出は有害大気汚染物質測定マニュアルに準じて行った¹³⁾。

イオン成分については, まず採取したフィルタの一部を切り取り, 超純水に浸して, 20分間超音波抽出を行った後, 0.45 μm のシリンジフィルタ (ADVANTEC製 13HP045AN) でろ過して分析用試料を作製した。分析にはイオンクロマトグラフ装置 (日本ダイオネクス製 ICS-1600) を用いて, Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} の8種を分析した。

2.3 調査地点

調査地点を図1に示す。調査地点は当県が有害大気汚染物質環境調査を行っている4地点で, 県南西部の笠岡市に位置する茂平測定局 (以下「茂平」という。), 県南部の早島町に位置する長津測定局 (以下「長津」という。), 同じく県南部の玉野市に位置する日比市民センター (以

下「日比」という。), 県北部の津山市に位置する美作県民局(以下「津山」という。)である。有害大気汚染物質環境調査における地点属性は茂平と日比が発生源周辺, 長津が沿道, 津山が一般環境である。また, 茂平と長津は大気汚染物質の常時監視を行っている環境大気測定局である。

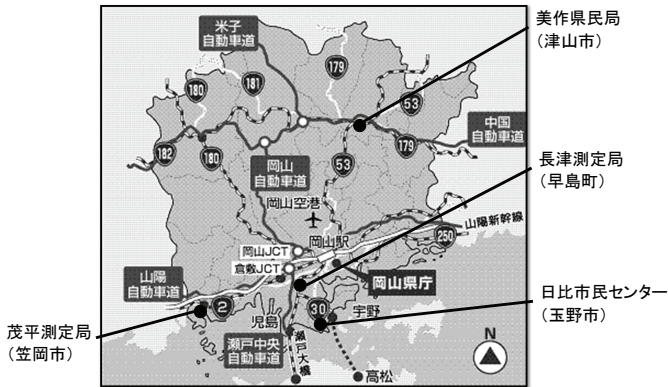


図1 調査地点

2.4 試料採取期間

試料採取期間を表1に示す。津山については6月の試料採取期間が他の3地点と異なり, また8, 9月は調査地点での工事に伴い欠測となっている。

表1 試料採取期間

月	期間
4	H27年4月16日 ~ 17日
5	H27年5月25日 ~ 26日
6	H27年6月15日 ~ 16日 ^{※1}
7	H27年7月6日 ~ 7日
8	H27年8月10日 ~ 11日 ^{※2}
9	H27年9月7日 ~ 8日 ^{※2}
10	H27年10月5日 ~ 6日
11	H27年11月9日 ~ 10日
12	H27年12月7日 ~ 8日
1	H28年1月7日 ~ 8日
2	H28年2月8日 ~ 9日
3	H28年3月7日 ~ 8日

※1 津山のみH27年6月16日~17日

※2 津山は欠測

3 結果及び考察

3.1 年平均

TSP及びイオン成分の年平均濃度を表2に示す。TSPの年平均濃度は28.7 ~ 42.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であり, 県北に位置する津山が1番低く, 沿道の長津が1番高かった。これら2地点には約15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の差があった。イオン成分濃度については NH_4^+ 以外が津山で1番低く, 特に NO_3^- は他地点よりも約1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 低かった。また, K^+ , Ca_2^+ 以外のイオン成分濃度は日比で1番高かった。なお, 津山の濃度が他地点よりも

低いという結果には津山における6月の試料採取期間の違いや8, 9月の欠測が影響している可能性が考えられたため, 全地点6, 8, 9月を除いた結果でも比較したところ, 津山のTSP及び全イオン成分濃度は他地点よりも低く, ほとんど同様の結果であった。

次に, 同一地点でのイオン成分濃度を比較すると, 4地点とも上位3成分は NH_4^+ , NO_3^- , SO_4^{2-} であった。津山以外の3地点は濃度が高い順に SO_4^{2-} , NO_3^- , NH_4^+ であったが, 津山は SO_4^{2-} , NH_4^+ , NO_3^- であり, 他の3地点と異なり NO_3^- より NH_4^+ の方が高かった。なお, 全地点6, 8, 9月を除いた結果でも比較したが, 同様の濃度順であった。よって, 津山で NO_3^- より NH_4^+ の方が高くなっていたことは地域的な要因による可能性が考えられた。

TSP中のイオン成分構成割合を表3に示す。イオン成分はTSPの27 ~ 36%であった。地点間で比較すると, 長津が1番低く, 日比が1番高かった。日比ではTSPへのイオン成分の寄与が大きいことが分かった。一方, 長津が1番低かった理由としては, 長津は幹線道路沿いであり, ディーゼル車などから発生する炭素成分の割合が他地点よりも高いことなどが推測された^{2, 14)}。

表2 TSP及びイオン成分の年平均濃度

	TSP ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	イオン成分($\mu\text{g}/\text{m}^3$)							
		Na^+	NH_4^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	NO_3^-	SO_4^{2-}
茂平	36.8	0.55	1.6	0.23	0.12	0.81	0.52	2.3	4.6
長津	42.4	0.55	1.8	0.23	0.11	0.73	0.58	2.4	5.0
日比	34.1	0.73	2.0	0.21	0.13	0.53	0.59	2.6	5.5
津山 [※]	28.7	0.34	1.7	0.20	0.059	0.30	0.38	1.4	4.2

※ 欠測があるため, 10ヶ月分の平均値

表3 TSP中のイオン成分構成割合

	TSP中の イオン成分 (%)	イオン成分(%)							
		Na^+	NH_4^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	NO_3^-	SO_4^{2-}
茂平	29	1.5	4.3	0.62	0.33	2.2	1.4	6.1	13
長津	27	1.3	4.3	0.54	0.27	1.7	1.4	5.7	12
日比	36	2.1	5.8	0.60	0.37	1.6	1.7	7.7	16
津山	30	1.2	6.1	0.70	0.21	1.1	1.3	4.8	15

イオン成分中の構成割合を図2に示す。イオン成分中の構成割合は SO_4^{2-} が40 ~ 50%, NH_4^+ が15 ~ 20%, NO_3^- が16 ~ 21%程度であり, 他のイオン成分は10%未満であった。

地点間で比較すると, 津山で NH_4^+ と SO_4^{2-} がやや高く, NO_3^- が低かった。なお, 全地点6, 8, 9月を除いた結果でも比較したが, この結果に変わりはない。また, 構成割合は10%未満であるが, Ca_2^+ の割合が茂平と長津で他の2地点よりも高かった。

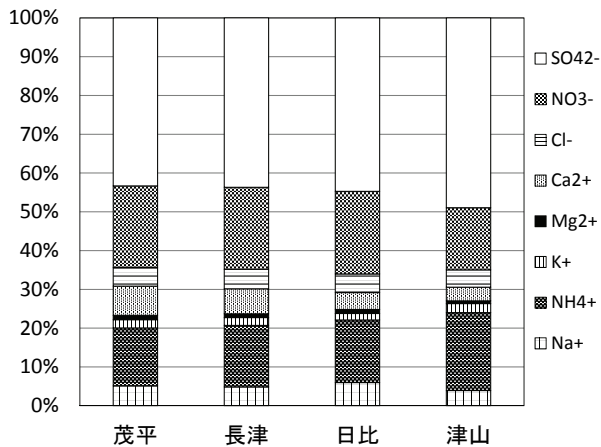


図2 イオン成分中の構成割合 (%)

これらの結果を試料採取日や調査地点は一部異なるものの、H25～H27年度の岡山県下におけるPM2.5構成成分をまとめた既報⁹⁾をもとにPM2.5のイオン成分分析結果と比較した。

PM2.5におけるイオン成分の構成割合は30～50%であり、本調査におけるTSP (27～36%)の方がわずかに低かった。PM2.5のイオン成分についても主な成分はTSP

同様に NH_4^+ 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} であり、濃度が高い順に SO_4^{2-} 、 NH_4^+ 、 NO_3^- と本調査における津山のTSPと同様であった。津山以外のTSPはPM2.5と異なり、 NH_4^+ よりも NO_3^- の方が高濃度であった。このことから、PM2.5よりも粒径が大きい浮遊粉じんには NO_3^- が多く含まれている可能性が考えられた。

PM2.5におけるイオン成分中の構成割合は SO_4^{2-} が50～60%、 NH_4^+ が20～25%、 NO_3^- が10～20%程度であり、本調査におけるTSPに比べ、 SO_4^{2-} 、 NH_4^+ はやや高く、 NO_3^- は同程度であり、これら3成分以外のイオン成分が占める割合はPM2.5よりもTSPの方が高かった。

また、PM2.5については県南の地点で NO_3^- の割合が高く、県北の地点では SO_4^{2-} の割合が高くなる傾向がみられたが、これは本調査におけるTSPでも同様の傾向がみられた。

3.2 各月の結果

各月におけるTSPとイオン成分の濃度を図3に示す。また、茂平と長津については調査地点が環境大気測定局であり、測定局内にPM2.5自動測定機(東亜DKK製FRM-

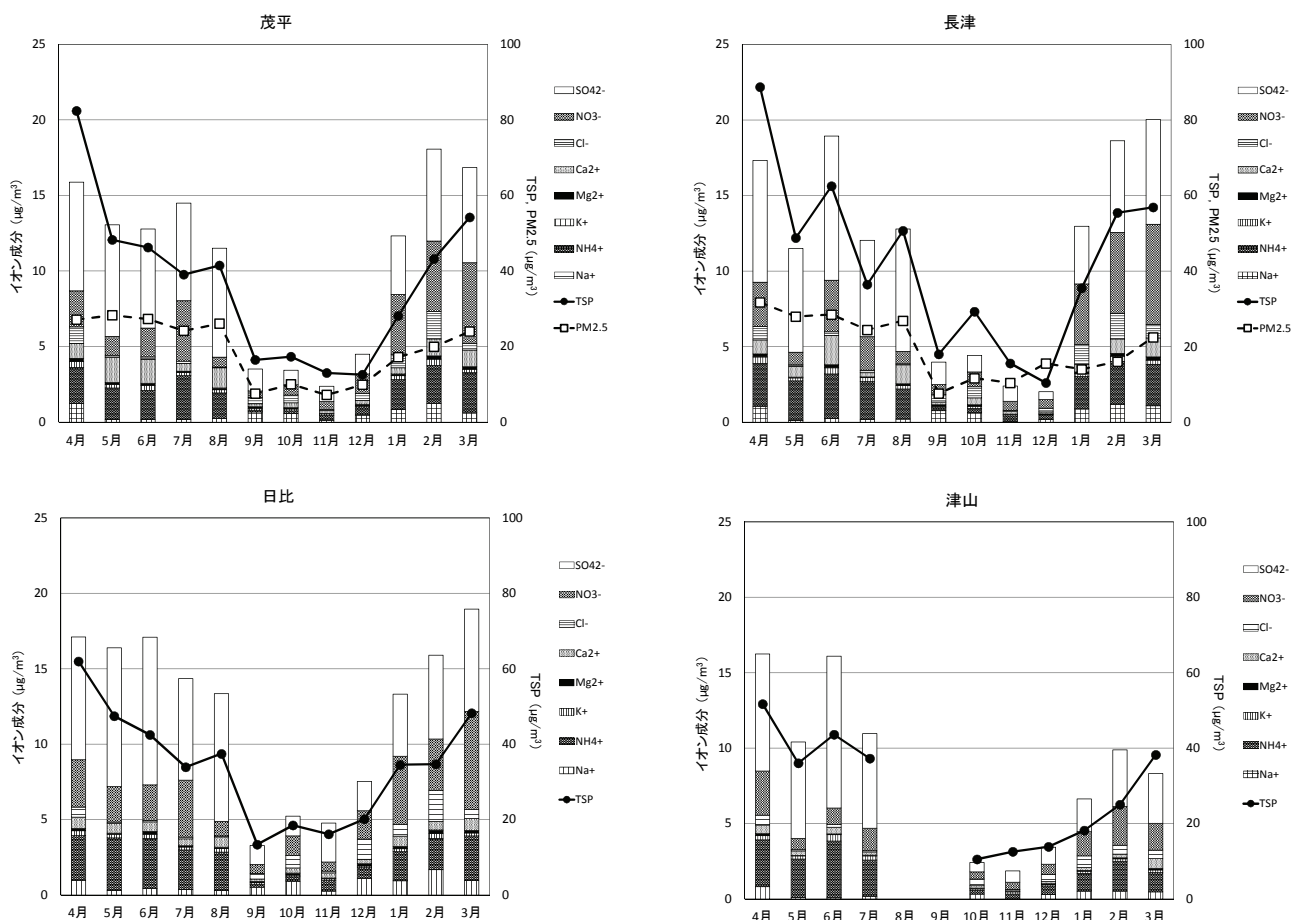


図3 各月におけるTSP及びイオン成分の濃度 (茂平、長津はPM2.5も含む)

377) が設置されている。そこで、本調査での試料採取期間1日目の午前11時から翌日午前10時までの1時間値の平均をPM2.5質量濃度として合わせて図示した。

なお、本調査結果は各月24時間のみの調査によることから、月の代表的な結果を示しているとは限らないことに留意が必要である。また、24でも述べたとおり、6月の津山は他地点と試料採取期間が異なることにも留意が必要である。

4地点ともTSPとイオン成分は類似した変動を示していた。各月で比較すると、4地点とも4月のTSP濃度が1番高かった。4月には試料採取期間中（平成29年4月17日）に岡山地方気象台で黄砂が観測されており^{15, 16)}、黄砂による広域的な影響によるものと考えられた。黄砂に伴い高くなると考えられるCa²⁺濃度^{1, 3)}は他の月に比べて顕著に高いわけではなかったが、年平均濃度より1.2～1.9倍程度高かった。一方、イオン成分濃度は茂平で2月が、長津と日比で3月が、津山で4月が1番高く、地点ごとに異なり、各地点における局地的な発生源や気象状況が影響していると考えられた。

また、津山以外の3地点で9～12月に、津山では9月欠測のため10～12月にTSP及びイオン成分濃度が低かった。これには試料採取期間中の降水が影響している可能性が考えられた。そこで、調査地点近傍の気象観測所における試料採取期間中の降水の有無を調べた¹⁷⁾。降水が観測されたのは、茂平と玉野で7, 11月、長津で4, 7, 11, 2月、津山で4, 5, 11, 2月であり、TSP及びイオン成分濃度が低かった9～12月のうち降水が観測されたのは11月のみであった。よって、9, 10, 12月のTSP及びイオン成分濃度が低かったことに降水は関係していなかった。季節的な要因によって秋ごろに濃度が低くなる可能性も考えられたが、今回は各月24時間のみの調査であり、要因の特定にはデータの拡充やより詳細な解析が必要と考えられた。

地点間で比較すると、津山のTSP及びイオン成分濃度はほとんどの月で他地点よりも低く、特に1～3月のイオン成分濃度は他の月よりも他地点との差が大きかった。このことから、3.1で述べたとおり津山のTSPやNH₄⁺以外のイオン成分の年平均濃度が他地点に比べて低いという結果に8, 9月の欠測は影響していないことが分かった。TSP及びイオン成分濃度が津山で低かった要因としては、津山の地点属性は4地点の中で唯一の一般環境であり、発生源や自動車の影響が他地点よりも少なかったことが考えられた。また、4地点の中で海から最も離れており、Na⁺やCl⁻などの海塩由来のイオン成分濃度が他地点

より低かったことも影響していると考えられた。

茂平と長津についてはPM2.5質量濃度も示しているが、12月の長津ではTSPよりもPM2.5濃度が高くなるという逆転現象が起きていた。SPMとPM2.5の逆転現象については過去の当センター年報⁵⁾に記載があり、PM2.5自動測定機は実流量によって濃度が求められる一方、SPM自動測定機は20℃、1気圧に換算した標準流量から濃度が求められ、気温が20℃以下の場合にはSPM濃度が実流量で求める場合に比べて低くなるのが逆転現象の原因の1つと考えられている。本調査におけるTSP濃度も標準流量から求めていることから、このことが逆転現象に影響したと考えられた。

地点ごとのTSPとPM2.5をみると、2地点ともTSPとPM2.5はおおむね類似した変動をしていた。また、PM2.5濃度をTSP濃度で除した値（以下「PM2.5/TSP比」という。）を求めると、PM2.5/TSP比の年平均値は2地点とも0.5程度であった。しかし、各月のPM2.5/TSP比については、茂平が0.33～0.78、長津が0.29～1.5（逆転現象が生じた12月を除くと0.29～0.67）であり、TSPに占めるPM2.5の割合は変動していた。過去の当センター年報¹⁸⁾でPM2.5濃度をSPM濃度で除した値（以下「PM2.5/SPM比」という。）についても同様の考察が行われており、SPM濃度が20μg/m³以下の低濃度域ではPM2.5/SPM比は大きく変動し不明確であるが、45μg/m³を超えるとPM2.5/SPM比が収束することが分かっている。TSPとPM2.5についても同様の傾向にある可能性が考えられた。

3.3 相関

表4にTSP及びイオン成分間の相関係数を示す。4地点全てで非常に相関が強い（相関係数が0.8以上）組合せとなったのが、TSP-SO₄²⁻、Na⁺-Cl⁻、NH₄⁺-SO₄²⁻であった。県内広い範囲でSO₄²⁻がTSPの濃度変化に影響を及ぼしていると考えられた。Na⁺とCl⁻で非常に強い相関がみられたが、これはNa⁺、Cl⁻ともに海塩由来であるためと考えられた。NH₄⁺とSO₄²⁻も非常に強い相関を示し、これらは硫酸アンモニウムとして存在している可能性が考えられた^{1, 3)}。

茂平以外の3地点ではTSP-NH₄⁺、TSP-K⁺でも非常に強い相関がみられ、茂平でもこれらの相関係数はともに0.78と高く、NH₄⁺とK⁺も県内の広い範囲でTSPの濃度変化に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

また、津山以外の3地点ではNO₃⁻と非常に強い相関を示す項目はなかったが、津山ではNa⁺とMg²⁺がNO₃⁻と非常に強い相関を示すといった違いがあった。

表4 TSP及びイオン成分間の相関係数

茂平

	TSP	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
TSP	-								
Na ⁺	0.38	-							
NH ₄ ⁺	0.78	0.22	-						
K ⁺	0.78	0.56	0.74	-					
Mg ²⁺	0.83	0.75	0.67	0.87	-				
Ca ²⁺	0.70	-0.06	0.62	0.64	0.58	-			
Cl ⁻	0.27	0.93	0.27	0.62	0.69	-0.02	-		
NO ₃ ⁻	0.43	0.45	0.79	0.55	0.56	0.19	0.51	-	
SO ₄ ²⁻	0.86	0.07	0.89	0.73	0.68	0.86	0.08	0.46	-

■ : 0.8以上

日比

	TSP	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
TSP	-								
Na ⁺	0.08	-							
NH ₄ ⁺	0.90	-0.14	-						
K ⁺	0.81	0.25	0.80	-					
Mg ²⁺	0.37	0.83	0.26	0.59	-				
Ca ²⁺	0.90	0.12	0.86	0.74	0.43	-			
Cl ⁻	-0.10	0.96	-0.26	0.17	0.73	-0.06	-		
NO ₃ ⁻	0.58	0.42	0.54	0.34	0.56	0.67	0.23	-	
SO ₄ ²⁻	0.86	-0.24	0.97	0.83	0.18	0.79	-0.34	0.34	-

■ : 0.8以上

長津

	TSP	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
TSP	-								
Na ⁺	0.44	-							
NH ₄ ⁺	0.84	0.28	-						
K ⁺	0.94	0.41	0.85	-					
Mg ²⁺	0.79	0.71	0.63	0.81	-				
Ca ²⁺	0.75	0.16	0.70	0.76	0.78	-			
Cl ⁻	0.31	0.90	0.29	0.34	0.56	0.10	-		
NO ₃ ⁻	0.54	0.71	0.67	0.61	0.77	0.51	0.72	-	
SO ₄ ²⁻	0.87	0.11	0.92	0.86	0.64	0.83	0.03	0.47	-

■ : 0.8以上

津山

	TSP	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
TSP	-								
Na ⁺	0.27	-							
NH ₄ ⁺	0.89	0.09	-						
K ⁺	0.82	-0.16	0.90	-					
Mg ²⁺	0.62	0.88	0.38	0.22	-				
Ca ²⁺	0.80	0.47	0.53	0.51	0.71	-			
Cl ⁻	-0.04	0.89	-0.14	-0.36	0.64	0.28	-		
NO ₃ ⁻	0.59	0.82	0.49	0.25	0.83	0.58	0.59	-	
SO ₄ ²⁻	0.90	0.01	0.99	0.94	0.35	0.54	-0.23	0.39	-

■ : 0.8以上

地点間で相関がみられる組合せにはやや違いがみられたものの、本調査ではデータ数が12（津山は10）と少なく、より詳細な検討を行うためにはデータの拡充が必要であると考えられた。

4 まとめ

・TSPの年平均濃度は28.7～42.4μg/m³であり、県北の津山が1番低く、沿道の長津が1番高かった。津山が低かった理由としては、発生源や自動車、海塩などの影響が他地点よりも少なかったことが考えられた。

・イオン成分のうち年平均濃度を比較すると、4地点とも上位3成分はNH₄⁺、NO₃⁻、SO₄²⁻であり、津山以外の3地点は濃度が高い順にSO₄²⁻、NO₃⁻、NH₄⁺であったが、津山はSO₄²⁻、NH₄⁺、NO₃⁻であり、他の3地点と異なりNO₃⁻よりNH₄⁺の方が高かった。

・イオン成分はTSPの27～36%であり、地点間で比較すると、長津が1番低く、日比が1番高かった。長津が1番低かった理由としては、幹線道路沿いでディーゼル車などから発生する炭素成分の割合が他地点よりも高いことなどが推測された。

・イオン成分中の構成割合から、SO₄²⁻、NH₄⁺、NO₃⁻がイオン成分の中でも主要な成分であり、これはPM2.5と同様であった。

・4地点とも4月のTSP濃度が最も高く、黄砂の影響が考えられた。

・各月のPM2.5/TSP比は茂平で0.33～0.78、長津で0.29～1.5（逆転現象が生じた12月を除くと0.29～0.67）となっており、TSPに占めるPM2.5の割合は大きく変動していた。

・各地点におけるTSP及びイオン成分の相関から、県内ではNH₄⁺、K⁺、SO₄²⁻がTSPの変動に影響していると考えられた。

・津山以外の3地点ではNO₃⁻と非常に強い相関を示す項目はなかったが、津山ではNa⁺とMg²⁺がNO₃⁻と非常に強い相関を示した。

文 献

- 1) 太田幸雄：大気化学（季刊 化学総説）大気エアロゾル，日本化学会編，10，123-145，1990
- 2) 環境省：大気汚染状況について
http://www.env.go.jp/air/osen/index.html
- 3) 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
- 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) 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
- 7) 中野温朗, 間野遼太, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋: 岡山県下における微小粒子状物質の成分の実態について, 岡山県環境保健センター年報, 39, 1-9, 2015
- 8) 中野温朗, 間野遼太, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋: 岡山県下における微小粒子状物質の成分の実態について（第2報）, 岡山県環境保健センター年報, 39, 11-19, 2015
- 9) 中野温朗, 間野遼太, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋: 岡山県下における微小粒子状物質の成分の実態について（第3報）, 岡山県環境保健センター年報, 40, 1-12, 2016
- 10) 内藤季和: 千葉県の浮遊粉じんの成分組成についての考察, 千葉県環境研究センター年報, 4, 160-167, 2006
- 11) 宮崎竹二, 船坂耕弘, 寺南芳一, 神浦俊一: 大阪市における浮遊粉塵および水溶性イオン成分濃度の挙動, 生活衛生, 54 (1), 33-40, 2010
- 12) 浅野比, 長谷川貴司, 白石幸英: 山口県山陽小野田市における大気中粒子状物質の主要無機イオン成分分析, 分析化学, 64 (10), 775-782, 2015
- 13) 環境省水・大気環境局大気環境課: 有害大気汚染物質測定マニュアル, 平成23年3月
- 14) 微小粒子状物質（PM2.5）の成分分析ガイドライン, 平成23年7月, 環境省
- 15) 気象庁: 黄砂観測日および観測地点の表と観測地点の図 http://www.data.jma.go.jp/gmd/env/kosahp/kosa_data_index.html
- 16) 環境省: 黄砂実態解明調査報告書（平成27年度）（平成29年3月） <http://www.env.go.jp/air/dss/torikumi/chosa/rep7.html>
- 17) 気象庁: 各種データ・資料 <http://www.jma.go.jp/jma/menu/menureport.html>
- 18) 喜多真帆, 中野温朗, 野村 茂, 信森達也, 鷹野 洋: 自動測定機を用いたPM2.5 とSPM及びその他の物質の相関について, 岡山県環境保健センター年報, 38, 1-5, 2014

【調査研究】

事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究
－ 公共用水域における魚への死時の農薬一斉分析法の検討 －

Study on the development of analysis method of chemical substances at the time
of water quality accidents

－ Study of simultaneous analysis method of pesticide residue at fish's death in public water areas －

吉岡敏行, 浦山豊弘, 山本浩司, 肥塚加奈江*, 難波順子* (水質科)

*衛生化学科

Toshiyuki Yoshioka, Toyohiro Urayama, Koji Yamamoto, Kanae Koeduka*, Junko Namba*
(Water Section),

*Food and Drug Chemical Research Section

要 旨

公共用水域において魚のへい死事象が発生した際の水質及び魚体中の残留農薬のGC/MS一斉分析法を検討した。農薬類354成分の添加回収試験を行ったところ、水質では溶媒抽出法で326成分、固相抽出法で306成分が良好な回収率であった。魚のエラでは、アセトン:ヘキサン抽出法で236成分、ジクロロメタン-ヘキサン抽出法で246成分が良好な回収率であった。

[キーワード: 公共用水域, 魚のへい死, エラ, 残留農薬, GC/MS]

[Key words: Public water areas, Fish's death, Gill, Pesticide residue, GC/MS]

1 はじめに

岡山県では、公共用水域において水質汚濁事象が発生した際に、その原因究明のための各種迅速分析法を検討し、確立してきた。特に、発生事例の多い油の流出や魚のへい死、白濁現象については、油種分析法^{1,2)}、残留農薬分析法³⁻⁶⁾、石灰硫黄合剤⁷⁾等の分析法を開発し、原因究明に役立てている。そのうち、残留農薬分析法については、現在までに、水質中の160成分について検体が搬入された翌日には分析結果が報告できる態勢を構築している。今回、分析可能な農薬成分数を増やすこと及び媒体として水質だけでなく、へい死した魚体中からの残留農薬の迅速分析法について検討したので報告する。

2 材料及び方法

2.1 材料

添加回収試験に使用する水は、当センター周辺の用水路で採水した。

添加回収試験に使用する魚は、金魚とボラを使用した。魚のエラの部分を切り取り、ホモジナイズし、試験を実施するまでは冷凍保存し、使用前に解凍した。

また、市販魚の実態調査として、11魚種(マアナゴ、ゲタ科、カレイ科、ヒラメ、ボラ科、サッパ、マダイ、

マアジ、ブリ、コイ) 23検体のエラを切り取り、ホモジナイズし、分析材料とした。

簡易な暴露試験には、購入した金魚(3cm程度)を約2週間、実験室で順化したもの及び実験室内で継代飼育したグッピーの成魚を使用した。

2.2 標準品及びカートリッジカラム

農薬標準液: PL2005農薬GC/MS Mix I ~ VII (林純薬工業: 354成分, 異性体及び代謝物を含む)

内標準液: ナフタレン-d₈, アセナフテン-d₁₀, フェナントレン-d₁₀, フルオランテン-d₁₀, クリセン-d₁₂, ベンゾ(e)ピレン-d₁₂ (Cambridge Isotope Laboratories製)

ENVI-Carb/LC-NH₂: 500mg:500mg/6mL (SUPELCO製)

Multi Sep PR: (Romer Labs製)

Sep-Pak Plus PS-2: (Waters製)

Inert Sep Slim J Dry (2.8g): (ジーエルサイエンス製)

GF/C: (Whatman製)

ジクロロメタン, アセトン, ヘキサン, アセトニトリル, トルエン: 残留農薬・PCB試験用5000倍濃縮溶媒 (和光純薬製)

2.3 装置

GC/MS : JMS-Q1000GC Mk II

GCカラム : Agilent DB-5MS+DG 30m 0.25mm × 0.25 μm

GC/MSの測定条件等は、既報⁸⁾のとおりである。

2.4 前処理方法

2.4.1 水質の前処理方法

図1に水質分析フローを示す。水質は、溶媒抽出と固相抽出を比較検討した。溶媒抽出は、試料1Lをジクロロメタン100mL、50mLで計2回抽出し、抽出液をあわせて後、ヘキサン20mLを加えて脱水した。抽出液はロータリーエバポレーターを用いて35℃以下で濃縮し、1mLに定容した後、内標準液を各0.1 μg添加した。固相抽出は、次のとおり実施した。はじめに、試料0.1Lをろ紙 (GF/C) でろ過し、ろ紙にアセトン2mLを加え、5分間超音波照射し、溶出した。アセトン溶出液は、ろ液にあわせた。ろ液はあらかじめ活性化したSep-Pak Plus PS-2に10mL/分の流速で通水した。通水終了後、PS-2を精製水10mLで洗浄し、2,500rpmで5分間遠心脱水した。PS-2の下側にInert Sep Slim J Dryを取り付け、ジクロロメタン8mLで溶出した。溶出液は窒素ガスで濃縮し、ヘキサンに転溶して0.5mLに定容し、内標準液を各0.05 μg添加した。

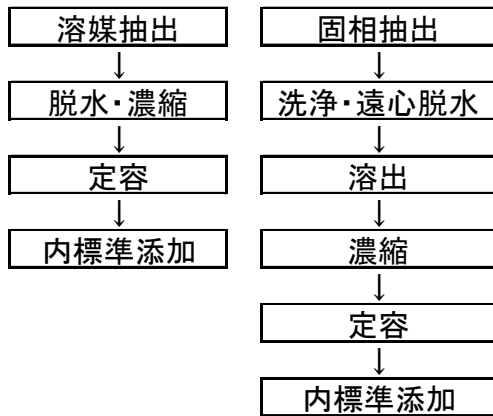


図1 水質分析フロー

2.4.2 魚の前処理方法

図2に魚の分析フローを示す。魚の分析は、既報⁶⁾の前処理方法を参考に、試料2gに水を20mL添加し、ジクロロメタン20mL (又はアセトン:ヘキサン=1:2 20mL) で振とう抽出を10分間実施した後、超音波抽出を10分間実施した。遠心分離を行い、ジクロロメタン層 (又はヘキサン層) をビーカーに移した。試料を含む水層はヘキサ

ン10mLで再度、振とう抽出を10分間実施した後、超音波抽出を10分間実施した。抽出液をあわせて脱水後、濃縮し、ヘキサンに転溶した。次に、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂後、アセトニトリル層を濃縮した。濃縮液をMulti Sep PRとENVI-Carb/LC-NH₂を連結したカラムに負荷し、アセトニトリル15mLで溶出した。上側のMulti Sep PRを外し、ENVI-Carb/LC-NH₂からトルエン:アセトニトリル (1:3) 25mLで溶出して、アセトニトリル15mLとあわせた。溶出液を濃縮し、ヘキサンに転溶・濃縮後、内標準液を0.1 μg添加して1mLに定容した。

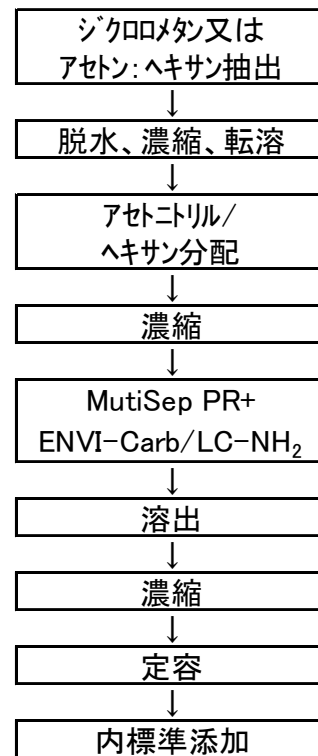


図2 魚分析フロー

2.5 魚の簡易暴露試験

暴露試験は、取扱が容易なことや小規模な実験であることから小型の金魚とグッピーを選定した。高濃度暴露試験では金魚を使用し、低濃度暴露試験では雌雄による取込量の違いがあるかどうか確認するために、グッピーの雌雄一対を使用した。

最初に、高濃度暴露試験として、1Lビーカーに脱塩素水道水1Lと農薬354成分各1 μgを添加した試験溶液を4個作成し、各ビーカーに金魚1尾を入れた。水質の農薬分析は、1, 3, 24時間後に実施した。金魚は、へい死した個体を1, 3, 24時間後に試験溶液から取り出し、農薬分析を実施した。

次に、低濃度暴露試験として、1Lビーカーに脱塩素水

水道水1Lと農薬354成分各0.1 μg 及び0.01 μg を添加したものを作成し、各ビーカーにグッピー2尾（雄1尾、雌1尾）を入れ、10日間の短期暴露試験を実施した。試験溶液は止水式で無曝気、エサは1日1回食べきる量だけ与え、試験溶液は1日1回交換した。試験終了後、0.1 μg /L濃度区のグッピー（雄、雌）の魚体を個別に農薬分析を実施した。なお、試験溶液には助剤は添加しなかった。

2.6 市販魚のエラの農薬分析

図2の魚の分析フローにしたがって魚のエラ2gの農薬分析を実施した。

3 検討結果及び考察

3.1 添加回収試験結果

水質は、農薬354成分の添加回収試験（溶媒抽出：各1 μg /L、固相抽出：各2 μg /L）を実施した。溶媒抽出の場合、回収率が良好（60～140%）な農薬は、326成分であった。固相抽出の場合、回収率が良好な農薬は300成分であった。溶媒抽出で回収率が60%未満であった農薬は、フルシラゾールやピフェナーゼ、ジタリムホス、ホルベット等8成分であった。固相抽出で回収率が60%未満であった農薬は、シフルトリンやフルシトリネート、フェンバレート、シベルメトリン等31成分であった。迅速な前処理が可能な点や回収率が良好な農薬数が多い点から判断すると、緊急時の分析法としては、ジクロロメタンを用いた溶媒抽出が適していると考えられた。

魚のエラは、農薬354成分の添加回収試験（各0.5 μg /g-wet）を実施した。金魚のエラへの添加回収試験（アセトン：ヘキサン抽出）の結果、回収率が良好な農薬は236成分であった。ボラのエラへの添加回収試験（ジクロロメタン抽出）の結果、回収率が良好な農薬は246成分であった。抽出溶媒による差は小さかった。緊急時の分析法としては、アセトン：ヘキサン抽出が適していると考えられた。

3.2 魚への簡易暴露試験結果

金魚への高濃度暴露試験の結果、1～3時間後に金魚はすべて死亡した。図3に試験期間中の代表的な農薬の経時的な濃度変化を示す。シノンエチル（除草剤）やトリフルラリン（除草剤）は、水質濃度が直線的に減少し、24時間後に当初濃度の60%未満となった。同様の傾向を示した農薬は、94成分あった。これらの農薬は分解や吸着に伴い濃度が減衰したものと推察された。一方、メチルパラチオン（殺虫剤）やエンドスルファンサルフェート

（殺虫剤エンドスルファンの代謝物）は、24時間後も水質濃度がほとんど変化しなかった。このような傾向を示す農薬は、197成分あった。これらの農薬は、24時間程度ではほとんど分解や吸着が生じないと考えられた。

試験開始24時間後の金魚からは、農薬37成分が検出された。検出量は0.010～0.25 μg /1尾であった。試験溶液から金魚への検出された農薬の移行率は、1～25%であった。図4に魚から検出された代表的な農薬の経時的な濃度変化を示す。今回の設定濃度1 μg /Lでは、3時間以内には魚への取り込みや吸着は10%未満であったが、24時間後には10%を超過していた農薬があったことから、へい死後も魚への吸着が生じていたことが判明した。

グッピーへの低濃度暴露試験では、試験期間中、0.01 μg /L濃度区のグッピーはエサをよく食べたが、0.1 μg /L濃度区のグッピーはエサをほとんど食べなかった。いずれの濃度区のグッピーも10日後まで生存していた。0.1 μg /L濃度区のグッピーの農薬を分析したところ、検出された農薬は、クロルベンシド（除草剤）、ペルタン（殺虫剤）、メトキシクロール（殺虫剤）等15成分で、検出量は0.005～0.21 μg /1尾であった。最も濃度が高かったのは、エンドスルファンサルフェートであり、水中濃度に対する魚体中濃度の比は、2,100であった。なお、農薬標準溶液には α -エンドスルファンと β -エンドスルファンも入っているため、エンドスルファンサルフェート濃度は魚が代謝

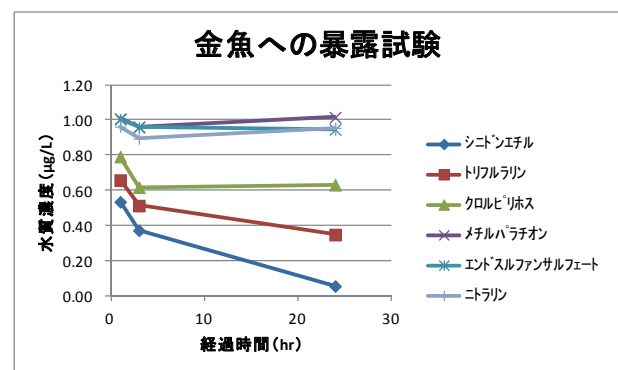


図3 代表的な農薬の濃度変化（水質）

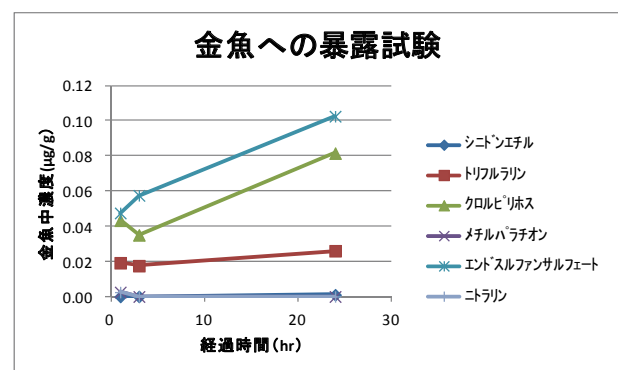


図4 代表的な農薬の濃度変化（魚）

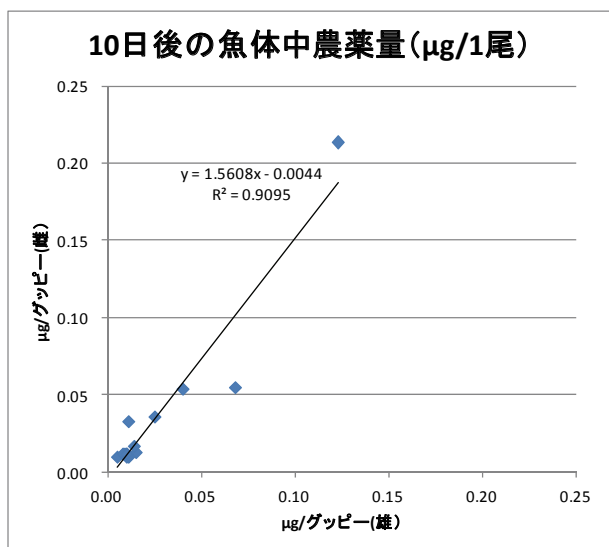


図5 雌雄の違いによる農薬検出量

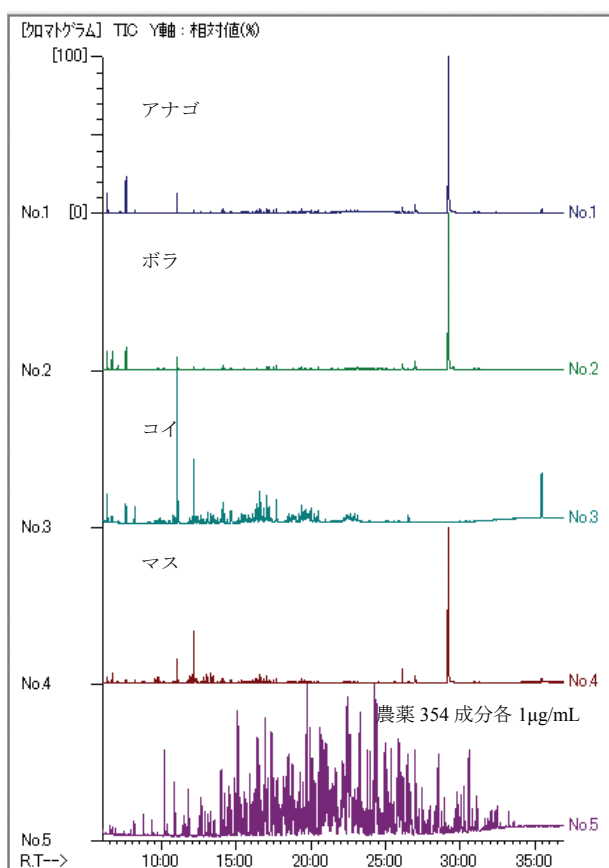


図6 代表的な魚のクロマトグラム

したものが合算されている可能性があった。魚がへい死しない低濃度の暴露試験の場合、魚が取り込む成分数は少なくなっているが、この原因は、今回の簡易暴露試験は、流水式でなくバッチ式であることが影響していると考えられた。試験溶液の交換は、1日1回だけであり、特に、水に溶けにくい農薬成分は魚が取り込む前にガラス壁に吸着し、魚へ暴露されにくかったと推測された。図5に検

出された15成分のグッピーの雌雄の違いによる検出量を示した。体が大きい雌は、体の小さい雄に比べて検出量が約1.5倍程度大きい傾向があり、検出量は体重に比例しているものと考えられた。

3.3 市販魚のエラの農薬分析結果

市販魚の実態調査として、11魚種23検体の農薬を分析した。図6にクロマトグラムの一例を示す。いずれの農薬も検出されなかった。今回実態調査に供した市販魚からは農薬が検出されなかったことから、一般に食用に供されている魚体からは農薬はほぼ検出されないと推測された。

4 まとめ

水質及び魚のエラ中の農薬一斉分析法を検討した。水質では、従来の160成分からおよそ倍程度の326成分の一斉分析が可能であった。魚のエラでは、246成分の一斉分析が可能であった。魚の簡易濃縮試験の結果、魚へ取り込まれた農薬成分が明らかになった。今後は、公共用水域において、魚のへい死事象が発生した場合には、水質及び魚体中の農薬分析を実施し、分析データの蓄積を行い、魚のへい死原因の究明に役立てる予定である。

文 献

- 1) 藤原博一, 吉岡敏行, 剣持堅志, 中桐基晴, 浦山豊弘: 環境中微量有害化学物質の分析, 検索技術の開発に関する研究—油分析に影響する各種要因について—, 岡山県環境保健センター年報, 32, 67-74, 2008
- 2) 吉岡敏行, 山辺真一, 大月史彦, 新 和夫: 有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究—GC/MSを用いた水質中脂肪酸メチルエステル (FAME) 等の多成分分析法の検討—, 岡山県環境保健センター年報 37, 29-40, 2013
- 3) 吉岡敏行, 西島倫子, 山辺真一, 林義隆, 今中雅章ら: 河川における魚の死亡原因物質の特定について, 岡山県環境保健センター年報, 26, 26-28, 2002
- 4) 浦山豊弘, 剣持堅志, 藤原博一, 杉山広和, 鷹野洋: 環境中微量有害化学物質の分析, 検索技術の開発に関する研究—GC/MSによる農薬の多成分同時分析法の開発—, 岡山県環境保健センター年報, 29, 55-66, 2005
- 5) 吉岡敏行, 剣持堅志, 藤原博一, 中桐基晴, 前田大輔ら: 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—岡山県の河川における農薬

類の環境実態調査一，岡山県環境保健センター年報
33, 65-72, 2009

- 6) 吉岡敏行, 難波順子, 浅田幸男, 赤木正章, 北村雅美:
食品と医薬品等に含まれる有害化学物質等の分析技
術の開発に関する研究一水産物及び穀類等の残留農
薬分析法の検討について一, 岡山県環境保健センター
年報, 40, 77-83, 2016
- 7) 北村雅美, 浦山豊弘, 藤田和男, 斎藤直己: 河川等
の汚濁事象における水質調査一水質の着色事例につ
いて一, 岡山県環境保健センター年報, 30, 25-29,
2006
- 8) 吉岡敏行, 劔持堅志, 藤原博一, 中桐基晴, 浦山豊
弘: 環境中超微量有害化学物質の分析, 検索技術の
開発に関する研究一GC/MSによる底質中の農薬多成
分同時分析法の検討一, 岡山県環境保健センター年
報, 32, 47-57, 2008

[調査研究]

事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究

－ 4-ビニル-1-シクロヘキサンの水質分析法の検討 －

Study on the development of analysis method of chemical substances
at the time of water quality accidents

－ Study of water quality analysis method of 4-vinyl-1-cyclohexene －

山本浩司, 浦山豊弘, 新 和大, 吉岡敏行 (水質科)

Koji Yamamoto, Toyohiro Urayama, Kazuhiro Atarashi, Toshiyuki Yoshioka
(Water Section)

要 旨

難燃剤, 塗料用樹脂などに使用される4-ビニル-1-シクロヘキセンについて, 水質試料の高感度分析法を検討した。ヘッドスペースガスクロマトグラム質量分析計 (以下「HS-GC/MS」という) で分析することにより, 検出下限値が0.047ng/mLの高感度な分析法を開発することができた。河川水及び海水を用いた添加回収試験の回収率は, それぞれ95%, 94%であった。また, 4-ビニル-1-シクロヘキセンの異性体及び揮発性有機化合物 (以下「VOCs」という) 23物質との同時分析の検討も行った。

[キーワード: 4-ビニル-1-シクロヘキセン, 同時分析, 水質, 難燃剤, HS-GC/MS]

[Key words: 4-vinyl-1-cyclohexene, Simultaneous analysis, Water quality, Flame retardant, HS-GC/MS]

1 はじめに

当センターは, 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28年度化学物質環境実態調査で4-ビニル-1-シクロヘキセンの水質分析法について検討した。

4-ビニル-1-シクロヘキセンは, 難燃剤, 塗料用樹脂の原料などに使用される有機化合物¹⁾であり, 人に対する生殖・発生毒性並びに内分泌かく乱作用の報告²⁾が確認されている。

今回, HS-GC/MSを用いて, 4-ビニル-1-シクロヘキセン, その異性体及びVOCs23物質との同時分析法を検討し, 高感度分析法を開発したので, 報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

4-ビニル-1-シクロヘキセン: Sigma-Aldrich製 (純度99.5%)

ビシクロ [3.2.1] オクタ-2-エン: 東京化成製 (純度96.0%)

1,3-シクロオクタジエン: 東京化成製 (純度95.0%)

1,5-シクロオクタジエン: 東京化成製 (純度98.0%)

VOCs 23種混合標準液: 和光純薬工業製 [揮発性有機化合物23種混合標準液 (メタノール溶液)] (1,1-ジクロロエチレン, ジクロロメタン, トランス-1,2-ジクロロエチレン, シス-1,2ジクロロエチレン, クロロホルム, 1,1,1-トリクロロエタン, 四塩化炭素, ベンゼン, 1,2-ジクロロエタン, トリクロロエチレン, 1,2-ジクロロプロパン, プロモジクロロメタン, シス-1,3-ジクロロプロペン, トルエン, トランス-1,3-ジクロロプロペン, 1,1,2-トリクロロエタン, テトラクロロエチレン, ジプロモクロロメタン, *m*-キシレン, *p*-キシレン, *o*-キシレン, トリプロモメタン, *p*-ジクロロベンゼン, 各900 ~ 1100mg/L)

トルエン-*d*₈: Cambridge Isotope Laboratories製 (純度99.94%)

p-プロモフルオロベンゼン-フルオロベンゼン混合標準液: 和光純薬工業製 (各1mg/mL)

メタノール: 和光純薬工業製 トリハロメタン測定用

塩化ナトリウム: 和光純薬工業製 水質試験用

ミネラルウォーター: Volvic

精製水: ミリQ水

2.2 HSの測定条件

使用機種：12031HSA (JEOL製)
 (ループモード)
 サンプルループ：1mL
 加熱温度：60℃
 加熱時間：30分
 トランスファーライン温度：150℃
 バルブブロック温度：100℃
 加圧
 圧力：20kPa, 加圧時間：10秒, サンプルループ流量：
 20.0SCCM
 サンプリング終了時圧力：3kPa, サンプリング後平衡時
 間：3秒

2.3 GC-MSの測定条件

使用機種：GC：Agilent7890A, MS：JMS-Q1000GC K9
 使用カラム：AQUATIC-2 60m×0.32mm, 1.8μm (ジ
 エルサイエンス製)
 カラム温度：40℃ (5min) →5℃/min→75℃ (0min)
 →15℃/min→170℃ (0min) →25℃/min→220℃ (5min)
 注入方法：ダイレクト

表1 各物質のモニターイオン

物質名	定量イオン(m/z)	定性イオン(m/z)
4-ビニル-1-シクロヘキセン	93	91
ビシクロ [3.2.1]オクタ-2-エン	93	91
1,3-シクロオクタジエン	93	91
1,5-シクロオクタジエン	93	91
1,1-ジクロロエチレン	61	96
ジクロロメタン	49	84
トランス-1,2-ジクロロエチレン	61	96
シス-1,2-ジクロロエチレン	61	96
クロロホルム	83	85
1,1,1-トリクロロエタン	97	61
四塩化炭素	117	119
ベンゼン	78	51
1,2-ジクロロエタン	62	64
トリクロロエチレン	95	60
1,2-ジクロロプロパン	63	62
プロモジクロロメタン	83	85
シス-1,3-ジクロロプロペン	75	77
トルエン	91	92
トランス-1,3-ジクロロプロペン	75	77
1,1,2-トリクロロエタン	83	61
テトラクロロエチレン	166	164
ジブロモクロロエタン	129	127
<i>m,p</i> -キシレン	91	106
<i>o</i> -キシレン	91	106
トリプロメタン	173	171
<i>p</i> -ジクロロベンゼン	146	75
トルエン- <i>d</i> ₈ (内標準)	98	100
フルオロベンゼン (内標準)	96	70
<i>p</i> -プロモフルオロベンゼン (内標準)	95	75

キャリアーガス：ヘリウム (3.5mL/min (10 min)
 →2mL/min)
 インターフェース温度：200℃
 イオン源温度：200℃
 イオン化電圧：70eV
 検出モード：SCAN (45～200)

2.4 前処理方法

分析フローを図1に示す。

塩化ナトリウムを入れたバイアルに試料を採り、内標準としてトルエン-*d*₈を添加した。バイアルを密栓して混和したものを試験液とした。

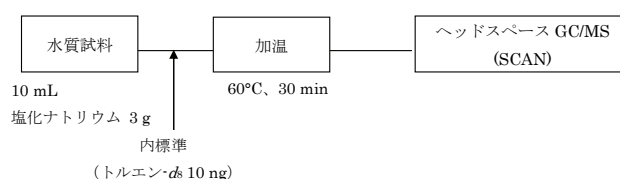


図1 分析フロー

2.5 4-ビニル-1-シクロヘキセン標準液の調製

メタノールを少量入れたメスフラスコに、4-ビニル-1-シクロヘキセンを100mg量り取り、メタノールを加えて100mLに定容し、1000μg/mLの標準原液を調製する。標準原液を分取し、メタノールで希釈し、100、10及び1μg/mLの標準液を調製する。

メタノールを少量入れたメスフラスコにトルエン-*d*₈を100mg量り取り、メタノールを加えて100mLに定容し、1000μg/mLの内標準原液を調製する。内標準原液を分取し、メタノールで希釈して100μg/mL及び5.0μg/mLの内標準液を調製する。

1000μg/mLの標準原液または各濃度の標準液と、100μg/mLの内標準液をそれぞれ分取し、メタノールで希釈する。0.10～100ng/mLの検量線を作成するため、各標準濃度が0.50μg/mL～500μg/mL、内標準濃度が5.0μg/mLとなるように検量線用混合標準液（以下、混合標準液）を調製する。

2.6 4-ビニル-1-シクロヘキセンの装置検出下限値 (IDL), 分析法の検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL)

IDL, MDL及びMQLの算出は、「化学物質環境汚染実態調査の手引き (平成27年度版)」³⁾に従った。IDLは、Volvic10mLに1μg/mL混合標準液を2μL添加し、塩化ナトリウム3gを加えてバイアルを密栓して混和したものを7個作製し、分析フローに従い加温してHS-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。MDL及びMQLは、河川水10mLに、IDLの5倍程度の濃度となるように1 μ g/mL混合標準液を2 μ L添加し、塩化ナトリウム3gを加えてバイアルを密栓して混和したものを7個作製し、分析フローに従い加温してHS-GC/MSで測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。

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

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

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

t(n-1, 0.05)：危険率5%，自由度n-1のt値（片側）

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

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

2.7 4-ビニル-1-シクロヘキサンの添加回収試験及び環境試料の分析

河川水及び海水試料10mLに100 μ g/mL混合標準液を2 μ L添加し、塩化ナトリウム3gを加えてバイアルを密栓して混和したものを、分析フローに従い加温してHS-GC/MSで測定した。また、環境試料として、無添加の河川水及び海水も分析した。

2.8 4-ビニル-1-シクロヘキサンの分解性スクリーニング試験及び保存性試験

「化学物質環境汚染実態調査の手引き（平成27年度版）」³⁾に従い、分解性スクリーニング試験及び保存性試験を実施した。

分解性スクリーニング試験の試験液は精製水を用いてpH5、pH7及びpH9のものを作製し、各10mLに5 μ g/mLの4-ビニル-1-シクロヘキセン標準液を2 μ L添加し、1時間後及び7日後（明所及び暗所に保存）に分析フローに従いHS-GC/MSで測定した。

保存性試験は、採水ビンに河川水及び海水を満水に入れ、対象物質の濃度が1.0ng/mLになるように100 μ g/mL標準液を添加し、冷暗所で7日間保存後、分析フローに従いHS-GC/MSで測定した。検量線最高濃度は500 μ g/mL混合標準液を冷暗所に保存し、1ヶ月後に再調製した500 μ g/mL混合標準液とともに、100ng/mL標準試料を作製し、測定結果を比較した。

2.9 異性体及びVOCsとの同時分析の検討

4-ビニル-1-シクロヘキサンの異性体である、ビスクロ[3.2.1]オクタ-2-エン、1,3-シクロオクタジエン、1,5-シクロオクタジエンとの同時分析を行った。4-ビニル-1-シク

ロヘキセンと異性体3物質を含む4種混合標準液を2.5に準じて作製し、測定した。なお、分析フローと異なり、塩化ナトリウムを添加せずに測定した。

さらに、上記の4種混合標準液と市販品のVOCs 23種混合標準液を使用し、VOCs23物質を含む27物質同時分析の検討も行った。VOCsの内標準は、*p*-ブロモフルオロベンゼン-フルオロベンゼン混合標準液を使用した。なお、こちらも塩化ナトリウムは添加せずに測定した。



図2 4-ビニル-1-シクロヘキセン及び異性体3物質

2.10 トラップモード及びSIM法の検討

2.9までの検討はすべてHSをループモード、測定モードをSCAN法（以下「ループ-SCAN」という。）で実施したが、さらなる高感度分析の検討として、HSをトラップモード、測定モードをSIM法（以下「トラップ-SIM」という。）で4-ビニル-1-シクロヘキセン及び異性体3物質を測定した。こちらも、2.9と同様に塩化ナトリウムを添加せずに測定した。なお、この検討はIDL測定時よりも時間が経過して行っており、装置のメンテナンス等によって感度変動があったこと、塩化ナトリウムを添加していないこと等、測定条件が異なることから、ループ-SCANの定量下限値がIDL測定で得られた定量下限値と異なっている。

(HS測定条件 [トラップモード])

使用機種：12031HSA（JEOL製）

トラップ管：GLトラップ1

抽出回数：3回

サンプルブロック温度：68℃

攪拌時間：25min

トランスファーライン温度：150℃

バルブブロック温度：100℃

トラップ管温度：23℃

加圧

圧力：40kPa、加圧時間：10秒、トラップ流量：

20.0SCCM、サンプリング終了時圧力：3kPa

ドライパージ時間：2分30秒、サンプリング後平衡時間：

3秒

GCインジェクション

トラップ管温度：220℃，時間：3min，トラップ管流量：20.0SCCM

3 結果及び考察

3.1 GC/MS測定条件の検討結果

4-ビニル-1-シクロヘキセンの検量線を図3と図4に示す。0.10～2.0ng/mLの低濃度領域，2.0～100ng/mLの高濃度領域でも相関の高い直線性のある検量線が得られた。

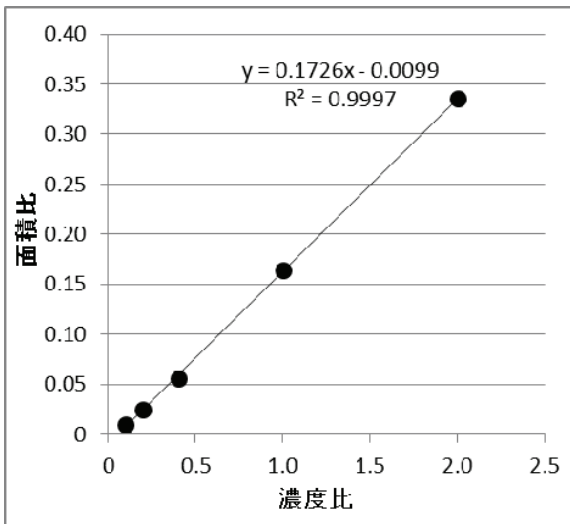


図3 検量線（低濃度領域）

内標準物質 1.0 ng/mL
対象物質濃度範囲 0.10～2.0 ng/mL

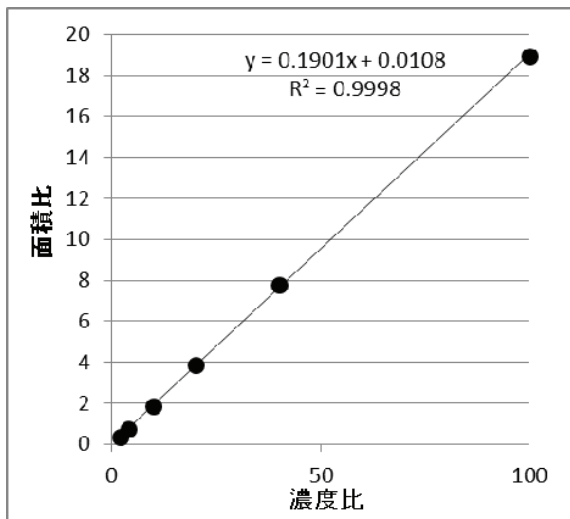


図4 検量線（高濃度領域）

内標準物質 1.0 ng/mL
対象物質濃度範囲 2.0～100 ng/mL

3.2 IDL, MDL及びMQL

4-ビニル-1-シクロヘキセンのIDL, MDL及びMQLを表2に示す。IDLは0.036ng/mL, MDLは0.047ng/mL, MQLは0.12ng/mLであり，環境省の要求感度(0.92ng/mL)を十分満足できる分析方法を開発することができた。

表2 4-ビニル-1-シクロヘキセンのIDL及びMDL, MQL

対象物質名	試料量 (mL)	IDL (ng/mL)	MDL (ng/mL)	MQL (ng/mL)
4-ビニル-1-シクロヘキセン	10	0.036	0.047	0.12

3.3 添加回収試験及び環境試料分析結果

4-ビニル-1-シクロヘキセンの添加回収試験結果を表3に示す。河川水の回収率は95%，海水の回収率は94%と良好な結果であった。無添加の河川水及び海水（環境試料）からは，4-ビニル-1-シクロヘキセンは検出されなかった。

表3 4-ビニル-1-シクロヘキセンの添加回収試験結果

試料名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	検体数	検出濃度 (ng/mL)	回収率 (%)	変動係数 (%)
河川水 (笹ヶ瀬橋)	10	0	1	< 0.047	-	-
	10	20	5	1.90	95	0.8
海水 (水島沖)	10	0	1	< 0.047	-	-
	10	20	5	1.87	94	0.7

3.4 分解性スクリーニング試験及び保存性試験結果

4-ビニル-1-シクロヘキセンの分解性スクリーニング試験結果を表4に示す。7日後における，pHによる分解及び光分解は認められなかった。

表4 4-ビニル-1-シクロヘキセンの分解性スクリーニング試験結果

pH	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率(%)*)		
		1時間放置後	7日間放置後	
			暗所	明所
5	1.0	0.96 (96)	0.96 (96)	-
7	1.0	1.0 (100)	0.96 (96)	0.98 (98)
9	1.0	0.99 (99)	0.97 (97)	-

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

4-ビニル-1-シクロヘキセンの保存性試験結果を表5に示す。7日後に河川水が87%，海水が86%の残存率であった。この結果から，試料採取後，可能な限り早く分析することが望ましいと考えられた。検量線最高濃度は1ヶ月後に99%の残存率であり，冷暗所で長期保存できることがわかった。

表5 4-ビニル-1-シクロヘキセンの保存性試験結果

試料名	検体数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度 (残存率 (%)*)	
			7日後	1ヶ月後
河川水	2	1.0	0.87 (87)	-
海水	2	1.0	0.86 (86)	-
検量線最高濃度	2	100	-	99 (99)

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

3.5 異性体及びVOCs成分との同時分析結果

4-ビニル-1-シクロヘキセンと異性体3物質との同時分析のクロマトグラムを図5に示す。4-ビニル-1-シクロヘキセンは異性体3物質すべてのピークと分離できており、これらの物質から妨害を受けることなく、同時分析が可能であると考えられた。

また、4-ビニル-1-シクロヘキセンと異性体3物質及びVOCs23物質を含む27物質同時分析のクロマトグラムを図6に示す。4-ビニル-1-シクロヘキセンはいずれの物質と

もピークは重なっておらず、0.20ng/mL ~ 20ng/mLの範囲で良好な検量線が得られたことから、VOCs23物質との同時分析が可能であると考えられた。一方、異性体である1,3-シクロオクタジエンは*o*-キシレンと、1,5-シクロオクタジエンはトリプロモメタンとリテンションタイムが重なっていた。各物質の定量イオンまたはフラグメントイオンがかぶっているため、これら4物質を同時分析するにはGCカラム等の分析条件についてさらなる検討が必要である。

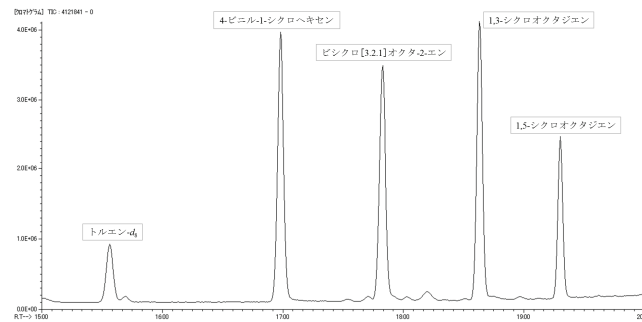


図5 4-ビニル-1-シクロヘキセン及び異性体3物質との同時分析のクロマトグラム (各2ng/mL)

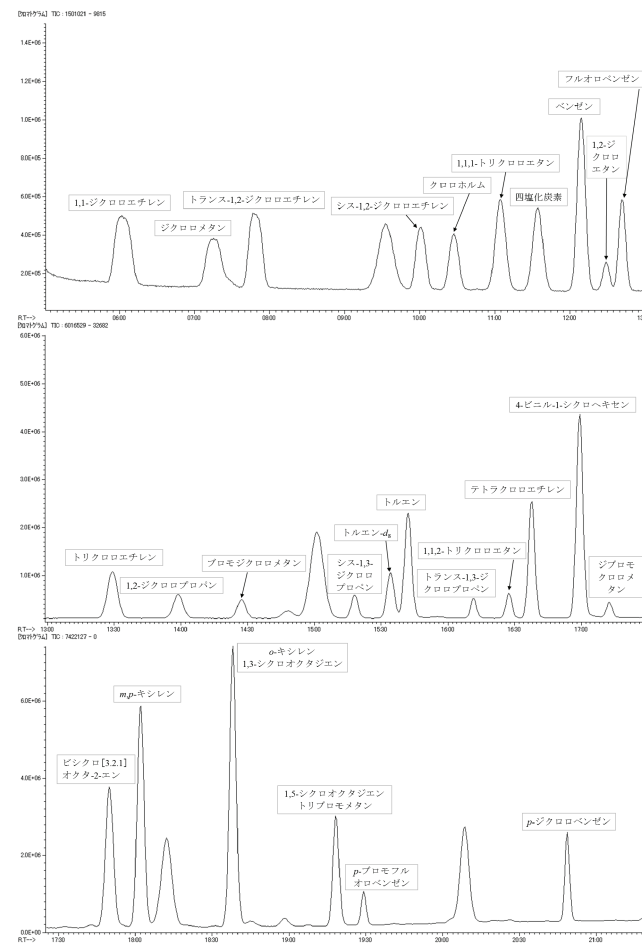


図6 27物質同時分析のクロマトグラム (各2ng/mL)

3.6 トラップモード及びSIM法による分析結果

ループ-SCAN及びトラップ-SIMにより得られた4-ビニル-1-シクロヘキセンのクロマトグラムを図7に示す。ループ-SCANでは0.020ng/mL、トラップ-SIMでは0.0010ng/mLまで定量が可能と考えられた。よって、トラップ-SIMにすることで20倍高感度な分析をすることが可能であった。異性体3物質についても、10～20倍高感度な分析が可能であった。また、今回のトラップ-SIMでの検討では塩析をしなかったが、塩析を行うことでさらなる高感度な分析を行える可能性が考えられた。

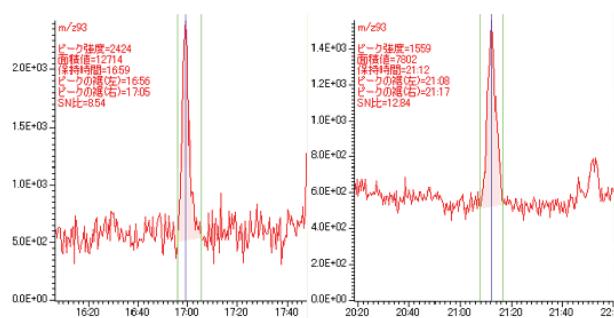


図7 4-ビニル-1-シクロヘキセンのクロマトグラム
(図左：ループ-SCAN、濃度0.020ng/mL、図右：トラップ-SIM、濃度0.0010ng/mL)

4 まとめ

4-ビニル-1-シクロヘキセン、その異性体及びVOCs23物質の同時分析法を検討したところ、HS-GC/MSで分析することにより、次に示すとおり高感度な分析法が開発できた。

- (1) 4-ビニル-1-シクロヘキセンのMDLは0.047ng/mL、MQLは0.12ng/mLであった。
- (2) 河川水及び海水を用いた4-ビニル-1-シクロヘキセンの添加回収試験の回収率は、それぞれ95%、94%であった。
- (3) 4-ビニル-1-シクロヘキセン及び異性体3物質との同時分析が可能であった。
- (4) 4-ビニル-1-シクロヘキセン及びVOCs23物質との同時分析が可能であった。
- (5) トラップ-SIMにすることでループ-SCANより20倍高感度な4-ビニル-1-シクロヘキセンの分析が可能であった。

なお、本研究は環境省委託の平成28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) 独立行政法人製品評価技術基盤機構：化学物質総合情報提供システム（CHRIP）

- 2) http://www.env.go.jp/chemi/report/h16-01/pdf/chap02/02_2_36.pdf
- 3) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：化学物質環境実態調査実施の手引き（平成27年度版）、平成28年3月、2016

[調査研究]

倉敷川流域の水量及びリン負荷量の推定

Water Quantity and Phosphorus Pollution Loading Amount Estimation of Kurashiki River Basin

藤田和男, 小川知也, 吉岡敏行 (水質科)

Kazuo Fujita, Tomoya Ogawa, Toshiyuki Yoshioka (Water Section)

要 旨

児島湖に流入する倉敷川流域の水量及びリン負荷量を調査した。児島湖に倉敷川経由で支流の丙川から流入する水量は $21 \times 10^6 \text{ m}^3$ /年と推計された。妹尾川からは児島湖樋門開放時と排水機場稼働時に合わせて $10 \times 10^6 \text{ m}^3$ /年が入ると推計されたが、それ以外の時間帯での流量は推計できなかった。倉敷川の全リン濃度の年平均値は上流部で 0.17 mg/L 、中流部で 0.26 mg/L 、下流部で 0.23 mg/L であり、中・下流部で流入する小河川や用排水路は $0.31 \sim 0.46 \text{ mg/L}$ と本川より高く、特に、かんがい期に $0.44 \sim 0.80 \text{ mg/L}$ と高かった。水質及び流量から推定されるリン負荷量は倉敷川中・下流部の丙川、都六区排水機場排水及び錦六区排水機場排水合わせて約 28 t/年 と推計された。なお、妹尾川のリン負荷量は推計できなかった。

[キーワード：倉敷川, 流量, 全リン, 汚濁負荷量]

[Key words : Kurashiki River, Volume Flow Rate, Total Phosphorus, Pollution Loading Amount]

1 はじめに

指定湖沼である児島湖の水質は平成27年度にCOD (75%値) が 7.2 mg/L 、全窒素 (平均値) が 1.1 mg/L 、全リン (平均値) が $0.17 \text{ mg/L}^{1)}$ であり、環境基準値COD (75%値) 5 mg/L 、全窒素 (平均値) 1 mg/L 、全リン (平均値) 0.1 mg/L と比較すると、全窒素は環境基準値に近い値まで改善されたが、CODと全リンは未だに高く、特に全リンは近年、環境基準値の2倍近い値で推移している。

一方、児島湖への流入水の多くは笹ヶ瀬川と倉敷川から流入しており¹⁾、倉敷川は全リンの濃度が高く²⁾、児島湖の水質に与える影響が大きいと考えられている³⁾ が、倉敷川下流域へ流入する小河川等からのリン負荷量について検討された事例は認められない。児島湖の水質改善のため、倉敷川のリンの負荷量を検討するには水質とともに流量のデータも必要であるが、流速計や流量計による連続測定の実施には費用や設置許可等の困難な点がある。しかし、水位計による連続測定は比較的簡易に行えることや、既存の流量データが存在することから、本報では倉敷川流域の小河川、用排水路で水位データ等を用いた流量の推計を試み、流量と全リン負荷量について検討したので報告する。

2 調査対象および方法

2.1 調査地点及び概況

図1に示す倉敷川流域の河川、用排水路の14地点で、平成28年4月～平成29年3月まで月1回採水した。倉敷川は大きく3つの流域から成る³⁾。以降、図1に示すように、この小流域の区域に対応して、地点1から地点8 (倉敷川最上流部から稔橋) を上流部、地点9から地点10 (稔橋から倉敷川橋) を中流部、地点11から地点14 (倉敷川橋から倉敷川河口部) を下流部と呼ぶこととする。

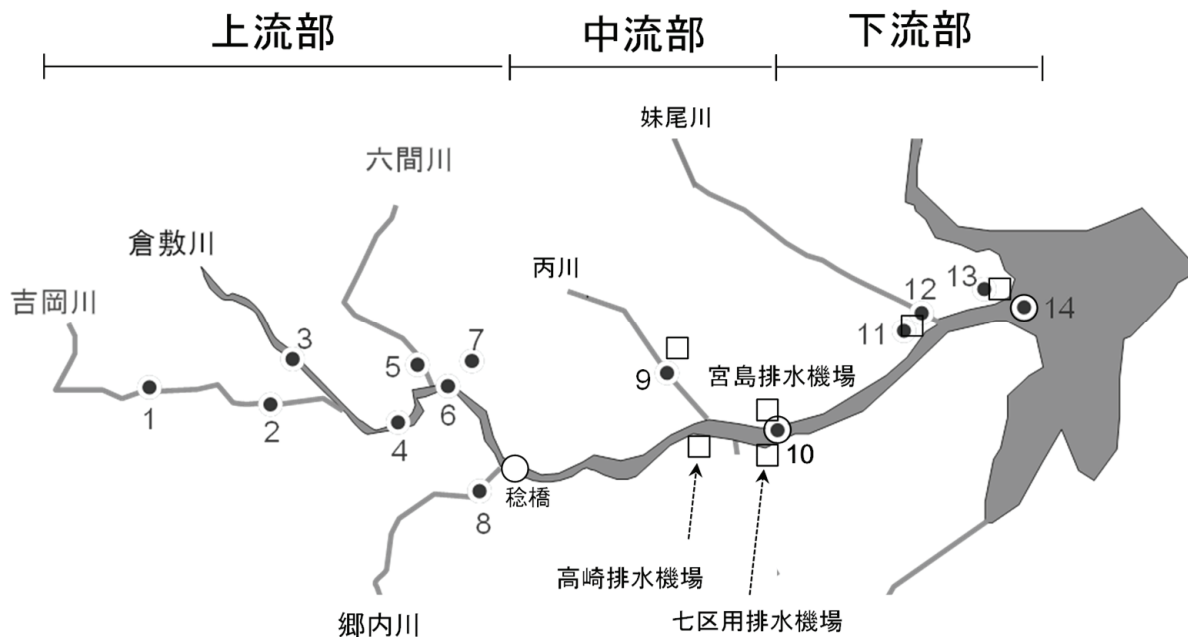
また、調査地点を倉敷川本川、支流の小河川及び用排水路の3つに分け比較するとき、倉敷川本川は上流部を地点6、中流部は地点10、下流部は地点14を代表点とし、上流部の小河川は地点1、地点2、地点5及び地点8の平均値、中流部の小河川は地点9、下流部の小河川は地点12とした。また、上流部の用排水路は地点7、下流部の用排水機場は地点11及び地点13の平均値とした。中流部では用排水路の測定を行っていない。このうち、地点11は農地である都六区 (面積440ha, うち水田300ha)⁴⁾ の排水路の水が集積する遊水池で妹尾川排水機場から倉敷川に排水される。地点12は妹尾川河口部で、倉敷川に直接流出する。妹尾川排水機場は都六区の排水と妹尾川の排水を行っているが、流入経路は堰堤で2系統 (都六区系と妹尾川系) に分かれており両者の水が混ざること無いため、都六区系を流入口付近の地点11、妹尾川系の流入口付近を地点12とした。妹尾川排水機場は都六区系の排水ポンプと、妹尾川系の排水ポンプから成り、以下では分かりやすくす

るために、都六区系を都六区排水機場、妹尾川系を妹尾川排水機場と呼ぶ。丙川排水機場は地点9、錦六区排水機場は地点13とした。

2.2 流量

現地では巻尺で川幅と水深を測定し、電磁流速計（東邦電探製TK-106X）により流速を測定した。小河川である妹尾川では児島湖樋門開放時の1～2時間を除きほとん

ど水が流れていなかった。また、丙川も測定値の変動が大きく、月1回の現地測定では正確な流速が求められないと考えられた。そこで、別途、児島湖樋門の開放時の両小河川の流速の速い時間帯に流速を測定すると同時に、水位の変化速度を測定し、両者の関係から児島湖樋門開放時における両小河川の流量を求めることとし、現地数時間、水位計（Daiki製DIK-611-A）を河床に静置して水位を測定した。流量を Q (m³)、水位を H (cm)、児島



地点番号	採水地点	本・支流別
1	吉岡橋	小河川
2	新浮州橋	小河川
3	粒榮橋	倉敷川本川
4	塩干橋	倉敷川本川
5	鶴城橋	小河川
6	茶屋藤戸橋	倉敷川本川
7	五間樋門上	用排水路
8	藤戸橋	小河川
9	丙川下流	小河川
10	倉敷川橋	倉敷川本川
11	都六区排水機場	用排水路
12	妹尾川下流	小河川
13	錦六区下流	用排水路
14	倉敷川河口部	児島湖

●:採水地点

○公共用水域水質調査地点²⁾

□:排水機場

丙川排水機場は地点9、妹尾川排水機場は地点11、錦六区排水機場は地点13に隣接した場所に存在する。

図1 調査地点

湖樋門開放時間を ΔH (hr) とし、流量と水位の変化速度との関係を、

$$Q = a \cdot (\Delta H / \Delta t)$$

とした。式中の $\Delta H / \Delta t$ (水位低下速度) は図2に示すように水位の傾き、 Q (流量) は現地の流速と断面積から求めた。係数 a は水位低下速度 ($\Delta H / \Delta t$) と流量 (Q) の比であり、この比を用いて児島湖樋門の水位低下速度⁵⁾ から児島湖樋門開放時の両河川の流量を推計した。水位及び流速の測定は平成29年4月26日～5月17日に妹尾川で8回、丙川で7回調査を行いデータを取得した。

また、倉敷川には7箇所の排水機場(丙川排水機場、妹尾川排水機場、都六区排水機場、錦六区排水機場、高崎排水機場、宮島排水機場、七区用排水機場)からの流入があり、各機場の稼働時間と排水量の記録³⁾ から水量を推計した。

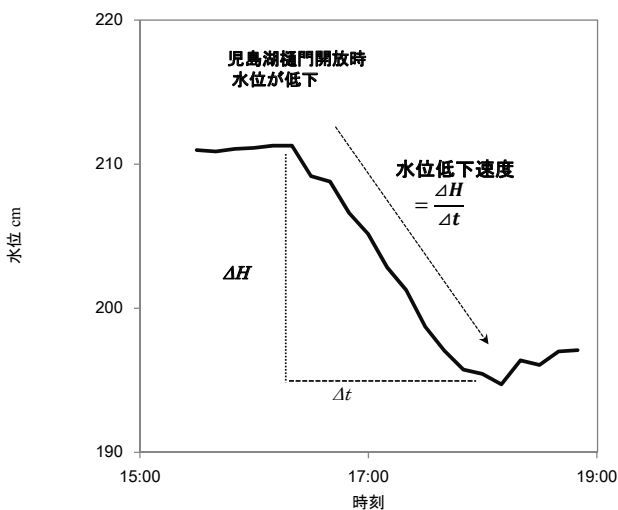


図2 水位低下速度

2.3 水質

採取した試料は、工場排水試験法JIS K0102⁶⁾ に準拠して全リン及びリン酸態リンを測定し、試料をろ紙(Whatman製GF/C)によりろ過して、ろ液の全リンを溶存態リン、全リンから溶存態リンを差し引いた値を懸濁態リンとした。

2.4 負荷量

各月の流量と水質を掛けて負荷量を推計した。

3 結果および考察

3.1 流量

現地での月1回の調査において、妹尾川と丙川の流速は測定時によって著しく異なっていた。したがって、両小河川の流量を(1)児島湖樋門開放時、(2)排水機場稼働

時及び(3)定常時(児島湖樋門開放時と排水機場稼働時以外の時間)の3つから成ると仮定し、それぞれについて検討した。

3.1.1 児島湖樋門開放時の流量

月1回の定常時の調査において、妹尾川では流速が全く無い状態であった。一方、児島湖樋門開放時に行った調査では両小河川とも概ね流速が10～20 cm/sと児島湖流域では比較的速く、両小河川の流速は児島湖樋門の開閉に強く依存して、児島湖樋門が開かれると児島湖の水位が低下し、流入河川の上流と下流に水位差が生じて、小河川の流速も発生すると考えられた。

図3に児島湖内の2地点(児島湖樋門と倉敷川水位観測所)⁵⁾ と2地点(丙川、妹尾川)の水位変化を示す。(3)定常時に上流からの流入水により各地点の水位が上昇していき、(1)児島湖樋門開放時に水位が低下した。年間を平均すると児島湖樋門の開放時間は1日に1～2時間、低下水位は10～20cm程度⁵⁾ が報告されており、今回樋門開放時に、2地点で水位計により測定した水位低下の継続時間と低下水位も概ね同等の値であった。

児島湖樋門開放時に丙川と妹尾川で測定した水位低下速度と、流速計と河川の断面積から求めた流量は正比例の関係が見られた(図4)。そこで、平成28年度の児島湖樋門操作記録⁵⁾ に記載されている操作時間と水位差から1日毎の水位低下速度を求め、水位低下速度と流量の関係式から、樋門の開閉操作による丙川と妹尾川の流量を推計することとした。ただし、児島湖樋門からの距離が大きくなるほど樋門操作の影響は緩くなり水位低下速度が減少すると考えられたことから、倉敷川での水位低下速度(年平均値)と樋門からの距離の関係を求めたところ、児島湖樋門から1 km離れると水位低下速度が約2.4%減少していた(図5)。これが丙川と妹尾川にも当てはまると仮定して、流量の推計値を補正した結果、児島湖樋門開放時の丙川の流量は 3.7×10^6 m³/年、妹尾川の流量は 7.4×10^6 m³/年と推計された。

また、今回の調査での水位低下は丙川で1日に最大33cm、妹尾川で1日に最大31cmであった。平成28年度の樋門操作による湖内の水位低下が31cm以上であったのは13%(48日)で、6月と9月が過半数(27日)を占めており、1日の水位低下が30cmを超える場合の、両河川の流量をより精度良く推計するためにはかんがい期等の調査が必要と考えられた。

3.1.2 排水機場稼働時の流量

丙川排水機場と妹尾川排水機場により両小河川から倉敷川へ強制排水される水量を、排水機場の稼働時間と時間あたりの排水量から求めた。丙川排水機場の流量は 3.9×10^6 m³/年、妹尾川排水機場の流量は 6.5×10^6 m³/年と推計され、図6に各月毎の流量の推計値を示した。

また、倉敷川中・下流部ではこの他5箇所の排水機場から倉敷川へ排水されており、これらの排水機場の稼働時間と、時間あたりの排水量から推計した月毎の排水量も図6に合わせて示す。都六区排水機場と錦六区排水機場からの排水量が多く、この2機場の合計は倉敷川下流部に流入する全排水機場（7機場）の約61%に相当すると試算された。

3.1.3 定常時の流量

丙川の定常時の流速は、月1回の定期的な調査では16～+25 cm/sまで大きくばらつき、妥当な値では無いと考えられた。

ところで、丙川流入点の上流に位置する稔橋と下流に位置する倉敷川橋の流量は既存のデータ^{5.7)}から推計可能であった。稔橋と倉敷川橋の2地点間の流量の差を求め、これを2地点間に位置する丙川（児島湖樋門開放時、機場稼働時及び定常時）、高崎排水機場³⁾、宮島排水機場³⁾及び七区用排水機場³⁾からの流入によると仮定し、ここから丙川（児島湖樋門開放時と機場稼働時）の流量と、3排水機場からの流量を差し引いた値を丙川の定常時の流量とした。なお、七区用排水機場は月毎の用水量と排水量の比率³⁾から倉敷川への排水量を推計した。この方法により求められた定常時における丙川の流量は 14×10^6 m³/年と推計された。

一方、妹尾川では月1回の調査において流れがほとんど観測されず、また丙川と同様の推計方法も使えず、定常時の流量を推計することはできなかった。

倉敷川の支流である妹尾川の定常時の流速は小さく、また丙川の流速も測定時によるばらつきが大きいなど、電磁流速計の適用は困難であり、複数箇所に水位計を設置して水位差から流量を推計するなどの、より適切な調査が必要であった。

3.2 リン濃度

図7に全リンの調査結果を上流部、中流部及び下流部の各月の平均値を示すが、下流部の小河川・用排水路で値が高い傾向にあった。

年平均値は上流部で0.17 mg/L、中流部で0.26 mg/L、下流部で0.23 mg/Lで、中流部と下流部は0.2 mg/Lを超

えていた。小河川や用排水路は本川より高く、月毎の変化を見ると、中流部から下流部でかんがい期（6～9月）に値が高い傾向であった。全リンと各態リンの地点別濃度（年平均値）を図8に示す。全リン中の懸濁態リンの割合は平均42%であり、かんがい期と非かんがい期ではほぼ同程度であった。

3.3 リン負荷量

全リン濃度は倉敷川上流部で低く、中・下流部で高くなっており、水質汚濁への影響等を検討するためには、濃度と水量から計算されるリン負荷量としての評価が重要である。丙川、妹尾川、都六区排水機場及び錦六区排水機場からの流入が倉敷川中・下流部への流入の大部分と考えられたが、高崎排水機場、宮島排水機場及び七区用排水機場からも排水が流入しており、これらも併せてリン負荷量を検討した。中・下流部小河川及び排水機場からのリン負荷量の月毎の推計値は図9に示す。ただし妹尾川は定常時の負荷量が推計できなかったため、児島湖樋門開放時と排水機場稼働時のみを示した。濃度が高く水量の大きい6～9月のかんがい期に全リン負荷量も大きかった。年間の汚濁負荷量の大きさは都六区排水機場と丙川が同程度で最も大きく、次いで錦六区排水機場、妹尾川の順であった。

丙川、妹尾川、都六区排水機場、錦六区排水機場、宮島・高崎及び七区用排水機場から流入する年間のリン負荷量を図10に示すが、リン負荷量は倉敷川中・下流部の丙川、都六区排水機場排水及び錦六区排水機場排水を合わせて約28 t/年と推計された。なお、妹尾川のリン負荷量は児島湖樋門開放時と排水機場稼働時に約5.4 t/年と推計されたが、定常時の流量が推計できなかったため、リン負荷量の総量は計算できず、図10中では a t/年と記載した。妹尾川のリン負荷量の推計が今後の課題であった。

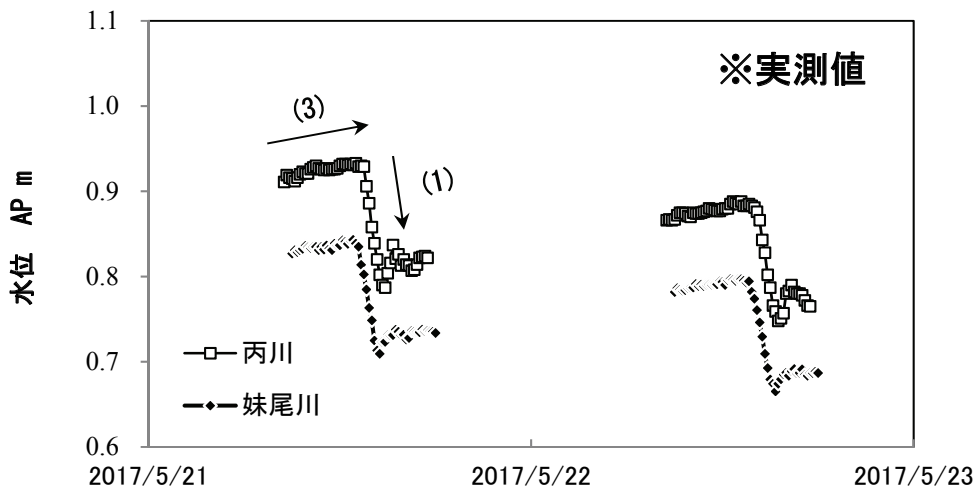
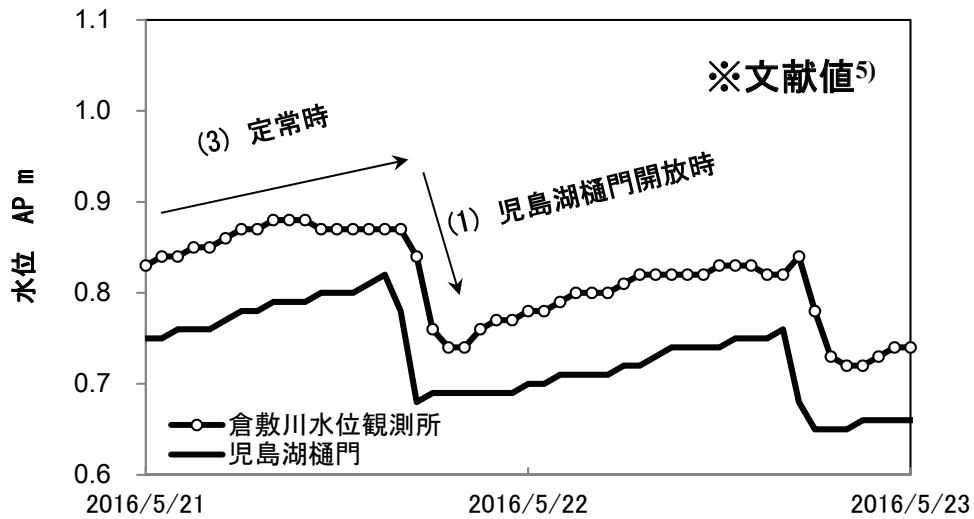
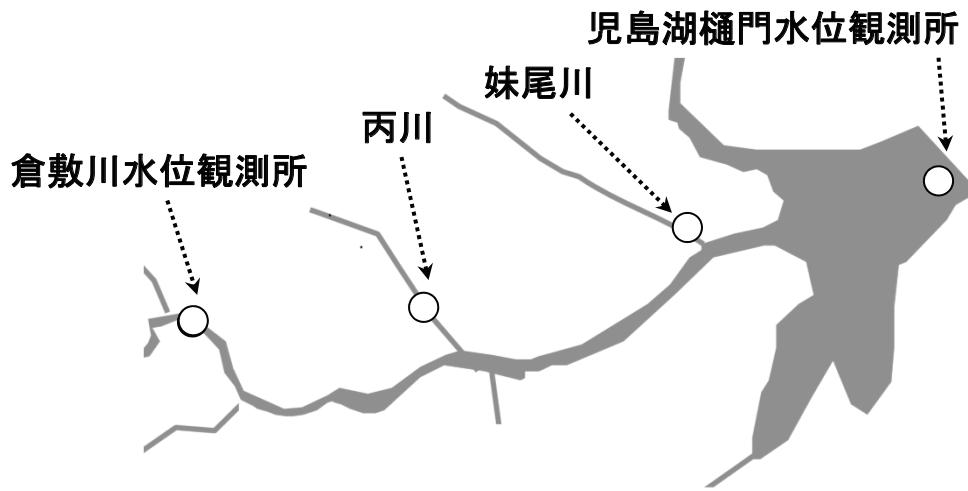


図3 水位測定地点及び測定例

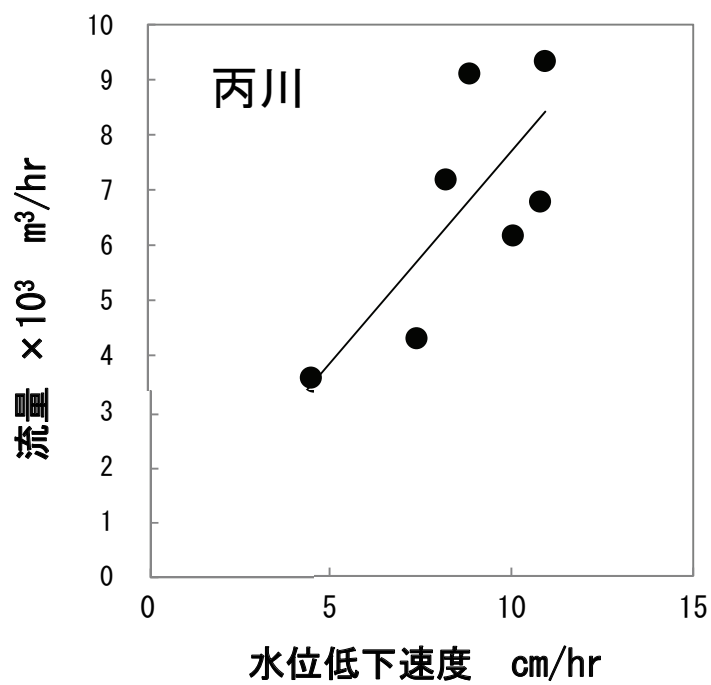
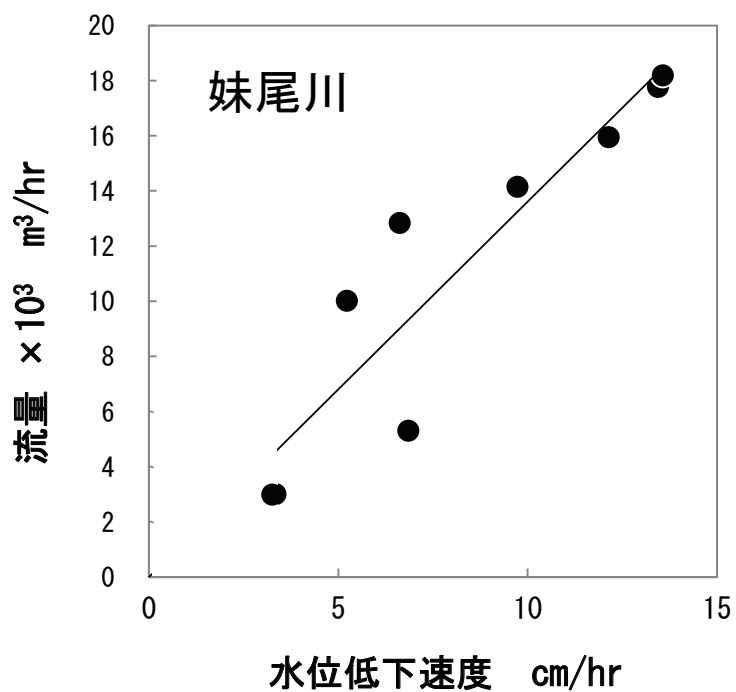


図4 妹尾川及び丙川の水位低下速度と流量の関係

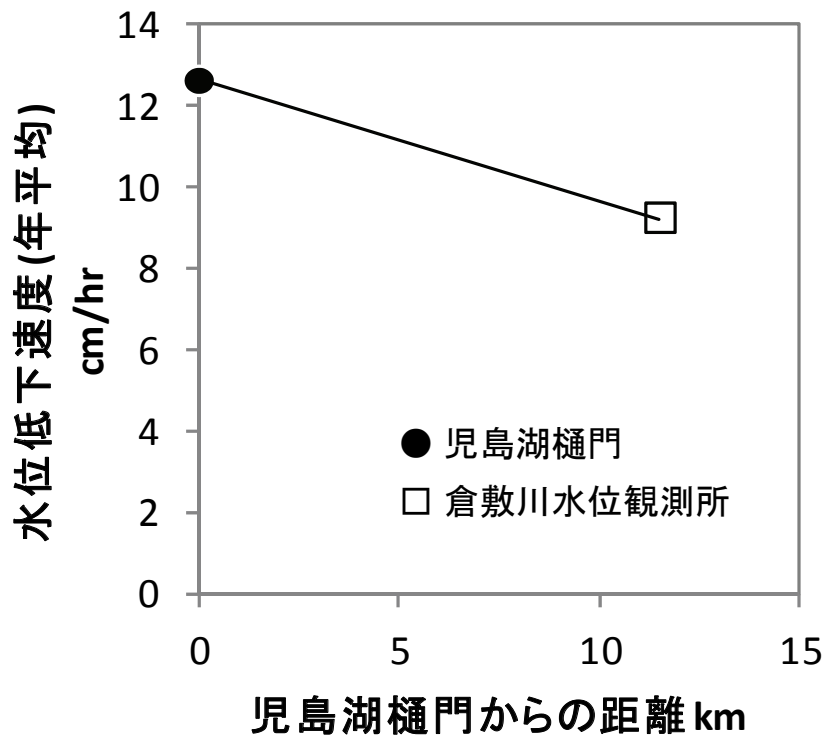
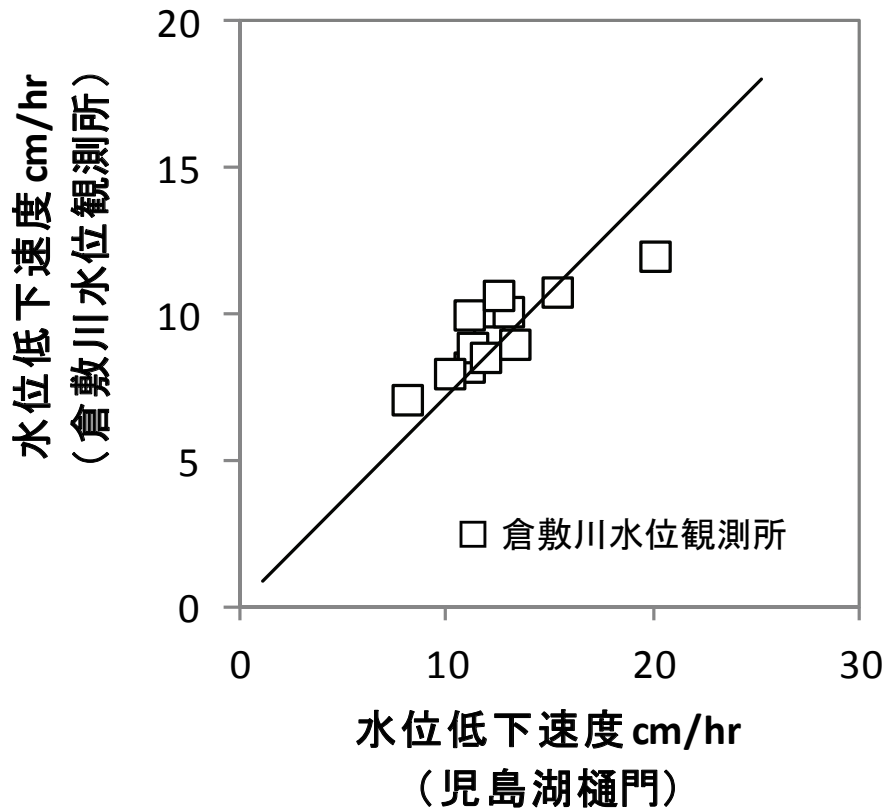


図5 水位低下速度と樋門からの距離

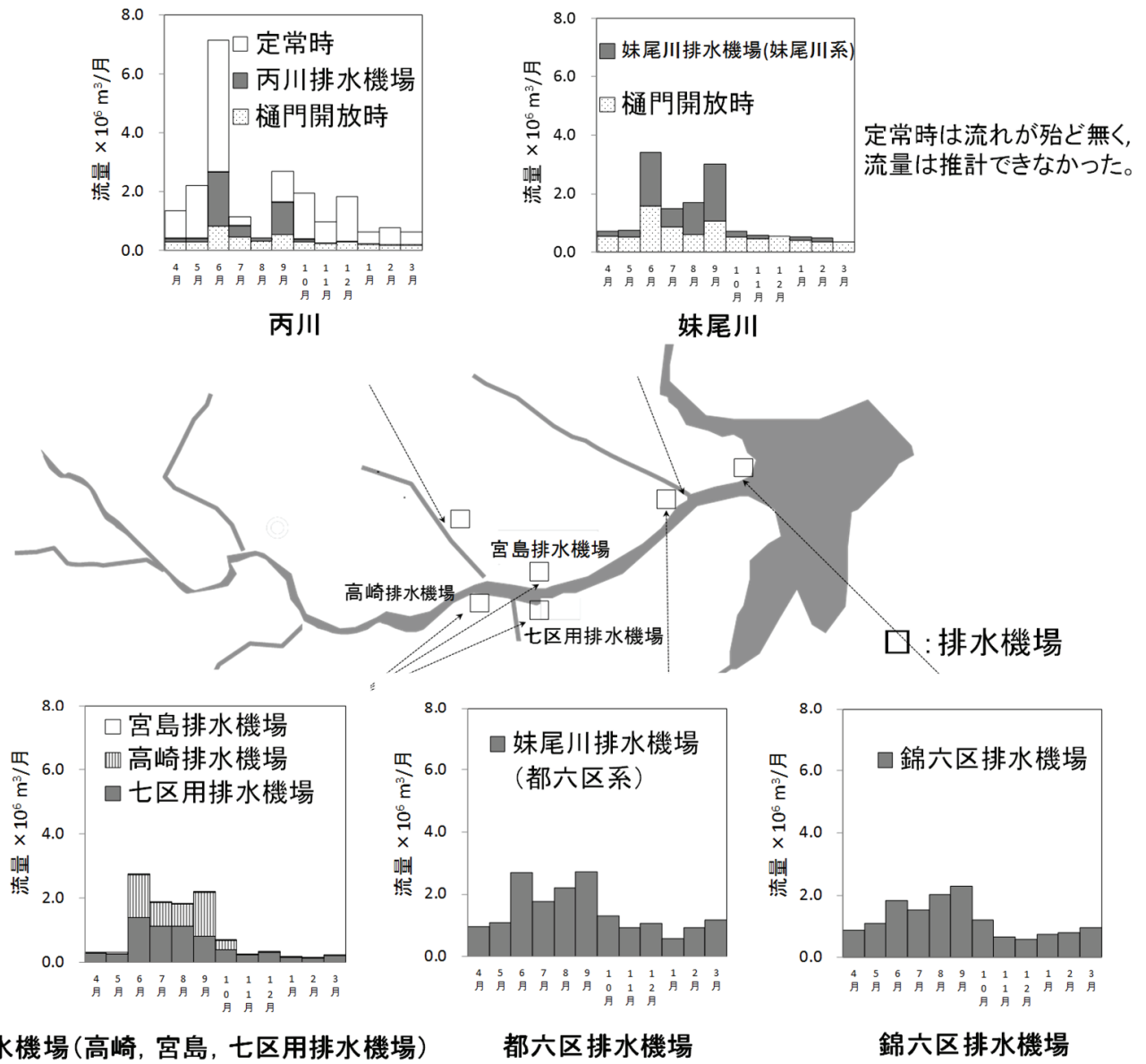


図6 小河川及び排水機場からの流量

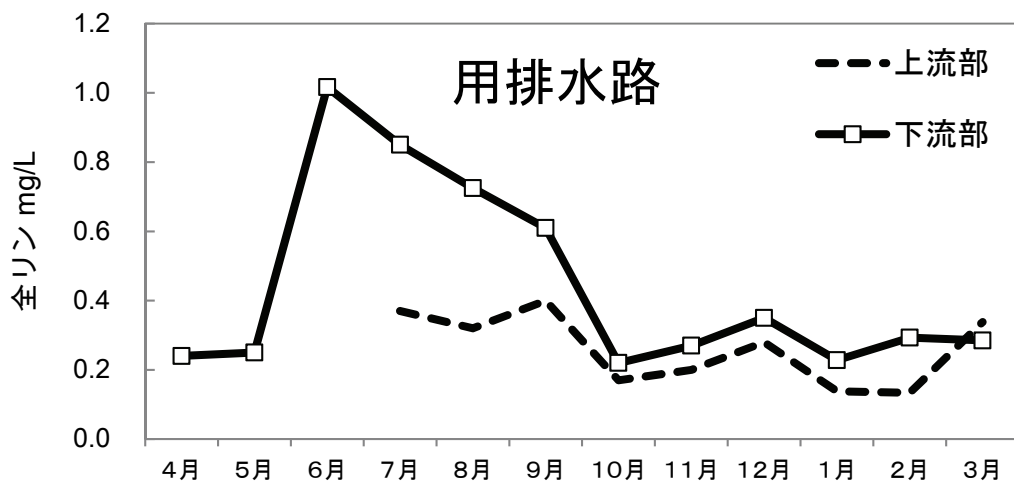
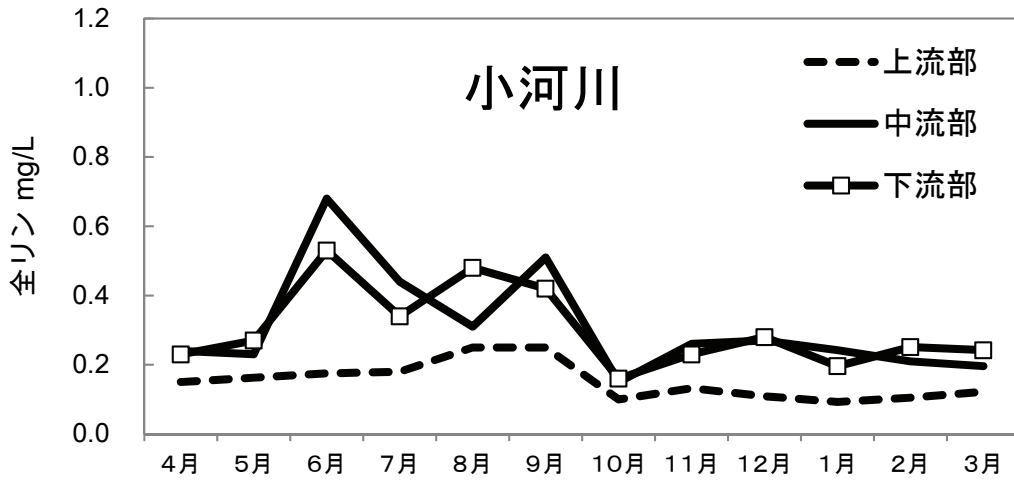
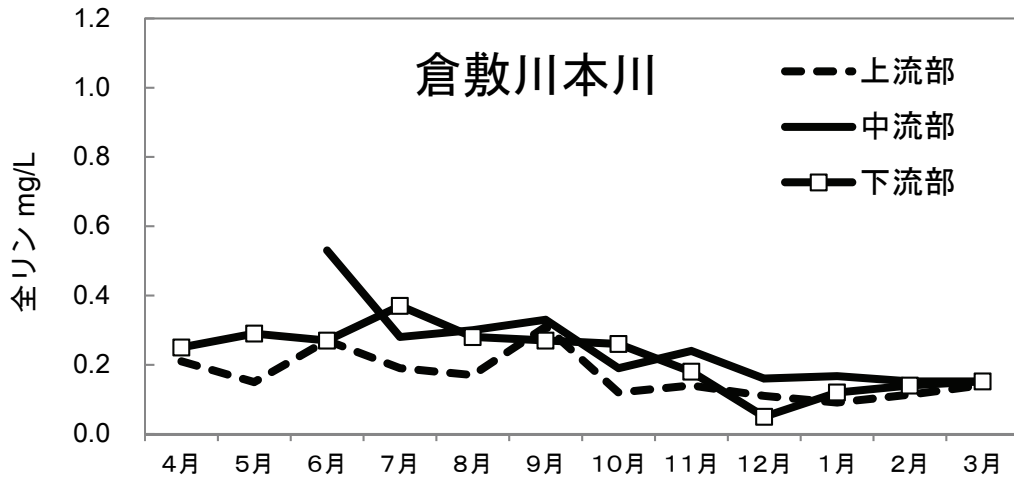
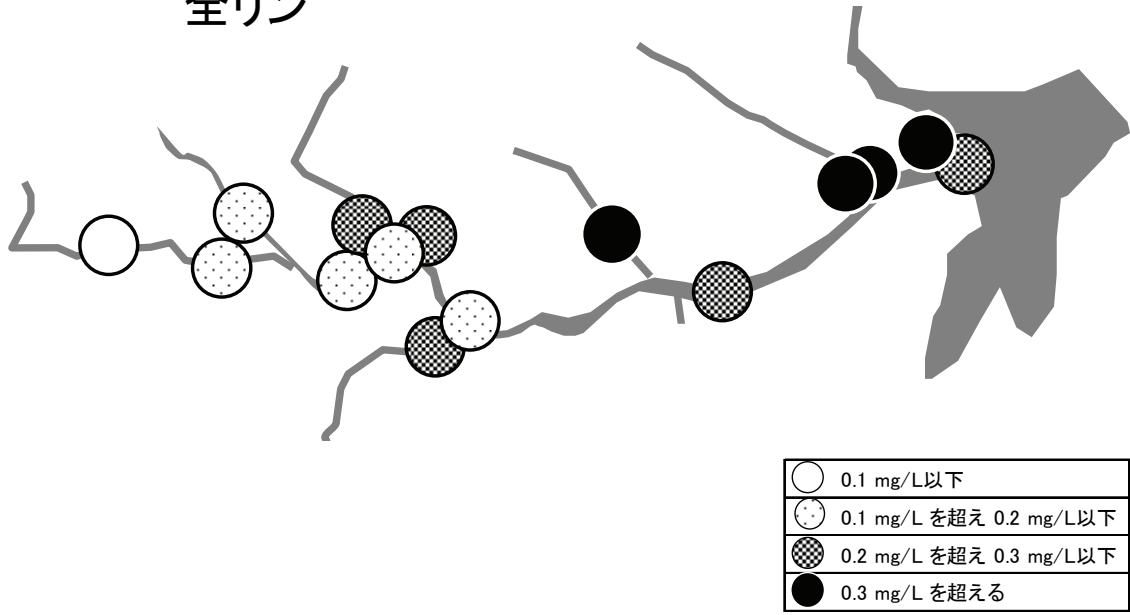


図7 リン濃度

全リン



各態リン

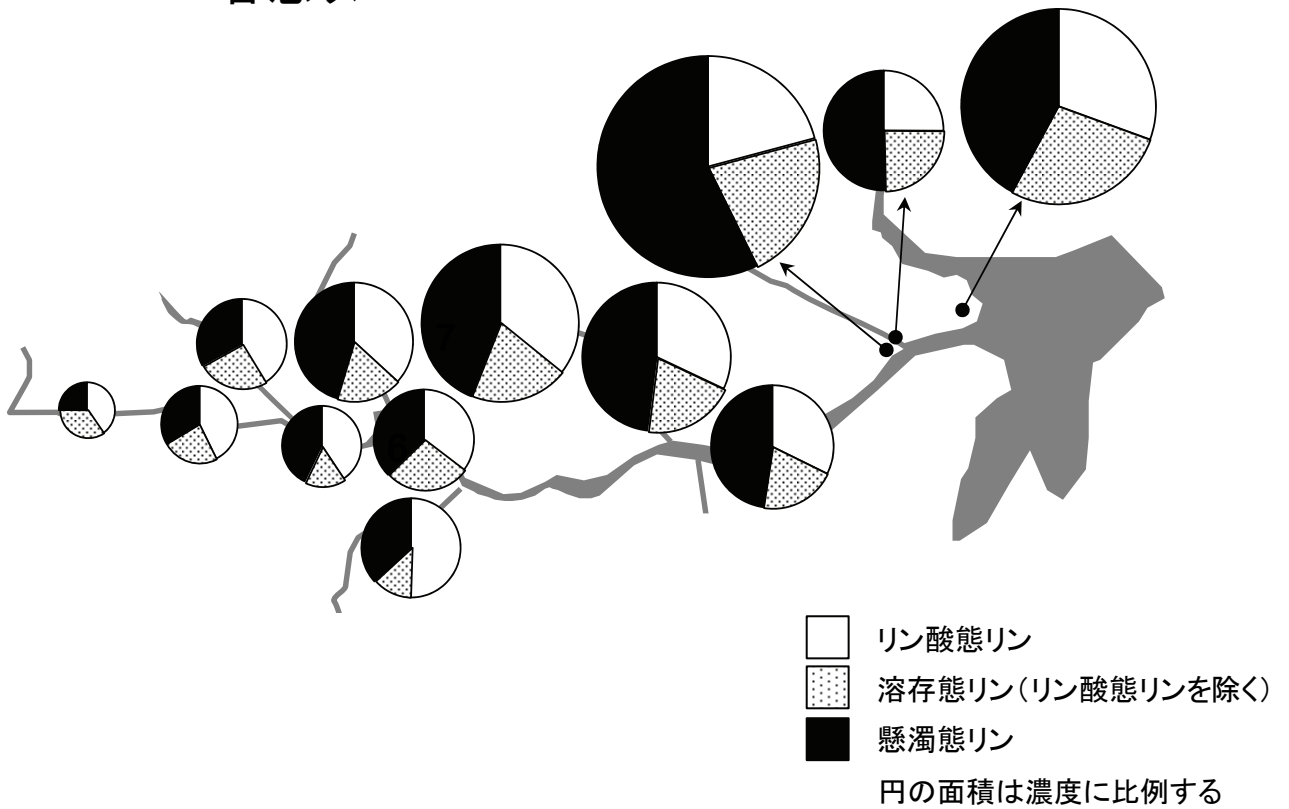
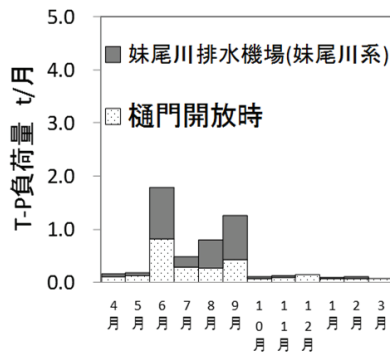
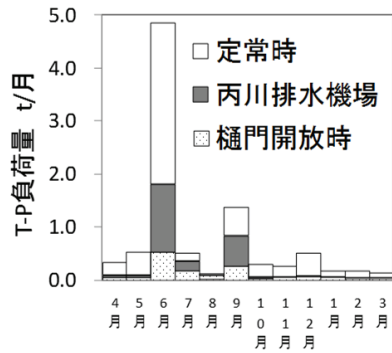


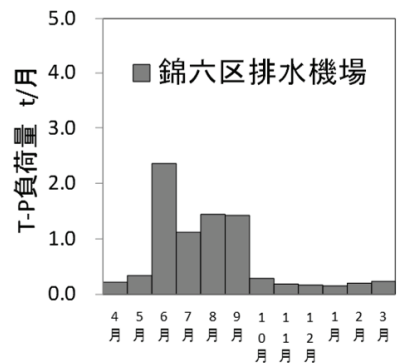
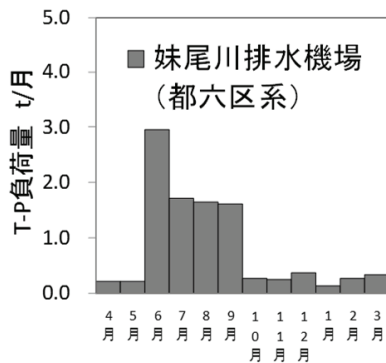
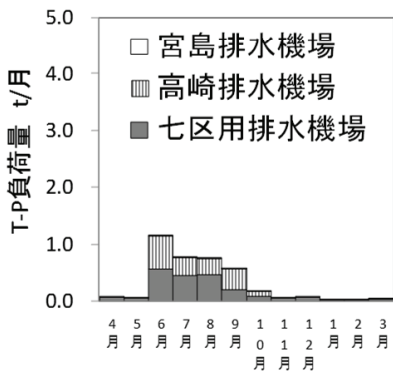
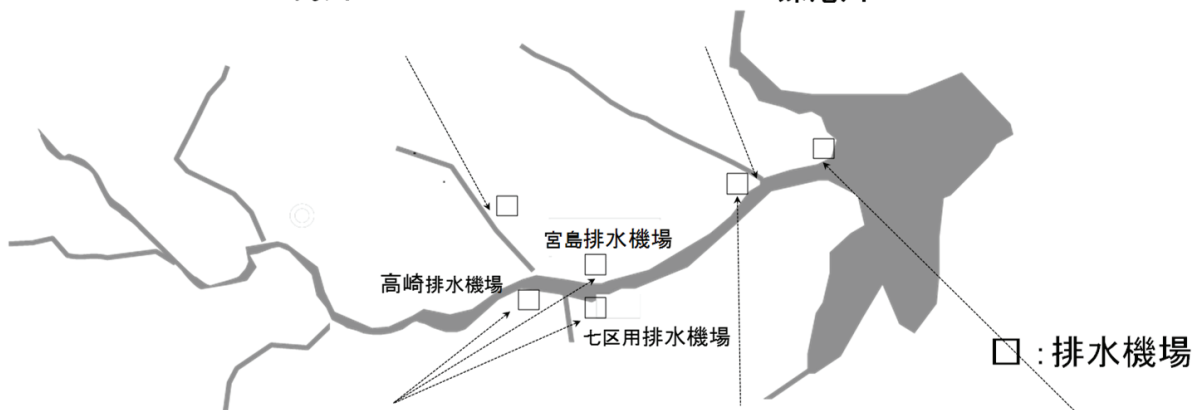
図8 リン濃度



定常時は流れが殆ど無く、
負荷量は推計できなかった。

丙川

妹尾川



排水機場(高崎, 宮島, 七区用排水機場)

都六区排水機場

錦六区排水機場

図9 小川川及び排水機場からのリン負荷量

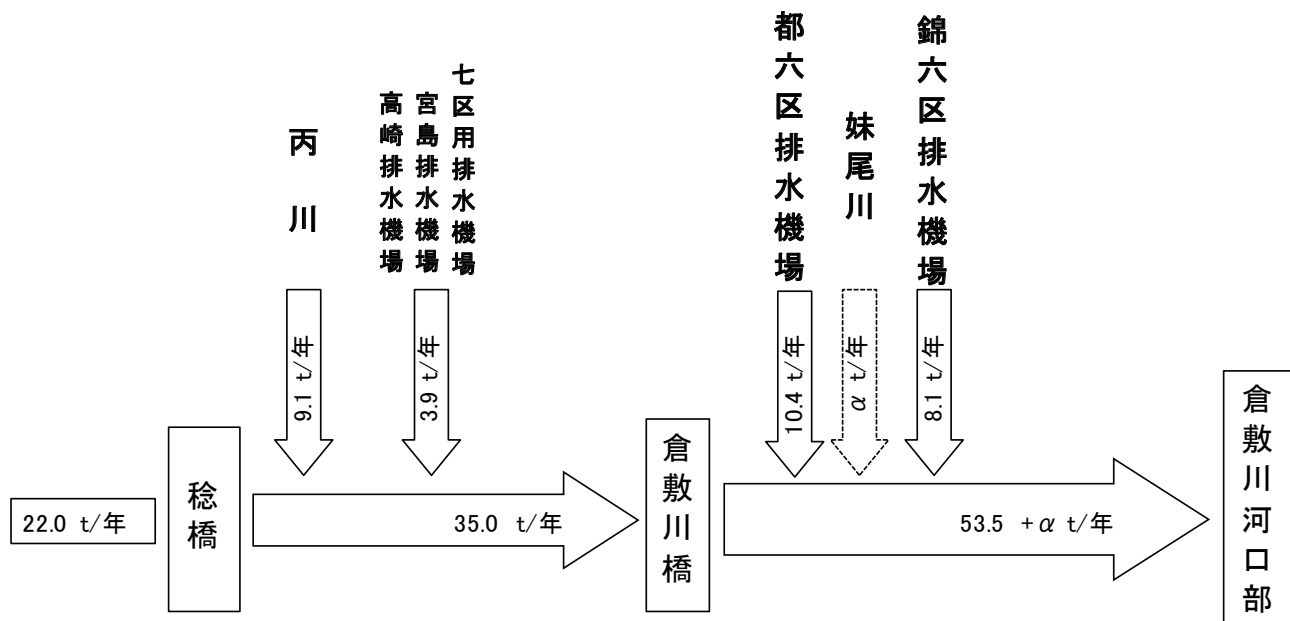


図10 小河川及び排水機場からのリン負荷量

4 まとめ

倉敷川流域の定常時、児島湖樋門開放時及び排水機場稼働時の流量及びリン負荷量を推計した。

丙川の流量はおよそ 21×10^6 m³/年と推計された。妹尾川の流量は児島湖樋門開放時と排水機場稼働時におよそ 10×10^6 m³/年と推計されたが、定常時の流量は推計できなかった。

倉敷川の全リン濃度の年平均値は上流部で0.17 mg/L、中流部で0.26 mg/L、下流部で0.23 mg/Lであり、かんがい期が高かった。倉敷川へ流入するリン負荷量は倉敷川中・下流部の小河川・排水路で大きく、丙川、都六区排水機場排水及び錦六区排水機場排水の合計は約28 t/年と推計されたが、妹尾川の負荷量は推計できず、倉敷川中・下流域へ流入するリンの負荷量を推定することはできなかった。

今後、妹尾川の負荷量を求めるため定常時の妹尾川の流量を測定する必要がある。

文 献

- 1) 岡山県：児島湖ハンドブック，2017
- 2) 岡山県：平成28年度公共用水域及び地下水の水質測定結果，2017
- 3) 岡山県：平成28年度指定湖沼汚濁負荷量削減状況調査，2017
- 4) 藤田和男，中野拓也，金子英史，山本 淳：児島湖における水質汚濁メカニズムの解明-都六区の水田群

及び八浜町波知の水田における汚濁負荷量調査，岡山県環境保健センター年報，39，75-80，2015

- 5) 岡山県：児島湖締切堤樋門操作月報，2016
- 6) 工場排水試験法 JIS-K0102（2010）：日本規格協会
- 7) 岡山県：平成17年度指定湖沼汚濁負荷量削減状況調査，57，2005

【資 料】

カビ臭原因物質の分析法の検討

Examination of the analysis of the causative agents of the mold smell

山本浩司, 吉岡敏行, 肥塚加奈江*, 難波順子* (水質科)
*衛生化学科

Koji Yamamoto, Toshiyuki Yoshioka, Kanae Koeduka*, Junko Namba* (Water Section)
*Food and Drug Chemical Research Section

要 旨

HS-GC/MSは、操作が簡単で迅速に分析が可能であるが、ジェオスミンの場合、内標準の添加濃度やGCカラムの選択に注意が必要であることが判明した。また、SPE-GC/MSは、固相抽出に時間を要する難点があるが、ヘッドスペースオートサンプラーがない場合には、この方法で十分測定できることが確認できた。また、SIM測定よりMS/MS測定の選択性が高く、内標準の影響を受けない利点があることも確認できた。

[キーワード：かび臭 ジェオスミン 2-メチルイソボルネオール GC/MS]
[Key word : mold smell, geosmin, 2-methylisoborneol, GC/MS]

1 はじめに

カビ臭の原因物質であるジェオスミン及び2-メチルイソボルネオール（以下2-MIB）は、水道法に基づく水質基準が0.00001mg/L以下に設定されている。測定に当たっては、基準値の1/10の定量が求められ、GC/MSを用いた測定法としては、最も高感度な測定法のひとつであり、測定法はパージ&トラップ(P&T)-GC/MS、ヘッドスペース(HS)-GC/MS、固相抽出(SPE)-GC/MS及び固相マイクロ抽出(SPME)-GC/MSが採用されている。分析方法については、研究機関やメーカーから各種報告^{1), 2)}が出されているが、基準値の10分の1の信頼性のある測定が難しい等の問題点が指摘されている。当センターでも緊急時対応が可能となるよう、カビ臭の分析方法について検討したところ、定量時に問題があることが明らかになった。そこで、当センターで実施可能なHS-GC/MSとSPE-GC/MSの分析方法について検討したところ、若干の知見を得たので報告する。

GC/MSはJMS-Q1000GC K9 (S-trap), SPE-GC/MSはJEOL JMS-Q1000GC Mk II 及びVarian-240MSであり、測定条件を表1に示す。

標準品(2-MIB, ジェオスミン, ジェオスミン-d₃, 2,4,6-トリクロロアニソール-d₃)は、和光純薬工業製を使用した。分析フローを図1に示す。

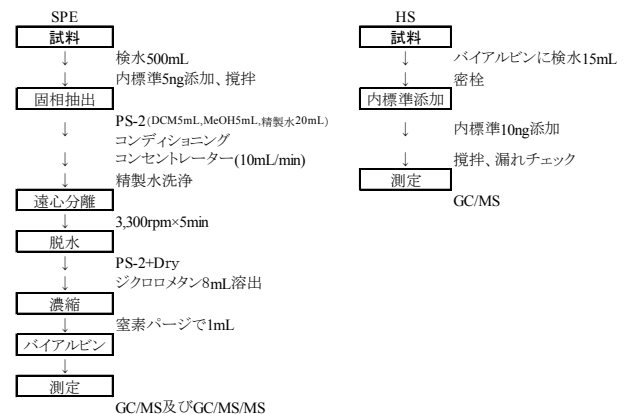


図1 分析フロー

2 実験方法

水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法（平成15年厚生労働省告示第261号）（以下、告示法）³⁾に基づき、HS-GC/MSとSPE-GC/MSを実施した。SPE-GC/MSでは四重極型とイオントラップ型で測定を行い、測定結果を比較した。使用したGC/MSは、HS-

3 結果及び考察

1) SPEの検討

SPEは低沸点溶媒をGC/MSに注入するため、特殊なオートサンプラーが必要でなく、最も分析装置の制約を受けない方法である。しかし、試料水0.5Lを固相抽出す

表1 測定条件

	HS-GC/MS (四重極型MS)	SPE-GC/MS (四重極型MS)	SPE-GC/MS/MS (イオントラップ型MS/MS)
使用機種	JMS-Q1000GC K9 Strap	JMS-Q1000GC Mk II	VARIAN 240MS
検出モード	SIM	SIM	MS/MS
使用カラム	GL Science Aquatic 60m×1.8μm×0.32mm	DB-5MS 30 m×0.25 mm, 0.25 μm (Agilent)	
カラム温度	40°C(2min)-20°C/min-150°C(0min)- 5°C/min-230°C(2min)	50 °C (2 min) – 20 °C/min – 320 °C (10 min)	
注入方法	直接導入	スプリットレス	パージ開始時間 1.5min
注入口温度	—		250 °C
注入量	—		1 μL
キャリアーガス	ヘリウム(20psi)		ヘリウム(1.0mL/min)
インターフェース温度	230°C	250 °C	300°C
イオン源温度	210 °C	210 °C	280°C
トラップ管	GLトラップ1	—	—
トラップ回数	3回	—	—
モニターイオン	2-MIB	95(107)	同左
	2,4,6-trichloroanisol- <i>d</i> ₃	213(215)	同左
	Geosmin	112(111)	同左
	Geosmin- <i>d</i> ₃	115	同左

るため、前処理に時間（約50分/1検体）を要する。告示法では、固相カラムはオクタデシル基を化学結合したシリカゲル又はこれと同等以上の性能を有するものと規定されており、今回は、4種類の固相カラムSep-Pak plus PS-2（waters製）、Sep-Pak plus tC18（waters製）、Sep-Pak plus C18（waters製）及びAquisis PLS-3（GL Science製）について検討した。

精製水0.5Lに標準物質5ngを添加（10ng/L）し、それぞれの固相カラムで抽出し、回収率を求めた結果を表2に示す。PS-2及びC18、PLS-3は良好な回収率が得られ、いずれの固相カラムも使用できると判断された。

しかし、tC18の2-MIBの回収率が58%と低い結果であった。その原因を調べたところ、内標準2,4,6-トリクロロアニソール-*d*₃のモニターイオンm/z 213に妨害ピークが重なったことにより、見掛け上回収率が低くなったことによる。tC18を使用した場合、内標準2,4,6-トリクロロアニソール-*d*₃のモニターイオンをm/z 215に変更したところ、正常な回収率（95%）となった。したがって、モニターイオンの選択にも注意が必要であることが判明した。

表2 4種類の固相カラムの添加回収率(%)

回収率(%)	PS-2	C18	tC18	PLS-3
2-MIB	84	86	58	92
Geosmin	107	107	119	107

2) SPEによる低濃度添加回収試験

水道水0.5Lにアスコルビン酸0.1gを添加して、塩素を除去した試験水を用いて添加回収試験を実施した。設定濃度は10ng/L（PS-2）と1ng/L（C18）とし、試験回数

はそれぞれ5回行った。本来は同一濃度で比較すべきであるが、限られた時間の中で違う固相及び違う濃度でも添加回収率に問題がないことを確認するために、今回の条件で行った。測定は、JMS-Q1000GC Mk II及びVARIAN-240MSで行った。添加回収試験結果を表3に、添加回収試験時のクロマトグラム（SPE-GC/MS）を図2に示す。いずれの装置でも10ng/L及び1ng/Lの回収率は82～104%であり、変動係数（CV）は1.7～5.1%と良好な結果が得られた。

表3 添加回収試験結果(%)

10ng/L PS-2回収率(%)	SPE-GC/MS		SPE-GC/MS/MS	
	2-MIB	Geosmin	2-MIB	Geosmin
添加(10ng/L)-1	89	96	80	91
添加(10ng/L)-2	90	96	97	95
添加(10ng/L)-3	93	94	96	95
添加(10ng/L)-4	95	96	94	99
添加(10ng/L)-5	93	93	99	95
平均	92	95	93	95
CV(%)	2.4	1.7	8.2	3.1

1ng/L C18回収率(%)	SPE-GC/MS		SPE-GC/MS/MS	
	2-MIB	Geosmin	2-MIB	Geosmin
添加(1ng/L)-1	94	102	84	96
添加(1ng/L)-2	98	103	85	100
添加(1ng/L)-3	100	102	83	98
添加(1ng/L)-4	104	95	82	101
添加(1ng/L)-5	104	98	93	91
平均	100	100	85	97
CV(%)	4.2	3.4	5.1	4.1

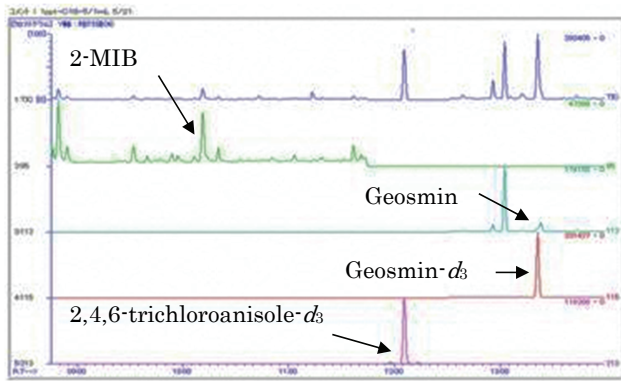


図2 添加回収試験 (1ng/L) のクロマトグラム (SPE-GC/MS)

3) HS-GC/MS

HS-GC/MSは操作が簡単で、かつ迅速に測定が可能であるが、専用のオートサンプラーが必要である。トラップ機能を有するJMS-Q1000GC K9 (S-trap) を用いて、検出感度を確認した。塩化ナトリウムは添加しないで、精製水15mLに内標準及び標準を添加し、トラップ回数3回で測定⁴⁾したところ、1ng/Lでも十分測定可能であった。公定法では塩化ナトリウムを添加するよう記載されているが、装置感度が十分あり、添加回収試験の結果が問題なかったため、添加せずに測定を行った。

4) 検出感度の比較

HS-GC/MS、SPE-GC/MS及びSPE-GC/MS/MSについて感度を比較した。試料換算の濃度で最も高感度に測定できたのは、SPE-GC/MSで0.2ng/Lであった。次にSPE-GC/MS/MSで0.5ng/L、HS-GC/MSで1ng/Lであった。いずれの方法でも基準値の1/10が測定可能であった。

5) 内標準d体の影響

図3にHS-GC/MSで測定した1ng/Lのクロマトグラムを示す。ジェオスミン-d₃とジェオスミンのピーク分離が不十分で、かつジェオスミン定量用イオンm/z 112にジェオスミン-d₃のフラグメントイオンm/z 112が重なり、特に、低濃度の試料の面積値の積算は自動で行うのは困難で、手動で行う必要があることがわかった。したがって、シングル四重極型GC-MSを用いてSIM測定する場合には、ジェオスミン-d₃の添加量を極力少なくするか、分離ができる昇温条件やGCカラムを再検討する必要があると考えられた。なお、図4にHS-GC/MS測定時のジェオスミンの検量線を示す。1～200ng/Lの範囲で直線性 ($r^2 > 0.999$) が確認された。

一方、GC-MS/MS測定の場合には、プロダクトイオン

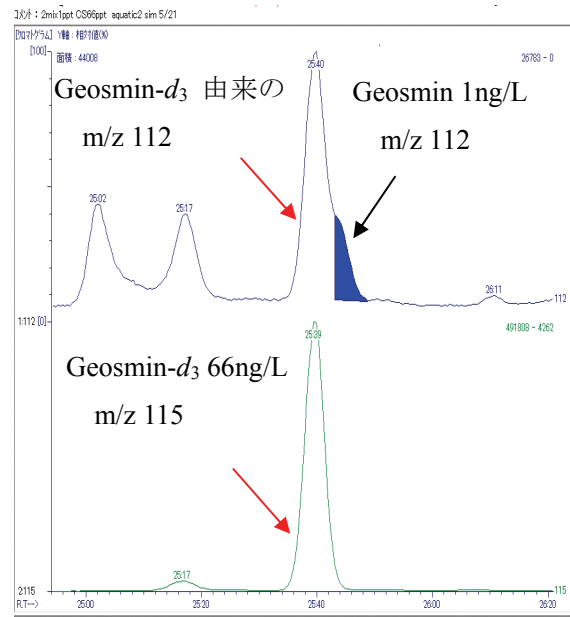


図3 Geosminのクロマトグラム(HS-GC/MS)

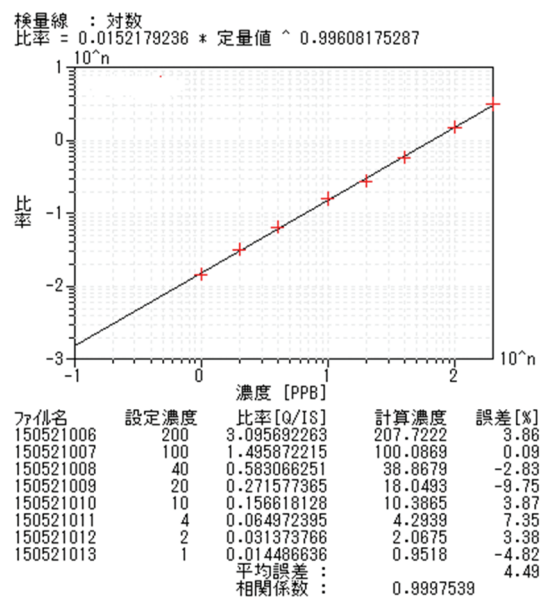


図4 Geosminの検量線 (HS-GC/MS)

m/z 97のプリカーサーイオンが異なるために図5に示すとおり、SIM測定のようなd体の影響は全く見られなかった。

SPE-GC/MS/MS測定時のジェオスミンの検量線を図6に示す。0.5～20ng/Lの範囲で直線性 ($r^2 > 0.995$) が確認された。なお、SPEの場合には、検量線溶液もSPE抽出により調製するため、若干、相関が悪くなったと考えられた。

2-MIBについては図7～9に示すとおり、HS-GC/MS (1～100ng/L)、SPE-GC/MS (0.2～20ng/L)、SPE-GC/

MS/MS (0.5 ~ 20ng/L) のいずれの測定法であっても直線性 ($r^2 > 0.995$) が確認された。

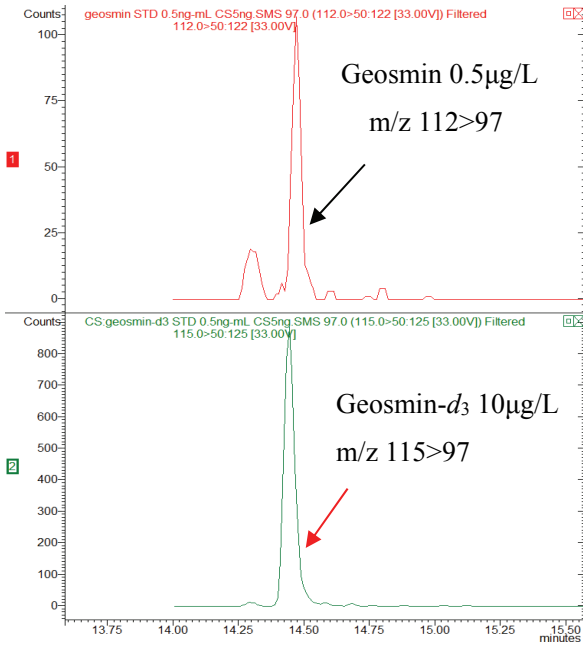


図5 Geosminのクロマトグラム (SPE-GC/MS/MS)

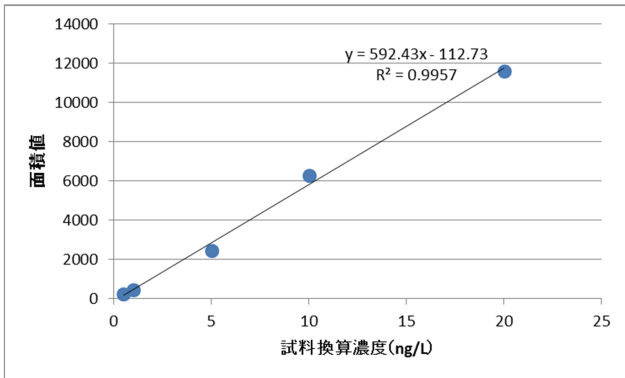


図6 Geosminの検量線 (SPE-GC/MS/MS)

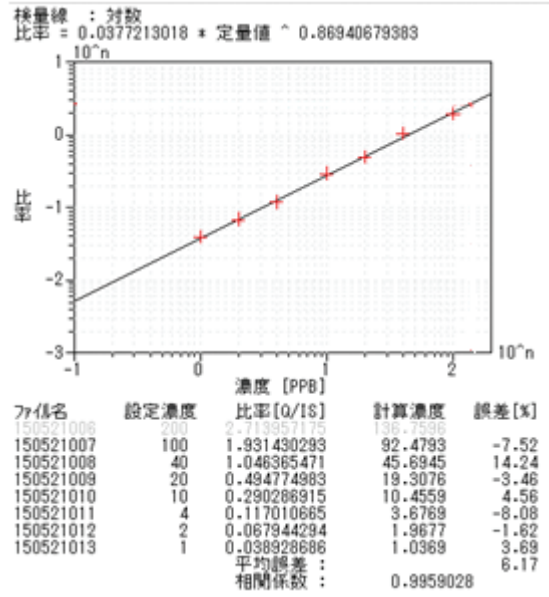


図7 2-MIBの検量線 (HS-GC/MS)

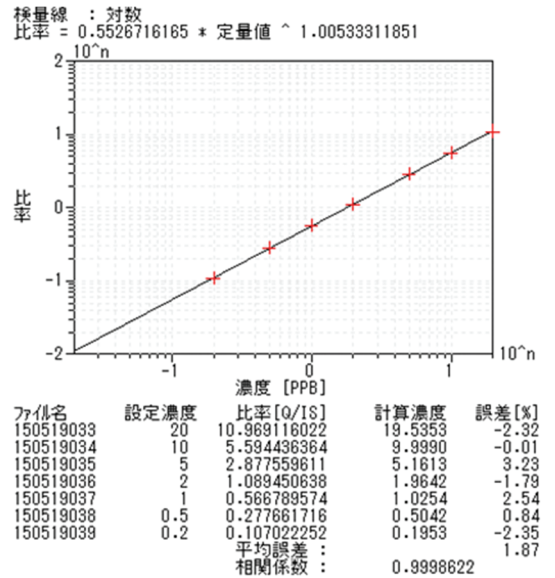


図8 2-MIBの検量線 (SPE-GC/MS)

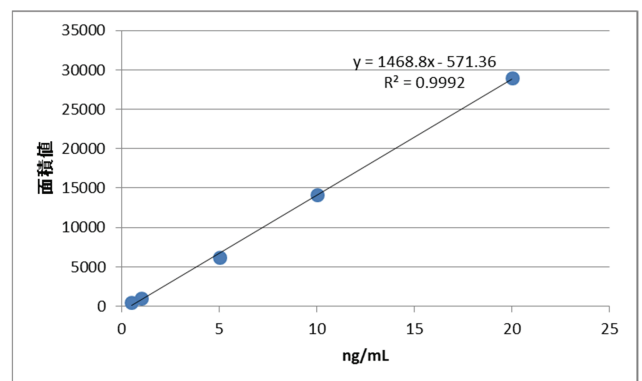


図9 2-MIBの検量線 (SPE-GC/MS/MS)

4 まとめ

かび臭原因物質であるジェオスミンと2-MIBについて、2種類の前処理法で3種類の測定法を検討した。検討の結果、いずれの方法でも基準値の1/10である1ng/Lレベルの測定は可能であった。

文献

- 1) 渡辺貞夫：水中のカビ臭物質（2-メチルイソボルネオールおよびジェオスミン）分析法の検討，神奈川県衛生研究所研究報告 No_34 (2004)
- 2) 谷澤春菜：GC大量注入法を用いたカビ臭物質（ジェオスミン・2-MIB）の高感度分析，株式会社アイステイサイエンス <http://www.aisti.co.jp/common/pdf/sk1801a.pdf>
- 3) 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法（平成15年厚生労働省告示第261号）
- 4) 榎本剛司：トラップ-ヘッドスペースによるVOCとカビ臭の同時分析，日本電子データム(株) www.ee-net.ne.jp/ms/sympo08/abstract-pdf/24_enomoto.pdf

【資料】

岡山県内における環境放射能バックグラウンド調査－ヨモギ－（第2報）

Survey of Environmental Radiation Background Level in Okayama Prefecture -Mugwort-
(2nd Report)

木下浩行, 加藤大貴, 清水光郎, 片岡敏夫, 小川 登 (放射能科)

Hiroyuki Kinoshita, Daiki Katou, Mitsuo Shimizu, Toshio Kataoka, Noboru Ogawa
(Environmental Radiation Section)

要 旨

国立研究開発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における環境放射線等の測定結果を補完するために、平成27～29年度は指標生物であるヨモギを対象として岡山県内の環境放射線等のバックグラウンドレベルを季節別に調査することとし、平成28年度は秋季に調査を行い、放射性核種濃度及びふっ素濃度のバックグラウンドレベルを把握した。その結果は、U-238濃度及びふっ素濃度は県南で高めの傾向であり、Ra-226濃度はU-238濃度等と同様の傾向であった他、人形峠環境技術センター周辺で最も高かった。また、人形峠環境技術センター周辺とその他のエリアで比較すると、U-238濃度とふっ素濃度は同センター周辺の方がやや低め、Ra-226濃度は同センター周辺の方が高めの傾向であった。Cs-137濃度は東京電力（株）福島第一原子力発電所事故前の他府県の測定結果と同程度であった。

[キーワード：ヨモギ, 環境放射能, バックグラウンド, 岡山県]

[Key words : Mugwort, Environmental Radiation, Background, Okayama Prefecture]

1 はじめに

岡山県では国立研究開発法人日本原子力研究開発機構人形峠環境技術センター（以下「人形峠センター」という。）周辺において環境放射線等の監視測定を昭和54年度から継続して行っている。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。）での事故を契機として、原子力災害発生時の施設からの放射性物質または放射線による周辺環境への影響を適切に評価する観点から、平常時における環境放射線等のレベルを把握しておくことが重要となっている。ちなみに、福島第一原発事故後、環境放射能水準調査（原子力規制庁委託）においてモニタリングが強化されているが、岡山県において福島第一原発事故の影響は認められていない。

そこで、岡山県では人形峠センター周辺の環境放射線等測定結果の評価を補完するため、県内の環境放射線等のバックグラウンドレベルを把握することを目的として、平成24～26年度に空間γ線線量率、土壌及び河川水中の放射性核種濃度等についてのバックグラウンド調査を実施してきた^{1)～4)}。平成27年度～29年度は生物質を対象として調査を行うこととし、県内に広域的に分布が認められ、比較的採取が容易な指標生物⁵⁾であるヨモギを対象とした。平成27年度は夏季に調査を行ったが⁶⁾、平成28年度は秋季に調査を実施したので結果を報告する。

2 調査方法

2.1 調査地点

既報^{1)～4) 6)}と同様に岡山県を図1に示すように16メッシュに区切り、このうち海域や山間部等が大半を占める等により試料採取が困難な3つのメッシュを除く13メッシュを調査対象エリアとした。各エリアの調査地点を表1に示すが、C4については人形峠センター周辺の3地点、その他のエリアについては平成24年度から平成26年度に調査を行った河川水の採取地点周辺を調査地点とした。



図1 県内メッシュ調査図

表1 ヨモギの調査地点一覧

測定エリア	調査地点
A1	浅口市鴨方町六条院東地内
A2	高梁市中井町西方地内
A3	新見市西方地内
B1	倉敷市真備町箭田地内
B2	岡山市北区御津虎倉地内
B3	真庭市江川地内
B4	真庭市蒜山下長田地内
C1	岡山市南区藤田地内
C2	岡山市中区桜橋地内
C3	津山市中島地内
D2	和気郡和気町尺所地内
D3	美作市栄町地内
C4	天王地区
	赤和瀬地区
	中津河地区

2.2 調査時期

平成27～29年度の調査では季節別の調査を行うこととしており、平成28年度は秋季（9月）に調査を行った。

2.3 調査項目及び測定方法等

測定項目はヨモギに含まれる放射性核種濃度及びふっ素（以下「F」という。）濃度とし、試料の採取、前処理及び測定等については文部科学省放射能測定法シリーズ⁷⁾に準拠して行った。

2.4 放射性核種濃度及びF濃度の測定

採取したヨモギは茎や枯れ葉等を取り除き、葉部を分析対象試料とした。葉部は生重量を測定した後に水洗し、それぞれの測定項目に応じて前処理及び試料調製を行った。

ウラン238（以下「U-238」という。）測定については、 α 線波高分析装置（CANBERRA製 α -Analyst）を用いて測定した。

ラジウム226（以下「Ra-226」という。）測定については、 2π ガスフロー自動測定装置（日立アロカメディカル製LBC-4311B）を用いて測定した。

F測定については、Fイオン電極法⁸⁾に準じて行い、Fイオンメーター（サーモフィッシャーサイエンティフィック製VERSA STAR）を用いて測定した。測定には乾燥試料を用いたが、参考として水分率から生重量あたりのF濃度への換算を行った。

セシウム134及びセシウム137（以下「Cs-134」及び

「Cs-137」という。）測定については、ゲルマニウム半導体検出器（CANBERRA製GR-3019）を用い、灰試料をU-8容器に詰めて80,000秒測定した。

なお、放射線計測による測定結果については、計数誤差の3倍を超えた場合を有意値とし、それ以下の場合是不検出（ND）とし、計数誤差の3倍に不等号を付して表記した。

3 結果及び考察

ヨモギの放射性核種濃度及びF濃度の測定結果について、平成28年度の測定結果を表2に示す。U-238濃度は0.003～0.035 Bq/kg生、Ra-226濃度はND～1.37 Bq/kg生、F濃度は0.5～1.5 mg/kg乾、Cs-134濃度は全地点でND、Cs-137濃度はND～0.32 Bq/kg生であった。

U-238濃度及びF濃度は平成27年度と同様にA1、B1、C1等の県南で高めの傾向であった。また、Ra-226濃度は県南で高めの傾向であった他、人形峠センター周辺（C4）で最も高かった。

人形峠センター周辺（C4）とその他のエリアの測定値（U-238、Ra-226、F（乾））の範囲を比較した結果について、平成28年度の結果を図2に示す。U-238濃度は人形峠センター周辺（C4）で平均値：0.007 Bq/kg生（測定値の範囲：0.004～0.011 Bq/kg生）、その他エリアで平均値：0.011 Bq/kg生（測定値の範囲：0.003～0.035 Bq/kg生）であり、平均値で比較すると人形峠センター周辺の方がやや低めの傾向であった。Ra-226濃度は人形峠センター周辺（C4）で平均値：1.06 Bq/kg生（測定値の範囲：0.75～1.37 Bq/kg生）、その他エリアで平均値：0.27 Bq/kg生（測定値の範囲：ND～0.51 Bq/kg生）であり、平均値で比較すると人形峠センター周辺の方が高めの傾向であった。F濃度は人形峠センター周辺（C4）で平均値：0.5 mg/kg乾（測定値の範囲：0.5～0.6 mg/kg乾）、その他エリアで平均値：0.7 mg/kg乾（測定値の範囲：0.5～1.5 mg/kg乾）であり、平均値で比較すると人形峠センター周辺の方がやや低めの傾向であった。

Ra-226濃度はU-238濃度に比べておよそ1桁高い値であったが、人形峠周辺の環境放射線等監視測定においても生物質（樹葉）の測定結果⁹⁾に同程度の違いが見られる。

Cs-137濃度は福島第一原発事故前である平成13～22年度（平成22年度は事故前の採取）の他府県（宮城県、福井県、京都府）の測定結果（ND～0.9 Bq/kg生）¹⁰⁾と同程度であった。

表2 ヨモギの放射性核種及びF濃度測定結果（平成28年度）

調査エリア	採取年月日	灰化率 (%)	U-238 (Bq/kg生)	Ra-226 (Bq/kg生)	F (mg/kg)			Cs-134 (Bq/kg生)	Cs-137 (Bq/kg生)	
					乾	生 (換算値)	水分率 (%)			
A1	H28.9.6	3.29	0.035 ± 0.004	0.49 ± 0.06	1.5	0.5	65.0	ND (<0.08)	ND (<0.07)	
A2	H28.9.14	2.08	0.004 ± 0.001	ND (0.02±0.02)	0.8	0.2	78.9	ND (<0.05)	0.18 ± 0.01	
A3	H28.9.12	1.76	0.003 ± 0.001	ND (0.04±0.02)	0.5	0.1	84.5	ND (<0.04)	0.24 ± 0.01	
B1	H28.9.6	2.74	0.013 ± 0.002	0.34 ± 0.05	0.5	0.1	68.8	ND (<0.06)	ND (<0.06)	
B2	H28.9.14	2.29	0.011 ± 0.002	0.25 ± 0.04	0.6	0.1	76.2	ND (<0.06)	ND (<0.06)	
B3	H28.9.12	1.94	0.004 ± 0.001	0.14 ± 0.03	0.5	0.1	82.2	ND (<0.04)	0.12 ± 0.01	
B4	H28.9.12	2.09	0.006 ± 0.001	0.23 ± 0.03	0.5	0.1	76.6	ND (<0.05)	0.14 ± 0.01	
C1	H28.9.1	3.53	0.032 ± 0.004	0.40 ± 0.06	0.7	0.2	67.3	ND (<0.08)	ND (<0.08)	
C2	H28.9.1	2.96	0.010 ± 0.002	0.40 ± 0.05	0.5	0.2	65.9	ND (<0.07)	ND (<0.07)	
C3	H28.9.8	2.68	0.006 ± 0.001	0.17 ± 0.04	0.7	0.2	73.6	ND (<0.07)	0.18 ± 0.02	
D2	H28.9.8	2.56	0.007 ± 0.001	0.51 ± 0.06	0.9	0.2	73.9	ND (<0.06)	ND (<0.06)	
D3	H28.9.8	2.53	0.006 ± 0.001	0.23 ± 0.04	0.6	0.1	76.0	ND (<0.06)	ND (<0.06)	
測定値の範囲			0.003 ~ 0.035	ND ~ 0.51	0.5 ~ 1.5	0.1 ~ 0.5		ND	ND ~ 0.24	
平均値			0.011	<0.27	0.7	0.2		ND	<0.11	
C4	天王	H28.9.15	2.20	0.007 ± 0.001	1.07 ± 0.08	0.5	0.1	82.2	ND (<0.06)	0.12 ± 0.01
	赤和瀬	H28.9.15	2.53	0.011 ± 0.002	0.75 ± 0.07	0.5	0.1	74.6	ND (<0.06)	0.32 ± 0.02
	中津河	H28.9.15	2.28	0.004 ± 0.001	1.37 ± 0.08	0.6	0.1	78.6	ND (<0.06)	0.12 ± 0.01
	測定値の範囲			0.004 ~ 0.011	0.75 ~ 1.37	0.5 ~ 0.6	0.1		ND	0.12 ~ 0.32
	平均値			0.007	1.06	0.5	0.1		ND	0.19

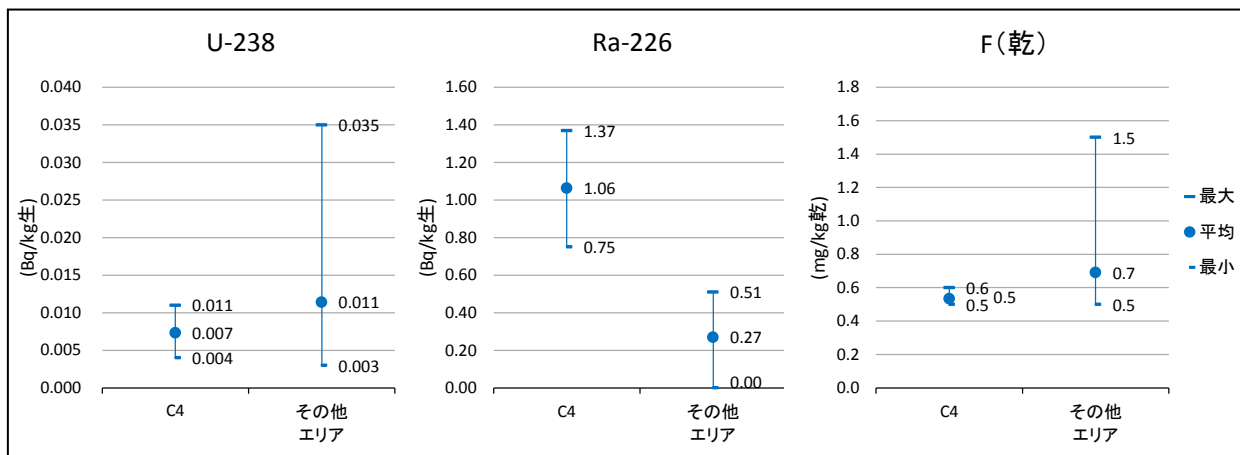


図2 人形峠センター周辺 (C4) とその他エリアの測定値 (U-238,Ra-226,F(乾)) の範囲の比較 (平成28年度)

4 まとめ

県内の環境放射線等のバックグラウンドレベルを把握することを目的として、平成27～29年度は指標生物であるヨモギを対象としてメッシュ調査を行うこととし、平成27年度の夏季調査(6月)に引き続き、平成28年度は秋季(9月)に調査を行った。

平成28年度の調査結果は、U-238濃度及びF濃度は県南

で高めの傾向であり、Ra-226濃度はU-238濃度等と同様の傾向であった他、人形峠センター周辺で最も高かった。また、人形峠センター周辺とその他のエリアで比較すると、U-238濃度とF濃度は人形峠センター周辺の方がやや低め、Ra-226濃度は人形峠センター周辺の方が高めの傾向であった。Cs-137濃度は福島第一原発事故前の他府県の測定結果と同程度であった。

なお、次年度は引き続き春季の県内のヨモギの放射能濃度等のバックグラウンドレベルを把握したいと考えている。

文 献

- 1) 森上嘉亮, 畑陽介, 清水光郎, 片岡敏夫, 小川登 :
岡山県内における環境放射能バックグラウンド調査,
岡山県環境保健センター年報, 37, 65-68, 2013
- 2) 森上嘉亮, 畑陽介, 清水光郎, 片岡敏夫, 小川登 :
岡山県内における環境放射能バックグラウンド調査
(第2報), 岡山県環境保健センター年報, 38, 29-33,
2014
- 3) 畑陽介, 清水光郎, 木下浩行, 片岡敏夫, 小川登 :
岡山県内における環境放射能バックグラウンド調査
(第3報), 岡山県環境保健センター年報, 39, 87-92,
2015
- 4) 畑陽介, 清水光郎, 木下浩行, 片岡敏夫, 小川登 :
岡山県内における環境放射能バックグラウンド調査
(第4報), 岡山県環境保健センター年報, 40, 39-46,
2016
- 5) 文部科学省 : 放射能測定法シリーズ (16), 環境試料
採取法, 1983
- 6) 畑陽介, 清水光郎, 木下浩行, 片岡敏夫, 小川登 :
岡山県内における環境放射能バックグラウンド調査
-ヨモギ- (第1報), 岡山県環境保健センター年報,
40, 47-50, 2016
- 7) 文部科学省 : 放射能測定法シリーズ
[http://www.kankyo-hoshano.go.jp/series/pdf_
series_index.html](http://www.kankyo-hoshano.go.jp/series/pdf_series_index.html)
- 8) 柳沢三郎 : 植物体中のフッ化物の測定法の検討, 環
境保健レポート, 8, 33-37, 1972
- 9) 岡山県 : 平成28年度人形峠周辺の環境放射線等測定
報告書 第39号, 2017
- 10) 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](http://search.kankyo-hoshano.go.jp/top.jsp)

【調査研究】

志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査（平成28年度）
Epidemiological investigation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (FY2016)

河合 央博, 仲 敦史, 畑 ますみ, 中嶋 洋 (細菌科)

Hisahiro Kawai, Atsushi Naka, Masumi Hata, Hiroshi Nakajima (Bacteriology Section)

要 旨

県内で発生する志賀毒素産生性大腸菌（以下「STEC」という。）感染症の感染源・感染経路の究明、発生予防や感染拡大防止対策の一助とすることを目的として、平成28年度に県内で分離されたSTEC菌株を収集し、疫学調査を行った。収集したヒト由来株64株のうち、O血清群157が39株（60.9%）で最も多かった。反復配列多型解析法等による遺伝子型別解析を実施した結果、家族内事例等、疫学的関連性がある菌株間では、すべて遺伝子型に関連が見られた。また、薬剤感受性試験では、STEC感染症治療の第一選択薬の一つであるホスホマイシンに対する耐性株が1株確認された。さらに、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生株も2株確認されたため、今後も薬剤耐性の調査を継続して行い、動向に注視する必要があると考えられた。

[キーワード：志賀毒素産生性大腸菌，疫学，反復配列多型解析，パルスフィールドゲル電気泳動，IS-printing System，薬剤耐性]

[Key words : shiga toxin-producing *Escherichia coli*, epidemiology, multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis, pulsed field gel electrophoresis, IS-printing System, drug-resistance]

1 はじめに

志賀毒素産生性大腸菌（以下「STEC」という。）感染症の発生は依然として全国的に続いている。岡山県でも多くの散発事例が発生しているが、感染源の特定が困難なため、効果的な感染予防や拡大防止対策を講じることが難しいのが現状である。そこで、当所では、県下で発生したSTEC感染症の感染源・感染経路の究明、さらには発生予防や感染拡大防止対策の一助とすることを目的として、ヒト由来STEC株について疫学調査を継続して実施している。これまででも反復配列多型解析法¹⁾ (multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis 以下「MLVA法」という。)等、遺伝子型別解析等により調査を行ってきたが、平成28年度は、調査内容を充実させるため、これらに加え、志賀毒素遺伝子（以下「stx」という。）サブタイプ型別試験及び薬剤感受性試験を実施し調査を行ったので報告する。

2 材料及び方法

2.1 菌株

県内のヒトから分離されたSTEC 64株を収集し、遺伝子型別、薬剤感受性試験等を実施し、疫学情報と合わせて解析した。

2.2 検査法

2.2.1 血清型別試験

病原性大腸菌免疫血清（デンカ生研）を用いて血清型別試験を実施し、O血清群及びH血清型を決定した。また、市販血清で同定できなかった菌株の血清型別試験は、感染研で実施した。

2.2.2 stx及びインチミン遺伝子（以下「eae」という。）

検出試験

stx及びeaeの検出は、井口ら²⁾の報告によるPCR法に準拠し、stx1, stx2及びeaeの3種類の遺伝子を対象としたマルチプレックスPCR法により実施した。

2.2.3 stxサブタイプ型別試験

Scheutzら³⁾の報告に準拠し、stx1は3種類 (stx1a, stx1c, stx1d), stx2は7種類 (stx2a, stx2b, stx2c, stx2d, stx2e, stx2f, stx2g) のサブタイプ型別を実施した。

2.2.4 MLVA法及びパルスフィールドゲル電気泳動法（以下「PFGE法」という。）による遺伝子型別解析

O26, O111及びO157株については、MLVA法による遺伝子型（以下「MLVA型」という。）の解析を、O26, O111及びO157以外のO血清群株については、PFGE法による遺伝子型（以下「PFGE型」という。）の解析を感染研で実施した。

2.2.5 IS-printing System（以下「IS法」という。）によ

る遺伝子型別解析

O157株については、IS-printing System (TOYOBO) を用いて遺伝子型（以下「IS型」という。）の解析を実施した。IS型は、2種類のプライマーセット（1st set及び2nd set primer）ごとに、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定し、高分子量側のバンドから3バンドごとに、順に「1」、「2」、「4」の係数を乗じて加算した数値を1st set, 2nd setの順に並べた12桁のコードとして表した。

2.2.6 薬剤感受性試験

センシ・ディスク（日本ベクトン・ディッキンソン）を用い、Kirby-Bauer法により薬剤感受性試験を実施した。薬剤はアンピシリン（ABPC）、セファゾリン（CEZ）、

セフメタゾール（CMZ）、セフォタキシム（CTX）、セフェピム（CFPM）、イミベネム（IMP）、メロベネム（MEPM）、カナマイシン（KM）、テトラサイクリン（TC）、クロラムフェニコール（CP）、ホスホマイシン（FOM）、ナリジクス酸（NA）、ノルフロキサシン（NFLX）、レボフロキサシン（LVFX）、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤（ST）の15種類を用いた。

2.2.7 基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（以下「ESBL」という。）の検出

薬剤感受性試験の結果、CTXに耐性を示した菌株については、感染研が示した薬剤耐性菌研修会資料（2016年9月修正ver.3）記載のクラブラン酸・スルバクタム含有ディ

表1 ヒト由来STEC月別検出状況

月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
株数	5	2	3	5	11	19	10	6	1	0	2	0	64
%	7.8	3.1	4.7	7.8	17.2	29.7	15.6	9.4	1.6	0.0	3.1	0.0	

表2 ヒト由来STECの血清型、Stx型等

血清型	Stx型	stxサブタイプ	eae	株数(%)	患者数 (有症者数)	重症者数		無症状 病原体 保菌者数
						HUS+血便	血便	
O22:H45	Stx2	不明	—	1(1.6)	0	0	0	1
O26:H11	Stx1	stx1a	+	7(10.9)	5	0	1	2
	Stx2	stx2a	+	2(3.1)	1	0	1	1
O77:H18	Stx2	stx2a	—	1(1.6)	0	0	0	1
O91:H-	Stx1	stx1a	—	1(1.6)	0	0	0	1
O103:H2	Stx1	stx1a	+	2(3.1)	0	0	0	2
O109:H-	Stx2	stx2a	+	2(3.1)	0	0	0	2
O111:H8	Stx1	stx1a	+	1(1.6)	1	0	0	0
O121:H19	Stx2	stx2a	+	1(1.6)	1	0	0	0
O145:H-	Stx2	stx2a	+	3(4.7)	1	0	1	2
O152:H8	Stx1	stx1a	—	1(1.6)	1	0	0	0
O157:H7	Stx1	stx1a	+	1(1.6)	1	0	1	0
	Stx2	stx2a	+	1(1.6)	1	0	1	0
		stx2c	+	1(1.6)	1	0	0	0
		stx2a+stx2c	+	5(7.8)	4	1	2	1
O157:H-	Stx1	stx1a	+	7(10.9)	3	0	1	4
	Stx1,2	stx1a+stx2c	+	3(4.7)	3	0	0	0
O165:H-	Stx2	stx2a+stx2c	+	1(1.6)	1	0	0	0
O174:H21	Stx2	stx2a	—	1(1.6)	0	0	0	1
		stx2c	—	1(1.6)	0	0	0	1
計				64	40	1	21	24

スクによるESBL産生のスクリーニング試験と、Shibataら⁴⁾及びYagiら⁵⁾の報告を参考にしたPCR法により、ESBL産生遺伝子(TEM型, SHV型, CTX-M-1group, CTX-M-2group, CTX-M-9group)の検出を行った。

3 結果及び考察

平成28年度のヒト由来STECの月別検出状況を、表1に示した。

ヒト由来STECは、例年は7月から8月の夏季に多く検出されるが、平成28年度は9月が19株(29.7%)と最も多く検出され、若干ではあるが検出ピークが遅い傾向が見られた。また、10月、11月もそれぞれ10株(15.6%)、6株(9.4%)検出され、例年と比べると秋季の検出数も多かった。

ヒト由来STECの血清型、志賀毒素(以下「Stx」という。)型、*stx*サブタイプ、*eae*保有の有無及びSTEC感染者の症

状を、表2に示した。

ヒト由来STECは、O157が39株(60.9%)、O26が9株(14.1%)と、例年と同様にこの2つのO血清群が多く、全体の75.0%を占めた。O157及びO26以外では、O22、O77、O91、O103、O109、O111、O121、O145、O152、O165及びO174と、例年よりも多種類のO血清群が検出された。*Stx*型は*Stx1*型が20株、*Stx2*型が20株、*Stx1,2*型が24株であった。*stx*サブタイプでは、*stx1a*が20株、*stx2a*が11株、*stx2c*が2株、*stx2a+stx2c*が6株、*stx1a+stx2a*が21株、*stx1a+stx2c*が3株で、1株(O22:H45(*Stx2*))は不明であった。*stx*サブタイプを血清型及び*Stx*型から見ると、O157:H7(*Stx2*)が*stx2a*、*stx2c*、*stx2a+stx2c*の3種類に、また、O174:H21(*Stx2*)は*stx2a*、*stx2c*の2種類に型別されたが、これら以外の同じ血清型及び*Stx*型の菌株は、1種類の*stx*サブタイプであった。また、*Stx1*型については、すべての*stx*サブタイプが*stx1a*であった。*eae*はO22、O77、O91、O152及びO174の6株を除く58株(90.6%)が保有していた。

平成28年度に菌株を収集したSTEC感染者数64名の内訳は、患者(有症者)が40名で、無症状病原体保有者(以下「保菌者」という。)は24名であった。患者のうち、溶血性尿毒症症候群(以下「HUS」という。)あるいは血便を呈した重症の患者(以下「重症者」という。)は22名(血便:21名、HUS+血便:1名)であった。

重症者から分離されたSTECは、O157が最も多く19株、次いでO26が2株、O145が1株で、これらはすべて*eae*を保有しており、*eae*非保有株では重症者は見られなかった。また、患者分離株の*eae*保有率は97.5%(39株/40株)で、

表3 ヒト由来STECの*eae*保有・非保有別患者数等

<i>eae</i>	患者(有症者)		無症状病原体保菌者	
	件数	%	件数	%
+	39	97.5%	19	79.2%
-	1	2.5%	5	20.8%
計	40		24	

表4 ヒト由来STECの*stx*サブタイプ別患者数及び重症者数

<i>stx</i> サブタイプ	株数	患者数 (有症者数)	重症者数 (血便あるいはHUSを呈した者)	
			重症者数 (血便あるいはHUSを呈した者)	有症者に対する重症者の割合(%)
<i>stx1a</i>	20	11	3	27.3
<i>stx2a</i>	11	4	3	75.0
<i>stx2c</i>	2	1	0	0.0
<i>stx2a+stx2c</i>	6	5	3	60.0
<i>stx1a+stx2a</i>	21	16	13	81.3
<i>stx1a+stx2c</i>	3	3	0	0.0
不明	1	0	0	—
計	64	40	22	

保菌者分離株の79.2% (19株/24株) と比べ高かった (表3)。これらのことから、STECの*eae*保有はSTEC感染症の発症、重症化に関与していることが示唆された。一方、*stx*サブタイプでは、*stx1a*及び*stx2a*保有株は重症者が見られたが、*stx2c*単独保有株では、症例数が少ないが重症者は見られなかった (表4)。*eae*は、STECの腸管付着に関与する重要な病原因子で、HUSのリスク因子とされている⁶⁾。また、*stx*サブタイプについては、*stx2a*保有株が他のサブタイプ保有株に比べて病原性が高い可能性を示唆する報告⁷⁾もあることから、今後、*eae*保有や*stx*サブタイプとSTEC感染症の発症あるいは重症化の関係について、さらに多くの菌株を用いて検証する必要があると思われる。

ヒト由来STECのMLVA法あるいはPFGE法によるクラスター解析結果を、表5に示した。

MLVA型あるいはPFGE型で遺伝子型が一致したものを同一クラスターとして分類した。なお、MLVA法ではリピート数が1遺伝子座で異なるsingle locus variantのMLVA型 (以下、「MLVAcomp型」という。) も同一クラスターに分類し、PFGE法ではバンドパターンの相違数が3バンド以内のものを同一クラスターに含めた。また、O157株についてはIS型を加えた。その結果、STEC64株のうち37株が13種類のクラスターに分類された。具体的には、O157:H7 (Stx1, 2) の15株は4種類のクラスター (クラスター B, C, D, E) に分類され、O157:H- (Stx1) の7株は2種類のクラスター (クラスター F, G), そし

表5 ヒト由来STECのMLVA法あるいはPFGE法によるクラスター解析結果

クラスター	血清型 (Stx型)	<i>stx</i> サブタイプ	菌株No	事例種	MLVA型	MLVAcomp型	IS型	PFGE型
A	O157:H7 (Stx2)	<i>stx2a + stx2c</i>	1	散発事例	17m0013		301457610642	
			2	散発事例				
B	O157:H7 (Stx1,2)	<i>stx1a + stx2a</i>	3	グループ事例①	16m0389		317577211757	
			4					
			5					
			6					
C	O157:H7 (Stx1,2)	<i>stx1a + stx2a</i>	7	散発事例	16m0093	16c070	317577211756	
			8	グループ事例②				
			9		16m0391			
			10					
D	O157:H7 (Stx1,2)	<i>stx1a + stx2a</i>	11	グループ事例③	16m0228	16c010	717557611657	
			12	散発事例				
			13					
			14					
			15	16m0317				
E	O157:H7 (Stx1,2)	<i>stx1a + stx2a</i>	16	散発事例	16m0079	16c078	717557611657	
			17	散発事例	16m0419			
F	O157:H- (Stx1)	<i>stx1a</i>	18	グループ事例④	16m0329		311057310455	
			19					
			20	散発事例				
			21					
			22					
G	O157:H- (Stx1)	<i>stx1a</i>	23	グループ事例⑤	16m0390		317175611755	
			24					
H	O157:H- (Stx1,2)	<i>stx1a + stx2c</i>	25	散発事例	16m0240		215457311656	
			26	散発事例				
I	O26:H11(Stx1)	<i>stx1a</i>	27	グループ事例⑥	16m2064			
			28					
J	O26:H11(Stx2)	<i>stx2a</i>	29	グループ事例⑦	16m2080			
			30					
K	O103:H2 (Stx1)	<i>stx1a</i>	31	散発事例				同一バンドパターン
			32	散発事例				
L	O109:H- (Stx2)	<i>stx2a</i>	33	グループ事例⑧				同一バンドパターン
			34					
M	O145:H- (Stx2)	<i>stx2a</i>	35	グループ事例⑨				同一バンドパターン
			36					
			37					

て、O157:H7 (Stx2) の2株、O157:H- (Stx1, 2) の2株、O26:H11 (Stx1) の2株、O26:H11 (Stx2) の2株、O103:H2 (Stx1) の2株、O109:H- (Stx2) の2株及びO145:H- (Stx2) の3株はそれぞれ1種類のクラスター（順にクラスター A, H, I, J, K, L, M）に分類された。

平成28年度は、家族内感染等、菌株間に疫学的関連性があるグループ事例は9件（グループ事例①～⑨）であった。O157株によるグループ事例③、④、⑤ではMLVA型及びIS型が、O26株によるグループ事例⑥、⑦はMLVA型が、そしてO109株によるグループ事例⑧はPFGE型が各事例内の菌株間で完全に一致した。O157株によるグループ事例①では、MLVA型は事例内の4株すべてが「16m0389」と完全に一致したが、IS型では菌株No.3,4,5の3株が「317577211757」、菌株No.6が「217577211747」と一部異なる結果となった。「217577211747」は「317577211757」の1st setの「1-01」及び2nd setの「2-13」の2バンドが無い菌株で、この2バンドは共に同一のゲノム領域に由来する箇所であった。このことから、菌株No.6のIS型は、何らかの遺伝的变化により一度に2バンドが脱落したものと推測され、菌株No.6は菌株No.3, 4, 5と同一由来株あるいは類縁株であると考えられた。O157株によるグループ事例②では、菌株No.8, 9, 10の3株は、IS型は完全に一致した。しかし、MLVA型は菌株No.8, 9が「16m0093」、菌株No.10が「16m0391」と異なったが、すべてMLVAcomp型が「16c070」と一致したためこれら3株は同一由来株あるいは類縁株であると考えられた。また、O145株によるグループ事例⑨では、PFGE型が菌株No.35及び36は同一であり、No.37はこれらと3バンドの相違であったため、これら3株は同一由来株あるいは類縁株であることが考えられた。以上のことから、平成28年度のグループ事例すべては、遺伝子型別解析によりそれぞれの事例内の菌株間での関連性が考えられ、それぞれが同一由来株あるいは類縁株によるものであることが示された。

また、今回、異なる事例で同一のMLVA型またはMLVAcomp型、あるいはPFGE型となるクラスターが多数確認された（クラスター A, C, D, E, F, H, K）。遺伝子型が同一となる等、遺伝子型から関連性が考えられる事例について保健所等から疫学情報を収集して解析したが、事例間の疫学的関連性はすべて不明であり、感染源・感染経路等の究明には至らなかった。当所では、収集したSTECについてMLVA型等の遺伝子型を中心に、血清型別試験等各種検査結果と疫学情報を併せた菌株データベースの構築を進めている。充実したデータベースの構築によって、事例が発生した際にデータベース内

のデータと比較することで事例間の関連性を解明し、感染源・感染経路等の究明に役立てるとともに、散在的集団発生（Diffuse outbreak）の発見も可能となり、感染拡大防止にも役立つと考えている。しかしながら、異なる事例間で同一遺伝子型が検出された場合に、疫学情報が不足して関連性の調査が進展しないケースが多いため、いかに有益な疫学情報を収集するか、どのような方法で収集するか等、疫学情報の収集方法等について、今後、検討が必要であると考えられた。

一方、O157株で実施したIS法の結果に着目すると、異なるクラスター間でIS型が一致するものが確認された。これらはクラスター DとEで、MLVAcomp型が異なるクラスターであったが、共に同一のIS型「717557611657」に分類された。しかし、クラスター Dの菌株のMLVA型「16m0228」、「13m0694」及び「16m0317」と、クラスター Eの菌株のMLVA型「16m0079」及び「16m0419」では、リピート数が異なる領域数は4～6カ所であったことから、クラスター DとEの類似度は低いと思われた。IS法に比べMLVA法やPFGE法はより詳細な解析が可能であると考えられており8)、今回の結果からもその傾向が推察された。このことから、疫学調査では、手技が非常に簡便で迅速に遺伝子型別解析が行える利点があるIS法を迅速スクリーニング法として使用し、さらに、MLVA法あるいはPFGE法を組み合わせる行うことが有効であると思われた。

ヒト由来STECの薬剤感受性試験結果を、図1及び表6に示した。

15種類の薬剤のうち、いずれかの薬剤に対して耐性を示した菌株が18株（28.1%）確認された。O血清群では、O157は5株、O26は4株、O145は3株、O103は2株、O91, O111, O165及びO174は各1株であった。耐性を示した薬剤は、試験した15種類のうち、ABPC, CEZ, CTX, TC, CP, FOM, NA及びSTの8種類で、TCが最も多く12株、次いでABPCが11株であった。単剤のみに耐性を示す菌株だけでなく、複数の薬剤に耐性を示すものも確認され、最大で6剤に耐性を示すものもあった。

今回、O157:H7 (Stx1,2) の1株でFOM耐性が確認された。FOMは、平成9年に厚生労働省が示した「一次、二次医療機関のための腸管出血性大腸菌（O157等）感染症治療の手引き」で、NFLX, KM及びニューキノロン系抗菌薬とともにSTEC感染症治療の第一選択薬の一つとされ、臨床上極めて重要な抗菌薬である。今回、FOMに耐性を示す菌株は64株中1株のみであり、またFOM以外の第一選択薬であるNFLX, KM, LVFXに耐性を示す菌

株はなかった。しかし、FOMをはじめとする第一選択薬に対する耐性菌の出現やまん延は、STEC感染症の早期治療に支障をきたすだけでなく、感染拡大防止にも影響を及ぼす可能性があるため、今後も継続して薬剤耐性に関する動向調査を行う必要があると考えられた。

また、第三世代セファロスポリン系抗菌薬であるCTXに耐性を示すO157:H7 (Stx1,2) 1株及びO91:H- (Stx1) 1株が確認された。近年、STECにおいて、第三世代セファロスポリン系抗菌薬に対しても耐性を示すESBL産生株の報告^{9) 10)}がある。今回、CTX耐性株2株についてク

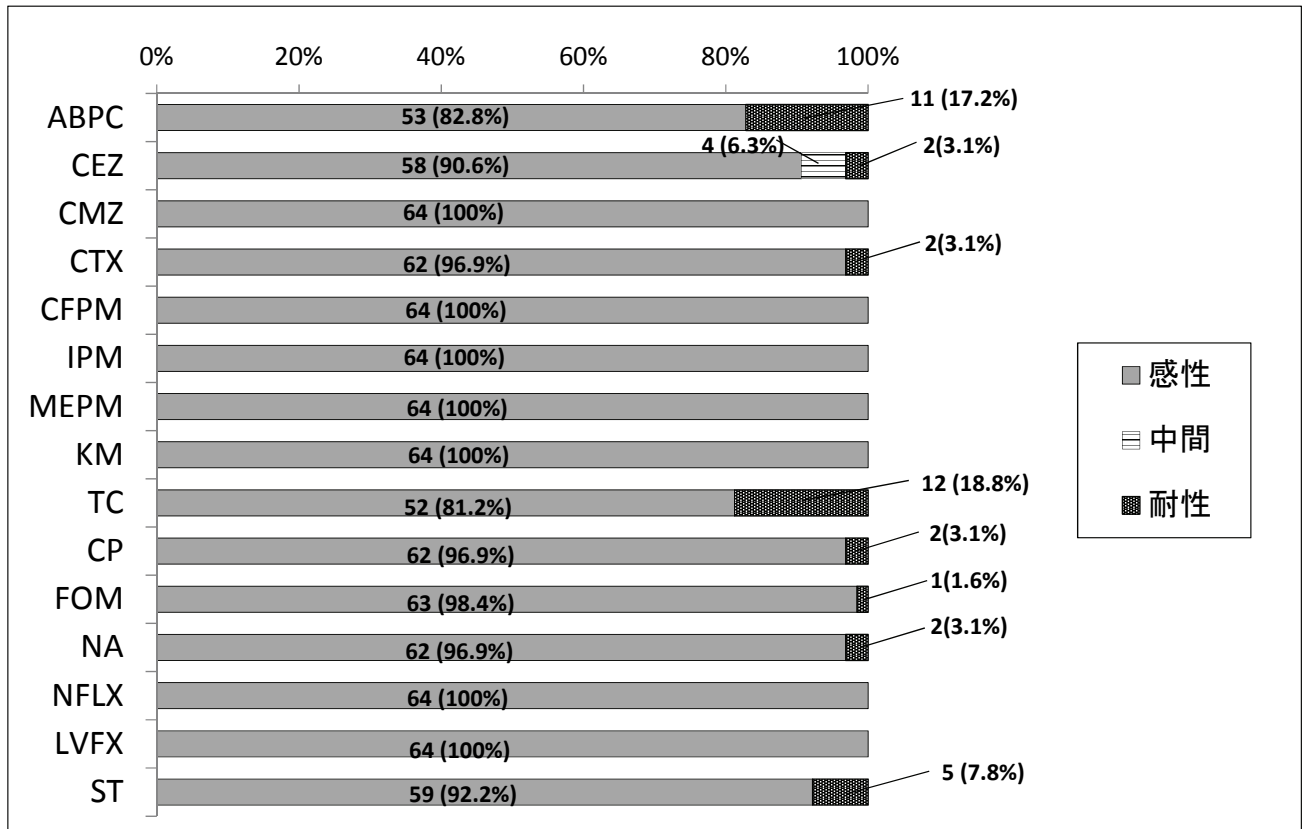


図1 ヒト由来STECの薬剤感受性試験結果 (薬剤別)

表6 ヒト由来STECの薬剤感受性試験結果 (O血清群別)

O血清群	株数	耐性株数	血清型 (Stx型)	薬剤耐性パターン (株数)	備考
O157	39	5	O157:H7(Stx2)	ABPC・TC (2)	ESBL (CTX-M-1group)
			O157:H7(Stx1,2)	ABPC・CEZ・CTX・FOM (1)	
			O157:H7(Stx1,2)	ABPC (2)	
O26	9	4	O26:H11(Stx1)	ABPC・TC・ST (2)	
			O26:H11(Stx1)	CP (2)	
O145	3	3	O145:H- (Stx2)	TC (3)	
O103	2	2	O103:H2(Stx1)	ABPC・TC・ST (2)	
O91	1	1	O91:H- (Stx1)	ABPC・CEZ・CTX・TC・NA・ST (1)	ESBL (CTX-M-9group)
O111	1	1	O111:H8 (Stx1)	TC・NA (1)	
O165	1	1	O165:H- (Stx2)	ABPC (1)	
O174	2	1	O174:H21 (Stx2)	TC (1)	
O22	1	0			
O77	1	0			
O109	2	0			
O121	1	0			
O152	1	0			
計	64	18			

ラブラン酸・スルバクタム含有ディスクによるESBL産生のスクリーニング試験を実施したところ2株とも陽性となり、また、ESBL産生遺伝子はO157:H7 (Stx1,2)からはCTX-M-Igroupが、O91:H- (Stx1)からはCTX-M-9groupが検出され、2株ともにESBL産生株であることが判明した。ESBL産生菌が起因菌となった場合、使用できる抗菌薬が制限され治療に苦慮することはもとより、ESBL産生遺伝子はプラスミド上に存在し、同一菌種間だけでなく腸内細菌科の異なる菌種間でも伝達され、容易に拡散や伝播がされる等の問題がある。このため、今後は、STECにおいてもESBL産生株の発生動向に注視していく必要があると考えられた。

謝 辞

本調査の実施に際して、MLVA型別等をお願いしました国立感染症研究所の泉谷 秀昌先生、伊豫田 淳先生、石原 朋子先生、薬剤耐性菌検査のご指導をいただきました国立感染症研究所の松井 真理先生、菌株の分与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) Hidemasa Izumiya, Yingxin Pei, Jun Terajima, Makoto Ohnishi, Tetsuya Hayashi et al. : New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups : O157,O26,and O111, *Microbiol Immunol*, 54, 569-577, 2010
- 2) 井口 純, 秋吉充子, 伊豫田淳, 大西 真: 腸管出血性大腸菌の主要なO血清群と病原性遺伝子を判定するOne-shotマルチプレックスPCR法の開発と評価, *日本食品微生物学会雑誌*, 32 (4), 215-218, 2015
- 3) Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G et al. : Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature, *J Clin Microbiol*, 50, 2951-2963, 2012
- 4) Naohiro Shibata, Hiroshi Kurokawa, Yohei Doi, Tetsuya Yagi, Kunikazu Yamane et al. : PCR classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 791-795, 2006
- 5) Tetsuya Yagi, Hiroshi Kurokawa, Naohiro Shibata, Keigo Shibayama, Yoshichika Arakawa : A preliminary survey of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan : *FEMS Microbiology Letters*, 184, 53-56, 2000
- 6) 仲西寿男,丸山 務監修:食品由来感染症と食品微生物, 281-296, 中央法規, 東京, 2009
- 7) 永井佑樹, 小林隆司, 小林章人, 赤地重宏:三重県における腸管出血性大腸菌感染症について Stxバリエーション解析とO157株のクレード解析, 三重県保健環境研究所年報, 第18号, 44-50, 2016
- 8) 中嶋 洋, 黒崎守人, 大島律子, 石井 学, 竹田義弘ら: 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究, 平成21年度 総括・分担研究報告書 (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), 87-93, 2010
- 9) 山口友美, 木村葉子, 矢崎知子, 後藤郁男, 畠山 敬ら: 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼを産生する腸管出血性大腸菌O15の遺伝子解析, 宮城県保健環境センター年報, 第30号, 27-30, 2012
- 10) 相原義之, 川又裕子, 増子京子: ESBL産生性腸管出血性大腸菌O26感染症分離菌株の薬剤耐性遺伝子について, 茨城県衛生研究所年報, No54, 39-42, 2016

【調査研究】

Rapid Determination System of Viral RNA Sequence ver.3.1の検出感度の改善 Improvement of Detection Sensitivity in Rapid Determination System of Viral RNA Sequence ver.3.1

木田浩司, 谷川徳行, 松岡保博, 磯田美穂子, 梶原香代子, 濱野雅子 (ウイルス科)

Kouji Kida, Noriyuki Tanikawa, Yasuhiro Matsuoka, Mihoko Isoda, Kayoko Kajihara, Masako Hamano
(Virology section)

要 旨

感染症発生動向調査事業において、上気道炎患者の咽頭拭い液からVeroE6細胞を用いて分離された未同定ウイルス2株について、RDV法 (Rapid Determination System of Viral RNA Sequence) ver.3.1による同定を試みたが、ウイルスゲノムは検出できなかった。そこで、本法の改良を目的として、エコーウイルス9型Hill株を用い、前処理工程及びRNA抽出工程における検出感度への影響を検証した。その結果、前処理工程のヌクレアーゼ処理によってウイルスゲノムが分解された可能性は否定された。また、RNA抽出工程においてキャリアRNAを添加することでウイルスゲノムの抽出効率が大きく改善し、その成績は原法で使用されるAgilent Total RNA isolation mini kitよりもQIAamp Viral RNA mini kitの方が優れていた。そこで、未同定ウイルス2株について、後者を用いたRDV法ver.3.1を実施したところ、1株はパラインフルエンザウイルス3型であることが確認された。同定できなかった1株については、同時に多数検出されたマイコプラズマの菌体及びゲノムを除去するため、前処理工程の前に遠心処理工程、さらにRNA抽出工程の後にDNase I処理工程を加え、再度RDV法ver.3.1を実施したところ、ヒトメタニューモウイルスであることが確認された。

[キーワード：RDV法, エコーウイルス, パラインフルエンザウイルス, ヒトメタニューモウイルス]

[Key words : Rapid Determination System of Viral RNA Sequence, Echovirus, Parainfluenza virus, Human Metapneumovirus]

1 はじめに

感染症発生動向調査事業 (以下「発生動向調査」という。)では、複数の株化細胞を用いることにより、多種多様な病原性ウイルスが分離される。これまで、これらの分離ウイルスの同定には、生物学的手法である中和試験、赤血球凝集試験等、また生化学的手法である蛍光抗体法、ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 等が用いられてきたが、近年では分子生物学的手法、特にPCR法が主流になってきている。PCR法は迅速性・特異性に優れた検査法であるが、それぞれのウイルスに特異的な塩基配列のプライマーが必要となる。そのため、ウイルス種が予測できない場合、検出系の選択自体が困難となる。また、一般にウイルスゲノム、とりわけRNAウイルスのゲノムは変異確率が高く、プライマー配列とのミスマッチにより、既存の検査系では検出できないウイルス株が生じることがある。

これらの未知ウイルス又は変異ウイルスを同定するため、これまでに様々な分子生物学的手法が開発されてきた。なかでも、遺伝子クローニングによる同定は、最も一般的に用いられてきた方法である。しかし、平成16年

に「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」が施行され、未同定ウイルスの遺伝子クローニングには文部科学大臣の確認が必要となった。また近年は、次世代シーケンサーにより、新種ウイルス等のゲノム解析が盛んに行われているが、機器、ランニングコストともに未だ高価なうえ、高度なデータ解析技術を要求される。そのため、これらの手法は、ほとんどの地方衛生研究所で導入できていないのが実情である。このような状況のなか、2007年、水谷らによって、未知のRNAウイルスのゲノムを短時間で検出・同定する網羅的遺伝子検出法であるRDV法 (Rapid Determination System of Viral RNA Sequence) が開発された¹⁾。RDV法は、遺伝子組換え生物や特別な機器を必要とせず、約3日でRNAウイルスの培養上清からのゲノム解析を可能とする画期的な方法であり、目的に応じて、様々なバージョンが開発されている^{2) 3) 4) 5)}。また、DNAウイルスに対応したRDV-D法も開発されている⁶⁾。

今回我々は、Watanabeらの報告したRDV法ver.3.1⁵⁾を導入し、発生動向調査で検出された未同定のウイルス2株について解析を行ったが、ウイルスゲノムは検出できな

かった。そこで、RDV法ver.3.1の工程を検証し、若干の操作を加えたところ、これらの同定に成功したので報告する。

2 材料と方法

2.1 ウイルス

2.1.1 未同定ウイルス

発生動向調査で採取した上気道炎を呈する患者の咽頭拭い液をVeroE6細胞に接種し、7.5μg/mLとなるようトリプシンを加えた無血清Eagle's Minimum Essential Medium (以下「E-MEM」という。)で培養して分離されたウイルス2株の培養上清を供試検体とした(以下「ウイルスA及びウイルスB」という。)

2.1.2 エコーウイルス9型Hill株

エコーウイルス9型(以下「E9」という。)Hill株をヒト羊膜由来株化細胞のFL細胞に接種し、2%ウシ胎児血清加E-MEMで培養し、その上清を供試検体とした。

2.2 RDV法ver.3.1 (原法)

RDV法ver.3.1の概略を図1に示した。今回はWatanabe

らの方法⁵⁾を基本とし、2次ライブラリー作成に用いる制限酵素をSau3AIからBfuCIに変更⁷⁾して実施した。2次ライブラリー用アダプター及びプライマー並びにシーケンス用プライマーの塩基配列を表1に示した。方法を要約すると、次のとおりである。

- ① 前処理:ウイルス培養上清88μLに対し、ヌクレアーゼ(DNAse I及びRNAse A)処理を行い、上清中の不要な核酸を除去した。
- ② RNA抽出:Agilent Total RNA isolation mini kit (Agilent Technology社製)を用いてウイルスゲノムRNAをnuclease free water 20μLに抽出した。
- ③ 逆転写反応:抽出したRNA 8μLを用いてSuperscript III (ThermoFisher scientific社製)とRNase Hを組み合わせ、2本鎖cDNAを合成した。
- ④ 1次ライブラリー:2本鎖cDNAをnuclease free waterで3倍希釈し、その10μLを用いてWhole Genome Amplification kit (Sigma Aldrich社製)により、DNAのフラグメンテーションとキット付属のアダプター付加を行った。次にAmplitaq Gold LD (ThermoFisher scientific社製)を用いて遺伝子増幅

表1 アダプター及びプライマー

使用目的	名称	塩基配列	塩基長
2次ライブラリー用 アダプター	RDV-Adaptor-BfuCI	5'-TGTCACGACTGAACCGAAC-3'	20
		5'-P-GATCGTTCGGTTCAGTCGTGGAC-3'	23
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAA-3'	21
		5'-P-CGTTTCGTAAGGGTATGCTCTCCGT-3'	24
2次ライブラリー 増幅用プライマー	RDV-Adaptor-BfuCI-1	5'-TGTCACGACTGAACCGAACGATCA-3'	25
	RDV-Adaptor-BfuCI-2	5'-TGTCACGACTGAACCGAACGATCT-3'	25
	RDV-Adaptor-BfuCI-3	5'-TGTCACGACTGAACCGAACGATCG-3'	25
	RDV-Adaptor-BfuCI-4	5'-TGTCACGACTGAACCGAACGATCC-3'	25
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-1	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTAA-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-2	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTAT-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-3	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTAG-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-4	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTAC-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-5	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTTA-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-6	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTTT-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-7	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTTG-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-8	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTTTC-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-9	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTGA-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-10	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTGT-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-11	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTGG-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-12	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTGC-3'	26
RDV-Adaptor-HpyCH4IV-13	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTCA-3'	26	
RDV-Adaptor-HpyCH4IV-14	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTCT-3'	26	
RDV-Adaptor-HpyCH4IV-15	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTCCG-3'	26	
RDV-Adaptor-HpyCH4IV-16	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTCC-3'	26	
シーケンス用 プライマー	RDV-Adaptor-BfuCI for Sequence	5'-TGTCACGACTGAACCGAACGATC-3'	24
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV for Sequence	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGT-3'	24

を行い、1次ライブラリーを作成した。

- ⑤ 2次ライブラリー：PCR産物精製キットである MonoFas（ジールサイエンス社製）を用いて増幅DNAを精製し、BfuCI及びHpyCH4IVによる消化後、アダプターを付加し、Amplitaq Gold PCR Master mix（ThermoFisher scientific社製）を用いて64通りのPCRを実施し、2次ライブラリーを作成した。
- ⑥ ダイレクトシーケンス：アガロースゲル電気泳動により、150bp以上の増幅産物を切り出し、MonoFasを用いて精製し、ダイレクトシーケンスを行った。得られた塩基配列について、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) BLAST検索を実施し、培養上清中のウイルスを同定した。

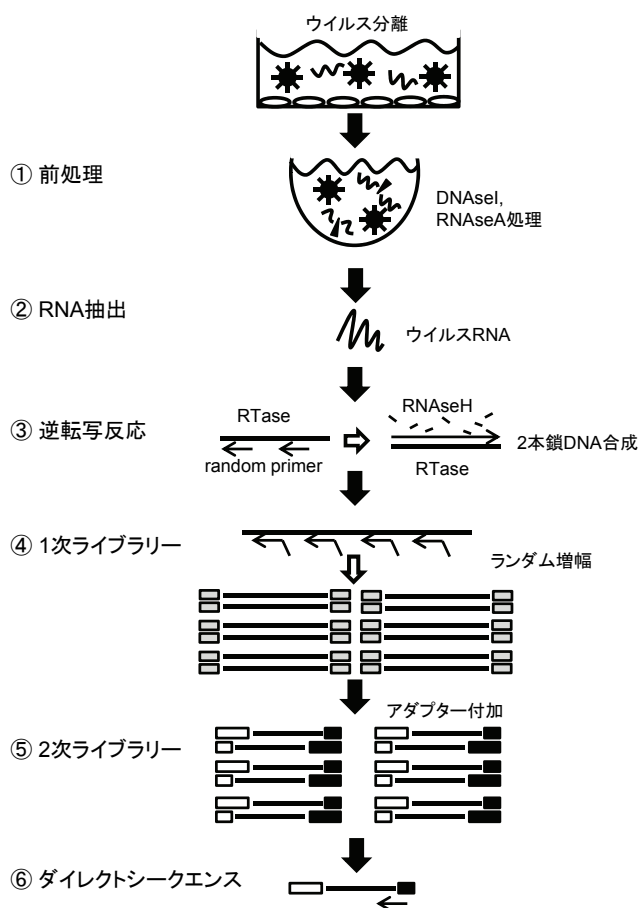


図1 RDV法ver.3.1の概略

2.3 RDV法ver.3.1前処理工程でのヌクレアーゼ処理によるウイルスゲノムへの影響

2.3.1 E9 Hill株のヌクレアーゼ処理

E9 Hill株の培養上清を $10^{-1} \sim 10^{-3}$ まで10倍階段希釈し、試験液とした。2.2①「前処理」の項に従いDNase I及びRNase Aによるヌクレアーゼ処理を実施した。対照試験

液には、ヌクレアーゼの代わりにNuclease Free Waterを用いた。

2.3.2 RNAの抽出

QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN社製)を用い、検体供与量140 μ Lとなるよう、不足分をPBS (-)で補い、添付マニュアルに従ってヌクレアーゼ処理試験液及び対照試験液からRNA抽出を行った。

2.3.3 逆転写反応

逆転写反応には、Superscript IIIを用いた。RNA抽出液8 μ Lに、pd(N) 6 random hexamer (0.5 μ g/ μ L Takara社製) 1 μ L及び10mM dNTPs 1 μ Lを加え、65 $^{\circ}$ Cで5分間加熱後ただちに氷中に移して急冷した。次に5x RT buffer 2.4 μ L, 0.1M DTT 1 μ L, Recombinant RNase Inhibitor (40U/ μ L Takara社製) 1 μ L, nuclease free water 4.6 μ L及びSuperScript III 1 μ Lを加えて20 μ Lとし、25 $^{\circ}$ C 10分間、50 $^{\circ}$ C 60分間及び98 $^{\circ}$ C 5分間反応させ、cDNAを合成した。

2.3.4 real-timePCR法によるE9 Hill株遺伝子の定量

各試験液から得られたcDNAは、以前我々が開発したE9 Hill株に対するreal-timePCR法^{8) 9)}を用いて定量した。

2.4 RNA抽出工程におけるキャリアRNA添加によるウイルスゲノム検出率への影響

2.4.1 試験液の調製とヌクレアーゼ処理

E9 Hill株の培養上清をreal-timePCR法を用いて定量し、 $10^8 \sim 10^1$ copies/88 μ Lとなるよう10倍階段希釈した。次に、2.2①「前処理」の項に従ってそれぞれをヌクレアーゼ処理し、試験液とした。

2.4.2 ウイルスゲノムRNAの抽出

Agilent Total RNA isolation mini kitについては、添付マニュアルに従い、試験液からウイルスゲノムRNAをnuclease free water 20 μ Lに抽出した。また、キャリアRNA添加試験として、マニュアル中の「Mini prefiltrationカラムを通過させた後の浄化ホモジネート」に対し、各試験液あたり20 μ gのPolyadenylic acid (Sigma Aldrich社製)をキャリアRNAとして添加し、他はマニュアルに従ってウイルスゲノムRNAをnuclease free water 20 μ Lに抽出した。

QIAamp Viral RNA mini kitについては、検体供与量140 μ Lとなるよう、不足分をPBS (-)で補い、添付マニュアルに従い、付属のキャリアRNAを添加してウイルスゲノムRNAをnuclease free water 60 μ Lに抽出した。

2.4.3 real-timePCR法によるE9 Hill株遺伝子の検出及び

定量

2.3.3に従い、逆転写反応を行った後、各試験液あたり3wellずつreal-timePCR法を実施し、E9 Hill株遺伝子の検出を試みた。また、 $10^5 \sim 10^3$ copies/88 μ Lの試験液については定量を行い、試験液あたりのウイルスゲノム量を次式で換算した。

Agilent Total RNA isolation mini kit：ウイルスゲノム量 = 定量値 x 10 x 20/8

QIAamp Viral RNA mini kit：ウイルスゲノム量 = 定量値 x 10 x 60/8

2.5 RDV法ver.3.1の条件検討

2.5.1 QIAamp Viral RNA mini kitによるウイルスゲノム抽出（検討No.1）

ウイルスA及びウイルスBを用い、RDV法ver.3.1を次のとおり変更して実施した。2.2のうち、②「RNA抽出」の項を変更し、QIAamp Viral RNA mini kitを用い、検体供与量140 μ Lとなるよう不足分をPBS (-) で補い、付属のキャリアRNAを添加し、ウイルスゲノムRNAをnuclease free water 60 μ Lに抽出した。

2.5.2 マイコプラズマの排除法の検討（検討No.2）

ウイルスBを15,000rpm 20分間遠心処理した上清を用い、2.2のうち、②「RNA抽出」の項を次のとおり変更してRDV法ver.3.1を実施した。

②RNA抽出及びDNase I処理：QIAamp Viral RNA mini kitを用い、検体供与量140 μ Lとなるよう、不足分をPBS (-) で補い、付属のキャリアRNAを添加し、ウイルスゲノムRNAをRT buffer 60 μ Lに抽出した後、Recombinant RNase Inhibitor 1 μ L及びDNase I 1 μ Lを加えて37 $^{\circ}$ Cで60分間、次いで75 $^{\circ}$ Cで5分間処理した。

また、対照として、ウイルスBを同様に遠心処理した上清を用い、2.4.2に従ってAgilent Total RNA isolation mini kitにキャリアRNAを添加して抽出したウイルスゲノムRNAについてもRDV法ver.3.1を実施した。

3 結果

3.1 RDV法ver.3.1（原法）による未同定ウイルスの同定

未同定のウイルスA及びウイルスBについて、RDV法ver.3.1（原法）を実施した。対照ウイルスとしてE9 Hill株を用いた。その結果、E9 Hill株については切り出しを行った2次ライブラリー14件のうち7件からE9 Hill株の塩基配列が確認されたが、ウイルスA及びウイルスBについては、いずれも2次ライブラリーに増幅産物が全く確認で

きなかった（データは示さない。）。

3.2 RDV法ver.3.1前処理工程でのヌクレアーゼ処理によるウイルスゲノムへの影響

RDV法ver.3.1（原法）では、RNA抽出工程の際のウイルス粒子溶解時に、前処理工程でウイルス培養上清に加えたヌクレアーゼの失活も同時に行われる。しかし、Miyoshiらは、ふん便検体においてはヌクレアーゼ処理を行わない方がノロウイルスゲノムの検出率が高いことを報告している¹⁰。このことから、RDV法ver.3.1（原法）でウイルスA及びウイルスBが検出できなかった一因がヌクレアーゼ処理にあった可能性が考えられた。そこで、 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ まで10倍階段希釈したE9 Hill株を用い、ヌクレアーゼ処理の有無で抽出されるウイルスゲノム量に差が生じるか、real-timePCR法によって検証した。その結果、 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ のいずれの希釈においても、ヌクレアーゼ処理によるウイルスゲノム量の低下はみられなかった（図2）。

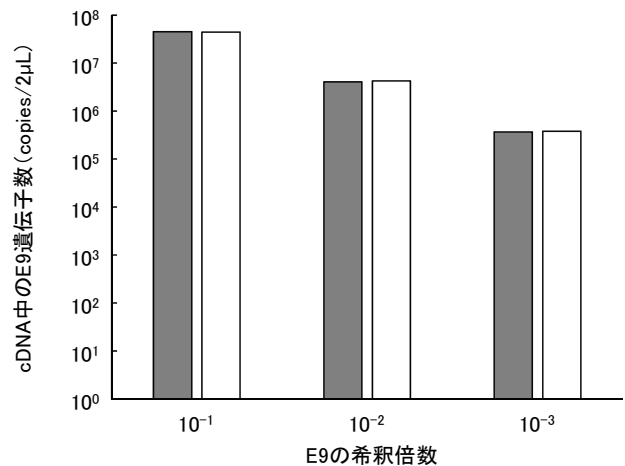


図2 E9培養上清のヌクレアーゼ処理によるE9遺伝子への影響

■ ヌクレアーゼ処理なし □ ヌクレアーゼ処理あり

3.3 RNA抽出工程におけるキャリアRNA添加によるウイルスゲノム検出率への影響

通常、カオトロピック効果を利用したカラム抽出キットを用いて微量のウイルスゲノムRNAを抽出する場合、担体としてキャリアRNAが用いられる。しかし、RDV法ver.3.1原法で使用するAgilent Total RNA isolation mini kitは、細胞、バクテリア等に多量に含まれるRNAを高純度で得ることを目的としたキットであるため、キャリアRNAの使用は想定されていない。そのため、ウイルスゲノムが低濃度であった場合、回収できない可能性が考えられた。そこで、RNA抽出工程におけるキャリア

表2 RNA抽出時におけるキャリアRNA添加によるE9遺伝子検出率への影響

RNA抽出キット ^{*1}	キャリアRNA	E9(copies/reaction)							
		10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
Agilent	無	3/3 ^{*2}	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	添加	ND ^{*3}	ND	ND	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3
QIAGEN	添加	ND	ND	ND	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3

検出限界の結果を太字で示した。

* 1 QIAGEN : QIAamp Viral RNA mini kit , Agilent : Agilent Total RNA Isolation Mini kit

* 2 検出数/試験数

* 3 Not Done

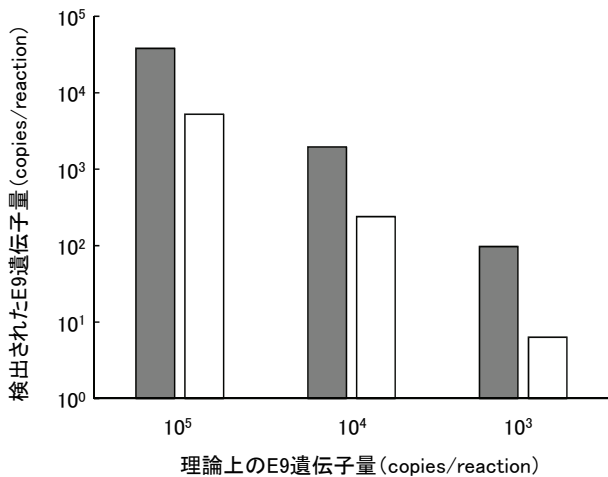


図3 キャリアRNA添加時における各社キットによる抽出効率の違い

- QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen)
- Total RNA Isolation Mini kit (Agilent)

RNA添加の有無によるウイルスゲノム抽出効率への影響について、10⁸～10¹copies/88μLに調製したE9 Hill株を用いて検証した。その結果、キャリアRNAを添加した場合は10²copies/88μLまで検出できたのに対し、非添加の場合は10⁶copies/88μLまでしか検出できなかった。また、微量のウイルスゲノムを検出することを目的としたQIAamp Viral RNA mini kitを用い、キャリアRNAを添加して同様の実験を行ったところ、Agilent Total RNA isolation mini kitと同様に10²copies/88μLまで検出できた(表2)。

そこで、10⁵～10³copies/88μLの試験液について、実際に検出されたウイルスゲノム量を両キットで比較したところ、いずれの試験液においてもQIAamp Viral RNA mini kitを用いた場合の検出遺伝子量が大きく、薄くなるほど差が広がることが確認された(図3)。特に、検出限界である10³copies/88μLでの両キットの値の差は大きく、約10倍もあった。

3.4 RDV法ver.3.1の条件検討

3.4.1 QIAamp Viral RNA mini kitによるウイルスゲノム抽出(検討No.1)

これまでに得られた結果から、RNA抽出キットをQIAamp Viral RNA mini kitに変更することでRDV法ver.3.1の検出感度が改善すると考えられたため、ウイルスA及びウイルスBに適用して同定を試みた。その結果、Aウイルスについては切り出した2次ライブラリー9件のうち7件でパラインフルエンザウイルス3型の塩基配列が確認された。しかし、ウイルスBについては、切り出した2次ライブラリー23件のうち9件がマイコプラズマゲノムであり、ウイルスゲノムは含まれていなかった(表3, 4)。

3.4.2 マイコプラズマの排除法の検討(検討No.2)

ウイルスBについては、培養上清中に存在すると考えられるマイコプラズマの除去を目的として15,000rpmで20分間遠心処理し、その上清をQIAamp Viral RNA mini kitを用いたRDV法ver.3.1に供した。対照として、キャリアRNAを添加したAgilent Total RNA isolation mini kitでも実施した。QIAamp Viral RNA mini kitについては、Agilent Total RNA isolation mini kitでは利用できる混入DNAの除去カラムが無いため、抽出RNA溶液をDNase Iで処理することによりRNA純度を高める工程を加えた。その結果、QIAamp Viral RNA mini kitでは切り出しを行った2次ライブラリー8件のうち1件から、Agilent Total RNA isolation mini kitでは9件のうち1件から、それぞれヒトメタニューモウイルスのゲノムを検出した(表3, 4)。また、マイコプラズマについては両キットとも検出されなかった。

4 考察

RDV法ver.3.1のRNAウイルスの検出感度は、おおむ

表3 検出されたウイルス遺伝子断片のBLAST検索結果

検体	検討No.	RNA抽出キット ^{*1}	検出ウイルスゲノムの塩基長(nt)	BLAST検索結果(株名) ^{*2}	Accession No.	位置	相同性(%)
ウイルスA	1	QIAGEN	91	パラインフルエンザウイルス3型(SC332)	KY369870	1262-1352	100
			58	パラインフルエンザウイルス3型(SC332)	KY369870	3129-3186	100
			123	パラインフルエンザウイルス3型(SC332)	KY369870	637-759	100
			96	パラインフルエンザウイルス3型(IWA32_2013)	LC076630	522-427	100
			167	パラインフルエンザウイルス3型(SC332)	KY369870	700-534	100
			118	パラインフルエンザウイルス3型(SC332)	KY369870	1292-1175	99
ウイルスB	2	Agilent	103	ヒトメタニューモウイルス(HMPV _{gz01})	GQ153651	3146-3044	100
		QIAGEN	153	ヒトメタニューモウイルス(HR2152-12)	KU375605	149-153	97

*1 QIAGEN : QIAamp Viral RNA mini kit , Agilent : Agilent Total RNA Isolation Mini kit

*2 BLAST検索の結果、最も相同性が高い株を示した

表4 RDV法ver3.1における条件検討結果

検体	検討No.	条件				ウイルスゲノムの検出率 ^{*2}	ウイルス種
		培養上清の遠心処理	RNA抽出キット ^{*1}	キャリアRNA	RNA抽出後のDNaseI処理		
ウイルスA	原法	無	Agilent	無	無	0/0	—
	1	無	QIAGEN	有	有	7/9	パラインフルエンザウイルス3型
ウイルスB	原法	無	Agilent	無	無	0/0	—
	1	無	QIAGEN	有	無	0/23	—
	2	有	Agilent	有	無	1/9	ヒトメタニューモウイルス
	2	有	QIAGEN	有	有	1/8	ヒトメタニューモウイルス

*1 QIAGEN : QIAamp Viral RNA mini kit , Agilent : Agilent Total RNA Isolation Mini kit

*2 検出されたウイルスゲノム断片の数 / シークエンスに供した遺伝子断片の数

ね10³copies/reactionであり、また1,000塩基未満のRNAを増幅することは困難とされている。感度を10³copies/reactionに改善したRDV法ver4.0がYamatoらによって報告されているが、RDV法ver.3.1と比較すると試薬が高価で長時間を要するという欠点がある⁴⁾。そこで今回我々は、RDV法ver.3.1を導入し、検出感度の改善法について検討した。

はじめに、RDV法ver.3.1の原法で、未同定ウイルスであるウイルスA及びウイルスBの同定を試みたが、ウイルスゲノムは検出できなかった。前処理工程のヌクレアーゼ処理によってウイルスゲノムが分解されている可能性を考え、E9 Hill株を用いて検証したが、否定された(図2)。これは、ふん便検体を用いてRDV法ver.3.1を実施したMiyoshiらの報告¹⁰⁾とは異なる結果だが、Miyoshiらの用いたRNase Aは、我々と比較して高濃度であったため、核酸溶出液によってRNase Aが失活するまでのわずかな時間に、むき出しになったウイルスゲノムが分解された可能性があると考えられた。

次に、RNA抽出工程におけるキャリアRNA添加の有無によるウイルスゲノム抽出効率への影響について、E9

Hill株を用いて検証した。その結果、Agilent Total RNA isolation mini kitを用いた場合、キャリアRNAを添加することによって抽出効率が4オーダー程度上昇することが明らかとなった(表2)。一方、QIAamp Viral RNA mini kitにキャリアRNAを添加した場合、抽出されたウイルスゲノムの検出限界はキャリアRNAを添加したAgilent Total RNA isolation mini kitと同様であったが、その定量値は10倍程度高かった。これらのことから、RNA抽出工程でのキャリアRNAの添加はウイルスゲノムの抽出効率に大きく影響し、RDV法ver.3.1にQIAamp Viral RNA mini kitを用いることで検出感度が改善すると考えられた(図3)。一般に、カオトロピック効果を利用したウイルスゲノムRNA検出キットでは、凝集した核酸のシリカへの結合効率を上げるため、キャリアRNAが用いられるが、今回の結果では予想以上の効果が認められた。これは、RDV法ver.3.1においては、抽出するウイルスゲノムの純度を高めるために、雑多な核酸を含むウイルス培養上清へのヌクレアーゼ処理を実施するが、結果的にRNA抽出カラムへ供する長鎖核酸量が減少し、ウイルスゲノムの抽出効率を低下させているものと考えられた。そこで、

QIAamp Viral RNA mini kitを用い、キャリアRNAを添加してRDV法ver.3.1を実施したところ、原法では増幅できなかった2次ライブラリーが得られ、ウイルスAについてはパラインフルエンザ3の塩基配列が確認された。しかし、ウイルスBについては切り出した2次ライブラリー23件のうち9件がマイコプラズマゲノムであり、ウイルスゲノムは含まれていなかった(表3, 4)。

多くの株化細胞がマイコプラズマの汚染を受けており、ウイルスの培養に用いることは望ましくないとされている⁷⁾。今回の結果から、当所で保有するVeroE6細胞がマイコプラズマに汚染されていることが明らかになった。ウイルスBからマイコプラズマゲノムが多数検出された理由として、マイコプラズマは微小であり、ウイルス培養液からVeroE6細胞を除去するために行った粗遠心処理では除去できなかった可能性が考えられた。また、ウイルスAからはマイコプラズマゲノムがほとんど検出されていないことから、RDV法ver.3.1では、培養上清中のウイルス濃度が低い場合に、上清中に存在するマイコプラズマゲノムが強く増幅されるものと考えられた。そこで、ウイルスBについて、マイコプラズマの除去を目的として前処理工程の前に遠心処理を実施した。さらに、キャリアRNAを添加したQIAamp Viral RNA mini kitによるRNA抽出工程の後にDNase I処理工程を加えてRDV法ver.3.1を実施したところ、マイコプラズマゲノムは検出されず、ヒトメタニューモウイルスのゲノムを1件検出した。このことから、前処理工程の前の遠心処理工程及びRNA抽出工程の後のDNase I処理工程は、RDV法ver.3.1の感度改善に一定の効果があると考えられた。但し、遠心処理については、サイズや密度の大きいウイルスの場合はマイコプラズマと共に沈殿してしまい、逆に感度が低下する可能性もあるので、適用は慎重に行うべきだろう。

発生動向調査において、株化細胞によって分離されるウイルスの中には、まれに同定不能なものが含まれる。その多くが新種ではなく既知のウイルスであると思われるが、同定不能に陥る要因として、一般的にはウイルスの変異によるプライマーのミスマッチ、経験不足による同定法の選択ミス等が考えられる。今回我々がRDV法ver.3.1を用いて同定したパラインフルエンザウイルス及びヒトメタニューモウイルスについては、新たに導入したVeroE6細胞で分離したため、細胞変性効果による種の予測ができなかったものである。RDV法ver.3.1は、遺伝子組換え技術を使用せず、特別な機器も使用しないため、このような場合には非常に強力な同定法となる。しか

し、地方衛生研究所で日常的に実施されている様々な検査法と比較すると操作が煩雑であるため、導入は進んでいない。今回、多くの地方衛生研究所で使用されているQIAamp Viral RNA mini kitを用いてRDV法ver.3.1の感度を改善することができたのは大きな成果であった。今後は、臨床検体等にも検索対象を広げ、発生動向調査の疫学解析の一助としたい。

文 献

- 1) Mizutani, T., Endoh, D., Okamoto, M., Shirato, K., Shimizu, H. *et al.* : Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses, *Emerging Infectious Diseases*, 13 (2), 322-324, 2007
- 2) Sakai, K., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Endoh, D. *et al.* : An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences for avian RNA virus, *Archives of Virology*, 152, 1763-1765, 2007
- 3) Watanabe, S., Mizutani, T., Sakai, K., Kato, K., Tohya, Y. *et al.* : Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV), *Journal of Clinical Virology*, 43, 56-59, 2008
- 4) Yamato, T., Eshita, Y., Kihara, Y., Sato, T., Kuroda, M. *et al.* : Novel virus discovery from field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver.4.0), *Archives of Virology*, 154, 153-158, 2009
- 5) Watanabe, S., Maeda, K., Suzuki, K., Ueda, N., Iha, K. *et al.* : Novel Betaherpesvirus in Bats, *Emerging Infectious Diseases*, 16 (6), 986-988, 2010
- 6) Maeda, K., Terakawa, J., Kiso, Y., Nakaichi, M., Endoh, D. *et al.* : Isolation of a novel adenovirus from a fruit bat (*Pteropus dasymallus yaeyamae*), *Emerging Infectious Diseases*, 14, 347-349, 2008
- 7) 田代真人, 牛島廣治編集: ウイルス感染症の検査・診断スタンダード: 羊土社, 294-300, 2011
- 8) 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
- 9) 木田浩司, 溝口嘉範, 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エコーウイルス9型Hill株を用いた核酸検出効率の評価, 岡山県環境保

健センター年報 38, 107-110, 2013

- 10) Miyoshi, M., Yoshizumi, S., Ishida, S., Komagome, R., Nagano, H. *et al.* : Usefulness of the rapid determination system of viral genome sequences in human stool specimens, *Journal of Virological Methods*, 179, 256-260, 2012

【調査研究】

胃腸炎ウイルスの疫学的研究

－岡山県の散発胃腸炎患者におけるロタウイルスAの流行状況（2015/2016シーズン）－

Epidemiological Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama

－Surveillance of Rotavirus A from Sporadic Gastroenteritis in Okayama Prefecture (2015-2016)－

梶原香代子, 濱野雅子, 木田浩司, 谷川徳行, 磯田美穂子, 松岡保博,
為房園実*, 井上勝**, 濃野信***, 金谷誠久**** (ウイルス科)

*岡山県感染症情報センター, **岡山赤十字病院小児科, ***のうの小児科,
****国立病院岡山医療センター小児科

Kayoko Kajihara, Masako Hamano, Kouji Kida, Noriyuki Tanikawa, Mihoko Isoda,
Yasuhiro Matsuoka, Sonomi Tamefusa*, Masaru Inoue**, Shin Nouno***, Tomohisa Kanadani****
(Virology Section)

*Okayama Prefectural Infectious Disease Surveillance Center,

**Department of Pediatrics, Okayama Red-Cross Hospital,

***Nouno Pediatric Clinic,

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

要 旨

2015/2016シーズン（2015年9月～2016年8月）の散発胃腸炎患者ふん便662件について、イムノクロマト法または酵素抗体法によるロタウイルスAの検索を行い、陽性となった63件について、VP7遺伝子及びVP4遺伝子を標的とした二系統の逆転写PCR法によりロタウイルスAの遺伝子検索を実施した結果、62件で遺伝子が確認された。この62件について、G遺伝子型別及びP遺伝子型別を実施したところ、G2P[4]が60件、G1P[8]及びG9P[8]がそれぞれ1件であった。2005/2006シーズン～2015/2016シーズンの11シーズンにおけるロタウイルスA遺伝子検出率、G遺伝子型の主流型及び感染性胃腸炎患者数を比較したところ、ワクチン導入後からロタウイルスA遺伝子検出率の低下及び感染性胃腸炎患者数の減少が見られた一方で、主流型となるG遺伝子型はシーズン毎に変化しており、特定の遺伝子型の継続的な流行は確認されなかった。これらのことから、現時点においては、ワクチンは効果的に機能しているものと推察された。

[キーワード：ロタウイルスA, 胃腸炎, 逆転写PCR, ワクチン]

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

1 はじめに

ロタウイルスA（以下「RVA」という。）は、レオウイルス科に属する2本鎖RNAをゲノムとして持つウイルスで、外殻糖たん白（VP7）及び外殻スパイクたん白（VP4）をコードする遺伝子に基づき、それぞれG（Glycoproteinの略号）遺伝子型及びP（Protease sensitiveの略号）遺伝子型に分類される¹⁾。現在までに、G遺伝子型についてはG1～G27、P遺伝子型についてはP[1]～P[35]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が、そのうちヒトから検出される頻度が高いのは、G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、

及びG9P[8]である^{1) 3)}。

RVAは小児の急性胃腸炎の病原体としてきわめて重要視されていることから、本ウイルスの感染制御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]）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）及びウシRVAにヒトRVAのG1～G4のVP7遺伝子とP[8]のVP4遺伝子を組み込んだ遺伝子組み換え株に由来する5価ワクチンであるRotaTeq[®]（メルク社製）が知られており、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

れ製造承認され導入が開始された。

2種類のワクチンに含まれるG遺伝子型は、それぞれRotarix[®]がG1, RotaTeq[®]がG1～G4のみと限られているため、ワクチンによる抑制を免れた遺伝子型が新たに流行する可能性が考えられた。そこで我々は、県内におけるRVA流行状況及び感染性胃腸炎患者数を継続的に調査し^{5)～10)}、2011/2012シーズンを境とするワクチン導入前後のRVA遺伝子検出率、G遺伝子型及び感染性胃腸炎患者数を比較解析することで、ワクチンの効果及び流行型への影響を把握してきた。2011/2012シーズンにはG1の遺伝子再集合体RVAの侵入が県内で初めて確認され¹¹⁾、2013/2014シーズンに主流型となったため⁹⁾、ワクチンの抑制効果が低いRVAが出現した可能性が危惧されたが、この流行は2014/2015シーズンにはほぼ終息した¹⁰⁾。一方、2014/2015シーズンに主流型となったG9¹⁰⁾は、ワクチンに含まれていないため、今後も流行が継続することが懸念された。

そこで2015/2016シーズンも、引き続き散発胃腸炎患者からのRVA遺伝子検出及び遺伝子型別を行い、県内の流行状況についてワクチンの影響等を解析した。また、G1の遺伝子再集合体RVAについても、存在の有無を確認した。

2 対象と方法

2.1 対象

2015年9月～2016年8月（毎年9月～翌年8月を1シーズンとする）に県内の3医療機関で採取された散発胃腸炎患者（年齢0歳～92歳）ふん便662件を用いた。

2.2 方法

市販のRVA検出キット（イムノクロマト法または酵素抗体法）によりRVAのスクリーニングを行い、陽性となった検体について、ふん便乳剤から市販キット（QIAamp Viral RNA mini kit, 株式会社キアゲン）によりRNAを抽出した。このRNAを用いて、Gouveaら¹²⁾の方法による逆転写PCR（以下「RT-PCR」という。）法でG遺伝子の検出及び型別を、Wuら¹³⁾の方法によるRT-PCR法でP遺伝子の検出及び型別を実施した。また、RVA遺伝子検出率、G遺伝子型の検出状況及び岡山県感染症発生動向調査に基づく定点医療機関あたり（以下「定点あたり」という。）の感染性胃腸炎患者数の推移について、11シーズン（2005/2006シーズン～2015/2016シーズン）で比較解析した。さらにG1P[8]と判定された株については、2011/2012シーズンに県内侵入が確認された遺伝子再集合体由来株であるか否かを簡易的に判別するため、NSP4遺伝子とNSP5/6遺伝子を増幅するRT-PCR法を実施し、産物サイズを比較した¹¹⁾。

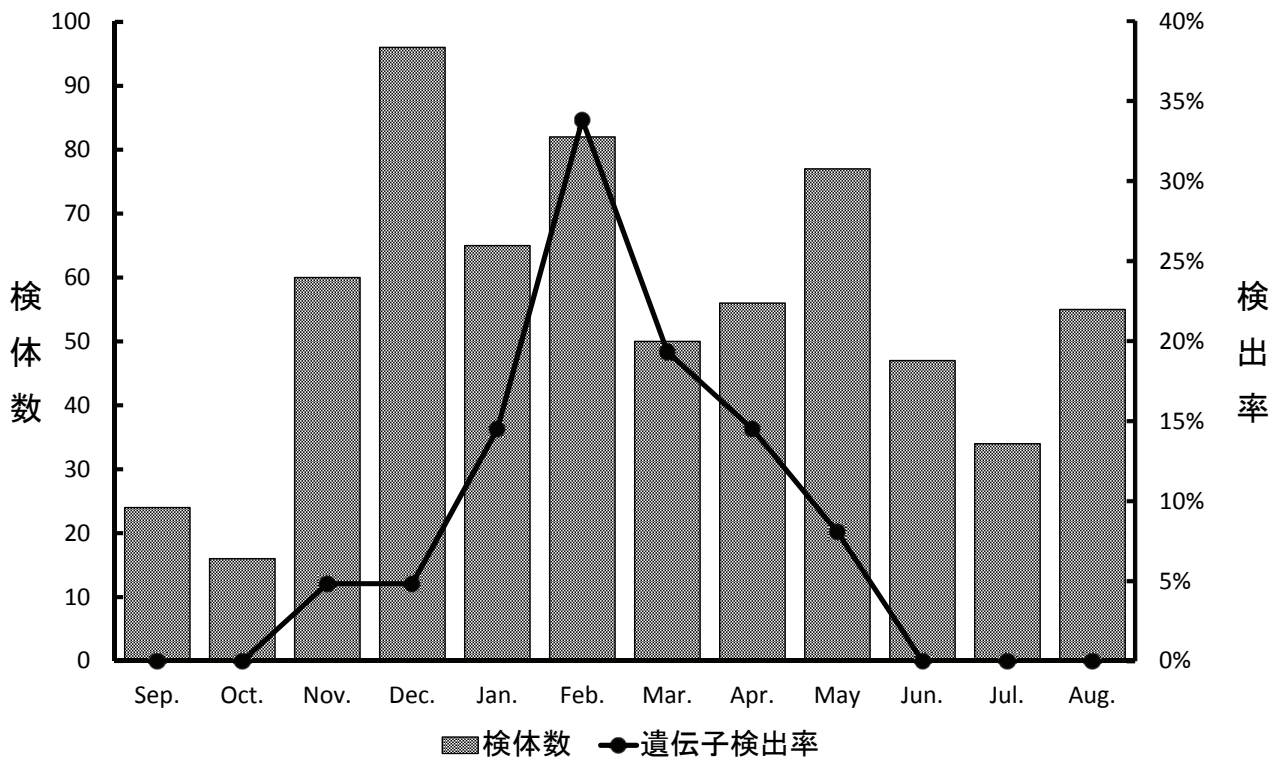


図1 月別RVA検出状況 (2015/2016シーズン)

3 結果

3.1 ウイルス検出状況

市販キットによるRVAのスクリーニングを行った患者ふん便662件のうち、陽性となった63件についてRT-PCR法による遺伝子検索を行ったところ、62件（総検体数の9.4%）からRVA遺伝子が検出された。

月別の検査検体数とRVA遺伝子の検出率を図1に示す。RVA遺伝子は11月～5月に検出され、検出率のピークは2月の33.9%（21/62件）であった。

3.2 G遺伝子型及びP遺伝子型の解析

RVA遺伝子が確認された62件すべてで、G遺伝子型及びP遺伝子型が判定可能であった。G遺伝子型の内訳は、G2が60件（96.8%）と最も多く、G2以外ではG1及びG9が各1件（1.6%）であった。

P遺伝子型の内訳は、P[4]が60件（96.8%）、P[8]が2件（3.2%）であった。G遺伝子型及びP遺伝子型の組み合わせの内訳は、G2P[4]が60件（96.8%）で最も多く、G1P[8]及びG9P[8]が各1件（1.6%）であった。

3.3 RVA遺伝子検出率の推移（2005/2006シーズン～2015/2016シーズン）

11シーズン（2005/2006シーズン～2015/2016シーズン）のRVA遺伝子検出率の推移を図2に示す。RVA遺伝子検出率は、ワクチン導入前の6シーズン（2005/2006シーズン～2010/2011シーズン）は20.4%～30.1%で変動していた^{6)・7)}のに対し、ワクチン導入後の5シーズン（2011/2012シーズン～2015/2016シーズン）は6.8%～20.9%^{8)～10)}と顕著な減少傾向を示した。

3.4 G遺伝子型の検出状況（2005/2006シーズン～2015/2016シーズン）

11シーズンのG遺伝子型検出状況の比較を図3に示す。主流行となるG遺伝子型は、ワクチン導入前の2005/2006シーズンはG9⁶⁾、2006/2007シーズンはG1⁶⁾、2007/2008シーズンはG9⁶⁾、2008/2009シーズン～2010/2011シーズンはG3^{6)・7)}、導入後の2011/2012シーズンはG3⁷⁾、2012/2013シーズン及び2013/2014シーズンはG1^{8)・9)}、2014/2015シーズンはG9¹⁰⁾、2015/2016シーズンはG2と、ワクチン導入の前後とも、シーズン毎に変化が見られた。

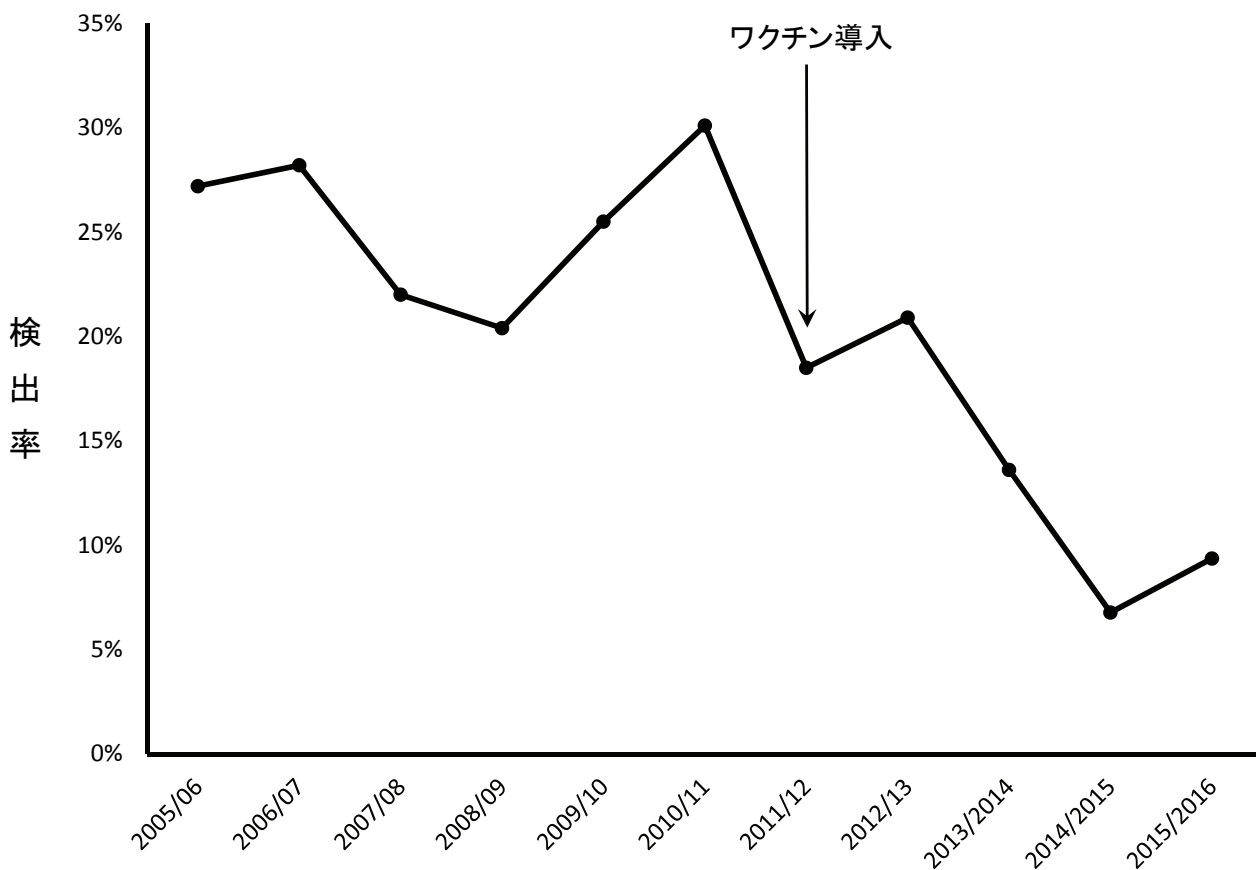


図2 RVA遺伝子検出率の推移（2005/2006シーズン～2015/2016シーズン）

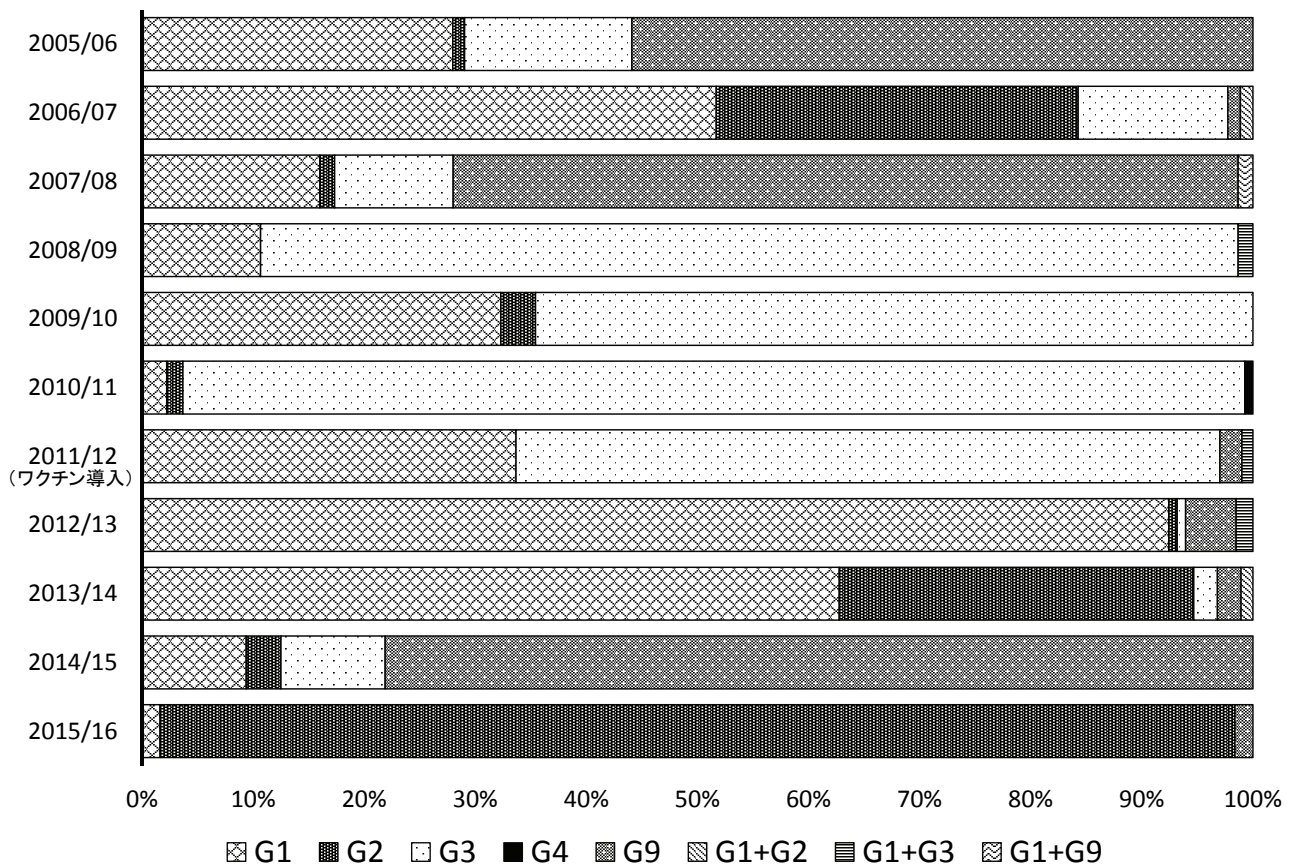


図3 G遺伝子型の検出状況 (2005/2006シーズン～2015/2016シーズン)

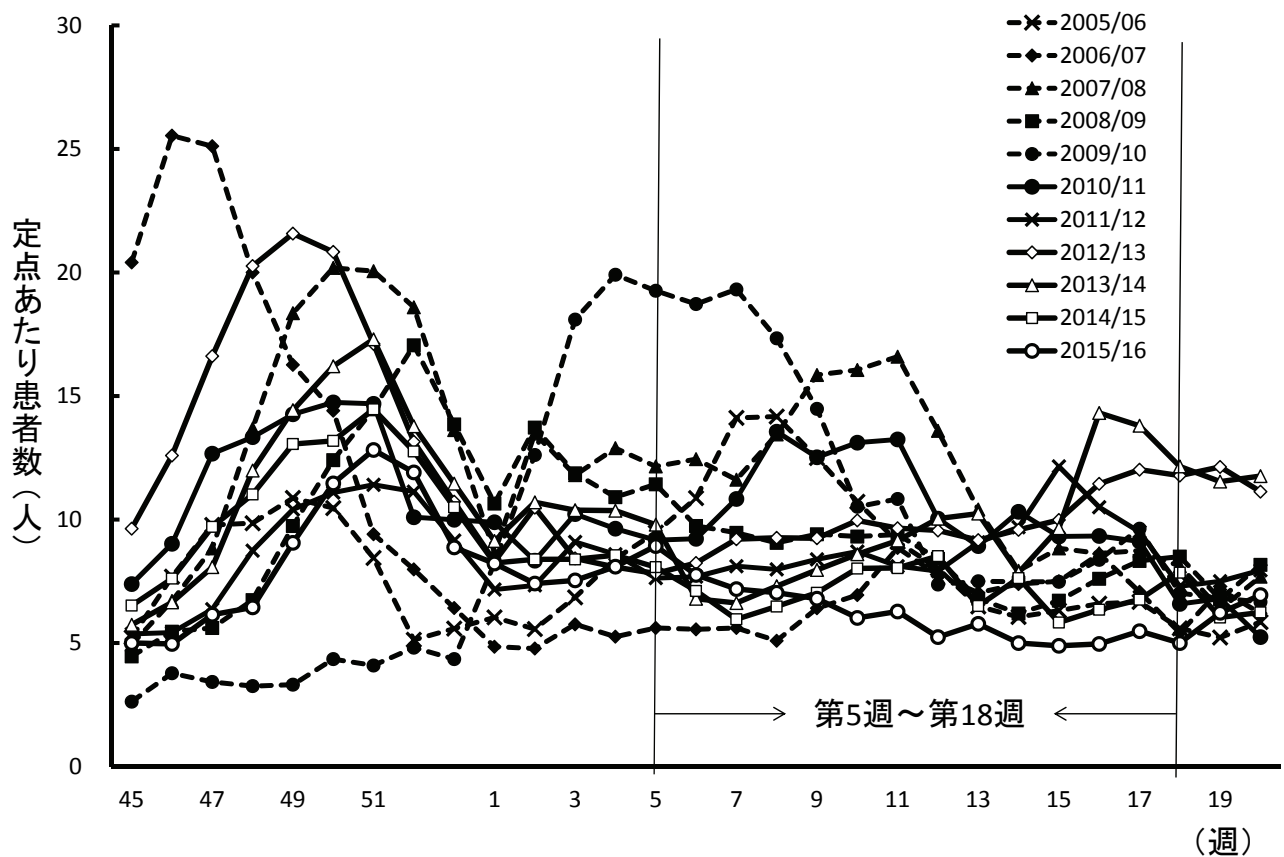


図4 感染性胃腸炎患者数 (2005/2006シーズン～2015/2016シーズン)

3.5 感染性胃腸炎患者数の推移 (2005/2006シーズン～2015/2016シーズン)

11シーズンの定点あたりの感染性胃腸炎患者数の推移を図4に示す。シーズン毎で流行のピークとなる時期は異なるが、全シーズンを通して多数の患者が発生していた。例年RVAの流行が認められる第5週～第18週(2月～5月)頃に着目すると、ワクチン導入前の2010/2011シーズン以前では、2006/2007シーズン及び2008/2009シーズンは例外的に患者数が少なかったものの、その他のシーズンは多くの患者が発生していた。しかし、ワクチン導入後の2011/2012シーズン以降は、患者数は顕著な減少を示した。

3.6 G1P[8]の遺伝子再集合体由来株解析

G1P[8]と同定された1件について、NSP4及びNSP5/6遺伝子のPCR産物サイズの比較を行ったところ、遺伝子再集合体由来株ではないと推定された。

4 考察

ワクチン導入後のRVA遺伝子の検出率は、導入前と比較して顕著な低下傾向を示していた。また、例年RVAの流行が認められる第5週～第18週(2月～5月)頃の定点あたりの感染性胃腸炎患者数も、ワクチン導入後は導入前と比較して明らかに減少していた。このことから、ワクチンの導入は、RVAの流行抑制に一定の効果があつたと考えられた。

我が国で使用されている2種類のワクチンは、含まれるG遺伝子型が限られているため、導入当初は抑制を免れた特定のG遺伝子型の流行が懸念された。しかし、ワクチンが導入された2011/2012シーズン以降において主流型となったG遺伝子型は、2011/2012シーズンはG3、2012/2013シーズン及び2013/2014シーズンはG1、2014/2015シーズンはG9、2015/2016シーズンはG2と、ワクチン導入前と同様にシーズン毎に変化が見られ、ワクチンによる抑制を免れた特定の遺伝子型の継続的な流行は確認されていない。また、2種類のワクチンは、異なる遺伝子型でも十分な異型免疫を誘導することが確認されており^{14), 15)}、我々の結果はこれを裏付けるものであつた。これらのことから、現時点においては、ワクチンは、効果的に機能しているものと推察された。

しかしながら、これまでの調査は、主にG遺伝子型に着目したものであり、ワクチンの導入以降に流行しているRVAが、何らかの変異によってワクチンから免れる機能を獲得している可能性は否定できない。従って、ワクチン導入前後におけるRVAについて詳細に比較解析する必要があり、今後の課題である。

文 献

- 1) 小林宣道, 浦沢正三: ロタウイルス, ウイルス, 50, 157-172, 2000
- 2) Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Banyai, K. *et al.*: Uniformity of rotavirus Classification Working Group (RCWG), Arch. Virol., 156, 1397-1413, 2011
- 3) Santos, N., Hoshino, Y.: Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine, Med. Virol., 15, 29-56, 2005
- 4) 中込治, 中込とよ子: ワクチンによるロタウイルスの感染制御, ウイルス, 60, 33-48, 2010
- 5) 葛谷光隆, 濱野雅子, 藤井理津志, 小倉肇, 金谷誠久ら: 岡山県におけるA群ロタウイルス検出状況と血清型分布の最近の動向, 病原微生物検出情報, 26, 4-6, 2005
- 6) 葛谷光隆, 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志, 岸本壽男ら: 岡山県におけるA群ロタウイルスの検出状況と血清型分布の最近の動向, 病原微生物検出情報, 32, 71-72, 2011
- 7) 濱野雅子, 木田浩司, 藤井理津志, 岸本壽男, 葛谷光隆ら: 岡山県におけるA群ロタウイルスの検出状況(2010/11～2012/13シーズン), 病原微生物検出情報, 35, 68-69, 2014
- 8) 濱野雅子, 藤井理津志, 木田浩司, 葛谷光隆, 榎原幸二ら: 胃腸炎ウイルスの疫学的研究-岡山県の散発胃腸炎患者におけるロタウイルスAの流行状況(2012/2013シーズン), 岡山県環境保健センター年報, 38, 55-58, 2014
- 9) 藤原香代子, 藤井理津志, 濱野雅子, 磯田美穂子, 松岡保博ら: 胃腸炎ウイルスの疫学的研究-岡山県の散発胃腸炎患者におけるロタウイルスAの流行状況(2013/2014シーズン), 岡山県環境保健センター年報, 39, 119-123, 2015
- 10) 藤原香代子, 藤井理津志, 濱野雅子, 磯田美穂子, 松岡保博ら: 胃腸炎ウイルスの疫学的研究-岡山県の散発胃腸炎患者におけるロタウイルスAの流行状況(2014/2015シーズン), 岡山県環境保健センター年報, 40, 63-67, 2016
- 11) Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Kida, K., Mizoguchi, Y. *et al.*: Prevalence and molecular characterization of G1P[8] human rotaviruses

- possessing DS-1-like VP6, NSP4, and NSP5/6 in Japan, *Med. Virol.*, 86 (6) , 1056-64, 2014
- 12) Gouvea, V., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F. *et al.* : Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens, *J. Clin. Microbiol.*, 28, 276-282, 1990
 - 13) Wu, H., Taniguchi, K., Wakasugi, F., Ukae, S., Chiba, S. *et al.* : Survey on the diistribution of the gene 4 alleles of human rotaviruses by polymerase chain reaction, *Epidemiol. Infect.*, 112, 615-622, 1994
 - 14) Correia, JB., Patel, MM., Nakagomi, O., Montenegro, FM., Germano, EM. *et al.* : Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil, *J. Infect. Dis.*, 201, 363-369, 2010
 - 15) Payne, DC., Boom, JA., Staat, MA., Edwards, KM., Szilagyi, PG. *et al.* : Effectiveness of pentavalent and monovalent rotavirus vaccine in concurrent use among US children <5 years of age, 2009-2011, *Clin. Infect. Dis.*, 57 (1) , 13-20, 2013

【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 (2015～2016年シーズン)
Epidemiological Analysis of Influenza in Okayama Prefecture during 2015 to 2016 Season

松岡保博, 木田浩司, 谷川徳行, 磯田美穂子, 梶原香代子, 濱野雅子,
爲房園実*, 森 勲** (ウイルス科)

*岡山県感染症情報センター, **保健福祉部健康推進課

Yasuhiro Matsuoka, Kouji Kida, Noriyuki Tanikawa, Mihoko Isoda, Kayoko Kajihara,
Masako Hamano, Sonomi Tamefusa* and Isao Mori**
(Virology Section)

*Okayama Prefectural Infectious Disease Surveillance Center

**Health Promotion Division, Department of Health and Welfare

要 旨

2015～2016年シーズンの岡山県におけるインフルエンザの流行は、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、2016年第1週(1月上旬)に始まり、2016年第9週(3月上旬)をピークとし、2016年第18週(5月上旬)に終息したものと考えられた。患者から検出されたウイルスは、B型山形系統が22株、AH3亜型が20株、AH1pdm09が12株、B型ビクトリア系統が11株であった。A型については、シーズンの前半はAH3亜型が、流行のピークを迎えたシーズンの後半はAH1pdm09が主に検出された。また、B型はシーズンを通して検出された。以上より、2015年～2016年シーズンは、AH1pdm09、AH3亜型及びB型の3つの型のウイルスによる混合流行であったが、シーズンの前半と後半でAH亜型の交替が見られ、AH1pdm09が多数を占めた全国の流行状況とは異なっていた。

[キーワード: 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: Influenza virus, Outbreak of influenza, Infectious disease surveillance, Epidemiological analysis]

1 はじめに

2015～2016年シーズン(2015/8/31～2016/9/4)の岡山県におけるインフルエンザの流行状況を明らかにするため、岡山県感染症発生動向調査事業(以下「発生動向調査」という。)の定点医療機関における患者発生状況及び学校等における集団事例の発生状況を解析した。また、患者等から採取された咽頭拭い液について、インフルエンザウイルス(以下「Inf.V」という。)の検索を行った。

2 材料及び方法

2.1 インフルエンザ患者発生状況

発生動向調査の週別患者報告から、1定点医療機関あたりのインフルエンザ患者報告数(1週間に1ヵ所の定点医療機関を受診したインフルエンザ患者報告数の平均値)(以下「定点あたり患者報告数」という。)を算出した。また、集団事例の発生状況については、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について」をもとに集計した。

2.2 ウイルス検索材料

2015年10月～2016年9月に、発生動向調査の病原体定点及び積極的疫学調査におけるインフルエンザ患者等55人(散発事例)並びに2015年11月～2016年2月にインフルエンザ集団発生が認められた9施設の患者29人(集団事例)、合計84人から採取した咽頭拭い液等を検索材料とした。

2.3 遺伝子検出によるウイルス検索

遺伝子検出によるInf.V検索については、国立感染症研究所から示された「インフルエンザ診断マニュアル(第3版)」¹⁾に従って実施した。すなわち、検体からQIAamp Viral RNA Mini Kit(株式会社キアゲン)により抽出したウイルスRNAを用いて、前記マニュアルに従って逆転写リアルタイムPCR(RT-realtimePCR)法を実施した。

2.4 Inf.V AH1pdm09の薬剤耐性マーカー遺伝子の検索

Inf.V AH1pdm09の薬剤耐性マーカー遺伝子の検索については、国立感染症研究所から示された「A/H1N1pdm09 H275Y耐性株検出法実験プロトコール(2011年8月 ver.2)」²⁾に従って実施した。すなわち、遺伝子検出法によりInf.V AH1pdm09陽性となった検体について、

MDCK細胞を使用してウイルス分離を実施し³⁾、分離株培養上清から抽出したウイルスRNAを用いて、前記プロトコールにより耐性遺伝子の有無を解析した。

3 結 果

3.1 患者発生状況

2015～2016年シーズンの発生動向調査における定点あたり患者報告数及びインフルエンザとみられる学校等の臨時休業施設数の推移を、図1に示した。2015年第38週（9月中旬）にシーズン初めての患者が報告され、2016年第1週（1月上旬）には、定点あたり患者報告数が、流行開始の指標である1.00人を超えた（1.54人）。以後、患者報告数は増加を続け、2016年第6週（2月上旬）には県内警報発令基準の30.0人を超え、第9週（3月上旬）には今シーズンのピークを迎えた（37.19人）。第10週以降、患者報告数は急激な減少に転じ、第18週（5月上旬）には定点あたり1.00人を下回り、流行は、ほぼ終息した。

一方、2015～2016年シーズンの臨時休業施設数は、854施設であり、内訳は、小学校597施設（69.9%）、中学校119施設（13.9%）、幼稚園99施設（11.6%）、高等学校32施設（3.8%）、その他6施設（0.7%）、保育園1施設（0.1%）であった。2015年第48週（11月下旬）に岡山市内及び備中地域の高等学校並びに備前地域の小学校でシーズン初

発の臨時休業があった。臨時休業施設数は、2016年第3週（1月中旬）から急激に増え始め、第5週にはシーズン最多となる145施設となった。その後第9週までは、毎週100施設を超える多い状態で推移し、第10週（3月上旬）から急激に減少した。臨時休業施設数の推移は、シーズンを通して定点あたり患者報告数の動向とよく一致していた。

3.2 Inf.V検出状況

インフルエンザ患者等からの検体採取状況及びウイルス検出状況を表1に示した。ウイルス検出数は、B型山形系統が22株、AH3亜型が20株、AH1pdm09が12株、B型ビクトリア系統が11株の順で多かった。散发事例では、55人中43人（78.2%）からInf.Vが検出され、その内訳はB型山形系統が16株、AH1pdm09が11株、AH3亜型及びB型ビクトリア系統が8株の順で多かった。一方、集団発生9事例の29人中22人からInf.Vが検出され、その内訳はAH3亜型が4事例12株、B型山形系統が3事例6株、B型ビクトリア系統1事例3株、AH1pdm09が1事例1株であった。

週別のウイルス検出状況を図2に示した。なお集団事例については、1件の事例から同一の型が複数株検出されている場合は、検出数1と表示している。1月上旬までは、AH3亜型及びB型山形系統が検出されたが、それ以降はAH1pdm09及びB型ビクトリア系統の検出が増加し、AH3亜型の検出は1株のみであった。B型山形系統は、シ

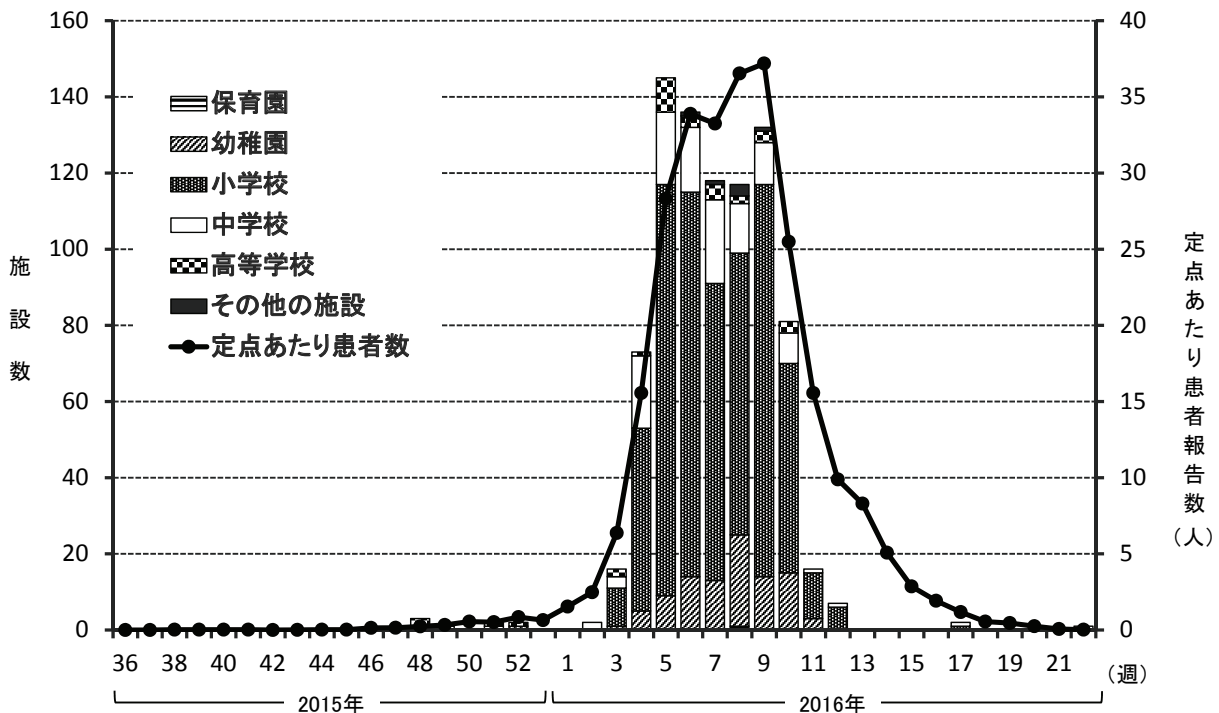


図1 定点あたり患者報告数及びインフルエンザとみられる学校等の週別臨時休業施設数

コラムが施設別の臨時休業数を、折れ線が定点あたり患者報告数を示す。

ズンを通して継続的に検出された。

Inf.V AH1pdm09の薬剤耐性マーカー遺伝子の検索を、今シーズン検出されたAH1pdm09全ての分離株12株について実施したが、耐性マーカー遺伝子を保有する株は見られなかった。

4 考 察

2015～2016年シーズンの岡山県におけるインフルエンザの流行は、定点あたり患者報告数から、2016年2月上旬～3月上旬をピークとする一峰性流行であったと考えられ、臨時休業施設数の推移も、これを裏付けていた。ウイルス検出状況では、1月上旬まではAH3亜型及びB型山形系統、それ以降はAH1pdm09、B型ビクトリア系統及びB型山形系統が主に検出されており、複数の型による混合流行であったと考えられた。2015年11月～2016年1月にかけてのAH3亜型は、主として県南地域での集団発生事例から検出されていることから、シーズン前半はAH3亜型が主流型であったと考えられた。一

方、シーズン後半は流行のピーク時に検体搬入が少なかったため、ウイルス検出数も少なく、主流型を特定することは困難であった。しかし、AH1pdm09が流行のピーク以後に連続して検出されていることから、後半の主流型はAH1pdm09であったと推察された。全国では、県内同様に混合流行であるものの、主流型はAH1pdm09単独であった⁴⁾が、西日本ではシーズン前半はAH3亜型の検出数が比較的多く⁵⁾、主流型に地域差が見られた。AH1pdm09が主流型となったのは、県内及び全国において2013～2014年シーズン以来の2シーズンぶりであり、2012～2013年シーズン以降は、AH3亜型とAH1pdm09がシーズン毎交互に流行の中心となる傾向が続いている^{4) 6) ~11)}。B型については、県内では2014～2015年シーズンは山形系統のみの検出であった¹¹⁾が、2015～2016年シーズンはビクトリア系統の検出割合が増加しており、山形系統とビクトリア系統の検出割合は2:1だった。全国でも2014～2015年シーズンはビクトリア系統がほとんど検出されていなかった¹⁰⁾が、2015～2016年シーズンは

表1 インフルエンザウイルス検出状況

	検体採取状況		ウイルス検出・同定				
			検出*				
				AH1pdm09	AH3亜型	B型(ビクトリア系統)	B型(山形系統)
散発事例	所管保健所名	検体採取年月日					
	岡山市保健所	2015.10.29～2016.9.2	14/17	6	4	4	
	備前保健所	2016.1.12～2016.4.23	5/5	1	1	3	
	備中保健所	2015.12.15～2016.4.13	18/22	2	3	7	
	美作保健所	2016.2.23～2016.3.29	1/2	1			
	倉敷市保健所	2016.4.1～2016.7.31	5/9	1		1	
	小計		43/55 (78.2%)	11	8	8	16
集団発生事例	施設名	所在地	検体採取年月日				
	A小学校	玉野市	2015.11.24	3/5		3	
	B中学校	総社市	2015.12.14	2/3		2	
	C幼稚園	倉敷市	2015.12.22	3/3		3	
	D中学校	岡山市	2016.1.12	2/3			2
	E小学校	笠岡市	2016.1.19	4/4		4	
	F小学校	赤磐市	2016.2.1	2/4			2
	G小学校	勝央町	2016.2.2	1/1	1		
	H小学校	高梁市	2016.2.3	2/3			2
	I中学校	真庭市	2016.2.10	3/3			3
	小計		22/29 (75.9%)	1	12	3	6
合計			65/84 (77.4%)	12	20	11	22

* 陽性数/検体数

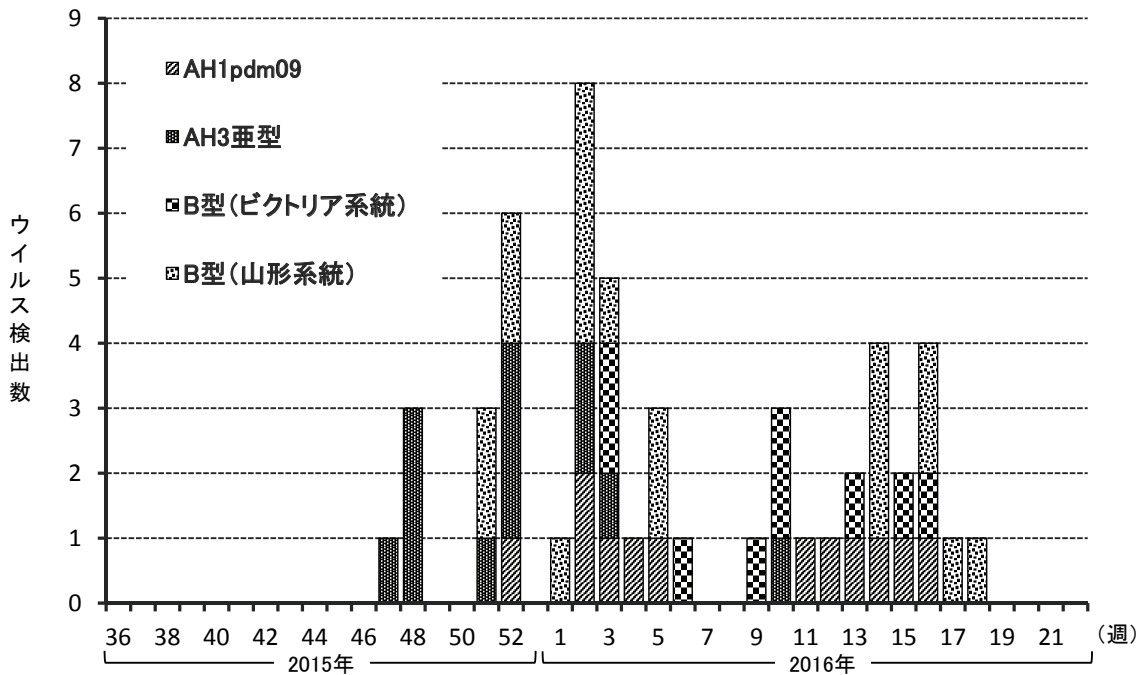


図2 週別ウイルス検出状況

集団事例については、1件の事例から同一の型が複数株検出されている場合は、検出数1とした。

ビクトリア系統の検出割合が大きく増加し⁴⁾、県内と同様の傾向であった。

2015～2016年シーズンの散発事例の検体数は55件であり、過去2シーズンと比較して半減していた^{7)・11)}。また、流行ピーク時の検体数及び検出数が少なかったため、主流行型の推定に苦慮した。しかし、感染症法改正により非流行期を含めた通年の検体採取が規定されたため、次シーズン以後は、県内の流行について、より正確かつ詳細な解析が可能になると考えられる。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル 第3版（平成26年9月）
- 2) 国立感染症研究所：A/H1N1pdm09 H275Y 耐性株検出法実験プロトコール（2011年8月 ver.2）
- 3) 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
- 4) 国立感染症研究所 感染症疫学センター：インフルエンザ 2015 / 16シーズン，病原微生物検出情報，37，211-213，2016
- 5) 国立感染症研究所 感染症疫学センターホームページ：都道府県別インフルエンザウイルスA（H3）分離・検出報告状況2015/16シーズン <http://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/arc/gv/1516/data1516.6j.pdf>

- 6) 国立感染症研究所 感染症疫学センター：インフルエンザ 2013 / 14シーズン，病原微生物検出情報，35，251-253，2014
- 7) 松岡保博，濱野雅子，磯田美穂子，藤原香代子，藤井理津志ら：岡山県におけるインフルエンザ流行の疫学的解析（2013～2014年シーズン），岡山県環境保健センター年報，39，131-135，2015
- 8) 国立感染症研究所 感染症疫学センター：インフルエンザ 2012 / 13シーズン，病原微生物検出情報，34，325-327，2013
- 9) 木田浩司，溝口嘉範，磯田美穂子，濱野雅子，藤井理津志ら：岡山県におけるインフルエンザ流行の疫学的解析（2012～2013年シーズン），岡山県環境保健センター年報，38，63-66，2014
- 10) 国立感染症研究所 感染症疫学センター：インフルエンザ 2014 / 15シーズン，病原微生物検出情報，36，199-207，2015
- 11) 松岡保博，濱野雅子，磯田美穂子，藤原香代子，藤井理津志ら：岡山県におけるインフルエンザ流行の疫学的解析（2014～2015年シーズン），岡山県環境保健センター年報，40，69-72，2016

【資 料】

日本紅斑熱リケッチアを特異的に検出するReal-timePCR法に 弱反応を示したリケッチア属菌の解析

Genomic Analysis of Rickettsia Reacted Weakly in
Specific Real-time PCR Method for *Rickettsia japonica*

松岡保博, 木田浩司, 谷川德行, 磯田美穂子, 梶原香代子, 濱野雅子
Yasuhiro Matsuoka, Kouji Kida, Noriyuki Tanikawa, Mihoko Isoda,
Kayoko Kajihara and Masako Hamano
(Virology Section)

要 旨

2015年に実施した県内捕獲マダニの*Rickettsia japonica*保有状況調査において、*Rickettsia japonica*を特異的に検出するreal-timePCR法を使用したところ、キチマダニ内臓浮遊液1検体で、陽性とは明らかに異なる弱反応を確認した。検体中にリケッチア属菌遺伝子の存在が確認されたため、今回の弱反応は、この菌によるものである可能性が高いと考えられた。そこで、本菌をHF2株と命名し、詳細な解析を実施した。その結果、HF2株は、県内のキチマダニが従来から保有するリケッチア属菌であり、ヒトへの病原性を持つ可能性は低いと考えられた。また、HF2株は、今回使用したreal-timePCR法の標的である216bpORF領域を保有することが確認された。標的領域の塩基配列を*Rickettsia japonica*と比較すると、HF2株は、プライマー対及びプローブの結合部位の塩基配列が1塩基ずつだけ異なっており、これが弱反応の原因であったと考えられた。データベース上では、HF2株の他にも*Rickettsia japonica*とよく似た塩基配列の216bpORF領域を保有するリケッチア属菌が複数確認された。しかし、これらはいずれも国内においてヒトからの検出報告がないことから、今回使用したreal-timePCR法の日本紅斑熱が疑われる患者の迅速診断法としての有用性を否定するものではないと考えられた。ただし、マダニ由来検体のようなヒトの臨床検体以外のものに本法を使用する場合は、HF2株のようなリケッチア属菌又は同様の反応を起こす未知のリケッチア属菌が存在する可能性を考慮する必要がある。

[キーワード：マダニ，日本紅斑熱リケッチア，リアルタイムPCR]

[Key words: Tick, *Rickettsia japonica*, Real-time PCR]

1 はじめに

日本紅斑熱は、*Rickettsia japonica*（以下「*R.j.*」という。）を保有するマダニに刺さることによって感染するダニ媒介性細菌感染症であり、感染症法では四類感染症に規定されている。発熱及び発しんを主徴とし、死に至ることもある重篤な感染症であるが、発症早期に有効な抗菌薬を投与することで重症化を防ぐことができるため、迅速な検査診断が求められている。2009年、花岡らによって、*R.j.*を特異的に検出するreal-timePCR法が報告された¹⁾。本法は、*R.j.*及び極東紅斑熱の起因種である*R.heilongjiangensis*が特異的に保有する216bpORF領域を標的としており、現在では日本紅斑熱の迅速診断法として広く利用されている。2015年に実施した県内捕獲マダニの*R.j.*保有状況調査²⁾において本法を使用したところ、*R.j.*は全て陰性であったが、キチマダニ内臓浮遊液1検体で、陽性とは明らかに異なる弱反応を確認した。そこで、

その原因を明らかにするため、詳細な遺伝子解析を実施した。

2 材料と方法

2.1 検体

2015年に実施した県内捕獲マダニの*R.j.*保有状況調査において、real-timePCR法で陽性とは異なる弱反応を示したキチマダニ内臓浮遊液1検体を用いた。

2.2 real-timePCR法

花岡らが報告した方法¹⁾に従い、TaqMan Universal PCR Master mix (Thermo Fisher Scientific社)を用い、20μL容量(検体2μL)でStepOnePlus (Thermo Fisher Scientific社)により実施した。使用したプライマー及びプローブの塩基配列を表1に示す。

2.3 リケッチア遺伝子の確認

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN社)により検体か

ら抽出したDNAを用いて、リケッチア属共通抗原である17kDa領域を標的としたnested PCR法によるリケッチア遺伝子検索を実施した。使用したプライマー^{3),4)}の塩基配列を表2に示す。ポリメラーゼはEx Taq (TaKaRa社)を使用し、反応条件は、95°C 1分間の初期変性の後、95°C 30秒間の熱変性、52°C 30秒間のアニーリング、72°C 1分間の伸長反応を行い、熱変性から伸長反応のサイクルを35回繰り返した後、5分間の最終伸長反応を行った。得られた増幅産物は、マイクロチップ電気泳動装置：MultiNA (島津製作所)により泳動した。

2.4 216bpORF領域の存在確認

検体から抽出したDNAを用いて、花岡らが報告した216bpORF領域を包含するように設計されたプライマー¹⁾(表3)によるPCR法を実施した。酵素及び反応条件は、2.3と同様に実施した。

2.5 ダイレクトシーケンス法

検体から得られたPCR増幅産物をBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific社)を用いてシーケンス反応した後、BigDye XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific社)により精製し、ABI3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific社)を用いて塩基配列を決定した。

2.6 BLAST検索

BLAST検索には、DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

[index-j.html](#))を利用した。

2.7 系統解析

GENETYX ver.12 (ゼネティックス社)を用いて、近隣結合法による遺伝子系統解析を実施した。

3 結果

3.1 real-timePCR法での弱反応の確認

検体から抽出したDNAについて、real-timePCR法を実施したところ、陽性とは異なる弱反応が再び確認された(図1)。

3.2 検体中のリケッチア遺伝子の確認

検体から抽出したDNAについて、リケッチア属共通抗原である17kDa領域を標的としたnested PCR法を実施した。その結果、想定産物長とほぼ同じ434bpのPCR増幅産物が生成されており、検体がリケッチア属菌を含むことが確認された(図2)。これにより確認されたリケッチア属菌をHF2株と命名した。

3.3 HF2株の種を同定するための遺伝子解析

HF2株の種を同定するために、ダイレクトシーケンス法により決定した17kDa領域394bpについて、BLAST検索を実施した。その結果、塩基配列が100%一致するリケッチア属菌は無かったが、99%一致するものが複数存在し、そのうち種名が定められているのは*R.raoultii*のみであった。しかし、*R.raoultii*が、ヨーロッパやロシアの

表1 プライマー及びプローブ

名称	塩基配列(5'→3')	文献
SpRija5'	GAACACGATGATACACCTCTGCA	1)
SpRija3'	GATTAGCCTCTGTCTTCAGTAGTATTTTAACT	1)
SpRijaMGB	(FAM)-TAGCGTCTATTCTAAGTAAAG-(NFQ)-(MGB)	1)

表2 プライマー

名称	塩基配列(5'→3')	文献
R1	TCAATTCACAACCTTGCCATT	3)
R2	TTTACAAAATTCTAAAAACC	3)
Rr17.61p	GCTCTTGCAACCTTCTATGTT	4)
Rr17.492n	CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG	4)

表3 プライマー

名称	塩基配列(5'→3')	文献
JapoSP5'	GAACACGATGATACACCTCTGCA	1)
JapoSP3'	GATTAGCCTCTGTCTTCAGTAGTATTTTAACT	1)

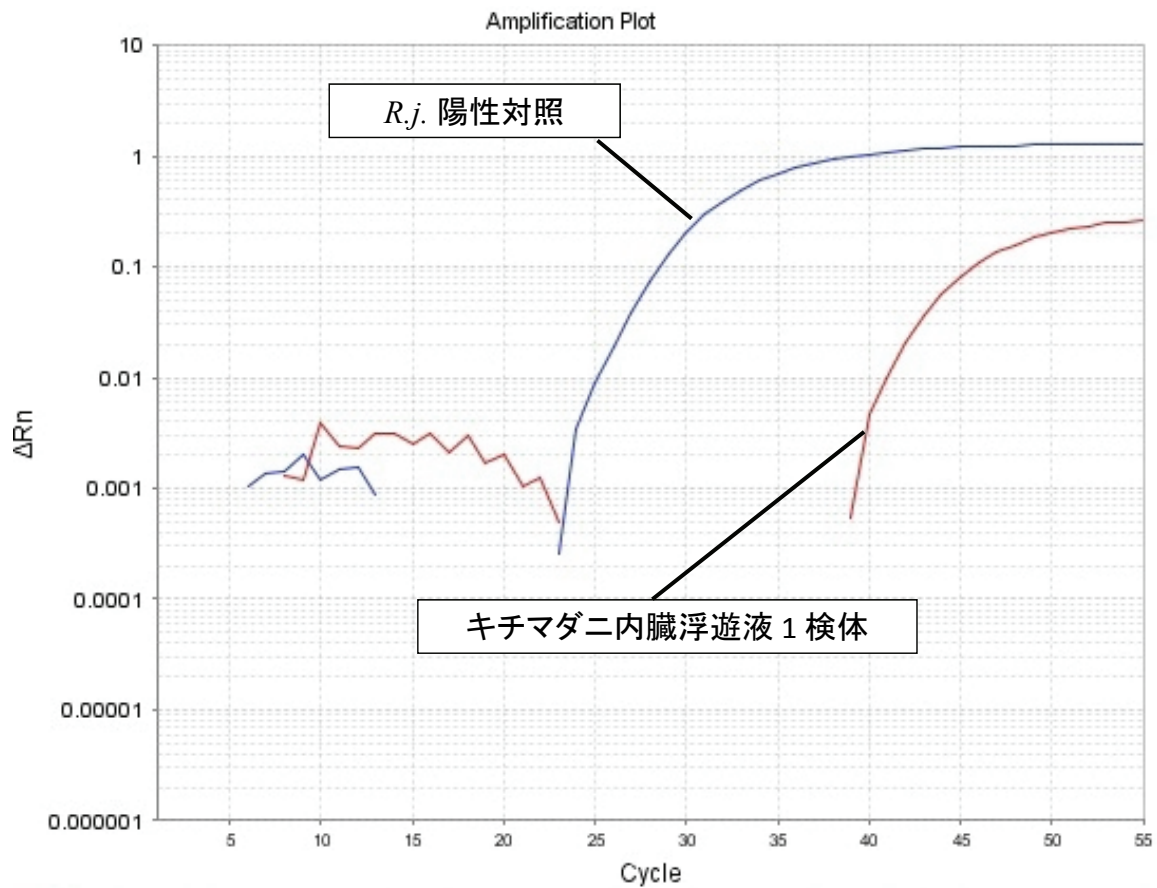


図1 検体がreal-timePCR法に示した弱反応

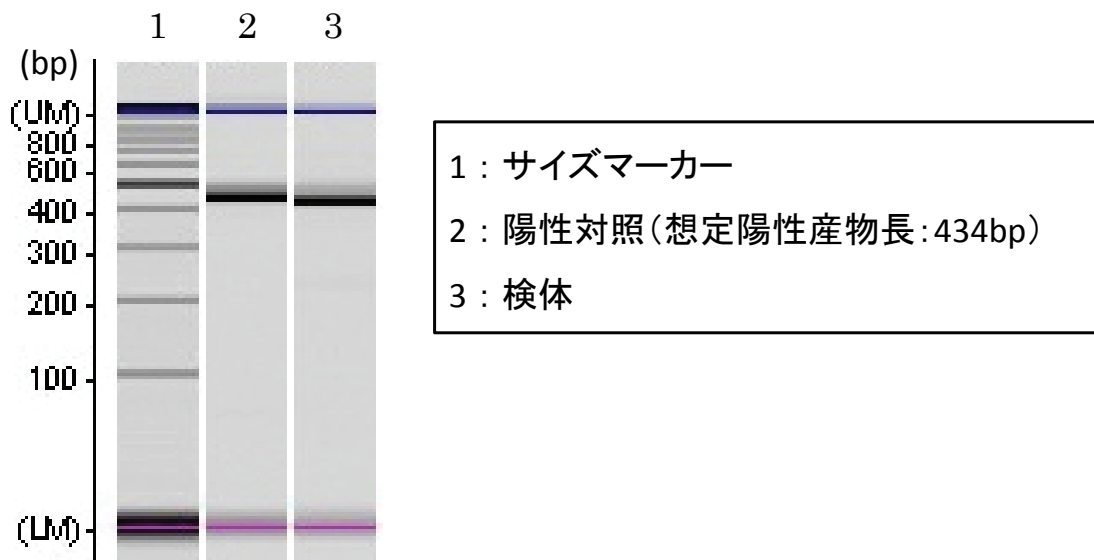


図2 リケッチア属共通抗原である17kDa領域PCR産物電気泳動像

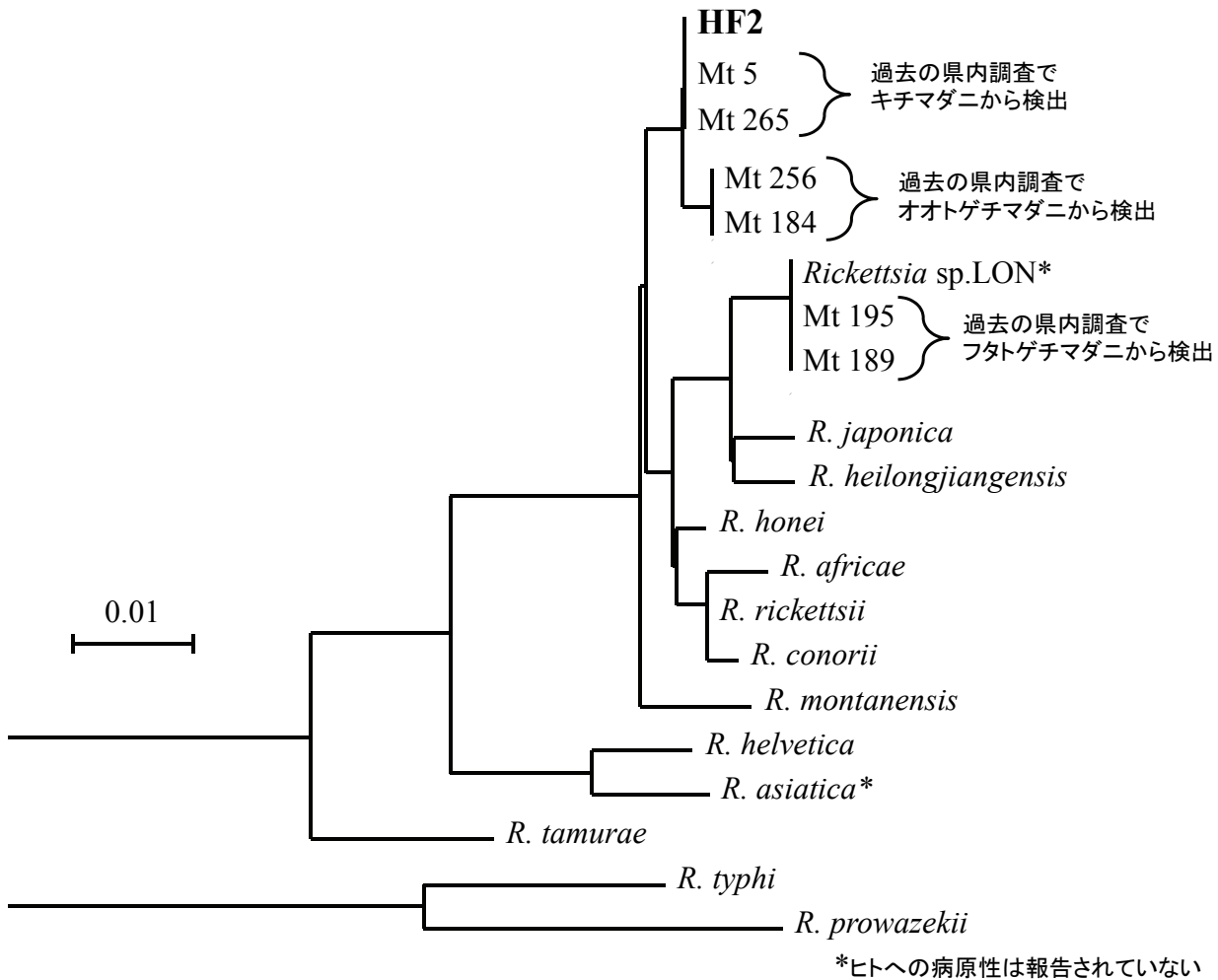


図3 リケッチア属共通抗原である17kDa領域 (394bp) 系統樹解析結果

カクマダニ属から検出された⁵⁾のに対し、HF2株は県内のチマダニ属のキチマダニから検出されたものである。両者は、保有マダニ種はもとより、その生息地域も異なることから別種である可能性が高いと考えられた。そこで、過去の県内調査でマダニから検出されたリケッチア属菌及びヒトへの病原性を有するリケッチア属菌を含む既知のリケッチア属菌の塩基配列データを用い、系統解析を実施した。その結果、HF2株は、過去の県内調査においてキチマダニから検出されたリケッチア属菌と同じクラスターに属しており、これはヒトへの病原性を有するリケッチア属菌の属するクラスターとは明らかに異なっていた (図3)。

3.4 HF2株の216bpORF領域の解析

HF2株について、216bpORF領域を包含するように設計されたプライマーを用いて、PCR法を実施し、得られた増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。その結果、HF2株が216bpORF領域を保有することが確認された。また、DDBJのデータベー

スで検索したところ、同領域を保有するリケッチア属菌が、*R.j.*及び*R.heilongjiangensis*の他に4種 (*R.raoultii*, *R.amblyommii*, *R.montanensis*及び*Rickettsia sp.LON*)存在することが確認された。これらの塩基配列の一致率を確認したところ、HF2株が保有する216bpORF領域の塩基配列は、どのリケッチア属菌とも異なっていた (表4)。また、HF2株以外でも相互の216bpORF領域が100%一致するリケッチア属菌は存在しなかったが、*Rickettsia sp.LON*を除くリケッチア属菌の塩基配列は、互いによく似ていた (一致率94.9～99.5%)。

次に、HF2株がreal-timePCR法で弱反応を示した原因を明らかにするために、real-timePCR法における増幅部位85bpについて比較した。その結果、HF2株のプライマー対及びプローブ結合部位の塩基配列が*R.j.*とは1塩基ずつ異なっていることが確認された (図4)。また、*R.heilongjiangensis*の塩基配列は*R.j.*と100%一致していたが、他のリケッチア属菌の塩基配列も*R.j.*とよく似ており、各結合部位の違いは最大でも2塩基のみであった。

*ヒトへの病原性は報告されていない

表4 216bpORF領域の塩基配列の一致率

表4 216bpORF領域の塩基配列の一致率

	HF2	<i>R.japonica</i>	<i>R.heilongjiangensis</i>	<i>R.raoultii</i>	<i>R.amblyommii</i>	<i>R.montanensis</i>	<i>Rickettsia</i> sp.LON
HF2	***						
<i>R.japonica</i>	96.8	***					
<i>R.heilongjiangensis</i>	97.2	99.5	***				
<i>R.raoultii</i>	98.1	96.8	97.2	***			
<i>R.amblyommii</i>	97.7	96.3	96.8	98.6	***		
<i>R.montanensis</i>	96.3	94.9	95.4	97.2	97.7	***	
<i>Rickettsia</i> sp.LON	91.7	91.2	91.7	91.7	91.2	89.8	***

```

R.japonica      GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGCGTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
R.heilongjiangensis GAACACGATGATACACCTCTGATATAGCTTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
HF2              GAACACGATGATACACCTCTGATATAGCTTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
R.raoultii     GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGCTTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
R.amblyommii   GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGCTTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
R.montanensis GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGCTTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
Rickettsia sp.LON GAACACGATGATACACCTCTGCATATAGCTTCTATTCTAAGTAAAGAAAATATAGTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
                GAACACGATGATACACCTCTGCATA--GCGTCTATTCTAAGTAAAGA-----GTTAAAATACTACTGAAGACAGAGGCTAATC
                SpRija5'              SpRijaMGB              SpRija3'
    
```

図4 real-timePCR法増幅部位85bpの塩基配列及びプライマー・プローブ配列

網掛け:プライマー・プローブ配列と異なっている塩基配列

4 考察

一般的に、TaqMan probeによるreal-timePCR法では、標的とは異なる遺伝子断片に対する非特異反応が生じることが知られている。また、標的に類似した配列を保有する検体の場合、陽性とは異なる反応を示すことも知られている。そのため、今回花岡らのreal-timePCR法においてキチマダニ由来の検体が示した弱反応が、標的とは異なる遺伝子断片あるいは類似配列を保有するリケッチア属菌のいずれの存在に起因するものか不明であった。そこで、リケッチア属共通抗原である17kDa領域のPCR法を実施したところ、リケッチア属菌の存在が確認された。これにより、今回の弱反応がリケッチア属菌によるものである可能性が高いと考えられたため、本菌をHF2株と命名し、詳細な解析を実施した。

HF2株の種を同定するため、17kDa領域394bpを用いてBLAST検索を実施したところ、HF2株は*R.raoultii*と塩基配列が99%一致しているという結果であったが、保有マダニ種はもとより、その生息地域も異なることから、別種である可能性が高いと考えられた。そこで、過去の県内調査でマダニから検出されたリケッチア属菌及びヒトへの病原性を有する既知のリケッチア属菌の塩基配列

データを用い、系統解析を実施した結果、HF2株は、県内のキチマダニが従来から保有するリケッチア属菌である可能性が高いと考えられた。またHF2株は、ヒトへの病原性を有する既知のリケッチア属菌とは明らかに異なるクラスターに属しており、過去にHF2類似株によると考えられる患者報告もないことから、ヒトへの病原性を持つ可能性は低いと考えられた。

HF2株が保有する216bpORF領域を解析したところ、プライマー対及びプローブの結合部位の塩基配列が*R.j.*とは1塩基ずつだけ異なっており、これが弱反応の原因であったと考えられた。また、216bpORF領域の保有が確認された*R.raoultii*、*R.amblyommii*、*R.montanensis*及び*Rickettsia* sp.LONについても、プライマー及びプローブ各結合部位の塩基配列の*R.j.*との違いは最大でも2塩基のみであり、同様の反応を示す可能性があった。しかし、*R.raoultii*、*R.amblyommii*及び*R.montanensis*は、海外でのみ報告されており、国内の検体についてこれらの種の存在を考慮する必要性は低いと考えられた。

216bpORF領域を保有するリケッチア属菌の中で、国内においてヒトへの病原性が報告されているリケッチア属菌は、*R.j.*及び*R.heilongjiangensis*のみである。そのため、日本紅斑熱が疑われる患者由来の検体において、花

岡らのreal-timePCR法により検出される可能性があるのは、この2菌種のみであり、今回確認されたような弱反応を起こすリケッチア属菌の存在が、本法の、国内において日本紅斑熱が疑われる患者の迅速診断法としての有用性を否定するものではないと考えられる。ただし、マダニ由来検体のようなヒトの臨床検体以外のものに本法を使用する場合は、HF2株及び*Rickettsia* sp.LONのようなリケッチア属菌又は同様の反応を起こす未知のリケッチア属菌が存在する可能性を考慮する必要がある。

本研究の概要は、平成28年度中国地区獣医公衆衛生学会において発表した。

文 献

- 1) Hanaoka N, Matsutani M, Kawabata H, Yamamoto S, Fujita H, et al.: Diagnostic assay for *Rickettsia japonica*, *Emerging Infect. Dis.*, 15, 1994-1997, 2009
- 2) 松岡保博, 濱野雅子, 磯田美穂子, 藤原香代子, 藤井理津志ら: 岡山県におけるマダニの季節的消長と日本紅斑熱リケッチア保有調査, 岡山県環境保健センター年報, 40, 73-76, 2016
- 3) Burt E. Anderson, Theodore Tzianabos: Comparative sequence analysis of a genus-common rickettsial antigen gene, *J. Bacteriol.*, 171, 5199-5201, 1989
- 4) Noda H, Ulrike G. Munderloh, Timothy J. Kurtti: Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of human and animals, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3926-3932, 1997
- 5) Mediannikov O, Matsumoto K, Samoylenko I, Drancourt M, Roux V, et al.: *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 1635-1639, 2008

【調査研究】

LC-MS/MSを用いた魚介類中有機スズ化合物の同時分析法の検討
Study on a Method for Simultaneous Determination of Organotin compounds
in marine products by LC-MS/MS

難波順子,肥塚加奈江,赤木正章,金子英史,北村雅美,吉岡敏行* (衛生化学科)

*水質科

Junko Namba, Kanae Koeduka, Masaaki Akaki, Hidefumi Kaneko, Masami Kitamura, Toshiyuki Yoshioka*
(Food and Drug Chemical Research Section)

*Water Section

要 旨

LC-MS/MSを用いた魚介類中トリブチルスズ化合物 (以下「TBT」という。) とトリフェニルスズ化合物 (以下「TPT」という。) の同時分析法を検討した。アセトン及びヘキサン混液で抽出し,アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂を行い,固相カラムで精製した後,LC-MS/MSで測定を行う分析法で,回収率は100.6 ~ 105.5%,併行精度は3.6 ~ 6.4%と十分な定量性が得られた。水産物8種類について実態調査を行ったところ,4種類からTBT,TPT共に検出されたが,その値はTBTが0.002 ~ 0.004 $\mu\text{g/g}$, TPTが0.001 ~ 0.014 $\mu\text{g/g}$ であり,健康影響上の問題の無い値であった。

[キーワード: トリブチルスズ,トリフェニルスズ,同時分析法,液体クロマトグラフタンデム質量分析計]

[Key Words: TBT, TPT, simultaneous determination, LC-MS/MS]

1 はじめに

有機スズ化合物であるTBT及びTPT等は,船底あるいは養殖魚網への甲殻類,貝類,海藻の付着防止を目的とした防汚塗料に使用されてきた結果,海洋への汚染,魚介類への残留が社会問題となった。

そのため,有機スズ化合物は難分解性(自然的作用による化学変化を生じにくい),高蓄積性(生物の体内に蓄積されやすい)で長期毒性(継続的に摂取される場合には,ヒトの健康を損なうおそれがある)を有する化学物質として,化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(以下「化審法」という。)により製造や使用などの規制が行われており,岡山県でも魚介類中の有機スズ化合物(TBT, TPT,ジブチルスズ化合物(以下「DBT」という。))及びジフェニルスズ化合物(以下「DPT」という。))の検査を実施している。その分析法は,衛生試験法注解2010¹⁾に示された試験溶液調製法に準拠した液液分配やテトラエチルホウ酸ナトリウム溶液による誘導体化で前処理を行いGC-MS/MSで測定する一斉分析法²⁾であるが,この分析法は分析工程が煩雑なため,分析に熟練する必要がある,結果が出るまでに時間を要し,また,誘導体化剤の取扱には発火の恐れなどがあり¹⁾注意を要する。そこで,近年,GC/MS法に代わりLC/MS法による方法が報告されている^{3)~5)}。今回,誘導体化を必要とせず,簡便に前処理を行いLC-MS/

MSで測定する分析法を検討したので報告する。

2 方法

2.1 試料

試料は,添加回収用試料として県内で販売されていたアジ,カキを用いた。これらは,事前に従来のGC-MS/MSで測定する一斉分析法²⁾により,分析対象とする有機スズ化合物が検出されないことを確認して用いた。実態調査試料には,県内で販売されていたアナゴ, サッパ/ママカリ*,アカシタビラメ/ゲタ*,コイ,ボラ,カレイ,カキ及びハマチを用いた。

*:地方名

2.2 標準品,固相カラム及び試薬

標準品:二塩化ジブチルスズ,塩化トリブチルスズ,二塩化ジフェニルスズ,塩化トリフェニルスズ(和光純薬工業製)

混合標準溶液:各標準を精秤し,アセトニトリルに溶解し標準原液(1000 $\mu\text{g/mL}$)を調製した。これらを混合し,適宜0.1%ギ酸 1mmol/L 酢酸アンモニウムアセトニトリル溶液で希釈した。

サロゲート化合物標準品:塩化トリブチルスズ-d27及び塩化トリフェニルスズ-d15(林純薬工業製)

サロゲート混合標準溶液:各サロゲート化合物を精秤

し、アセトニトリルに溶解し標準原液 (1000 μ g/mL) を調製した。これらを混合し、適宜0.1%ギ酸 1mmol/L 酢酸アンモニウム アセトニトリル溶液で希釈した。

Florisil : SUPELCO製 LC- Florisil 1g/6mL
 ENVI-Carb/LC-NH2 : SUPELCO製 500mg:500mg/6mL
 ENVI-Carb : SUPELCO製 500mg/6mL
 多機能カラムMultiSep PR : Romer Labs製
 メンブレンフィルター : Millipore製 Millex-LCR 0.45 μ m
 その他の試薬 : 残留農薬試験用又は特級試薬を用いた。

2.3 装置及び測定条件

2.3.1 LC-MS/MS

1) LC条件

LC機種 : 島津製作所製 LC-20A 高圧グラジエントシステム
 カラム : Agilent製 Poroshell 120 SB-C18, 2.1 x 100mm, 2.7 μ m
 カラム温度 : 40℃
 移動相A : 水 : アセトニトリル (950:50, 20mmol/L ヘプタフルオロ酪酸 (以下「HFBA」という。))
 B : アセトニトリル : 水 (800:200, 20mmol/L HFBA)
 グラジエント条件 : A/B=90/10 (0-1min) →0/100 (10-20min) →90/10 (25-35min)
 移動相流量 : 0.2mL/min
 試料注入量 : 5 μ L

2) MS条件

MS機種 : Applied Biosystems製 API3200 QTrap

表1 モニターイオン

物質名	条件	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)
TBT	定量	291.2	179.0
	定性	291.2	122.9
		291.2	235.1
TPT	定量	351.0	119.9
	定性	351.0	197.1
		351.0	273.0
TBT-d27	定量	318.3	190.3
	定性	318.3	126.0
		318.3	254.0
TPT-d15	定量	366.2	120.1
	定性	366.2	202.1
		366.2	118.8
DBT	定量	269.1	155.1
	定性	269.1	213.0
		269.1	120.9
DPT	定量	309.0	197.1
	定性	309.0	154.8
		309.0	77.2

インターフェース : Turbo V source

測定法 : MRMモード

イオン化モード : ESI positive モード

イオン源温度 : 400℃

イオン化電圧 : 5500V

モニターイオン : 表1に示した

2.3.2 ゲル浸透クロマトグラフ (GPC)

カラム : 昭和電工製 GLNpak PAE-2000 AC
 (プレカラム : PAE-G AC)

カラム温度 : 40℃

移動相 : アセトン : シクロヘキサン (95 : 5)

移動相流量 : 4mL/min

試料注入量 : 2mL

2.4 試験溶液調製方法

分析フローを図1に示す。細切した試料2.0gを50mL遠沈管に量り取り、サロゲート (TBT-d27及びTPT-d15) を各0.2 μ gになるよう添加した。次に、精製水10mL, 1mol/L塩酸溶液5mL, 塩化ナトリウム5g, アセトン : ヘキサン (1:5) 10mLを加えてポリトロンでホモジナイズした後、10分間振とうした。700×Gで5分間遠心分離した。上層を分取し、下層をヘキサンで再抽出した。上層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水した。

分液ロートに移し、ヘキサン飽和アセトニトリル30 mL



図1 分析フロー

を加え、5分間振とうした。静置した後、アセトニトリル層を分取した。分離したヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう静置し、アセトニトリル層を分取した。この操作を更に行い、得られたアセトニトリル層を合わせ、0.5%酢酸アセトニトリル2mLを加えた後、約2mLまで減圧濃縮し抽出液を得た。

ENVI-Carb/LC-NH₂カラム及びMultiSep PRカラムに、それぞれ0.5%酢酸アセトニトリル10mLを注入しコンディショニングした。上側にENVI-Carb/LC-NH₂、下側にMultiSep PRを連結し、抽出液を負荷した。0.5%酢酸アセトニトリル5mLで容器を洗い込み、さらに0.5%酢酸アセトニトリル15mLを添加し溶出液を得た。溶出液に0.1%ギ酸1 mmol/L酢酸アンモニウム アセトニトリル溶液1mLを加え、1mL以下になるまで減圧濃縮した。濃縮液を0.1%ギ酸1mmol/L酢酸アンモニウム アセトニトリル溶液で1mLに定容した。メンブレンフィルターでろ過したものをLC-MS/MS測定用試験溶液とした。

3 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS測定条件

3.1.1 MS条件

イオン化法はESI positive モードを選択し、条件の検討を行った。MSスペクトルで測定された各測定物質の最も強度が高いイオンのm/zは、TBT : 291.2, TPT : 351.0, TBT-d27 : 318.3, TPT-d15 : 366.2, DBT : 269.1, DPT : 309.0であり、これらは[M+H-HCl]⁺に相当するピークであった。これらをプリカーサーイオンとした場合に得られるプロダクトイオンを強度の高い順に表1に示した。一番強度が高いイオンを定量イオン、その他のイオンを定性イオンとした。これらの条件は既報^{4), 6)}でのLC/MS測定条件の検討の際に測定されたプリカーサーイオン及びプロダクトイオン生成過程の考察と一致していた。

3.1.2 LC条件

分析カラムはC18, Phenyl (Waters製Xbridge 2.1 x 150mm, 3.5 μm) 及びHILIC (ナカライテスク製COSMOSIL 2.0 x 150mm, 5 μm) を、移動相はアセトニト

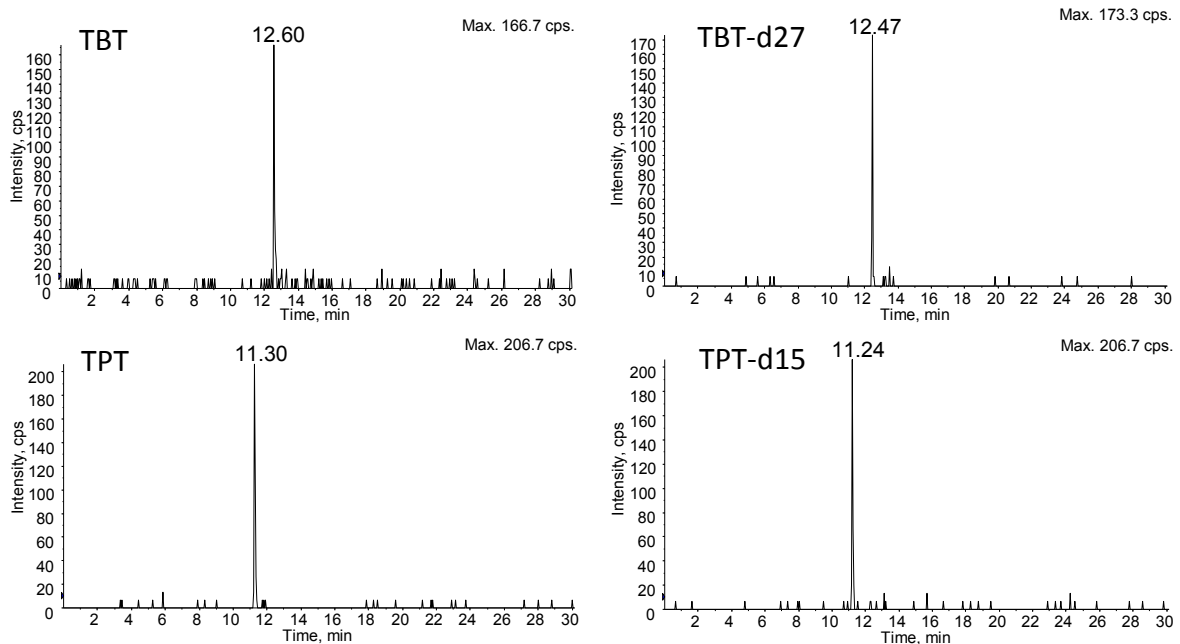


図2 MRMクロマトグラム (TBT, TPT, TBT-d27, TPT-d15 各0.002 μg/mL)

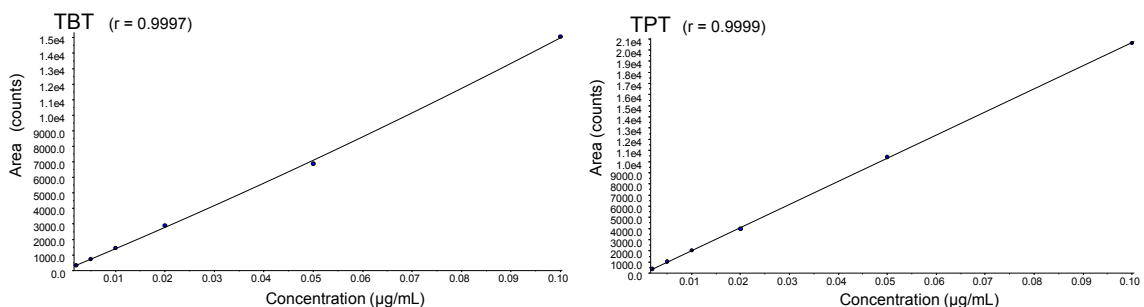


図3 検量線 (TBT, TPT)

リル,酢酸アンモニウム,ギ酸アンモニウムなどを各種組み合わせで検討した。その結果,アミノグリコシドの分析で用いられているC18カラムを用い,20 mmol/L HFBAを含有したアセトニトリルと水のグラジエント分析の条件⁶⁾でTBT,TPT,TBT-d27,TPT-d15標準品(0.002 μg/mL)は図2に示す良好なピーク形状を得ることが出来た。一方で,DBT,DPTは検討した全ての条件で感度が低く,良好なピーク形状を得ることが出来なかった。この結果から,DBT,DPTは以後の検討は行わなかった。

3.1.3 検量線及び定量限界値

0.002 μg/mLの濃度の混合標準溶液(検体濃度では0.001 μg/g)から得られるピークのS/N比を確認したところ,TBT,TPT,TBT-d27,TPT-d15標準品が目標値のS/N比≥10を満たしていた。また,各標準品の0.002~0.1 μg/mL 0.1%ギ酸 1mmol/L 酢酸アンモニウム アセトニトリル溶液を6点調製し,LC-MS/MS測定を行った検量線を図3に示す。TBT,TPT共に良好な直線性(相関係数0.999以上)が得られた。目標とした定量限界値である検体濃度として0.001 μg/gで十分な定量性を確保できた。

3.2 試験溶液調製法

3.2.1 抽出法の検討

有機スズ化合物は強い共有結合,イオン結合により海産物中のタンパク質,血液などと結合していることが考えられるため⁸⁾,塩酸酸性下での抽出を検討した。小林らの方法⁵⁾を参考に,アセトン:ヘキサン混液で抽出することとし,その比を(1:1),(1:2),(1:3),(1:5)と変化させ,1mol/L塩酸,超純水,塩化ナトリウムを加えて抽出した結果を表2に示す。ヘキサンの比率を増やすほど抽出効率は良くなり,その効果はTBTで顕著であった。よって,アセトン:ヘキサン混液の比は(1:5)を採用し,抽出効率を増加させるためにヘキサンで再度抽出を行った。また,標準品を溶

かしている溶媒を乾固した後に再溶解するとTBTは60%程度に減少した。そのため,溶媒を濃縮する操作では0.5%酢酸アセトニトリル溶液を1mL添加した後に濃縮を行い,1mL以下程度になったら濃縮を止め,0.5%酢酸アセトニトリル溶液で1mLに定容した。なお,TPTは溶媒を乾固した後に再溶解した場合でも減少しなかった。

3.2.2 脱脂法の検討

脱脂法として,アセトニトリル/ヘキサン分配とGPCの検討を行った。アセトニトリル/ヘキサン(1:1)分配でのアセトニトリルへの分配率を表3に示す。1回での分配率はTBTが50%程度,TPTが90%程度であった。

GPCは魚介類中PCB検査の条件⁹⁾を参考に行い,TBT及びTPTの溶出結果を表3に示す。TBTは14~18分(4分:16mL),TPTは16~30分(14分:56mL)の画分に90%以上溶出した。大部分の脂肪成分は14分までに溶出する⁹⁾ので,脱脂法として有効であった。しかし,TPTの溶出時間が長いこと,洗浄も含めて1検体に1時間程度かかること等の理由により,アセトニトリル/ヘキサン分配を選択した。アセトニトリル/ヘキサン分配はアセトニトリルへの分配率を上げるために3回行うこととした。

3.2.3 精製法の検討

精製法としては固相カートリッジカラムのFlorisil,ENVI-Carb/LC-NH2,ENVI-Carb及びMultiSep PRを検討した。標準溶液を0.5%酢酸アセトニトリル溶液に溶かし,各カラムに負荷した後,0.5%酢酸アセトニトリル溶液で溶出させた。結果を表4に示す。Florisil,ENVI-Carb/LC-NH2,ENVI-Carbでは10mL,MultiSep PRでは15mLでほぼ100%溶出した。MultiSep PRは,脂肪酸エステル類の除去効果が高く,魚介類や畜産物試料の前処理方法として採用されている¹⁰⁾。そこで,精製効果を高めるために,MultiSep PRと性質の異なるカラム(Florisil又はENVI-Carb/LC-NH2)をMultiSep PRの上に連結した連

表2 抽出溶媒の回収率(%)

物質名	アセトン:ヘキサン			
	1:1	1:2	1:3	1:5
TBT	41	44	62	92
TPT	84	86	92	96

表3 脱脂操作の回収率(%)

物質名	アセトニトリル/ヘキサン分配	GPC分画 (min)									合計
		12-14	14-16	16-18	18-20	20-22	22-24	24-26	26-28	28-30	
TBT	49	0	105	13	0	0	0	0	0	0	118
TPT	90	0	0	24	34	17	9	5	3	2	93

結カラム法での検討を行った結果を表5に示す。0.5%酢酸アセトニトリル溶液に溶かした標準溶液を各連結カラムに負荷すると、0.5%酢酸アセトニトリル溶液15mLでほぼ100%溶出した。なお、ENVI-Carb/LC-NH2で良い結果が得られたので、ENVI-CarbとMultiSep PRの連結カラムの検討は行わなかった。

ハマチ及びカキを試料として、試験溶液調製方法に従って得た抽出液を2種類の連結カラムを用いて精製したところ、FlorisilとMultiSep PRの連結カラムを用いたカキの溶出液のみが黄色に着色しており、精製が不十分であることが確認された。よって、ENVI-Carb/LC-NH2とMultiSep PRの連結カラムを採用した。

3.2.4 添加回収試験

添加回収試験はアジ及びカキを用いて実施した。細切したアジ及びカキ2gに各化合物を0.2μg添加し、試験溶液調製方法に従って5回併行で検査した。結果を表6に示す。回収率は100.6～105.5%、併行精度は3.6～6.4%であり、良好な結果が得られた。また、サロゲートの回収率はアジがTBT-d27：73.0%、TPT-d15：86.4%、カキがTBT-d27：74.7%、TPT-d15：89.9%であり、共に十分満足できる値であった。

4 実態調査

本法を用いて県内で市販されていた水産物8種類につ

表4 固相カラムの回収率 (%)

物質名	Florisil				ENVI Carb/LC-NH2				ENVI Carb				MultiSep PR			
	溶出液量 (mL)				溶出液量 (mL)				溶出液量 (mL)				溶出液量 (mL)			
	0-5	5-10	10-15	合計	0-5	5-10	10-15	合計	0-5	5-10	10-15	合計	0-5	5-10	10-15	合計
TBT	88	5	0	93	88	11	0	99	101	0	0	101	0	47	55	101
TPT	87	10	0	97	58	56	0	114	100	7	0	107	0	58	56	114

表5 連結カラムの回収率 (%)

物質名	Florisil + MultiSep PR					ENVI Carb/LC-NH2 + MultiSep PR				
	溶出液量 (mL)					溶出液量 (mL)				
	0-5	5-10	10-15	15-20	合計	0-5	5-10	10-15	15-20	合計
TBT	0	53	42	0	95	0	54	42	0	96
TPT	0	69	42	0	111	10	66	41	0	117

表6 添加回収試験結果

検体名	TBT		TPT	
	回収率(%)	併行精度(%)	回収率(%)	併行精度(%)
アジ	100.6	5.6	105.5	3.6
カキ	104.0	5.1	100.1	6.4

表7 実態調査検出結果 (μg/g)

検体名	TBT	TPT
アナゴ	0.002	0.005
ママカリ	0.004	0.003
ゲタ	< 0.001	< 0.001
コイ	< 0.001	< 0.001
ボラ	< 0.001	< 0.001
カレイ	< 0.001	< 0.001
カキ	0.004	0.014
ハマチ	0.003	0.001

いて実態調査を行った検査結果を表7に示す。アナゴ、マカリ、カキ及びハマチ4検体からはTBT,TPT共に検出され、その値はTBTが0.002～0.004 $\mu\text{g/g}$ 、TPTが0.001～0.014 $\mu\text{g/g}$ であった。ゲタ、コイ、ボラ、カレイ4検体からはTBT,TPT共に検出されなかった。また、カキ及びハマチを液液分配やテトラエチルホウ酸ナトリウム溶液による誘導体化で前処理を行いGC-MS/MSで測定する一斉分析法²⁾により検出した値は今回の分析法の検出値の2倍程度であった。この原因はGC-MS/MS測定ではマトリックス効果で値が高くなる傾向がある一方で、LC-MS/MS測定ではマトリックス効果によってイオン化抑制が起こり、値が低くなる傾向があること等が考えられた。今後は、環境標準物質を用いた検討等を行い両検査法の検証を行っていききたい。

厚生労働省のビス(トリブチルスズ)オキシド(以下「TBTO」という。)の暫定許容摂取量は1.6 $\mu\text{g/kg/日}$ としている¹¹⁾。平成26年の国民健康・栄養調査の結果、魚介類の平均摂取量は74.5g/人/日(20歳以上)とされていることから、体重50kgの人のTBTO暫定許容濃度は1.1 $\mu\text{g/g}$ となる。今回TBTの検出値が最も高かったカキ0.004 $\mu\text{g/g}$ (TBTO換算値0.004 $\mu\text{g/g}$)はこの値の0.4%相当であり、健康影響上の問題はないと考えられる値であった。

TPTについては、FAO(国連食糧農業機関)とWHO(世界保健機構)がTPTの暫定許容摂取量は0.5 $\mu\text{g/kg/日}$ としている¹²⁾。体重50kgの人のTPT暫定許容濃度は0.34 $\mu\text{g/g}$ となる。今回TPTの検出値が最も高かったカキ0.014 $\mu\text{g/g}$ はこの値の4.1%相当であり、健康影響上の問題はないと考えられる値であった。

5 まとめ

LC-MS/MSを用いた魚介類中TBT及びTPTの迅速同時分析法の検討を行い、次の結果を得た。

- (1) TBT,TPT,TBT-d27,TPT-d15をLC-MS/MSで感度良く測定出来た。しかし、DBT,DPTを感度良く測定することは出来なかった。
- (2) 抽出法は塩酸性下でアセトン:ヘキサン(1:5)で抽出し、抽出効率を増加させるためにヘキサンで再抽出を行うこととした。
- (3) 脱脂法はアセトニトリル/ヘキサン分配を採用し、1回での分配率はTBTが50%程度、TPTが90%程度であったため、3回抽出を行った。
- (4) 精製法はENVI-Carb/LC-NH₂とMultiSep PRの連結カラムを採用し、0.5%酢酸アセトニトリル溶液15mL

でほぼ100%溶出させた。

- (5) 添加回収試験はアジ及びカキを用いて実施し、回収率は100.6～105.5%、併行精度は3.6～6.4%であり、良好な結果が得られた。
- (6) 実態調査を水産物8種類について行った。4種類からTBT,TPT共に検出され、その値はTBTが0.002～0.004 $\mu\text{g/g}$ 、TPTが0.001～0.014 $\mu\text{g/g}$ であり、健康影響上の問題はない値であることがわかった。

今回は高濃度での添加回収試験を行ったので、より低濃度での添加回収試験及び環境標準物質を用いた検討等を引き続き行っていきたい。また、DBT,DPTのLC測定条件及び前処理方法の再検討もを行い、TBT及びTPTとの同時分析法の可能性を検討したい。

文 献

- 1) 衛生試験法・注解2010 2.4食品汚染物試験法 3) 有機スズ化合物(ジブチルスズ(DBT)、トリブチルスズ(TBT)、ジフェニルスズ(DPT)およびトリフェニルスズ(TPT))(2010年2月10日発行)
- 2) 山辺真一、武志保、肥塚加奈江、今中雅章：魚介類中の有機スズ実態調査(Ⅱ)、岡山県環境保健センター年報、29、117-122、2005
- 3) 吉元秀和、村上弘、福島孝兵、吉田達雄、飛野敏明：熊本県の港湾における有機スズ化合物の生物濃縮に関して—LC/MS/MSによる分析—、熊本県保健環境科学研究所報、39、35-42、2010
- 4) 古川浩司、橋本真、橋爪清：LC/MS/MSによる海水中のトリブチルスズ及びトリフェニルスズ分析、三重県保全環境事業団報告、42、175-182、2013
- 5) 小林麻紀、酒井菜穂子、上條恭子、小池裕、新藤哲也：LC-MS/MSを用いた魚介類中トリブチルスズ及びトリフェニルスズ化合物の分析、東京都健康安全研究センター年報、66、147-151、2015
- 6) Joseph H.Banoub, Judith Miller-Banoub, George V.Sheppard, Howard J.Hodder：Electrospray tandem mass spectrometric measurements of organotin compounds, Spectroscopy 18, 95-112, 2004
- 7) Andy Zhai：Agilent Bond Elut Plexa SPE, Agilent Poroshell 120カラム, LC/タンデムMSを使用したウシ筋肉中のアミノグリコシドの分析, Agilent Technologies アプリケーションノート
- 8) 食品衛生検査指針：Ⅱ. 試験法, 第6章食品中の汚染物質及び変質物, 試験法9.有機スズ(トリブチルスズおよびトリフェニルスズ), 694-702

- 9) 剣持堅志,武志保,難波順子,吉岡敏行, 西島倫子ら：
食品中の有害化学物質等に関する研究－ポリ塩化ビ
フェニル類（PCBs）全異性体及びポリ塩化ナフタレ
ン類（PCNs）の同時分析法確立のための基礎的検討
－, 岡山県環境保健センター年報, 26, 72-81, 2002
- 10) 吉岡敏行,難波順子,浅田幸男,赤木正章,北村雅美：食品
と医薬品等に含まれる有害物質等の分析技術の開発
に関する研究－水産物及び穀類等の残留農薬分析法
の検討について－, 岡山県環境保健センター年報, 40,
77-83, 2016
- 11) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長：衛乳第18号,魚介類
中のピストリブチルオキシド（TBTO）について（通
知）,1985
- 12) FAO/WHO Monograph,1970 Evaluations of some
pesticides residues in food , 1971

【資 料】

ダイズ加工食品を対象とした遺伝子組換え食品の実態調査
(平成28年度)

Monitoring Results of Genetically Modified Organisms in Soyproducts
(FY2016)

北村雅美, 赤木正章, 肥塚加奈江, 金子英史, 難波順子 (衛生化学科)
Masami Kitamura, Masaaki Akaki, Kanae Koezuka, Hidefumi Kaneko, Junko Namba
(Food and Drug Chemical Research Section)

[キーワード: 遺伝子組換え作物, Roundup Ready Soybean (RRS), Liberty Link Soybean (LLS), Roundup Ready 2 Yield (RRS2), 定量PCR]

[Key words: Genetically modified organisms, Roundup Ready Soybean (RRS), Liberty Link Soybean (LLS), Roundup Ready 2 Yield (RRS2), Quantitative PCR]

1 はじめに

全世界における遺伝子組換え作物の栽培面積は、平成8年の170万ヘクタールから平成28年の1億8510万ヘクタールまで、21年間の商業栽培を通じて実に約110倍にまで増加している¹⁾。このように、世界的には遺伝子組換え作物の栽培が増加しているが、日本国内では食品としての商業栽培は行われておらず、国内で流通する遺伝子組換え作物は、全て輸入されたものである。具体的には、平成28年にはダイズ及びトウモロコシ約2,000万トンを輸入しているが、そのうちの1,500万トン程度が遺伝子組換え品種と推定され^{1) 2)}、もはや遺伝子組換え作物は日常生活の中で欠かせないものとなってきている。

日本においては、遺伝子組換え作物を流通させようとする場合には、生物多様性への影響や、食品や飼料としての安全性について、最新の科学的知見により評価を行い、安全性が確認されなければならない(安全性審査)。よって、遺伝子組換え食品の検査を行う意義としては、「安全性未審査の遺伝子組換え作物が国内流通することのないよう監視を行う」ことと、「安全性審査済みの遺伝子組換え作物を食品原料として使用している場合に原材料表示が正しいかどうかを確認する(5%を超える含有率ならば、原料作物は『遺伝子組換えである』と表示する義務がある。)」ことの2点が挙げられる。

岡山県では、遺伝子組換え食品の表示が義務化された翌年の平成14年度から遺伝子組換え食品の検査を行っており、平成24年度からはダイズ加工食品である豆腐や油揚げについて、「安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の検査方法」(平成24年11月16日付け消食表第201号

消費者庁次長通知)別添「安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の検査方法」2.1.2 定量PCR法に従い、食品衛生法に基づく収去検査(検査項目:安全性審査済の遺伝子組換え大豆であるRoundup Ready Soybean(以下RRS))を行ってきた。ダイズ加工食品については前出の通知では定量試験の対象外であるが、当県では通知法に準じて定量試験を行い、5%以上の混入が疑われる場合には原料のダイズ穀粒について定量試験を実施することとしている。このたび、岡山市内及び倉敷市内の小売店舗から試買したダイズ加工食品34検体から抽出したDNAの吸光度を測定して、その吸光度比によりリアルタイムPCRに供する検体としての適否を推定した。ついで前出の通知で検査法が示された遺伝子組換えダイズであるLiberty Link Soybean(以下LLS)及びRoundup Ready 2 Yield(以下RRS2)の2種類と従来から検査を行っていたRRSを加えた3項目について、リアルタイムPCRを行い、遺伝子組換えダイズの混入率の算出を行ったので、その結果を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

岡山市内及び倉敷市内の小売店舗から、豆腐(11検体)、油揚げ(11検体)、きなこ(5検体)、おから(3検体)、豆乳(2検体)及びゆば(2検体)を試買し、分析試料に供した。

2.2 試薬等

QIAGEN製: Genomic-Tip 20/G, RNase A (100mg/mL), Proteinase K, G2緩衝液, QBT緩衝液, QC緩衝液, QF緩衝液

滅菌水（超純水を滅菌）
 ナカライテスク製：エタノール（99.5%）、イソプロピルアルコール（99.5%）
 ニッポンジーン製：GMダイズ（RRS）プラスミドセット-ColEI/TE-
 GMダイズ（LLS）プラスミドセット-ColEI/TE-
 GMダイズ（RR2）プラスミドセット-ColEI/TE-
 ダイズ内在性DNA Le1オリゴヌクレオチドセット
 GMダイズ（RRS）系統別DNA RRSオリゴヌクレオチドセット
 GMダイズ（LLS）系統別DNA LLSオリゴヌクレオチドセット
 GMダイズ（RR2）系統別DNA RR2オリゴヌクレオチドセット
 Thermo Fisher Scientific製：TaqMan Universal PCR Master Mix,
 MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate,
 MicroAmp Optical Adhesive Film,
 MicroAmp Optical Film Compression Pad

2.3 測定

2.3.1 測定条件等

使用機器 分光光度計：Thermo Fisher Scientific NanoDrop 2000
 リアルタイムPCR：ABI PRISM 7900HT 96well

DNA抽出法及びリアルタイムPCR測定条件

平成24年11月16日付け消食表第201号消費者庁次長通知準拠及びJAS分析試験ハンドブック遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル改訂第3版（2012）一部参照

変更点：試料量1.0g, G2 buffer 8mL, ProteinaseK 100 μ L, RNaseA 10 μ L, 50°Cで2時間保温

2.3.2 PCR標的DNA及び内在性（Le1）遺伝子のコピー数と組換え遺伝子混入率の算出

「安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の検査方

法」（平成24年11月16日付け消食表第201号消費者庁次長通知）別添「安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の検査方法」2.1.2 定量PCR法に規定されている標準プラスミドDNA溶液を標準物質として用い、コピー数を算出した。具体的には、TaqMan Chemistryを応用した定量PCR法を行う。同法では、プライマー対及び蛍光オリゴヌクレオチドプローブを使用する。遺伝子組換え食品の定量は、非組換え体、組換え体を問わず普遍的に存在する遺伝子（内在性遺伝子）を内標として用い、内在性遺伝子のコピー数に対する組換え遺伝子を求めることで行う。ダイズの内在性遺伝子はLe1遺伝子であり、このコピー数を元にした組換え遺伝子のコピー数との比率で、混入率を算出する。（なお、混入率の定量下限値0.1%を担保するためには、Le1遺伝子のコピー数は20,000コピー数得られなければならない。）

なお、「不検出」とは、組換え遺伝子を標的としたリアルタイムPCRにおいて、組換え遺伝子が増幅されなかった（組換え遺伝子のコピー数が0）場合を表し、「0.1%未満の混入率」とは、43未満のCt値で組換え遺伝子の増幅が確認されたが、組換え遺伝子混入率の計算結果が0.1%未満のものを表す。

3 結果および考察

3.1 検体からのDNA収量及び吸光度比

試買検体から得られたDNA収量及び吸光度比を表1に示す。検体番号29のおからはDNA収量が極端に少なかった。このおからは豆腐工場のできるおからを乾燥させ、パウダー状にした製品であったので、高温磨砕処理によりDNAの断片化が進んだ³⁾ためDNA収量が少なくなったと推察された。また、検体番号31～34のきなこは、A260/A230<1であったため、糖の混入が多く、このことがPCR反応を阻害した⁴⁾可能性があると考えられた。（なお、A260/A230<1で糖の混入が疑われた場合は再抽出することとしており、再抽出を行ったが同様の結果になっ

表1 DNA収量及び吸光度比 (Ratio)

No.	品目	DNA収量 (μ g)	Ratio		No.	品目	DNA収量 (μ g)	Ratio		No.	品目	DNA収量 (μ g)	Ratio	
			A260/A230	A260/A280				A260/A230	A260/A280				A260/A230	A260/A280
1	豆腐	11.6	2.36	1.98	13	油揚げ	46.7	2.02	1.89	25	ゆば	13.0	2.21	1.95
2	豆腐	13.1	2.02	1.91	14	油揚げ	29.0	1.85	1.88	26	ゆば	36.9	2.19	1.95
3	豆腐	17.3	2.38	1.97	15	油揚げ	30.4	1.99	1.91	27	おから	6.0	2.20	2.06
4	豆腐	17.8	2.19	1.94	16	油揚げ	31.5	1.91	1.92	28	おから	1.5	2.41	1.84
5	豆腐	12.6	2.37	1.96	17	油揚げ	4.0	2.05	1.92	29	おから	0.9	2.18	1.93
6	豆腐	3.2	2.53	2.04	18	油揚げ	41.8	2.39	1.97	30	きなこ	106.2	1.70	1.88
7	豆腐	13.0	2.30	1.99	19	油揚げ	21.2	2.31	1.97	31	きなこ	30.1	0.51	1.38
8	豆腐	15.9	2.25	1.90	20	油揚げ	26.6	2.89	1.95	32	きなこ	10.8	0.73	1.60
9	豆腐	16.4	3.53	1.96	21	油揚げ	15.2	2.98	1.95	33	きなこ	49.9	0.63	1.50
10	豆腐	25.5	2.26	1.97	22	油揚げ	71.0	2.34	1.97	34	きなこ	20.1	0.32	1.10
11	豆腐	19.8	2.27	1.96	23	豆乳	26.2	2.38	1.98					
12	油揚げ	40.6	2.03	1.91	24	豆乳	29.8	2.32	1.95					

注：A260/A230<1の場合、糖の混入が多く、A260/A280<1.1の場合、タンパクの混入が多い。

表2 ダイズ内在性遺伝子 (Le1) コピー数

No.	品目	Le1コピー数	No.	品目	Le1コピー数	No.	品目	Le1コピー数
1	豆腐	48,000±14,000	13	油揚げ	37,000±12,000	23	豆乳	37,000±4,900
2	豆腐	40,000±12,000	14	油揚げ	40,000±15,000	24	豆乳	32,000±3,700
3	豆腐	34,000±8,000	15	油揚げ	33,000±4,200	25	ゆば	40,000±5,800
4	豆腐	40,000±3,700	16	油揚げ	55,000±14,000	26	ゆば	30,000±3,600
5	豆腐	41,000±7,800	17	油揚げ	42,000±12,000	27	おから	28,000±5,300
6	豆腐	55,000±7,000	18	油揚げ	43,000±10,000	28	おから	31,000±1,400
7	豆腐	36,000±3,500	19	油揚げ	36,000±4,300	29	おから	5,000±3,100
8	豆腐	39,000±2,700	20	油揚げ	46,000±13,000	30	きなこ	10,000±3,800
9	豆腐	43,000±6,000	19	油揚げ	36,000±4,300	31	きなこ	3,100±700
10	豆腐	36,000±2,000	20	油揚げ	46,000±13,000	32	きなこ	2,500±200
11	豆腐	42,000±3,500	21	油揚げ	52,000±2,500	33	きなこ	2,300±400
12	油揚げ	41,000±13,000	22	油揚げ	39,000±3,900	34	きなこ	2,000±300

表3 検体別遺伝子組換えダイズ混入率結果

No.	品目	組換え遺伝子混入率(%)			原産国	表示
		RRS	LLS	RRS2		
1	豆腐	<0.1	<0.1	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
2	豆腐	<0.1	<0.1	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
3	豆腐	<0.1	<0.1	<0.1	アメリカ	遺伝子組換えでない
4	豆腐	<0.1	<0.1	<0.1	アメリカ・日本	遺伝子組換えでない
5	豆腐	<0.1	不検出	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
6	豆腐	不検出	<0.1	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
7	豆腐	<0.1	不検出	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
8	豆腐	<0.1	<0.1	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
9	豆腐	<0.1	不検出	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
10	豆腐	<0.1	不検出	<0.1	アメリカ・カナダ	遺伝子組換えでない
11	豆腐	<0.1	不検出	<0.1	日本	遺伝子組換えでない
12	油揚げ	不検出	不検出	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
13	油揚げ	<0.1	<0.1	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
14	油揚げ	<0.1	<0.1	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
15	油揚げ	<0.1	<0.1	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
16	油揚げ	<0.1	<0.1	<0.1	アメリカ・カナダ	記載なし
17	油揚げ	<0.1	<0.1	<0.1	カナダ	遺伝子組換えでない
18	油揚げ	不検出	<0.1	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
19	油揚げ	<0.1	<0.1	<0.1	不明	記載なし
20	油揚げ	<0.1	不検出	<0.1	アメリカ・カナダ	記載なし
21	油揚げ	<0.1	<0.1	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
22	油揚げ	<0.1	不検出	<0.1	不明	遺伝子組換えでない
23	豆乳	<0.1	不検出	<0.1	不明	記載なし
24	豆乳	不検出	不検出	不検出	日本	遺伝子組換えでない
25	ゆば	不検出	不検出	不検出	日本	遺伝子組換えでない
26	ゆば	不検出	不検出	不検出	日本	遺伝子組換えでない
27	おから	不検出	不検出	不検出	アメリカ・カナダ	遺伝子組換えでない
28	おから	不検出	不検出	不検出	日本	遺伝子組換えでない
29	おから	検知不能	検知不能	検知不能	日本	遺伝子組換えでない
30	きなこ	検知不能	検知不能	検知不能	カナダ	遺伝子組換えでない
31	きなこ	検知不能	検知不能	検知不能	不明	遺伝子組換えでない
32	きなこ	検知不能	検知不能	検知不能	カナダ	遺伝子組換えでない
33	きなこ	検知不能	検知不能	検知不能	日本	遺伝子組換えでない
34	きなこ	検知不能	検知不能	検知不能	不明	遺伝子組換えでない

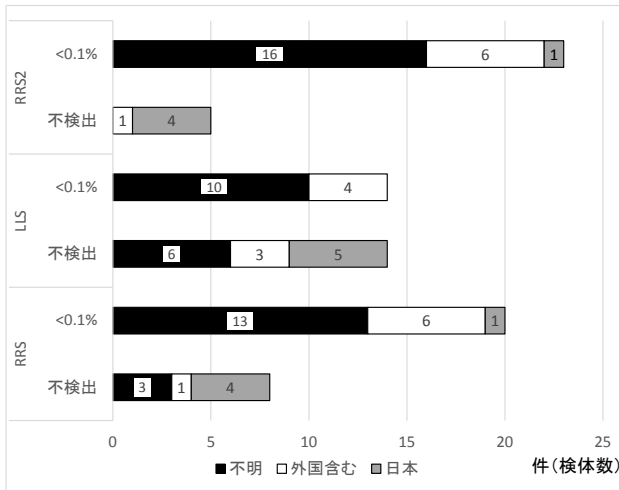


図1 混入率別の原産国表示

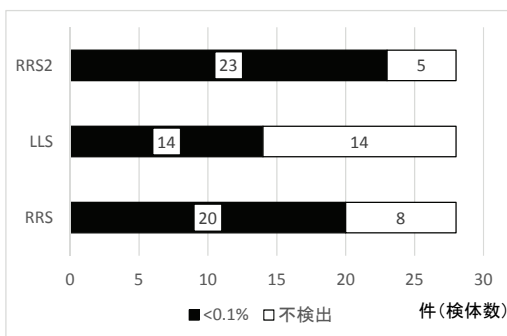


図2 組換え遺伝子系統別の混入率

た。)

3.2 Le1遺伝子コピー数

リアルタイムPCR結果のうち、Le1遺伝子のコピー数を表2に示す。検体番号29～34は、Le1遺伝子のコピー数が2,000～10,000コピー数と少なく、検知不能となったが、その他の検体については20,000コピー数以上と良好なコピー数が得られた。Le1遺伝子のコピー数が少なかった原因としては、元々のDNAの断片化が進んでいたことと、糖の混入が考えられた。ただし、検体番号30のきなこは、DNA収量が106.2μgと全34検体の中で一番多い計算結果となり、A260/A230が1.7で、糖の混入も少ないと推察されるにも関わらず、Le1遺伝子のコピー数が10,000コピー数程度と少なくなった。このことについては、検体番号30のきなこのDNA収量が、使用したDNA抽出キットのDNA収量の規格(<20μg)を大幅に超えていることから、吸光度測定でDNA以外の、波長260nm付近に極大吸収を持つ何らかの物質の混入が考えられた。

3.3 遺伝子組換えダイズ混入率

検体別遺伝子組換えダイズ混入率算出結果を表3に示す。検体番号1～28について、遺伝子組換えダイズの混入率は5%未満であったが、定量下限値である0.1%未満

の混入率のものが多くあった。不検出及び0.1%未満の混入率の原産国別の検体数のグラフを図1に示す。0.1%未満混入検体の原産国は、産地表示のない「原産国不明」がRRSで13件、LLSで10件、RRS2で16件であり、「外国、外国+日本(図1の「外国含む」)(RRS 6件、LLS 4件、RRS2 6件)、「日本」(RRS 1件、LLS 0件、RRS2 1件)に比べて多かった。一方、原産国表示が「日本」である5検体中4検体はいずれの組換え遺伝子系統でも不検出であった。現在、国内では遺伝子組換えダイズの商業栽培は行われていないため、0.1%未満混入検体の多くを占めた「原産国不明」の検体は外国産であろうと推察された。

また、0.1%未満混入検体の内訳を組換え遺伝子系統別に見ると、RRSで20件、LLSで14件、RRS2で23件であり(図2)、この傾向は他自治体からの報告⁵⁾⁶⁾と同様であった。

前述のとおり国内では遺伝子組換えダイズの商業栽培は行われていない⁷⁾ため、国内各地の同様の状況は、国外の遺伝子組換えダイズの栽培状況を反映していると考えられる。RRS2は、RRSの収量を増加させた改良品種⁸⁾で、RRSと同じ農薬(グリホサート)耐性であるため、RRSの栽培経験がある生産者の場合は、異なる農薬(グルホシネート)耐性のLLSよりもRRS2栽培に切り替えるケースが多いものと推察された。

4 まとめ

平成28年度に岡山市内及び倉敷市内の小売店舗で試買した34検体のダイズ加工食品について遺伝子組換え食品実態調査を行った。1種類のおからと5種類のきなこについて検知不能となったが、RRS、LLS及びRRS2の3項目について定量検査が可能で組換え遺伝子混入率を算出した結果、混入率はいずれも意図せざる混入率である5%未満であった。

今後は、平成28年11月17日付けで一部改正された「食品表示基準について」(消食表第706号、消費者庁次長通知)で示された検査法で対応できるよう体制を整え、適切な食品表示の監視のために、遺伝子組換え食品の検査を継続していくことが必要である。

文 献

- 1) 国際アグリバイオ事業団 (ISAAA) : Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops : 2016
- 2) 農林水産省ホームページ : 農林水産物輸出入統計、農林水産物輸出入概況 (2016年) 公表資料
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/attach/pdf/houkoku_gaikyou-1.pdf

- 3) 荒平正緒美, 深澤親房: PCR法による植物遺伝子の検出方法, 特許公報, 特許第3131633号
- 4) 板宮裕実, 吉川ひとみ: 植物の法科学的検査に適したPCRキットの比較, 分析化学, Vol.65 (2016)
- 5) 大森清美, 清水碧ら: 遺伝子組換え食品の分析結果(平成25年度), 神奈川県衛生研究所研究報告, No.44, 35-37, 2014
- 6) 沖嶋直子, 小林亜里沙ら: 長野県松本地域で販売されたダイズ製品における組換えダイズ混入状況の網羅的調査結果, 日本食品化学学会誌, vol.22 (2), 123-132 (2015)
- 7) 農林水産省ホームページ「遺伝子組換え農作物をめぐる国内外の状況」遺伝子組換え農作物の管理について-生物多様性を確保する観点から- (平成29年9月) <http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/zyoukyou/attach/pdf/index-15.pdf>
- 8) 日本モンサントホームページ
[http://www.monsantoglobal.com/global/jp/newsviews/pages/favorable-harvest -results.aspx](http://www.monsantoglobal.com/global/jp/newsviews/pages/favorable-harvest-results.aspx)

業 務 報 告

2016年岡山県における感染症の患者発生状況について

(岡山県感染症情報センター業務報告 2016.1～2016.12)

1 感染症発生動向調査

1.1 調査方法

感染症発生動向調査事業実施要綱（平成11年3月19日付け健医発第458号。以下「要綱」という。）に基づき、各関係機関から報告された患者情報を感染症サーベイランスシステムにより、国立感染症研究所感染症疫学センターへ報告するとともに、岡山県内の発生状況を解析した。

1.2 調査期間

全数把握感染症（表1-1）及び月報告の定点把握感染症（表1-2-②）の調査期間は、2016年1月1日～12月31日、週報告の定点把握感染症（表1-2-①）については、2016年第1週～第52週（2016年1月4日～2017年1月1日）とした。なお、インフルエンザについては、流行時期にあわせて、第36週～翌年第35週（2015年8月31日～2016年9月4日）とした。また、いずれの感染症も診断日を基準とした。

2 届出対象感染症

対象となる感染症は、「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104号。以下「感染症法」という。）により定められており、一類～五類感染症、新型インフルエンザ等感染症及び指定感染症に分類されている。一類～四類感染症、新型インフルエンザ等感染症及び指定感染症は全数把握対象に、五類感染症は、全数把握対象と定点把握対象に区分されている（表1参照）。なお、2016年2月15日に感染症法施行令及び施行規則の改正により、「ジカウイルス感染症」が全数把握対象の四類感染症に追加となった。

2.1 全数把握感染症

全数把握感染症とは、発生数が希少、あるいは周囲への感染拡大防止を図るため、発生した全ての患者を把握することが必要な感染症で、医師は該当する患者を診断したときには、最寄りの保健所へ届出なくてはならない。

2.2 定点把握感染症

定点把握感染症とは、発生動向の把握が必要な感染症のうち、患者数が多数で、その全てを把握する必要がないもので、指定された医療機関（定点）から発生状況が

週単位又は月単位で届出されることになっている。なお、定点医療機関は、要綱の基準に基づき選定されており、岡山県の場合、定点医療機関数は、小児科定点54、内科定点30、眼科定点12、性感染症定点17、基幹定点5が設定され、小児科定点と内科定点をあわせて、インフルエンザ定点84となっている。

定点把握感染症については、すべての定点医療機関から報告される患者数を定点医療機関数で割った値（以下「定点あたり報告数」という。）、又は年間の患者報告数を定点医療機関数で割った値（以下「定点あたり累積報告数」という。）を用いて、全国や過去のデータとの比較を行った。

3 結果

3.1 全数把握感染症の発生状況（表2、3参照）

3.1.1 一類感染症

一類感染症の届出はなかった。

3.1.2 二類感染症

二類感染症は、結核の届出があり、急性灰白髄炎、ジフテリア、重症急性呼吸器症候群（病原体がベータコロナウイルス属SARSコロナウイルスであるものに限る。）、中東呼吸器症候群（病原体がベータコロナウイルス属MERSコロナウイルスであるものに限る。）、鳥インフルエンザ（H5N1）、鳥インフルエンザ（H7N9）の届出はなかった。

i) 結核

結核は311例の届出があり、過去5年間と比較して最も少なかった（図1）。病型は、患者213例、無症状病原体保有者96例、疑似症患者1例、死亡者1例で、無症状病原体保有者96例のうち28例が医療・介護従事者（医師、看護婦、介護士など）であった。性別は男性144例、女性167例で、年齢階級別では、60歳以上の高齢者が半数以上を占めていた（図2）。特に20歳代の女性が多くなっており、その半数は医療・介護従事者であった。

3.1.3 三類感染症

三類感染症は、腸管出血性大腸菌群感染症の届出があ

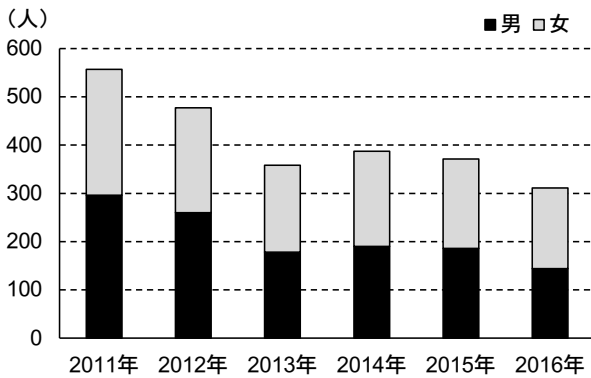


図1 結核 年次別発生状況

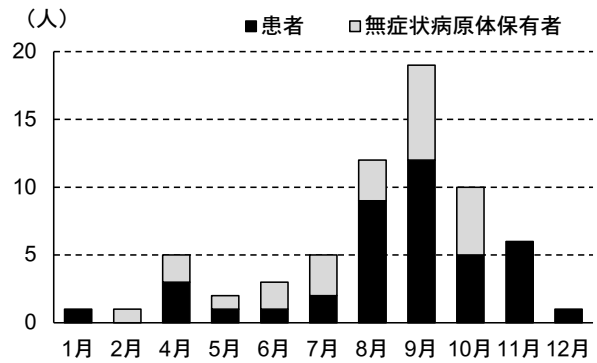


図4 腸管出血性大腸菌感染症 月別発生状況

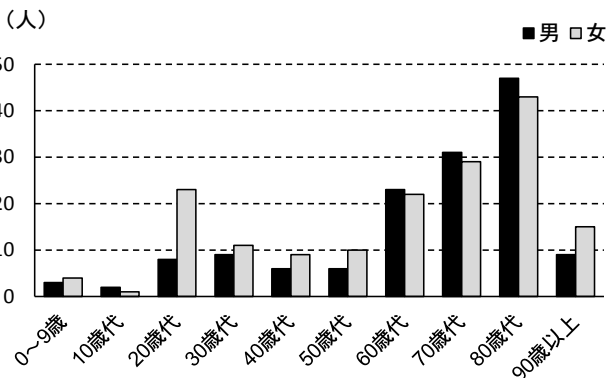


図2 結核 年齢階級別発生状況

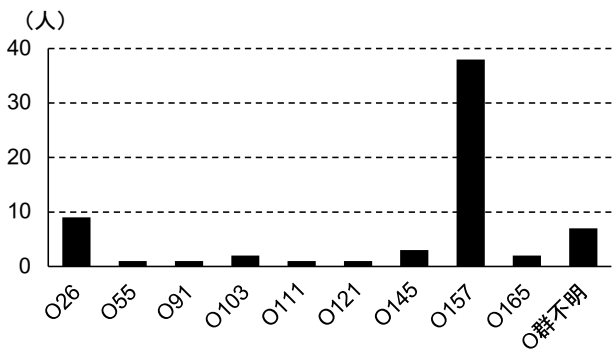


図5 腸管出血性大腸菌感染症 O血清群発生状況

り、細菌性赤痢、コレラ、腸チフス、パラチフスの届出はなかった。

i) 腸管出血性大腸菌群感染症

腸管出血性大腸菌感染症は65例の届出があり、前年（63例）とほぼ同数であった（図3）。病型は、患者41例（うち溶血性尿毒症候群2例）、無症状病原体保有者24例であった。性別は男性19例、女性46例で、乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層で発生が見られた。月別発生状況は9月の19例が最も多く、8月12例、10月10例の順となっており、夏～秋にかけて多くの届出があった（図4）。血清群別の内訳は、図5のとおりであった。

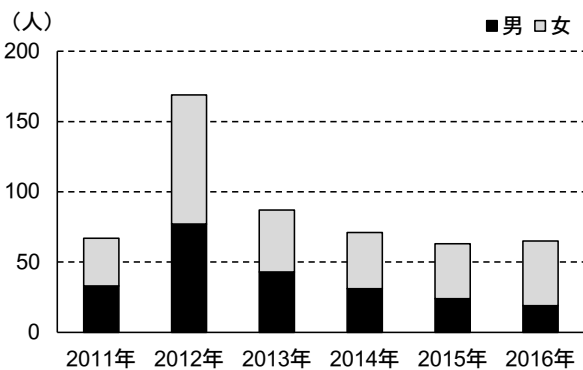


図3 腸管出血性大腸菌感染症 年次別発生状況

3.1.4 四類感染症

四類感染症は、E型肝炎、A型肝炎、重症熱性血小板減少症候群、つつが虫病、デング熱、日本紅斑熱、日本脳炎、レジオネラ症の届出があり、その他の四類感染症の届出はなかった。

i) E型肝炎

E型肝炎は2例の届出があり、60歳代と80歳代の男性であった。推定感染地域は、すべて国内（県内1例、都道府県不明1例）で、推定感染経路は経口感染1例、不明1例であった。

ii) A型肝炎

A型肝炎は3例の届出があった。性別は男性2例、女性1例で、年齢階級別では10歳代・30歳代・60歳代（各1例）であった。推定感染地域は、すべて国内（県内2例、都道府県不明1例）で、推定感染経路は経口感染2例、不明1例であった。

iii) 重症熱性血小板減少症候群

重症熱性血小板減少症候群は5月に1例の届出があり、2013年2例、2014年2例の発生に続いて5例目となった。患者は80歳代の女性で、推定感染地域は県内であった。

iv) つつが虫病

つつが虫病は2例の届出があり、月別発生状況は5月と12月であった。患者は60歳代男性と80歳代女性で、推定

感染地域は、すべて国内（県内）であった。

v) デング熱

デング熱は9月に1例の届出があり、50歳代の男性であった。推定感染地域は、国外（フィリピン）であった。

vi) 日本紅斑熱

日本紅斑熱は5例の届出があり、2009年10月に県内で初めての発生があつてから、累計報告数は19例となった。月別発生状況は7月1例、9月2例、10月2例であった。性別は男性2例、女性3例で、年齢階級別では50～80歳代であった。

vii) 日本脳炎

日本脳炎は1例の届出があり、2013年以来3年ぶりの患者発生であった。患者は60歳代の女性で、ワクチン接種歴はなく、推定感染地域は県内であった。

viii) レジオネラ症

レジオネラ症は27例の届出があり、前年と同数であった（図6）。病型は肺炎型26例、ポンティアック熱型1例であった。性別は男性20例、女性7例で、年齢階級別では70歳代（9例）が最も多く、次いで80歳代（7例）、60歳代（6例）の順であった（図7）。推定感染経路（重複あり）は、水系感染2例、塵埃感染2例、不明24例であった。

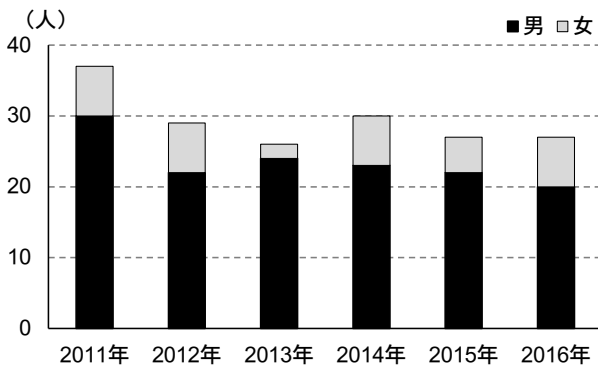


図6 レジオネラ症 年次別発生状況

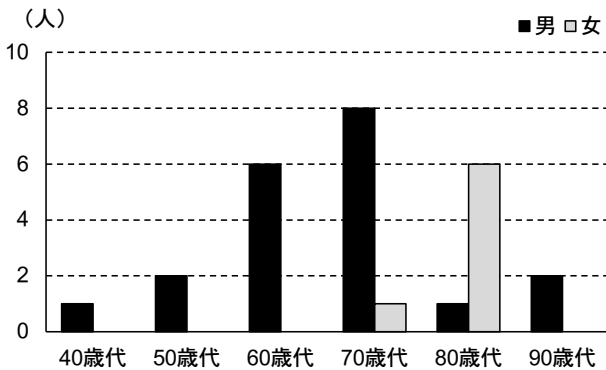


図7 レジオネラ症 年齢階級別発生状況

3.1.5 五類感染症（全数把握対象）

五類感染症では、15の感染症で届出があり、クリプトスポリジウム症、侵襲性髄膜炎菌感染症、先天性風しん症候群、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症、風しん、麻しん、薬剤耐性アシネトバクター感染症の届出はなかった。

i) アメーバ赤痢

アメーバ赤痢は18例の届出があり、前年（17例）とほぼ同数であった（図8）。病型は、腸管アメーバ症15例、腸管外アメーバ症3例であった。性別は男性15例、女性3例で、年齢階級別では60歳代（6例）、50歳代（5例）、40歳代（3例）の順となっており、患者はすべて30歳以上の成人であった（図9）。推定感染地域はすべて国内で、県内5例、都道府県不明13例で、推定感染経路は性的接触6例、不明12例であった。

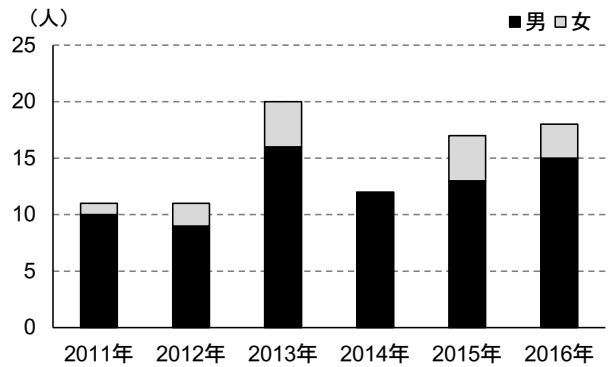


図8 アメーバ赤痢 年次別発生状況

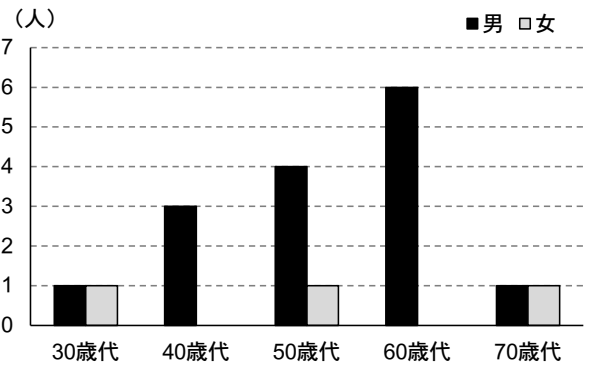


図9 アメーバ赤痢 年齢階級別発生状況

ii) ウイルス性肝炎（E型肝炎及びA型肝炎を除く）

ウイルス性肝炎は4例の届出があり、病型はすべてB型であった。性別は、すべて男性で、年齢階級別では30歳代1例、50歳代2例、60歳代1例であった。推定感染地域は国内3例（県内2例、県外1例）、国外（フィリピン）1例で、推定感染経路は、性的接触3例、不明1例であった。

iii) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症は28例の届出

があった（図10）。性別は男性19例，女性9例で，年齢階級別では，70歳代（15例），60歳代・70歳代（各5例），90歳以上（2例）の順となっており，患者のほとんどが60歳以上の高齢者であった（図11）。

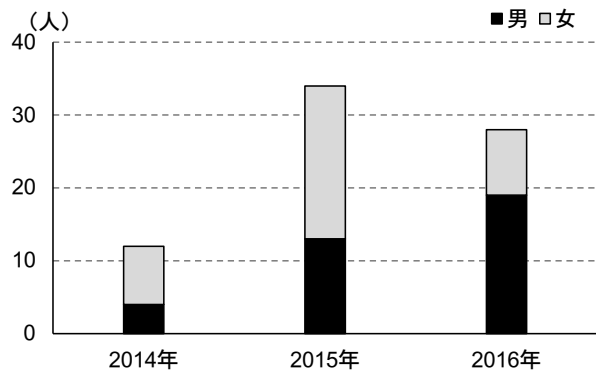


図10 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症 年次別発生状況 (2014年から全数把握感染症に追加)

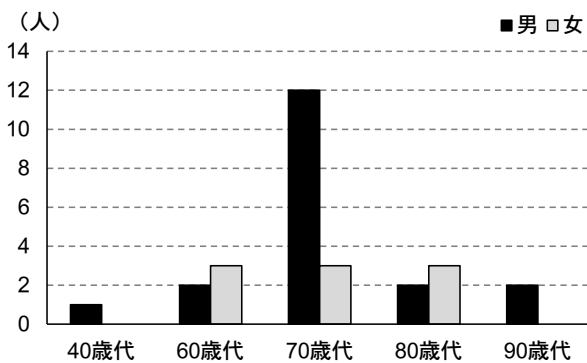


図11 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症 年齢階級別発生状況

iv) 急性脳炎

急性脳炎は11例の届出があった（図12）。そのうち病原体が検出されたのは，インフルエンザウイルスA，インフルエンザウイルスB，ヒトヘルペスウイルス，水痘・帯状疱疹ウイルスが各1例で，7例は病原体不明であった。男女別では男性8例，女性3例で，年齢階級別では0～9歳・60歳代（各4例），10歳代・40歳代・80歳代（各1例）であった（図13）。

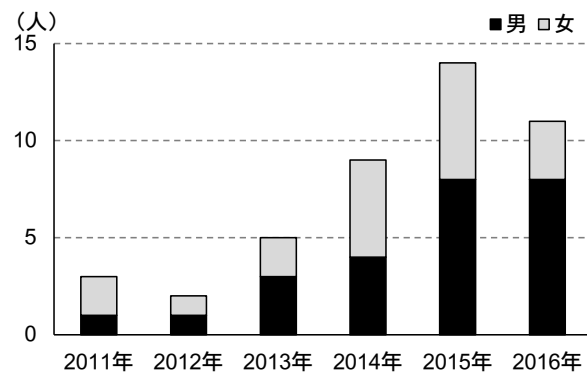


図12 急性脳炎 年次別発生状況

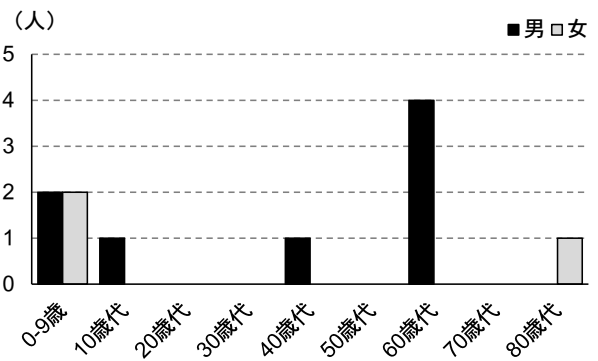


図13 急性脳炎 年齢階級別発生状況

v) クロイツフェルト・ヤコブ病

クロイツフェルト・ヤコブ病は3例の届出があった。性別は男性1例，女性2例で，年齢階級別では70～80歳代の高齢者であった。

vi) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は7例の届出があり，過去5年間と比較して最も多かった。性別は男性5例，女性2例で，年齢階級別では80歳代（2例），70歳代（2例），40歳代・50歳代・60歳代（各1例）であった。

vii) 後天性免疫不全症候群

後天性免疫不全症候群は12例の届出があり，前年（21例）より減少した（図14）。性別は，すべて男性で，20～60歳代で発生があり，特に20歳代が多かった（図15）。病型

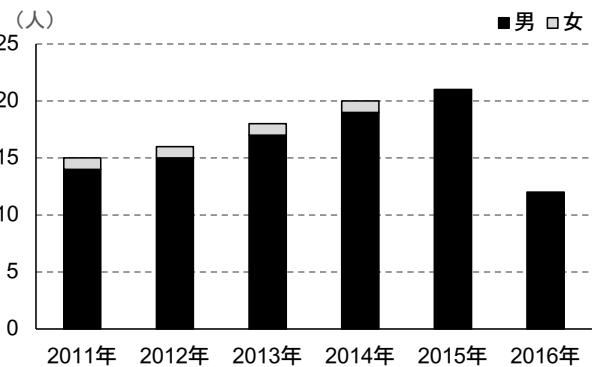


図14 後天性免疫不全症候群 年次別発生状況

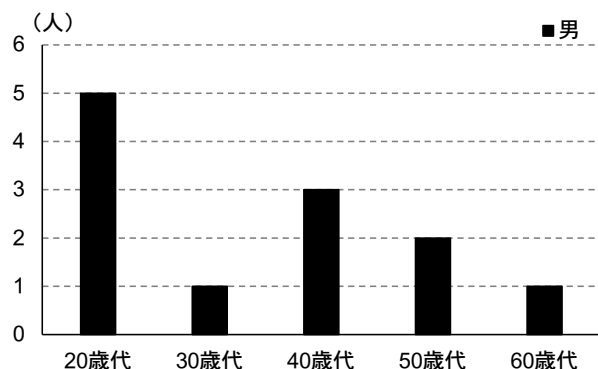


図15 後天性免疫不全症候群 年齢階級別発生状況

はAIDS 3例，無症候性キャリア9例であった。推定感染地域は，国内10例，国内又は国外（インドネシア）1例，不明1例であった。推定感染経路は性的接触10例（異性間2例，同性間8例），不明2例であった。

viii) ジアルジア症

ジアルジア症は1例の届出があり，50歳代の男性であった。推定感染地域は国外（インド）であった。

ix) 侵襲性インフルエンザ菌感染症

侵襲性インフルエンザ菌感染症は7例の届出があった。性別は男性5例，女性2例で，年齢階級別では50歳代・70歳代（各2例），0～9歳・20歳代・60歳代（各1例）であった。

x) 侵襲性肺炎球菌感染症

侵襲性肺炎球菌感染症は32例の届出があり，前年（35例）より減少した（図16）。性別は男性17例，女性15例で，年齢階級別では60歳代・70歳代（各9例）が最も多く，次いで0～9歳（6例），80歳代（4例）の順であった（図17）。ワクチン接種歴別は，接種歴あり8例，接種歴なし19例，不明5例であった。

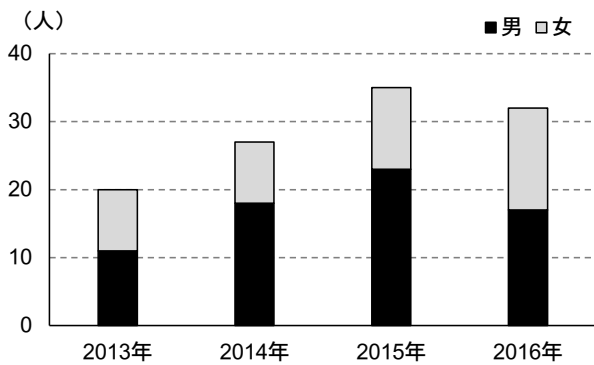


図16 侵襲性肺炎球菌感染症 年次別発生状況 (2013年から全数把握感染症に追加)

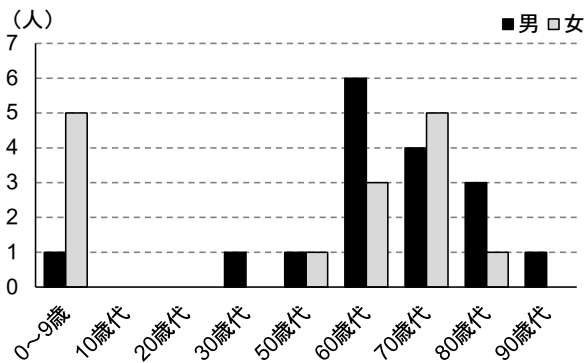


図17 侵襲性肺炎球菌感染症 年齢階級別発生状況

xi) 水痘（入院例に限る）

水痘（入院例に限る）は3例の届出があった。性別は男性2例，女性1例で，年齢階級別では，20歳代，30歳代，70歳代（各1例）であった。

xii) 梅毒

梅毒は40例の届出があった。過去5年間と比較して最も多く（図18），感染症法が施行された1999年以降で最も多くであった。病型は，早期顕症梅毒Ⅰ期15例，早期顕症梅毒Ⅱ期15例，晩期顕症梅毒1例，無症状病原体保有者9例であった。性別は男性31例，女性9例で，年齢階級別では，男性は30歳代（8例），20歳代（7例），40歳代・50歳代（各6例），女性は20歳代（5例），30歳代・40歳代（各2例）の順で多かった。（図19）。推定感染地域は国内 39例（県内16例，県外8例，都道府県不明15例），国外（タイ）1例であった。推定感染経路は，性的接触36例，不明4例であった。

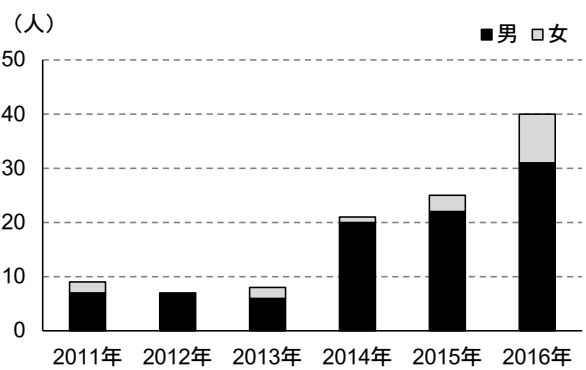


図18 梅毒 年次別発生状況

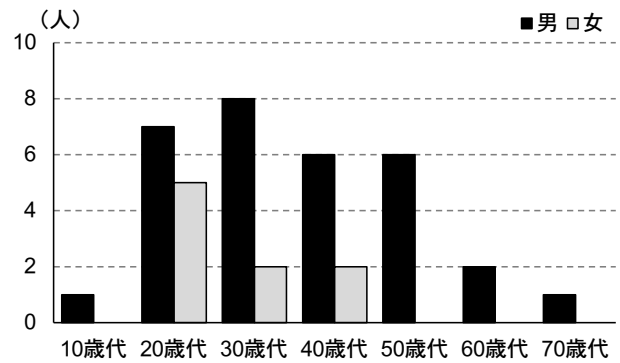


図19 梅毒 年齢階級別発生状況

xiii) 播種性クリプトコックス症

播種性クリプトコックス症は2例の届出があった。患者は50歳代の男性と80歳代の女性で，推定感染地域は，すべて国内（県内）であった。

xiv) 破傷風

破傷風は4例の届出があった。性別は男性2例，女性2例で，年齢階級別では，すべて70歳代の高齢者であった。推定感染地域は，全て国内（県内2例，県外2例）であった。ワクチン接種歴は，接種歴あり（受傷後に接種）1例，接種歴なし2例，不明1例であった。

xv) バンコマイシン耐性腸球菌感染症

バンコマイシン耐性腸球菌感染症は1例の届出があり、30歳代の女性であった。

3.2 定点把握感染症（五類感染症）の届出状況

3.2.1 小児科・内科定点における週報告の感染症（表4参照）

小児科・内科定点における週報告の感染症のうち、主な感染症については、以下のとおりである。

i) インフルエンザ（2015/2016年シーズン流行のまとめ）（図20）

2015/2016年シーズン（2015/8/31～2016/9/4）、岡山県の患者報告数は、22,726人であった。2015年 第38週（9/14～9/20）にシーズン初めての患者が報告され、第1週（1/4～1/10）には定点あたり報告数1.54人となり、過去5年間と比較して最も遅い流行シーズン入りとなった。その後、急速に流行は拡大し、2016年第6週（2/8～2/14）に定点あたり報告数33.88人となり、警報発令基準の30.00人を上回った。そして第9週（2/29～3/6）に定点あたり報告数37.19人となり、2015/2016シーズンのピークを迎えた。その後急速に減少し、第12週（3/21～3/27）、第13週（3/28～4/3）と2週連続して定点あたり10.00人を下回ったため、岡山県では警報から注意報に切り替えた。以降、徐々に減少し、第18週（5/2～5/8）、第19週（5/9～5/15）に2週連続して1.00人を下回り、インフルエンザの流行は終息した。全国と比べると、年間を通してほぼ同様に推移した。年齢階級別では、4～6歳が17%と最も高く、15歳未満の割合が全体の60%を占めた。

2015/2016年シーズンのうち、2015年8月31日～2016年5月29日までに岡山県環境保健センターで検出されたインフルエンザウイルスは65株であった。その内訳は、B型33株（山形系統22株、ビクトリア系統11株）と最も多く、次いでAH3型20株、AH1pdm09型12株であった。2014/2015年シーズンは、AH3型が最も多く検出されたが、今シーズンは、複数のインフルエンザウイルスが同時期に検出された。

ii) RSウイルス感染症（図21）

RSウイルス感染症は、定点あたり累積報告数が23.35人であり、前年（23.31人）とほぼ同数であった。第1週（1/4～1/10）の患者が多い状態から減少傾向となり、第11週（3/14～3/20）からは散発的であった。第35週（8/29～9/4）から急速に増加しはじめ、第41週（10/10～10/16）には定点あたり報告数2.35人となり、過去5年間と比較して最も早いピークを迎えた。全国と比べると、年間を通してほぼ同様に推移した。年齢階級別では、1歳以下の割

合が全体の78%を占めた。

iii) 咽頭結膜熱（図22）

咽頭結膜熱は、定点あたり累積報告数が15.59人であり、前年（10.76人）より増加した。第14週（4/4～4/10）と第51週（12/19～12/25）で大きく増加したが、その後は減少し、全国と比べると低いレベルで推移した。年齢階級別では、1歳以下の割合が全体の40%を占めた。

iv) A群溶血性レンサ球菌咽頭炎（図23）

A群溶血性レンサ球菌咽頭炎は、定点あたり累積報告数が51.70人であり、前年（59.39人）より減少した。全国と比べると、年間を通して低いレベルで推移した。年齢階級別では、4～5歳（26%）、6～7歳（20%）、2～3歳（16%）の順で、5歳以下の割合が全体の48%を占めた。

v) 感染性胃腸炎（図24）

感染性胃腸炎は、定点あたり累積報告数が378.48人であり、前年（344.67人）より増加した。第1週（1/4～1/10）からほぼ横ばいで推移していたが、第42週（10/17～10/23）から徐々に増加し、第50週（12/12～12/18）には定点あたり報告数20.15人となりピークを迎えた。全国と比べると、年間を通してほぼ同様に推移した。年齢階級別では、5歳以下の割合が全体の58%を占めた。

vi) 水痘（図25）

水痘は、定点あたり累積報告数が14.81人であり、前年（18.65人）より減少し、過去5年間と比較して最も少ない年であった。全国と比べると、年間を通してほぼ同様に推移した。年齢階級別では、5歳以下の割合が全体の65%を占めた。

vi) 手足口病（図26）

手足口病は、定点あたり累積報告数が17.78人であり、前年（89.26人）より減少し、大きな流行はみられなかった。全国と比べると、年間を通してほぼ同様に推移した。年齢階級別では、1歳以下の割合が全体の50%を占めた。

vii) 伝染性紅斑（図27）

伝染性紅斑は、定点あたり累積報告数が13.07人であり、前年（12.22人）より増加した。前年6月頃から患者が増加し始め、増減を繰り返しながら、患者が多い状態で2016年に入った。2016年第26週（6/27～7/3）には定点あたり報告数0.67人となり、過去5年間と比較して最も少なくなった。その後は減少傾向となり、低いレベルで推移した。全国と比べると、1～2月頃までは少ない報告数であったが、その後はほぼ同様に推移した。年齢階級別では、4～5歳（32%）、6～7歳（21%）、2～3歳（20%）の順であった。

viii) 突発性発疹（図28）

突発性発疹は、定点あたり累積報告数が19.07人であり、前年（19.48人）とほぼ同数であった。全国と比べると、ほぼ低いレベルで推移した。年齢階級別では、1歳以下の割合が全体の92%を占めた。

ix) 百日咳（図29）

百日咳は、定点あたり累積報告数が0.41人であり、前年（0.70人）より減少した。全国と比べると、低いレベルで推移した。年齢階級別では、乳児から成人まで幅広い年齢層で患者が報告された。

x) ヘルパンギーナ（図30）

ヘルパンギーナは、定点あたり累積報告数が31.48人であり、前年（24.59人）より増加した。第20週（5/16～5/22）から患者が増加し始め、その後、急激に増加した。第26週（6/27～7/3）には定点あたり報告数5.48人となり、2013年のピーク（5.52人）に次いで、高いピークを迎えた。

以降、急速に減少し、第29週（7/18～7/24）から緩やかに減少した。全国と比べると、同時期に患者が増加し始めたが、ピークの時期は全国より早かった。年齢階級別では、0～1歳（36%）、2～3歳（32%）、4～5歳（19%）の順であった。

xi) 流行性耳下腺炎（図31）

流行性耳下腺炎は、定点あたり累積報告数が56.50人であり、前年（27.20人）より増加した。前年12月から多い状態で2016年に入り、高いレベルで推移していたが、9月頃から減少傾向となった。全国と比べると、8月までは高いレベルで推移したが、第37週以降全国より少ない報告数となった。年齢階級別では、4～5歳（32%）、2～3歳・6～7歳（各20%）、8～9歳（11%）の順であり、幅広い年齢層で患者が報告された。

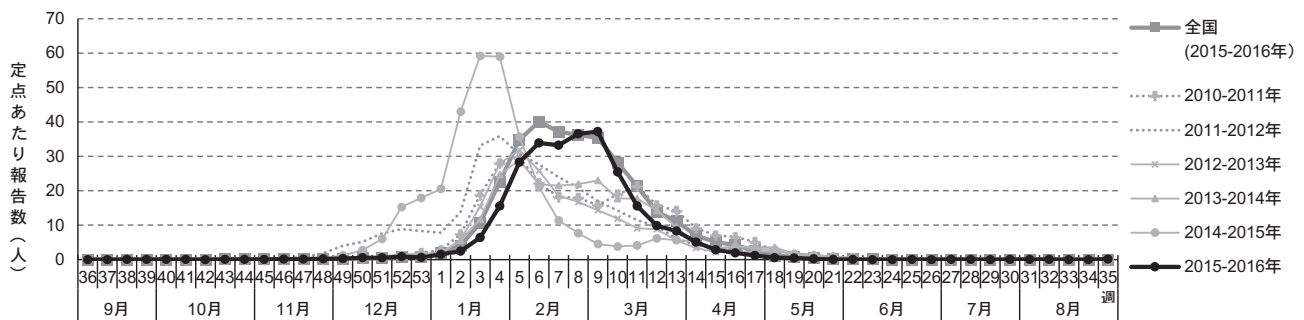


図20 インフルエンザ 発生状況

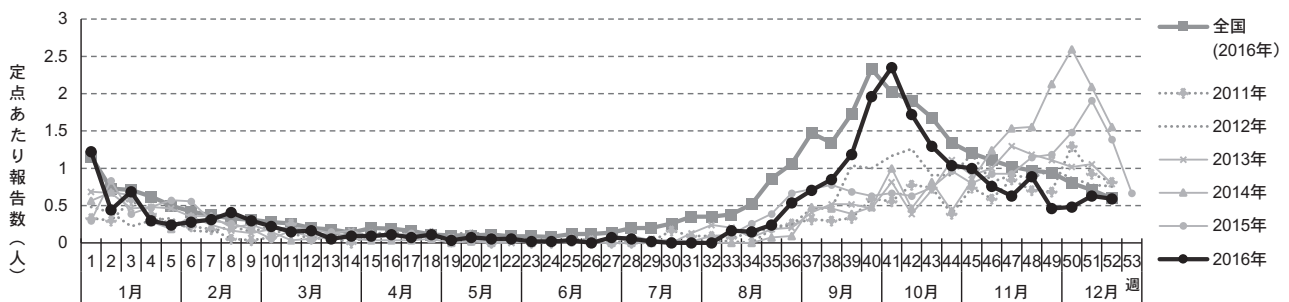


図21 RSウイルス感染症 発生状況

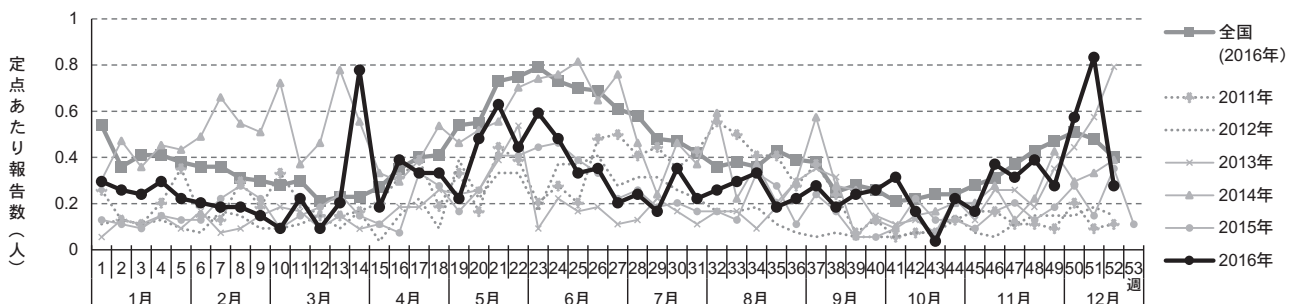


図22 咽頭結膜熱 発生状況

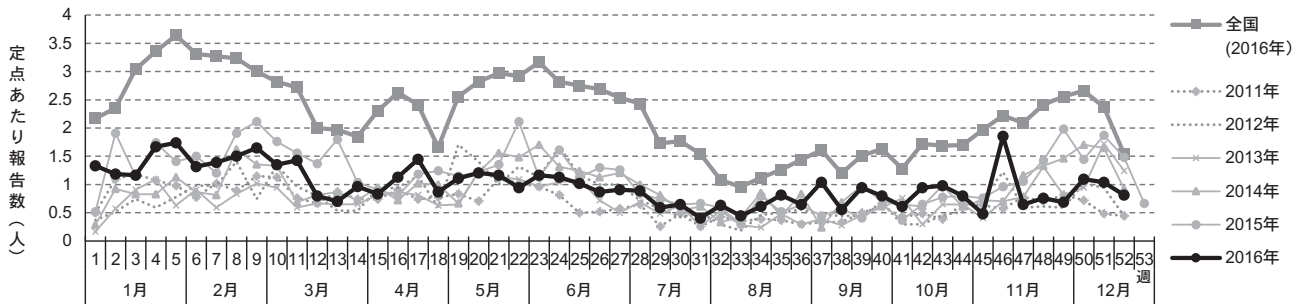


図23 A群溶血性レンサ球菌咽頭炎 発生状況

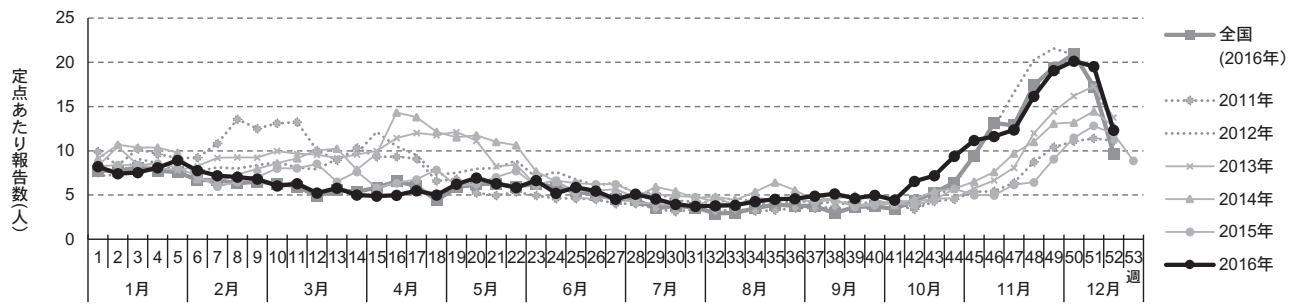


図24 感染性胃腸炎 発生状況

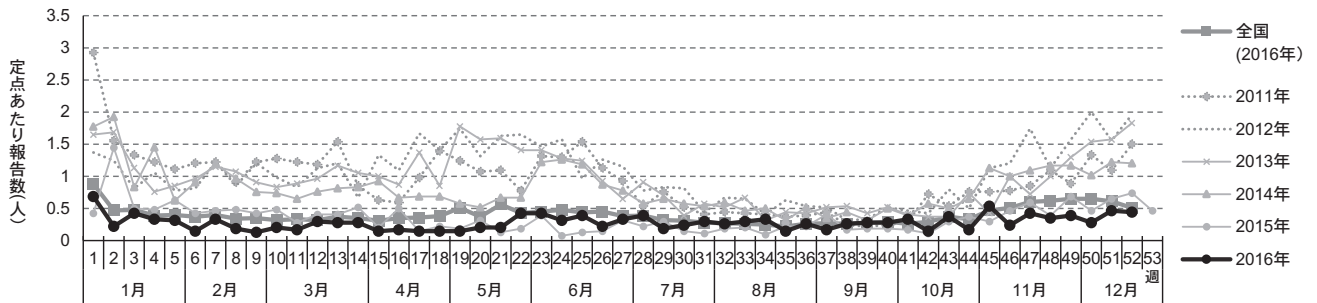


図25 水痘 発生状況

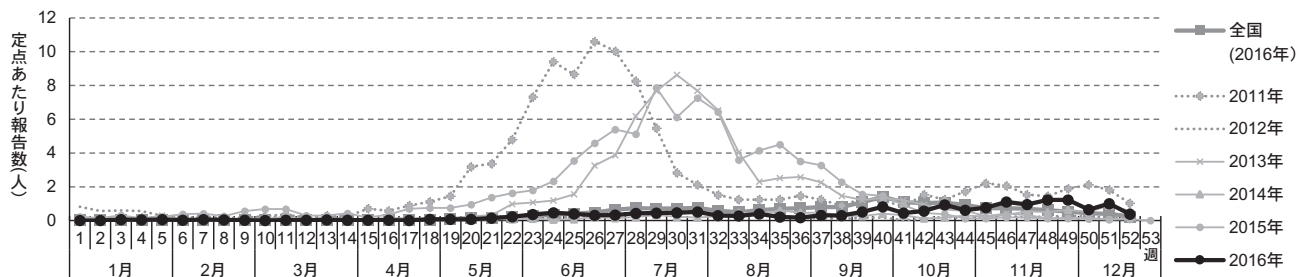


図26 手足口病 発生状況

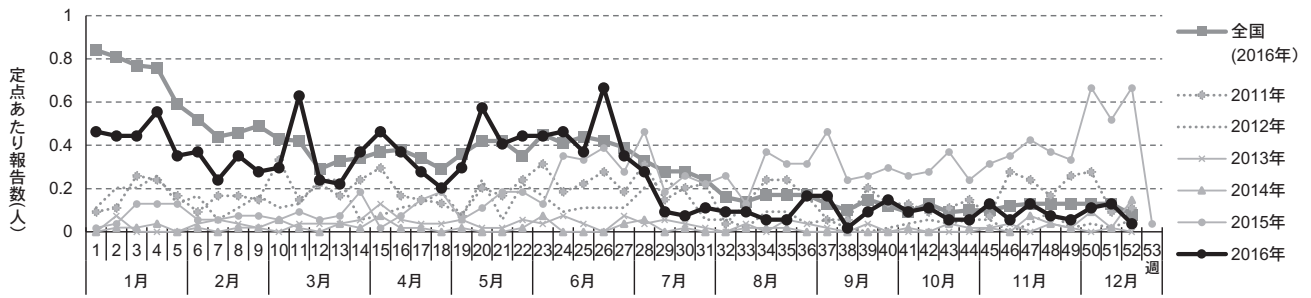


図27 伝染性紅斑 発生状況

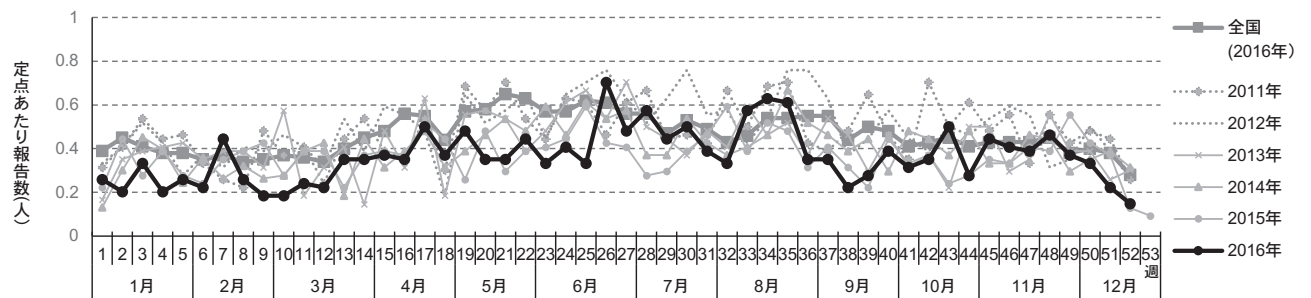


図28 突発性発疹 発生状況

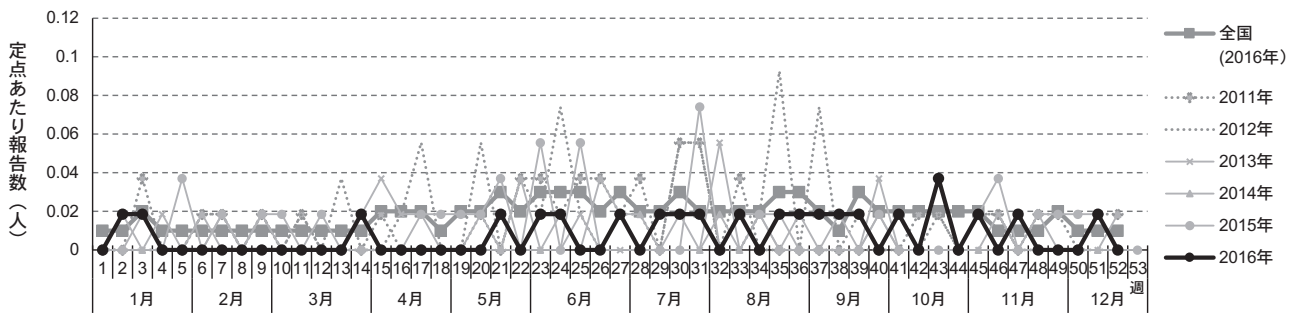


図29 百日咳 発生状況

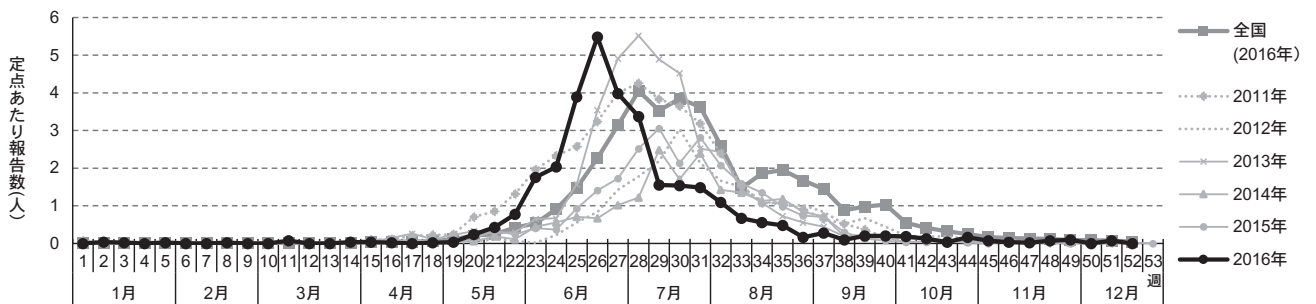


図30 ヘルパンギーナ 発生状況

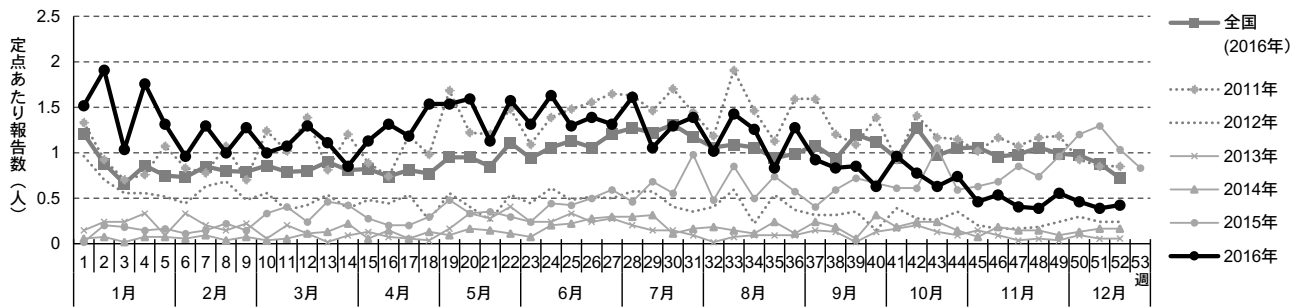


図31 流行性耳下腺炎 発生状況

3.2.2 眼科定点における週報告の感染症 (表4参照)

i) 急性出血性結膜炎

急性出血性結膜炎は、定点あたり累積報告数が0.58人であり、前年(0.58人)と同数であった。

ii) 流行性角結膜炎

流行性角結膜炎は、定点あたり累積報告数が17.17人であり、前年(24.75人)より減少した。

3.2.3 基幹定点における週報告の感染症 (表4参照)

i) 細菌性髄膜炎

細菌性髄膜炎は、定点あたり累積報告数が1.20人であり、前年(0.40人)より減少した。

ii) 無菌性髄膜炎

無菌性髄膜炎は、定点あたり累積報告数が3.80人であり、前年(1.80人)より増加した。

iii) マイコプラズマ肺炎

マイコプラズマ肺炎は、定点あたり累積報告数が14.40人であり、前年(5.40人)より大きく増加した。

iv) クラミジア肺炎(オウム病を除く)

クラミジア肺炎(オウム病を除く)は、定点あたり累積報告数が0.20人であり、前年(0.40人)より減少した。

v) 感染性胃腸炎(ロタウイルスによる)

感染性胃腸炎(ロタウイルスによる)は、定点あたり累積報告数が5.00人であり、前年(8.40人)より減少した。

3.2.4 性感染症定点における月報告の感染症 (表5, 6参照)

i) 性器クラミジア感染症

性器クラミジア感染症は、定点あたり累積報告数が18.18人であり、前年(22.18人)より減少しており、全国と比べても少ない報告数であった(図32)。性別では男性16%、女性84%で、女性の割合が高かった。年齢階級別では、10～50歳代で報告されており、20歳代が最も多かった(図33)。

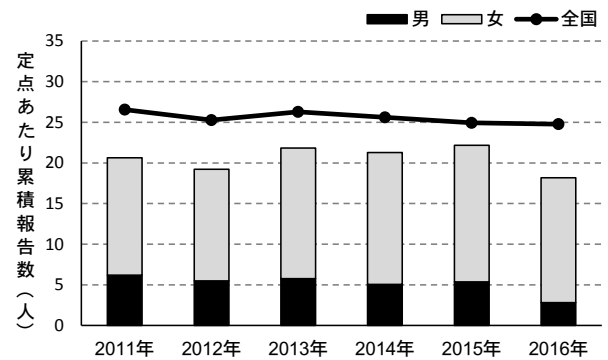


図32 性器クラミジア感染症 年次別発生状況

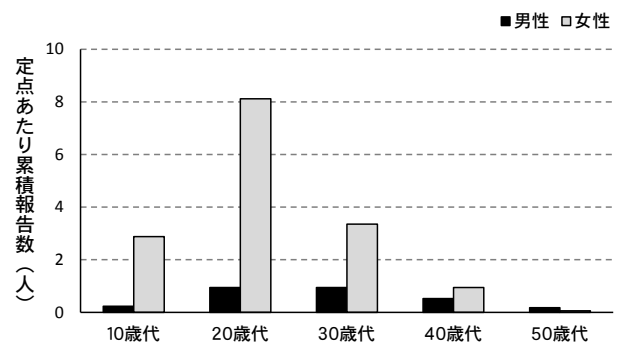


図33 性器クラミジア感染症 年齢階級別発生状況

ii) 性器ヘルペスウイルス感染症

性器ヘルペスウイルス感染症は、定点あたり累積報告

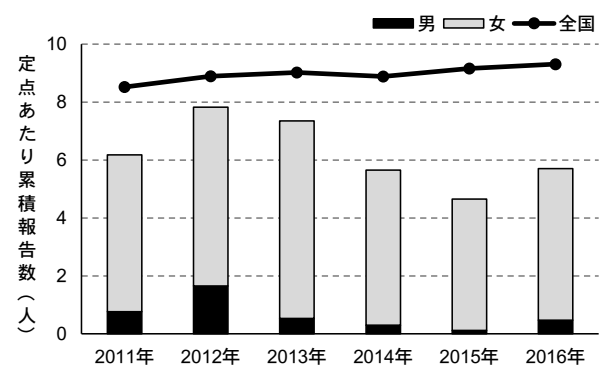


図34 性器ヘルペスウイルス感染症 年次別発生状況

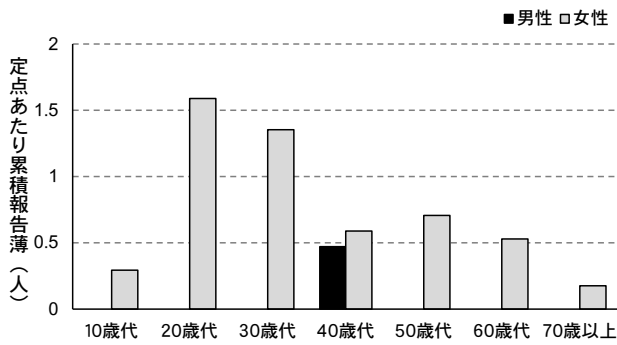


図35 性器ヘルペスウイルス感染症 年齢階級別発生状況

数が5.71人で、前年（4.65人）より増加したが、全国と比べると少ない報告数であった（図34）。性別では男性8%、女性92%で、女性の報告数が圧倒的に多かった。年齢階級別では、20歳代で最も多く、次いで30歳代、40歳代の順であった（図35）。

iii) 尖圭コンジローマ感染症

尖圭コンジローマ感染症は、定点あたり累積報告数が5.24人で、前年（4.76人）より増加した。過去5年間で最も多かったが、全国と比べると少ない報告数であった（図36）。性別では男性80%、女性20%で、年々、男性の報告数が増加傾向にある。年齢階級別では、20～50歳代で多くなっていた（図37）。

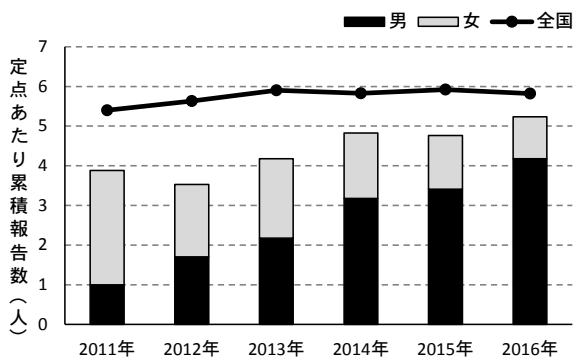


図36 尖圭コンジローマ感染症 年次別発生状況

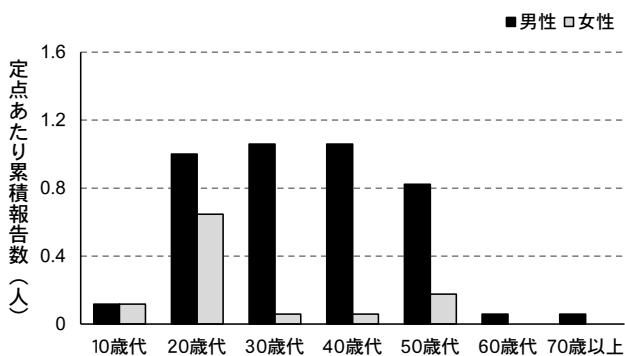


図37 尖圭コンジローマ感染症 年齢階級別発生状況

iv) 淋菌感染症

淋菌感染症は、定点あたり累積報告数が4.29人であり、前年（6.00人）より減少した（図38）。2011年から減少傾向にあり、全国と比べても少ない報告数であった。性別は男性37%、女性63%で、女性の報告数がやや多かった。年齢階級別では、20～40歳代で多くなり、特に20歳代の女性の報告数が多かった（図39）。

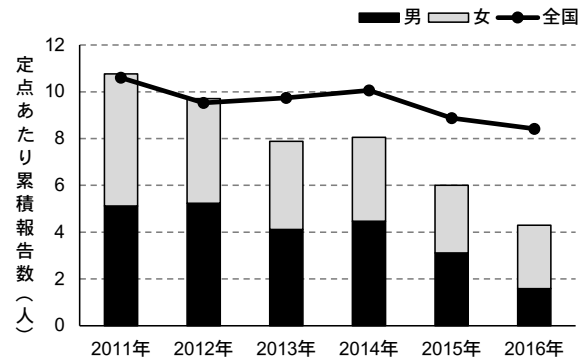


図38 淋菌感染症 年次別発生状況

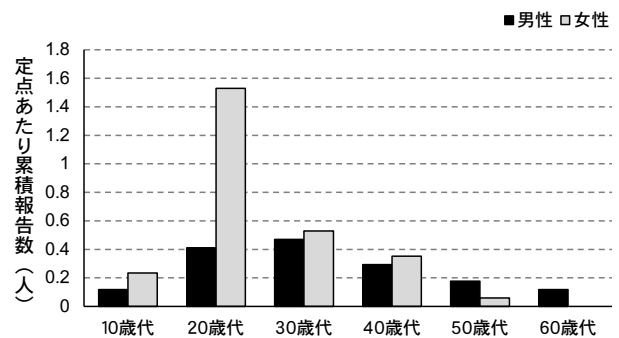


図39 淋菌感染症 年齢階級別発生状況

3.2.5 基幹定点における月報告の感染症（表5、7参照）

i) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症は、定点あたり累積報告数が22.75人であり、前年（26.20人）より減少した。年齢階級別では、70歳以上の報告が最も多かった。

ii) ペニシリン耐性肺炎球菌感染症

ペニシリン耐性肺炎球菌感染症は、定点あたり累積報告数が0.75人であり、前年（0.20人）よりわずかに増加した。年齢階級別では、0～9歳と70歳以上であった。

iii) 薬剤耐性緑膿菌感染症

薬剤耐性緑膿菌感染症は、定点あたり累積報告数は0.75人であり、前年（1.40人）より減少した。年齢階級別では、50歳代と70歳以上で報告された。

4 まとめ

全数把握感染症のうち、結核の届出数は311例であり、2011年以降減少傾向にあるが、依然として300例以上の届出があった。年齢階級別では、60歳以上の高齢者が全体の70%を占めていた。重症熱性血小板減少症候群は1例の届出があり、2013年2例、2014年2例に続いて5例目の発生となった。10月には3年ぶりに日本脳炎の患者発生があった。推定感染地域は県内で、ワクチン接種歴はなかった。梅毒の届出数は40例であり、感染症法が施行された1999年以降最も多くなった。全国の梅毒患者の届出数が2010年以降増加傾向にあり、岡山県でも2014年以降年々増加しているため、今後の発生動向に十分注意する必要がある。

定点把握感染症に関して、2015/2016年シーズンのインフルエンザは、過去5年間で最も遅い流行シーズン入りとなり、流行期間が19週間と前年に比べて短かった。前年より4週間遅くピークを迎えた後、急速に減少し、インフルエンザの流行は終息した。RSウイルス感染症は、過去5年間と比較して患者発生の最も多い年であった。8月頃から患者が増加し始め、例年よりも早い時期にピークを迎えた。ヘルパンギーナは、5月から患者が増加し始め、6月には2013年に次いで高いピークを迎えた。

今後も引き続き、県内における感染症情報の収集・分析を迅速に行い、全国の感染症発生動向にも注意を払いながら、感染症対策の一助となるよう広く情報発信をしていきたい。

表1 感染症法に基づく届出対象感染症（2016年）

1. 全数把握感染症:全ての医師が、全ての患者発生について届出を行う感染症

<p>【 一類感染症 】 直ちに届出</p> <p>(1) エボラ出血熱 (2) クリミア・コンゴ出血熱 (3) 痘そう (4) 南米出血熱 (5) ペスト (6) マールブルグ病 (7) ラッサ熱</p>
<p>【 二類感染症 】 直ちに届出</p> <p>(1) 急性灰白髄炎 (2) 結核 (3) ジフテリア (4) 重症急性呼吸器症候群(病原体がベータコロナウイルス属 SARS コロナウイルスであるものに限る)</p> <p>(5) 鳥インフルエンザ(H5N1) (6) 鳥インフルエンザ(H7N9) (7) 中東呼吸器症候群(病原体がベータコロナウイルス属 MERS コロナウイルスであるものに限る)</p>
<p>【 三類感染症 】 直ちに届出</p> <p>(1)コレラ (2)細菌性赤痢 (3)腸管出血性大腸菌感染症 (4)腸チフス (5)パラチフス</p>
<p>【 四類感染症 】 直ちに届出</p> <p>(1) E 型肝炎 (2) ウエストナイル熱 (3) A 型肝炎 (4) エキノコックス症 (5) 黄熱 (6) オウム病 (7) オムスク出血熱 (8) 回帰熱 (9) キャサナル森林病 (10) Q 熱 (11) 狂犬病 (12) コクシジオイデス症 (13) サル痘 (14) ジカウイルス感染症 * (15) 重症熱性血小板減少症候群(病原体がフレボウイルス属 SFTS ウイルスであるものに限る) (16) 腎症候性出血熱 (17) 西部ウマ脳炎 (18) ダニ媒介脳炎 (19) 炭疽 (20) チクングニア熱 (21) つつが虫病 (22) デング熱 (23) 東部ウマ脳炎 (24) 鳥インフルエンザ(H5N1 及び H7N9 を除く) (25) ニパウイルス感染症 (26) 日本紅斑熱 (27) 日本脳炎 (28) ハンタウイルス肺炎候群 (29) B ウイルス病 (30) 鼻疽 (31) ブルセラ症 (32) ベネズエラウマ脳炎 (33) ヘンドラウイルス感染症 (34) 発しんチフス (35) ボツリヌス症 (36) マラリア (37) 野兔病 (38) ライム病 (39) リッサウイルス感染症 (40) リフトバレー熱 (41) 類鼻疽 (42) レジオネラ症 (43) レプトスピラ症 (44) ロッキー山紅斑熱</p>
<p>【 五類感染症の一部 】 7 日以内に届出(麻しん・風しんはできるだけ早く)</p> <p>(1) アメーバ赤痢 (2) ウイルス性肝炎(E 型肝炎及び A 型肝炎を除く) (3) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症 (4) 急性脳炎(ウエストナイル脳炎、西部ウマ脳炎、ダニ媒介脳炎、東部ウマ脳炎、日本脳炎、ベネズエラウマ脳炎及びリフトバレー熱を除く) (5) クリプトスポリジウム症 (6) クロイツフェルト・ヤコブ病 (7) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (8) 後天性免疫不全症候群 (9) ジアルジア症 (10) 侵襲性インフルエンザ菌感染症 (11) 侵襲性髄膜炎菌感染症 (12) 侵襲性肺炎球菌感染症 (13) 水痘(入院例に限る) (14) 先天性風しん症候群 (15) 梅毒 (16) 播種性クリプトコックス症 (17) 破傷風 (18) パイコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症 (19) バンコマイシン耐性腸球菌感染症 (20) 風しん (21) 麻しん (22) 薬剤耐性アシネトバクター感染症</p>
<p>【 指定感染症 】 直ちに届出</p> <p>該当なし</p>

2. 定点把握感染症(五類感染症):指定した医療機関が、患者の発生について届出を行う感染症

①週単位報告

<p>【 小児科定点 】</p> <p>(1) RS ウイルス感染症 (2) 咽頭結膜熱 (3) A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎 (4) 感染性胃腸炎 (5) 水痘 (6) 手足口病 (7) 伝染性紅斑 (8) 突発性発しん (9) 百日咳 (10) ヘルパンギーナ (11) 流行性耳下腺炎</p>
<p>【 インフルエンザ定点 】</p> <p>(1)インフルエンザ(鳥インフルエンザ及び新型インフルエンザ等感染症を除く)</p>
<p>【 眼科定点 】</p> <p>(1)急性出血性結膜炎 (2)流行性角結膜炎</p>
<p>【 基幹定点 】</p> <p>(1)感染性胃腸炎(病原体がロタウイルスであるものに限る) (2) クラミジア肺炎(オウム病を除く) (3) 細菌性髄膜炎(髄膜炎菌、肺炎球菌、インフルエンザ菌を原因として同定された場合を除く) (4) マイコプラズマ肺炎 (5) 無菌性髄膜炎</p>

②月単位報告

<p>【 性感染症定点 】</p> <p>(1)性器クラミジア感染症 (2)性器ヘルペスウイルス感染症 (3)尖圭コンジローマ (4)淋菌感染症</p>
<p>【 基幹定点 】</p> <p>(1)ペニシリン耐性肺炎球菌感染症 (2) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症 (3) 薬剤耐性緑膿菌感染症</p>

* 2016年2月15日より追加

表2 全数把握感染症 月別患者発生状況

2016年

		総数	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
一類感染症	エボラ出血熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	クリミア・コンゴ出血熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	南米出血熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
二類感染症	マールブルグ病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ラッサ熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	急性灰白髄炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
三類感染症	ジフテリア	311	29	26	21	23	21	28	29	27	35	22	26	24
	重症急性呼吸器症候群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	中東呼吸器症候群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
四類感染症	鳥インフルエンザ(H5N1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	鳥インフルエンザ(H7N9)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	コリネバクテリウム性赤痢	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
五類感染症	腸管出血性大腸菌感染症	65	1	1	-	5	2	3	5	12	19	10	6	1
	腸チフス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	パラチフス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
六類感染症	E型肝炎	2	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
	ウエストナイル熱	3	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-
	A型肝炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
七類感染症	エキソコックス症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	黄熱病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	オウムムスク出血熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
八類感染症	回帰熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	キヤサヌル森林病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Q熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
九類感染症	狂犬病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	コキシジオイデス症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	サトル短症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
十類感染症	ジカウイルス感染症*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	重症熱性血小板減少症候群	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
	腎症候群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
十一類感染症	西部ウマ脳炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ダニ媒介脳炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	炭疽	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
十二類感染症	チングニア熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	チツガ虫病	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
	デング熱	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
十三類感染症	東部ウマ脳炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	鳥インフルエンザ(鳥インフルエンザ(H5N1)を除く)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ニバウイルス感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
十四類感染症	日本紅斑熱	5	-	-	-	-	-	-	1	-	2	2	-	-
	日本脳炎	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
	ハンタウイルス肺症候群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
十五類感染症	Bウイルス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	鼻疽	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ペルセララ病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
十六類感染症	ベネズエラウマ脳炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ヘンドラウイルス感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	発しんチフス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
十七類感染症	ポツリヌス症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	マラリア	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	野兔病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
十八類感染症	リッサウイルス感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	リフトバレー熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	類鼻疽	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
十九類感染症	レジオネラ症	27	5	1	1	4	3	4	2	-	1	2	4	-
	レプトスピラ症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ロッキーマン山紅斑熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
二十類感染症	アムール赤痢	18	-	-	2	1	4	-	3	5	2	-	-	1
	ウイルス性肝炎(E・Aを除く)	4	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1	-
	カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症	28	1	4	1	3	2	4	2	1	2	5	1	2
二十一類感染症	急性脳炎*	11	3	-	-	2	2	-	1	-	1	-	1	1
	クリプトスポリジウム症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	クロイツフェルト・ヤコブ病	3	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-
二十二類感染症	劇症型溶血性レンサ球菌感染症	7	-	1	1	1	1	1	1	-	-	1	-	-
	後天性免疫不全症候群	12	-	1	-	1	2	2	2	-	1	-	2	1
	ジアルジア症	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
二十三類感染症	侵襲性インフルエンザ菌感染症	7	1	-	-	1	-	2	1	-	1	-	-	1
	侵襲性髄膜炎菌感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	侵襲性肺炎球菌感染症	32	2	3	6	3	2	2	-	2	2	3	4	3
二十四類感染症	水痘(入院例)	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1
	先天性風しん症候群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	梅毒	40	2	3	3	2	5	1	2	7	6	3	2	4
二十五類感染症	播種性クリプトコックス症	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	破傷	4	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	2	-
	バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
二十六類感染症	バンコマイシン耐性腸球菌感染症	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	風しん	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	麻疹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
薬剤耐性アシネトバクター感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

*¹ 2016年2月15日より、ジカウイルス感染症が全数把握感染症に追加。

*² ウエストナイル脳炎、西部ウマ脳炎、ダニ媒介脳炎、東部ウマ脳炎日本脳炎、ベネズエラウマ脳炎及びリフトバレー熱を除く。

表3 全数把握感染症 年齢別患者発生状況

2016年

		総数	0~9歳	10歳代	20歳代	30歳代	40歳代	50歳代	60歳代	70歳代	80歳代	90歳~
一類感染症	エボラ出血熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	クリミア・コンゴ出血熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	痘苗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	南米出血熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	パームス病熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
二類感染症	急性灰白髄炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	結核	311	7	3	31	20	15	16	45	60	90	24
	重症急性呼吸器症候群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	中東呼吸器症候群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	鳥インフルエンザ(H5N1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
三類感染症	鳥インフルエンザ(H7N9)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	コレラ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	細菌性赤痢	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	腸管出血性大腸菌感染症	65	9	6	13	8	10	8	9	1	1	-
	腸チフス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
四類感染症	パルチフス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E型肝炎	2	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-
	ウエストナイル熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A型肝炎	3	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-
	エキノкокク	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	オウム熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	オムスク出血熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	回帰熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	キヤサヌル森林病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Q熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	狂犬病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	コクシジオイデス症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	サイル痘	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ジカウイルス感染症*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	重症熱性血小板減少症候群	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	腎症候性出血熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	西部ウマ脳炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ダニ媒介脳炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	炭疽	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	チングニア熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	つが虫病	2	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-
	デング熱	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
	東部ウマ脳炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	鳥インフルエンザ(鳥インフルエンザ(H5N1)を除く)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ニパウイルス感染症	5	-	-	-	-	-	-	1	1	2	1
日本脳炎	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	
ハンタウイルス肺症候群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bウイルス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
鼻疽	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ブルセラ症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ベネズエラウマ脳炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ヘンドラウイルス感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
発しんチフス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ボツリヌス症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
マラリア	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
野兔病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ライム病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
リッサウイルス感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
リフトバレー熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
類鼻疽	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
レジオネラ症	27	-	-	-	-	-	1	2	6	9	7	
レプトスピラ症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ロッキース山紅斑熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
五類感染症	アメーバ赤痢	18	-	-	-	2	3	5	6	2	-	-
	ウイルス性肝炎(E・Aを除く)	4	-	-	-	1	-	2	1	-	-	-
	カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症	28	-	-	-	-	1	-	5	15	5	2
	急性脳炎*	11	4	1	-	-	1	-	4	-	1	-
	クリプトスポリジウム症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	クロイツフェルト・ヤコブ病	3	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-
	劇症型溶血性レンサ球菌感染症	7	-	-	-	-	1	1	1	2	2	-
	後天性免疫不全症候群	12	-	-	5	1	3	2	1	-	-	-
	ジアルジア症	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
	侵襲性インフルエンザ菌感染症	7	1	-	1	-	-	2	1	2	-	-
	侵襲性髄膜炎菌感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	侵襲性肺炎球菌感染症	32	6	-	-	1	-	2	9	9	4	1
	水痘(入院例)	3	-	-	1	1	-	-	-	1	-	-
	先天性風しん症候群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	梅毒	40	-	1	12	10	8	6	2	1	-	-
播種性クリプトコックス症	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	
破傷風	破傷風	4	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-
	バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	バンコマイシン耐性腸球菌感染症	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	風しん	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	麻疹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
薬剤耐性アシネトバクター感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

*1 2016年2月15日より、ジカウイルス感染症が全数把握感染症に追加。

*2 ウエストナイル脳炎、西部ウマ脳炎、ダニ媒介脳炎、東部ウマ脳炎日本脳炎、ベネズエラウマ脳炎及びリフトバレー熱を除く。

表4 定点把握対象感染症の発生状況

定点あたり報告数、週別(小児科定点, インフルエンザ(小児科・内科)定点, 眼科定点, 基幹定点)

2016年

	インフルエンザ	RSウイルス感染症	咽頭結膜熱	A群溶血性レンサ球菌咽頭炎	感染性胃腸炎	水痘	手足口病	伝染性紅斑	突発性発しん	百日咳	ヘルパンギーナ	流行性耳下腺炎	急性出血性結膜炎	流行性角結膜炎	細菌性髄膜炎	無菌性髄膜炎	マイコプラズマ肺炎	クラミジア肺炎	感染性胃腸炎 (ロタウイルス)
総数	288.35	23.35	15.59	51.70	378.48	14.81	17.78	13.07	19.07	0.41	31.48	56.50	0.58	17.17	1.20	3.80	14.60	0.20	5.00
1週	1.54	1.22	0.30	1.33	8.22	0.69	—	0.46	0.26	—	—	1.52	—	1.50	—	—	0.20	—	0.20
2週	2.48	0.44	0.26	1.19	7.41	0.22	—	0.44	0.20	0.02	0.04	1.91	—	0.58	—	—	1.00	—	0.20
3週	6.37	0.69	0.24	1.17	7.54	0.43	0.06	0.44	0.33	0.02	0.02	1.04	—	0.50	—	0.4	—	—	—
4週	15.56	0.30	0.30	1.67	8.09	0.33	0.04	0.56	0.20	—	—	1.76	—	0.50	—	—	—	—	—
5週	28.32	0.24	0.22	1.74	8.93	0.31	0.06	0.35	0.26	—	0.02	1.31	—	0.58	—	—	0.40	—	1.80
6週	33.88	0.28	0.20	1.31	7.76	0.15	0.02	0.37	0.22	—	—	0.96	0.17	0.83	—	—	0.40	—	0.80
7週	33.25	0.31	0.19	1.39	7.19	0.33	0.06	0.24	0.44	—	—	1.30	—	1.08	0.20	—	0.40	—	—
8週	36.54	0.41	0.19	1.50	7.04	0.19	0.04	0.35	0.26	—	0.02	1.00	—	0.25	0.00	0.2	0.40	—	—
9週	37.19	0.30	0.15	1.65	6.80	0.13	0.02	0.28	0.19	—	—	1.28	—	0.17	0.40	—	0.20	—	0.20
10週	25.49	0.22	0.09	1.35	6.02	0.20	—	0.30	0.19	—	—	1.00	—	0.42	—	—	0.20	—	—
11週	15.56	0.15	0.22	1.43	6.28	0.17	0.02	0.63	0.24	—	0.07	1.07	—	0.42	—	—	—	—	—
12週	9.89	0.17	0.09	0.80	5.24	0.30	0.02	0.24	0.22	—	—	1.30	—	0.08	—	—	0.40	—	—
13週	8.30	0.06	0.20	0.70	5.78	0.28	0.04	0.22	0.35	—	—	1.11	0.08	0.25	—	—	0.40	—	0.20
14週	5.08	0.09	0.78	0.96	5.00	0.28	0.02	0.37	0.35	0.02	0.04	0.85	—	0.25	—	—	—	—	0.20
15週	2.86	0.09	0.19	0.83	4.89	0.15	0.02	0.46	0.37	—	0.04	1.13	—	0.17	—	—	0.20	—	0.40
16週	1.92	0.11	0.39	1.13	4.96	0.17	0.02	0.37	0.35	—	0.02	1.31	—	0.42	—	—	—	—	0.40
17週	1.18	0.07	0.33	1.44	5.48	0.15	—	0.28	0.50	—	—	1.19	0.08	0.08	—	—	—	—	0.20
18週	0.55	0.11	0.33	0.87	5.00	0.15	0.07	0.20	0.37	—	0.02	1.54	—	0.25	—	—	—	—	0.20
19週	0.46	0.04	0.22	1.11	6.22	0.15	0.07	0.30	0.48	—	0.04	1.54	—	0.33	—	0.8	0.20	—	—
20週	0.25	0.07	0.48	1.20	6.94	0.20	0.07	0.57	0.35	—	0.24	1.59	—	0.25	—	—	0.20	—	—
21週	0.07	0.06	0.63	1.17	6.28	0.20	0.15	0.41	0.35	0.02	0.43	1.13	—	0.42	—	—	0.20	—	—
22週	0.02	0.06	0.44	0.94	5.85	0.43	0.22	0.44	0.44	—	0.78	1.57	—	—	0.20	—	—	—	0.20
23週	—	0.02	0.59	1.17	6.65	0.43	0.35	0.44	0.33	0.02	1.76	1.31	—	0.17	—	—	0.20	—	—
24週	—	0.02	0.48	1.13	5.19	0.31	0.46	0.46	0.41	0.02	2.04	1.63	—	0.17	0.20	—	—	—	—
25週	0.01	0.04	0.33	1.02	5.87	0.39	0.39	0.37	0.33	—	3.89	1.30	—	0.17	—	—	0.40	—	—
26週	—	—	0.35	0.87	5.46	0.22	0.31	0.67	0.70	—	5.48	1.39	—	0.08	—	0.2	—	—	—
27週	0.01	0.07	0.20	0.91	4.54	0.33	0.33	0.35	0.48	0.02	3.98	1.31	—	—	—	—	—	—	—
28週	0.01	0.06	0.24	0.89	5.11	0.39	0.43	0.28	0.57	—	3.37	1.61	—	—	—	0.2	0.20	—	—
29週	—	0.02	0.17	0.59	4.56	0.19	0.44	0.09	0.44	0.02	1.56	1.06	—	0.25	—	—	0.20	—	—
30週	0.01	—	0.35	0.65	3.94	0.24	0.46	0.07	0.50	0.02	1.54	1.30	—	0.08	—	—	0.20	—	—
31週	0.01	—	0.22	0.41	3.72	0.30	0.52	0.11	0.39	0.02	1.48	1.39	—	0.08	—	—	0.40	—	—
32週	0.01	—	0.26	0.63	3.78	0.26	0.30	0.09	0.33	—	1.09	1.02	—	0.08	—	—	—	—	—
33週	—	0.17	0.30	0.44	3.85	0.30	0.28	0.09	0.57	0.02	0.67	1.43	—	—	—	—	0.60	—	—
34週	—	0.15	0.33	0.61	4.26	0.33	0.39	0.06	0.63	—	0.56	1.26	0.08	0.17	—	—	—	—	—
35週	0.13	0.24	0.19	0.81	4.52	0.15	0.20	0.06	0.61	0.02	0.48	0.83	0.08	0.08	—	0.8	0.80	—	—
36週	0.04	0.54	0.22	0.65	4.59	0.26	0.17	0.17	0.35	0.02	0.17	1.28	—	0.08	—	—	0.20	—	—
37週	0.05	0.70	0.28	1.04	4.89	0.17	0.31	0.17	0.35	0.02	0.28	0.93	0.08	0.50	—	—	—	—	—
38週	0.06	0.85	0.19	0.56	5.13	0.26	0.30	0.02	0.22	0.02	0.09	0.83	—	0.42	—	—	—	—	—
39週	0.01	1.19	0.24	0.94	4.61	0.28	0.52	0.09	0.28	0.02	0.20	0.85	—	0.42	—	—	0.40	—	—
40週	0.01	1.96	0.26	0.80	4.96	0.28	0.81	0.15	0.39	—	0.20	0.63	—	0.83	—	0.2	0.80	0.20	—
41週	0.05	2.35	0.31	0.61	4.43	0.33	0.44	0.09	0.31	0.02	0.19	0.96	—	0.75	—	—	—	—	—
42週	0.01	1.72	0.17	0.94	6.54	0.15	0.56	0.11	0.35	0.00	0.13	0.78	—	0.08	—	—	0.40	—	—
43週	0.11	1.30	0.04	0.98	7.20	0.37	0.93	0.06	0.50	0.04	0.04	0.63	—	0.33	—	0.4	0.80	—	—
44週	0.15	1.04	0.22	0.80	9.39	0.17	0.61	0.06	0.28	—	0.17	0.74	—	0.25	—	—	0.20	—	—
45週	0.30	1.00	0.17	0.48	11.19	0.54	0.76	0.13	0.44	0.02	0.07	0.46	—	0.08	—	—	—	—	—
46週	0.74	0.76	0.37	1.85	11.63	0.24	1.09	0.06	0.41	—	0.04	0.54	—	0.42	—	0.2	1.20	—	—
47週	2.24	0.63	0.31	0.65	12.35	0.43	0.94	0.13	0.39	0.02	0.02	0.41	—	0.33	0.20	—	0.20	—	—
48週	1.45	0.89	0.39	0.76	16.17	0.35	1.22	0.07	0.46	—	0.07	0.39	—	0.42	—	—	0.20	—	—
49週	1.63	0.46	0.28	0.69	19.07	0.39	1.22	0.06	0.37	—	0.09	0.56	—	0.75	—	—	0.40	—	—
50週	2.57	0.48	0.57	1.09	20.15	0.28	0.65	0.11	0.33	—	0.00	0.46	—	0.33	—	0.2	1.00	—	—
51週	5.35	0.63	0.83	1.04	19.52	0.46	1.00	0.13	0.22	0.02	0.07	0.39	—	0.42	—	0.2	0.40	—	—
52週	6.63	0.59	0.28	0.81	12.31	0.44	0.37	0.04	0.15	—	—	0.43	—	0.08	—	—	0.60	—	—

表5 月報告 定点把握感染症（性感染症定点，基幹定点） 月別，定点あたり報告数

2016年

疾患名		総計	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	
性感染症定点	性器クラミジア感染症	計	18.18	1.12	1.41	1.06	1.06	1.76	2.35	1.71	1.65	1.24	2.12	1.41	1.29
		男	2.82	0.29	0.35	0.12	0.12	0.18	0.18	0.29	0.29	0.47	0.29	0.06	0.18
		女	15.35	0.82	1.06	0.94	0.94	1.59	2.18	1.41	1.35	0.76	1.82	1.35	1.12
	性器ヘルペスウイルス感染症	計	5.71	0.18	0.41	0.53	0.59	0.53	0.65	0.47	0.65	0.53	0.18	0.35	0.65
		男	0.47	—	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	—	0.06	0.06	—	0.06	—
		女	5.24	0.18	0.35	0.47	0.53	0.47	0.59	0.47	0.59	0.47	0.18	0.29	0.65
	尖圭コンジローマ	計	5.24	0.47	0.41	0.59	0.41	0.35	0.41	0.35	0.53	0.47	0.41	0.47	0.35
		男	4.18	0.41	0.35	0.41	0.24	0.29	0.35	0.35	0.35	0.41	0.29	0.41	0.29
		女	1.06	0.06	0.06	0.18	0.18	0.06	0.06	—	0.18	0.06	0.12	0.06	0.06
	淋菌感染症	計	4.29	0.29	0.47	0.47	0.24	0.18	0.35	0.18	0.35	0.41	0.65	0.47	0.24
		男	1.59	0.06	0.24	0.12	0.18	0.06	0.12	—	0.12	0.24	0.18	0.24	0.06
		女	2.71	0.24	0.24	0.35	0.06	0.12	0.24	0.18	0.24	0.18	0.47	0.24	0.18
基幹定点	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症	計	22.75 ^{**}	2.00	0.80	2.20	1.00 ^{**}	3.20	1.40	1.40	1.00	0.80	1.40	1.40	1.80
		男	13.75 ^{**}	1.00	0.80	1.00	1.00 ^{**}	2.00	1.20	1.20	0.40	0.20	0.80	0.80	0.80
		女	9.00 ^{**}	1.00	0.00	1.20	—	1.20	0.20	0.20	0.60	0.60	0.60	0.60	1.00
	ペニシリン耐性肺炎球菌感染症	計	0.75 ^{**}	—	0.20	—	—	—	—	0.40	—	—	—	—	—
		男	0.25 ^{**}	—	—	—	—	—	—	0.20	—	—	—	—	—
		女	0.50 ^{**}	—	0.20	—	—	—	—	0.20	—	—	—	—	—
	薬剤耐性緑膿菌感染症	計	0.75 ^{**}	0.20	—	—	—	—	—	—	0.20	0.20	—	—	—
		男	0.75 ^{**}	0.20	—	—	—	—	—	—	0.20	0.20	—	—	—
		女	0.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

※定点数4で集計

表6 月報告 定点把握感染症（性感染症定点） 年齢階級別患者報告数

2016年

疾患名		0歳	1歳～	5歳～	10歳～	15歳～	20歳～	25歳～	30歳～	35歳～	40歳～	45歳～	50歳～	55歳～	60歳～	65歳～	70歳～	総計
性器クラミジア感染症	計	—	—	—	2	51	84	70	43	30	17	8	4	—	—	—	—	309
	男	—	—	—	1	3	8	8	9	7	6	3	3	—	—	—	—	48
	女	—	—	—	1	48	76	62	34	23	11	5	1	—	—	—	—	261
性器ヘルペスウイルス感染症	計	—	—	—	—	5	16	11	14	9	14	4	5	7	6	3	3	97
	男	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8	—	—	—	—	—	—	8
	女	—	—	—	—	5	16	11	14	9	6	4	5	7	6	3	3	89
尖圭コンジローマ	計	—	—	—	—	4	19	9	16	3	4	15	9	8	—	1	1	89
	男	—	—	—	—	2	13	4	16	2	3	15	6	8	—	1	1	71
	女	—	—	—	—	2	6	5	—	1	1	—	3	—	—	—	—	18
淋菌感染症	計	—	—	—	1	5	17	16	9	8	6	5	4	—	2	—	—	73
	男	—	—	—	1	1	4	3	4	4	3	2	3	—	2	—	—	27
	女	—	—	—	—	4	13	13	5	4	3	3	1	—	—	—	—	46

表7 月報告 定点把握感染症（基幹定点） 年齢階級別患者報告数

2016年

疾患名	0歳	1歳～	5歳～	10歳～	15歳～	20歳～	25歳～	30歳～	35歳～	40歳～	45歳～	50歳～	55歳～	60歳～	65歳～	70歳～	総計
メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症	—	—	1	1	1	1	—	1	1	5	3	4	7	3	9	54	91
ペニシリン耐性肺炎球菌感染症	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	3
薬剤耐性緑膿菌感染症	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	2	3

他誌発表論文抄録

Extremely Low Genomic Diversity of *Rickettsia japonica* Distributed in Japan

Arzuba Akter, Tadasuke Ooka, Yasuhiro Gotoh, Seigo Yamamoto, Hiromi Fujita, Fumio Terasoma, Kouji Kida, Masakatsu Taira, Fumiko Nakadouzonon, Mutsuyo Gokuden, Manabu Hirano, Mamoru Miyashiro, Kouichi Inari, Yukie Shimazu, Kenji Tabara, Atsushi Toyoda, Dai Yoshimura, Takehiko Itoh, Tomokazu Kitano, Mitsuhiko P Sato, Keisuke Katsura, Shakhinur Islam Mondal, Yoshitoshi Ogura, Shuji Ando, Tetsuya Hayashi

Genome Biology and Evolution, Vol.9 (1): 124-133, 2017

Rickettsiae are obligate intracellular bacteria that have small genomes as a result of reductive evolution. Many *Rickettsia* species of the spotted fever group (SFG) cause tick-borne diseases known as "spotted fevers". The life cycle of SFG rickettsiae is closely associated with that of the tick, which is generally thought to act as a bacterial vector and reservoir that maintains the bacterium through transstadial and transovarial transmission. Each SFG member is thought to have adapted to a specific tick species, thus restricting the bacterial distribution to a relatively limited geographic region. These unique features of SFG rickettsiae allow investigation of how the genomes of such biologically and ecologically specialized bacteria evolve after genome reduction and the types of population structures that are generated. Here, we performed a nationwide, high-

resolution phylogenetic analysis of *Rickettsia japonica*, an etiological agent of Japanese spotted fever that is distributed in Japan and Korea. The comparison of complete or nearly complete sequences obtained from 31 *R. japonica* strains isolated from various sources in Japan over the past 30 years demonstrated an extremely low level of genomic diversity. In particular, only 34 single nucleotide polymorphisms were identified among the 27 strains of the major lineage containing all clinical isolates and tick isolates from the three tick species. Our data provide novel insights into the biology and genome evolution of *R. japonica*, including the possibilities of recent clonal expansion and a long generation time in nature due to the long dormant phase associated with tick life cycles.

Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Antigen 1 Detection using the Monoclonal Antibodies to the Nucleocapsid Protein

Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi*, Tomoki Yoshikawa, Hideki Tani, Satoshi Taniguchi, Takeshi Kurosu, Kazutaka Egawa, Yuto Suda, Harpal Singh, Taro Nomachi, Mutsuyo Gokuden, Katsuyuki Ando, Kouji Kida, Miki Kan, Nobuyuki Kato, Akira Yoshikawa, Hiroaki Kitamoto, Yuko Sato, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Shigeru Morikawa, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo

PLOS neglected tropical diseases vol.10(4), e0004595, 2016

Background

Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) is a tick-borne infectious disease with a high case fatality rate, and is caused by the SFTS virus (SFTSV). SFTS is endemic to China, South Korea, and Japan. The viral RNA level in sera of patients with SFTS is known to be strongly associated with outcomes. Virological SFTS diagnosis with high sensitivity and specificity are required in disease endemic areas.

Methodology/Principal Findings

We generated novel monoclonal antibodies (MAbs) against the SFTSV nucleocapsid (N) protein and developed a sandwich antigen (Ag)-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of N protein of SFTSV using MAb and polyclonal antibody as capture and detection antibodies, respectively. The Ag-capture system was capable of

detecting at least 350-1220 TCID₅₀/100 μ l/well from the culture supernatants of various SFTSV strains. The efficacy of the Ag-capture ELISA in SFTS diagnosis was evaluated using serum samples collected from patients suspected of having SFTS in Japan. All 24 serum samples (100%) containing high copy numbers of viral RNA ($>10^5$ copies/ml) showed a positive reaction in the Ag-capture ELISA, whereas 12 out of 15 serum samples (80%) containing low copy numbers of viral RNA ($<10^5$ copies/ml) showed a negative reaction in the Ag-capture ELISA. Among these Ag-capture ELISA-negative 12 samples, 9 (75%) were positive for IgG antibodies against SFTSV.

Conclusions

The newly developed Ag-capture ELISA is useful for SFTS diagnosis in acute phase patients with high levels of viremia.

報告書等

人形峠周辺の環境放射線等測定報告（平成28年度）

小川 登，木下浩行，加藤大貴，片岡敏夫，清水光郎，鷹野 洋，伊東清実，岸本壽男

岡山県環境保健センター，同 環境企画課：平成28年度人形峠周辺の環境放射線等測定報告書

国立研究開発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28年度における放射線，放射能，

ふっ素等の測定結果を外部専門家で構成される測定技術委員会において検討した結果，“施設由来の異常値は認められなかった。”との評価であった。

食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究 (平成28年度)

中嶋 洋, 河合 央博, 仲 敦史, 畑 ますみ, 他

厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究

平成28年度 総括・研究分担報告書: 76-134, 2017

食品由来感染症の広域発生事例においては、事例由来株の分子疫学解析結果等を共有・比較する必要がある。このため、中四国地域の各施設における分子疫学解析手法の技術の維持と解析精度の向上や、将来的に解析データや疫学情報を用いたデータベースを構築し利用可能にす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IS-printing System、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE法)及びmultiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA法) による精度管理を、実施した。その結果、多くの施設が良好な結果であったが、一部施設では検査法の改良・工夫や技術の

習熟が必要と思われた。

平成28年度に中四国地域で発生したEHECによる感染事例について、IS-printing system等による分子疫学解析データや疫学情報を収集し解析した結果、7種類のISコードの菌による感染事例の発生が、複数の県で確認された。このうち、疫学的な関連が確認された2事例を含めて5事例では、MLVA法による解析結果も一致していた。広域発生事例の疫学解析に重要である分子疫学解析結果等を用いたデータベース構築に向け、今後さらに分子疫学解析技術の維持・向上が重要になるものと思われる。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業） 分担研究報告書

地方感染症情報センター・地方衛生研究所の立場からの 感染症発生動向調査の評価と改善

中村 廣志、濱野 雅子 他

（厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
地方感染症情報センター・地方衛生研究所の立場からの感染症発生動向調査の評価と改善
新興・再興感染症の発生に備えた感染症サーベイランスの強化とリスクアセスメント

平成28年度 総括・分担研究報告書：22-25, 2017

研究要旨

「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（感染症法）」（1999年4月施行）から、「結核予防法」を統合（2007年4月1日）、新たな感染症（鳥インフルエンザ（H7N9）及び中東呼吸器症候群（MERS））の2類感染症への追加（2015年1月21日）などの改定を行い、2016年4月1日には、感染症に関する情報の収集体制（全ての感染症の患者等に対し検体の採取等に応じること）を強化するための一部改正が行われたことにより、地方感染症情報センターの立場から感染症発生動向調査の評価と改善をはかる必要が生じた。

地方感染症情報センターとして、平常時から感染症に関する情報を収集し、分析を行って感染症を発生状況や原因に関する情報、予防に必要な情報を積極的に公表するための方策を強く求められている。

感染症法の主要な柱の1つに、感染症発生動向調査があり、その役割を担う地方感染症情報センターは、都道府県、政令指定都市等の地方衛生研究所にその多くが設置されているが、情報の収集力には大きな差があるため、2006年からは全国レベルで、情報を一元的に管理する感染症サーベイランスシステム（NESID）の運用が開始され、還元データを利用した感染症情報の解析、提供が容易となったことから、地域をはじめ全国の感染症対策に大きな役割を果たしており、2018年3月には新しいNESIDへの移行・更改が行われる。

また、情報発信ツールとして、研究班が主体となり、地方感染症情報センターにおける患者情報集計、解析業務を支援する情報ツールの開発を行った。また、感染症情報センターのより一層の機能強化、連携の推進を図るため関連会議を開催した。

学会発表

	題 名	発表者	学会名
1	日本紅斑熱リケッチア検出real-time PCR法に反応を示したリケッチア属菌の解析	松岡保博、木田浩司、磯田美穂子、藤原香代子、谷川徳行、濱野雅子、中嶋 洋、岸本壽男	平成28年度岡山県獣医三学会
2	岡山県下におけるPM2.5大気環境調査について	中野温朗、間野遼太、喜多真帆、野村 茂、信森達也、鷹野 洋	第57回大気環境学会年会
3	日本紅斑熱リケッチア検出real-time PCR法に反応を示したリケッチア属菌の解析	松岡保博、木田浩司、磯田美穂子、藤原香代子、谷川徳行、濱野雅子、中嶋 洋、岸本壽男	平成28年度中国地区獣医公衆衛生学会
4	<i>Haemaphysalis flava</i> から分離された新種のレオウイルス	木田浩司、溝口嘉範、松岡保博、谷川徳行、磯田美穂子、藤原香代子、濱野雅子、岸本壽男	第9回日本リケッチア症臨床研究会

岡山県環境保健センター年報 第41号

(平成28年度)

平成30年2月23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/>
