

研究成果報告書（1）

研究課題名	生食用カキの NoV 不活化に関する研究
担 当	保健科学部 部長 高橋 知子、主査専門研究員 藤森 亜紀子、専門研究員 小泉 英誉、 専門研究員 山下 裕紀、主任専門研究員 岩渕 香織、上席専門研究員 高橋 雅輝、 企画情報部 主任専門研究員 佐藤 卓、水産技術センター 加賀 克昌

1 目的

冬季に多く発生する感染性胃腸炎の主な原因であるヒト NoV（以下、「NoV」）は、人から環境水中へ排出され、カキ等の二枚貝に蓄積することが知られている。我々は、平成 29 年度から、食品のウイルス制御として効果が期待されており、しかも生の食感を損いにくい高圧処理¹⁾²⁾という方法を用いて NoV の不活化の効果を調査してきた。今回、カキむき身での実験に加えて、2 種類の大型の高圧処理機で実験を行い、殻付きカキにおける高圧処理の不活化効果について検証した。また、購入したむき身カキを用いて、高圧処理の有無による生食用カキの成分規格（生菌数、E. coli 最確数、腸炎ビブリオ最確数）の変化を調査した。

2 方法

(1) 人工汚染カキを用いた高圧処理による NoV 不活化効果

① 汚染カキの作成：NoV 感染者の糞便乳剤（テスト 1 および 2： 2.26×10^6 コピー/mL を 5mL、テスト 3： 2.26×10^6 コピー/mL を 10mL）を添加した海水 25L 中に、生カキ 5～6 個を入れ蓄養（72 時間、水温 15°C、給餌（1 回/日）した。テスト 1（n=15）は、48 時間海水浄化を行った後、むき身にしたものをビニール袋に入れシールし試料と同様の実験を 3 回行った。テスト 2（n=10）および 3（n=29）では蓄養後、殻付きのまま滅菌海水と共にビニール袋に入れシールし試料とした。（n=5）。

② 高圧処理：装置は、テスト 1「Dr. CHEF」（神戸製鋼所）、テスト 2「食品加工用特別機」（石川島播磨重工業(株)製）テスト 3「FOOD FRESHER」（神戸製鋼(株)製）をそれぞれ使用した。処理条件は、いずれも圧力 400MPa、加圧保持時間 10 分の条件で行った。処理時の温度はいずれも 4°C に保持した。（表 1）

③ NoV のコピー数測定：カキの中腸腺を切り出し、 α -アミラーゼ溶液によるグリコーゲン消化を行った後、ポリエチレングリコール沈殿法により濃縮を行った。ここから感染性推定遺伝子検出法[※]を用いて RNA を抽出及び逆転写を行った後、リアルタイム PCR 法で NoV コピー数を測定した。NoV が検出されなかった検体については、実験中、最も低いコピー数 0.02 として中腸腺 1 g あたり NoV コピー数を求め、Log 値を算出した。

※感染性推定遺伝子検査法³⁾：不活化したウイルス粒子の検出を抑えるため、カプシドが破壊されて露出した RNA を RNase 処理で消化し、カプシドが正常でも損傷した RNA はオリゴ dT プライマーを用いて逆転写を行うことで排除する方法。

④ データ解析：R version 3.4.3 を使用して分散分析及および T 検定を行った。

(2) 高圧処理によるカキの成分規格の変化

① カキ養殖場で水揚げ後、48 時間の海水浄化したカキを購入し、むき身の状態で滅菌海水とともにビニール袋に入れ、シールしたものを試料とし、前述の処理条件で高圧処理を行った。これらについて、生食用カキの成分規格（生菌数、E. coli 最確数、腸炎ビブリオ最確数）を調査した。

3 結果

(1) NoV 汚染カキ（むき身）を用いた高圧処理による NoV コピー数（Log）の変化（テスト 1：図 1）

加圧なしに比較して、48 時間の海水浄化したものは NoV の有意な減少は見られなかったが、加圧したむき身は、中腸腺 1 g 当たりの NoV コピー数が、3Log から 4Log、有意に減少した。（ $P < 0.001$ ）

(2) NoV 汚染カキ（殻付き）を用いた高圧処理による NoV コピー数（Log）の変化（テスト 2 および 3：図 2）

2 種類の高圧処理機を使用したところ、いずれの機械でも高圧処理をかけた検体で、ノロウイルスコピー数は約 2 Log 有意に減少した。

(3) 加圧したカキでは、生菌数、E. coli 最確数、腸炎ビブリオ最確数が減少した。

4 今後の研究方向等

加熱に代わるウイルス不活化法として近年注目されている高圧処理を用いて、NoV の不活化を検討してきた。これまでの調査では、中腸腺に NoV を添加したものに 300MPa、400MPa の圧力で、5 分、10 分、5 分 2 回の保持時間について検討した中で、400MPa、10 分の処理条件が最も有効であった。また、NoV 汚染の程度を変えた、高濃度試験区と低濃度試験区への高圧処理の効果についても調査したところ、いずれも、NoV コピー数は減少したが、有意に減少したのは低濃度試験区であった。今回は、カキが自然に汚染された場合に含まれると推定される NoV

汚染濃度にカキを汚染し、実験を行った。このカキを前述の加圧条件（400MPa、10分）で、むき身、殻付きのカキの形態で実験を行い、いずれも NoV コピー数は有意に減少した。このことにより高圧処理が NoV の不活化に有効であることが示唆された。しかし、NoV の不活化には限界があり、リスクをゼロにすることは困難と考えられる。この処理法をより確実なものとするためには、カキの NoV 汚染濃度をより低濃度に抑えることが重要であると考えられた。

日本の食品業界において、その9割以上を占める中小企業、小規模事業者が、食品を加工するための大型の高圧処理装置の導入するのは困難な状況であるが、今後、受託加工または有償加工（アメリカ、カナダ、中国、台湾、ニュージーランド、オランダ、スペイン、アイルランド、イタリア、ドイツ、イギリスで事業化済み）という業態、また、廉価な高圧処理機が普及すれば、高圧処理による食品加工が広がる可能性があると考えられる。

表 1 高圧処理条件

加圧条件	高圧処理機		
	テスト 1	テスト 2	テスト 3
	「Dr.CHEF」 神戸製鋼製	「食品加工用特別機」 石川島播磨重工業製	「FOOD FRESHER」 神戸製鋼製
形態	むき身	殻付き	殻付き
なし(0MPa)	5個×3回	5個	9個
なし(0MPa) 海水浄化48時間	5個×3回	—	—
400MPa 10分間 4℃	5個×3回	5個	20個

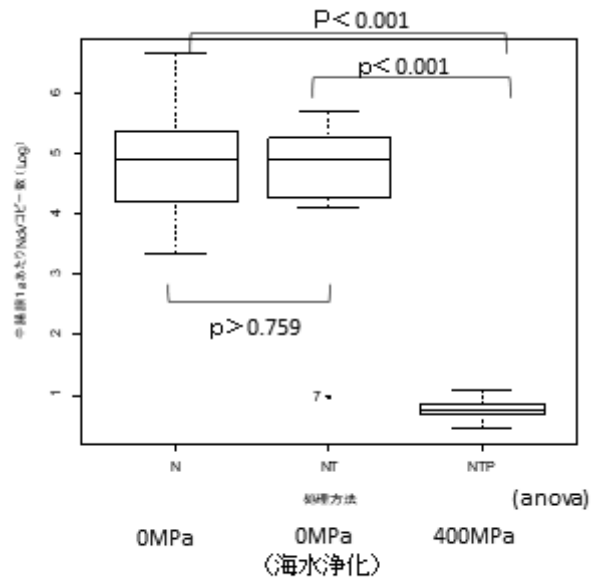


図 1 NoV汚染カキ（むき身）を用いた高圧処理による NoV コピー数 (Log) (/中腸腺 1 g) の変化

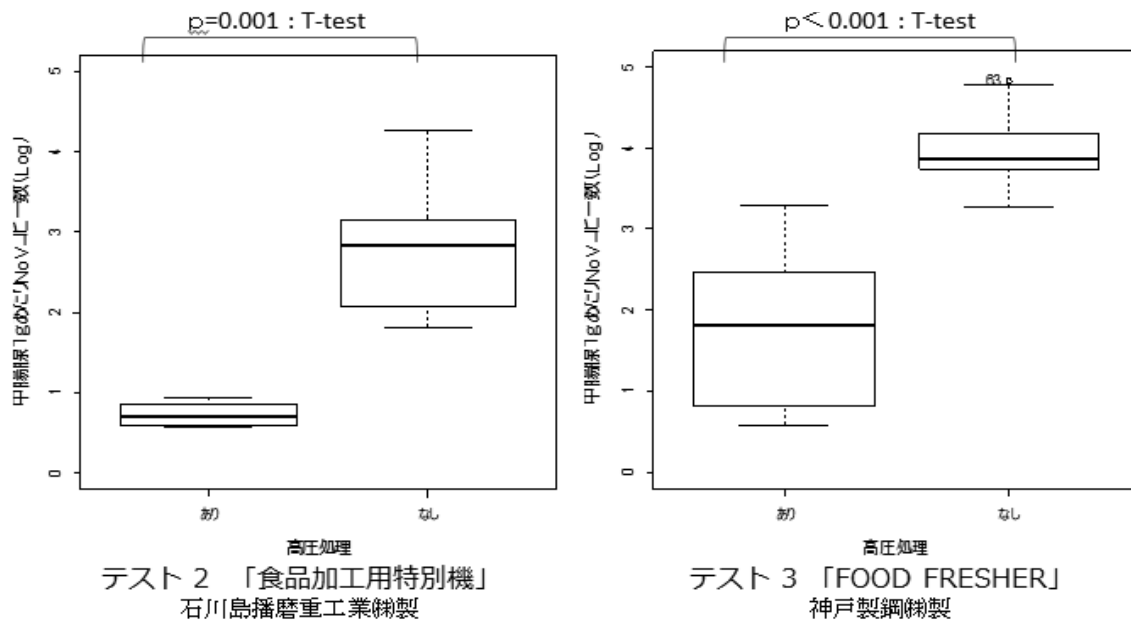


図 2 NoV汚染カキ（殻付き）を用いた高圧処理による NoV コピー数 (Log) の変化

参考文献

- 1) Renduelesa, E., Omerb, M.K., Alvseikeb, O., Alonso-Callejaa, C., Capita, R., Prietoa, M. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. LWT-Food Sci. Technol., 44, 1251-1260 (2011)
- 2) Kingsley, D. H., Holliman, D. R., Calci, KR., Chen, H., Flick, G. J. Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. Appl. Environ. Microbiol., 73, 581-585 (2007)
- 3) 野田衛. 食品のウイルス汚染のリスクを評価のための遺伝子検査法の開発と応用に関する研究 平成 24~25 年度報告書. 内閣府食品安全委員会食品健康影響評価技術研究 (2014)

研究成果報告書（2）

研究課題名	麻痺性貝毒に関する機器分析法の研究
担 当	衛生科学部 専門研究員 沼野 聡
1 目的	<p>麻痺性貝毒 (PSTs, Paralytic shellfish toxins) は、サキントキシン (STX, saxitoxin) と 50 種類以上の類縁体の総称である。岩手県沿岸においては、有毒渦鞭毛藻の <i>Alexandrium</i> 属が産生した毒が、カキやホタテガイ等の二枚貝中に蓄積されることが知られている。近年、貝類の毒化が高毒化や長期化する場合があります、出荷規制の地域が拡大する傾向にある。出荷規制の判定には、マウス毒性試験が用いられているが、各毒成分の構成比率や経時的な変化の情報を得ることが出来ない問題を抱える。</p> <p>そこで、当所では平成 28 年度より LC-MS/MS を用いた検討に取り組んでいる。これまでに得られた知見は、第 16～18 号年報において報告した。今年度は、LC-MS/MS で麻痺性貝毒の代謝物の探索を行ったので報告する。</p>
2 方法	<p>2-1) サンプルおよび前処理</p> <p>2017 年～2018 年に、県内で定期的に採取したホタテガイ（採取協力：岩手県水産技術センター）より、毒の主な蓄積部位である中腸腺を取り出し、公定法に準じて 0.1N 塩酸による加熱抽出を行った。得られた抽出液を、固相カラムにより精製し、限外ろ過したものを検液とした。</p> <p>2-2) 代謝物の探索</p> <p>麻痺性貝毒の主要成分の標準品は、NRC (カナダ) および Cifga (スペイン) より発売されている。しかし、代謝物の標準品は発売されていない。当研究では、先行研究¹⁻³⁾を参考にし、LC-MS/MS の Scan 測定や各 SRM (selected reaction monitoring) 測定を用いて、県内産ホタテガイ中に代謝物群が含有されているか探索を行った。</p>
3 結果	<p>先行研究¹⁾では、これまでに 12 種類の麻痺性貝毒の代謝物 (M toxin, M1～12) の存在が提唱されている。今回の検討においても、代謝物と推測される物質を確認した (図 1)。</p> <p>M1 と M3、M5 は、弱毒成分の C1 と C2 由来と考えられている。また、M2、M4、M6、M8、M10 は、強毒成分の GTX1～4 由来と考えられており、当県のホタテガイにおいても毒が減衰する時期に検出されることが分かった。</p>
4 今後の研究方向等	<p>各代謝物について、標準品が発売されていないことから、完全に同定出来たわけではない。今後、各化合物の構造確認を行っていくと共に、濃度の経時変化を捉えることで、減衰指標に繋げていきたいと考えている。</p>
5 参考文献	<p>1) Quilliam, M. <i>et al.</i>, <i>ICHA Proceeding</i>, 2016, 118-121. 2) Dell's Aversano, C. <i>et al.</i>, <i>J.Nat.Prod.</i> 2008, 71, 1518-1523. 3) Ding, D. <i>et al.</i>, <i>J.Agric.Food Chem.</i> 2017, 65, 5494-5502.</p>

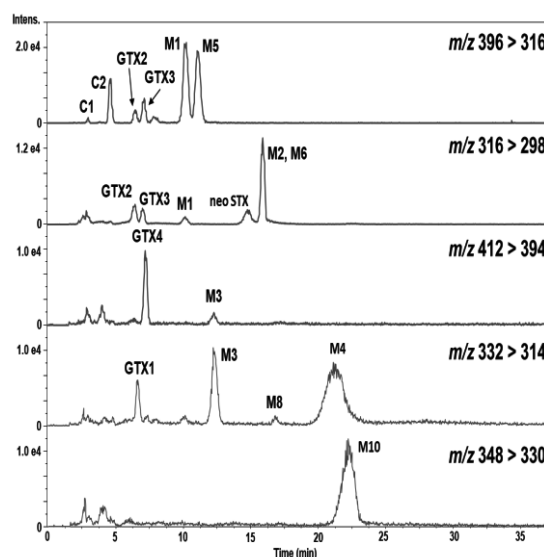


図 1. クロマトグラム (ホタテガイ 中腸腺)

(測定条件)

装置 : ABSciex API4000

カラム : TSKgel amide80 (2×150mm, 5μm)

移動相 : 2 mM HCOONH₄, 62% MeCN

流速 : 0.2 mL/min, isocratic

研究成果報告書（3）

研究課題名	DNA 抽出時における前処理効果の検討について
担 当	衛生科学部 主任専門研究員 関村 照吉、主任専門研究員 昆野 智恵子
1 目的	DNA 組換え食品検査及びアレルギー物質検査では、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）により目的 DNA の増幅を行う。その加工品の PCR 検査では、定性試験を満足するための「十分な量と質」の DNA を抽出する必要がある。しかし、厚生労働省や消費者庁から発出されている検査方法 ¹⁾ の市販抽出キットを用いた抽出法は、加工食品の全てに対応できてはいない。このため、本研究では、過去に DNA 抽出が困難であった加工食品を対象に前処理を追加して、検査可能な DNA が抽出可能かを検討した。
2 方法	<p>(1) 試料 大豆加工品:木綿豆腐、にがり充填豆腐、納豆、おから、厚揚げ、油揚げ、大豆缶詰、みどり豆、きな粉 米粉加工品:米しとぎ、大福もち</p> <p>(2) DNA 抽出用キット 検査方法の DNeasy Plant mini kit 法 (QIAGEN 社製)。納豆では、大豆の DNA 以外に納豆菌の DNA も抽出されるほか、何らかの PCR 阻害因子も含まれるとの報告²⁾があることから、この kit で十分な量が抽出できなかった納豆は同じく検査方法記載の CTAB 法も実施した。</p> <p>(3) 前処理装置 試料の均一化にはオスターブレンダー（オスター社製）を用いた。定温乾燥には、乾燥機 DS44（ヤマト社製）、粉碎にはミルサー（大阪ケミカル社製）を用いた。真空凍結乾燥には、真空凍結乾燥機 FD-10BM（日本テクノサービス社製）を用いた。</p> <p>(4) 前処理方法 試料は、検査方法に従って処理後、混合・均一化または乾燥粉碎後、抽出用キットで抽出し測定を行った。20μg/g 以上の DNA が抽出できなかった大豆缶詰と納豆は、さらに以下の前処理を追加した。 <ol style="list-style-type: none"> ①定温乾燥機を使用し、DNA 抽出時の保温反応温度と同じ 65$^{\circ}$C で 14 時間乾燥後に粉碎した。 ②DNA 抽出の保温反応時に、デンプン等の夾雑物質の分解を目的に、プロテイナーゼ K（QIAGEN 社製）と α-アミラーゼ（和光純薬工業社製）を添加処理した。また、米粉加工品も同じ酵素処理を実施した。 ③乾燥粉碎した試料に n-ヘキサンを加えて振とうして吸引ろ過して脱脂した。 ④真空凍結乾燥を行った後に粉碎した。 </p> <p>(5) DNA の抽出方法 検査方法の通り、1 試料あたり 2 併行で行った。</p> <p>(6) DNA 量の測定 DNA 試料液は、分光光度計 Genespec III（日立ハイテクサイエンス社製）を用いて、吸光度 230-320nm の紫外吸収スペクトルを測定し、260nm の値 1 を 50ng/μLDNA として DNA 濃度を算出した。タンパク質等不純物質由来の影響を見るため、260nm の吸光度と 280nm の吸光度の比が、1.7-2.0 であるかを確認した。</p> <p>(7) リアルタイム PCR による定量 大豆缶詰と納豆は、追加した前処理品を含め、リアルタイム PCR:ABI7900HT（サーモフィシャー社製）を用いて増幅後、大豆内在 LecDNA のコピー数を求めた。このコピー数で大豆 DNA が十分に抽出できたかどうかを判定した。</p> <p>(8) 定性 PCR とキャピラリー電気泳動 米粉加工品は、抽出した DNA を PCR:Pro Flex（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて増幅し、キャピラリー電気泳動:QIAxcel（キアゲン社製）を用いて小麦 DNA の陽性コントロールとして比較し、小麦 DNA が抽出できたかどうかを判定した。</p>
3 結果と考察	<p>(1) 大豆加工品の測定結果 大豆加工品 9 品目の DNA 抽出結果を表 1 に示す。DNA 抽出量は、納豆と大豆缶詰以外は、十分な量の DNA を抽出することができた。260/280 比は、納豆、大豆缶詰、おから、揚げ豆腐及び油揚げが 1.7-2.0 の範囲を外れたが、特に納豆と大豆缶詰の DNA 抽出量は 20μg/mL を下回りかつ 260/280 比も範囲を外れた。このため、この 2 つについて前処理条件を追加して検討することとした。</p> <p>(2) 前処理の追加 前処理を追加した試料の DNA を測定した結果を表 2 に示す。試料を定温乾燥粉碎後抽出した納豆及び大豆缶詰は、20μg/mL を超える DNA が抽出できた。260/280 比は問題なかったが、低分子化合物由来の夾雑物質の指標となる 230nm で大きなピークが見られた、例として納豆のスペクトルを図 1 に示す。酵素処理を行った場合は、納豆は抽出量が多くなったが、20μg/mL を超える量を抽出することができなかった。n-ヘキサンで脱脂を行ったものは、いずれも 20μg/mL を超える量は抽出できなかった。また、定温乾燥後粉碎した納豆試料を、18~30 メッシュ、30~42 メッシュ、42 メッシュ、42 メッシュ以下にふるい分けして DNA の抽出を行った結果、粒子径が小さいほど多くの DNA が抽出できる傾向があった。真空凍結乾燥後粉碎したものは、定温乾燥後粉碎した場合とほぼ同程度の抽出量であった。納豆は真空凍結乾燥粉碎処理後に CTAB 法で</p>

抽出したものは260/280比が小さかったものの十分な量のDNAが抽出できた。

米粉加工品は、酵素処理により米しとぎは十分な量の抽出が可能であり、大福もちは20 μ g/mLを下回ったが抽出は可能であった。

(3) リアルタイムPCRの結果

大豆DNAが抽出できているかを確認するため、乾燥大豆缶詰と乾燥納豆を対象に、それぞれ粉碎後42メッシュ以下の部分と真空凍結乾燥後に粉碎した大豆缶詰と納豆及び真空凍結乾燥納豆をCTAB法抽出した7検体をそれぞれリアルタイムPCRを用いて、大豆内在LecDNAのコピー数を測定した結果を表3に示す。同時に測定した大豆のLecDNAは18,200copyであり、定量下限³⁾は18copyと推定された。この結果、大豆缶詰は定温乾燥処理で、納豆は真空凍結乾燥後CTAB法抽出により抽出が可能と判断した。

(4) 定性PCRとキャピラリー電気泳動の結果

米しとぎと大福もちのDNA抽出物をPCRで増幅し、小麦DNA検出用のマーカー141bpを対象に電気泳動した結果を図2に示した。小麦DNAマーカーと同位置にバンドが見られた。この結果、米粉加工品は酵素処理で小麦DNAの抽出が可能と判断した。

4 今後の研究方向等

本研究の結果から、大豆加工品はリアルタイムPCR定性試験を満足する組換えDNAの抽出が可能であった。供試の加工品は組換えDNAを含有していないため大豆内在Le1を測定した。しかし、大豆内在DNAと組換えDNAでは、PCR阻害の程度が異なるとの報告²⁾もあり、また、納豆は検体の種類によってDNA抽出に差があるとの別報告⁴⁾もあることから留意が必要である。

表1 大豆加工品から抽出したDNA濃度と吸光度比

	DNA濃度(μ g/mL)		260nm/280nm	
	RUN1	RUN2	RUN1	RUN2
木綿豆腐	40.5	45.8	2.0	2.0
充填豆腐	41.0	49.6	2.0	2.0
納豆	4.3	3.9	1.5	1.7
おから	41.9	61.9	3.5	2.3
揚げ豆腐全体	50.0	30.2	2.0	1.9
揚げ豆腐外側を除いたもの	26.2	25.9	2.3	2.1
油揚げ	22.6	23.1	2.1	2.2
大豆缶詰	5.7	8.0	3.5	6.4
みどり大豆穀粒	94.5	92.4	2.0	1.9
きな粉	78.7	76.2	2.0	2.0

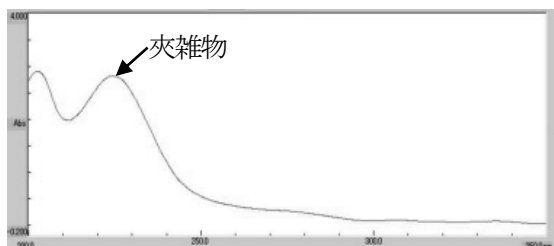


図1 納豆定温乾燥処理後に抽出した紫外吸収スペクトル

表2 前処理後抽出したDNA濃度と吸光度比

	DNA濃度(μ g/mL)		260nm/280nm	
	RUN1	RUN2	RUN1	RUN2
大豆缶詰定温乾燥	20.7	38.4	2.0	1.9
大豆缶詰酵素添加	5.2	6.8	2.2	1.8
大豆缶詰ヘキササン脱脂	3.0	2.4	1.7	1.6
大豆缶詰真空凍結乾燥	20.7	24.4	1.8	2.0
納豆定温乾燥	46.9	31.7	1.7	1.7
納豆酵素添加	13.4	8.0	1.8	1.8
納豆ヘキササン脱脂	7.6	7.4	1.8	1.4
納豆18-30メッシュ	15.0	20.8	1.7	1.7
納豆30-42メッシュ	21.4	27.2	1.7	1.8
納豆42メッシュ以下	92.0	62.0	1.8	1.8
納豆真空凍結乾燥	35.0	46.4	2.1	2.1
納豆真空凍結乾燥CTAB法	860	790	1.5	1.3
米しとぎ酵素処理	43.5	41.3	1.4	1.9
大福もちのみ酵素処理	30.8	32.5	2.0	3.0

表3 各前処理によるリアルタイムPCR定量

	Le1遺伝子 copy数
大豆粒	18,200
大豆缶詰定温乾燥	4,760
大豆缶詰42メッシュ以下	1,650
大豆缶詰真空凍結乾燥	879
納豆定温乾燥	<18
乾燥納豆42メッシュ以下	<18
納豆真空凍結乾燥	<18
納豆真空凍結乾燥CTAB法	87.6

(大豆粒は3併行、加工品は2併行試験の平均値)

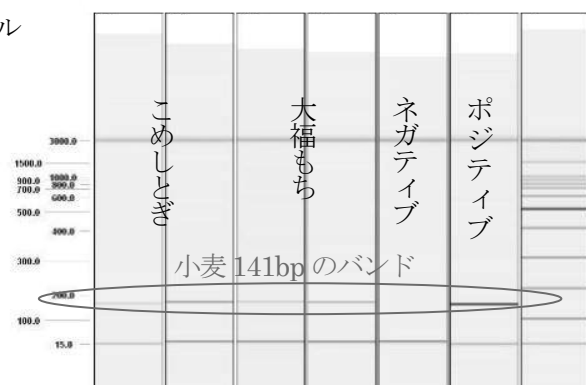


図2 酵素処理米粉加工品のキャピラリー電気泳動

- 文献 1) 安全性審査済みのDNA組換え食品の検査方法, 消食表第139号(平成27年3月)
 2) 北村雅美ら, 納豆を検体とするDNA組み換え食品検査についての一考察, 岡環セ報, **40**, 99-102(2008)
 3) DNA組換え食品検査・分析マニュアル第3版, 農林水産消費安全技術センター(平成24年9月)
 4) 森内理江ら, 大豆加工食品を対象としたDNA組み換え食品検査におけるDNA抽出方法の検討, 食衛誌, **9**, 347-351(2008)

研究成果報告書（４）

研究課題名	食品中自然毒等の分析法に関する研究
担 当	衛生科学部 主査専門研究員 宮手 公輔
<p>1 目的</p> <p>有毒のキノコ、植物、魚介類等を食用と間違えて食べたことによる食中毒は全国的に毎年発生しており、本県においても過去20年間で45件（患者数148名（うち死者2名））発生している。</p> <p>当研究は、自然毒が疑われる食中毒等事案における迅速な原因物質特定を目指し、当センターとしての分析（定性試験）法を確立することを目的とするものである。</p> <p>2 方法</p> <p>(1) 機器分析条件の検討</p> <p>当センターにおいて過去に実施した分析の条件を参考としつつ、以下の成分についてLC-MS/MSによる機器分析の条件を検討した。</p> <p>対象成分：aconitine、α-amanitin、α-chaconine、α-solanine、atropine、β-amanitin、colchicine、cyclopamine、demecolcine、diosgenin、galanthamine、galanthaminon、hyaconitine、illudin S、jervine、jesaconitine、lycorine、mesaconitine、phalloidin、scopolamine</p> <p>(2) 抽出法の検討</p> <p>当センターでは、これまで自然毒分析を行う際は、サンプルを約10倍量のメタノールにより抽出し、メンブレンフィルター濾過したものを適宜希釈して機器分析の検液としていた。この方法では、夾雑物等を広く検液に含むことが考えられたことから、夾雑物の除去を目的として当センターで試薬等を保有していたQuEChERS法による抽出、分散SPEキットによる精製により、今回対象とした成分が分析可能か検証した。</p> <p>具体的には、水15mLを50mL PP製試験管に採取し、アセトニトリル10mLを加えてホモジナイズ（11,000rpm, 1min）した。これにQuEChERS抽出試薬を入れ直ちに振とう（1min）し、遠心分離（3,500rpm, 4℃, 5min）したアセトニトリル層を中間試料液とした。</p> <p>①中間試料液3mLをCaptive ND Lipidsを用いて遠心濾過したものを試料液Aとした。</p> <p>②中間試料液1.5mLを分散SPEキットに採取し振とう（10sec）した後、Captive ND Lipidsを用いて遠心濾過したものを試料液Bとした。</p> <p>また、上記とは別に、メタノール抽出法として、メタノール抽出した検液をCaptive ND Lipidsを用いて遠心濾過したものを試料液Cとした。</p> <p>なお、試料液A～Cは、機器測定時に20ppbとなるよう抽出操作前の水に混合標準液を添加し、n=3で試験を行った。</p> <p>(3) 添加回収試験</p> <p>添加回収試験用試料として、豚汁、きんぴらごぼう、ほうれん草胡麻和えの3試料を使用し、メタノール抽出法により添加回収試験を実施した。添加回収試験は、機器分析試験液において20ppbとなるよう試料に混合標準液を添加し、n=3で試験を行った。</p> <p>3 結果</p> <p>(1) 機器分析条件の検討</p> <ul style="list-style-type: none"> ・HPLC条件を図1のとおり、MS/MS条件を図2のとおりとした。 ・5、10、20、50及び100ppbの混合標準液を調整し、絶対検量線法により求めた検量線は、α-amanitin 	

以外の成分においては、 $r^2=0.999\sim 1.000$ と良好な直線性を示した。

- α -amanitin は感度不良であり、明確なピークを確認するためには 50ppb 以上が必要であったため、今回の検討から除外した。

(2) 抽出法の検討

- メタノール抽出では、全ての成分において、回収率が 78.5-136.5%であった。
- 一方、QuEChERS 法による抽出では、 β -amanitin、diosgenin の回収率が低く 0.0-23.8%であった。更に分散 SPE キットの使用により、 α -chaconine、 α -solanine、atropine、phalloidin も回収率が悪くなり、0.0-20.4%であった。
- 以上より、メタノール抽出法を採用することとした。

(3) 添加回収試験 (α -amanitin を除く)

- きんぴらごぼう及び豚汁でいずれも 18/19 成分、ほうれん草胡麻和えでは 17/19 成分が回収率 70-100%の範囲内にあった。(図 3)
- 回収率が特に低かった成分は diosgenin であり 27.7-41.6%であった。
- その他、ほうれん草胡麻和えで galanthamin の回収率が 68.7%とわずかに 70%を下回った。

以上 (1) から (3) の結果より、回収率が低い成分が 2 成分確認されたものの、これらを含めた 19 成分について原因究明を目的とした定性試験は可能であると示唆された。

4 今後の研究方向等

- 本年度は機器分析条件及び抽出方法について重点的に検討した結果、 α -amanitin を除く 19 成分についてメタノール抽出法により定性試験が可能であると示唆された。
- 今後は、今回検証から除外した α -amanitin や添加回収試験において回収率が低かった diosgenin について再度検証を行うほか、今回の成分以外の自然毒成分についても追加検証を行い、食中毒発生時の分析体制の強化を図る。
- 更に、食中毒事案発生時の迅速な対応に向け、今回の検証結果を踏まえて当センターとしての手順化を図ることとする。

<LC>

機器：Agilent社製 HP1100
 移動相：A液...10mMギ酸アンモニウム、B液...MeOH
 グラジエント：
 0min(95:9)→2min(95:5) → 3min(70:30)
 → 20min(5:95) → 30min(0:100) → 40min(0:100)
 → 40.1min(95:5) → 50min(95:5)
 流速：0.200mL/min
 カラム：Imtakt Scherzo SM-C18 150×2mm 3 μ m
 カラム温度：40°C
 試料注入量：5 μ L

図1 LC分析条件

<MS/MS>

機器：AB Sciex社製 API4000
 イオン化方式：ESI (+)
 Ionspray voltage：5500V
 Ion source temp：300°C
 MRM測定条件：

name	m/z		DP	CE
	Precursor ion	Product ion		
aconitine	646.1	586.3	56	47
α -amanitin	920.5	902.7	90	31
α -chaconine	852.7	706.8	181	89
α -solanine	868.7	722.5	151	89
atropine	290.1	124.0	40	30
β -amanitin	921.5	259.0	115	47
colchicine	400.0	341.0	66	29
cyclopamine	412.2	114.1	116	41
demecolcine	372.0	341.1	56	17
diosgenin	415.3	271.1	71	25
galanthamine	288.0	213.0	46	31
galanthaminone	286.1	229.1	46	27
hyaconitine	616.1	556.3	76	45
illudin S	265.2	247.0	56	11
jervine	426.3	114.1	116	45
jesaconitine	676.1	616.3	51	47
lycorine	288.0	147.0	56	39
mesaconitine	632.0	572.3	76	47
phalloidin	790.4	754.5	80	25
scopolamine	304.0	138.0	40	30

図2 MS/MS分析条件

	回収率 (%)		
	きんぴら	豚汁	ほうれん草胡麻和え
aconitine	80.5	79.5	77.0
α -chaconine	87.5	87.7	85.2
α -solanine	93.2	89.8	88.0
atropine	96.0	98.2	91.0
β -amanitin	82.7	78.5	84.2
colchicine	82.3	86.3	76.2
cyclopamine	84.2	80.0	74.5
demecolcine	90.0	89.2	88.0
diosgenin	41.6	30.7	27.7
galanthamine	89.5	85.2	78.2
galanthaminone	83.2	86.8	68.7
hyaconitine	85.7	84.0	83.7
illudin S	75.2	73.7	76.8
jervine	85.2	79.5	80.2
jesaconitine	86.7	84.8	81.0
lycorine	85.2	87.0	81.2
mesaconitine	84.2	82.0	79.8
phalloidin	89.5	83.0	89.3
scopolamine	88.5	89.8	83.2

図3 添加回収試験 回収率 (%)

研究成果報告書（5）

研究課題名	レバーを含む食品の細菌検査で生じる遺伝子増幅阻害を軽減する手法の開発
担 当	検査部 主査専門研究員 山中 拓哉、主任専門研究員 太田 美香子、 主任専門研究員 小野 正文、部長 佐藤 徳行
<p>1 目的</p> <p>当センターでは食品における腸管出血性大腸菌の検査を、厚労省通知「腸管出血性大腸菌O26、O103、O111、O121、O145及びO157の検査法について(平成26年11月20日食安監発1120第1号)」に記された、Loop-mediated isothermal amplification（以下LAMP）法による増菌液からのベロ毒素遺伝子の検出により実施している。</p> <p>遺伝子検査は迅速性、簡便性、検出感度の点で優れているが、食品検体には非常に多様な成分が含まれることから、遺伝子抽出液中の成分により遺伝子増幅反応が阻害を受ける可能性を考慮する必要がある。このため本検査においては、ベロ毒素遺伝子の検出試験を実施する際に、外因性コントロールによる増幅試験を行っている。外因性コントロールは増菌培養液の遺伝子抽出時に全検体に添加される既知のDNA断片であり、LAMP法による遺伝子増幅が陰性の場合には検体由来物質による反応阻害が生じていると判定される。</p> <p>平成29年度に当センターで実施したレバー加工食品の検査においては、外因性コントロールの増幅が陰性となり検査が不成立となるという事例が発生している。レバー類の検査においてLAMP法による遺伝子増幅反応が阻害を受ける件については一般的に生じている問題とされ、試薬に添付された文書にも明記されている。これらを踏まえ、レバーを含む市販食品における外因性コントロールの増幅阻害の有無についての検討をおこなった。</p> <p>この問題に関しては、栄研化学株式会社がレバーを含む食品検体におけるLAMP反応阻害を回避する方法として特許「核酸増幅反応における阻害を回避する方法（特開2008-72904）」を公開している。この特許はLAMP反応液に鉄イオンを添加することで、遺伝子増幅阻害を回避できるというものである。これに倣い、本研究では、増幅阻害が起こった抽出液に塩化第二鉄（FeCl_3）を添加し、阻害の軽減が見られるかどうかについても検討した。</p> <p>2 方法</p> <p>(1) レバーを含有する市販食品における遺伝子増幅阻害について</p> <p>市販の生レバー（鶏、豚）およびレバー加工食品を検体とした。生レバーを電子レンジで加熱したものも併せて検体とした（計10検体、図1、2）。検体25gにノボバイオシン加mEC培地225mlを加えて混和後、35℃で20時間培養した増菌培養液100μlからアルカリ熱抽出法により遺伝子抽出を行った。外因性コントロールは抽出中に添加されるため全検体に含まれる。LAMP法による遺伝子増幅には腸管出血性大腸菌検出試薬キット（外因性コントロール入り、栄研化学）を使用した。増幅反応はキットのプロトコールに従い、65℃、1時間行った。本キットでは遺伝子が増幅すると反応液の濁度が上昇し、吸光度の上昇として捉えられる。反応、測定および判定はリアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA®（栄研化学）により行った。</p> <p>(2) 鉄イオン添加による遺伝子増幅阻害の軽減について</p> <p>LAMP反応液にFeCl_3溶液を最終濃度が0.4mM上昇するように添加した。それ以外の材料、試薬および反応については上記（1）と同様の条件で解析を実施した。</p> <p>3 結果</p> <p>(1) レバーを含有する市販食品における遺伝子増幅阻害について</p> <p>結果を図1に示した。外因性コントロールは全検体に含まれるが、これが増幅し陽性と判定されたのは10検体中3検体（検体7、8、10）のみであり、他は陰性と判定された。以上より、今回解析を行った10検体中7検体においてLAMP反応の阻害が起こっていることが示唆された。今回の解析では、阻害の有無について鶏肉/豚</p>	

肉および生肉／加熱品／加工品といった検体種別による明確な差は認められなかった。

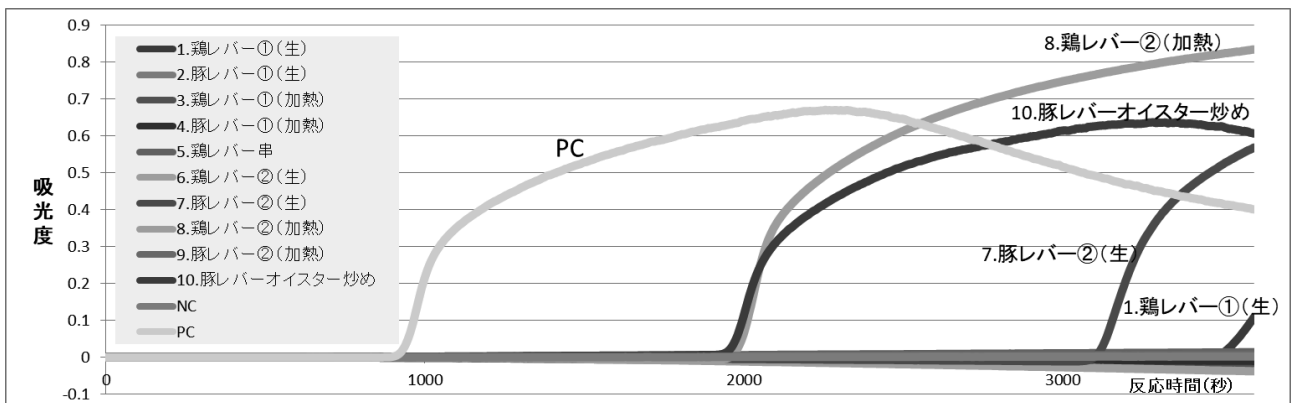


図1 LAMP 反応による外因性コントロールの増幅 (通常条件)

(2) 鉄イオン添加による遺伝子増幅阻害の軽減について

結果を図2に示した。外因性コントロールによる増幅試験は10検体全て陽性と判定された。通常条件下で陽性となった3検体に関しても FeCl_3 添加により増幅が早くなったことから、通常条件下で生じた阻害が FeCl_3 添加により軽減していることが示唆された。以上より、今回解析を行った食品10検体全てにおいて FeCl_3 添加による増幅阻害軽減効果が示唆されるという結果になった。

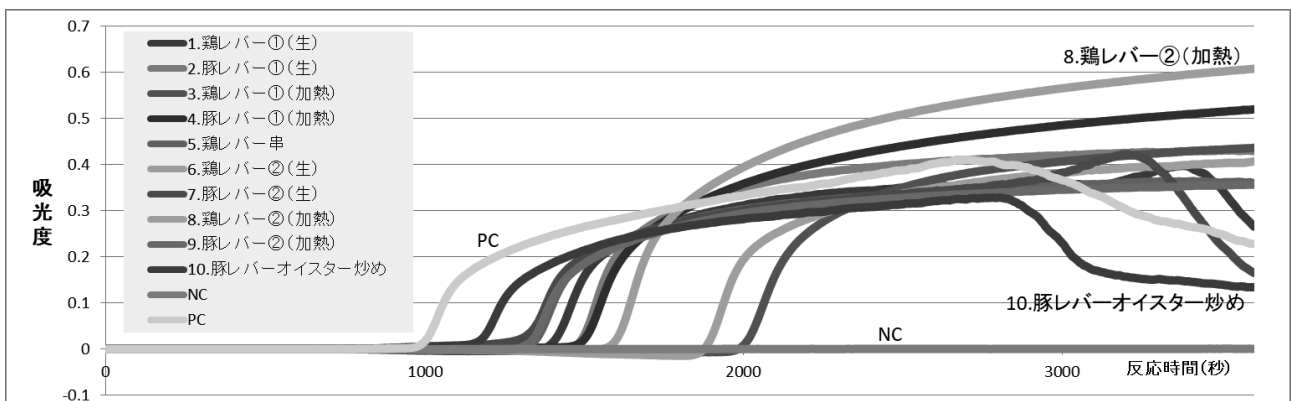


図2 LAMP 反応による外因性コントロールの増幅 (0.4mM FeCl_3 添加)

4 まとめ

解析を行ったレバーを含有する10件の食品検体全てにおいて、①LAMP法における遺伝子増幅阻害および②0.4mM FeCl_3 添加による阻害の軽減が認められた。この結果より、今回の反応条件を実際の食品検査においても適用できると考えられる。

研究成果報告書（6）

研究課題名	医療機関との連携による薬剤耐性菌の解析
担 当	保健科学部 上席専門研究員 岩渕香織
<p>目的</p> <p>岩手県内の薬剤耐性菌の検出状況の把握のため、医療機関で多く検出され、市中感染も発生している ESBL (extended-spectrum β-lactamase) 産生菌 (以降 ESBL) の CTX-M 型別を行った。また、海外・県外からの持ち込みが危惧される CRE (Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae、以降 CRE) について、感染症発生動向調査により届け出のあった CRE 患者分離株及び環境汚染の視点から下水道流入水についてカルバペネマーゼ遺伝子の検査を実施した。</p> <p>2 方法</p> <p><u>ESBL 解析</u>：</p> <p>《材料》 県内 3 カ所の医療機関で、平成 31 年 4 月から令和 2 年 3 月にかけて検出され、当センターに提供された 119 株の ESBL 産生菌株を対象とした。菌種は、<i>Escherichia coli</i>107 株 (89.9%)、<i>Klebsiella pneumoniae</i>6 株 (5.0%)、<i>Proteus mirabilis</i>5 株 (4.2%)、<i>Klebsiella oxytoca</i>1 株 (0.9%) で、これらを検出した材料は、尿検体 73 検体 (61.3%)、呼吸器検体 19 検体 (16.0%)、動脈血 7 検体 (5.9%)、静脈血 5 検体 (4.2%)、その他 (胆汁、羊水、膣分泌物等) 15 検体 (12.6%) であった。</p> <p>《検査方法》</p> <p>(1) 血清型別</p> <p>大腸菌の血清型別は、PCR 法による大腸菌血清型判別法¹⁾により、O 血清群は O25 を、H 型は H4 を標的として単独プライマーペアを用いて実施した。</p> <p>(2) ESBL 産生遺伝子の検出</p> <p>TEM 型、SHV 型および CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-9 group の ESBL 遺伝子について、PCR 法による検出を行った²⁾。CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-9 group PCR で陽性になった遺伝子増幅産物については、シーケンス解析により CTX-M 型の遺伝子型別を行った³⁾。</p> <p><u>CRE 解析</u>：</p> <p>《材料と検査方法》</p> <p>(1) 人由来株：患者分離株届け出のあった 4 株の CRE について、カルバペネマーゼ遺伝子 (NDM、KCP、IMP、VIM、OXA-48、GES) の PCR 法による検出を実施した²⁾。</p> <p>(2) 下水道流入水：2019 年 4 月から 2020 年 3 月まで月 1 回 (ラグビーワールドカップの開催予定だった 9 月は 2 回、10 月は 4 回) 採水した流入水 100~150mL について、5,000rpm で遠心分離した沈渣をスキムミルク培地に入れマイナス 80℃で保存しておいた検体の半量 (50~75mL 相当) を、10 μg/1 枚のメロペネムディスク 2 枚を加えたトリプトソイブイオン 20mL で 35℃14 時間増菌培養した。</p> <p>増菌液を PBS で 10 倍希釈した 100 μL 及び 100 倍希釈した 100 μL をクロモアガー-mSuper CARBA 培地に塗抹し、37℃18~24 時間培養し、CRE と推定されるコロニーを CLIG 培地に釣菌した。37℃18~24 時間培養後、菌株を熱抽出し、カルバペネマーゼ遺伝子 (NDM、KCP、IMP、VIM、OXA-48、GES) の PCR 法による検出を実施した²⁾。遺伝子の検出された菌株について、簡易同定キット ID20 により、菌種を同定した。</p> <p>3 結果</p> <p><u>ESBL 解析</u>：</p> <p>(1) <i>E. coli</i> の血清型は 107 株のうち、71 株 (66.4%) が O25:H4 であった。</p>	

(2) 提供された 119 株のうち 108 株で CTX-M 遺伝子が検出されたが、シーケンス解析できた株は A 病院で 29 株、B 病院で 13 株、C 病院で 44 株の計 86 株であった。各医療機関別 CTX-Mgroup のグラフ 1~3 に各医療機関の CTX-M 型別結果を表 1 に示した。CTX-Mgroup では医療機関によって差があるが、いずれの医療機関とも CTX-M-27 が 50%以上を占めていた。

CRE 解析：

- (1) 患者分離株 4 株からはカルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった。
- (2) 下水道流入水からは、5 月、6 月、9 月の試料から IMP 遺伝子陽性の *Citrobacter freundii* が検出された。

4 今後の研究方向等

- (1) ESBL について、岩手県における CTX-M 型別では、CTX-M-27 が多い。世界的な流行株であり、岩手県でも確認されたと以前に報告している ST131 クロームは、CTX 型が CTX-M-14、CTX-M-15 であり、今後も動向を注視していく必要がある。
- (2) CRE については、県内では患者から耐性遺伝子は検出されていない。下水道流入水の昨年度の結果では IMP の他、NDM、OXA-48 遺伝子を持つ菌が検出され、海外・県外からの流入が危惧されたが、今年度は IMP だけが検出された。原因は不明だが、引き続き、医療機関と連携し、早期探知及び拡散防止に向け、迅速に遺伝子検査等を実施していく必要性を感じた。

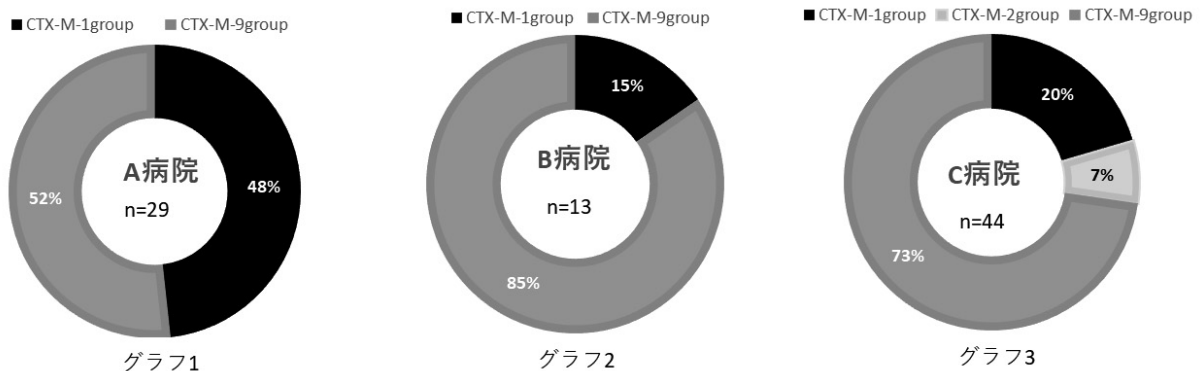


表1 協力医療機関別のCTX-M型β-lactamase遺伝子型別結果

	CTX-M-1 group(n=25)				CTX-M-2group(n=3)	CTX-M-9-group(n=58)		Total
	CTX-M-3	CTX-M-15	CTX-M-32	CTX-M-55	CTX-M-2	CTX-M-14	CTX-M-27	
A病院	4	8	0	2	0	0	15	29
B病院	1	0	0	1	0	4	7	13
C病院	0	5	1	3	3	8	24	44
Total	5	13	1	6	3	12	46	86

文献

- 1) Iguchi A*, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, and Pathogenic E. coli Working Group in Japan. Escherichia coli O-genotyping PCR; a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping. Journal of Clinical Microbiology 53(8):2427-32 (2015)
- 2) 薬剤耐性菌サーベイランスの強化及びゲノム解析の促進に伴う迅速検査法開発に関する研究によるマルチプレックスPCR法, Ver 170928
- 3) Canton R, Gonzales-Alba JM, Galan JM. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. Front Microbiol. 2012;3:110

研究成果報告書（7）

研究課題名	岩手県における小児呼吸器ウイルスの疫学に関する研究
担 当	保健科学部 上席専門研究員 高橋 雅輝
<p>1 目的 小児呼吸器ウイルス感染症について包括的なウイルスサーベイランスを行うほか、ウイルスの抗原解析を行うことにより、感染症発生動向調査の充実に資する。</p> <p>2 材料及び方法 (1) 2019年1月から2019年12月までの間に、子どもは未来もりおかこどもクリニック（前もりおかこども病院、以下こどもCと略す）を受診した上気道炎及び下気道炎患者の咽頭ぬぐい液及び喀痰29検体について、呼吸器ウイルス等の分離・検出並びに血清型別・遺伝子型別を行った。検体については迅速診断キットにより診断されえなかった症例を中心に収集し明らかな細菌性疾患は除外した。 (2) 1994年から2019年までに病原体定点サーベイランスにより検出されたパラインフルエンザウイルス3型（HPIV3）76株のHN遺伝子について、ベイジアンMCMC法による時系列進化系統解析を行った。 (3) 正常ヒト血清の抗PIV3中和抗体価を調べるため、こどもCにおいて2009年から2010年に採取された10歳～18歳の7血清並びに横浜市立大学（以下横浜市大と略す）血清バンクに保存されている医療従事者20～30歳代女性の10血清（2015年採取）について、分離株6株及びレファレンスであるワシントン1957株を用いてウイルス中和試験を行った。</p> <p>3 結果及び考察 (1) 2019年は29検体中14検体（48.3%）から病原ウイルスが検出された（重複検出例含む）。内訳は、ライノウイルス（HRV）が7例（24.1%）、パラインフルエンザウイルス（HPIV）が1例（3.4%）、ヒトメタニューモウイルス（HMPV）が1例（3.4%）であった。今回RSウイルス（RSV）は検出されなかった。この年は例年にくらべてRSウイルス感染症の流行が小さかったためと考えられた。2013年から2019年のこれら主要4ウイルスの検出数を表に示した。検出率が最も高かったのはHRV（平均22.0%）で、HPIV（同14.3%）、RSV（同10.2%）、HMPV（同8.0%）の順であった（表）。また、2017年以降は主要4ウイルス以外のウイルス（アデノウイルス、エンテロウイルス、パレコウイルス、ヒトコロナウイルス、インフルエンザCウイルス等）の検出率が増加傾向にあり、呼吸器感染症の起因ウイルスは多様であることが示された。 (2) HPIV3のHN遺伝子進化系統樹はA、B及びCの3クラスターに大別され、さらにクラスターCはサブクラスターC1、C2、C3、C4及びC5に分岐した（図1）。本県で検出された株はC1、C3及びC5系統に分類された。2019年はC3系統株のみが検出された。本県のCサブクラスター株はC1が2017年以降、C2が2006年以降検出されず、C5株は2017年の検出にとどまったことから、近年はC3系統株が流行の中心であると考えられた。しかしながら、ベイジアンスカイラインプロット解析によるとC3株は流行株でありながらゲノムポピュレーションが減少傾向であることが示された（データ示さず）。今後どのような進化を辿るのか注目される。 (3) クラスターAの1株（レファレンス株）、サブクラスターC1、C5及びC3それぞれ1株、1株及び4株（系統樹上の位置は図1の①～⑦のとおり）に対する中和抗体価（血清の希釈倍率）を図2に示した。こどもC血清と横浜市大血清の比較では⑦岩手47/2013/C3に対する抗体価で有意差が認められた。他の株に対する有意差は認められなかった。これらことから、⑦岩手47/2013/C3に対する抗体価は比較的低いものの、PIV3に対する防御抗体はクラスター・サブクラスターを問わず広く有効であることが示唆された。</p> <p>4 今後の研究方向等 新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の流行により呼吸器ウイルスの動向が一層注目される。令和2年度においても呼吸器感染症検体からのウイルス検出を継続しウイルスの詳細解析を行うほか、HPIV3のHN抗原解析を継続していく。</p>	

表 1 検体採取年別ウイルス検出実績

検体採取年	2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		合計	
検体数	129		105		83		124		89		93		29		652	
病原体検出数	117		78		53		91		71		64		14		488	
ライノウイルス	32	24.8%	22	21.0%	9	10.8%	32	25.8%	27	30.3%	16	17.2%	7	24.1%	145	22.2%
RSウイルス	24	18.6%	10	9.5%	10	12.0%	13	10.5%	11	12.4%	8	8.6%	0	0.0%	76	11.7%
パラインフルエンザウイルス	35	27.1%	16	15.2%	10	12.0%	18	14.5%	14	15.7%	11	11.8%	1	3.4%	105	16.1%
ヒトメタニューモウイルス	15	11.6%	18	17.1%	5	6.0%	14	11.3%	3	3.4%	3	3.2%	1	3.4%	59	9.0%
その他のウイルス	11	8.5%	12	11.4%	19	22.9%	14	11.3%	16	18.0%	26	28.0%	7	24.1%	105	16.1%
不検出	23	17.8%	35	33.3%	30	36.1%	40	32.3%	31	34.8%	37	39.8%	15	51.7%	211	358%

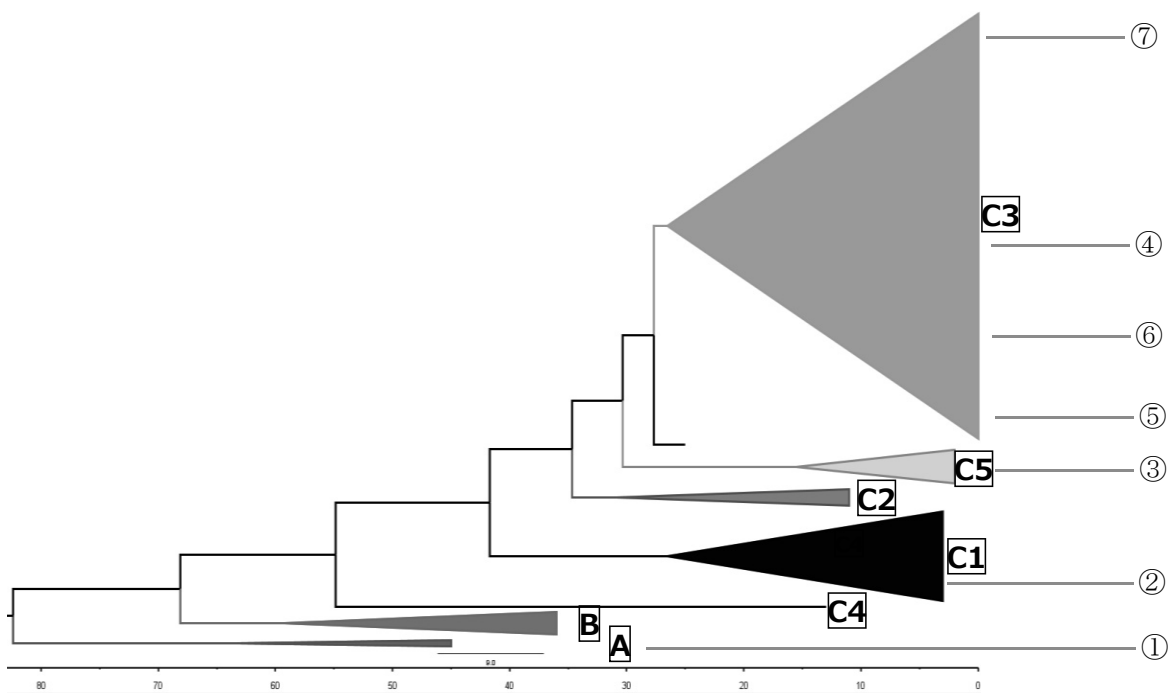


図 1 パラインフルエンザウイルス 3 型の HN 遺伝子進化系統樹 (2019 年を起点としたベイジアン MCMC 解析)

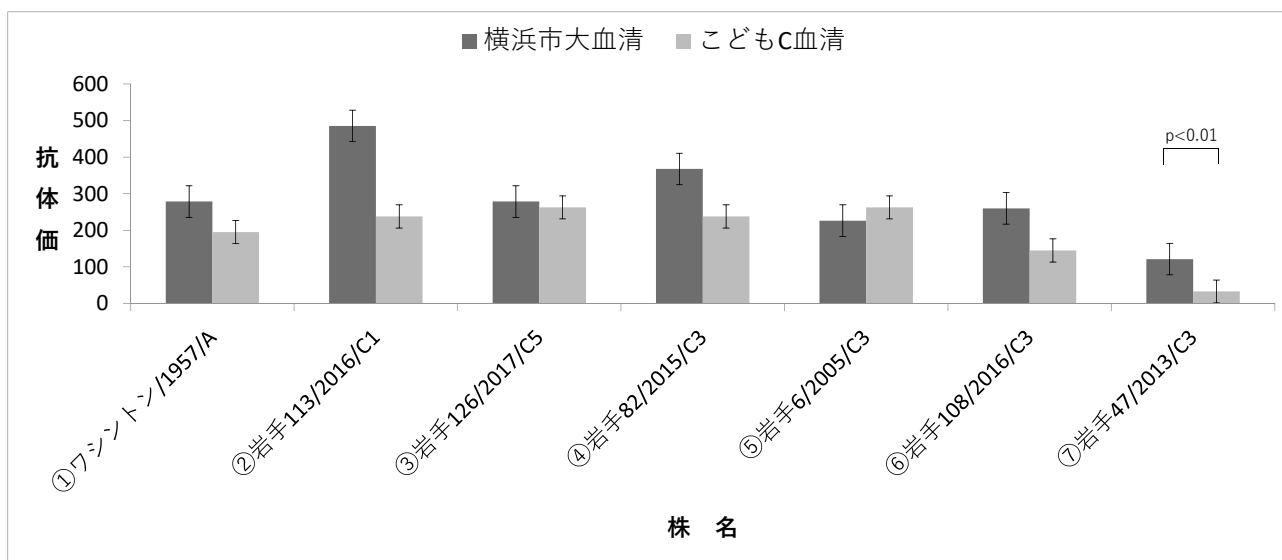


図 2 パラインフルエンザウイルス 3 型分離株に対する中和抗体価

研究成果報告書（8）

研究課題名	ウイルス媒介性節足動物の生息に関する研究
担 当	地球科学部 専門研究員 大橋 慶太郎
1 目的	
<p>ヒトスジシマカは、ジカ熱やデング熱等のウイルス疾患を媒介する感染症対策上重要な節足動物である。近年、その生息北限が北上しており、気温の上昇が影響しているといわれている。岩手県内における同蚊の生息分布状況を明らかにするとともに、生息北限地域における生息条件を検討することにより地球温暖化適応策や感染症予防対策に資することを目的とする。</p>	
2 方法	
(1) 蚊類の生息状況調査	
<p>蚊類の生息状況調査は令和元年7～9月、岩手県一関市、釜石市、久慈市、宮古市、山田町、紫波町、盛岡市、大槌町、滝沢市の6市3町の延べ60地点で行った（図1）。</p> <p>調査対象は主に寺院の花生けや手水鉢、屋外に放置された古タイヤなどの人工容器の貯留水とし、生息している蚊の幼虫及び蛹を太口ピペットで採取した。1調査地点につき1～5人工容器を調査した。採取した蚊の幼虫を室温で飼育し、羽化させた成虫を、実体顕微鏡下で形態学的に同定した。</p>	
(2) ヒトスジシマカの生息条件の解析	
<p>2010年から2019年までのヒトスジシマカ生息分布調査結果と1kmメッシュ気温情報等を基に、統計モデリング手法を用いて岩手県におけるヒトスジシマカ生息リスクマップを作成した。ヒトスジシマカのほぼ生息北限である本県では、越冬卵による繁殖が成立している地域と、越冬はしないが成虫の移入によってシーズン限定で繁殖している地域があると考えられる。このことから、1～3月の平均気温、有効積算温度をパラメータとして検討した。パラメータ選択はAIC及びAUCを評価基準とした。GISアプリケーションはGisway light ver. 2.2.4、統計計算アプリケーションはR ver. 3.5.1 パッケージglmMLを用いた。</p>	
3 結果	
(1) 蚊類の生息状況調査	
<p>成虫の羽化が確認された60地点193人工容器について、計1,116頭を同定した。今回採集された蚊の種類はヤマトヤブカ、ヒトスジシマカ、キンイロヤブカ、ヤマダシマカ、オオクロヤブカ、トウゴウヤブカ、ヤマトクシヒゲカ、トラフカクイカ、キンパラナガハシカ及びイエカ類であった。このうちヤブカ類では、ヤマトヤブカは捕集数が最も多く、調査地域全域において優先種であり、計897頭が採取された。ヒトスジシマカは、一関市、盛岡市、滝沢市、紫波町の3市1町11地点で計93頭が採取された。今年度の調査ではヒトスジシマカが滝沢市牧野林で初めて確認され、徐々に生息域を北に広げていることが示唆された。</p>	

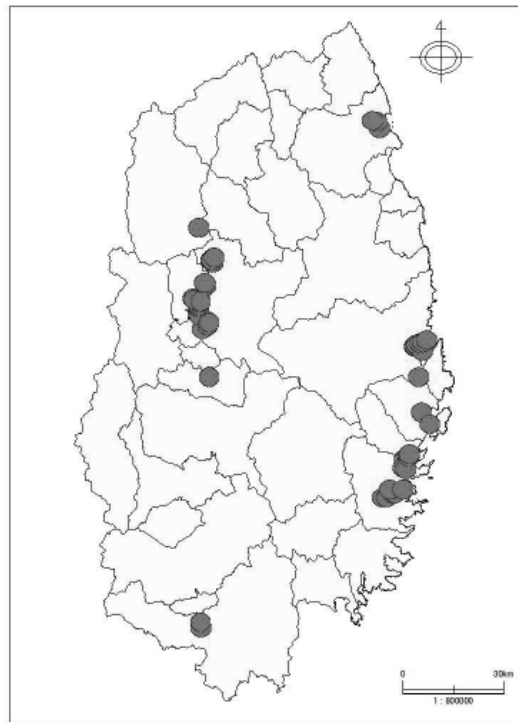


図1.採取地点

(2) ヒトスジシマカの生息条件の解析

メッシュごとのヒトスジシマカの検出割合を一般化線形混合モデルによって解析を行った。AIC を基準としてパラメータ選択を行い、「2月平均気温」、「人口密度」、「調査年における1月1日から調査日までの10.8℃を閾値とする有効積算温度」が有意なパラメータとして選択された。ROC 解析では、AUC=0.82 と本モデルのあてはまりは良好であった。

本モデルでは、 q_i を 1km メッシュごとのヒトスジシマカ生息確率としたとき以下の式で算出される。

$$\text{logit}(q_i) =$$

$$-3.952043 + [2 \text{ 月平均気温}]_i \times 0.2667567 + [\text{人口密度}]_i \times 0.0002983 + [\text{調査年における1月1日から調査日までの10.8℃を閾値とする有効積算温度}]_i \times 0.0010745$$

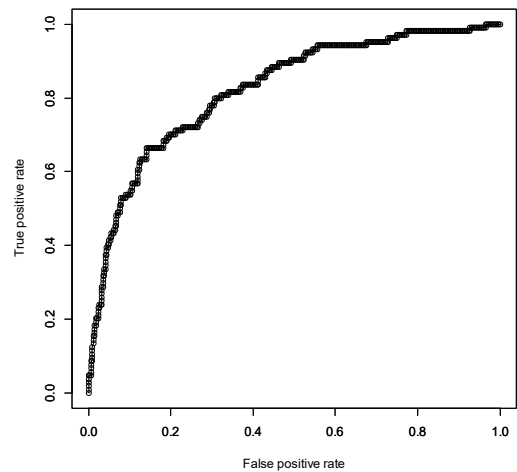


図2.ROC 曲線

本モデルにより、岩手県内の任意の3次メッシュ及び任意の日について、生息確率を算出することができる。True Positive Rate=0.90、False Positive Rate=0.49 のカットオフ値で、任意の日におけるヒトスジシマカ生息リスクマップを作成した (図3～4)。

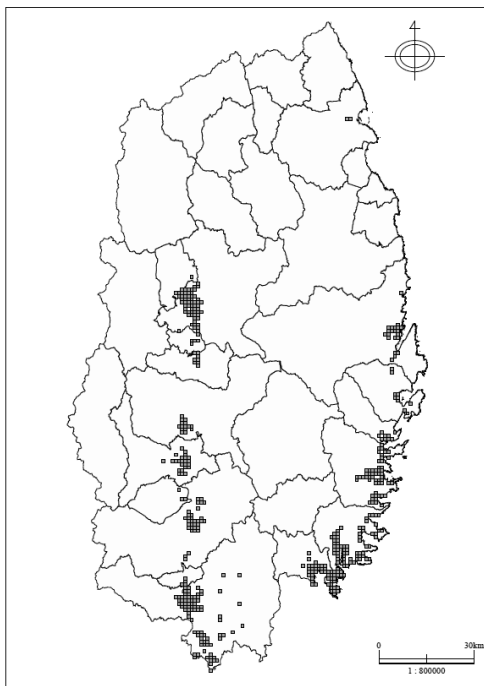


図3.生息リスクマップ (令和元年7月末現在)

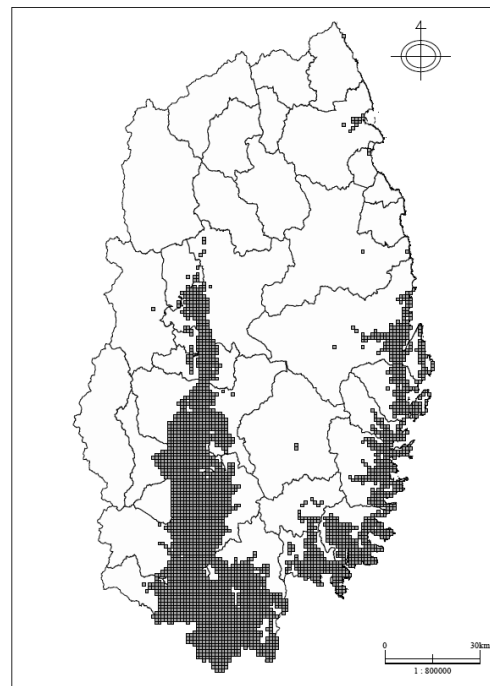


図4.生息リスクマップ (令和元年8月末現在)

4 今後の研究方向等

ヒトスジシマカの生息調査及び生息条件の解析は、生息北限地域におけるヒトスジシマカの分布の変化や、生息条件を明らかにするうえで重要である。また、地球温暖化に伴う適応策を検討し、感染症予防に関する知見を得るため、今後とも調査を継続することが必要である。

研究課題名	微小粒子状物質の発生源解明に関する研究
担当	地球科学部 専門研究員 菊池 一馬

1 目的

微小粒子状物質 (PM_{2.5}) の構成成分の一種である水溶性有機炭素 (WSOC) は、大気中で酸化された有機粒子やバイオマス燃焼の指標物質であるレボグルコサン等を含むことが知られており、分析することでより詳細な発生源解析に資することができる。

環境省の WSOC 測定マニュアルによると、測定に用いる石英フィルタは大気中のガス状有機炭素を吸着するため、ブランク処理後は速やかに分析を行うこととされている。しかし、WSOC 測定の前処理はフィルタが長時間大気にさらされるため、ガス吸着の影響を防ぐことは難しい。また、操作ブランクを差し引く手法についても、フィルタが置かれた条件によって操作ブランクが大きく変動するため、正確な測定のためには測定の都度操作ブランクを測定する必要があるが、一日に測定できる検体数も限られることから現実的には難しい。

そこで本研究では、ガス吸着量の測定値から算定する操作ブランク (以下「ガス吸着量補正操作ブランク」という。) を求めることにより、より正確かつ簡便に WSOC を測定する手法を検討した。

2 方法

(1) 測定方法

測定方法は、「水溶性有機炭素成分測定方法第2版(2019年5月 環境省)」における「3.炭素分析装置による方法」によった(図1)。試料調整は、抽出瓶とろ過フィルタ(孔径0.2μmナイロン製)が一体となったものを使用し、試料フィルタ面積3.0cm²、抽出液量500μL、超音波抽出15分(5分毎にバイブレーターで攪拌)、測定用フィルタ面積1.5cm²、試験液滴下量90μL(15μL×6回)とした。フィルタは東京ダイレック(株)2500QAT-UPを用い、測定に使用するフィルタは全て、測定日の前日に350℃・1時間の加熱によるブランク処理を行ったものを用いた。測定装置はSunset社製Lab Modelカーボンエアロゾル分析装置を用い、分析プロトコルはIMPRVE法を用いた。

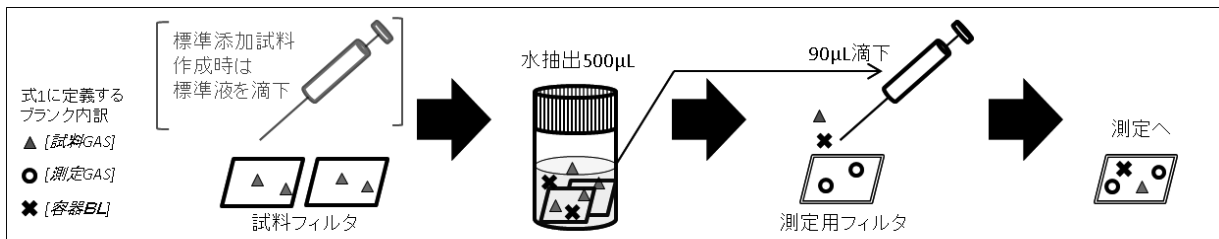


図1 試料調整操作の概要とブランクのイメージ

(2) 試験

ア) 操作ブランクの測定

ブランク処理後のフィルタを試料フィルタとして図1に示す試料調整操作を行い、操作ブランク試料として測定した。また、操作ブランクの標準偏差から方法検出下限値を算出した。

イ) ガス吸着量補正操作ブランクの算定

操作ブランクの内訳を式1のとおり定義し、ガス吸着量補正操作ブランクを算定した。

$[操作BL] = [装置BL] + [測定GAS] + [容器BL] + [試料GAS] \times 90/500 \quad (式1)$	
[操作BL] : 操作ブランク (μg/cm ²)	[測定GAS] : 測定用フィルタ(1.5 cm ²)に吸着したガス由来のブランク (μg/cm ²)
[装置BL] : 装置由来のブランク (μg/cm ²)	[試料GAS] : 試料フィルタ(3.0 cm ²)に吸着したガス由来のブランク (μg/cm ²)
[容器BL] : 抽出瓶や純水由来のブランク (μg/cm ²)	※本実験においては[試料GAS]=[測定GAS]×2である。

ウ) 標準添加試料の測定

ブランク処理後のフィルタ 3.0 cm²にスクロース標準液(1.071 μg/μL)を 10、20、30 μL 滴下し乾燥させたものを試料フィルタとして図 1 に示す試料調整操作を行い、標準添加試料として測定した。添加量の理論値から算出した回収率について、通常の実験ブランクを適用したものと、ガス吸着量補正操作ブランクを適用したものを比較した。

3 結果・考察

ア) 操作ブランクの測定

操作ブランク (N=5) の測定結果は、測定値の範囲は 0.93~1.22 μg/cm²であり、平均値 1.05 μg/cm²、標準偏差 0.12 μg/cm²、変動係数 0.12 であった。方法検出下限は 0.18 μg/m³であり、環境省マニュアルに記載される目標値(0.19 μg/m³)を達成した。

イ) ガス吸着量補正操作ブランクの算定

式 1 により各試料測定時のガス吸着量補正操作ブランクを算定した(表 1)。フィルタへのガス吸着量は測定日により異なり、ガス吸着量補正操作ブランクは 3/3 が 0.71 μg/cm²、2/28 が 1.10 μg/cm²であった。

表1 ガス吸着量補正操作ブランクの算定

サンプル属性	算定式等	式1に基づく内訳	測定値 (μg/cm ²)
A 清浄なフィルタのみ(測定日2/18)	N=3平均値	[装置BL]	0.29
B 測定用フィルタのみ(測定日2/18)	N=5平均値	[装置BL]+[測定GAS1]	0.60
C 通常の実験ブランク(測定日2/18)	N=5平均値	[装置BL]+[測定GAS1]+[容器BL]+[試料GAS1]*90/500	1.05
D 測定用フィルタのみ(測定日3/3)	N=2平均値	[装置BL]+[測定GAS2]	0.35
E 測定用フィルタのみ(測定日2/28)	N=3平均値	[装置BL]+[測定GAS3]	0.64
F 容器BL	C-B-(B-A)*2*90/500	[容器BL]	0.34
ガス吸着量補正操作ブランク(3/3)	D+F+(D-A)*2*90/500	[装置BL]+[測定GAS2]+[容器BL]+[試料GAS2]*90/500	0.71
ガス吸着量補正操作ブランク(2/28)	E+F+(E-A)*2*90/500	[装置BL]+[測定GAS3]+[容器BL]+[試料GAS3]*90/500	1.10

ウ) 標準添加試料の測定

標準添加試料の測定結果をまとめた(表 2)。各濃度試料(いずれも N=3)の変動係数は 0.01~0.03 であり、ばらつきは小さかった。添加量の理論値から算出した回収率(通常)は 71~97%であり、低濃度ほど回収率が悪かった。一方、ガス吸着量補正操作ブランクを適用した標準添加試料の回収率(補正)は 96~99%となり、ガス吸着量補正操作ブランクの適用が効果的であることが示唆された。

表2 ガス吸着量補正操作ブランクを適用した標準添加試料の測定結果

サンプル名	測定値 (μg/cm ²)						回収率 (通常) c/d	回収率 (補正) c'/d
	平均値 a	通常の実験 ブランク b	ガス吸着量補正 操作ブランク b'	c=a-b	c'=a-b'	添加量の 理論値 d		
10 μL 試料(測定日3/3)	1.96	1.05	0.71	0.91	1.25	1.29	71%	97%
20 μL 試料(測定日3/3)	3.25		0.71	2.20	2.54	2.57	86%	99%
30 μL 試料(測定日2/28)	4.81		1.10	3.76	3.71	3.86	97%	96%

4 今後の研究方向等

環境サンプルの WSOC 測定を実施する場合、試料フィルタのガス吸着量の算定が重要となることから、フィルタ保管条件等と吸着ガス量の関係を明らかにする必要がある。

参考文献

- ・水溶性有機炭素成分測定方法第 2 版(2019 年 5 月 環境省)

研究成果報告書（10）

研究課題名	酸性雨による環境影響の総合的評価（広域連携事業）
担 当	地球科学部 主任専門研究員 鳴海 史、専門研究員 菊池 一馬

1 目的

本研究は、降水の酸性化に影響を及ぼす乾性沈着物（ガス成分及びエアロゾル成分）の濃度をモニタリングし、成分濃度の推移や成分どうしの相関等に注目し解析することで、本県における酸性雨の実態把握に資することを目的とする。

乾性沈着物はメンブレンフィルター等で捕集し測定することが可能であるが、フィルター上に捕集したエアロゾル成分のガス化や、フィルター素材へのガス成分の吸着等の現象による影響を受けることが知られている。それらの影響を加味した乾性沈着物の濃度を測定するためには、多種多段フィルターを用いたサンプリング（フィルターパック法）が必要となる。本研究では、フィルターパック法による全国調査である全国環境研協議会酸性雨広域大気汚染調査研究部会第6次酸性雨全国調査（以下「全環研調査」）に参加することで、測定精度の向上に資するとともに、全国的観点から見た岩手県の酸性雨の状況について評価を行う。

2 方法

盛岡市内の当センター屋上を調査地点とし、原則2週間単位のサンプリングを通年連続で行った。調査期間は2019年4月1日から2020年3月30日までであり、サンプリングは全26回、うち欠測が1回（2019/5/27～6/10の微小粒子及びガス粒子）であった。

サンプリング装置は、全環研調査要領に推奨されるNILU社製6段ホルダーを使用し、フィルターの内訳は図1に示すとおりとした。捕集後の各フィルターは水（4～5段目は0.05%過酸化水素）20mlで振とう抽出し、0.45μmディスクフィルターでろ過したものを試験液とし、イオンクロマトグラフ法により陰イオン（硫酸イオン、硝酸イオン、塩化物イオン及び亜硝酸イオン）及び陽イオン（アンモニウムイオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン及びマグネシウムイオン）を分析した。

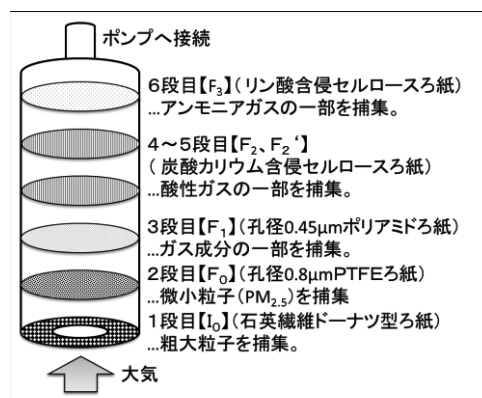


図1 フィルターパック法の概要

サンプリングの正確さの検証を目的として測定結果の評価を行った。評価項目及び評価基準は、全環研調査要領に示される基準である「F₀におけるイオンの当量濃度積算値が50neq/m³以上であること。」及び、「F₀におけるイオンバランス（陰イオン積算値/陽イオン積算値）が0.7～1.3の範囲内であること。」とした。また、当センターにおける先行研究により、調査地点の降水（湿性沈着及び乾性沈着の合計）中の海塩起源成分（塩化物イオン、ナトリウムイオン及びマグネシウムイオン）は概ね海塩組成比を保っていることが分かっていたため、ガス成分及び粒子成分の合計値のMg /Na モル比及びCl/Na モル比と海塩組成比を比較評価した。

3 結果

(1) 各成分の濃度推移

2019年度における主要成分の形態別濃度推移を図2～図9にそれぞれ示す。硫黄酸化物成分は、微小粒子としての存在割合が大きかった。アンモニア成分は、ガスとしての存在割合が大きかった。窒素酸化物成分は、季節によって形態の存在割合が変化し、特に夏期はガスとしての存在割合が多くなっていた。海塩起源成分であるナトリウムイオン、塩化物成分及びマグネシウムイオンや土壌起源成分であるカルシウムイオンは、いずれも粗大粒子として多く存在していた。カリウムイオンは、粗大粒子よりも微小粒子にやや多く存在していた。

(2) 測定結果の評価

F₀におけるイオンの当量濃度積算値及びイオンバランスについての評価結果は、イオンの当量濃度積算値が基準を満足できないことが1回あったが、その値は基準値の9割に達しており、リークテストの結果は良好であり、フィルター間のイオンの挙動にも異常は見られなかったことから、サンプリングは概ね良好に実施できたと考えられた。

Mg/Na 比の範囲は0.08~0.13 (平均値0.11、中央値0.11) であり、概ね海塩組成比 (文献値0.11) に近い範囲で推移していた。一方、Cl/Na 比の範囲は1.16~4.18 (平均値1.61、中央値1.38) であり海塩組成比 (文献値1.16) よりも大きい値となる回が多く、海塩以外の塩化物の起源があることが示唆された。Cl/Na 比のはずれ値 (第三四分位数+1.5IQR を超えたもの) は3回あり、いずれも7月であった。この期間はいずれも海塩起源成分の粗大粒子の濃度が低かったため、相対的に海塩以外の塩化物の割合が大きくなり、Cl/Na 比が高くなったと考えられた。夏季に海塩起源成分の粗大粒子の濃度が低くなった原因としては、季節風や気温、湿度等の影響の可能性が考えられ、今後、複数年のデータをもとに検証したい。

4 今後の研究方向等

大気汚染状況の長期的な推移を把握し、汚染の実態を解明するために、今後もモニタリングを継続する必要があり、全環研調査にも引き続き参加する。

今後も正確なデータを蓄積していくとともに、各成分の存在形態の関係性等について解析していく。

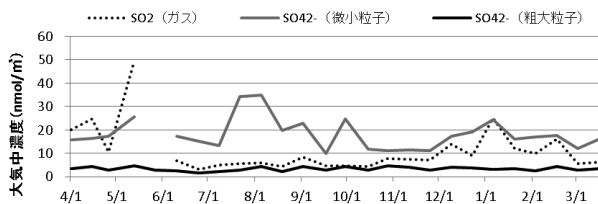


図2 硫酸化合物成分の形態別濃度推移(2019年度)

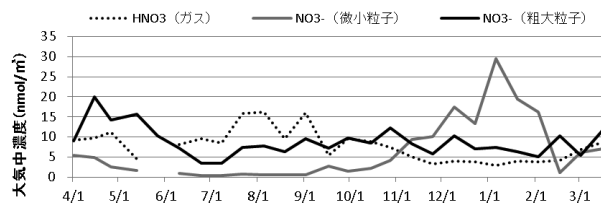


図3 窒素酸化物成分の形態別濃度推移(2019年度)

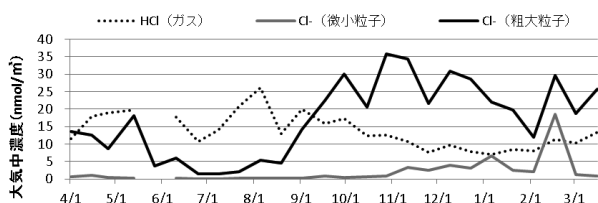


図4 塩化物成分の形態別濃度推移(2019年度)

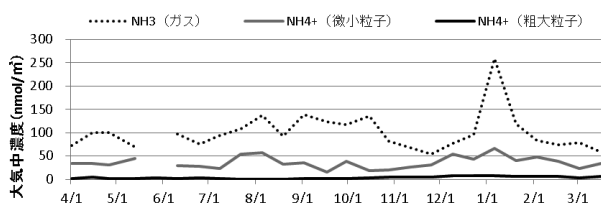


図5 アンモニア成分の形態別濃度推移(2019年度)

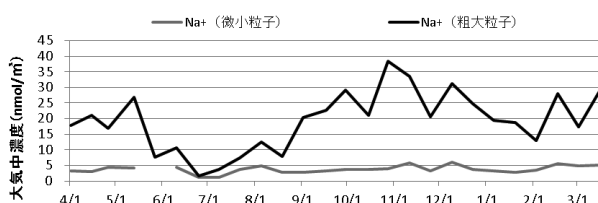


図6 ナトリウムイオンの粒径別濃度推移(2019年度)

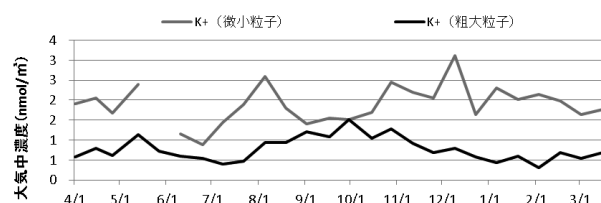


図7 カリウムイオンの粒径別濃度推移(2019年度)

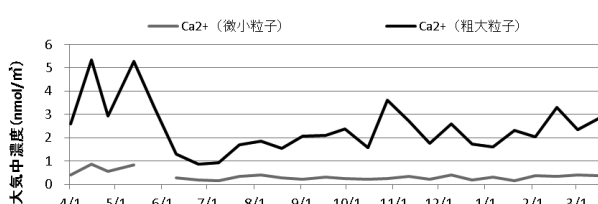


図8 カルシウムイオンの粒径別濃度推移(2019年度)

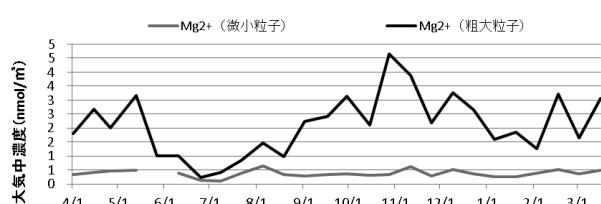


図9 マグネシウムイオンの粒径別濃度推移(2019年度)

研究成果報告書（11）

研究課題名	公共用水域の水質検査において大腸菌と誤判定されるコロニーに関する研究
担 当	検査部 主査専門研究員 山中 拓哉、主任専門研究員 太田 美香子、主任専門研究員 小野 正文、部長 佐藤 徳行

1 目的

公共用水域における糞便汚染の指標としては、現在「水質汚濁に係る環境基準について」（昭和46年12月28日環境庁告示59号）において示されたBGLB最確数法による大腸菌群数検査を実施している。しかしながら、大腸菌群には糞便とは無関係である環境由来の細菌も含まれており、得られた大腸菌群数のデータに関しては糞便汚染の指標性が低いとの問題点が指摘されてきた。このため環境省はより適切に糞便汚染を捉えられる指標として大腸菌数を導入することを検討しており、平成23年に各自治体に対し、基準設定に必要なデータ収集の協力依頼についての通知（「要測定指標の測定について」平成23年3月24日付環水大発第110324001号）を發出している。当センターではこの通知に基づき、大腸菌群数の検査と並行して特定酵素基質寒天培地を用いたメンブランフィルター法による大腸菌数の測定を行っている。

本法において大腸菌は菌が持つβ-グルクロニダーゼ活性により青色のコロニーとして検出されるが、検査において青色を呈するものの大腸菌ではないグラム陽性球菌からなる小型のコロニーが検出される事例がしばしば見られた。このようなコロニーの存在は大腸菌数の過剰報告へとつながる恐れがある。本研究では、このような菌株を分離し、菌の性状解析を行い、菌種を同定した。

2 方法

2017～19年度に岩手県内の公共用水域（河川、海域、ダム）から採取された検水をポアサイズ0.45μmのセルロース混合エステルメンブランフィルターでろ過し、特定酵素基質寒天培地（アガートリコロール、エルメックス社製）上に貼付後、35℃で22時間培養した。コロニーの所見より大腸菌でないことが疑われる小型の青色コロニーから菌を分離し、グラム染色、菌の性状解析、同定キットを用いた菌種同定を行った。なお、他社製の特定酵素基質寒天培地においても本研究で用いたアガートリコロールと同様の結果が得られる事を確認している。

3 結果

（1）青色小コロニーの出現率

2017年度にメンブランフィルター法による大腸菌数検査を実施した河川水772検体を調査したところ、約28%の215検体において、コロニーの7所見より大腸菌でないことが疑われる小型の青色コロニーが認められた。

（2）分離菌株の同定

上記所見を示すコロニーから15菌株を分離したところ全てグラム陽性球菌であり、グラム陰性桿菌である大腸菌ではないことが判明した。これらの菌株について同定キット（ID32 スタファアピ、SP-18）を用いて解析した結果、全ての菌株が *Staphylococcus* 属であり、環境中に常在する菌種であることがわかった（表1）。

表1 分離菌株の内訳

菌種	株数
<i>Staphylococcus cohnii</i>	5
<i>Staphylococcus warneri</i>	4
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
<i>Staphylococcus hominis</i>	1

(3) 菌増殖におけるメンブレンフィルターの影響

分離した菌株の増殖におけるメンブレンフィルターの影響を解析するために、表1のうち *S. cohnii* 2株、*S. xyloso* 1株、*S. hominis* 1株の計4菌株について、培地に直接塗抹した場合と培地に貼付したメンブレンフィルターの表面上に塗抹した場合の増殖を比較した。結果を表2に示す。大腸菌および大腸菌群の増殖についてはメンブレンフィルターの影響が無かったのに対し、分離したグラム陽性球菌については4菌株全てについて直接塗抹では増殖が見られないのに対しメンブレンフィルター上でのみ増殖が認められるという結果になった。

本現象の原因としては培地に含まれるグラム陽性球菌に対する発育阻害剤であるラウリル硫酸ナトリウムの効果がメンブレンフィルターによって軽減されている可能性があると考えられる。

表2 菌増殖におけるMFの影響*

菌種	直接塗抹	フィルター上に塗抹
大腸菌 (<i>E. coli</i>)	増殖	増殖
大腸菌群 (<i>K. oxytoca</i>)	増殖	増殖
グラム陽性球菌 (4菌株)	増殖せず	増殖

*アガートリコロール培地、35°C、22時間培養

4 まとめ

メンブレンフィルター法による公共用水域の大腸菌数検査時に見られる青色小コロニーはβ-グルクロニダーゼ陽性グラム陽性球菌であることが明らかになった。今後はメンブレンフィルターや培地の種類および培養条件を検討し、本現象を回避できる検査手法を確立する必要があると考える。

研究成果報告書（12）

研究課題名	有機フッ素化合物の環境動態及び生物蓄積に関する研究
担当	環境科学部 上席専門研究員 岩淵 勝己

【研究①】水質及び底質における新規注目化学物質の分析法及び環境モニタリングに関する共同研究

(H29年度で日韓共同研究におけるPFASsを対象としたモニタリング調査が終了となったことから、H30年度に引き続き、R1年度は実施しなかった。)

【研究②】パッシブサンプラーを用いた河川中の有機フッ素化合物の測定及び環境動態に関する研究

1 目的

パッシブサンプラー (POCIS) により環境水中のPFASsの中長期的な平均濃度を測定し、サンプラーへの蓄積量から底質あるいはメダカへの蓄積量を把握できる技術として確立すること。

2 方法

昨年度までの基礎研究で蓄積してきたノウハウとデータをもとに、POCISの環境水への適用性を検討した。

【ターゲット物質】PFAS15種類 (カルボン酸系 (PFCA) 10種 : CXA (Xは炭素数)、スルホン酸系 (PFSA) 5種 : CXSと表記)。

【試験方法】昨年度までの基礎研究で検討した条件でPOCISを作成し、2019年9月にフィールド試験を実施した。一定の流量のある環境水中 (下水処理施設からの放流水の水路) に、POCIS



Fig. 1 POCISを取り付けたサンプリング用のかご

3個 (n=3とするため) を取り付けたかご (Fig. 1) を設置し、一定時間 (1、4、8、15日間) 放置した。回収時に水温を測定し、同時に採水も行った。回収後、かごからPOCISを取り出し、SPに吸着したPFAS量及び環境水中のPFAS濃度を測定して見かけの吸着速度定数であるサンプリングレート (R_s) を算出した。本研究で算出した R_s と、昨年度までの基礎研究のラボ試験から算出していた R_s を比較し、相同性等を確認した。

3 結果と考察

この実験からは、C5A-C11A、C6S、C8Sの R_s を確認することができた。このほかのPFASは、POCISから検出されなかった。また、C13A、C14A、C7S、C10Sについては、環境水からも検出されなかった。C5Aは、4日目以降はほとんどPOCISからの検出量に変化せず、飽和していると考えられた。そのほかのPFAS (C6A-C11A、C6S、C8S) は、15日目まで増加し続けており、飽和はしていなかったと考えられた。 M_d/C_w と t の散布図を作成し、最も決定係数の高い直線を示した区間を確認したところ、C5A、C6Aは4日目まで、C7A-C11A、C6Sは15日目まで、C8Sは8日目までの区間であった。得られた R_s は Table 1 のとおり。ラボ試験とフィールド試験のデータを比較したところ、C8AとC6Sではほぼ一致していた。そのほかのPFASでは若干誤差があり、特にC5AとC8Sは、ラボ試験の値とかけ離れており、この条件のPOCISではフィールドにおける捕捉が困難と考えられた。誤差及び捕捉が困難なPFASがあるのは、環境水中のマトリクス量の種類、SPへの吸着と脱離 (速度定数) の差などが考えられる。各PFASで、さらに至適条件を検討する必要がある。

Table 1 ラボ試験とフィールド試験から得られた R_s の比較

		Laboratory test	Field test	Field/Lab. ratio	R ² (Field test)
PFCA	C5A	0.131	0.245	1.87	0.99
	C6A	0.162	0.234	1.44	0.94
	C7A	0.166	0.112	0.67	0.91
	C8A	0.137	0.143	1.04	0.95
	C9A	0.145	0.189	1.30	0.96
	C10A	0.109	0.126	1.16	0.91
	C11A	-	0.085	-	0.92
	C12A	-	-	-	-
	C13A	-	-	-	-
	C14A	-	-	-	-
PFSA	C4S	-	-	-	-
	C6S	0.163	0.165	1.01	0.97
	C7S	-	-	-	-
	C8S	0.076	0.147	1.93	0.97
	C10S	-	-	-	-

【研究③】下水処理場における生活由来化学物質の発生原単位の把握とその低減化技術に関する研究～有機フッ素化合物に着目して～

1 目的

下水処理場（STP）を対象とし、流入水の PFAS 濃度から発生原単位を、放流水の PFAS 濃度から排出原単位を把握する。また、下水処理工程における季節毎の除去率についても検討する。

2 方法

対象の STP として、全国から処理人口 20 万人以上の STP 8 か所（A～H 処理場）を選定した。2017 年 7 月～2018 年 5 月にかけて季節毎に 4 回採水し、流入水及び放流水の 24 時間コンポジットを調製し試料水とした。試料水をコンセントレーターで固相カートリッジ（Waters Oasis WAX Plus）に濃縮し、アンモニア含有メタノールで抽出後、濃縮、遠心分離し、上清を LC-MS/MS で測定した。分析対象は、研究②と同様、PFAS15 種類。

3 結果と考察

昨年度に報告していたデータにさらに新しい測定データを加え、季節毎のデータとしても整理し、再集計を行った。各 STP から検出された流入水及び放流水の PFASs 濃度は Table 1 のとおりである。各 STP の流入水を確認したところ、D 処理場では 4 種（C5A、C13A、C6S、C7S）、E 処理場では 1 種（C4S）、F 処理場では 2 種（C5A、C6S）、G 処理場では 12 種（全ての PFCA、C8S、C10S）が有意（5%）に高濃度であった。同様に、放流水では、A 処理場では 4 種（C12A、C13A、C14A、C10S）、D 処理場で

Table 1 流入水、放流水の PFASs 濃度 (ng/L)

		Influent								mean±SD	Effluent								mean±SD
		A	B	C	D	E	F	G	H		A	B	C	D	E	F	G	H	
PFCA	C5A	1.9	1.2	1.3	5.8	4.0	5.9	6.3	2.1	3.6±2.2	2.8	1.8	1.3	6.5	4.8	6.4	16	2.2	5.2±4.8
	C6A	2.7	2.0	1.7	12	5.2	9.6	29	3.2	8.2±9.2	4.3	4.1	2.3	14.4	8.7	11	42	4.3	11±13
	C7A	1.4	1.0	1.3	5.2	3.4	3.8	9.2	1.7	3.4±2.8	1.2	1.5	0.89	5.1	3.8	3.8	29	1.6	5.8±9.4
	C8A	2.9	1.6	2.2	8.4	5.2	8.6	35	3.4	8.5±11	4.7	2.7	3.3	10	7.7	9.8	53	4.4	12±17
	C9A	4.3	3.8	4.7	16	8.1	4.5	38	7.0	11±12	6.6	3.3	5.0	22	9.1	8.1	640	7.0	88±220
	C10A	0.86	0.30	0.13	1.1	1.0	0.47	2.2	0.81	0.85±0.64	1.9	0.6	0.61	1.2	0.85	1.1	9.1	0.59	2.0±2.9
	C11A	0.76	0.57	0.85	2.7	1.0	0.70	7.2	1.0	1.8±2.2	1.0	0.27	0.44	1.7	0.39	0.41	82	0.34	11±29
	C12A	0.18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.15	0.35	n.d.	0.085±0.13	0.20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.051	n.d.	0.031±0.071
	C13A	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	n.d.	n.d.	0.093	n.d.	0.029±0.056	0.069	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.010±0.024
	C14A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.067	n.d.	0.0083±0.024	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0049±0.014
ΣPFCA	15	11	12	52	28	34	130	19	37±39	23	14	14	61	35	40	870	21	130±300	
PFSA	C4S	2.6	1.0	4.4	4.8	5.9	4.0	3.3	2.3	3.5±1.6	0.47	0.53	0.82	3.6	2.7	3.6	6.5	1.0	2.4±2.1
	C6S	n.d.	1.4	0.75	24	3.9	26	8.3	3.1	8.3±10	0.26	1.1	0.89	18	3.6	21	21	2.5	8.5±9.5
	C7S	0.75	0.93	0.52	4.9	0.84	1.6	1.2	0.43	1.4±1.5	n.d.	0.076	n.d.	1.9	0.24	0.69	2.7	0.20	0.73±1.0
	C8S	3.7	8.5	3.9	76	10	23	330	9.8	58±110	6.4	6.2	3.1	60	10	22	470	9.0	73±160
	C10S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.16	n.d.	0.021±0.058	0.060	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.01±0.023
	ΣPFSA	7.1	12	9.6	110	21	54	340	16	71±110	7.2	7.8	4.8	84	17	47	500	13	85±170
ΣPFAS	22	22	22	160	49	88	470	35	110±150	30	22	19	150	52	87	1400	33	220±460	

n.d. : 検出下限値未満

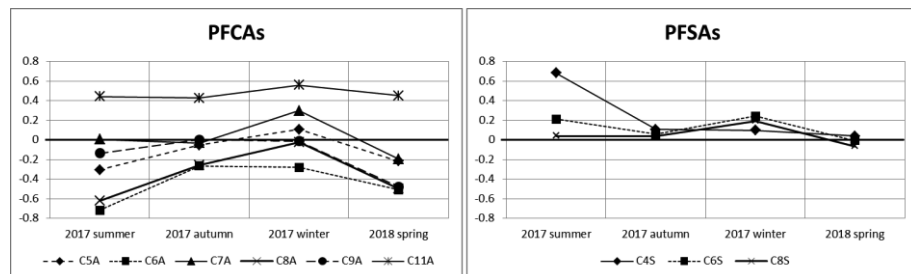


Fig. 2 下水処理工程における PFAS 除去率

は 2 種（C4S、C8S）、F 処理場では 1 種（C4S）、G 処理場では 12 種（C5～11A、全ての PFSA）が有意（5%）に高濃度であった。季節毎の除去率を確認したところ（Fig. 2）、PFCAs は、春から夏にかけて除去率が低くなり、秋から冬にかけては高くなる傾向が見られた。除去率がマイナスになるということは、処理工程で増加していることを示しており、これは先行研究と同様の結果であった。増加している原因としては、PFCAs 前駆物質の化学的及び生物学的分解、酸化などによる PFCAs 生成、下水処理中の active sludge などの particulate matter からの脱離などが考えられる。PFSA は、すべてのシーズンでほぼ除去率が 0 からプラスと計算された。C4S の除去率が夏季に約 70% であったほかは、季節的な変動は小さかった。これは、年間を通じて前駆体からの生成と処理工程における除去が拮抗しているか、又は生成も除去もされていないと考えられる。流入水の PFASs 濃度、各 STP の流入水量、処理人口から発生原単位を、放流水の PFASs 濃度、各 STP の放水量、処理人口から排出原単位を求めたところ、年間平均の発生原単位は PFCAs 合計で 10 mg/day/1,000capita、PFSA s 合計で 7.9 mg/day/1,000capita、排出原単位は PFCAs 合計で 12 mg/day/1,000capita、PFSA s 合計で 6.3 mg/day/1,000capita と算出された。

研究成果報告書（13）

研究課題名	PPCPs (Pharmaceutical and Personal Care Products) 等化学物質実態調査
担当	環境科学部 上席専門研究員 伊藤 朋子、技師 浅沼 英明

1 目的

PPCPs について、LC/MS/MS 等を活用した測定法を開発し、本県の河川・海域等の水質濃度を測定することで、環境汚染状況を把握しようとするものである。令和2年度は、環境省化学物質環境実態調査で本県が開発した分析法を活用し、水質中のチアベンダゾール (TBZ)、ピリメタニル (Py)、アゾキシストロビン (Az) (いずれも防かび剤) 及び(Z)-アゾキシストロビン (Azの光分解物) の河川水中濃度測定を実施した。また、高病原性鳥インフルエンザ発生時の防疫措置に関連し、環境への影響を把握することとなっている陽イオン界面活性剤 (CS) について、測定感度等について JIS を改良した測定法で、県内河川中の実態調査をそれぞれ実施したので、その結果について報告する。

2 分析方法の概要と測定結果

2-1 TBZ、Py、Az 及び z-Az の県内河川中実態調査

2-1-1 分析方法

水質試料は固相抽出による濃縮と、LC/MS/MS (ESI Positive) により測定を行った。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) を表 1-1 に、分析法のフローを図 1-1 に示す。

表 2-1-1 各物質の IDL,MDL 及び MQL

物質名	IDL ($\mu\text{g/L}$)	MDL ($\mu\text{g/L}$)	MQL ($\mu\text{g/L}$)
TBZ	0.00031	0.00040	0.0010
Py	0.00055	0.00017	0.00044
Az	0.00021	0.00075	0.0019
z-AZ	0.00019	0.00031	0.00080

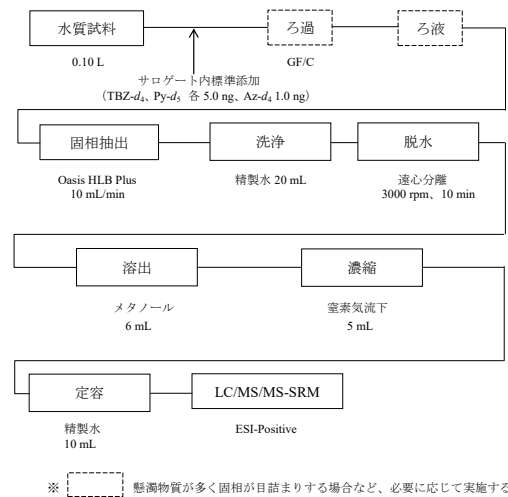


図 2-1-1 分析法のフロー

2-1-2 環境試料の測定結果

県内8地点で6月中旬に河川水を採水し、2-1-1の方法で測定を行った。採水地点を図1-3、測定結果を表1-2、に示す。各物質とも全地点MQL未満となったが、川原田橋ではAzがMDLを超えて検出された。Azは農薬(殺菌剤)として芝生へ使用されるが、検出地点の上流では、芝生の公園やゴルフ場が位置しており、これらが発生源となっている可能性がある。なお、Azの検出濃度は、甲殻類の48hr-LC50 (71 $\mu\text{g/L}$) から算出された要求検出下限値 0.01 $\mu\text{g/L}$ を十分下回る値であった。

表 2-1-2 県内河川水の測定結果 (単位: $\mu\text{g/L}$)

採水地点	TBZ	Py	Az	z-Az
丹藤橋	<0.00040	<0.00017	<0.00075	<0.00031
沼田橋	<0.00040	<0.00017	<0.00075	<0.00031
乙部橋	<0.00040	<0.00017	<0.00075	<0.00031
新岳南橋	<0.00040	<0.00017	<0.00075	<0.00031
桜橋	<0.00040	<0.00017	<0.00075	<0.00031
落合橋	<0.00040	<0.00017	<0.00075	<0.00031
川原田橋	<0.00040	<0.00017	0.0012	<0.00031
青竹橋	<0.00040	<0.00017	<0.00075	<0.00031

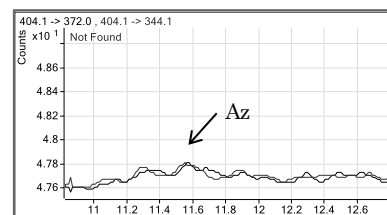
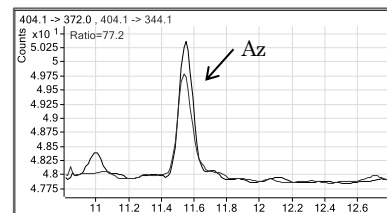


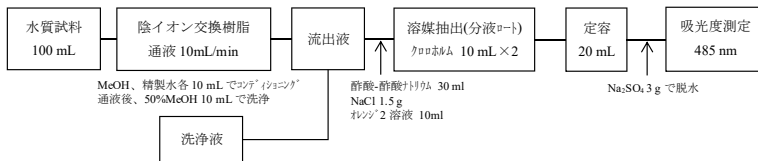
図 2-1-2 環境試料のクロマトグラム (図上: 川原田橋、図下: 丹藤橋)

2-2 陽イオン界面活性剤（CS）の県内河川中実態調査

2-2-1 分析方法の追加検討

JIS K 0102 1998 年度版付属書（参考）補足（オレンジⅡ吸光度法）は、定量範囲が0.2～3.5mg/Lであり、環境測定を行うために、さらに低濃度を測定できるよう改良が必要であるとされている。このことから、昨年度 JIS 法を改良し、10 倍程度の感度向上を達成した。JIS 法と改良法の分析フローを図 2-2-1 に示す。改良法では、クロロホルムによる液々抽出を JIS 法よりスケールダウンし、プラスチックチューブで操作するように変更しているが、検討の際に、溶媒抽出時の NaCl 添加量や、メタノールの残存量により測定結果が影響を受けることが判明した。このことから、今年度はこの 2 点についてさらに検討を加え、より安定した測定方法となるように最適化を図ることとした。

JIS K 0102 1998 年度版付属書（参考）補足（オレンジⅡ吸光度法）



JIS 改良法

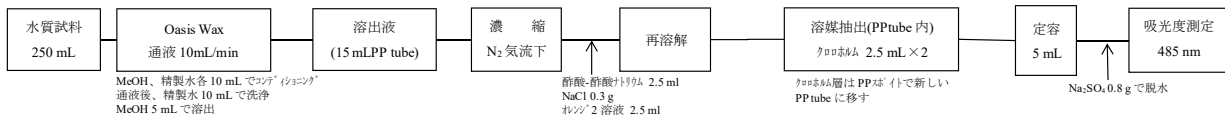


図 2-2-1 分析法のフロー

① 溶媒抽出時の NaCl 添加量による回収率の確認

改良法では JIS 参考法の溶媒抽出部分を大幅にスケールダウンして行うため、NaCl の添加量を変え、回収率が最も良くなる量を検討した。なお、JIS 法では塩化ベンザルコニウム（EB）を標準物質として使用しているが、岩手県の高病原性鳥インフルエンザ発生時の防疫には、パコマが使用されるため、この 2 物質について検討を行った。結果を図 2-2-2 に示す。検討の結果、EB、パコマともに NaCl を 0.3 g 添加することで、回収率が 90%以上となることが確認された。

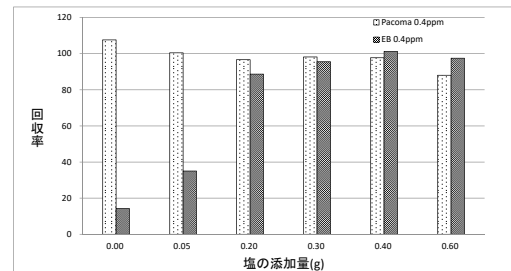


図 2-2-2 塩の添加量による回収率

② N₂ パージ後のメタノール残存量による吸光度の増感効果の確認

JIS 参考法ではメタノールの残存量は測定結果に影響しないと記載されているが、今回の検討結果では、陽イオン界面活性剤が低濃度である場合、メタノールが残存していると吸光度に増感効果が確認され、その影響が無視できないことが判明した。固相抽出の際、Oasis WAX からメタノールで溶出するため、窒素パージによりメタノールを除去することが必要であった。

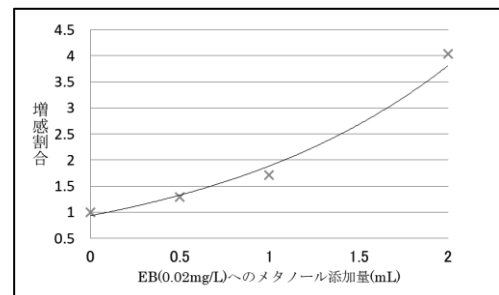


図 2-2-3 MeOH の残存量による増感効果

2-2-1 JIS 改良法による河川水中の陽イオン界面活性剤の測定結果

検討した改良法により、県内 6 地点の河川中の陽イオン界面活性剤を測定した。測定地点は、畜産統計並びに航空写真等を活用し、鶏舎が集中して設置されている県北地区と県南地区の河川で、上流に鶏舎が位置している地点から選定し令和 2 年 2 月に採水を実施した。今回の測定結果では、全ての地点が定量下限値 (0.02 mg/L) 未満であった。

表 2-2-1 陽イオン界面活性剤の河川水中濃度

採水地点	陽イオン界面活性剤 (mg/L)
岩谷橋	<0.02
大向橋	<0.02
報国橋	<0.02
七曲橋	<0.02
川原田橋	<0.02
館山橋下流	<0.02

研究成果報告書（14）

研究課題名	重要な絶滅危惧植物を存続させるための技術開発に関する研究
担 当	地球科学部 上席専門研究員 小山田智彰
<p>1 目的</p> <p>絶滅の危険性が極めて高い植物、特に「絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律（「種の保存法」）」の指定を受けている絶滅危惧植物を対象に、自生個体を存続させるための手法と苗生産を行うための技術の開発を行う。また、国や他機関からの絶滅危惧植物の保全に対する要請や指導依頼に対応し、研究によって培われた技術により、継続した国内屈指の技術支援実績を積み重ねて行き、希少野生植物の保護に資する。</p> <p>【研究の対象とした絶滅危惧植物】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・岩手県に自生する「種の保存法」指定植物：アツモリソウ【研究分類①】 ・国から要請を受けた「種の保存法」指定植物：チョウセンキバナアツモリソウ【研究分類②】 <p>2 実施内容</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 自生地調査及び周辺環境の状況確認、保護対策への取り組み、先進地の活動状況についての調査を行う。 (2) 種を存続させるための科学的な技術開発とその活用評価を行う。 (3) 国、県、市町村等の依頼に対応した技術指導を行う。（地域資源の活用等を含む） <p>3 成果</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) アツモリソウの自生地調査と保護措置を取りまとめて全国環境研協議会に報文を投稿した。（表1、図1） (2) チョウセンキバナアツモリソウは、種子の発芽および育苗試験を進め、この取り組みが同省ホームページに掲載された（http://www.env.go.jp/nature/kisho/hogozoushoku/chosenkibanaatsumoriso.html）。また、自生地の土壌分析結果を取りまとめて自然環境復元学会全国大会で発表した（国内初例）。（表1、図2） (3) 「東日本大震災」以降から継続している岩手県沿岸地域の希少植物調査について、沿岸全域を対象に行った。「いわてレッドデータブック」掲載種の中で自生地が限定されている希少植物の現状調査を実施した。 (4) 花巻市大迫町商工会より依頼されたハヤチネウスユキソウとアツモリソウの花酵母培養に成功した。この花酵母を利用した地域ブランド品の開発が同町老舗菓子店によって進められている。 <p>4 今後の取り組み</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 自生地の保全に有効な技術開発を進め、実証試験による効果の確認を行う。 (2) 「種の保存法」指定植物の生息域外保全に有効な手法を開発する。 (3) 国や地方公共団体等からの希少野生植物の保護に対する依頼に応じて技術支援を行う。 (4) 地域資源の活用に関する技術開発を進め、地域に成果を還元する。 (5) 研究成果の各種発表を進める。 	

表 1 主な発表業績(令和元年度)

No.	主催団体	掲載書誌名刊号頁	発表年月日	カテゴリー	タイトル名	発表者
①	日本調理科学学会	●日本調理科学会東北・北海道支部例会講演会 (50頁)	2019/6/15	講演	南部一郎かぼちゃの開発をはじめとする育種と植物の活用	小山田智彰
②	東京山草会	●やまくさ69	2019/9/1	報文	アツモリソウ花酵母の増殖	小山田智章・千葉文也・佐藤香菜
③	全国環境研協議会	●全国環境研会誌第44巻第3号 (通巻152号)	2019/9/25	報文	岩手県におけるアツモリソウの現状と保全	小山田智彰
④	自然環境復元学会	●第20回自然環境復元学会研究発表会要旨	2020/2/14	口頭発表	チョウセンキバナアツモリソウの自生地と栽培地の土壌分析	小山田智彰・鞍懸重和
⑤	薬用植物栽培研究会	●薬用植物研究42(1)	2020年6月掲載	審査中	胚培養による宇宙リンゴ“ふじ”の苗生産	小山田智彰・鞍懸重和・佐藤晋也・越谷善樹・佐藤雄大



図 1 自動撮影カメラで撮影したニホンジカ（アツモリソウ野生株の保護措置）
 〈全国環境研会誌 Vol.44 No.3 (2019) 写真2より〉

チョウセンキバナアツモリソウ自生地の分析結果

分析項目	上の群集	下の群集	自生地内	自生地外	崩壊地	養分地
	開花あり	開花なし	草地	裸地	裸地	オオバクロモジ・ミズナラ群集
アンモニア態窒素 (mg/100g)	1.5	1.5	0.8	1.2	2.3	3.3
硝態態窒素 (mg/100g)	1.2	1.0	2.2	4.1	1.8	3.2
可給態リン酸 (mg/100g)	1.7	2.2	3.3	1.2	8.3	4.4
交換性カリウム (mg/100g)	46.7	37.7	37.0	38.0	132.0	24.0
交換性カルシウム (mg/100g)	143.0	95.0	75.0	455.0	583.0	64.0
交換性マグネシウム (mg/100g)	46.3	50.0	63.0	82.0	125.0	6.0
可給態鉄 (ppm)	39.0	21.3	21.0	12.0	7.0	68.0
交換性マンガン (ppm)	11.0	6.3	4.0	7.0	3.0	3.0
塩分 (%)	0.014	0.046	0.042	0.006	0.015	0.010
pH	5.77	5.86	5.81	5.62	6.94	4.22
EC (μS/cm)	4.3	8.7	3	34	7	53

14

図 2 チョウセンキバナアツモリソウ自生地の土壌分析
 〈自然環境復元学会全国大会 発表スライドより〉

研究成果報告書（15）

研究課題名	イヌワシの生息数維持に向けた保全生態学的研究
担 当	地球科学部 上席専門研究員 前田 琢
<p>1 目的</p> <p>岩手県は国内有数のイヌワシ生息地であり、これまでに 35 つがいが確認されてきた。しかし、2002 年以降、消失するつがいが現れるようになり、その数は 2019 年には 7 つがいにまで増えている。つがい数が減少傾向にある背景には、長年続く繁殖成功率の低迷による若齢個体の個体数縮小があると推測される。イヌワシの生息数を今後安定的に維持していくためには、繁殖率の向上に資する保全方法を明らかにすることが重要となる。</p> <p>当センターのこれまでの研究によって、岩手県内のイヌワシの生息状況や生態的特性に関する詳しい知見が集められてきたが、個体の移動分散、遺伝的特性、生存率など、今後の生息動向を予測するうえで必要となる事項には、未解明な点も少なくない。また、つがいごとに大きく異なる繁殖成績や営巣場所の選択についても、標高、地形や土地利用、植生、気象要因等を考慮した多角的な分析を行なう必要がある。本研究では、このような課題に取り組むことを通じて、岩手県のイヌワシの生息数を維持していくために必要な保全手法を明らかにし、提言を行なうことを目的とする。</p> <p>31 年度（2019 年）に調査研究を行なった主な項目は以下のとおりである： ①県内に生息するつがいの動向および繁殖状況の調査、②個体識別による移動分散調査、③羽根等を利用した遺伝子解析（京都大学野生動物研究センターとの共同研究）、④営巣地の周辺環境の特性を用いた繁殖成績の分析。</p> <p>2 方法</p> <p>① 県内で確認されている全つがいを対象に、繁殖期全般にわたる行動、巣の状態、ひなの生育状況等を調査し、繁殖経過を明らかにした。また、これまでに生息が確認されていない地域で、新たなつがいや営巣地を発見するための探索調査を実施した。調査したつがいは可能な限り個体識別を行ない、個体の入れ替わり等も明らかにした。</p> <p>② 県内外で観察されたイヌワシを写真撮影するとともに、各地の観察者が撮影した個体の映像も収集、整理し、特徴の比較を行なった。そして、同一個体を判別することにより、個体の移動分散の状況を明らかにした。</p> <p>③ イヌワシの巣の周辺や採餌場所から、脱落した羽根、ペレット、卵殻、糞といった試料を採集するとともに、剥製標本や飼育個体などからも試料を収集した。得られた試料から DNA を抽出し、核 DNA のマイクロサテライトおよびミトコンドリア DNA のコントロール領域（CR）や擬似コントロール領域（ΨCR）等について、多様性やハプロタイプの解析を行なった。マイクロサテライトの分析にあたっては、既存のマーカーに加え、独自に開発したイヌワシ専用のマーカーも用いた。</p> <p>④ 北上高地で 2002 年以降使用が確認されている 78 巣について、JAXA 衛星写真判別データや国土数値情報を利用して、巣の周辺の環境条件（標高、傾斜、土地利用、植生など）を集計し、繁殖成績（2002～18 年）との関係を一般化線形モデルにより分析した。環境条件は 1～10km 四方スケールで段階的に計測し、スケールの違いによる結果の違いも検討した。</p> <p>3 結果</p> <p>① 2019 年には県全体で 27 つがいの生息が確認され、このうち 13 つがいで抱卵、9 つがいで育雛、2 つがいでひなの巣立ちが観察された。繁殖成功率は 7.4%であり、直近 10 年間の平均である 16%を大きく下回る結果となった。繁殖失敗の直接的原因が明らかにできた例は少ないが、巣に侵入したツキノワグマにひなが捕食された事例</p>	

が監視カメラの映像によって明らかになった。過去にも同様の事例が複数確認されていることから、クマによる繁殖阻害は看過できない問題となってきた。2019年に新たなつがいの発見はなかったが、既存つがいにおいて3巣の利用が新たに確認された。

② 同一個体であることが確認できた映像が新たに数組得られ、岩泉町に生息するつがいの雄成鳥が、約21キロ離れた宮古市の別つがいのなわばり内で確認された例や、岩泉町でつがいを形成していた雌の若鳥が、約33キロ離れた葛巻町の既存の個体と繁殖期の一時期、一緒に行動し、また岩泉町に戻った事例など、これまで知られていなかったつがい間の関係を示す興味深い知見を得ることができた。また、秋田県内における個体の移動事例も初めて明らかになった。

③ 新たに開発された11種のイヌワシ用遺伝子マーカーの精度を検討した結果、既存16マーカーと同程度の遺伝的多様性の検出が確認されたほか、2個体が偶然同じ遺伝子型を持つ確率を計算したところ十分に低い値となり、個体識別に関しても正確に行なえることが示唆された。

④ 標高、傾斜、土地利用、植生などに関する15要因のうちから、互いに相関の高い要因を除いた約10要因を説明変数とし、繁殖成績を目的変数とした一般化線形モデルを作成した結果、主に平均標高、最小傾斜、農地面積、草地面積などがモデルに取り込まれた(変数増減法による)。巣の形態(岩棚・樹上)は繁殖成績にあまり関与していなかった。また、モデルのAICは、1kmスケールや5kmスケールで大きくなる傾向がみられ、それより広域スケールでは顕著な向上はみられなかった。

⑤ イヌワシの保全を効果的に進めるためには、生態学的知見のみならず、遺伝学、獣医学、生息地管理、域外保全(飼育個体の利用)といったさまざまな分野の研究を統合し、学際的なアプローチを行なうことが重要であることから、これら各分野で構成される専門家グループと共同で、長期的な保全に応用するための学術的情報や技術を整理、議論した総説論文を作成した。

4 今後の研究方向等

(1) 各営巣地における繁殖状況の把握や失敗原因の解明を進めるとともに、未確認つがいや消失つがいが示唆される地域を中心に、引き続き情報収集や探索調査を行なう。

(2) 繁殖成績に関するモデル解析において、これまでに用いた環境要因に加えて、衛星写真から抽出したイヌワシの好適採餌環境を定量化して用い、モデルの精度が向上するか検討する。また、個体の入れ替わりなど、各つがいの個別の条件がモデルの精度に関与していないか精査を行なう。

(3) 個体の映像の収集を進めて識別事例を増やし、より広範囲な移動分散の実態やつがい関係の知見を拡充する。

(4) 新規DNAマーカーを用いて、同一個体や血縁関係が分かっているサンプル間で類似性を確認し、個体識別や近親度の解析を進める。また、個体の適応能力などを示す機能遺伝子の活用についても検討する。

研究課題名	ツキノワグマの個体群動態と将来予測手法の開発ならびに人里への出没メカニズムの解明
担 当	地球科学部 専門研究員 鞍懸 重和

1 目的

継続したヘア・トラップ調査の結果を組み入れた、岩手版の個体群動態モデルと将来予測モデルを開発する。また、ツキノワグマ（以下、クマ）にGPS テレメトリー首輪を装着して詳細な行動圏を把握し、大量出没年時の行動圏の変化や個体数密度の変化等を観測してクマの人里への出没要因を検討する。

特に、今年度（2019年）は大量出没年であったため、非大量出没年であった2017年と2018年のクマの行動圏と比較し、大量出没年時のクマの行動圏の傾向について言及した。

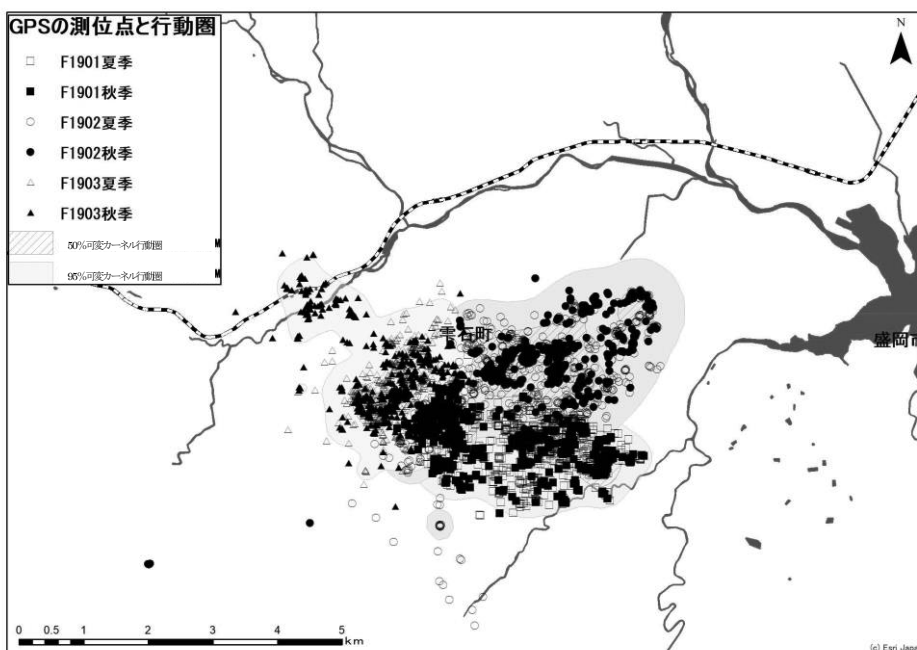
2 方法

岩手大学御明神演習林内に4基のドラム缶ワナを5月中旬に設置した。各ドラム缶ワナの周囲に遠隔監視装置1機を設置した（ISE社製、ほかぽと）。エサはハチミツを利用し交換は週に2回行った。捕獲が確認された場合は、麻酔により不動化し、各部形態を測定した後、体毛60本、血液20cc及び歯1本を採取し、GPS テレメトリー首輪（Followit社製TellusGPS）を装着して放獣した。GPS テレメトリーの測位間隔は、5～8月は1時間に1点、9～11月は2時間に1点、12月～4月は24時間に1点とした。捕獲した個体から得られた6月から11月までの2時間おきの測位点を用い、可変カーネル法により50%行動圏及び95%行動圏を算出した。

なお、行動圏の算出にあたっては、捕獲が個体の行動に与える影響を考慮して、放獣より7日後のデータを用い、また、測位誤差に考慮し測位精度が3Dのデータを用いた。

3 結果・考察

2019年はメス3個体、オス2個体の計5個体が捕獲された。捕獲日及び捕獲個体の性齢を以下に示す。



捕獲日及び性齢は、6月18日捕獲個体（F1901）が推定年齢3才メス、6月19日捕獲個体（M1901）が推定年齢1.5才オス、6月28日捕獲個体（F1902）が推定年齢3～4才メス、7月5日捕獲個体（M1801）が推定年齢4～5才オス、7月6日捕獲個体（F1903）が推定年齢1.5才メスであった。

図1 メス3個体のGPSの測位点と行動圏

次に、2019年7月以前から11月までGPSテレメトリーで位置を測位できた捕獲個体の行動圏面積を以下に示す。

7月以前に捕獲されたメス3個体の50%及び95%行動圏面積は、F1901で1.8 km²と6.3 km²、F1902で2.5 km²と10.1 km²、F1903で1.0 km²と6.0 km²であった(図1)。

2019年7月以前に捕獲されたオス3個体の50%及び95%行動圏面積は、M1901で0.9 km²と4.9 km²、M1801で27.6 km²と166.9 km²、M1803で7.8 km²と37.1 km²であった(図2)。

なお、M1803は2018年10月に捕獲されたが、越冬後、2019年11月までGPSで測位できたため行動圏面積を算出した。

非大量出没年であった2017、2018年のオス、メスの可変カーネル95%行動圏の平均面積は、メスで114.3 km²(n=5)、オスで544.1 km²(n=2)であった。一方、大量出没年にあたる2019年では、メスで7.5 km²(n=3)、オスで69.6 km²(n=3)であった。また2018年、2019年両年で通年行動圏を算出できたM1801の行動圏は、2018年で422.3 km²、2019年で166.9 km²であった。

非大量出没年と大量出没年の行動圏の平均面積を比較すると、メス、オス両性においても、大量出没年時には行動圏の平均面積が8割以上減少し、両年観測できたM1801の行動圏も6割以上減少した。両年算出できた個体は1個体であり、捕獲した個体の差も考えられるが、2018年の10月に捕獲したM1803は、放獣後10日程で捕獲地点から20km以上南下した地点に定着しており、2019年の通年の行動圏よりも大きく移動しており、行動圏面積は減少した可能性が考えられる。またメスについては、先行研究で推定されているメスの年間行動圏面積20~50 km²(大井・山崎2007)と比較しても、3個体とも狭く、個体差だけからくるものとも考えにくい。

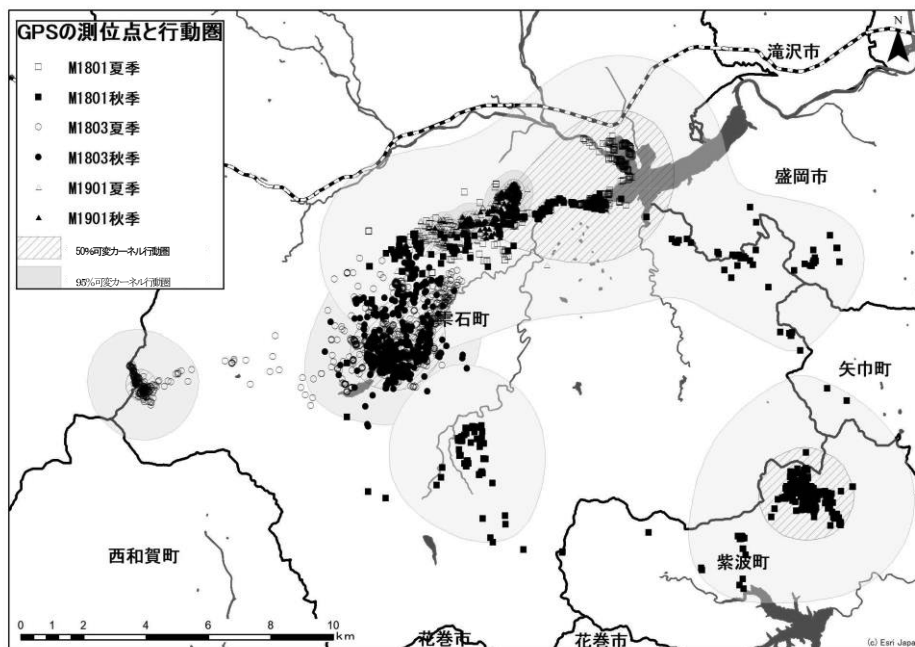


図2 オス3個体のGPSの測位点と行動圏

これらのことから、本研究においては、行動圏面積を算出できた個体数は少ないものの、非大量出没年と比較し大量出没年では行動圏が狭くなる傾向が考えられた。

今後は、2020年度に予定しているクマの行動圏調査のデータを追加するとともに、選択環境特性や痕跡調査結果の傾向等、大量出没年と非大量出没年でのクマの行動の変化に着目し解析を進める。

研究成果報告書（17）

研究課題名	五葉山地域に生息するニホンジカの個体数推定
担 当	地球科学部 専門研究員 鞍懸重和

1 目的

岩手県では、ニホンジカに対する様々なモニタリング調査を実施して保護管理計画を運用してきた。しかし急激な分布の拡大、里周辺に生息するニホンジカの個体の増加など、従来までの個体数推定法では正確な生息状況並びに将来予測が不可能になっている。そこで本研究では個々の事業で蓄積されたデータを用いて、ヘリコプター調査に代わる五葉山地域の個体数推定法を確立することを目的とした。

2 方法

個体数推定の対象範囲は、五葉山の頂上を含んだ5kmメッシュを中心とした、周辺2メッシュまでとした（以下、五葉山周辺25メッシュ地域）。個体数推定に用いたデータは、推定範囲内の2005～2018年の捕獲数、2005年～2018年の糞塊密度及び2005、7、9、11年の追出し調査で推定された個体数密度とした。

個体数推定は Harvest-based モデルを用い推定した。個体数の経年の変動を表す過程モデルでは Beverton-Holt モデルを用い、個体数と密度指標の関係を表す観測モデルでは、糞塊密度及び追出し調査による個体数密度を密度指標とした、混合ポワソン回帰モデルを用いた。事前分布は、無情報ないしそれに準ずる事前分布を用いた。

各パラメーターの事後分布はマルコフ連鎖モンテカルロ法（MCMC 法）により計算し、各パラメーターの収束診断には Rhat を採用し、収束したかは Rhat 値が 1.1 未満であることを基準とし判定した。

3 結果・考察

各事後分布の Rhat 値はすべて 1.1 未満であり、全パラメーターについて収束したものと判定した。

五葉山周辺25メッシュ地域における推定個体数の中央値は、2012年度の24700頭（95%信用区間：20610～30450頭）をピークとし、2018年は16990頭（95%信用区間：11360～25360頭）であった（図1）。

2012年度より減少したのは、2012年度から実施された県独自の捕獲事業や、その後実施された指定管理鳥獣捕獲等事業により、五葉山周辺で捕獲圧が高まったためと思われる。

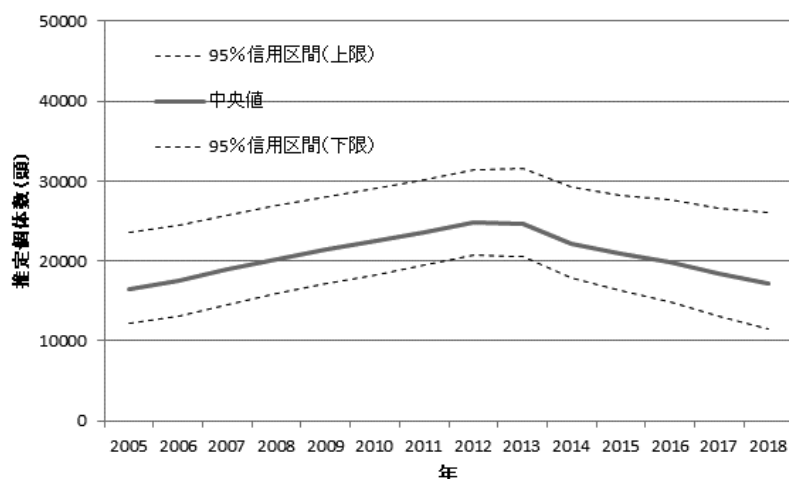


図1 五葉山周辺25メッシュ地域の推定個体数

4 今後の研究方向等

今後は推定範囲を拡大し、岩手全域の個体数の推定が可能か、また岩手県では過去にシカの歯、腎臓を収集していたことから、栄養状態と自然増加率の関係を明らかにし、個体数推定モデルに導入可能かを検討する。