

2 研究概要報告

研究成果報告書（1）

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

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish toxins, PSTs) は、フグ毒の tetrodotoxin と同様に、神経や筋肉細胞に存在する電位依存性ナトリウムイオンチャンネルを特異的に阻害する強力な神経毒である。サキントキシン (STX, Fig. 1) を代表として、ゴニオトキシン (GTX) 類 や C トキシン類など 50 種以上の類縁体が知られている¹⁾。岩手県沿岸では、毎年春から秋にかけて PSTs を産生する有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属が発生し、二枚貝などのフィルターフィーダーの餌となり、毒化させることが知られている。近年、日本近海において、貝類の高毒化や毒蓄積の長期化が問題となっているが、公定法がマウス毒性試験法であることもあり、PSTs の上昇期および減衰期における詳細な経時変化の報告は少ない。また、マウスの準備および試験実施に時間を要し、食中毒発生時に迅速な対応が出来ない問題点がある。

そこで、本研究では、平成 28 年度より LC-MS/MS を用いた分析法の検討に取り組んでいる。これまでに得られた知見は、第 16～19 号年報において報告した。今年度は、昨年度に引き続いて、麻痺性貝毒の代謝物 (M toxin) について検討したので報告する。

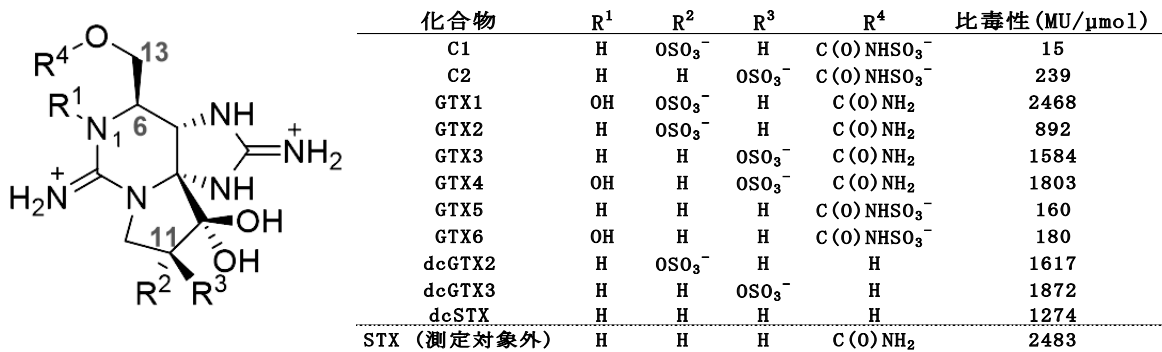


Fig.1 代表的な麻痺性貝毒成分の構造式および比毒性²⁾

(STX は、化学兵器禁止法の中で化学兵器に指定されているため、本研究では測定対象外とした。)

2 方法

2-1 実験試料

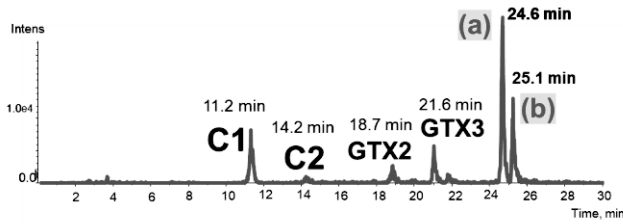
ホタテガイは、県水産技術センターが PSTs 生産渦鞭毛藻の発生する海域で養殖したものを用いた。2017 年 4 月から 2019 年 12 月までの間、一定点より採取したホタテガイより、主な毒の蓄積部位である中腸腺を切り出したものをサンプルとした。

2-2 代謝物 (M toxin) の構造解析

第 19 号年報において、ホタテガイ中に M toxin と推測される化合物群を確認したことを報告した。しかし、M toxin の標準品は、発売されていないため、定性および定量することが出来ない。

そこで、本研究では、東北大学農学研究科において、各成分の構造解析を行うこととした。まず、本研究で検出した未知ピークと先行研究とを比較し、M1 (Fig. 2, ピーク a)、M5 (ピーク b)、M3 (ピーク c) と推測した成分について単離を行った。次に、単離した成分を他の M toxin へと化学誘導することで標準品とし、ホタテガイ中の未知ピーク群の同定を行った。

(A) Detecting at m/z 396 > 316



(B) Detecting at m/z 412 > 332

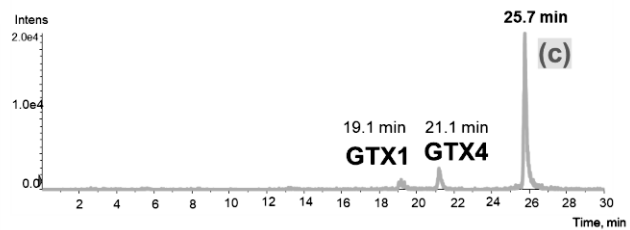


Fig. 2 県内産ホタテガイ中の麻痺性貝毒成分のLC-MS/MSクロマトグラム

3 結果

各化合物を精製し、NMRを用いて構造を解析した結果、Fig. 2のピークaおよびピークcが、既知化合物であるM1、M3であることを確認した。しかし、M5と推測したピークbの成分は、Quilliamら³⁾によって提唱³⁾されていた開環構造ではなく、ヘミアミナル型の構造を有していることが明らかになった (Fig. 3)。麻痺性貝毒の構造式は、基本骨格として6-5-5員環の3環系

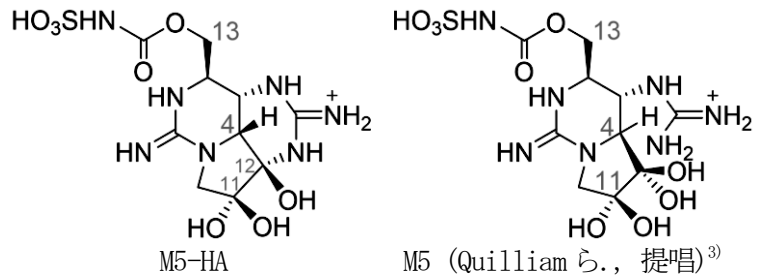


Fig. 3 M5-HA およびM5の構造式

であるが (Fig. 1)、今回確認した化合物では6-6-5員環であった。自然界の貝類に含有される麻痺性貝毒成分において、新規の構造を有しており、M5-HA (hemiaminal) と命名した⁴⁾。

また、精製で得られたM1、M3、M5-HAを用い、渡邊ら⁵⁾の方法により13位末端の脱硫酸化を行うことで、M2、M4、M6-HAを化学誘導し、標準品とした。ホタテガイ中の未知ピークと各々の標準品とを比較した結果、M2、M4、M6-HAの存在を確認した (Fig. 4)。なお、M2およびM6-HAは、zic-HILICカラムを用いて分析することで両化合物を分離させ、各々の存在を確認している⁴⁾。

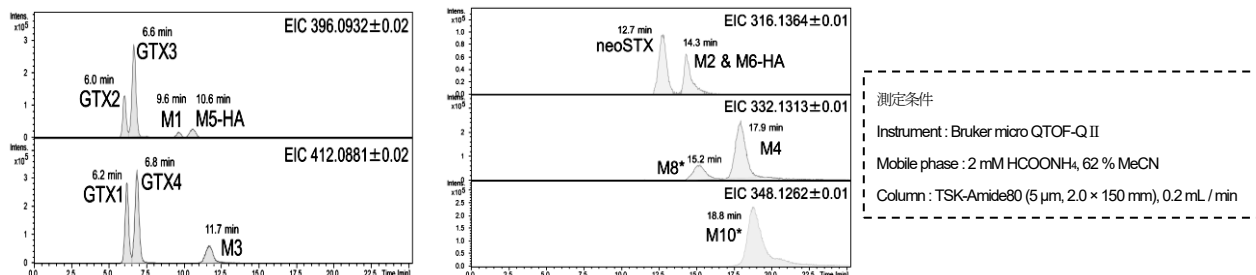


Fig. 4 県内産ホタテガイ中のM toxin (M8およびM10は、先行研究からの推測)

4 今後の研究方向

M toxinは、Quilliamら³⁾によって12種類 (M1~12) の存在が提唱されている化合物群である。しかし、日本の貝類において、M toxinに関する報告はこれまでになされておらず、新規性が非常に高いものである。本研究では、当県のホタテガイに含有するM toxinを6種類同定すると共に、M8とM10と推測される成分を検出した。

今後、本研究の成果を活用し、わが国で長期化および高毒化する貝毒の問題を解決すべく、代謝物を含めた毒成分の経時的変化データの蓄積と解析等、貝毒の減衰に関する知見を得るための取組みを継続していきたい。

5 参考文献

- 1) M. Wiese, *et al.*, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2185-2211
- 2) Y. Oshima, *et al.*, *J. AOAC* **1995**, *78*, 528-532
- 3) M. Quilliam *et al.*, *ICHA (Brazil) Proceeding*, **2017**, 118-121
- 4) S. Numano, Y. Kudo, Y. Kaga, M. Yotsu-Yamashita, *et al.*, *Chemosphere*, **2021**, *278*, 130224
- 5) R. Watanabe *et al.*, *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 466-477

※ 二枚貝からの抽出液は、「化学兵器の禁止および特定物質の規制等に関する法律」に従い、試験終了後にNaOHを用いて毒分解処理を行い、廃棄している。

研究成果報告書（2）

研究課題名	安全性審査済み遺伝子組換え大豆の LLS 遺伝子定量分析法の確立
担 当	衛生科学部 主任専門研究員 関村照吉、主査専門研究員 今野鈴子
<p>1 目的 現在、当センターで実施している安全性審査済み遺伝子組換え大豆検査は、Roundup Ready Soybean 遺伝子 (RRS 遺伝子と略) のみを対象に実施している。一方、2002 年に承認された Liberty Link Soybean 遺伝子 (LLS 遺伝子と略) 及び 2007 年に承認された Roundup Ready 2 Yield 遺伝子 (RRS2 遺伝子と略) が収穫されており、既に国内に流通していると考えられる。また、大豆の分別生産流通管理を実施しても意図せずに混入してくる遺伝子組換え大豆の混入許容値は、上記 3 つの遺伝子の合計が 5% であったものが、「遺伝子組換えでない」と表記する場合は、2023 年 4 月から含まれていないときのみ限定される¹⁾ことが決まっている。このため、それぞれの含有率を明らかにして合算する必要がある。 以上のことから、当年度は、RRS 遺伝子に加え LLS 遺伝子を定量分析できる方法を追加するため研究を実施した。</p> <p>2 方法 (1) 試料 ポジティブコントロール遺伝子 (ポジコン遺伝子と略) は、RRS 遺伝子 (シグマ社: 含有量 1% の大豆粉、ERMBF410DP) 及び LLS 遺伝子 (プラクティカル社: Bayer A2704-12 Soybean Leaf DNA 含有量 999.9ng/μg・TE 緩衝液、AOCs 0707-B) の 2 種類とした。試料として、大豆 3 種類及び遺伝子組換え大豆 (遺伝子の種類は不明) 使用のフリーズドライ納豆 (以下 FD 納豆と略)²⁾ の両遺伝子含有量を測定した。 (2) DNA 抽出用キット 検査方法³⁾ の DNeasy Plant mini kit 法 (QIAGEN 社) (3) 粉碎処理装置 試料の粗粉碎にはフードプロセッサー (パナソニック社) を、微粉碎にはミルサー (大阪ケミカル社) を用いた。 (4) DNA の抽出方法 検査方法の 1 試料あたり 3 併行で実施した。 (5) DNA 量の測定 DNA 抽出液は、分光光度計 Genespec III (日立ハイテクサイエンス社) 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/μL DNA として DNA 濃度を算出した。DNA 濃度を測定後 TE 緩衝液で 20ng/μL に希釈して PCR 検液とした。 (6) リアルタイム PCR による定量 リアルタイム PCR は ABI7900HT (サーモフィッシャー社) 及び QuantStudio 5 (アプライドジャパンシステム社) を用いて定性・定量し、相関係数が 0.990 以上を確認³⁾して結果とした。</p> <p>3 結果と考察 (1) RRS 及び LLS ポジコン遺伝子の測定結果 表 1 にそれぞれのプライマーに反応するかどうかの結果と表 2 及び表 3 にそれぞれのポジコン遺伝子を 4 回測定した結果を示した。大豆の内在遺伝子 Le1 はいずれの DNA 検液からも検出され、RRS 及び LLS 遺伝子のプライマーはそれぞれの遺伝子のみ反応し、他のプライマーには全く反応せず定性⁴⁾は明確であった。定量結果は、RRS 遺伝子は 0.880%、LLS 遺伝子は 101% と保証含有量とほぼ一致した。この方法によって定性・定量できることが確認できた。 (2) 試料の測定結果 3 種類の大豆と FD 納豆の RRS 及び LLS 遺伝子を測定した結果を表 4 に示す。大豆はアメリカ産の 1 種類から RRS 遺伝子が検出されたが定量下限以下であった。LLS 遺伝子はいずれの試料からも検出されず、FD 納豆からは Le1 遺伝子が少量検出されたが、RRS・LLS 遺伝子とも検出されなかった。 (3) 検査経費および作業時間 図 1 にリアルタイム PCR プレート作成時の器具類を示した。また、表 5 に検体数が 6 検体 (1 プレート当たり、大豆内在遺伝子 Le1 と他の 1 遺伝子の測定で 3 検体検査可能) までの、RRS 遺伝子のみの検査と LLS 遺伝子を加えた 2 遺伝子を検査する場合の経費と作業時間の増加を示した。6 検体では、RRS 遺伝子のみの検査では 2 プレートであったものが、RRS 遺伝子と LLS 遺伝子の検査では 4 プレートが必要となり、経費は 1.9 倍、検査時間は 1.4 倍に増えると試算した。</p> <p>4 今後の研究方向等 遺伝子組換え大豆の検査法には、上記の RRS 遺伝子・LLS 遺伝子の他 RRS2 遺伝子の 3 遺伝子の検査の記載があることから次年度これら 3 遺伝子の検査法⁵⁾を確立し、標準作業書を作成する予定である。</p>	

表1 RRS・LLS 遺伝子定性試験

	Le1	RRS	LLS
RRSプライマー	+	+	-
LLSプライマー	+	-	+

+:検出、 -:不検出

表2 RRS 遺伝子定量試験

RRSポジティブコントロール(1%含有)				
測定機	内標比	Le1(copy数)	RRS(copy数)	割合(%)
PRISM 7900HT	1.04	31,800	169	0.5
Quant Studio 5	0.97	10,700	86	0.8
Quant Studio 5	0.97	10,700	105	1.0
Quant Studio 5	0.97	9,540	108	1.2
			平均	0.880

表3 LLS 遺伝子定量試験

LLSポジティブコントロール(100%含有)				
測定機	内標比	Le1(copy数)	LLS(copy数)	割合(%)
PRISM 7900HT	0.98	104,000	106,000	104
Quant Studio 5	1.08	75,000	79,000	98
Quant Studio 5	1.08	73,000	81,100	103
Quant Studio 5	1.08	73,200	76,800	97
			平均	101



図1 PCR 1 プレート作成器具

表4 大豆試料の RRS・LLS 遺伝子定量結果

	Le1(copy数)	RRS(copy数)	RRS(割合:%)	Le1(copy数)	LLS(copy数)	LLS(割合:%)
国産・大豆	13,100	0	-	11,000	0	-
カナダ産・大豆	41,300	0	-	33,000	0	-
アメリカ産・大豆	40,900	2.04	定量下限以下	34,500	0	-
遺伝子組換え納豆	59.1	0	-	81.0	0	-

表5 検体数6の検査時経費・作業時間の比較

6検体までの検査	経費金額(円)	作業時間(hr)	検査日数
RRS遺伝子・プレート数2	137,747	19.4	3日間
RRS・LLS遺伝子・プレート数4	260,671	26.8	4日間
	1.89倍	1.38倍	

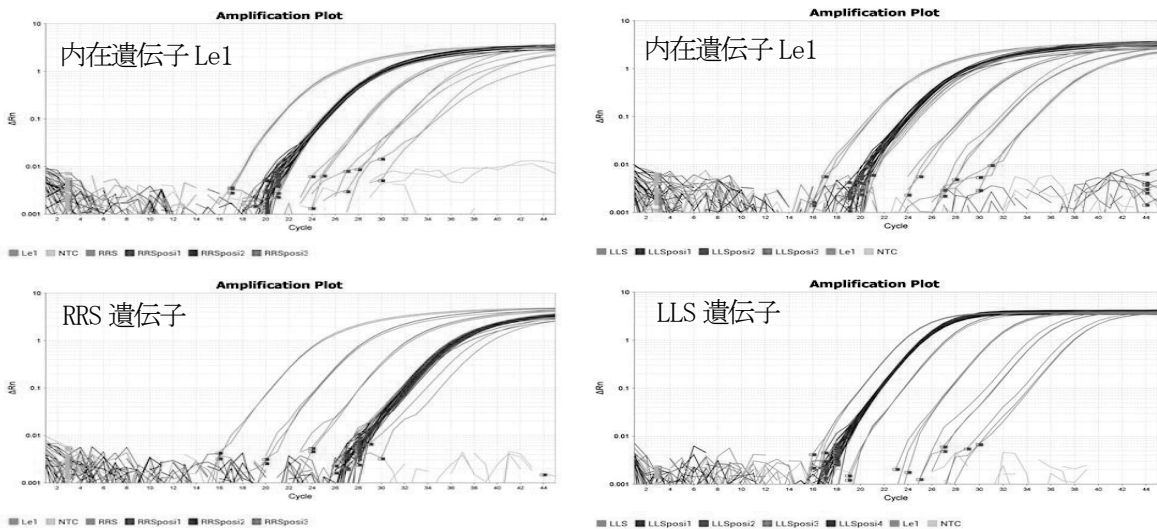


図2 RRS 及び LLS 遺伝子の PCR 増幅曲線 (黄色・緑色:標準レト遺伝子、青色・赤色:ポジコ遺伝子)

- 文献 1) 新たな遺伝子組換え表示制度に係る考え方(補足資料), 消費者庁(2019)
 2) 「納豆のススメ」日本初遺伝子組換え食品, 生物工程, **87**, 150-151(2009)
 3) 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)
 4) 高島令王奈, 遺伝子組み換えダイズ検知法の開発及び妥当性確認, 醸協誌, **108**, 156-163(2013)
 5) 中野久子ら, 遺伝子組換え検査状況, 東京健康安全研究センター報, **69**, 13-22(2018)

研究成果報告書（3）

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

1 目的

当センターでは、自然毒が原因であると疑われる食中毒が発生した場合にその原因究明に向けて試験分析を行っている。食中毒等の原因となった食材等の分析では、通常であれば標準試薬等を用い機器分析を行うことで成分を特定するが、多種多様な自然毒の中には毒成分が市販されていないものも多数存在するため、分析機器を用いた成分分析では原因物質の究明に至らないケースも発生しえる。

今般、食中毒の事例はあるものの毒成分が市販されていないキノコのうちカキシメジ（成分：ウスタル酸）について、定性分析を可能とするためのLC-MS/MS用セミ標準を作成し、食中毒発生時の原因究明項目を拡充することを目的として本研究を実施した。

なお、本研究は、高純度の成分の単離を目的とするものではなく、あくまで定性用の毒成分含有溶液を簡易な手法で作成する方法を検討するとともに、本手法を手順化することによりカキシメジを入手すれば常に定性用のセミ標準を作成できる体制を構築することを重点的に考慮した。

2 方法

(1) カキシメジ中のウスタル酸（推定）の含有確認

県内で採取したカキシメジを0.1%ギ酸含有メタノールで抽出し、0.45 μmのメンブレンフィルターを用いてろ過したものをTable 1の分析条件によりLC-MS/MS測定した。なお、LC-MS/MSの測定条件はYoshiokaら¹⁾の報告を参考として設定し、Scan及びMRM測定により得られたMSスペクトル及びクロマトグラムをYoshiokaらの報告及びItoら²⁾の報告と比較してウスタル酸を推定した。

Table 1. LC-MS/MS 分析条件

LC	機 器 : 島津製作所製 LC-20AD
	移 動 相 : A液…0.1%ギ酸 B液…アセトニトリル
	グラジエント : 0 min (10%) - 12 min (70%) - 13 min (95%) - 16 min (95%) (B液%) - 16.01 min (10%) - 22.00 min (10%)
	流 速 : 0.2 mL/min
	カ ラ ム : Waters社製 Atlantis dC18 (2.1 mm × 100 mm, 3μm)
	カラム温度 : 40°C 試料注入量 : 2μL
MS	機 器 : AB Sciex社製 Triple Quad 5500
	イオン化方式 : ESI (-)
	ionspray voltage : -4500 V ion source temp : 300°C
	測定モード : MS scan (<i>m/z</i> : 50 - 400) Product ion scan (Precursor ion <i>m/z</i> : 337.0) MRM (337.0 > 219.0, 337.0 > 117.0)

(2) ウスタル酸（推定）の分取

(1)と同様に0.1%ギ酸含有メタノールで抽出した試験液を減圧濃縮したのち、0.1%ギ酸に溶かして0.45 μmのメンブレンフィルターでろ過した。このろ液を分取クロマトグラフに注入して溶出時間1分ごとに溶出液を分取し、各溶出液をLC-MS/MSで測定してウスタル酸（推定）の分取クロマトグラフ溶出時間を確認した。なお、分取クロマトグラフの条件はTable 2のとおりとした。

Table 2. 分取条件

分取機器 (HPLC & フラクシオンコレクタ) : Agilent社製 1200 series
移 動 相 : A液…0.1%ギ酸 B液…アセトニトリル
グラジエント : 0 min (10%) - 15 min (95%) - 20 min (95%) (B液%) - 20.01 min (10%) - 30.00 min (10%)
流 速 : 1.2 mL/min
カ ラ ム : Imtakt社製 SM-C18 (6.0 mm × 150 mm, 3μm)
カラム温度 : 40°C 試料注入量 : 100 μL フラクシオンコレクト設定 : 0 - 30 min, 溶出時間1分ごとと採取

(3) 定性分析用セミ標準の作成

カキシメジを0.1%含有メタノールで抽出した溶液を減圧濃縮し、0.1%ギ酸に溶かして0.45 μmのメンブレンフィルターでろ過した溶液（子実体1g/1mL相当）について、分取クロマトグラフを用いて溶出液を分取する工程を繰り返した。ウスタル酸（推定）の含有を確認したフラクシオンをすべて合わせ、減圧濃縮したものをメタノールに溶かし定性分析用セミ標準とした。

3 結果

(1) カキシメジ中のウスタル酸（推定）の含有確認

LC-MS/MS を用いて測定した結果、MS scan から m/z 337.0 を抽出したクロマトグラム (Fig. 1) において溶出時間 10.18 min に明確なピークを確認した。当該溶出時間におけるプリカーサイオン m/z 337.0 のプロダクトイオンスキャンを行い得られた MS スペクトル (Fig. 2) において m/z 219.0 及び 117.0 のプロダクトイオンを確認した。このことから、当該ピークがウスタル酸であると推定した。

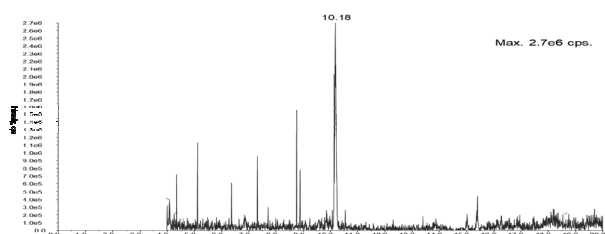


Fig.1 Selected ion monitoring (SIM) LC-MS chromatogram for m/z 337.0 obtained from *Trichroloma ustale* extract.

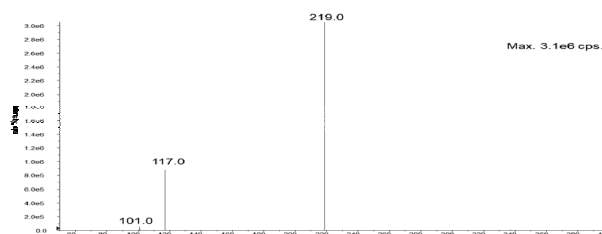


Fig.2 MS spectrum (Product ion scan) (Precursor ion : m/z 337.0)

(2) ウスタル酸（推定）の分取

分取クロマトグラフを用いて分取した各溶出時間の溶出液を(1)の分析条件で LC-MS/MS 測定し、ウスタル酸（推定）を検出した溶出時間 9 分から 11 分のフラクションを分取することとした。

(3) 定性分析用セミ標準の作成

子実体 1 g / 1 mL 相当の試験液 100 μ L を分取クロマトグラフに 10 回繰り返し注入し、(2)において確認したフラクションに溶出した液をすべて合わせ、減圧濃縮したものをメタノールに溶かして 1 mL とした（子実体 1 g / 1 mL 相当セミ標準溶液）。本品をメタノールで 1000 倍希釈したものを LC-MS/MS で MRM 測定し、Fig. 3 のとおり明確なピークが得られることを確認した。

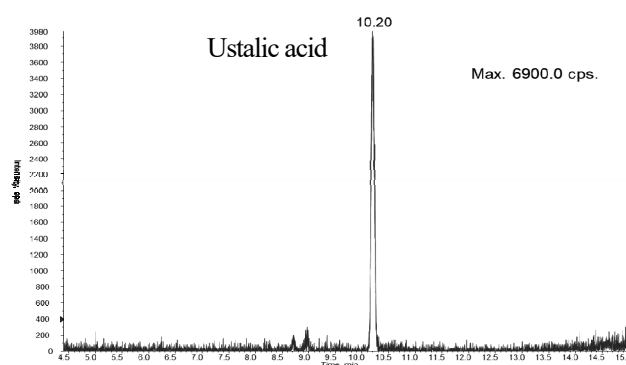


Fig.3 LC-MS/MS chromatogram of the semi-purified extract obtained from *Trichroloma ustale*.

4 今後の研究方向等

本研究では、分取クロマトグラフを用いてカキシメジからウスタル酸（推定）を分取することにより定性分析用のセミ標準を作成した。

今後は、本研究において得られたセミ標準の長期保存試験を実施するとともに、他の自然毒について同様の手法によりセミ標準を調製し、健康危機管理事案の発生時の検査体制の強化を図る。

参考文献

- 1) Yoshioka. N. *et al*, *Forensic Science International*. **2020**, 317, 110554.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110554>
- 2) Ito. T. *et al*, *Journal of Natural Medicines*. **2021**.
DOI <https://doi.org/10.1007/s11418-021-01496-z>

研究成果報告書（４）

研究課題名	残留農薬検査に係る前処理方法の検討
担 当	衛生科学部 主任専門研究員 川村 あさひ

1 目的

当センターにおいては、残留農薬検査を厚生労働省が定める通知試験法¹⁾により行っているところであるが、簡便で迅速であるとされるSTQ法（Solid Phase Extraction Technique with QuEChERS method）が他に知られている。

このことから、業務効率化を図り、検査対象農産物の拡大に繋げることを目的として、同法導入の妥当性を評価するための検討を行ったものである。

2 方法

食品試料（ほうれんそう、キャベツ、えだまめ）に農薬混合標準溶液を添加し、STQ法による添加回収試験を行った。

農薬標準の添加は、0.01 ppm 及び0.04 ppm の2濃度とし、1日（1回）2併行、5日間の枝分かれ試験を行った。

LC-MS/MS、GC-MS/MS の測定条件を表1、表2のとおりとし、得られた測定結果について、「妥当性評価ガイドライン²⁾」に基づき、選択性、真度（回収率）、精度及び定量限界の性能パラメータを算出して妥当性を評価した。

3 結果

妥当性評価項目毎の適合数を表3に、農薬及び品目別の妥当性評価結果を表4及び表5に示す。今回の試験では、STQ法によっても、多くの農薬成分の定量が可能であることが示された。

表1 LC-MS/MS 測定条件

機 器	LC：島津製作所社製 LC-20AD MS/MS：AB Sciex社製 Triple Quad 5500
移 動 相	A液…0.05%ギ酸含有10mM酢酸アンモニウム B液…アセトニトリル
グラジエント	0 min (1%) - 2.99 min (1%) - 3.00 min (18%) - 12.00 min (90%) - 19.00 min (90%) - 19.01 min (1%) - 26.00 min (1%)
流 速	0.2 mL/min
カ ラ ム	Waters社製 Atlantis dC18 (2.1 mm × 100 mm, 3 μm)
カ ラ ム 温 度	40 °C
試 料 注 入 量	5 μL
イオン化方式	ESI (+) 及び ESI (-)
Ion spray voltage	5500 V 及び -4500 V
Ion source temp	600 °C

表2 GC-MS/MS 測定条件

機 器	GC：Agilent社製 7890B MS/MS：Agilent社製 7000D
キャリアガス	ヘリウム
注 入 口 温 度	270 °C
オ ー プ ン 温 度	80 °C (1 min) - 20 °C/min - 140 °C - 4 °C/min - 200 °C - 8 °C/min - 300 °C - 20 °C/min - 310 °C (5.5 min) → 310 °C (ポストラン5 min)
トランスファーライン温度	290 °C
カ ラ ム	Agilent社製 VF-5MS (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)
注 入 モ ー ド	スプリットレス
試 料 注 入 量	2 μL
イオン化方式	EI (70 eV)
イオン源温度	320 °C
測 定 モ ー ド	MRM

表3 妥当性評価項目毎の適合数

測定機器	品目	選択性	0.01 ppm			0.04 ppm			定量限界	全評価項目
			回収率	併行精度	室内精度	回収率	併行精度	室内精度		
LC-MS/MS (136項目中)	ほうれんそう	130	113	133	128	127	133	130	136	112
	キャベツ	133	106	133	128	123	134	129	136	103
	えだまめ	135	128	134	133	131	133	132	135	127
GC-MS/MS (181項目中)	ほうれんそう	180	180	181	179	180	181	181	176	175
	キャベツ	180	179	179	175	179	181	177	176	167
	えだまめ	180	168	175	176	167	181	181	177	158

4 今後の研究方向等

STQ法採用の適否を判断するために3品目の試験では不足であるので、今後、今回試験した以外の農産物で試験を継続し、STQ法採用の妥当性を判断する。採用することが適当と判断された場合には、これまでに検査対象としてこなかった農産物について添加回収試験を行い、対象農産物の拡大を図っていく。

参考文献

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

研究成果報告書（５）

研究課題名	生体試料中の薬毒物の分析法検討について
担 当	衛生科学部 主査専門研究員 宮手 公輔

1 目的

岩手県では、テロ等の発生を想定し、県民等の生命、身体及び財産への被害の防止・軽減を図ることを目的として「岩手県NBCテロその他大量殺傷型テロ対処関係機関連携マニュアル」（総合防災室所管）を策定している。本マニュアルでは、保健所が医療機関を通じて被害者の血液、吐しゃ物等の検体（以下、「生体試料等」という。）を入手した場合には、県環境保健研究センター又は国立感染症研究所等に検体を送付し、同所において検査・分析を行う旨が規定されている。

しかしながら、当センターにおいては、これまでに生体試料中の化学剤や薬毒物分析を実施してきておらず、緊急時に迅速に対応するための情報の蓄積等がなされてきていない。

このため、本研究において、当センターでの理化学試験部門における生体試料の取り扱い手順を検討するとともに、生体試料からの迅速かつ効率的な薬毒物の抽出方法を検討し、当センターにおける分析体制を構築することを目的として調査研究を行った。

2 方法

(1) 理化学試験における生体試料等安全管理要綱等の作成

岡部らの報告¹⁾²⁾³⁾を参考として、当センターの保有設備、試験室配置（動線）、検体の暴露危険度等を検討したのち、理化学試験における生体試料等安全管理要綱及び生体試料等管理区域運営要領の案を作成し、当該要綱等の案の試験運用を実施した。

(2) 生体試料等を用いた農薬の添加回収試験

生体試料の模擬試料等を用いて農薬の添加回収試験を実施した。

添加回収試験用試料として、血液（ブタ血液・岩手県食肉衛生検査所より入手）、人工尿（JIS T3214:2011 ぼうこう留置用カテーテルに記載のものを調製）及び人工胃液（日本薬局方 溶出試験第 1 液・購入品）を準備し、試料溶液中の標準溶液濃度が 50 ng/mL となるように混合標準溶液を添加したのち、田口ら⁴⁾の分析方法により試験溶液を調製して、LC-MS/MS を用いて表 1 の分析条件により測定した。

なお、添加回収試験の測定項目は、本県で実施している食品収去検査（残留農薬）の項目を中心として、日常的に LC-MS/MS を用いて測定している表 2 の項目を対象とした。

また、前処理の最終段階で実施する遠心ろ過で使用するフィルターは、田口らの方法に記載のあるコスモスピンフィルターHを使用した。

表 1 LC-MS/MS 測定条件

LC	機 器	： 島津製作所社製 LC-20AD
	移 動 相	： A液 … 0.05%ギ酸含有10mM酢酸アンモニウム B液 … アセトニトリル
	グラジエント (B液%)	： 0 min (1%) - 2.99 min (1%) - 3.00 min (18%) - 12.00 min (90%) - 19.00 min (90%) - 19.01 min (1%) - 26.00 min (1%)
	流 速	： 0.2mL/min
	カ ラ ム	： Waters社製 Atlantis dC18 (2.1 mm × 100 mm, 3µm)
	カ ラ ム 温度	： 40°C
	試 料 注 入 量	： 5µL
MS	機 器	： AB Sciex社製 Triple Quad 5500
	イオン化方式	： ESI (+) 及び ESI (-)
	Ionspray voltage	： 5500 V 及び -4500 V
	Ion source temp	： 600°C

表2 添加回収試験実施項目

殺菌剤	アゾキシストロピン、エポキシコナゾール、オキサジキシル、オキシカルボキシ、シアゾファミド、ジフェノコナゾール、シプロコナゾール、シメコナゾール、ジメトモルフ、チアジニル、チアベンダゾール、テトラコナゾール、テブコナゾール、トリシクラゾール、トリフルミゾール、トリフロキシストロピン、ピラクロストロピン、フェリムゾン、フラメピル、フルオピコリド、プロクロラズ、プロピコナゾール、ヘキサコナゾール、ペンシクロン、ボスカリド、メタラキシル及びメフェノキサム、メコナゾール、メパニピリム	
殺虫剤 (殺ダニ剤を含む)	ネオニコチノイド系	アセタミプリド、イミダクロプリド、クロチアニジ、ジノテフラン、チアクロプリド、チアメキサム
	ベンゾイルフェニル系	ジフルベンズロン、フルフェノクソロン、ルフェヌロン
	有機リン系	イソキサチオン、オメエート、ジメエート、トリアソホス、メチダチオン
	その他	インドキサカルブ、カルバリル、フルベンジアミド、トルフェンピラド、エトフェンプロックス、メキシフェノジド、クロフェンテジン、スピロジクロフェン、シエノピラフェン
除草剤	インダノファン、カルフェントラゾンエチル、ダイムロン、ピラクロニル、プロモプチド、メトラクロール、メトリブジン、リニユロン	
防かび剤	イマザリル	

3 結果

(1) 理化学試験における生体試料等安全管理要綱等の作成

試験運用の結果を受けて、生体試料等管理区域を設置する期間等の規定について若干の修正をしたのち、運用を開始することとした。

(2) 生体試料等を用いた農薬の添加回収試験

血液では、スピロジクロフェンの回収率が36.9%と70%を下回ったものの、そのほかの成分では、回収率70%を上回り、良好に検出できることを確認した。また、36成分で回収率が120%を超えたところであるが、緊急を要する健康危機管理事案の発生時には、検出することが最優先であることから、回収率が120%を上回ったものについても試験検査の対象として問題ないと判断した。

人工尿及び人工胃液では、測定成分のすべてが回収率70-120%と良好な回収が得られた。

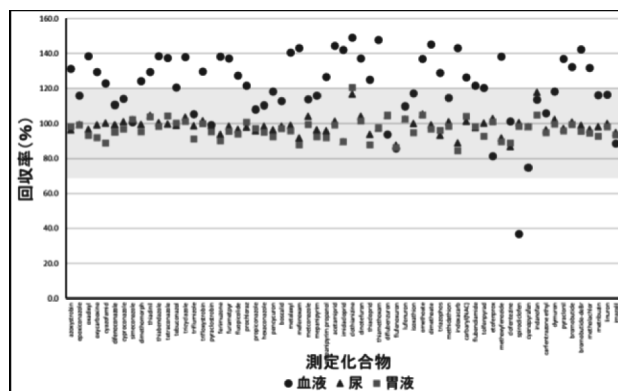


図1 添加回収試験 回収率

4 今後の研究方向等

本研究では、生体試料等の取り扱いに関する規定類を作成するとともに、ブタの血液及び人工尿・胃液により添加回収試験を実施した。

今後は、人由来の生体試料等を用いて添加回収試験を実施するとともに、自然毒成分やGC-MS/MS測定農薬等の検証も行き、分析対象項目の拡充を図ることとする。

参考文献

- 岡部信彦. “衛生研究所での「人体（血液、尿等）試料の検査手法」の標準化にむけて”. 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）:食品防御の具体的な対策の確率と実行検証に関する研究（研究代表者：今村知明），平成24～26年度総合研究報告書，2015，6-1～6-11
- 岡部信彦. 感染性物質を含有する可能性のある生体試料等の理化学試験に関するガイドライン. <http://www.nihs.go.jp/food/group3/JintaiShiryokuKensaJouhou/JintaiShiryokuKensaJouhou_files/Guideline.pdf>, (参照2020-8-17)
- 岡部信彦. “衛生研究所での「人体（血液、尿等）試料の検査手法」の標準化”. 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）:行政機関や食品企業における食品防御の具体的な対策に関する研究（研究代表者：今村知明），平成27-29年度総合研究報告書，2018，4-1～4-23
- 田口貴章ら, 日本食品化学学会誌, 2020, 27, 33-37

研究成果報告書（6）

研究課題名	医薬品・生活関連物質の環境実態及び環境リスク解明に関する研究
担 当	環境科学部 上席専門研究員 岩淵 勝己

【研究①】日韓共同研究「Cooperative research on environmental status of PPCPs in both countries」

共同研究機関：国立環境研究所、兵庫県環境研究センター、韓国国立環境科学院、韓国釜山大学

1 目的と方法

本研究は、PPCPsによる環境汚染実態を明らかにするため、環境サンプルの多成分一斉分析を行い、地点間で比較することを目的とした。PPCPsは、環境中へは主に下水道放流水として供給されるものと考えられるため、下水道放流水の流入する河川の2地点、下水道放流水の流入地点の上流と下流で岩手、兵庫、でそれぞれ採水し、サンプルとした（韓国のサンプルは、コロナの影響等により検討できなかった）。採水地点名はそれぞれ、岩手（上流）をI-1、岩手（下流）をI-2、兵庫（上流）をH-1、兵庫（下流）をH-2とした。採水時期は、温暖期及び寒冷期に各地点で1回ずつとした。分析及び解析にはSciex製LC-QTOFMS X500R、AIQS-LC*を利用した。本研究でターゲットとした化学物質は516種であり、内訳はTable 1のとおりである。医薬品が162種、生活関連物質が6種で、PPCPsは168種である。*AIQS-LC：Automated Identification and Quantification System with a Database for LC-QTOF-MS

2 結果と考察

Table 1. ターゲットとした化学物質

group	number	example
Pharmaceuticals	162	Antibiotics, Analgesic, Lipid regulator, Psychiatric drug, etc.
Personal care products	6	UV filter
Pesticides	299	Herbicide, Fungicide, Insecticide, etc.
Flame retardants	8	
Industrial chemicals	7	Organic synthesis raw materials, etc.
Others	34	Artificial sweetener, Surfactant, Optical brightener, etc.
Total	516 (PPCPs = 168; 33%)	

(1) 検出した化学物質
化学物質はトータルで84種検出された（Table 2）。採水地点で比較すると、検出された化学物質数は下水道放流水の流入前であるI-1、H-1よりも、流入後のI-2、H-2のほうが多かった。温暖期のI-1は農薬（殺菌剤）が最も多く検出されたが、他の季節や場所は、医薬品が最も検出された。検出時期で比較すると、すべてのサイトで、寒冷期よりも温暖期に多くの化学物質が検出された。下水道放流水の流入後で比較すると、I-2、H-2とも、検出される化学物質の種類は同様の傾向を示していた。

Table 2. 検出された化学物質数

group	warm season				cold season			
	I-1	I-2	H-1	H-2	I-1	I-2	H-1	H-2
Pharmaceutical	3	36	22	34	4	34	15	28
Personal Care Prod	0	3	1	2	0	2	1	1
Pesticide_herbicide	2	2	3	2	1	1	1	2
Pesticide_fungicide	6	6	8	7	2	2	2	2
Pesticide_insecticide	2	1	3	1	2	1	1	0
Flame retardants	0	0	0	0	0	0	0	0
Industrial chemical	0	0	0	0	0	0	0	0
Others	0	5	4	5	3	3	3	6
Total	13	53	41	51	12	43	23	39

(2) 検出された化学物質の構成比
検出された化学物質の構成比を確認したところ、I-2、H-1、およびH-2では検出された化学物質の約55~80%がPPCPsであった（Fig. 2）。I-1では農薬が主要な成分で、これは、岩手の対象河川の上流部に広がっている農耕地の影響と考えられる。兵庫の対象河川は、比較的都市部を流れる河川であり、採水位置による違いは岩手ほど大きくはなかった。

(3) 検出された化学物質の濃度

最高濃度で検出されたのはSucraloseで、18,000 ng/Lであった。PPCPsもターゲット物質の中では比較的高濃度で、医薬品ではメトフォルミンが4,900 ng/L、パーソナルケア製品ではジスチリルピフェニルジスルホン酸が3,400 ng/Lであった。寒冷期の下水道放流水流入後において高濃度で検出される物質が多かったが、農薬のジノテフラン（殺菌剤）は、寒冷期に岩手の下水道放流水流入前のI-1で最も高濃度となっていた。温暖期のI-1、H-1でも同程度の濃度が検出されており、採水地点上流部の水田や畑、河川敷などにおける使用が影響していると考えられる。

(4) PNEC との比較

3種の化学物質、医薬品では、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、農薬では、カルベンダジムがPNECを超過していた。これらはすべて抗菌物質であった。クラリスロマイシンは、温暖期、寒冷期とも、岩手、兵庫双方の下水放流水流入後で超過しており、アジスロマイシンとカルベンダジムは、寒冷期の岩手の下水放流水流入後で超過していた。カルベンダジム

は、本来は農薬であるが、農薬以外の抗菌剤用途として使用されることも多いため、下水放流水に比較的高濃度で含まれていたと推察される。

【研究②】国環研、地方環境研究所とのⅡ型共同研究「LC-MS/MSによる分析を通じた生活由来物質のリスク解明に関する研究」
共同研究機関：国立環境研究所、Ⅱ型共同研究に参画する地方環境研究所

R2年度は、県内の公共用水域の底質及び生物のサンプリングとサンプル調製を実施し、分析を担当する地環研（名古屋市、兵庫県）へ送付した。PPCPsの分析を実施中で、測定結果が出るのは年度明けになる予定。網羅分析法の開発については、当方で実施したAIQS-LCについて情報提供し、そのほか情報収集中である。

【研究③】岩手大学との共同研究「畜産排水中抗菌剤の分解除去技術の開発に向けた基礎的研究」

1 目的と方法

家畜に投与された抗菌剤の一部は、排せつ物とともに体外に排出され、畜産排水として環境中に放出されるが、その分解生成物については情報が少なく、水環境生物への生態毒性も明らかにされていない。本研究では、このような新規抗菌剤分解除去技術の開発に向け、分解生成物の構造解析と、淡水藻類への生態毒性を評価し、生態系への影響を評価することを目的とする。R2年度は、対象物質をSulfamonomethoxine（以下、SMM）及び分解物とした。対象物質の分解処理前後の抗菌性物質溶液をLC-QTOFMSを用いて分析し、分解後に存在量が増加した物質（分解生成物）の存在を確認し、さらに、その精密質量から分解生成物の構造について推定を試みた。

2 結果と考察

SMMの分解実験は、岩手大学で実施した。分解前後のサンプルを入手し、LC-QTOFMSで分解生成物の精密質量及びMSMSデータをIDAモードで取得した。この分解前後のデータをもとに、①差分解析、②フラグメント検索を行い、得られた精密質量から構造推定を

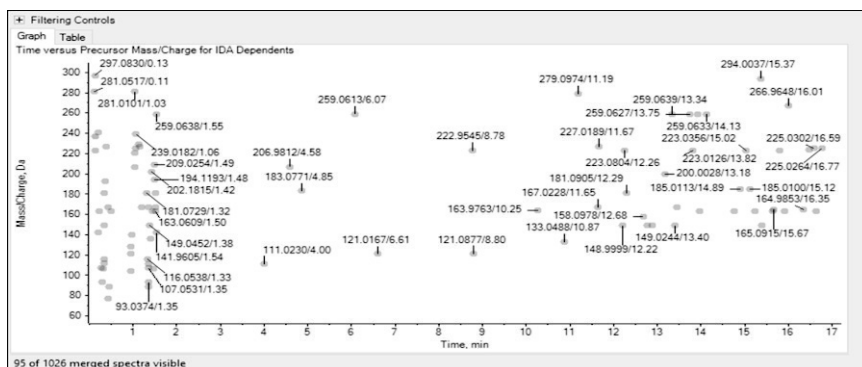


Fig. 2. 分解後サンプルから得られたプレカーサーイオンの精密質量と保持時間

行った。①差分解析からは、14個のフラグメントを抽出したが、保持時間、精密質量、データベース等から判断して、SMMの分解物とは確定できなかった。②フラグメント検索では、分解後サンプルから95個のプレカーサーイオンを抽出し（Fig. 2）、次にSMMのフラグメントになり得る精密質量を選択して、そのMSMSスペクトルも含めて解析した。4種のプレカーサーイオンが、SMM分解物である可能性が確認された。今回の実験サンプルは、分解条件が強過ぎたと考えられ、SMMは完全に分解しており、またその分解物もあまり検出されなかった。今後は、分解条件を再検討したうえで、SMM分解物の構造推定を行っていくこととしている。

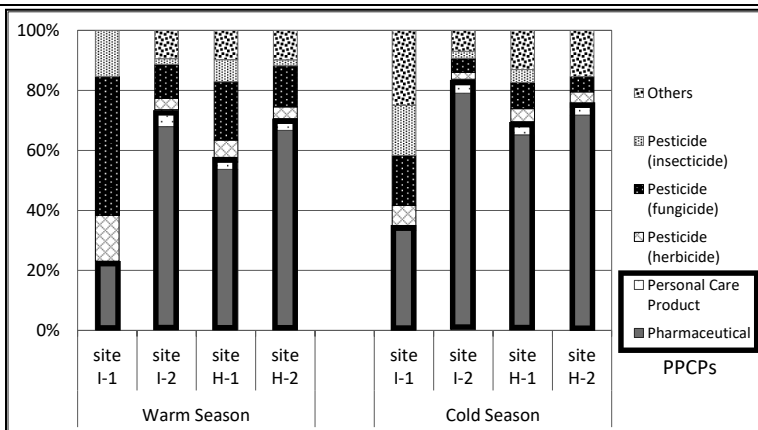


Fig. 1. 検出された化学物質の構成比

研究成果報告書（7）

研究課題名	畜産感染症の防疫に使用される陽イオン界面活性剤の分析法確立とこれを活用した環境水中実態調査
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

高病原性鳥インフルエンザを始めとした畜産感染症発生時、県が行う防疫措置で、陽イオン界面活性剤（商品名：パコマ、成分：[モノ,ビス-(塩化トリメチルアンモニウムメチレン)] アルキルトルエン）が使用される。また、防疫を行った際は、周辺河川と地下水について、環境調査を行うことが県マニュアルに規定されている。これを受け、陽イオン界面活性剤（以後、CS と称する。）の測定方法を確立するとともに、調査結果の評価に活用するため、平常時の河川水中濃度レベルを把握することを目的として検討を行った。

2 方法

調査地点：2015 年の畜産統計で、食鳥鶏、採卵鶏の飼育羽数の多い 5 市町村について、航空写真等から比較的規模の大きい鶏舎が設置されている地域の河川 5 か所を採水地点として選定した。

測定方法：河川水中の CS は、昨年度までに検討した JIS 改良法（オレンジII吸光光度法）による定量と LC-MS/MS による成分分析を行った。

3 結果

3-1 各地点の CS 測定結果

JIS 改良法により測定した各地点のシーズンごとの CS 濃度を表 1 に示す。また、定量下限値を超えて検出した地点の、LC-MS/MS による成分分析例を図 1 に示す。

表 1 各地点の JIS 改良法による陽イオン界面活性剤濃度

地点名	市町村	春	夏	秋	冬	検出率
岩谷橋	二戸市	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	0/4
大向橋	九戸村	<0.02	0.02	<0.02	<0.02	1/4
報国橋	軽米町	0.02	0.02	<0.02	<0.02	2/4
川原田橋	金ヶ崎町	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	0/4
館山橋下流	一関市	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	0/4

※単位：mg/L 塩化ベンザルコニウム換算。なお、測定結果は 3-2②の分析フローで測定した値

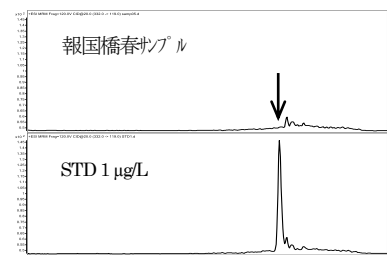


図 1 LC-MS/MS のクロマトグラム
モノ-(トリメチルアンモニウムメチレン)アルキルトルエン
のうちアルキ鎖の炭素数 12 のもの

JIS 改良法による測定で、大向橋及び報国橋の 2 か所で定量下限値程度の CS が検出されたが、LC-MS/MS による成分分析では、パコマの成分であるモノ（トリメチルアンモニウムメチレン）アルキルトルエンは検出されなかった。

3-2 着色成分による増感の防止

懸濁物の多い河川水の場合、JIS 改良法の試験液の色調が橙色からやや黄色にシフトするのが観察された。このような試料では、固相のメタノール溶出液が淡黄色に着色しており、この着色成分がクロロホルム相に抽出され、測定値に正の誤差を与える可能性が考えられた。このことから、下記の検討を行った。

① 試験液の吸収スペクトル確認

検量線用標準液及び河川試料について、試験液の吸収スペクトルを測定した。結果を図 2 に示す。

標準液では 485 nm が吸収ピークのトップとなるが、河川試料ではより短波長側にシフトしていた。また、河川試料について、オレンジⅡの代わりに精製水を用いた試験液の吸収スペクトルを測定したところ、485nm の吸光度が 0.05 以上あることが確認された。

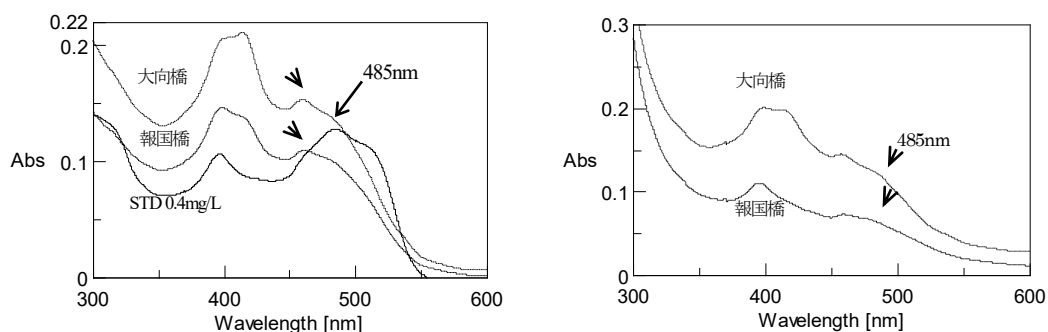
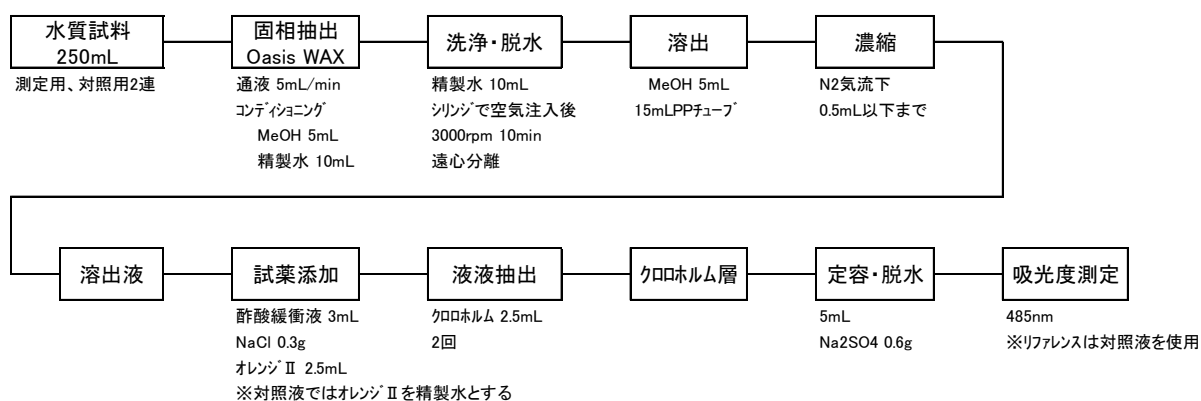


図2 JIS改良法試験液の吸収スペクトル（左：オレンジⅡを使用した試験液のスペクトル、右：オレンジⅡの代わりに精製水を使用した試験液のスペクトル）

② 分析フローの最適化

河川水の着色成分による測定値の誤差を防ぐため、対照液をクロロホルムから、オレンジⅡを精製水に変えて抽出した試験液とし、下記のとおり分析フローを修正した。



4 今後の研究方向等

高病原性鳥インフルエンザの高リスク地域において、シーズン毎のCS濃度を測定し、平常時データを収集した。畜産防疫用のCSはいくつかの製品があり、車両や作業者の消毒に常時使用されているが、JIS改良法による測定結果では、全ての調査地点で0.02 mg/Lもしくはそれ以下の濃度レベルであった。また、JIS改良法でCSを検出した地点の成分分析では、パコマの成分は検出されなかった。

県が防疫に使用するパコマは、魚毒性等の生物影響が検討されていないが、陽イオン界面活性剤全体濃度としてみた時、調査地域の濃度レベルで魚類へい死は起きていない。一方、人の健康影響については、地下水もしくは河川水を原水とした水道水の飲用利用による影響を考慮する必要がある。食品健康影響評価において、[モノ、ビス（塩化トリメチルアンモニウムメチレン）] アルキルトルエンのNOAELは2.5 mg/kg 体重/日¹⁾とされており、同成分の食品のADIを算出した際の安全係数と同じ200を不確実係数として、生涯耐用できる飲用水濃度を計算した場合、許容限度は0.031 mg/Lとなる。防疫措置を実施した際、水質事故が起きない、また、人への健康影響がおきない濃度レベルを測定するため、今回確立したJIS改良法の測定感度はこれを満たすものであると考えられる。

【参考文献】

- 1) 動物用医薬品評価書, [モノ、ビス（塩化トリメチルアンモニウムメチレン）] -アルキルトルエン, 食品安全委員会動物用医薬品専門調査会, 2017年10月

研究成果報告書（8）

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
1 目的 <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】	
2 実施内容 <p>(1) 自生地への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。</p> <p>(2) 種を存続させるための科学的な技術開発とその活用の評価を行う。</p> <p>(3) 国、県、市町村等の依頼に対応した技術支援を行う。（地域資源の活用等を含む）</p>	
3 成果 <p>(1) アツモリソウ野生株の生息域内保全を目的とした移植と保全措置の有効性について取りまとめ、学会誌「自然環境復元研究」に投稿し、受理された。（表1）</p> <p>(2) 環境省より依頼を受けて実施したチョウセンキバナアツモリソウの種子発芽および育苗試験を進め、この苗を北海道大学植物園と秋田県立農業科学館に提出した。（表1）</p> <p>(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、沿岸全域を対象に調査を実施した。この結果を全国環境研協議会の会誌「全国環境研会誌」に投稿し、掲載された。（表1、図1・2）</p> <p>(4) 花巻市大迫町商工会より依頼を受けて培養したハヤチネウスユキソウとアツモリソウの花酵母を定期的に提出し、この花酵母を利用した花酵母パン5種が同町老舗菓子店によって開発・販売された。（R2年6月27日岩手日日新聞・岩手日報に掲載）</p> <p>(5) 青森県の農業高校生が授業の中で採取したリンゴの種子を国際宇宙ステーションに保管し、スペースシャトルの最終飛行で地球に帰還させる「宇宙教育事業」が行われた。その種子の発芽について依頼を受け、取り組んだ試験結果を学術誌「薬用植物研究」に投稿し、掲載された。（表1、図3・4）</p>	
4 今後の取り組み <p>(1) 自生地へ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。</p> <p>(2) 試験対象としている植物の生息域外保全を進める有効な手法を開発する。</p> <p>(3) 国や地方公共団体からの希少野生植物等の依頼内容に応じて技術支援を行う。</p> <p>(4) 地域資源の活用に関する技術開発を進め、地域に研究成果を還元する。</p>	

表1 主な発表業績(令和2年度)

No	主催団体	掲載書誌名刊号頁	発表年月日	タイトル名	発表者	審査
①	薬用植物栽培研究会	●薬用植物研究42(1), 20-30	2020/6/20	胚培養による宇宙リンゴ“ふじ”の苗生産	小山田智彰・敬懸重和・佐藤晋也・越谷善樹・佐藤雄大	有
②	環境省・秋田県立農業科学館	●環境省依頼講演(チョウセンキバナアツモリソウ保護増殖事業)	2020/10/29	アツモリソウの保護・増殖とチョウセンキバナアツモリソウの生息域外保全	小山田智彰	無
③	全国環境研協議会	●全国環境研会誌第45巻第4号(通巻167号), 33-38	2021/1/20	岩手県における東日本大震災津波の影響調査: 海浜性希少植物の動態	小山田智彰・敬懸重和・千嶋則正	有
④	自然環境復元学会	●自然環境復元研究	受理	生息域内保全を目的にしたアツモリソウ野生株の移植と保全措置の有効性	小山田智彰・敬懸重和・高柳茂樹・吉田馨	有

〈全国環境研会誌 Vol. 45 No. 4 (2020) より〉



図1 沿岸調査で確認したスナビキソウ

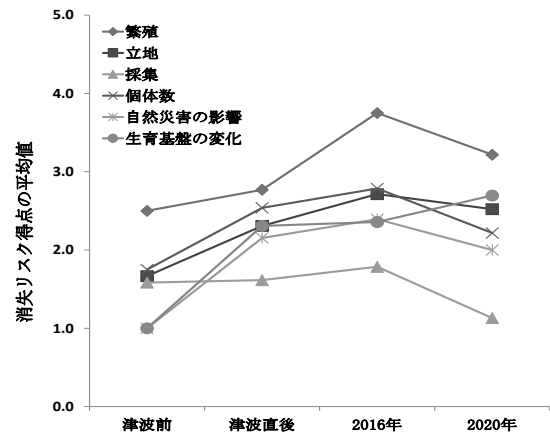


図2 6項目別消失リスク得点の平均値の推移

〈薬用植物研究 Vol. 42 No. 1 (2020) より〉

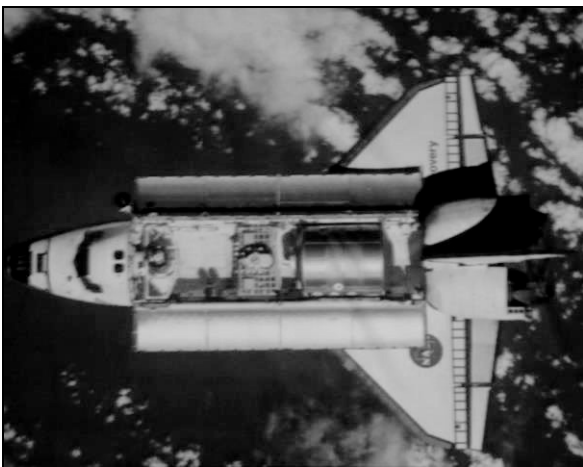


図3 スペースシャトル「ディスカバリー号」



図4 反重力伸長した宇宙リンゴの苗

研究成果報告書（9）

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 主任専門研究員 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を把握し、大量出没年と非大量出没年の行動の変化からクマの人里への出没要因を検討する。

本年は2017～2020年までに捕獲したクマ計14個体のGPSデータを用い、集落周辺に滞在するクマの秋季の行動の変化に着目し、秋季の集落周辺滞在率を大量出没年と非大量出没年で比較した。

2 方法

2017～2020年にかけて、クマ14個体にGPSテレメトリー首輪（Followit社製TellusGPS）を装着し放獣した。秋季の集落周辺滞在率は、いずれのクマも放獣後、7～8月の夏季にかけて集落周辺に滞在したことから、各クマの夏季の95%カーネル行動圏（以下、夏季行動圏）を集落周辺での滞在範囲とし、秋季の測位点数当たりの夏季行動圏内の秋季の測位点数により算出した。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。夏季行動圏は、7月から8月の1時間おきの測位点を用い、可変カーネル法により95%カーネル行動圏を算出した。秋季の測位点は自己相関を考慮し、2日に1点、10:00～14:00時点の測位点を、測位点がない場合は翌日の同時刻の測位点を利用した。

大量出没年と非大量出没年、雌雄での秋季の集落周辺滞在率の変化を明らかにするため、被説明変数を秋季の集落周辺滞在率、説明変数を大量出没の有無（大量出没年；2019年、非大量出没年；2017, 18, 20年）、性別および両要因の交互作用とした一般化線形混合モデルによりクマの集落周辺での滞在傾向について解析した。モデルの誤差分布は二項分布、ランダム変量は個体とした。また、最良モデルの選択では赤池情報量基準（AIC）が最小のモデルを採用した。

3 結果・考察

検討したモデルと説明変数の効果及びAIC値を表1に示す。

モデル1, 2, 3, 4及び5のAIC値はそれぞれ、98.4, 96.5, 105.8, 118.1及び136.8であった。また説明変数に大量出没の有無があるモデルでは、いずれも大量出没年時に正の効果が有意に認められ、性別があるモデルではオスに負の効果が有意に認められた。AICの最小モデルは、モデル2の説明変数が大量出没の有無および性別のモデルであった。

モデル2の説明変数の係数の推定値を表2に示す。

切片は非大量出没年時のメスの秋季の集落周辺滞在率のロジット値を示し、0.355であった。また大量出

表1 一般化線形混合モデルで解析したモデルと各説明変数の効果及びAIC値

モデル	説明変数	出没年	オス	交互作用	df	AIC
1	出没有無+性別+交互作用	+	-		11	98.4
2	出没有無+性別	+	-		12	96.5
3	出没有無	+			13	105.8
4	性別		-		13	118.1
5	null				1	119.7

没年の推定係数は 2.285, オスの推定係数は-1.981 であった. 滞在率に変換した場合, 非大量出没年のメスの集落周辺滞在率は 58.8%, オスは 16.4%, 大量出没年時のメスの集落周辺滞在率は 93.3%, オスは 65.9%であった.

これらのことから夏季に集落周辺に滞在するクマは, 非大量出没年では秋季に集落周辺から離散する傾向にあり, 大量出没年では夏季から秋季にかけても集落周辺に滞在する傾向が示唆された. また基礎的情報として, 本研究中の全 14 個体中 92.9%の個体の夏季行動圏内で住宅地を含み, 集落周辺の山地を選択したこと, 秋季の離散時には 64.3%の個体がおよそ 10 km 離れた秋田県境をまたぎ高標高帯の環境を利用したことを加えておく.

非大量出没年時の秋季にクマが集落周辺から離散した場合, 県境等の高標高帯へ移動することが確認されたが (図 1), この高標高帯への季節移動の有無が, 大量出没年時の秋季の集落周辺滞在率の高さに影響しているものと思われた. 関東地方の既往研究において, クマは堅果類の凶作年には秋季の行動圏が低標高値も含んで大きく拡大する (Yamazaki *et al.*, 2009; Kozakai, *et al.*, 2009) ことが知られており, 本試験地においても同様の傾向が見られる場合, 大量出没年時には, 集落周辺のクマは秋季の集落周辺に滞在し, 高標高帯のクマは低標高帯へ行動圏を広げ, 一時的に低標高帯でクマの密度が高まるものと推測され, このことが秋季におけるクマの出没メカニズムの一端となっている可能性が考えられる.

4 今後の研究方向等

今後は, 季節移動の要因を明らかにするため, 間接的ではあるもののツキノワグマが利用した痕跡出現率を大量出没年と非大量出没年で比較するとともに, 集落周辺の出没率やその周辺の環境を解析し, 出没しやすい環境要因を抽出する.

表 2 最良モデル (モデル 2) における各説明変数の係数の推定値

説明変数	推定値	標準誤差	z 値	p 値
非大量出没年メス	0.355	0.309	1.149	0.251
大量出没年	2.285	0.392	5.825	5.7E-9
オス	-1.981	0.442	-4.483	7.4E-6

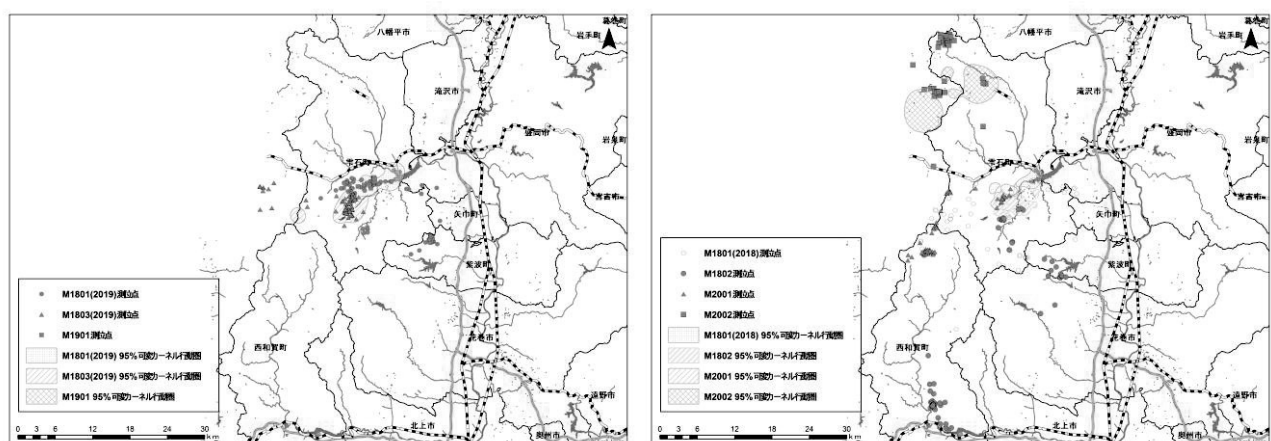


図 1 オスの夏季行動圏と秋季の測位点 (左: 大量出没年, 右: 非大量出没年)

引用文献

- Yamazaki, K., S. Koike, C. Kozakai, Y. Nemoto, A. Nakajima and T. Masaki. 2009. Behavioral study of free-ranging Japanese black bears I. Does food abundance affect the habitat use of bears? *In* FFPRI Scientific Meeting Report 4 "Biology of Bear Intrusions". pp. 60-63. FFPRI, Tsukuba.
- Kozakai, C., K. Yamazaki, Y. Nemoto, A. Nakajima, S. koike and K. Kaji. 2009. Behavioral study of free-ranging Japanese black bears II. How does bear manage in a food shortage year? *In* FFPRI Scientific Meeting Report 4 "Biology of Bear Intrusions". pp. 64-66. FFPRI, Tsukuba.

研究成果報告書（10）

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、これまでに合計 35 つがいの存在が確認されてきた。しかし、2002 年以降、消失つがいが見られるようになり、その数は 2020 年時点で 8 つがいに増えている。つがい数が減少傾向を示す背景には、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。生息数を今後安定的に維持していくために、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>これまでの研究によって、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、個体の移動範囲、幼鳥の分散、地域間での遺伝的差異など、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多い。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、土地利用、植生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>2 年度（2020 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つがいごとの繁殖成績の傾向分析。</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可能な限り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、脱落した羽根などの試料を元に 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。これまでは岩手を中心とした北日本での試料に偏っていたことから、西日本（滋賀県）の試料も追加した。また、個体の免疫反応に関係する主要組織適合複合体（MHC）遺伝子についても分析し、海外の亜種のデータと比較検討した。</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、巣の周辺の環境条件（標高、傾斜、土地利用、植生など）を JAXA 衛星写真判別データや国土数値情報を利用して集計した。また、衛星画像に基づいて牧草地や伐採地などイヌワシの好適採餌場所となる環境の面積割合についても計測した。これらのデータを用いて、イヌワシの繁殖成績（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、最もあてはまりの良いスケールを検討した。</p>	

3 結果

① 2020年には県全体で26つがいの生息が確認され、このうち12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7.7%であり、直近10年間の平均である16%を大きく下回っていた。繁殖失敗の直接的原因が確認できた事例として、親鳥が巣材を高く積み上げたことで巣が不安定になり、抱卵期に卵2個とともに巣の上部が崩落したことが明らかになった。また、つがいの一方の個体が不在になり、新たな相方が入らないまま繁殖活動が停滞する事例も2つがいで見られた。新規つがいの発見はなかったが、既存つがいにおいて新たに2つの巣の利用が確認された。

② 映像による個体識別の結果、岩泉町で巣立ちした幼鳥が約半年後の2021年1月に、同町の別のつがいの営巣地に侵入していたことが明らかになった。巣立ちした場所からの分散距離は約18 kmであった。また、遠野市で観察された雄若鳥が、西には6 km、東には9 km離れた複数地点で目撃され、行動圏の広がりの一部が明確になった。2011～17年の個体識別による観察に基づき、隣接するつがい間でつがい形成と解消が見られた事例については、詳細を報文にまとめた。

③ マイクロサテライトおよびミトコンドリアDNAから求めた遺伝的多様性は、西日本の個体についても北日本の集団と大きな違いはなく、ハプロタイプの地理的な偏りも見られなかった。欧州などに生息する他の亜種に比べると、日本のイヌワシはマイクロサテライトの平均アليل数が少ない傾向が認められ、同様のことがMHC遺伝子の多様性についても明らかになった。このことから、日本のイヌワシはボトルネックを経験して希少な遺伝子を失っている可能性が考えられた。

④ イヌワシの巣立ち回数を目的変数とした一般化線形モデル解析では、巣の周辺約7 kmまでの範囲について測定した環境要因のもとで、最も当てはまりの良いモデルが得られた。モデルでは、標高が低く、傾斜が緩く、落葉広葉樹や落葉針葉樹の多い営巣地で巣立ち回数が多い傾向にあった。一方、採餌場所として重要と考えられる牧草地や伐採地の面積は、予想とは反対に巣立ち回数と負の関係が見られた。

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、引き続き情報収集および探索調査を行なう。

(2) イヌワシの採餌場所の豊富さを示す指標を、標高や巣の形態などと組み合わせて用い、繁殖成績を説明するモデルの精度向上を目指す。また、各つがいを構成する個体の遍歴について情報をまとめ、年齢などの条件を考慮して繁殖成功率を予測できるか検討する。

(3) 個体の映像の収集を進めて識別事例を増やし、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) MHC遺伝子と繁殖成績の関連を、飼育下個体や野生個体について解析し、配偶者選択を通じて繁殖成績の低下が生じるか検討する。また、遺伝子を用いた近縁関係の解明方法についても検討する。

研究成果報告書（11）

研究課題名	岩手県全域におけ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（以下、シカ）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

個体数推定の地域ユニットは、五葉山の頂上を含んだ5kmメッシュを中心に周辺2メッシュまでを五葉山周辺地域、北上川以東、閉伊川以南に囲まれた地域を北上高地南部地域、それ以外の地域の3ユニットとし、それぞれの推定値を加算し岩手県全域の個体数を推定した。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。

個体数推定に使用したモデルは Harvest-based モデルとした。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。

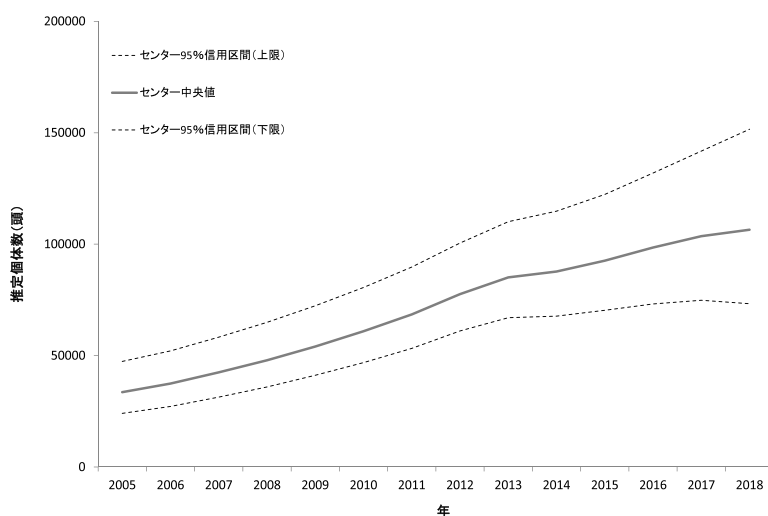
3 結果・考察

各パラメーターの事後分布の 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。

岩手県全域におけるシカの推定個体数の推移は、推定開始年の2005年から2013年にかけて、急速に個体数が増加した後、緩やかに上昇する傾向であった。推定最終年である2018年の推定個体数は106,500頭（95%信用区間：73,260～151,600頭）であった（図1）。

2013年より個体数の増加が緩やかになったのは、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、岩手県内でシカへの捕獲圧が高まったためと思われる。

4 今後の研究方向等



今後は、過去に岩手県で収集したシカの歯、腎臓を用い、栄養状態と自然増加率の関係を、また、積雪量と自然増加率明らかにし、個体数推定モデルに導入可能かを検討する。

図1 岩手県全域におけるニホンジカの推定個体数

研究成果報告書（12）

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 木登 梢、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（ガス成分及び粒子状成分）の濃度をモニタリングし成分濃度の推移や各成分の相互関係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。また、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」）のフィルターパック法による乾性沈着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本県の大気汚染状況について評価を行うことも目的とする。

2 方法

- (1) 調査期間 2020年3月30日から2021年3月29日まで
- (2) 試料採取周期 通年調査とし、原則2週間単位（全26回）
- (3) 調査地点 盛岡市（当センター屋上）
- (4) 採取方法 図1のとおり6段ろ紙ホルダーに各種ろ紙を装着し、ダイヤフロム型ドライ真空ポンプを用いて流量2L/minの吸引速度で大気を採取することでガス成分及び粒子状成分を捕集した。

- (5) 分析方法 捕集後のろ紙を水（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）を測定した。得られた濃度、吸引流量（20℃換算値）より乾性沈着物成分の大気中濃度（nmol/m³）を求めた。

- (6) 測定値の評価 測定結果について、サンプリングの正確さの検証を目的とし全環研調査要領で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」により評価を行った。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ることから、ガス成分及び各粒子状成分の合計値のMg/Naモル比及びCl/Naモル比と海塩組成比の文献値¹⁾を比較評価した。

3 結果

2020年度の主要成分の形態別濃度推移を図2～図9にそれぞれ示す。2020/7/6～7/20のアンモニアガス成分については正常なサンプリングができなかったため欠測とした。F₀におけるイオンの当量濃度積算値が50neq/m³を下回った回は9回あり、当該サンプリング期間については図に色を付した。基準値を下回った原因としては、F₀で捕集されるはずである微小粒子の量が実際に少なかったことや、ホルダーの内部でリークが発生し本来F₀で捕集されるはずだった成分がF₁以降の段で捕集されてしまったこと等が考えられた。なお、イオンバランスは全ての回で基準を満たした（0.9～1.1の間で推移）。

各成分の形態別濃度はそれぞれ異なる推移を示していた。硫黄酸化物成分は、主にガス及び微小粒子として存在していた。窒素酸化物成分は、季節による形態の変化が顕著であり、春季及び秋季は粗大粒子、夏季はガス、冬季は微小粒子としての存在割合が高くなっていた。アンモニア成分は年間を通じてガスとしての存在割合が高くなっていたが、冬季は粒子としての存在も増加していた。塩化物成分は春季から夏季はガス、秋季から冬季は粗大粒子としての

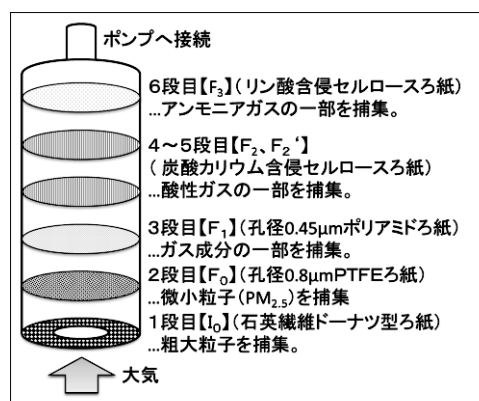


図1 フィルターパック法の概要

存在割合が高く、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオンは年間を通じて粗大粒子、カリウムイオンは微小粒子としての存在割合が高かった。海塩起源成分である塩化物成分、ナトリウムイオン、マグネシウムイオンの粗大粒子の濃度推移は近似した挙動を示しており、共通して夏季に濃度の低下がみられた。

サンプリング全26回分について、Mg/Na モル比を算出したところ、範囲は0.08~0.13 (平均値0.11、中央値0.11) で推移しており、概ね海塩組成比 (文献値 0.11) を保っていた。一方、Cl/Na モル比の範囲は 1.09~5.65 (平均値1.66、中央値 1.29) 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 モル比のはずれ値 (第三四分位数+1.5IQR を超えたもの) となった4回はいずれも夏季 (6~8月) であった。

4 今後の研究方向等

大気汚染状況の実態を解明するためには、長期的なモニタリングデータが必要となる。今後も、正確なデータを蓄積し、各成分の存在形態の関係性等について解析していく。また、引き続き全環研調査に参加し測定精度の向上に努めるとともに、全国的観点から見た岩手県の酸性雨の状況についても評価を行っていく。

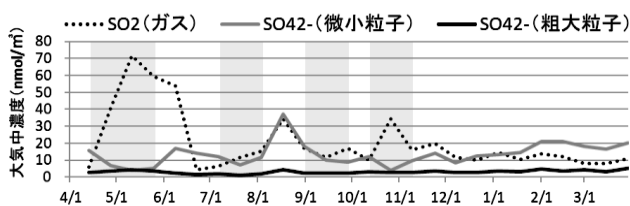


図2 硫酸酸化物成分の形態別濃度推移(2020年度)

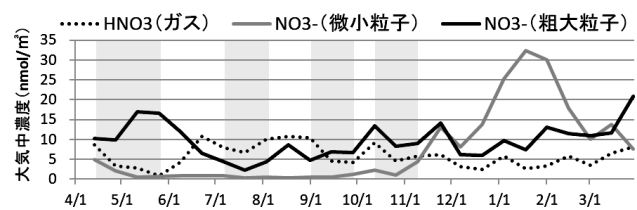


図3 窒素酸化物成分の形態別濃度推移(2020年度)

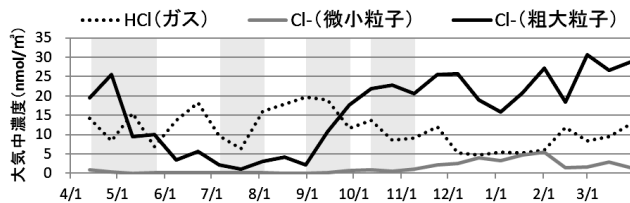


図4 塩化物成分の形態別濃度推移(2020年度)

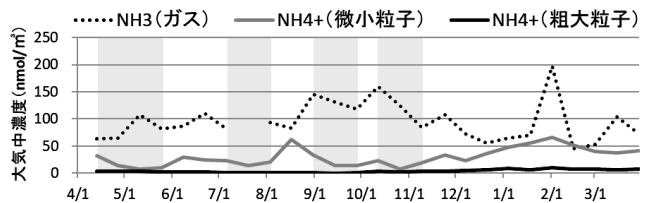


図5 アンモニア成分の形態別濃度推移(2020年度)

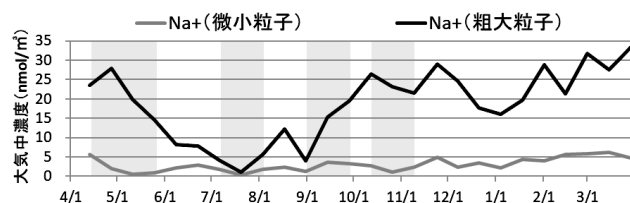


図6 ナトリウムイオンの粒径別濃度推移(2020年度)

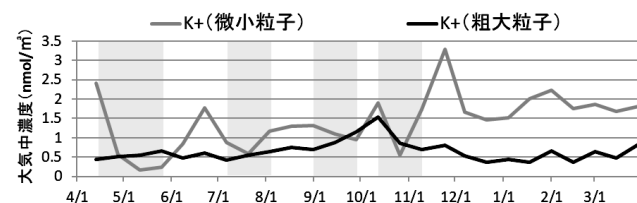


図7 カリウムイオンの粒径別濃度推移(2020年度)

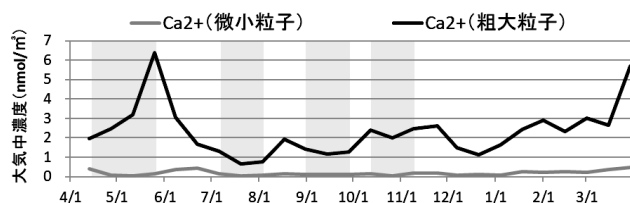


図8 カルシウムイオンの粒径別濃度推移(2020年度)

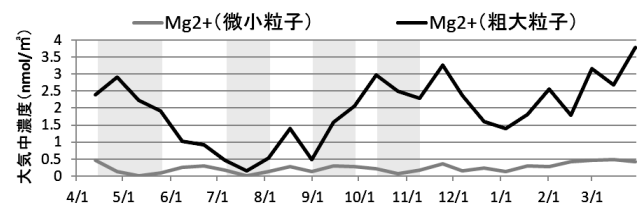


図9 マグネシウムイオンの粒径別濃度推移(2020年度)

【参考文献】

- 1) 桑本融: "海水の無機成分", 化学と生物, Vol.22, No.7, 1984

研究成果報告書（13）

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	（所属部）地球科学部 （職・氏名）主任専門研究員 佐藤 卓

1 目的

東南アジア原産であるヒトスジシマカは、デング熱等のウイルス性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、地球温暖化による気温上昇等の影響によりその生息地域が北に拡大しており、本県はすでに同蚊の生息北限地域である。同蚊の気温上昇に伴う生息分布域の変化や生息条件の把握は、地球温暖化に対する適応策の一環である感染症対策として重要である。

2 方法

（1）蚊類の生息状況調査

蚊類の生息状況調査は、H21～R2 の各年度 6～10 月、県内延べ 649 地点 2,419 コロニーにおいて実施した。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（コロニー）を調査した。採取した蚊の幼虫を室温で飼育し、羽化させた成虫について実体顕微鏡を用いて形態学的に同定した。

（2）ヒトスジシマカの生息条件の解析

トスジシマカの生息北限地域における生息条件を解析するため、統計モデリング手法を用いて岩手県内 3 次メッシュ毎のヒトスジシマカ生息確率を推計した。ヒトスジシマカ生息分布調査結果（H22～R1）を応答変数、調査年の冬季の平均気温、有効積算温度、人口密度等を説明変数として一般化線形混合モデルにより検討した。リンク関数は logit、ランダム効果は調査地点の 2 次メッシュとした。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 及び ROCR を用いた。

3 結果

（1）蚊類の生息状況調査

年度毎の調査地点数及び蚊類の同定数を表 1 に、調査地点及びヒトスジシマカの生息が確認された地点を図 1 に示す。H21 から R2 年度までに延べ 649 地点を調査した結果、合計 10,916 頭の蚊類が同定された。県内の優占種はヤマトヤブカ（8,228 頭）であった。ヒトスジシマカは、北上川流域及び沿岸南部地域を中心に生息が確認され、特に、盛岡市市街地では、平成 21 年以降徐々に生息域を拡大していることが確認された。

（2）ヒトスジシマカの生息条件の解析

3 次メッシュ毎のヒトスジシマカ生息確率は、説明変数として「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、岩手県内の任意の 3 次メッシュ $[i]$ におけるヒトスジシマカの生息確率を $[q_i]$ とすると、以下のモデルで推計することができた。

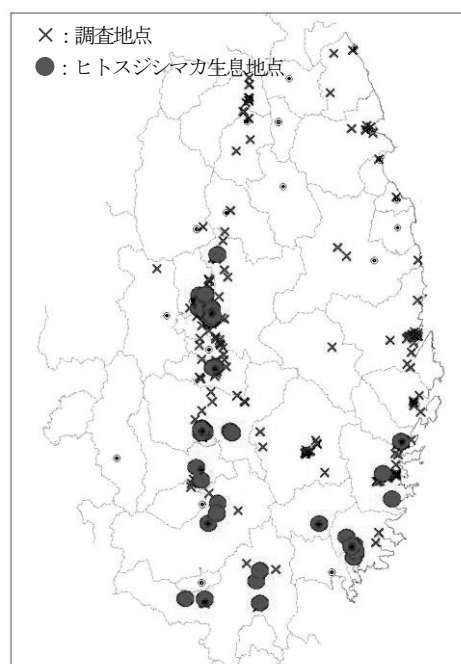


図1 蚊類の調査地点とヒトスジシマカ生息確認地点

$$\text{logit}(q_i) = -3.952043 + [2 \text{ 月平均気温}]_i \times 0.2668 + [\text{人口密度}]_i \times 0.0002983 + [\text{有効積算温度}^*]_i \times 0.001075$$

AUC=0.82

※調査年の 1 月 1 日から採取日までの 10.8℃を閾値とする有効積算温度

表1 県内の蚊類検出状況

年度	調査 地点数	調査コロ ニー数	ヤマトヤ ブカ	ヒトスジ シマカ	イエカ類	ヤマダシ マカ	オオクロ ヤブカ	キンバラナ ガハシカ	その他	計
H21	99	337	214	100	23	10	9	26	9	391
H22	144	417	1,379	243	125	139	14	5	31	1,936
H23	34	132	300	117	182		14			613
H24	59	211	1,263	83	69	47	19	24		1,505
H25	57	288	630	73	18	101	12	10		844
H26	55	215	940	75	16	54	37	6		1,128
H27	56	241	967	77	82	93	1	75	8	1,303
H28	28	96	322	45	55	3	1	11	30	467
H29	40	221	1,049	87	38	20	2	8	29	1,233
H30	13	43	171	2	8	3		1	2	187
R1	53	193	897	93	76	25	8	7	11	1,117
R2	11	25	96	17		7	58	1	13	192
計	649	2,419	8,228	1,012	692	502	175	174	133	10,916

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おけるヒトスジシマカの生息確率を算出することができる。本モデルを基に、各メッシュのヒトスジシマカ陽性検出率が90%となる生息確率6.6%をカットオフ値として、ヒトスジシマカ生息リスクマップを作成した(図2)。

4 考察

ヒトスジシマカは、H12年に初めて岩手県で生息が確認されて以来、徐々に生息域を北に拡大してきた。しかし、北上川流域の生息状況をみると、都市部以外ではその生息が確認されていない地域が多い。これは、ヒトスジシマカの行動範囲が100m前後と狭く、都市部と農村部では吸血のターゲットとなるヒトとの暴露機会に差があることが、繁殖に影響していることが考えられた。また、6月の活動初期と比べ、夏季から秋季にかけて生息域が拡大しており、これはヒトスジシマカが繁殖地から自動車などの交通機関により容易に遠方に

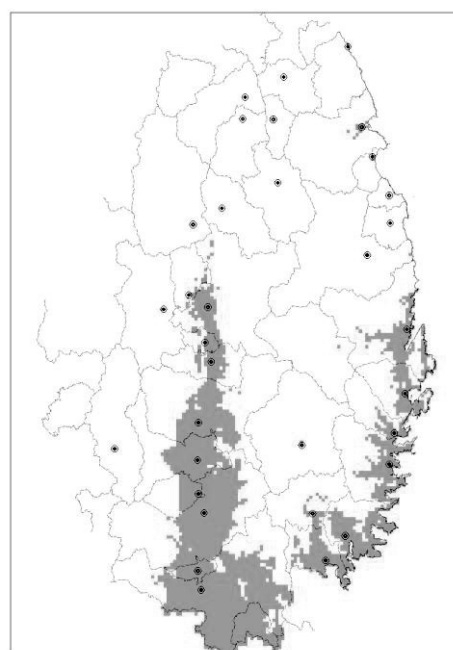


図2 ヒトスジシマカ生息リスクマップ (R1. 8. 31 時点)

輸送され、気温の高い時期限定で繁殖していることが考えられた。特に、盛岡市ではH21年度に市街地南部である仙北町で初めて生息が確認されて以後、毎年その生息域を拡大し、H29年度には市街地北部のみたけ地区での定着が確認されている。盛岡市市街地は、ほぼ同蚊の生息北限地域であるが、夏季から秋季限定で繁殖した同蚊が卵で越冬し、春に孵化できる条件が年々整いつつあると考えられた。

5 まとめ

ヒトスジシマカは、本県において生息分布が徐々に拡大してきていることが明らかとなった。同蚊の生息には、気温等の自然条件に加えて、交通機関による蚊の輸送や人口密度などの社会的な条件が関与していることが示唆された。

6 参考文献

- ・Kobayashi M., Nihei N. and Kurihara T.: Analysis of Northern Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by Geographical Information System. *J. Med. Entomol.*, 39, 4-11, 2002
- ・佐藤卓, 松本文雄, 安部隆司, 二瓶直子, 小林睦生.: 岩手県におけるヒトスジシマカの分布と GIS を用いた生息条件の解析. *衛生動物*, 63, 3, 195-204, 2012

研究成果報告書（14）

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 菊池一馬
1 目的	<p>大気中に浮遊する微小粒子状物質（以下「PM_{2.5}」という。）はイオン成分、炭素成分及び無機元素成分などから構成されており、成分組成を解析することはPM_{2.5}の発生源を解明する手がかりとなる。</p> <p>本報告では、令和2年度に実施した県内2地点のPM_{2.5}成分分析結果について、地点及び成分の相関等による解析を行い、各地点におけるPM_{2.5}の起源等について考察した。</p>
2 方法	<p>（1）調査地点及び調査期間</p> <p>調査地点は滝沢市菓子局及び一関市三反田局の2地点とした。菓子局は周辺に固定発生源及び移動発生源が少なく、自動測定機によるPM_{2.5}濃度は県内の他の地点に比べて低い。三反田局は交通量の多い国道4号線に隣接しており、PM_{2.5}濃度は菓子局に比べ高い。</p> <p>調査期間は、春季（2020年5月13日～5月26日）、夏季（2020年7月22日～8月4日）、秋季（2020年10月20日～11月2日）、冬季（2021年1月21日～2月3日）とした。1試料の採取時間は毎日0時を起点とする24時間とした。</p> <p>（2）測定方法</p> <p>測定項目は質量濃度、イオン成分（Cl⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻、NH₄⁺、Na⁺、K⁺、Ca²⁺及びMg²⁺）、無機元素成分（Na、Al、K、Ca、Sc、V、Cr、Mn、Fe、Ni、Zn、As、Sb及びPb）及び炭素成分（OC及びEC）とした。サンプリング機器はThermo社製FRM2025i型を用い、分析方法等は「大気中微小粒子状物質（PM_{2.5}）成分測定マニュアル」（環境省）に沿って実施した。</p> <p>（3）解析方法</p> <p>ある1成分についての両地点の相関図を作成し、相関の強さとプロットの偏り方を見ることで、両地点の濃度推移が一致する成分や地点間の濃度に差がある成分を洗い出し、PM_{2.5}汚染の規模が広域汚染か地域汚染かについて考察した。</p> <p>また、PM_{2.5}の発生源解析のための示されている指標成分¹⁾を参考に、2成分の相関図を作成し、相関の強さとプロットの偏り方を見ることで、発生源からの影響の度合いを考察した。</p>
3 結果と考察	<p>（1）PM_{2.5}濃度及び主要成分</p> <p>両地点のPM_{2.5}濃度範囲はそれぞれ菓子局1.0～25.0μg/m³、三反田局1.3～22.4μg/m³であり、両地点の相関は非常に強かった（r=0.91）（図1）。また、PM_{2.5}の主要成分であるSO₄²⁻（r=0.94）やNH₄⁺（r=0.94）やOC（r=0.93）なども両地点の相関が非常に強く、両地点のPM_{2.5}は同様の発生源による広域汚染の影響を強く受けていると考えられた（図2）。</p> <p>ECの両地点の相関は強く（r=0.74）、また、ほぼ全ての試料において三反田局が菓子局を上回っていた（図3）。ECの主な発生源としてディーゼル排ガスがあり、三反田局は交通量の多い国道沿いに位置することから、自動車排ガスの影響が観測された結果と考えられた。</p> <p>（2）主要成分以外のイオン成分</p> <p>イオン成分のうちNa⁺とMg²⁺の相関は非常に強く（菓子局r=0.99、三反田局r=0.96）、また、2成分の重量比（Mg²⁺/Na⁺）は海塩組成比²⁾と同程度であり（菓子局0.09、三反田局0.08、文献値0.12）、これらのイオンは海塩を主な起源としていると考えられた（図4）。なお、同じく海塩成分であるCl⁻は半揮発性であり高温時にガス化</p>

が促進されるため、特に春季及び夏季に低濃度となり Na^+ や Mg^{2+} との相関は弱かった。

(3) 無機元素成分

無機元素成分は主要成分に比べ $\text{PM}_{2.5}$ の重量に占める割合は低いが発生源の特徴が表れやすい成分であるため、発生源解析にとって重要である。代表的なものでは、重油燃焼の指標としての V と Ni や、石炭燃焼の指標としての Pb と As がある。V と Ni の相関は両地点とも強い相関（巣子局 $r=0.78$ 、三反田局 $r=0.84$ ）があり、両地点ともに重油燃焼の影響を受けていると考えられた（図5）。Pb と As の相関は、巣子局は強く（ $r=0.85$ ）石炭燃焼による影響を受けていると考えられたが、三反田局は相関がやや弱く（ $r=0.68$ ）、石炭燃焼以外の発生源の影響が示唆された（図6）。また、V、Ni、As 及び Pb のいずれも平均値は三反田局の方が巣子局より高く、三反田局における地域発生源からの上乗せが示唆された。

4 まとめ

両地点の $\text{PM}_{2.5}$ 濃度及び主成分の相関はいずれも非常に強く、両地点の $\text{PM}_{2.5}$ は同様の発生源による広域汚染の影響を強く受けていると考えられた。また、三反田局においては自動車排ガスの影響と考えられる EC の上昇が見られた。

発生源の解析では、海塩、重油燃焼及び石炭燃焼の影響が考えられ、三反田局においては地域発生源からの上乗せが示唆された。

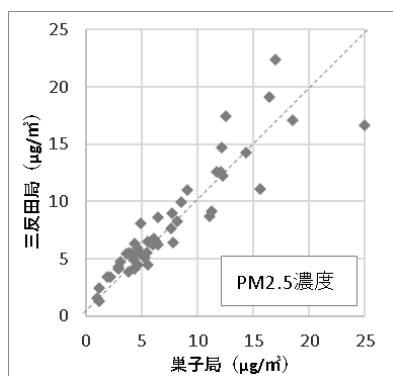


図1 両地点の $\text{PM}_{2.5}$ 濃度の相関

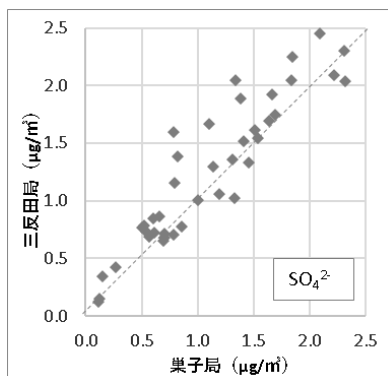


図2 両地点の SO_4^{2-} の相関

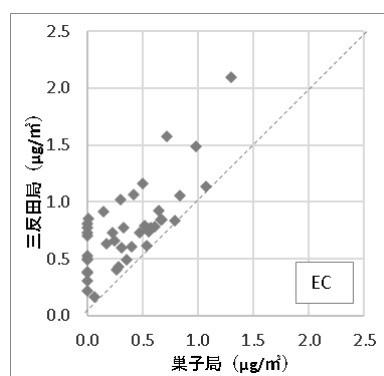


図3 両地点の EC の相関

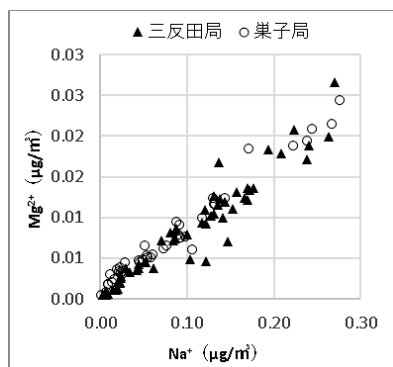


図4 Na^+ と Mg^{2+} の相関

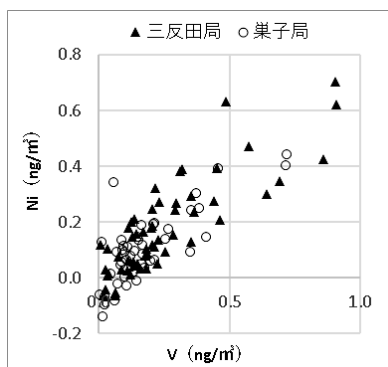


図5 V と Ni の相関

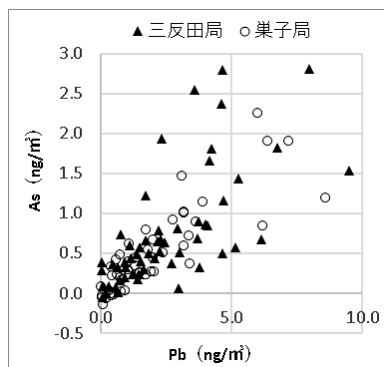


図6 Pb と As の相関

参考文献

- 1) 環境省：”大気中微小粒子状物質（ $\text{PM}_{2.5}$ ）成分測定マニュアル 無機元素測定法 第2版”，2019年5月
- 2) 桑本融：”海水の無機成分”，化学と生物，Vol.22，No.7，1984

研究成果報告書（15）

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	山中 拓哉、太田 美香子、高橋 幸子、佐藤 德行

1 目的

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ペロ毒素遺伝子の検出により実施している。

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、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た。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。

本件に関しては、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(FeCl₃)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。また、SR DNA抽出キット(栄研化学)を用いた場合の阻害軽減効果についての検討も併せて行った。

2 方法

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)。検体25gにノボビオシン加mEC培地225mlを加えて混和後、35°Cで20時間培養した増菌培養液からアルカリ熱抽出法もしくはSR DNA抽出キット(栄研化学)により遺伝子抽出を行った。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°C、1時間行った。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。FeCl₃についてはフィルター滅菌した溶液をLAMP反応液に添加した。

3 結果

(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

結果を図1に示した。10検体中3検体(検体7, 8, 10)は陽性、7検体は陰性と判定されLAMP反応の阻害が起こっていることが示唆された。鶏肉/豚肉および生肉/加熱品/加工品といった検体種による明確な差は認められなかった。

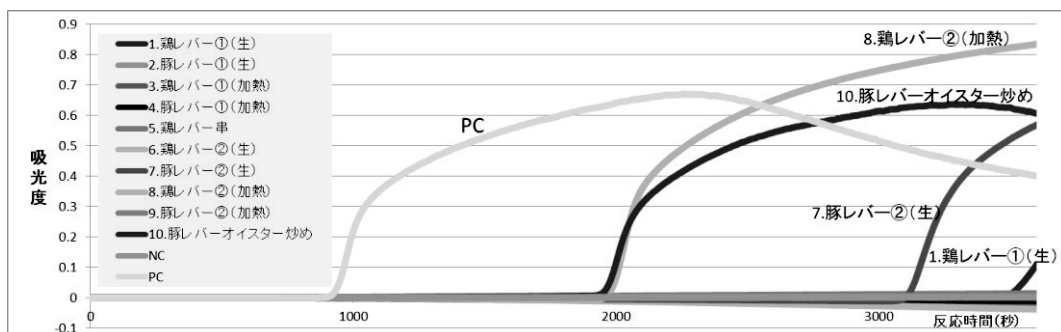


図1 LAMP 反応による外因性コントロールの増幅 (0.4mM FeCl₃添加)

(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。0.4mM FeCl₃を添加した場合は10検体全てが陽性と判定された。(1)で陽性となった3検体に関しては増幅開始時間の短縮がみられ、阻害が軽減していることが示唆された。以上より、FeCl₃添加による増幅阻害軽減効果が示されたと考えられる。また、2検体についてFeCl₃添加濃度(0~0.8mM)の詳細な解析を行い、両検体とも無添加時は増幅せず0.2~0.8mM添加時は増幅することを示した(図3)。しかし、一方の検体(豚レバー①加熱)においては0.2mM添加時に阻害軽減効果が若干弱まっており、この検体においては添加量の不足が示唆された、このことから、現状では0.4mM FeCl₃添加が最適な条件と考えられる。

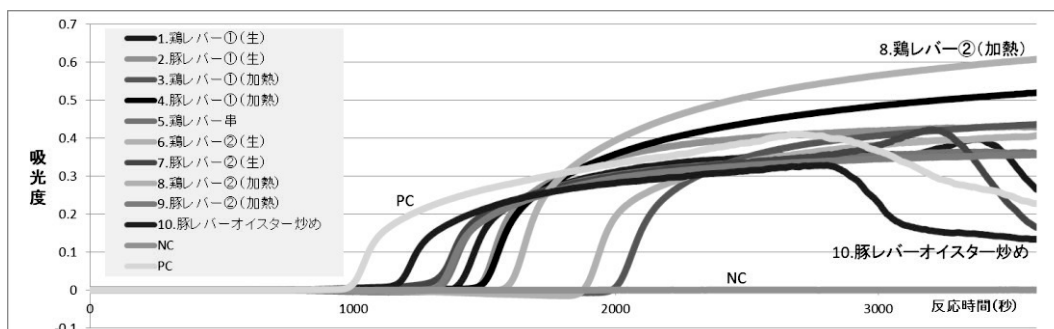


図2 LAMP 反応による外因性コントロールの増幅 (0.4mM FeCl₃添加)

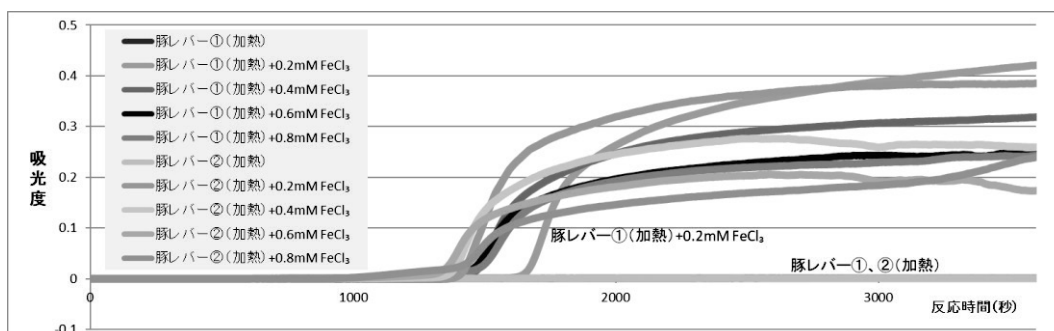


図3 LAMP 反応による外因性コントロールの増幅 (0~0.8mM FeCl₃添加)

(3) SR DNA 抽出キット (栄研化学) による遺伝子増幅阻害の軽減について

結果を図4に示した。本キットを使用して抽出したDNAについては10検体全てがLAMP陽性と判定され、増幅阻害軽減効果が示された。

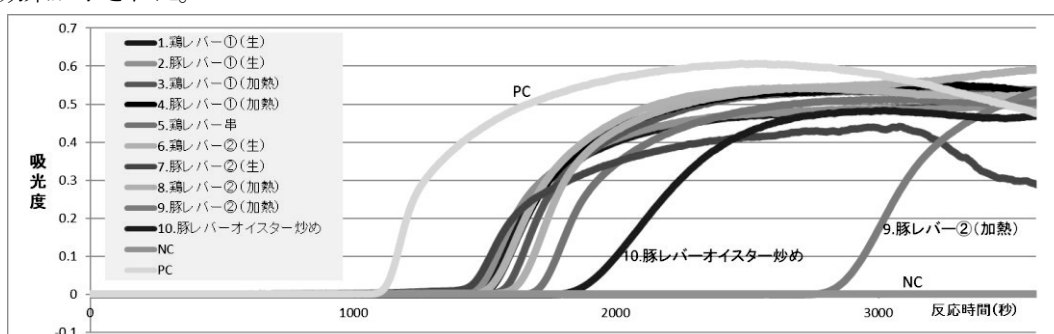


図4 LAMP 反応による外因性コントロールの増幅 (SR DNA 抽出キット使用)

4 まとめ

レバーを含有する食品検体において、LAMP法における遺伝子増幅阻害が認められた。これについて①反応液への0.4mM FeCl₃添加、および②SR DNA抽出キットの使用により軽減できることが分かった。本研究により確定した反応条件は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（16）

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	山中 拓哉、太田 美香子、高橋 幸子、佐藤 徳行
1 目的	<p>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。</p> <p>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。</p>
2 方法	<p>2017～20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。</p>
3 結果	<p>（1）青色小コロニーの出現率</p> <p>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。</p> <p>（2）分離菌株の同定</p> <p>上記所見を示すコロニーから29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を用いて解析した結果、25株が<i>Staphylococcus</i>属であり、環境中に常在する菌種であることが判明した（表1）。</p> <p>（3）菌増殖におけるメンブランフィルターの影響</p> <p>分離菌株9株について培地に貼付したMF表面に塗抹して培養したものと培地表面で直接塗抹培養したものの増殖状態を比較した。その結果、解析を行った全ての菌株において、MF上での増殖促進が認められた（表1）。これに対し大腸菌、大腸菌群に関してはMFの有無は影響せず両方で同程度の増殖が見られた。</p> <p>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ラ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。</p>

表 1 選択分離培地上に発育した青色小コロニーから分離された菌株

検体採取日	種類	グラム陽性球菌	菌種*	MFによる増殖促進
H29.6.21	河川	○	<i>Staphylococcus xylosus</i>	○
H29.7.4	海域	○	<i>Staphylococcus hominis</i>	○
H29.7.19	河川	○	<i>Staphylococcus cohnii</i>	○
H29.9.6	河川	○	<i>Staphylococcus cohnii</i>	○
H29.11.8	河川	○	<i>Staphylococcus xylosus</i>	未実施
H29.11.28	海域	○	<i>Staphylococcus warneri</i>	未実施
H30.1.17	河川	○	<i>Staphylococcus cohnii</i>	未実施
H30.5.9	河川	○	<i>Staphylococcus warneri</i>	未実施
H30.5.9	河川	○	<i>Staphylococcus cohnii</i>	未実施
H30.5.15	ダム	○	<i>Staphylococcus warneri</i>	未実施
H30.6.20	河川	○	<i>Staphylococcus warneri</i>	未実施
H30.6.27	河川	○	<i>Staphylococcus cohnii</i>	未実施
H30.7.3	海域	○	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	未実施
H30.7.3	海域	○	<i>Staphylococcus warneri</i>	未実施
H30.7.3	海域	○	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	未実施
H30.7.4	河川	○	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	未実施
H30.7.18	河川	○	<i>Staphylococcus xylosus</i>	未実施
H30.7.18	河川	○	<i>Staphylococcus xylosus</i>	未実施
H30.7.18	河川	○	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	未実施
H30.7.18	河川	○	<i>Staphylococcus xylosus</i>	未実施
H30.7.18	河川	○	<i>Staphylococcus cohnii</i>	未実施
H30.8.8	河川	○	<i>Staphylococcus cohnii</i>	未実施
H30.8.8	河川	○	<i>Staphylococcus xylosus</i>	未実施
R1.5.14	ダム	○	<i>Staphylococcus warneri</i>	未実施
R2.11.4	河川	○	同定不能	○
R2.11.4	河川	○	同定不能	○
R2.11.4	河川	○	<i>Aerococcus viridans</i>	○
R2.11.4	河川	○	同定不能	○
R2.11.4	河川	○	<i>Staphylococcus xylosus</i>	○

*キット試薬 (ID32スタファピ[®]、N-IDテストSP-18) により同定

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。今後も本研究で得たデータを基に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、検査手法を改善していく必要があると考える。