

## 2 研究概要報告

## 研究成果報告書（1）

研究課題名	食中毒原因となる自然毒の特定方法等に関する研究
担 当	衛生科学部 主査専門研究員 宮手 公輔
<p><b>1 目的</b></p> <p>本研究では、令和3年度から令和5年度までの3年間で、当センターにおける自然毒分析法の充実強化を図り、本県における健康危機管理体制の更なる強化を目指すものである。具体的には、LC-MS/MSを用いた分析可能成分の拡充、植物やキノコの種の同定を目的としたPCR法を導入し、これらについて手順化することを目標とする。</p> <p>令和4年度は、食中毒事案発生時のキノコ種の同定を目的としたPCR法の適用について検討を行った。PCR法によるキノコ種の同定については、キノコ種毎にプライマーセットを設計しDNA塩基配列の特定領域の増幅の有無について電気泳動装置を用いて確認することにより当該キノコ種であるかを確認する方法があるが、この方法ではキノコの種類毎にプライマーセットを準備する必要があり、毒キノコ種だけでも数十種にもなるプライマーセットを準備して試験検査を行うことは現実的ではない。そのため、食中毒事案発生時のキノコ種の同定を目的として、既報<sup>1)</sup>において報告されているユニバーサルプライマーを用い、サンガーシーケンス法での塩基配列解析による同定方法の検討を行った。</p> <p><b>2 方法</b></p> <p>試験検体に市内で購入した食用キノコ6種（しいたけ、えのき、エリンギ、なめこ、ぶなしめじ及びまいたけ）の子実体を粉碎したものを、各検体をワンステップ法（KOD FX）及び固相抽出法（DNeasy Plant mini Kit）によりDNA抽出精製・増幅したのち、電気泳動でのバンドを確認した。更にダイレクトシーケンス法で塩基配列を確認しBLAST検索した。</p> <p>各試験検体についてバイオマッシャーII（ニッピ社製）に100 mgを分取し、次の(1)及び(2)の方法によりDNAを抽出（精製）した。抽出液を増幅した増幅調製液について電気泳動装置 QIAxcel（キアゲン社製）を用いて増幅バンドの確認を行った。</p> <p>(1) KOD FX（東洋紡社製）を用いた抽出・増幅</p> <p>検体を採取したバイオマッシャーIIに100 mM Tris-HCl (pH9.5)・20 mM EDTA・1 M KCl Buffer (BufferA)を100 µL入れすりつぶし、95°Cで10 min加熱後、12,000 rpmで10 min遠心分離した上清1 µLをKOD FX PCR 反応液49 µLと合わせて、次の条件で増幅した。</p> <p>【増幅条件】94°C (2 min) → [98°C (10 sec) → 58°C (30sec) → 68°C (1 min)]×30 cycles → 4°C (∞)</p> <p>(2) DNeasy Plant mini Kit（キアゲン社製）を用いた精製・増幅</p> <p>検体をバイオマッシャーIIに100 mg分取してすりつぶしたのち、DNeasy Plant mini Kitのプロトコルに従いDNAの抽出精製を行った。得られたDNA抽出液は、GoTaq Master mix（Promega社製）及びPlatinum II Hot start PCR master mix (2×)（サーモフィッシャー社製）を用いて増幅した。</p> <p>【増幅条件（GoTaq Master mix）】</p> <p style="padding-left: 40px;">94°C (2 min) → [94°C (30 sec) → 54°C (30sec) → 72°C (1 min)]×30 cycles → 72°C (2 min) → 4°C (∞)</p> <p>【増幅条件（Platinum II Hot start PCR master mix (2×)）】</p> <p style="padding-left: 40px;">94°C (2 min) → [94°C (15 sec) → 60°C (15sec) → 68°C (30 min)]×30 cycles → 4°C (∞)</p>	

更に、(1)及び(2)のそれぞれの増幅調製液を MonoFas DNA 精製キット I を用いて精製後、BigDye Terminator v3.1 cycle Sequencing Kit を用いて蛍光ラベル化し、SeqStudio Genetic Analyzer (サーモフィッシャー社製) を用いてシーケンス分析を行った。

なお、増幅及びシーケンスに使用したプライマーは表 1 のとおりであり、プライマーセット (F-primer/R-primer) を ITS1/ITS2、ITS3/ITS4、ITS5/ITS4 及び ITS1/ITS4 とした。

表 1 使用プライマー

Name	Sequence (5'-3')	Length(bp)
ITS 1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	19
ITS 2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	20
ITS 3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	20
ITS 4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	20
ITS 5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	22

### 3 結果

- 電気泳動の結果、KOD FX を用いて抽出したもののうち、ITS1/ITS2 で増幅したものはしいたけ以外の 5 試料で 2 重バンドとなったが、それ以外は概ね理論上の塩基長に単一のバンドが得られた。
- KOD FX 及び DNeasy Plant mini Kit のいずれの方法においても、シーケンスにより F-primer と R-primer による塩基配列が完全に一致するプライマーセットは少なかった。そのため、プライマーセットを横断的に参照して概ね 200 bp 以上の同一配列を示す塩基配列を抽出して BLAST 検索を行った。
- 上記により得られた塩基配列の長さ(bp)とその配列により BLAST 検索を行った結果の相同性(%)を表 2 に示す。
- 得られた塩基配列の長さは、275~667 bp とばらつきがあったものの、いずれにおいても高い相同性で試料そのものが検索結果として得られ、その相同性は 96.72 ~100.00 %であった。
- ワンステップ法と固相抽出法を比較すると、固相抽出法ではプライマー間で塩基配列が一致する度合いが高く、長い塩基配列が得られる傾向にあった。

表 2 BLAST 検索の概要

sample		KOD FX		Dneasy Plant mini Kit			
				Gotaq Master mix		Platinum II Hot start PCR master mix	
学名	日本名	塩基長 (bp)	相同性 (%)	塩基長 (bp)	相同性 (%)	塩基長 (bp)	相同性 (%)
<i>Lentinula edodes</i>	しいたけ	534	100.00	582	100.00	608	100.00
<i>Flammulina velutipes</i>	えのき	608	99.84	484	98.98	667	99.55
<i>Pleurotus eryngii</i>	エリンギ	565	100.00	565	100.00	611	100.00
<i>Pholiota microspora</i>	なめこ	275	100.00	407	100.00	380	100.00
<i>Hypsizygyus marmoreus</i>	ぶなしめじ	295	99.66	564	100.00	538	100.00
<i>Grifola frondosa</i>	まいたけ	457	96.72	550	98.91	484	99.59

### 4 今後の研究方向等

検討を行った食用の 6 種類のキノコについて、ユニバーサルプライマーを用いたサンガーシーケンス法により概ね種の特性が可能であった。

本研究で行ったサンガーシーケンス法は、ユニバーサルプライマーを用いた場合には、複数のキノコ等が混合された調理品等においては適切な塩基配列データが得られないため特定は不可能である。そのため、今後は調理品等への適用を目指し NGS を用いた手法について検討を行う。

また併せて令和 3 年から行ってきた本研究について、その方法を手順化することにより当センターでの自然毒食中毒対応マニュアルの制定を行う。

1) 野村ら, 食中毒を引き起こす有毒キノコの種特異的プライマーによるスクリーニング法の開発, 食衛誌, 58(3), 132-142,(2017)

## 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新公定分析法への対応
担 当	衛生科学部 主任専門研究員 涌井 玲、主査専門研究員 今野 鈴子

**1 目的**  
食品表示法に基づく食品表示基準により、これまで、大豆および大豆を原材料とする加工食品への「遺伝子組換えでない」との表記は「分別生産流通管理をして、意図せざる混入を5%以下に抑えている場合」に認められていた。しかし、令和5年4月からは「分別生産流通管理をして、遺伝子組換えの混入がないと認められる大豆および大豆を原材料とする加工食品」にしか「遺伝子組換えでない」との表記ができないことに変更された。  
このため、消費者庁では令和3年9月15日付け通知により「遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法」（以下、「 $\Delta\Delta Cq$ 法」という。）を示した。  
本研究は、令和5年度以降の食品収去検査においてこの表示基準変更に対応した検査を実施するため、当所における新公定法の実施体制を確立することを目的とする。

**2 方法**  
現在、国内に流通している遺伝子組換えダイズは、Roundup Ready Soybean (40-3-2)（以下、「RRS」という）、Liberty Link Soybean (Event A2704-12)（以下、「LLS」という。）及びRoundup Ready 2 Yield (Event MON89788)（以下、「RRS2」という。）の3種類であり、 $\Delta\Delta Cq$ 法もこの3種類を検知する試験を実施することとなっている。（1）の4種の試料について、（2）、（3）を用いて試験を実施した。  
（1）試料  
RRSを含む標準試料として、Soya Bean GMO Standard GTS 40-3-2 1%および0.1%（シグマアルドリッチジャパン合同会社）を、LLSを99%以上含む標準試料としてAOCs 0707-B Bayer A2704-12 Soybean Leaf DNA（株プラクティカル）を、RRS2を99%以上含む標準試料としてAOCs 0906-B Monsanto MON89788 Soybean Powder（株プラクティカル）を使用した。  
（2）DNA抽出  
DNeasy Plant mini kit（QIAGEN社）を用いて、検査方法<sup>1)</sup>のシリカゲル膜タイプキット法により実施した。  
（3）機器  
試料粉碎：ナイフミル GM 200（Retsch社）  
分光光度計：Genespec III（日立ハイテクサイエンス社）  
リアルタイムPCR：QuantStudio 5（アプライドジェネラルシステムズ社）

**3 結果と考察**  
 $\Delta\Delta Cq$ 法は、DNA試料液及び判定基準となる標準試料液それぞれの内在性遺伝子における $Cq$ 値と、組換え遺伝子における $Cq$ 値の差 [ $\Delta Cq = Cq(\text{組換え遺伝子}) - Cq(\text{内在性遺伝子})$ ]を算出し、得られるDNA試料液の $\Delta Cq$ 値と標準試料液の $\Delta Cq$ 値の差 [ $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{DNA試料液}) - \Delta Cq(\text{標準試料液})$ ]を用いて検体陽性かどうかの判定を行う。 $\Delta Cq$ 値は混入率の対数値と負の相関があるため、混入率が高いほど $\Delta Cq$ 値は低くなる。  
2（1）の4種の標準試料について各2併行の試験を実施した結果の増幅曲線を図1に示す。また、この増幅曲線から求めた $Cq$ 値および $\Delta Cq$ 値を表1に示す。  
表1に示した $\Delta Cq$ 値から $\Delta\Delta Cq$ 値を求め、図2に示す検査方法<sup>1)</sup>に記載の判定フローにより判定した結果を表2に示す。このことから、それぞれの標準試料について、正しく判定できていることがわかった。  
RRSについては1%含有標準試料のみならず、0.1%含有標準試料についても陽性であると判定できた。しかし既報<sup>2)</sup>では、ダイズにおける $\Delta\Delta Cq$ 法の試験室間共同試験において、P35Sでは90回測定中88回で陽性となったと報告されていることから、0.1%含有試料において陰性と判断する必要があることを考慮する必要があると考えられる。

**4 今後の研究方向等**  
遺伝子組換え食品検査実施標準作業書（SOP No：5-61-2）を作成し、当所における改正食品表示基準に対応した検査体制を整備した。引き続き、本県の食の安全を支えるために必要な試験検査体制の充実強化を図っていく。

参考文献 1) 「食品表示基準について」（平成27年3月30日付け消食表第139号 消費者庁次長通知）  
別添 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法 2021年9月15日改正  
2) 高島令王奈ら「改正食品表示基準に対応した遺伝子組換えダイズ混入の判定に係る定性PCR検査法の開発」第117回日本食品衛生学会抄録, 33, 2021年

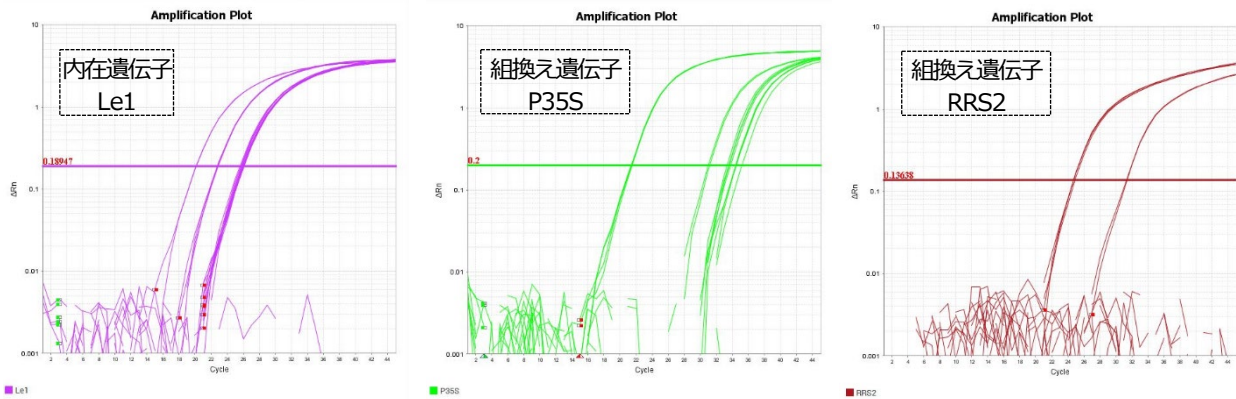


図1 4種標準試料のPCR増幅曲線

表1 4種標準試料の試験における $\Delta\Delta Cq$ 値の算出結果

Sample Name	Cq	Cq mean	Sample Name	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$	Sample Name	Cq	Cq mean	Sample Name	Cq	Cq mean	$\Delta Cq$
GM control	30.97	31.06	GM control	20.11	20.11	10.95	GM control	31.32	31.29	GM control	20.11	20.11	11.18
GM control	31.15		GM control	20.10			GM control	31.25		GM control	20.10		
RRS 1%-1	33.78		RRS 1%-1	25.92		7.86	RRS 1%-1	-		RRS 1%-1	25.92		-
RRS 1%-1	33.33		RRS 1%-1	25.93		7.40	RRS 1%-1	-		RRS 1%-1	25.93		-
RRS 1%-2	33.54		RRS 1%-2	25.95		7.60	RRS 1%-2	-		RRS 1%-2	25.95		-
RRS 1%-2	33.60		RRS 1%-2	25.86		7.74	RRS 1%-2	-		RRS 1%-2	25.86		-
RRS 0.1%-1	34.46		RRS 0.1%-1	26.00		8.46	RRS 0.1%-1	-		RRS 0.1%-1	26.00		-
RRS 0.1%-1	34.42		RRS 0.1%-1	26.01		8.42	RRS 0.1%-1	-		RRS 0.1%-1	26.01		-
RRS 0.1%-2	34.52		RRS 0.1%-2	26.04		8.48	RRS 0.1%-2	-		RRS 0.1%-2	26.04		-
RRS 0.1%-2	35.21		RRS 0.1%-2	26.03		9.18	RRS 0.1%-2	-		RRS 0.1%-2	26.03		-
LLS-1	21.41		LLS-1	22.85		-1.44	LLS-1	-		LLS-1	22.85		-
LLS-1	21.39		LLS-1	22.77		-1.38	LLS-1	-		LLS-1	22.77		-
LLS-2	21.49		LLS-2	22.74		-1.25	LLS-2	-		LLS-2	22.74		-
LLS-2	21.45		LLS-2	22.79		-1.34	LLS-2	-		LLS-2	22.79		-
RRS2-1	-		RRS2-1	25.54		-	RRS2-1	24.68		RRS2-1	25.54		-0.87
RRS2-1	-		RRS2-1	25.65		-	RRS2-1	24.86		RRS2-1	25.65		-0.79
RRS2-2	-		RRS2-2	25.79		-	RRS2-2	24.68		RRS2-2	25.79		-1.11
RRS2-2	-		RRS2-2	25.73		-	RRS2-2	24.68		RRS2-2	25.73		-1.05

1 各ウェルの判定スキーム

- 得られた $\Delta\Delta Cq$ 値が0以下の場合 [ $\Delta\Delta Cq \leq 0$ ]、そのウェルは「+」と判定する。
- 得られた $\Delta\Delta Cq$ 値が0より大きい場合 [ $\Delta\Delta Cq > 0$ ] 又はDNA試料液におけるP35S検知試験若しくはRRS2検知試験においてCq値が得られず $\Delta Cq$ 値が算出できない場合、そのウェルは「-」と判定する。

2 各試料液の判定スキーム

- 2ウェル共に「+」と判定された場合、当該DNA試料液は試料液陽性と判定する。
- 2ウェル共に「-」と判定された場合、当該DNA試料液は試料液陰性と判定する。

図2  $\Delta\Delta Cq$ 法における判定フロー

表2 4種標準試料の試験における判定結果

Sample Name	$\Delta\Delta Cq$	ウェル判定	試料液判定	Sample Name	$\Delta\Delta Cq$	ウェル判定	試料液判定
RRS 1%-1	-3.10	+	+	RRS 1%-1	-	-	-
RRS 1%-1	-3.56	+		RRS 1%-1	-	-	-
RRS 1%-2	-3.36	+	+	RRS 1%-2	-	-	-
RRS 1%-2	-3.21	+		RRS 1%-2	-	-	-
RRS 0.1%-1	-2.49	+	+	RRS 0.1%-1	-	-	-
RRS 0.1%-1	-2.54	+		RRS 0.1%-1	-	-	-
RRS 0.1%-2	-2.47	+	+	RRS 0.1%-2	-	-	-
RRS 0.1%-2	-1.77	+		RRS 0.1%-2	-	-	-
LLS-1	-12.39	+	+	LLS-1	-	-	-
LLS-1	-12.33	+		LLS-1	-	-	-
LLS-2	-12.20	+	+	LLS-2	-	-	-
LLS-2	-12.29	+		LLS-2	-	-	-
RRS2-1	-	-	-	RRS2-1	-12.05	+	+
RRS2-1	-	-	-	RRS2-1	-11.97	+	+
RRS2-2	-	-	-	RRS2-2	-12.29	+	+
RRS2-2	-	-	-	RRS2-2	-12.23	+	+

## 研究成果報告書（3）

<b>研究課題名</b>	<b>残留農薬検査における対象農産物拡充の検討</b>
<b>担 当</b>	<b>衛生科学部 主任専門研究員 川村 あさひ</b>

### 1 目的

当センターの残留農薬検査における前処理方法は、厚生労働省が定める通知試験法により実施しているが、この試験法の他に、株式会社アイスティサイエンスが開発したSTQ法が知られている。

STQ法は簡便で迅速性等に優れた手法であるため、この試験法を採用することにより、有機溶媒使用量の削減や分析時間の短縮による業務の効率化を図ることができる。

そのため、当センターでは、令和2年度からSTQ法の導入について検討を進めている。

令和2年度から3年度は、GC-MS/MSを用いたSTQ GC-B法について、代表農産物10品目を選定し、「妥当性評価ガイドライン」に基づく妥当性評価を完了させたところである。

令和4年度は、検査対象農産物の拡充を図ることを目的として、これまで検査対象外であった農産物を含む17品目について、添加回収試験を実施したので、その概要を報告する。

### 2 方法

品目毎に、試験対象である農薬を含まない試料（ブランク試料）に試験対象の農薬を添加した試料（添加試料）を調製し、STQ GC-B法に従い試験を行った。品目は、収去対象の12品目と、これまで収去対象外の5品目の計17品目とし、試験対象の農薬は181成分とした。

添加回収試験は、農薬標準の添加は、0.04ppmの1濃度とし、1日1回（5併行）の試験を実施した。

GC-MS/MSの測定条件を表1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」に基づき、選択性、真度（回収率）、精度及び定量限界を求め、それぞれの目標値に適合しているかを確認した。

**表1 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℃
オ ー プ ン 温 度	80℃ (1 min) - 20℃/min - 140℃ - 4℃/min - 200℃ - 8℃/min - 300℃ - 20℃/min - 310℃ (5.5 min) → 310℃ (ポストラン5 min)
トランスファーライン温度	290℃
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℃
測 定 モ ー ド	MRM

### 3 結果

添加回収試験の結果について、表2に評価項目毎の適合数を、図1に回収率の分布を示す。

**表2 評価項目毎の適合数（対象農薬181成分中）**

品目	選択性	回収率	併行精度	定量限界	全評価項目
アスパラガス	181	173	179	181	173
かぼちゃ	180	179	180	181	179
こまつな	181	180	178	181	177
さやいんげん	180	178	180	180	176
さやえんどう	180	180	181	181	179
しゅんぎく	181	173	180	181	173
だいこん	180	179	181	181	179
とうもろこし	181	179	179	181	177
にんじん	181	180	181	181	180
はくさい	181	176	181	181	176
レタス	179	173	181	181	172
かき	181	180	181	180	179
グレープフルーツ	180	152	166	181	151
なし	178	175	180	181	172
パイナップル	181	180	181	181	180
バナナ	179	180	181	180	177
ぶどう	178	177	180	181	175

### 4 今後の研究方向等

現在、LC-MS/MSを用いた妥当性評価を実施しているところであり、総合的な結果が良好であれば残留農薬検査実施標準作業書を改定し、STQ法にて残留農薬検査を実施していくこととする。また、他の農産物についても添加回収試験を実施し、検査対象品目を拡充することで、本県の食の安全を支えるために必要な試験検査体制の充実強化を図っていく。

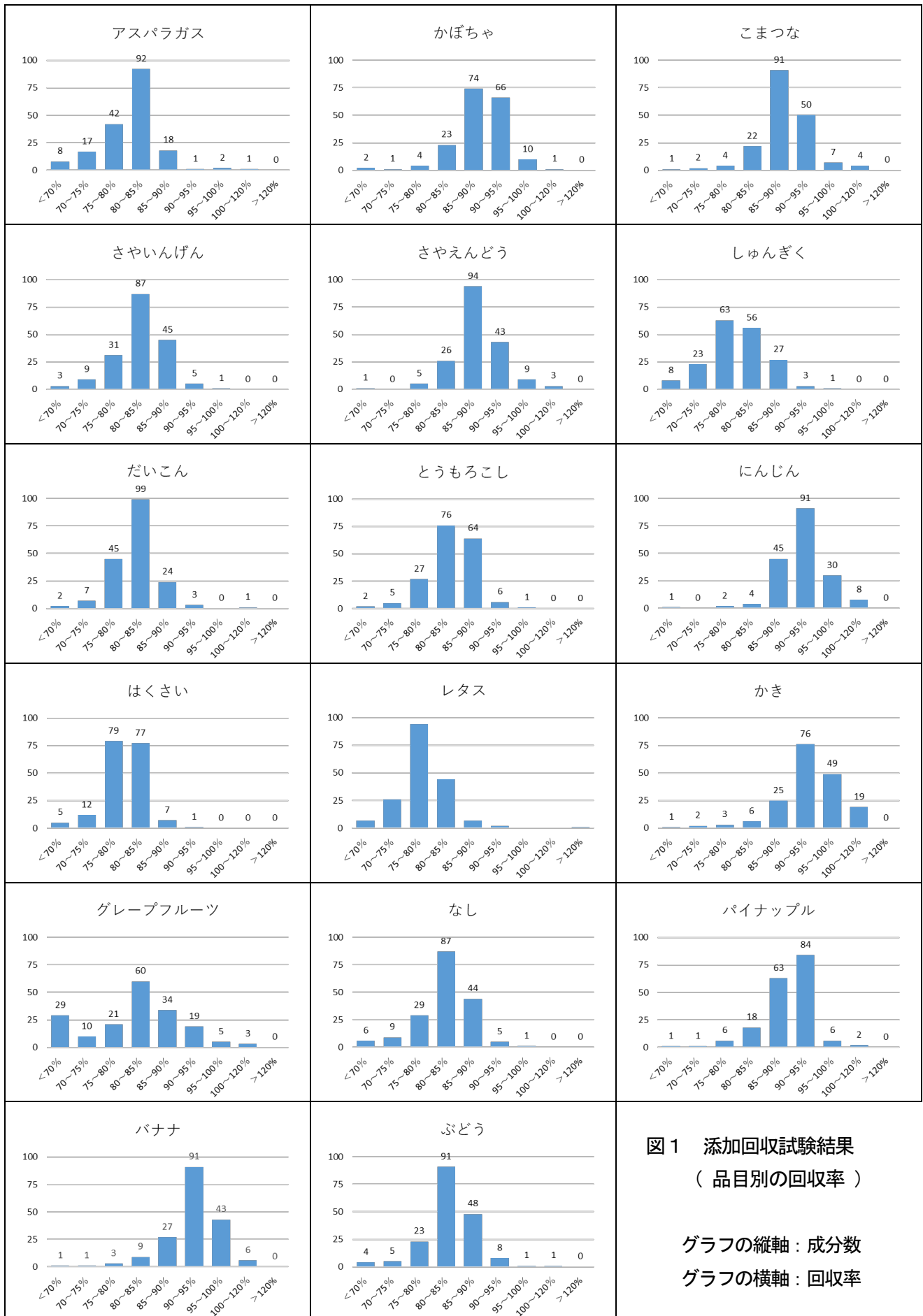


図1 添加回収試験結果  
(品目別の回収率)

グラフの縦軸：成分数

グラフの横軸：回収率

## 研究成果報告書（４）

<b>研究課題名</b>	<b>食品添加物（指定外着色料）検査導入のための検討</b>
<b>担当</b>	<b>衛生科学部 主査専門研究員 今野 鈴子</b>

### 1 目的

日本では現在、12種類の酸性タール色素の使用が許可されており、食品表示基準により食品に使用した場合は容器包装に表示することが義務付けられている。当センターでは現在、食品表示基準への適合性を確認するため、酸性タール色素12種類の検査を実施している。近年、輸入食品から国内で使用できない指定外着色料が検出された食品衛生法違反事例（以下、違反事例とする。）が散見されているが、これまで当センターでは指定外着色料を検査対象としていなかったことから、検査体制の構築を目指して本検討を行うものである。

### 2 方法

#### (1) 試料

違反事例で散見されているチョコレート、ビスケット、タピオカ、蒸留酒のほか、着色料が使用されることが多いグミキャンディ、ジュースを試料とした。試料は全て、県内で流通している食品を購入した。

#### (2) 色素標準品

違反事例で多く検出されているアズルピン(AZO, C. I. 14720)、キノリンイエロー(QY, C. I. 47005)、パテントブルーVF(PBVF, C. I. 42045)の他、アシッドブルー3(AB3, C. I. 42051)、ブラックPN(BP, C. I. 28440)、オレンジG(OG, C. I. 16230)、アシッドレッド13(AR13, C. I. 16045)、オレンジII(O2, C. I. 15510)の計8種を使用した。QYは、メーカーによりモノスルホン体(QY-mono)とジスルホン体(QY-di)の混合比率が違うとの報告<sup>1)</sup>があり、QY-monoとQY-diが同程度混合されているSigma-Aldrich社製を用いた。PBVF、O2については富士フィルム和光純薬㈱製を、その他の色素は東京化成工業㈱製を用いた。各色素標準品10mgを精秤し50%メタノールで溶解したものを標準原液とした。各色素標準原液を混合し50%メタノールで50µg/mLとしたものを色素混合標準溶液として使用した。

#### (3) 試験溶液の調製方法

食品中からの色素の抽出は図1のとおり、精製は図2のとおり行った。手順は既報<sup>2)</sup>および当センターの酸性タール系許可色素検査標準作業書を参考に決定した。精製に使用するミニカラムは既報<sup>2)</sup>を参考に複数の弱陰イオン交換カラムを検討し、GLサイエンス(株)製InertSep MA-2(250mg/6mL)を選択した。

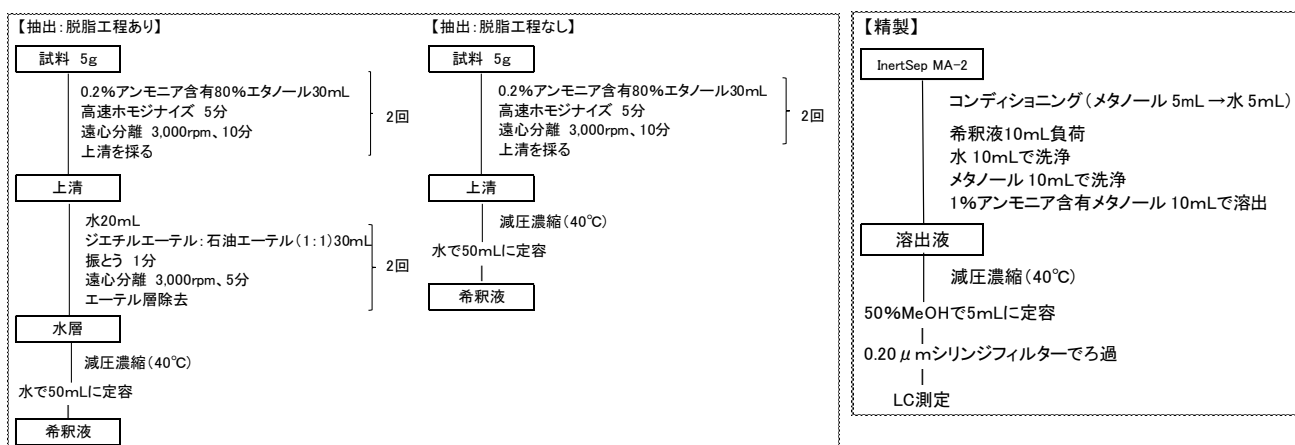


図1 食品中の色素抽出方法

図2 食品中の色素抽出液の精製方法

<p><b>【LC】</b></p> <p>機器：Waters ACQUITY UPLC H-class</p> <p>移動相：(A液)10mM酢酸アンモニウム溶液 (B液)アセトニトリル</p> <p>グラジエント：(B液) 0分(2%)→11.1分(60%)→11.11分(98%) →13.5分(98%)→13.51分(2%)→19分(2%)</p> <p>流速：0.3mL/分</p> <p>カラム：ACQUITY UPLC HSS T3(2.1×100mm, 1.8µm)</p> <p>カラム温度：40°C 試料注入量：2µL</p>	<p><b>【PDA】</b></p> <p>測定波長：200~700nm</p> <p><b>【MS】</b></p> <p>機器：Waters ACQUITY QDa</p> <p>イオン化モード：ESI(-)</p> <p>プローブ温度：350°C</p> <p>キャピラリー電圧：0.8kv</p>
---	---

図3 LC-PDA-MS 条件



#### (4) 測定条件

LC-PDA-MS 条件は図3のとおり。各物質の PDA における溶出時間と解析波長は表1に示した。定量は PDA により行い、PDA でピークが認められた場合の確認を MS により行うこととした。

#### (5) 食品における添加回収試験

指定外添加物が含まれていないことを確認した6種類の食品に 5µg/g となるように色素混合標準溶液を添加し、よく混合して30分間放置した試料から、2(3)に従い試験溶液を調製した。なお、チョコレートおよびビスケットについては、0.2%アンモニア含有80%エタノールで抽出した際に油状物質が認められたため、図1に示す手順のうち、脱脂工程のある手順で調製した。添加回収試験は1種類の試料につき3併行で実施した。

### 3 結果

#### (1) 測定条件

酸性タール系許可色素は食品への使用量の規制がないことから、着色料検査は定性検査で実施している。しかし、本検討では検査法として採用できるか否かを判断するため、検量線を作成し回収率等を確認することとした。

図3の条件により測定し、PDA において 0.25、0.5、1.0、2.5、5.0µg/mL の5濃度により作成した検量線は全て  $r^2=0.9995\sim 0.9998$  と良好な直線性を示した。

また、指定外着色料であることを確実に確認できるよう、8種類の色素標準原液を各々50%メタノールで希釈した標準溶液を用いて図3の測定条件における scan 分析を行い、表1のとおり、MS における最適な確認イオンとコーン電圧の組合せを決定した。なお、AR13 と AZO は構造異性体であり、解析波長や確認イオンとコーン電圧の組合せが同じであるため、溶出時間の違いで判別することとした。

#### (2) 食品における添加回収試験

添加回収試験における回収率は表2のとおりであった。

ビスケットを除く5種類の食品では回収率が78~101%の回収率が得られ、本手法による検査が可能と考えられたが、ビスケットでは一部の物質で回収率が低いものが見られた。QY-di は回収率61%、AZO は回収率53%であったが、定性検査においては問題ないと考えられる。しかし、BP は回収率20%と低値であり、ほぼ同じ抽出方法である当センターの酸性タール系許可色素検査標準作業書による添加回収試験でも低回収率であったことから、抽出方法に何らかの改善が必要と考えられた。

以上より、BP を除く7物質については、本手法により食品中の指定外着色料検査が可能であると考えられる。

表1 各物質の PDA 解析条件と MS 条件

	溶出時間 (分)	解析波長 (nm)	m/z	コーン電圧 (V)
QY-di	4.64	415	432	50
BP	4.72	575	389	20
OG	5.26	485	302	40
AR13	6.31	510	457	40
AZO	6.69	510	457	40
QY-mono	7.50	415	352	40
PBVF	8.50	640	543	50
O2	8.77	485	327	20
AB3	9.12	640	559	40

表2 食品における添加回収試験結果

	回収率 (%)					
	タピオカ	チョコレート	グミ	蒸留酒	ビスケット	ジュース
QY-di	90	95	97	99	61	97
BP	86	90	85	96	20	94
OG	91	96	96	99	76	96
AR13	89	95	98	100	70	97
AZO	86	95	96	98	53	97
QY-mono	91	92	99	100	84	97
PBVF	89	93	100	101	89	99
O2	92	96	99	101	83	97
AB3	78	91	99	99	78	98

### 4 今後の研究方向等

令和5年度中に本手法による指定外着色料検査実施標準作業書を整備し、指定外着色料にかかる収去検査の実施体制を確立する予定である。

#### 参考文献

- 1) 山口瑞香ら、LC-MS を用いた食品中の着色料検出法、食衛誌, 56(1), 8-13(2015)
- 2) 久保田晶子ら、固相抽出ミニカラムを用いた食用タール色素試験法の検討、道衛研所報, 67, 57-62(2017)

## 研究成果報告書（5）

研究課題名	残留動物用医薬品検査における分析対象化合物の見直し検討
担 当	衛生科学部 主任専門研究員 後藤 吉乃、主査専門研究員 宮手 公輔

**1 目的**

本県で行っている残留動物用医薬品の収去検査は、牛筋肉・養殖魚・鶏卵等 6 品目を対象に、43 から 45 の分析対象化合物を一斉分析法で検査している。しかし、ここ 10 年余り、分析対象化合物の見直しがほとんどなされていない。このことについて、一部の分析対象化合物標準品の入手が難しくなっているなどの問題が生じているほか、動物用医薬品の使用実態との乖離が危惧される。そのため、分析対象化合物と併せて試験法の変更を予定している。

本研究では、2 ヶ年で試験法の検討と分析対象化合物の選定を行う予定であり、本年度は、5 種の試験法について比較検討を行った。

**2 方法**

前処理方法の検討

(1) 対象項目

これまで収去検査で対象としていた 48 成分のほか、当センターで過去に LC/MSMS 分析条件を設定し、且つ、現在標準品を有している成分を追加した計 102 成分を対象とした。

(2) 添加回収試験

以下の 5 種類の前処理方法について、鶏筋肉を試料とした添加回収試験 (n=5) で実施した。いずれの方法も、農薬混合標準液は最終試験溶液が 2 ppb となるよう試料に添加した。

(ア) 「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 III (畜水産物)」※従前より運用している方法

(イ) 「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」※新通知試験法

(ウ) STQ 法 (※株式会社アイスティサイエンス)

(エ) QuEChERS 法により抽出し、アセトニトリル層を 50k NMWL で限外濾過する方法

(オ) QuEChERS 法により抽出し、アセトニトリル層を SPEEDIA (※三浦工業株式会社) を用いて精製する方法

**3 結果**

次頁図に各前処理方法の回収率の状況を示す。棒グラフは回収率毎の成分数を、レーダーチャートには回収率 70~120%となった成分を、成分の系統別に割合で示す。QuEChERS 法により抽出し、SPEEDIA を用いて精製する方法では、回収率 100~110%となる成分が最も多く、成分を系統別に見ても、いずれの系統の成分も比較的バランスよく良好な回収率となった。

**4 今後の研究方向等**

令和 5 年度は、動物用医薬品の使用実態を確認するため、食肉衛生検査所等の関係機関と打合せを行う。その結果を踏まえ、分析対象とすべき成分を精査し、当該成分の測定に最も適した前処理方法を選択する。鶏肉以外の品目についても試行したうえで、良好な結果が得られる前処理方法の見当をつけ、当該方法について妥当性評価を実施し、その結果が良好であれば標準作業書を改定する。

成分名	系統・種類
2-acetylamino-5-nitrothiazole	寄生虫駆除剤
albendazole metabolite	寄生虫駆除剤
clorsulon	寄生虫駆除剤
lebamisole	寄生虫駆除剤
morantel	寄生虫駆除剤
pyrantel	寄生虫駆除剤
thiabendazole metabolite	寄生虫駆除剤
thiabendazole	寄生虫駆除剤
flumequine	キノロン系
nalidixic acid (NA)	キノロン系
oxolinic acid (OXA)	キノロン系
ciprofloxacin	キノロン系
miloxacin	キノロン系
difloxacin	キノロン系
enrofloxacin	キノロン系
marbofloxacin	キノロン系
nicarbazin (NCZ)	キノロン系
norfloxacin	キノロン系
ofloxacin	キノロン系
orbifloxacin	キノロン系
sarafloxacin	キノロン系
danofloxacin	キノロン系
sulfabenzamide	サルファ剤
sulfacetamide	サルファ剤
sulfachlorpyridazine (SCPD)	サルファ剤
sulfadiazine (SDZ)	サルファ剤
sulfadimethoxine (SDMX)	サルファ剤
sulfadimidine (SDD)	サルファ剤
sulfadoxine (SDX)	サルファ剤
sulfaguanidine (SGD)	サルファ剤
sulfamerazine (SMR)	サルファ剤
sulfamethoxazole (SMXZ)	サルファ剤
sulfamethoxyypyridazine (SMPD)	サルファ剤
sulfamonomethoxine (SMMX)	サルファ剤
sulfantran	サルファ剤
sulfapyridine (SPD)	サルファ剤
sulfaquinoxaline (SQX)	サルファ剤
sulfathiazole (STZ)	サルファ剤
sulfisoxazole (SSXZ)	サルファ剤
ampicillin (ABPC)	ペニシリン系
benzylpenicillin (PCG)	ペニシリン系
cloxacillin	ペニシリン系
dicloxacillin	ペニシリン系
naftillin	ペニシリン系
oxacillin	ペニシリン系
phenoxymethylpenicillin (PCV)	ペニシリン系
fenbendazole	ベンズイミダゾール系
flubendazole	ベンズイミダゾール系
mebendazole	ベンズイミダゾール系
oxfendazole	ベンズイミダゾール系
oxibendazole	ベンズイミダゾール系
triclabendazole	ベンズイミダゾール系
triclabendazole metabolite	ベンズイミダゾール系
a_tolenborone	ホルモン剤
b_tolenborone	ホルモン剤
betamethazone	ホルモン剤
chlormadinone	ホルモン剤
dexamethasone	ホルモン剤
hydrocortisone	ホルモン剤
melengestrol	ホルモン剤
prednisolone	ホルモン剤
zeranol	ホルモン剤
clenbuterol	その他
diclazuril	その他
ethopabate	その他
pyrimethamine	その他
2-quinoxaline carboxylic acid	その他
boscalid	その他
isoprothiolane	その他
warfalin	その他
diflubenzuron	その他
famphur	その他
fenobucarb (BPMC)	その他
carbadox	その他
ketoprofen	その他
cefalexin	その他
cefapirin	その他
cefazoline	その他
cefoperazone	その他
ceftiofur	その他
amprorium	その他
clopidol	その他
flumixim	その他
oxfendazole sulfone	その他
xylazine	その他
chlortetracycline (CTC)	その他
oxytetracycline (OTC)	その他
tetracycline (TC)	その他
allethrin	その他
chloramphenicol	その他
florfenicol	その他
thiamphenicol	その他
virginiamycin	その他
erythromycin	その他
oleandomycin	その他
spiramycin	その他
tiamulin	その他
procaine	その他
lincomycin	その他
tripelenamin	その他
ormetoprim (OMP)	その他
trimethoprim (TMP)	その他

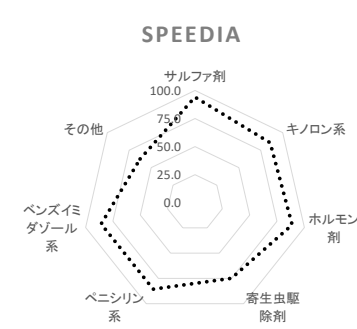
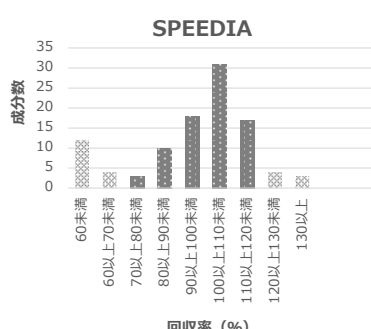
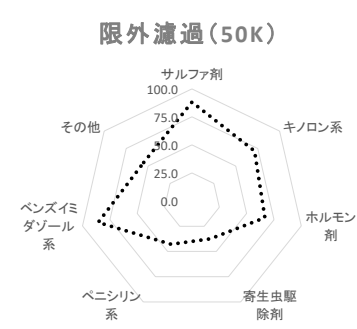
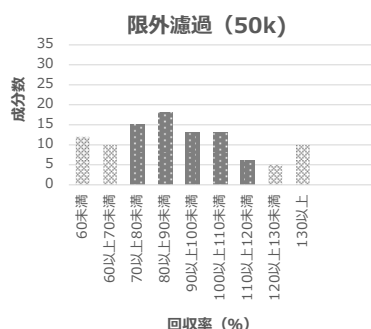
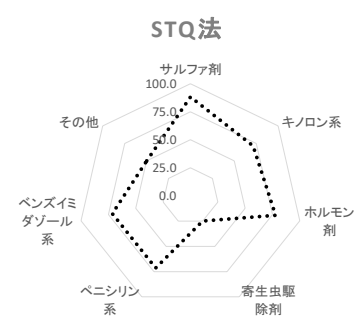
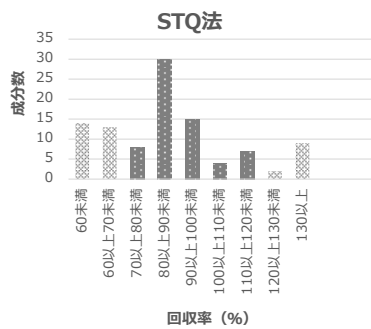
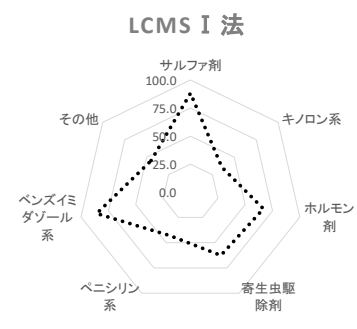
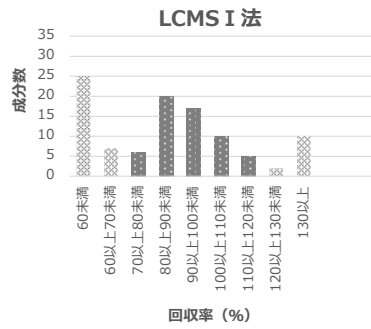
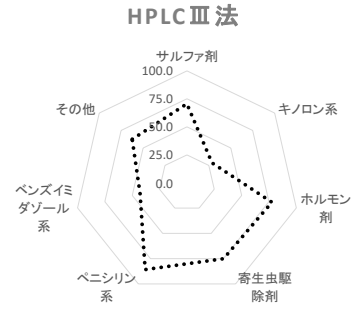
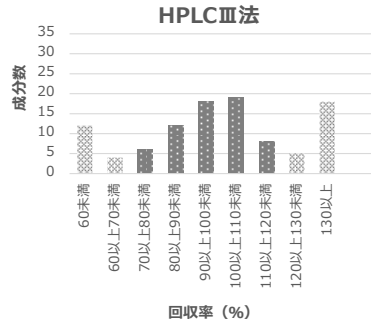


図 前処理方法別回収率の状況 (棒グラフ;濃色バーは70-120%の範囲を示す。レーダーチャート;回収率70-120%となった成分の系統別の割合)

## 研究成果報告書（6）

<b>研究課題名</b>	<b>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</b>
<b>担 当</b>	<b>保健科学部 専門研究員 今野 博貴</b>
<p><b>1 目的</b></p> <p>新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の流行を機に、呼吸器ウイルスサーベイランスの重要性が飛躍的に高まっている。しかし、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）に規定される五類定点把握疾患の内、呼吸器ウイルス感染症はインフルエンザ及びRSウイルス感染症のみであり、これら以外の呼吸器ウイルスサーベイランスは十分に行われていない。また通常実施している病原体サーベイランスは小児の検体が中心であり、成人も含めた患者発生疫学は不明であり、新型コロナウイルス流行下という特殊な状況の中、他にどのようなウイルスの流行があったのかは明らかになっていない。</p> <p>小児呼吸器感染症及び COVID-19 疑い症例から呼吸器ウイルスを検出・解析し、ルーチンの病原体サーベイランスではカバーできない呼吸器感染症の包括的なウイルスサーベイランスを行い、感染症発生動向調査の充実に資する。</p> <p><b>2 方法</b></p> <p>令和2年2月から令和2年12月までの間に、保健所依頼検査による COVID-19 関連検査にて SARS-CoV-2 が検出されなかった鼻咽頭ぬぐい液、喀痰及び唾液のうち、発熱、咳嗽等何らかの症状が見られた患者検体 998 件について、呼吸器ウイルスの検出及び遺伝子の型別検査を実施した。</p> <p>対象となる臨床検体に含まれる遺伝子を抽出・精製し、PCR 法にてターゲットとする遺伝子を増幅させ、電気泳動による検出を行った。電気泳動によりウイルスが検出された検体について、サンガーシーケンス法により遺伝子型別を同定した。</p> <p>検査は代表的な呼吸器ウイルスである RS ウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ライノウイルスに加えて、エンテロウイルス、アデノウイルス、ヒトコロナウイルス、パレコウイルス等を対象として実施した。</p> <p><b>3 結果及び考察</b></p> <p>検体採取月別のウイルス検出実績を表 1 に示す。検査検体 998 検体のうち、119 検体から（検出率 11.9%）から病原ウイルスが検出された（重複感染例含む）。検出されたウイルスの内訳は、ライノウイルス（HRV）が 52 例（5.2%）で最も多く、続いてインフルエンザウイルス（Flu）が 12 例（1.2%）、ヒトヘルペスウイルス 6 型（HHV-6）及びヒトコロナウイルス（HCoV）が 10 例（1.0%）、ヒトメタニューモウイルス（hMPV）が 7 例（0.7%）、パラインフルエンザウイルス（PIV）が 5 例（0.5%）、アデノウイルス（AdV）が 4 例（0.4%）、マイコプラズマ（Myco）、RS ウイルス（RSV）及び A 群溶血性レンサ球菌（GAS）が 3 例（0.3%）、その他のウイルスが合計 5 例（0.5%）という結果であった。</p> <p>小児患者検体が中心となる通常の病原体サーベイランスでの令和2年度の検出率（53.9%）と比較するとウイルスの検出率は低かった。また、通常の病原体サーベイランスにおいて、直近の令和元年度から4年度までの間に最も検出率が低かった令和3年度の 47.4%よりも下回っていた。また、検体採取月別の検出率は、2月採取の検体が最も高く、その後減少傾向にあり、6月に一時的に上昇したものの、その後は低調に推移していた。このことから、新型コロナウイルス流行下に、他のウイルスの大きな流行は見られなかったことが示された。その理由として、新型コロナウイルスが流行し、マスクの着用、手洗い、アルコール消毒等、県民の感染予防意識が平時より高まっていたことが一因として考えられる。</p> <p>その中で、ライノウイルスの検出率が最も高かった理由として、ライノウイルスはエンベロープを持たないウイルスであることが考えられる。エンベロープを持たないウイルスはアルコールによる消毒効果が低い。こ</p>	

のため、新型コロナウイルス対策として定着していたアルコール消毒の効果が低かった可能性がある。

また、患者年代別に何らかのウイルスを検出した検体の検体数を集計したグラフを図1に示す。最もウイルスが検出されているのが「10歳未満」で27件、次いで「30代」の23件、「20代」の18件という結果だった。これは、抗体を持たない10歳未満の小児が最もウイルスに感染しやすく、感染した小児からの家庭内感染により、20代及び30代の感染者数が多くなっている可能性が考えられる。

#### 4 今後の研究方向等

令和3年1月から3月までに採取された検体について、引き続き呼吸器ウイルスの検出及び遺伝子の型別検査を実施する。また、感染症発生動向調査の病原体サーベイランスの検出結果との比較、解析を実施する。

表1 検体採取月別ウイルス検出実績

検体採取月 (2020年)	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
検査検体数	21	73	268	111	65	76	163	45	23	146	7	998
ウイルス検出数 (検出率)	9 (42.9%)	14 (19.2%)	34 (12.7%)	13 (11.7%)	12 (18.5%)	8 (10.5%)	8 (4.9%)	4 (8.9%)	2 (8.7%)	15 (10.3%)	0 (0.0%)	119 (11.9%)
hMPV	4 (19.0%)	1 (1.4%)	2 (0.7%)	-	-	-	-	-	-	-	-	7 (0.7%)
Myco	2 (9.5%)	1 (1.4%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3 (0.3%)
HHV-6	1 (4.8%)	2 (2.7%)	5 (1.9%)	-	2 (3.1%)	-	-	-	-	-	-	10 (1.0%)
Flu	1 (4.8%)	2 (2.7%)	7 (2.6%)	2 (1.8%)	-	-	-	-	-	-	-	12 (1.2%)
HCoV	-	1 (1.4%)	9 (3.4%)	-	-	-	-	-	-	-	-	10 (1.0%)
AdV	-	1 (1.4%)	-	1 (0.9%)	1 (1.5%)	-	1 (0.6%)	-	-	-	-	4 (0.4%)
HRV	-	-	8 (3.0%)	7 (6.3%)	6 (9.2%)	6 (7.9%)	7 (4.3%)	4 (8.9%)	1 (4.3%)	13 (8.9%)	-	52 (5.2%)
RSV	-	-	1 (0.4%)	1 (0.9%)	-	-	-	-	-	1 (0.7%)	-	3 (0.3%)
PIV	-	-	1 (0.4%)	1 (0.9%)	2 (3.1%)	1 (1.3%)	-	-	-	-	-	5 (0.5%)
GAS	-	-	-	1 (0.9%)	-	1 (1.3%)	-	-	1 (4.3%)	-	-	3 (0.3%)
その他のウイルス	1 (4.8%)	1 (1.4%)	1 (0.4%)	-	1 (1.5%)	-	-	-	-	1 (0.7%)	-	5 (0.5%)

※ 重複感染事例を含む

※ その他のウイルスは、ボカウイルス、ヒトヘルペスウイルス7型、ヒトパレコウイルス、パルボウイルス B19型、コクサッキーウイルス B 群

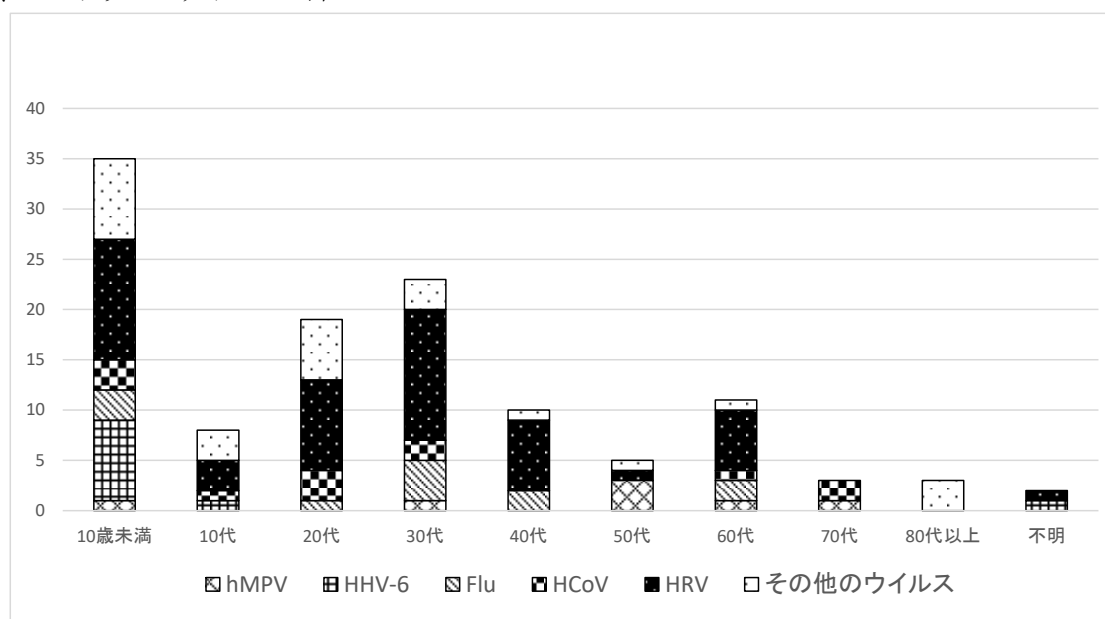


図1 年代別ウイルス検出結果

## 研究成果報告書（7）

<b>研究課題名</b>	<b>地域の健康課題解決を目的とした保健情報の効果的活用に向けた基礎的研究</b>								
<b>担 当</b>	<b>保健科学部 主任専門研究員 並岡 亜希子、主任専門研究員 平野 春菜</b>								
<p><b>1 目的</b></p> <p>本研究は、当センターの保健情報について、より効果的な情報還元を進めるため、保健所や市町村等の関係機関における保健情報の活用状況及びニーズ等について把握することを目的とする。</p> <p>また、地域の特徴的な健康課題等を抽出するための新たなデータ解析法の確立を目指す。</p> <p>これにより、県内関係機関における、地域の健康課題解決に向けた保健情報の効果的な活用に寄与するとともに、地域での生活習慣病予防対策の充実強化に資するものである。</p> <p><b>2 方法</b></p> <p>(1) 保健情報の効果的活用に向けた情報還元の評価・検討</p> <p>関係機関を対象とした保健情報の活用状況及び課題、ニーズ等に関する調査（保健情報の活用に関する調査）を実施するための情報収集、検討を行った。</p> <p>(2) 特定健診・特定保健指導データの効果的なデータ解析法等の検討</p> <p>解析法の検討として、当センターの解析項目・解析法について評価・検討を行い、その結果について整理した。また、今後の情報還元に向けて、具体的な解析項目・内容等を検討するためのポイントを整理した。</p> <p><b>3 結果</b></p> <p>(1) 保健情報の効果的活用に向けた情報還元の評価・検討</p> <p>保健情報の活用に関する調査の調査計画を作成した。</p> <p>(2) 特定健診・特定保健指導データの効果的なデータ解析法等の検討</p> <p>ア これまでの当センターの情報還元について</p> <p>当センターでは、平成20年度から平成29年度実施分までの健診結果を、毎年度、医療保険者ごとにまとめ、各医療保険者へ還元するとともに、県全体の結果を広く情報提供してきた。これについて、評価・検討を行った結果は次のとおりである。</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">対象</th> <th>内容</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>医療保険者</td> <td>還元内容から各健診項目等の性別・5歳年齢階級別集計結果や、県全体との比較、年次推移等を確認することができ、現状把握や健康課題抽出の基礎資料として活用できる内容となっていたと考えられる。</td> </tr> <tr> <td>県・市町村</td> <td>県全体や市町村別等の集計結果は、各地域の健康の状況や生活習慣の現状把握、健康課題抽出の基礎資料として、健康増進計画や食育推進計画等の各種計画作成、施策立案等の支援に繋がってきたと考えられる。</td> </tr> <tr> <td>県民</td> <td>ホームページ等を通じて、県民の健康に関する現状等について広く情報発信することにより、健康づくりや生活習慣病予防の意識醸成に繋がってきたと考えられる。</td> </tr> </tbody> </table> <p>イ 今後の情報還元に向けて</p> <p>生活習慣病予防対策を支援するためのより効果的な情報還元を行っていくため、特定健診・特定保健指導データの解析項目・内容等について検討を行った。結果は次のとおりである。</p>		対象	内容	医療保険者	還元内容から各健診項目等の性別・5歳年齢階級別集計結果や、県全体との比較、年次推移等を確認することができ、現状把握や健康課題抽出の基礎資料として活用できる内容となっていたと考えられる。	県・市町村	県全体や市町村別等の集計結果は、各地域の健康の状況や生活習慣の現状把握、健康課題抽出の基礎資料として、健康増進計画や食育推進計画等の各種計画作成、施策立案等の支援に繋がってきたと考えられる。	県民	ホームページ等を通じて、県民の健康に関する現状等について広く情報発信することにより、健康づくりや生活習慣病予防の意識醸成に繋がってきたと考えられる。
対象	内容								
医療保険者	還元内容から各健診項目等の性別・5歳年齢階級別集計結果や、県全体との比較、年次推移等を確認することができ、現状把握や健康課題抽出の基礎資料として活用できる内容となっていたと考えられる。								
県・市町村	県全体や市町村別等の集計結果は、各地域の健康の状況や生活習慣の現状把握、健康課題抽出の基礎資料として、健康増進計画や食育推進計画等の各種計画作成、施策立案等の支援に繋がってきたと考えられる。								
県民	ホームページ等を通じて、県民の健康に関する現状等について広く情報発信することにより、健康づくりや生活習慣病予防の意識醸成に繋がってきたと考えられる。								

① 検討のポイント

- 地域の健康課題の抽出、新たな視点からの健康実態の把握
- 健康課題のわかりやすい情報還元

② データ解析・情報還元

- 集計単位  
地域別（県全体、二次医療圏別（必要に応じて広域圏別）、市町村別）を基本とする。
- 留意する点

【データ解析】

- ・ 健康増進計画等各種計画の指標や健康増進施策等の立案、評価等に関連すると考えられる項目、データ解析法を検討する。
- ・ 県の健康課題をもとに、二次医療圏別、市町村別等の地域別にもデータ解析を行い、それぞれの地域の状況が評価できるようにする。
- ・ 可能であれば、全国と県、県と二次医療圏、他の市町村等と比較できるようなデータ解析を行い、評価や健康課題の抽出に活用できるようにする。

【情報還元】

- ・ 県民の健康状態、健康課題をよりわかりやすく伝えるため、データ解析から見てきた県民の健康の特徴について、ポイントを絞って発信する。（そのために、健康課題抽出のためのデータ解析を確実にを行い、結果を検討する必要がある。）
- ・ 県全体や地域別の特徴、健康課題をわかりやすく伝えるため、データから見える傾向・特徴について、必要に応じてコメントを記載する。

#### 4 今後の研究方向等

本研究は令和5年度にかけての2年間で行うこととしており、今年度検討した内容をもとに、次年度は、以下について取り組む。

(1) 保健情報の効果的活用に向けた情報還元の評価・検討

保健情報の活用に関する調査の実施及び当センターの情報還元に関する評価・検討

(2) 特定健診・特定保健指導データの効果的なデータ解析法等の確立

当センターにおける具体的な解析法（データ解析項目・解析法・還元内容等）の検討及びデータ解析

- ※ 具体的な解析法の検討及びデータ解析について、当初は、いわて健康データウェアハウスに集積している平成20年度から平成29年度のデータを用いることにしていたが、当センターでは、今後、成人の健康に関する情報として、国のオープンデータや岩手県医療等ビッグデータ利活用システム等の情報を活用することになると考えられることから、それらの情報の活用を視野に入れて検討を進める。

研究成果報告書（8）

研究課題名	ヒトと環境における薬剤耐性菌サーベイランス
担当	検査部 主任専門研究員 岩淵 香織
<p><b>1 目的</b></p> <p>岩手県内の薬剤耐性菌の実態把握のため、海外・県外からの持ち込みが危惧される CRE (Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae) について、排泄物を通じて環境中に流れ込む下水道流入水のカルバペネマーゼ遺伝子の検査を実施した。</p> <p><b>2 方法</b></p> <p>材料：2020年4月～2023年2月まで月1回採水した流入水</p> <p>流入水は、100～150mLを5,000rpmで遠心分離し沈渣をスキムミルク培地に入れマイナス80℃で保存</p> <p>検査方法：</p> <p>(1) 流入水は、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、10μg/1枚のメロペネムディスク2枚を加えたLB-broth20mLで35℃14時間振とう増菌培養した。増菌液を滅菌生理食塩水で10倍段階希釈し10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>希釈した100μLをクロモアガーmSuper CARBA培地に塗抹し、37℃18～24時間培養した。併せて増菌液をDNA抽出した。CREと推定されるコロニーをCLIG培地等に釣菌し、37℃18～24時間培養後、菌株をDNA抽出した。増菌液およびCREと推定されるコロニー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。<sup>1)</sup></p> <p>(2) 遺伝子の検出された菌株について、簡易同定キットID20(ニッスイ製薬)により、菌種を同定した。</p> <p><b>3 結果</b></p> <p>増菌液でのPCRでは、採水月によりIMP、GES、NDM、OXA-48、VIM遺伝子が検出され、KPC遺伝子は検出されなかった(表)。なお、PCRにおいて遺伝子が確認されても、当該遺伝子を持つ腸内細菌科細菌の菌株がクロモアガーmSuper CARBA培地で必ず分離されるということにはなかった。下水流入水にはカルバペネマーゼ遺伝子を持つ腸内細菌科ではない細菌も流入しており、それらの遺伝子が検出されていると考えられた。実際NDM遺伝子を持つ緑膿菌やIMP遺伝子をもつ<i>Aeromonas</i>を検出したことがあり、環境中でカルバペネマーゼ遺伝子が伝達され伝搬される可能性も考えられた。</p> <p>NDM型、VIM型、IMP及びGES型のカルバペネマーゼ遺伝子を持つ菌株が検出された。特にIMP及びGES型のカルバペネマーゼ遺伝子を持つ菌株は2021年4月以降毎月のように確認された。</p> <p><b>4 今後の研究方向等</b></p> <p>これまでの研究<sup>2)</sup>では、2018年にはいろいろな型のカルバペネマーゼ遺伝子を持つ菌種が検出されていたが、ラグビーワールドカップの開催された2019年には5、6、7、9月にIMP遺伝子をもつ<i>Citrobacter freundii</i>のみが検出された。今回の研究では、新型コロナウイルス感染症のパンデミックにより、県外や海外からの移動が制限されていたが、カルバペネマーゼ遺伝子は関連なく検出されており、今後も流入は続くと考えられる。</p> <p>下水放流水から環境に流れ込んだ薬剤耐性菌や遺伝子が、直接健康リスクを発生することはないと考えられるが、環境中の動向調査は必要と考えられる。2018年から協力している地方衛生研究所の参加する下水放流水のモニタリング調査<sup>3)</sup>に引き続き参加したいと考えている。</p> <p>文献</p> <p>1) 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</p> <p>2) 岩手県環境保健研究センター年報平成29年度、30年度 医療機関との連携による薬剤耐性菌の解析</p> <p>3) IASR Vol. 40 p29-30: 2019年2月号 ワンヘルスアプローチに資する環境薬剤耐性モニタリング</p>	



表 検出されたCRE遺伝子

年	月	増菌液						分離菌株	
		IMP	GES	NDM	OXA-48	VIM	KPC		
2020	4		○	○		○			
	5		○	○		○		NDM VIM	
	6		○	○	○	○			
	7		○	○		○		IMP & GES	
	8		○	○		○			
	9		○	○		○			
	10		○	○		○		IMP & GES	
	11		○	○		○		IMP & GES	
	12		○	○		○		IMP & GES	
	2021	1		○	○		○		IMP & GES
		2							IMP & GES
		3							IMP & GES
4		○	○	○		○		IMP & GES <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
5		○	○	○		○		IMP & GES <i>K. pneumoniae</i>	
6		○	○	○		○		IMP & GES <i>K.pneumoniae</i>	
7		○	○	○	○	○		IMP & GES <i>K. pneumoniae</i>	
8		○	○	○	○	○		IMP & GES <i>K.pneumoniae</i>	
9		○	○	○		○		IMP & GES <i>K. pneumoniae</i>	
10		○	○	○				IMP & GES <i>K.pneumoniae</i>	
11		○						IMP & GES <i>K. pneumoniae</i>	
12		○	○	○		○		IMP & GES <i>K.pneumoniae</i>	
2022	1	○	○	○				IMP & GES <i>K. pneumoniae</i>	
	2	○	○	○	○	○		IMP & GES <i>K.pneumoniae</i>	
	3								
	4		○	○					
	5	○	○	○		○		IMP & GES <i>K. pneumoniae</i>	
	6	○	○			○			
	7	○	○					VIM <i>Escherichia coli</i> IMP & GES <i>K. pneumoniae</i>	
	8		○	○					
	9	○	○		○			VIM & GES <i>Pasteura volantium</i>	
	10							IMP & GES <i>K. pneumoniae</i>	
	11							IMP & GES <i>K. pneumoniae</i>	
	12							IMP & GES <i>K. pneumoniae</i>	
2023	1		○	○		○		IMP & GES	
	2		○	○		○		IMP & GES	

○：遺伝子検出

## 研究成果報告書（9）

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 伊藤 朋子

### 【研究①】化学物質の潜在的リスクの把握：環境水中のPPCPs等の残留実態調査

#### 1 目的と方法

令和3年度に引き続き、県内河川中の化学物質による潜在的リスクを把握するため、PPCPs等の環境残留実態を調査した。これまでの調査で、下水処理施設直下河川においてマクロライド系抗菌剤（以後、マクロライドという。）など一部の医薬品がMEC/PNEC>1となり、環境リスクの恐れがあることが判明していたことから、今年度はこれらの物質の影響範囲を確認するため、排出源からの濃度推移を確認することとした。調査地点は図1のとおりで、温暖期と寒冷期に採水し、AIQS-LC ターゲットスクリーニング<sup>2)</sup>によるPPCPs測定を実施した。

#### 2 結果

測定結果から、MEC/PNECが比較的高かった物質を抽出し図2、3に示した。下水処理水流入直下でリスクの恐れありと考えられたマクロライド等の医薬品はA2地点で数ng/L程度となり、PNECを十分に下回る濃度に希釈されていた。このことから、環境リスクの恐れは、下水処理放流水流入地点から本流に合流するまでの0.5km程度の限定された範囲に収まると考えられた。

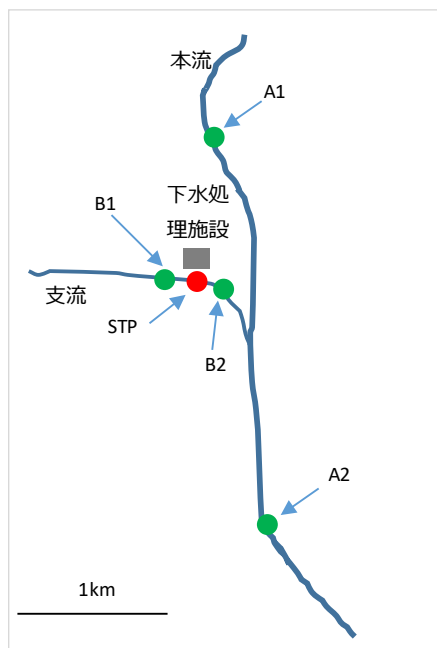


図1 採水地点

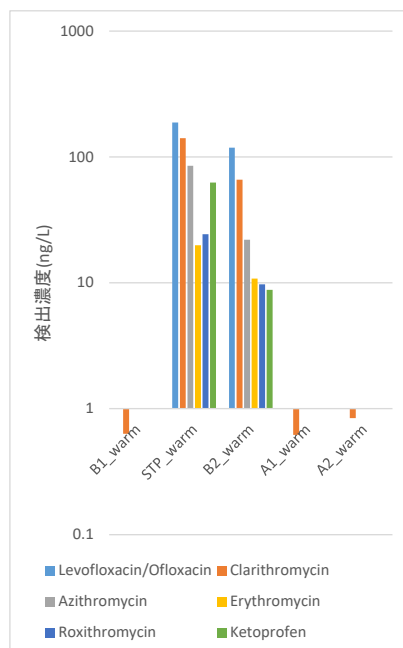


図2 温暖期のPPCPs検出濃度

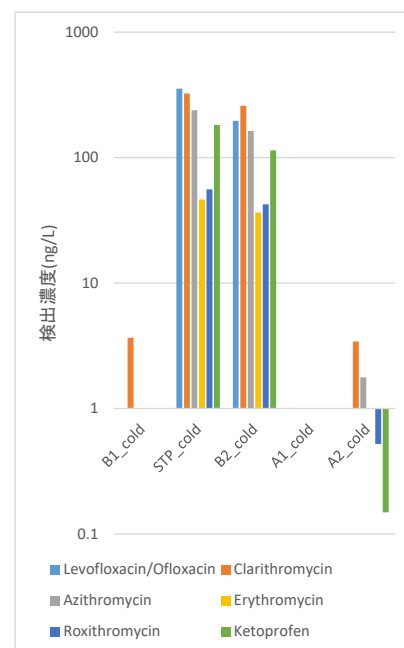


図3 寒冷期のPPCPs検出濃度

### 【研究②】環境リスクの低減：ヒト及び動物用医薬品等による環境リスクの低減

#### 1 目的と方法

昨年度の検討で、環境リスク物質として評価したマクロライド及びLevofloxacinが、下水処理水のゼオライト処理により高度に除去可能であることを確認していた。

マクロライドは、経口摂取後に、図4<sup>3)</sup>のような代謝を受けるが、Clarithromycinの代謝物である14-Hydroxyclearithromycinは、Clarithromycinと同等もしくはやや弱い抗菌活性を持つことが知られている。下水処理水には、この他にも代謝物や分解物が存在していることが考えられる。これらのマクロライド類縁体を探索するため、下水処理水のAIQS-LCデータを活用し、MS-DIALによる物質検索を行うとともに、マクロライド類縁体についても、ゼオライトで除去可能であるか併せて確認した。

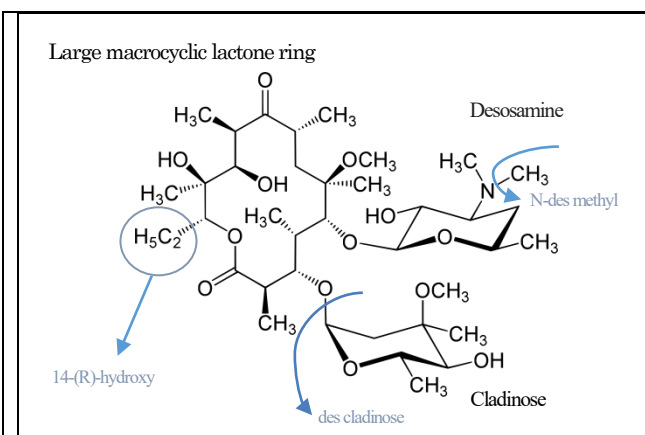


図4 Clarithromycin の代謝経路

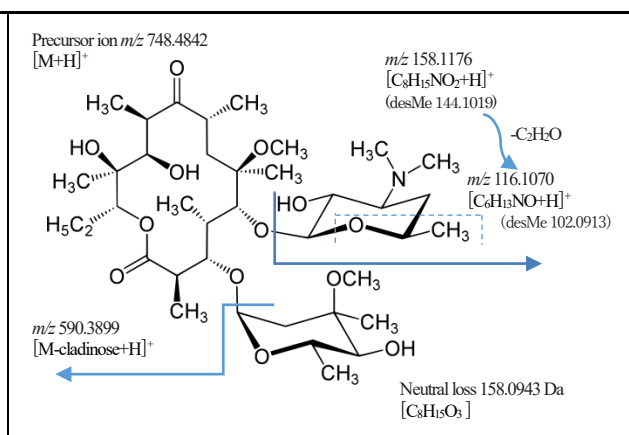


図5 Clarithromycin のフラグメント

## 2 結果

マクロライドのMS/MS スペクトルでは、ラクトン環から二つのデオキシ糖がエーテル結合部分で切断され、クラジノースが Neutral loss として脱離した  $[M\text{-clainose}+H]^+$  と、ジメチルアミノ糖の  $[desosamine+H]^+$  が特徴ピークとして観察される (図5)。マクロライド類縁体においても、同様のフラグメンテーションが起きると考えられることから、上記の特徴ピークに着目し、下水処理水中の類縁体を検索した。抽出された 5 つのピークスポットについて、ライブラリ検索や MS/MS スペクトル等から、物質推定した結果を表1に示す。Clarithromycin の代謝物や Erythromycin の分解物と考えられる物質が推定された。また、ゼオライト処理後の水質では、これらの類縁体は未変化体同様、ほぼピークが消失し、高度に除去されていることが確認された (図6)。

表1 下水処理水から検出されたマクロライド類縁体

No.	Precursor ion (accurate mass)	推定組成式	Product ion (accurate mass)
未変化体	748.4851 (1.3 ppm)	C38H70NO13+	590.3907(1.4ppm)
	RT 23.90 min		158.1167(-5.4ppm)
	Clarithromycin		116.1074(3.5ppm)
1	750.4669 (4.6 ppm)	C37H68NO14+	592.3695(0.6ppm)
	RT 20.20 min		144.1020(0.7ppm)
2 (3)	764.4797(0.8 ppm)	C38H70NO14+	606.3855(1.2ppm)
	RT 21.16(20.45) min		158.1170(-3.5ppm)
	14(or16)-Hydroxycylarthromicin		116.1070(0.1ppm)
4	734.4657(-3.8ppm)	C37H68NO13+	576.3755(2.2ppm)
	RT 23.24 min		144.1007(-8.3ppm)
	N-Desmetyl Clarythromycin		102.0910(-3.3ppm)
未変化体	734.4681(-0.5ppm)	C37H68NO13+	589.3483(-0.5ppm)
	RT 21.98 min		158.1170 (0.9ppm)
	Erythromycin		116.1078(6.9ppm)
5	716.4684 (14.6ppm)	C38H70NO14+	558.3629(-1.3ppm)
			540.3602(13.0ppm)
	Erythromycin A enol ether		522.3446(3.9ppm)
			158.1177(0.9ppm)

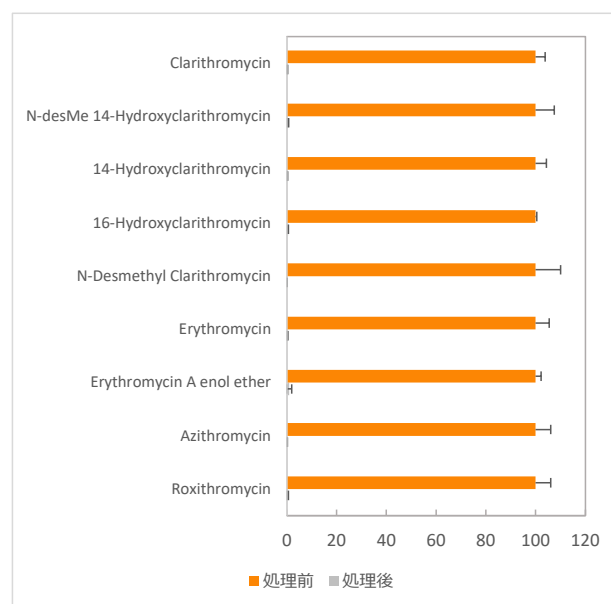


図6 下水処理水のゼオライト処理前後のマクロライド及び類縁体残存率\* (n=3, mean±sd)  
\*処理前ピーク強度を 100 とし算出

### 【参考文献】

- 1) 伊藤朋子, 岩手県環境保健研究センター年報第 21 号.(2021),101-102
- 2) Kadokami, K.; Ueno, D. Anal. Chem. 2019, 91 (12), 7749–7755
- 3) Suzuki, A. et al. : Drug Metab. Pharmacokin. 2003, 18(2), 104-113.

研究成果報告書 (10)

研究課題名	微小粒子状物質 (PM2.5) 濃度の地域的な特性に関する研究
担 当	地球科学部 専門研究員 畠山 幸大

1 目的

大気中に浮遊する微小粒子状物質 (以下「PM2.5」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PM2.5による大気汚染の地域的な特性を明らかにする手がかりとなる。本研究では、平成28年度から令和3年度にかけて実施した巣子局の成分分析結果について解析を行い、PM2.5濃度の経年変化を追うことで巣子局の地域的な特性について考察した。

2 方法

調査地点は滝沢市巣子局とし、調査期間は四半期毎に原則2週間 (午前0時から24時間採取) とした。サンプラーはThermo社製FRM2025i型を用い、PTFE及び石英フィルターに試料を捕集した。分析は「大気中微小粒子状物質 (PM2.5) 成分測定マニュアル」(環境省)<sup>1)</sup>に準拠して行い、質量濃度、イオン成分 ( $Cl^-$ 、 $NO_3^-$ 、 $SO_4^{2-}$ 、 $NH_4^+$ 、 $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 及び $Mg^{2+}$ )、炭素成分 (有機炭素 (OC) 及び元素状炭素 (EC)) 及び無機元素成分 (Na、Al、K、Ca、Sc、V、Cr、Fe、Ni、Zn、As、Sb 及びPb) を測定した。

表1 調査期間

年度	春季	夏季	秋季	冬季
H28	5/6~5/27	7/21~8/3	10/20~11/2	1/19~2/1
H29	5/12~5/25	7/20~8/2	10/19~11/1	1/19~2/5
H30	5/9~5/21	7/19~8/3	10/18~10/31	1/17~1/30
R1	5/8~5/21	7/19~8/1	10/17~10/30	1/16~1/29
R2	5/13~5/26	7/22~8/4	10/20~11/2	1/21~2/3
R3	5/12~5/25	7/20~8/2	10/20~11/2	1/19~2/1

3 結果と考察

(1) PM2.5 質量濃度及び主要成分

H28年度からR3年度における調査期間別の平均質量濃度は、 $4.6 \sim 12.6 \mu g/m^3$  の範囲で変動し、令和2年度春季が最も低く、平成28年度春季が最も高かった (図1)。調査期間別の平均質量濃度の経年変化を見ると、弱い相関ではあるものの下降傾向にあった (相関係数-0.30)。

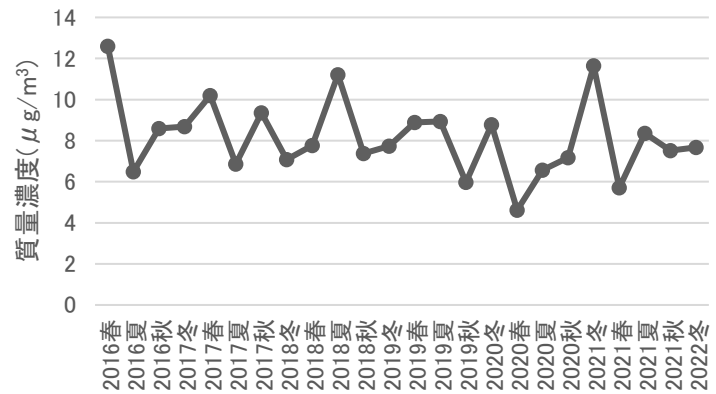


図1 PM2.5 質量濃度経年変化 (調査期間別平均)

H28年度からR3年度における季節別の平均質量濃度は、春季及び冬季が高く、秋季が低かった。主要成分の質量濃度については、どの季節でもOCが最も高く、次いで $SO_4^{2-}$ が高かった。春季及び夏季は $SO_4^{2-}$ 、秋季は炭素成分、冬季は $NO_3^-$ の割合が他の季節に比べて高くなっており、季節による特徴がみられた (図2)。

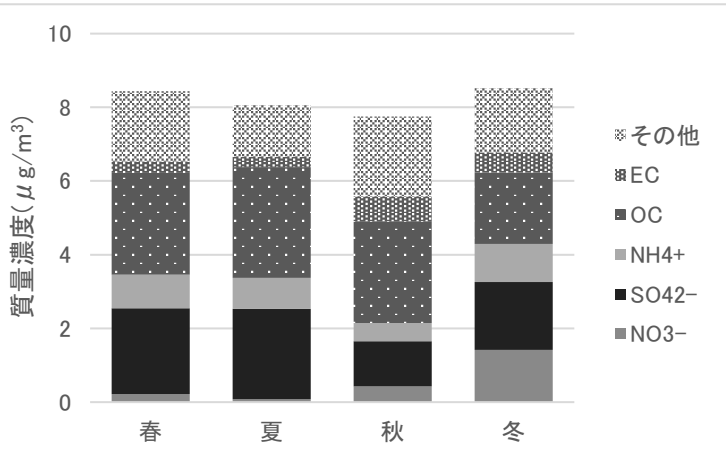


図2 H28年度~R3年度の季節別平均PM2.5質量濃度

PM2.5 の主要成分別の経年変化を見ると、 $\text{SO}_4^{2-}$ の質量濃度については、令和元年度までは春季や夏季に質量濃度が高くなる傾向がみられたが、令和2年度以降では年間を通して低い濃度で推移するようになり、 $\text{SO}_4^{2-}$ をもたらす汚染源に変化があったものと考えられる(図3)。 $\text{SO}_4^{2-}$ 以外の主要成分やイオン成分の質量濃度の経年変化を見ると、相関係数-0.49で下降傾向にあったOC以外では強い相関はなかった。

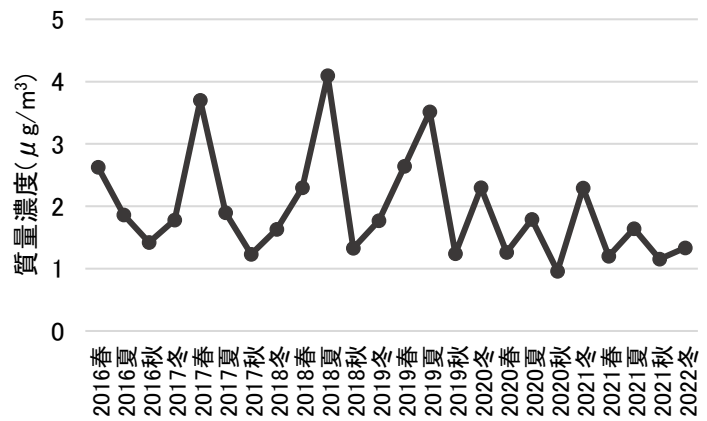


図3  $\text{SO}_4^{2-}$ の質量濃度経年変化

## (2) 無機元素成分

無機元素成分は質量濃度への寄与は僅かであるが、発生源の情報を多く含んでいるため、濃度やその比を用いた発生源解析が有効である。

有鉛ガソリンを用いている地域では、一般的な汚染元素であるZnに対して相対的にPb濃度が高くなる傾向があることから、大陸からの長距離輸送の指標としてPb/Zn比が用いられており、国内起源の場合0.2~0.3程度、大陸起源の場合は0.5~0.6程度と推定されている<sup>2)</sup>。巢子局のPb/Zn比の経年変化を見ると、平成29年度春季から平成30年度夏季までの間、他の期間よりも値が高く、大陸からの長距離輸送による汚染の影響をより強く受けていた可能性がある(図4)。

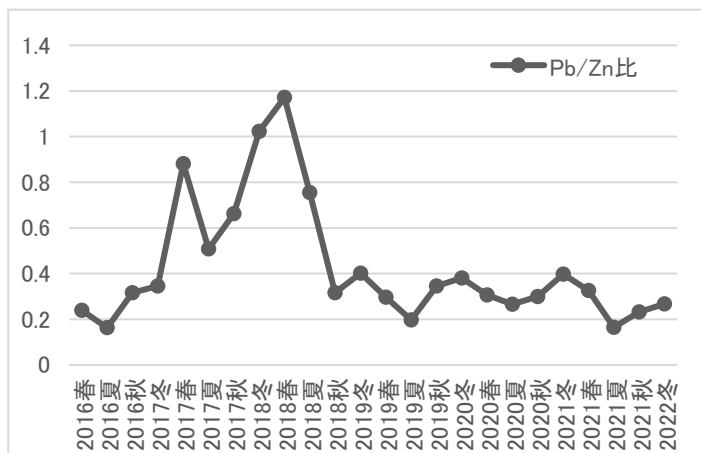


図4 鉛(Pb)と亜鉛(Zn)の質量濃度比の経年変化

また、Asは石炭燃焼の指標、Vは石油燃焼の指標であることから、石油燃焼に対する石炭燃焼の指標としてAs/V比が用いられており、中国など石炭燃焼が石油燃焼より優勢な地域ではAs濃度が相対的にV濃度より高くなる傾向がある<sup>2)</sup>。巢子局のAs/V比の経年変化を見ると、令和元年度冬季以降、それ以前の期間と比較して高い値が続いている。これは、新型コロナウイルス感染症拡大に伴う経済低迷や輸送量減少等で石油消費量が減少した影響によりV濃度が低下したためであると考えられる(図5)。

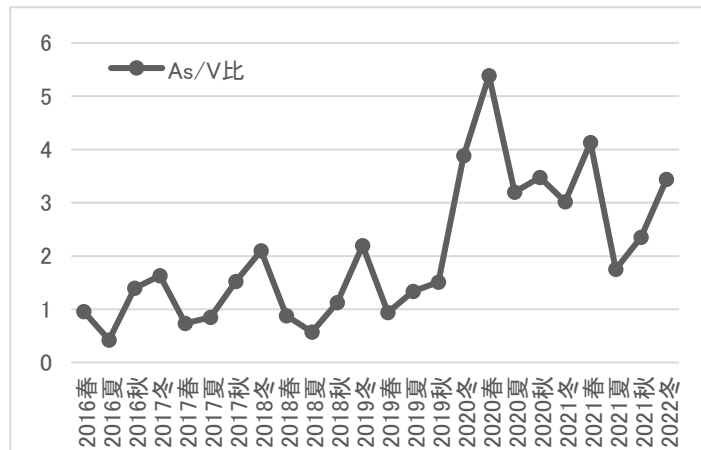


図5 砒素(As)とバナジウム(V)の質量濃度比の経年変化

## <参考文献>

- 1) 環境省: "大気中微小粒子状物質 (PM2.5) 成分測定マニュアル 無機元素測定法 第2版", 2019年5月
- 2) 日置正ほか: 松山, 大阪, つくばで観測した浮遊粉じん中金属元素濃度比による長距離輸送と地域汚染特性の解析, 大気環境学会誌, 44, 91-101(2009)

研究成果報告書 (11)

研究課題名	岩手県における絶滅危惧植物を対象にした種の存続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

岩手県は豊かな自然環境に恵まれているが、近年は希少植物が絶滅する危機も生じている。そこで、いわてレッドデータブックに掲載されている希少植物から保護の手立てが必要な絶滅危惧植物を対象に、種を存続させるための技術の開発を行う。また、希少植物の資源としての活用を模索し希少植物の保護 PR への活用を図る。その上で他機関からの高度な要求に対応できる技術・実績を獲得するように取り組む。

【研究の対象とした絶滅危惧植物】

I 型：内陸に自生する希少植物 3 種      II 型：沿岸地域に自生する希少植物 4 種

分類	植物名	いわてRDB	確認状況
I	アツモリソウ	Aランク	2箇所
I	ムラサキ	Aランク	1箇所
I	ナツエビネ	Aランク	1箇所
II	ハマナデシコ	Aランク	1箇所
II	スナビキソウ	Aランク	3箇所
II	エソツルキンバイ	Aランク	2箇所
II	オオアカバナ	Aランク	2箇所

2 実施内容

- (1) 自生地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。
- (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。
- (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)

3 主な成果

- (1) アツモリソウの自生地保護と生息域外保全（野生復帰）について試験を進めた。特に野生株由来の種子発芽に成功し、フラスコ苗の育成培養まで進んでいる。
- (2) チョウセンキバナアツモリソウの発芽試験をとりまとめ、自然環境復元学会に論文を投稿した。また、環境省の依頼を受けて環境省新宿御苑管理事務所で保管されていた保存種子の発芽に取り組み、さらに関係者に配布する技術解説書「チョウセンキバナアツモリソウの域外保全に関する技術マニュアル」を執筆した（令和5年3月22日原稿提出）。
- (3) 内陸のAランク希少植物である、ナツエビネ自生地の土壌分析を行い、発芽用培地の開発を進めた。この培地に自生地で採取した種子を無菌的に播種し、発芽を進めた。また、ムラサキの発芽・育苗試験にも取り組み、育てた幼苗を山に戻す野生復帰試験に着手した。
- (4) 東日本大震災津波後の希少植物調査の調査結果をとりまとめて、自然環境復元学会で発表した。また、研究対象種の海浜性希少植物の結実調査と採種に取り組み、発芽試験と組織培養試験に着手した。
- (5) 大迫町商工会によりハヤチネウスユキソウとアツモリソウ花酵母の酵母パンが継続的に販売されており、依頼に合わせて酵母液を提出した。

4 今後の取り組み

- (1) 自生地の保全に有効な技術開発を進め、効果の確認を行う。
- (2) 試験対象としている希少植物の生息域外保全を進める苗生産等の技術を開発する。
- (3) 国や地方公共団体等からの希少野生植物等の保護や資源活用の依頼内容に応じて技術支援を行う。

表1 主な発表業績(令和4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	審査
1	自然環境復元学会	自然環境復元研究	投稿 2023/2/13	論文	生息域外保全を目的とした絶滅危惧種チョウセンキバナアツモリソウの発芽法の開発と保存種子を用いた苗生産の有効性	小山田智彰・鞍懸重和・千崎則正	有
2	自然環境復元学会	第23回自然環境復元学会研究発表会要旨	2023/2/17	口頭発表	東日本大震災後の岩手県における海浜性希少植物の消失リスクの推移	小山田智彰・鞍懸重和・千崎則正	無
3	環境省東北地方環境事務所	環境省作成テキスト(技術解説書)	2023/3/22	技術書	チョウセンキバナアツモリソウの域外保全に関する技術マニュアル	小山田智彰	無

〈自然環境復元研究 投稿論文より〉



図1 試験地で開花・群生化したチョウセンキバナアツモリソウ

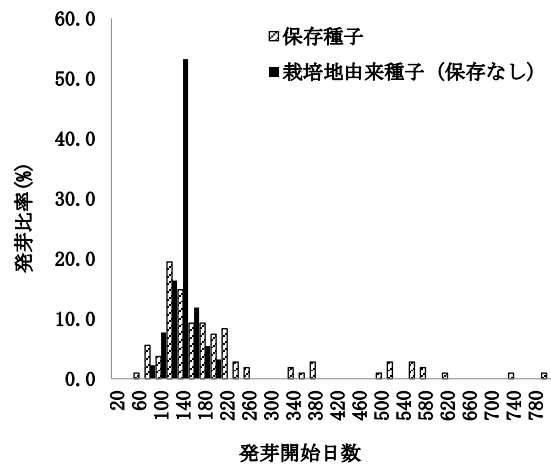


図2 チョウセンキバナアツモリソウ保存種子の発芽傾向

〈第23回自然環境復元学会全国大会の発表スライドより〉

<p><b>a. 繁殖</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・自然状態での繁殖能力</li> <li>5 ほとんど増殖が認められない</li> <li>4 弱い増殖力がある</li> <li>3 中位の増殖力が認められる</li> <li>2 著しい増殖力がある</li> <li>1 強大な増殖力がある</li> </ul> <p><b>b. 立地</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ハビタットの消失危険度</li> <li>5 極めて強い</li> <li>4 強い</li> <li>3 中</li> <li>2 弱い</li> <li>1 無い</li> </ul> <p><b>c. 採集</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・選択的採集の危険度</li> <li>5 極めて強い</li> <li>4 強い</li> <li>3 中</li> <li>2 弱い</li> <li>1 無い</li> </ul>	<p><b>d. 個体数</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・分布地点における個体数</li> <li>5 消失</li> <li>4 10個体未満</li> <li>3 10個体以上数十個体</li> <li>2 100個体以上数百個体</li> <li>1 1,000個体以上</li> </ul> <p><b>e. 自然災害の影響</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・東日本大震災後の自然災害(台風・高潮)</li> <li>5 完全に消失</li> <li>4 ほとんどが消失し復元が困難</li> <li>3 個体の減少が激しい</li> <li>2 個体の減少がある</li> <li>1 変化なし</li> </ul> <p><b>f. 生育基盤の変化</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・復興工事等の人為的な改変によるもの</li> <li>5 完全な改変あり</li> <li>4 大規模な改変あり</li> <li>3 部分的な改変あり</li> <li>2 一部に改変あり</li> <li>1 変化なし</li> </ul>
--	--

図3 消失リスク評価表

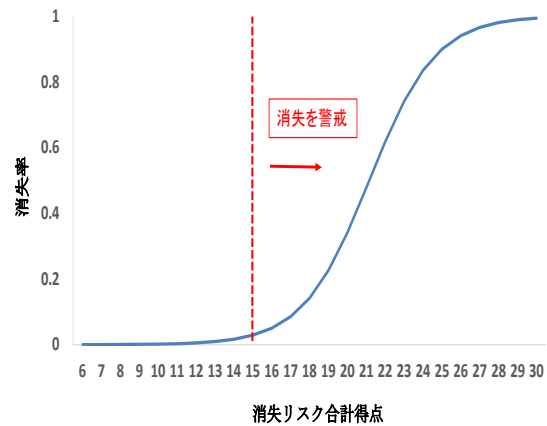


図4 消失リスク合計得点と消失率の関係

研究成果報告書 (12)

研究課題名	個体特性および個体群構造に基づいたイヌワシの保全に関する研究
担 当	地球科学部 上席専門研究員 前田 琢
<p><b>1 目的</b></p> <p>国内最大規模のイヌワシ生息地を有する岩手県では、これまでにのべ35つがいの繁殖が確認されてきた。しかし、2002年以降、消失するつがいが見られるようになり、その数は2022年時点で10つがいに増えている。背景には、長年続く繁殖成功率の低迷による若齢個体の減少があると推測される。今後安定的に生息数を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>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して様々な知見が集積されてきたが、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ために必要となる事項には、まだ十分解明されていないものも多い。また、つがい間でばらつきのある繁殖成績や営巣場所選択についても、標高、地形、土地利用、植生等に加えて、個体の年齢等を考慮した分析により、そのしくみを明らかにする必要がある。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することを目的とした。</p> <p>4年度(2022年)には次に挙げる4項目に関して調査研究を行なった。(1) つがいの動向および繁殖状況のモニタリング調査、(2) ビデオを用いた繁殖行動調査、(3) 映像を用いた個体識別による移動分散調査、(4) 周辺環境や個体の特性等を考慮した繁殖成績の解析。</p> <p><b>2 方法</b></p> <p>(1) つがいの動向および繁殖状況のモニタリング調査</p> <p>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も実施した。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を検討した。</p> <p>(2) ビデオを用いた繁殖行動調査</p> <p>巣に設置されたビデオカメラおよびインターバル撮影のできるスチルカメラによって、イヌワシの繁殖行動を長期的に撮影し、その映像に基づいて、親鳥の出入り頻度、抱卵・抱雛時間、雛の成長、給餌頻度、食餌率、餌内容などを定量的に分析した。</p> <p>(3) 映像を用いた個体識別による移動分散調査</p> <p>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を収集、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、個体の移動分散やつがい関係を明らかにした。</p> <p>(4) 周辺環境や個体の特性等を考慮した繁殖成績の解析</p> <p>各営巣地周辺の環境条件(標高、傾斜、土地利用、植生など)を国土数値情報やJAXA衛星写真判別データを利用して1~10km四方スケールで段階的に計測したほか、衛星画像に基づいて牧草地や伐採地など好適採餌場所となる環境の面積割合を測定した。これらを説明要因として、繁殖成績(2002~22年に抱卵が確認された巣における巣立ちの有無(241事例))との関係を示す一般化線形混合モデル(GLMM)を作成した。このモデルに各繁殖事例におけるつがいの年齢(成鳥・若鳥)を説明要因として追加し、結果の比較を行なった。</p>	



### 3 結果

#### (1) つがいの動向および繁殖状況の調査

2022年には県全体で25つがいの生息が確認され、このうち7つがいで抱卵、5つがいで育雛、1つがいでひなの巣立ちが確認された。繁殖成功率は4.0%で過去に例のない低さとなったほか、抱卵が確認されたつがい数も過去最低となった。繁殖失敗の直接的原因が確認できた事例はなかったが、つがい相手が不在のまま繁殖活動が停滞している事例が3つがいで見られた。新たなつがいの発見はなかったが、既存つがいにおいて新たな巣の存在が1か所確認された。

#### (2) ビデオを用いた繁殖行動調査

これまでに撮影、記録された映像を元に、親鳥によって巣に運ばれた餌内容について調べたところ、世界的にも報告例の少ない魚類が利用されていることが明らかになった。魚類を餌とする行動は、2011年を最初に10年以上にわたって断続的に確認され、計57回の事例が明らかになった。親鳥の持ち込み時の行動や利用された魚類の特徴を解析した結果、例えばミサゴのような魚食性種から魚を略奪している可能性が考えられた。詳細は山階鳥類学雑誌に発表した。

#### (3) 映像を用いた個体識別による移動分散調査

県北地域で繁殖していたつがいの雄個体および雌個体について検討した結果、雄（若鳥）が南側に隣接して生息する別の雌の元に移動し、新たにつがいを形成し直した可能性が考えられた。一方、単独となった雌は、北側に隣接して生息する雄の元に移動し、つがいを作っていたことが明らかになった。こうしたつがいの解消や再形成の事例は過去にも県内で観察されており（年報第19号の報文参照）、稀ではない頻度でつがいの組み換えが起きていることが示唆された。

#### (4) 周辺環境や個体の特性等を考慮した繁殖成績の解析

各営巣地における繁殖成績は、標高、草地率、牧野率、伐採地率などの複数の有意な説明要因によってモデル化することができた。このモデルに「つがいの両個体ともに成鳥 / 少なくとも一方が若鳥」を表す要因を追加したところ、全ての地理的スケールにおいてモデルの予測の良さ（AIC）が向上し、成鳥どうしのつがいの方が若鳥を含むつがいよりも、高い繁殖成績を示す傾向が明らかになった。若鳥はまだ十分な繁殖経験がないことから、繁殖において不利になる面があると推測された。

### 4 今後の研究方向等

(1) 各営巣地における繁殖状況や失敗原因の詳細な把握を進めるとともに、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) 個体映像を集めて識別事例を増やし、広域的な移動分散の実態やつがい関係の知見を拡充する。

(3) 年代によって繁殖成績を説明するモデルに違いがあるか検討するとともに、消失したつがいの生息環境に共通する特徴の有無についても解明を進める。

研究成果報告書 (13)

研究課題名	ツキノワグマの個体数推定精度の向上ならびに 生息密度がツキノワグマの出没に及ぼす影響
担 当	地球科学部 主任専門研究員 鞍懸 重和

1 目的

岩手県では、ツキノワグマ（以下、クマ）の集落や市街地への出没により人身被害、農林業被害が毎年継続し発生している。出没の要因は、ブナ科堅果類の結実量の変化に伴うクマの行動の変化や農作物の採餌を目的とした耕作地への侵入、低木等の被覆物の存在による警戒心の低下などが挙げられるが、生息密度と出没の関係は明らかになっていない。生息密度と出没の関係を明らかにするためには、広域かつ多数の地域でのクマの出没数と生息密度を調査する必要があるため、2021 年には、ブナの壮齢林が優占する奥羽山脈の和賀岳北東部（以下、高標高帯試験区）、ブナ、ミズナラ、スギがモザイク状に配する花巻市豊沢湖周辺（以下、中山間試験区）及び西部にブナ、ミズナラ、スギが、東部にコナラ、ミズナラ、スギ、アカマツの植栽地がモザイク状に配する雫石町御明神演習林（以下、低標高帯試験区）の3試験区にヘア・トラップを設置し、クマの生息密度を調査した。

2 方法

5月下旬にヘア・トラップを高標高帯試験区に20基、中山間試験区に25基、低標高帯試験区に21基設置し(図1)、体毛の回収を概ね10日間間隔で高標高帯試験区で8セッション、中山間試験区で4セッション、低標高帯試験区で5セッション実施した。ヘア・トラップの設置方法、体毛の処理方法、DNAの抽出、PCR法及びフラグメント解析は Yamauchi et al. (2014) に従った。ただし、Multiplex PCR のプライマーセットはG10C、G10L 及びG10B とG10X、MU23 及びMSUT2 とした。DNA 分析により個体識別を行った後、個体、利用トラップ及び利用セッションから捕獲履歴を作成し、空間明示標識再捕獲最尤法により生息密度を推定した。生息密度の推定には、R のパッケージソフトである secr を使い、各試験区の全セッションの捕獲履歴及びトラップから5km内のハビタットマスクをデータとし、生息密度(D)、行動圏中心での捕獲率(g0)、行動圏距離(sigma)の各パラメーターに説明変数を設けないNull modelにより生息密度を推定した。また、地域により生息密度に偏りが無いか、またその方向性を明らかにするため、x(東西方向)、y(南北方向)の2種類の説明変数を、xのみ、yのみ、及びx+yの組合せでDに設定し、高標高帯試験区では2~5セッション、中山間試験区及び低標高帯試験区では1~4セッションのデータを用い、3つのモデルにNull modelを加えた4モデルについて生息密度を推定した。推定後は、各モデルのAICを比較し最適モデルを選択した。

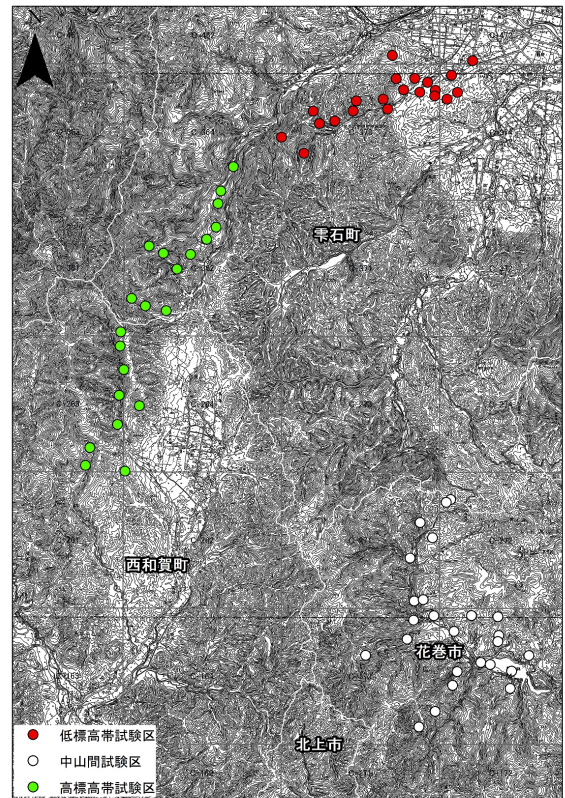


図1 トラップ配置

### 3 結果

各試験区のクマの生息密度は、高標高帯試験区で0.70頭/km<sup>2</sup>（95%信頼区間下限；0.48頭、上限；1.02頭）、中山間試験区で1.71頭/km<sup>2</sup>（下限；1.23頭、上限；2.30頭）、低標高帯試験区で1.09頭/km<sup>2</sup>（下限；0.64頭、上限；1.88頭）であった（図2）。

生息密度の不均質性を表すモデルの各AICと説明変数の推定値は、NullモデルでAICが1118.7、xのみのモデルでAICが1110.9、xの推定値は0.36（95%信頼区間下限；0.13、上限；1.60）、yのみのモデルでAICが1117.7、yの推定値は-0.17（下限；-0.36、上限；0.02）、x+yモデルでAICが1112.7、xの推定値が0.34（下限；0.07、上限；0.60）yの推定値が-0.05（下限；-0.25、上限；0.15）であった。AICによる最適モデル選択ではxのみのモデルが選択された。

### 4 考察

各試験区のクマの生息密度は高標高帯試験区で最も低く、次に低標高帯試験区で高く、中山間試験区で最も高い結果となった。またこの結果を受けて、生息密度の不均質性を表すモデルでは、AIC差が小さいもののxのみのモデルが選択され、その推定値は0を含まず正の値を示した。これらのことはクマの生息密度が地域間で異なり、北奥羽山脈からその東部にかけて偏っていることを示唆している。これは標高帯や植生などが大きく異なる場合、ツキノワグマの生息密度が変化する可能性があり、生息密度と出没の関係を明らかにする研究や個体数推定の精度や正確度を高める研究においても、これらのことに考慮した調査設計をする必要があるものと考えられた。

今後は調査を継続し、他の地域でも同様な傾向が見られるかを確認する。また、出没数や有害捕獲数との関係についての検討を進める。

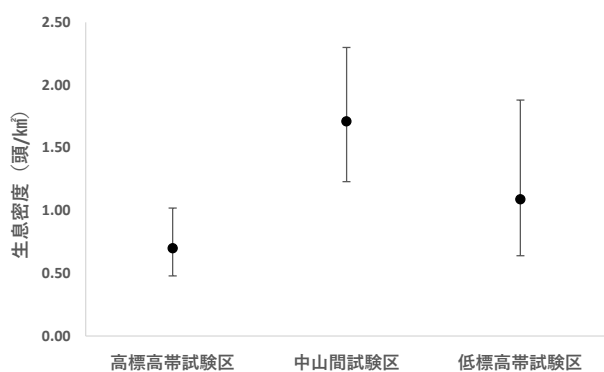


図2 各試験区におけるクマの生息密度

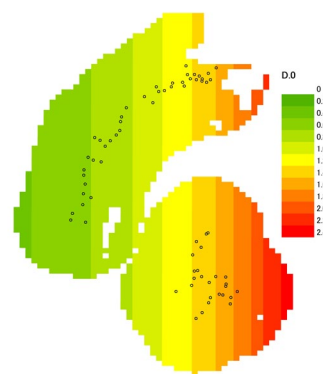


図3 xのみのモデルによる生息密度の不均質性

表1 生息密度の不均質性を表すモデルの推定値およびAIC

モデル	説明変数	D. x			D. y			AIC	AICc
		95%lcl	estimate	95%ucl	95%lcl	estimate	95%ucl		
1	Null	-	-	-	-	-	-	1118.7	1118.9
2	x	0.13	0.36	0.60	-	-	-	1110.9	1111.2
3	y	-	-	-	-0.36	-0.17	0.02	1117.7	1118.0
4	x+y	0.07	0.34	0.60	-0.25	-0.05	0.15	1112.7	1113.2

## 研究成果報告書（14）

研究課題名	公共用水のメンブランフィルター法による大腸菌数測定方法の改善及び実用化へ向けた検証
担 当	検査部 主任専門研究員 齊藤 里美、主任専門研究員 岩淵 香織、主任専門研究員 太田 美香子、部長 阿部 なるみ

### 1 目的

令和4年4月1日から公共用水域の水質検査における糞便汚染の指標として新たに導入された大腸菌数測定法（特定酵素基質培地を用いたメンブランフィルター法。以下「告示法」という。）においては、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。

一方で、前研究（「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（平成31・令和元年度から令和2年度まで）」においては、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の約28%で大腸菌でないことが疑われる小型の青色コロニーの発育が認められ、簡易同定キット（ID32 スタッフアピ（ビオメリュール・ジャパン(株)、N-IDテスト・SP-18（日水製薬(株)）を用いた解析の結果、環境中に常在するグラム陽性球菌である *Staphylococcus* 属の菌6種が確認された。

本研究では、これまでの知見を基に、特定酵素基質培地の種類、組成や培養時間について検討し、これを検証することにより、前研究で明らかになった大腸菌数測定法の問題点の改善方法を検討する。

### 2 方法

#### (1) 菌株

菌液を用いたモデル試験用のグラム陽性球菌の菌株として、これまでに公共用水域検体から分離した *S. cohnii* B、*S. haemolyticus*、*S. gallinarum*、*S. xyloso*、*S. cohnii/urealyticus*、*S. warneri* A 及び簡易同定キットで該当菌名なしとなった菌株のうち1種類（以下「球菌X」とする。）を用いた。また、比較対象として、大腸菌（NCTC9001）を使用した。

菌液濃度は、告示法で示される計数すべきコロニー数の範囲がフィルター上で20個から100個であることから、いずれも100cfu/100ml程度になるように調製した。

#### (2) 培地

市販培地の比較試験には、培地A、培地B及び培地Cを用いた。また、培地組成の検討には、培地Aを使用した。

#### (3) 操作及び判定

調製した菌液をポアサイズ0.45μmのセルロース混合エステルメンブランフィルター（アドバンテック東洋）でろ過し、培地に貼付けて36℃で17、18、20、22、24時間の発育状況を経時的に観察、記録した。

なお、告示法においては培養温度と時間は使用する培地の使用説明書を参照することとされており、培地Aの使用説明書には培養時間は18時間から24時間と記載されている。

### 3 結果

#### (1) 市販培地の比較試験

告示法で例示されている特定酵素基質培地の組成のうち、グラム陽性球菌の発育を阻害する目的で添加されているのはSDS（ラウリル硫酸ナトリウム）である。市販されている酵素基質培地のうち、SDSを含有していることを表示している3種類の培地のSDS含有率は、培地Aが0.02%、培地Bが0.02%、培地Cが0.01%である。

2(1)の菌株から調製した各菌液について発育状況を比較したところ、培地Cにおいて他の培地より早い培養時間で発育することを確認した。これは、他の培地に比べてSDS濃度が低いためであると考えられた。

また、培地Aと培地Bでは、菌の種類や濃度による多少の差があるものの、培地Bの方が早く発育することが確認された。このことから、以降の試験の培地には、よりグラム陽性球菌の発育を抑制するという結果

が得られた培地Aを用いることとした。

(2) 特定酵素基質培地の組成 (SDS 濃度) 及び培養時間に係る検証

培地Aに SDS 濃度が 0.02 及び 0.04、0.06、0.08、0.1%になるように段階的に SDS を添加した培地を用いて、2 (1) の菌株から調製した各菌液について告示法を実施した。その結果、グラム陽性球菌では SDS 濃度が 0.04%以上の培地で 24 時間以内には発育が認められなかった。大腸菌では全ての SDS 濃度の培地で発育が確認されたが、SDS 濃度が 0.04%以上の培地で経時による青色コロニー数の微増が見られた。この結果は、SDS はグラム陽性球菌の発育を阻害するが、濃度によっては大腸菌の発育にも影響を及ぼすことを示しており、大腸菌の発育に影響を与えないように SDS 濃度をできる限り抑える必要があることを示している。

そこで、SDS 濃度を 0.04%より低濃度の 0.02、0.025、0.03、0.035 及び 0.04%の 5 段階にして、同様の試験を行った。その結果を表 1 に示す。

SDS 濃度が 0.02%の培地においては、*S. warneri* A を除き全ての株で発育が観察され、特に球菌 X では、大腸菌と同じく 17 時間時点での発育が確認された。SDS 濃度 0.03%の培地においては、菌液濃度 100cfu/100ml 程度の濃度では全てのグラム陽性球菌の菌液で発育が確認されなかったが、特に発育が活発に見られた球菌 X の濃度を 10 倍 (1,000cfu/100ml 程度) にして同様に試したところ、22 時間で発育が見られた。なお、球菌 X の 10 倍菌液で 22 時間時点に計数されたコロニー数は 100 個以下であり、告示法で示される計数すべきコロニー数の範囲内であった。

これらの結果から、グラム陽性球菌の種類によっては、SDS を培地に添加せずに、培養開始後 18 時間から 20 時間までの間に判定することで、小型の青色コロニーを形成するグラム陽性球菌を大腸菌として誤計数することを防ぐことも可能であることが示された。しかし、日常業務での実用性を考慮すると、SDS 濃度を 0.03%に調製した培地Aで培養時間 18 時間から 20 時間までの間に判定することが、大腸菌数をより正確に判定する一条件になると考えられた。

表 1 各菌株の発育が確認された時間 ([ ]内は発育時間以降の経時によるコロニー数の変化)

菌株名	SDS 濃度				
	0.02% (SDS 添加なし)	0.025%	0.03%	0.035%	0.04%
<i>S. cohnii</i> B	24h [－]	発育なし	発育なし	発育なし	発育なし
<i>S. haemolyticus</i>	20h [増]	24h [－]	発育なし	発育なし	発育なし
<i>S. gallinarum</i>	18h [増]	24h [増]	発育なし	発育なし	発育なし
<i>S. xylosus</i>	20h [増]	22h [増]	発育なし	発育なし	発育なし
<i>S. cohnii/urealyticus</i>	24h [－]	発育なし	発育なし	発育なし	発育なし
<i>S. warneri</i> A	発育なし	発育なし	発育なし	発育なし	発育なし
球菌 X ①	17h [増]	22h [増]	発育なし	発育なし	発育なし
球菌 X ①の 10 倍菌量	17h [増]	20h [増]	22h [増]	26h [増]	発育なし
大腸菌(NCTC9001)	17h [増なし]	17h [増なし]	17h [増なし]	17h [増なし]	17h [増]

4 今後の研究方向等

今年度実施した菌株を用いたモデル試験では、「SDS 濃度を 0.03%に調整した培地Aで 18 時間から 20 時間の間に判定すること」が大腸菌数を正確に計数する条件として有効であるという結果を得た。しかし、実際の公共用水域の検水では、大腸菌やグラム陽性球菌以外の細菌、砂泥、栄養塩類など様々な環境由来因子が存在している。

来年度は、本結果を参考に、それらの環境由来因子が存在する実際の公共用水域の検水を用いて、大腸菌数測定法の問題点の改善方法を検討する。