

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

1 目的

国内では、例年、自然毒に起因する食中毒が多く発生しており、2018年から2022年までの5年間だけでも全国で321件（患者757名、うち死者14名）、本県では12件（患者31名）が報告されている¹⁾。細菌やウイルス等を含む全食中毒事案のうち、植物性又は動物性自然毒によるものは、事件数が全体の約7%、患者数は約1%と少ない。一方、食中毒による死者数の約80%は自然毒によるものであり、他の食中毒と比較してその致死率の高さが特徴として挙げられる。そのため、事案発生時には早期に原因物質を特定し、適切な治療へと繋げることが重要となる。

しかし、自然毒の分析には公定法がなく、各地方衛生研究所等は独自に試験法を検討し、原因究明を行っている状況である。当センターでも、令和3年度から、自然毒による食中毒の早期原因究明に向けた体制の構築を目指し、検討を進めてきた。

今般、これまでの検討結果を取りまとめ、自然毒による食中毒を想定した試験検査等対応マニュアルを作成したので、その概要を報告する。

2 方法・結果

(1) LC-MS/MS を用いた毒成分分析法の検討と体制整備

毒成分の分析はLC-MS/MSを用いることとし、試験条件は毒成分の性質から植物性自然毒（キノコ毒を含む）と動物性自然毒に分けて設定した。また、以前より保有していた標準品に加えて市販の標準品を購入し、植物性自然毒については既報²⁾により、動物性自然毒については鈴木らの方法³⁾により添加回収試験等を実施した。

Table 1 に示す成分について標準品等を整備し、これらの成分について添加回収試験等を実施した結果、いずれも分析が可能であることを確認した。

(2) PCR 法によるキノコ種の特定方法の検討

毒キノコの中には、毒成分の特定ができていないためLC-MS/MSによる成分分析が困難なものがある。このことから、LC-MS/MSによる成分分析と並行してDNA解析による種の特定を行うこととし、その方法を検討した。

市販のキノコ6種（エノキ、エリンギ、シイタケ、ナメコ、ブナシメジ及びマイタケ）を購入し、それぞれの粉砕物を採取したもの及び6種のキノコの粉砕物を混合したものを試料とし、DNeasy Plant mini kit（QIAGEN社製）を用いてDNAを抽出・精製を行い、次に、キノコDNAのITS領域を増幅するユニバーサルプライマー（F-Primer：5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'、R-Primer：5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'）を用いてサーマルサイクラー（Applied biosystems社製Pro Flex PCR System）によりITS領域を増幅させ、その後、サンガーシーケンス法又はNGS（次世代シーケンス）法により、塩基配列の解析を行った。

サンガーシーケンス法は、増幅産物をMonoFas DNA精製

Table 1. LC-MS/MS 分析対象成分

区分	成分	含有生物種等	
植物性	α-ソラニン α-チャコニン	ジャガイモ	
	アトロピン スコポラミン	チョウセンアサガオ、 エンジェルトラネペット など	
	アコニチン メサコニチン ヒバコニチン ジェサコニチン	トリカブト	
	ニコチン	タバコ	
	アミグダリン	アンズ、アーモンド、 梅などの種子	
	ククルピタシンB	ゴーヤ、ユウガオ、 ズッキーニ など	
	ジギトキシン ジゴキシン	ジギタリス	
	グラヤノトキシンI	レンゲツツジ	
	ジオスゲニン ジオスシン	カエデドコロ など	
	リコリン ガラントアミン ガラントアミノン	スイセン、 タマスダレ など	
	コルヒチン デメコルシン	イヌサフラン、 グロリオサ など	
	ジェルビン シクロバミン	バイケイソウ など	
	フェブリフジン	アジサイ、アマチャ	
	α-アマニチン β-アマニチン フロイジン	シロタマゴテング、 テングタケ など	
	イルジンS	ツキヨタケ	
	ムスカリン	テングタケ など	
	動物性	テトラミン	ツブ貝
		Cトキシン群 ゴニオトキシン群	麻痺性貝毒 (ホタテガイ等)
テトロドトキシン		フグ	

キット I (アニモス社製) を用いて DNA を精製したのち BigDye Terminator v3.1 cycle Sequencing Kit (Applied biosystems 社製) を用いて蛍光ラベル化したものを SeqStudio Genetic analyzer (Applied biosystems 社製) で塩基配列を決定した。データ解析は、得られた配列データについて MEGA X を用いてアライメントを行ったのち、BLAST 解析を行った。

NGS 法は、機器に Nanopore 社製 MinION Mk1C、シーケンシングキットに SQK-LSK109 を用いて行った。3 で得られた各試料について End Prep 処理のちバーコーディング処理を行い、全試料を混合した。混合液を Adapter 結合処理したのち MinION Mk1C のフローセルにアプライし、run 時間を 4 時間として分析した。

データ解析は、得られた Fastq.gz ファイル (Fastq の圧縮ファイル) について、プログラム言語の Python を用いてアライメントの一致度による分類を行ったのち、分類した配列について BLAST 解析を行った。

その結果、サンガーシーケンス法及び NGS 法のいずれにおいても、試料としたキノコ 6 種を検出することが可能であった。また、NGS 法では、6 種のキノコの混合物を同様に試験したところ、混合物であっても 6 種のキノコを検出することが可能であった。

(3) 理化学試験における人体試料取扱規程の整備

自然毒による食中毒が発生した場合、主な検体は調理品や食材であるが、稀に患者の尿、血液、吐しゃ物等の人体試料が搬入されることがある。人体試料は、微生物部門の試験検査では感染性試料として取り扱うため、安全キャビネット等の設備を用いて検査を行ってきたが、理化学検査部門では、感染性試料の取扱いについての基準等が無く課題となっていた。そこで今後、作業者の安全と設備の汚染防止を図ることを目的に、理化学試験部門における人体試料等の取扱い要領等の規程類を策定した。

規程類の策定にあたっては、微生物部門で策定している「病原体等安全管理要綱」等の規程を参考としながら、試験室、検体、器具・機器、廃棄物の管理方法の他、作業上の留意点、使用後の清掃手順、作業者の教育訓練等について明記した。

(4) 試験検査等対応マニュアル案の作成

自然毒による食中毒は、発生頻度が細菌やウイルス等に比べて少ないうえに、本県では発生しない年度もある。そのため、人事異動により、事案発生時に対応すべき担当者が自然毒分析の未経験者である状況も考えられ、技術継承が課題となっている。このことから、これまで行ってきた各分析法の検討結果を踏まえ、試験検査等対応マニュアル案を作成した。これには、食中毒が発生した際の検査方法のほか、検体受入や連絡調整の手順に加え、実際に行った添加回収試験の分析方法別の比較結果や、試験実施時の留意点等についても併せて記載した。また、遺伝子解析に不慣れな理化学試験担当者でも容易に理解が進むよう、操作手順に画像を多く掲載することにより作業理解度の向上を図った。また、マニュアルはチェック方式とし試験記録としても活用できる形式とした。

3 考察

これまで当センターでは、自然毒食中毒が発生してから試験法を確認していたため、対応に遅れが生じていた。併せて、技術継承が困難であったり人体試料の取扱い・管理方法が不明確であったりと課題が複数散見された。

今般、理化学検査における人体試料の取扱いを規定するとともに、試験検査等対応マニュアル案を作成した。自然毒による食中毒は県内での発生が稀であるものの即時対応が必要となることから、作成の際には①通常業務で使用している試薬、器具、機材等を用いること、②未経験の職員でも操作が容易に理解できることの 2 点を念頭に置き作業を進めた。今回作成したマニュアルが、従前の課題解決に寄与すると考える。

4 まとめ

自然毒による食中毒の原因究明体制の構築に向け、当センターにおける健康危機管理発生時のマニュアルを策定した。

- 1) 厚生労働省ホームページ：食中毒統計資料
- 2) 宮手、岩手県環境保健研究センター年報第 21 号令和 3 年度
- 3) 鈴木ら、第 58 回全国衛生化学技術協議会年会

研究成果報告書（2）

研究課題名	陽イオン性界面活性剤の分析法の検討
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
<p>1 目的</p> <p>令和4年度、県内のそうざい製造業者が、指定外食品添加物である陽イオン性界面活性剤のジデシルジメチルアンモニウムクロリド（以下、「DDAC」という。）を味付き卵の製造に使用し、行政処分を受けた。当該事例は本県で2度目であり、今後も類似事例の発生が懸念される。</p> <p>そこで、昨年度開発したゆで卵中の DDAC 分析法を用いて、DDAC と同様に広く消毒剤として使用されている陽イオン性界面活性剤の塩化ベンザルコニウムも分析できないかを検討した。</p> <p>また、類似事例発生の際に、陽イオン性界面活性剤の故意の使用を判断する材料となるよう、通常市場に流通している鶏の生卵及び卵加工品の DDAC 及び塩化ベンザルコニウムによる汚染実態を調査したので、併せて報告する。</p> <p>2 方法</p> <p>1) LC-MS/MS を用いた塩化ベンザルコニウムの分析</p> <p>塩化ベンザルコニウムの構造式はFig. 1 のとおりであり、アルキル基が C8 から C18 の混合物として存在する。主成分はアルキル基が C12、C14 及び C16 とされているため¹⁾、分析対象成分をこれら 3 成分（それぞれ BAC12、BAC14 及び BAC16 と呼ぶ。）とした。</p> <p>ゆで卵中の塩化ベンザルコニウムの分析は、昨年度開発した DDAC 分析法に則った。前処理方法を Fig. 2 に、測定装置及び測定条件を Table. 1 に示す。</p> <p>妥当性評価試験は、厚生労働省通知「妥当性評価ガイドライン」²⁾に従い試験を実施した。すなわち、1 試験当たり非添加試料(n=1)、定量下限値相当添加試料（0.01 ppm, n=2）及び鶏卵（可食部）における DDAC の残留基準値相当添加試料（0.05 ppm, n=2）の試験を行い、これを 5 回繰り返した。そこで得られた結果から、選択性、真度（回収率）、併行精度、室内精度により妥当性を評価した。</p> <p>なお、試料は県内で購入した鶏卵を沸騰水浴中で 10 分間ゆで、殻を剥いて粉碎均一化したものを用いた。試料 5 g を分取し、標準溶液を添加して 30 分間放置したものを添加試料とした。検量線用標準溶液は、2%ギ酸含有メタノールを用いて 0.5～20 ppb 標準溶液の 6 点を調製した。</p> <p>2) 市場流通する生卵及び卵加工品の汚染実態調査</p> <p>令和5年7月、盛岡市内の複数のスーパーマーケットから、鶏の生卵を 8 種類、温泉卵や味付き卵等の卵加工品を 8 種類購入し、可食部及び殻における DDAC 及び塩化ベンザルコニウムを測定した。</p> <p>3 結果</p> <p>1) LC-MS/MS を用いた塩化ベンザルコニウムの定量</p> <p>非添加試料については、妨害ピークは認められなかった。また、添加試料のピークは S/N\geq10 であることを確認した。真度（回収率）、併行精度、室内精度の結果は Table. 2 に示すとおりで、いずれも妥当性評価ガイドラインの判定基準を満たした。</p> <p>2) 市場流通する生卵及び卵加工品の汚染実態調査</p> <p>生卵及び卵加工品の可食部では、測定対象成分はすべて 0.01 ppm 未満であった。</p> <p>一方、殻では、Table. 3 及び Table. 4 に示すとおり、多くの製品では測定対象成分は 0.01 ppm 未満であったが、一部の製品では 0.01～0.05 ppm 検出されるものもあった。</p>	

なお、令和4年度の事例では、原料由来のもので殻から0.01~0.02 ppm程度だったのに対し、DDACを防カビ目的で添加した際、殻から1~10 ppmというオーダーでDDACが検出されている。

以上のことから、今後同様の事例が発生した際、生卵及び卵加工品から検出された陽イオン性界面活性剤が、原料由来なのか、故意に添加されたものなのか判断する材料として、本結果が参考となりうると思う。

4 今後の研究方向等

今後、同様の事案が発生した際は、本研究の成果をもって保健所の調査に寄与していくこととする。

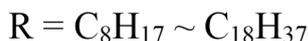
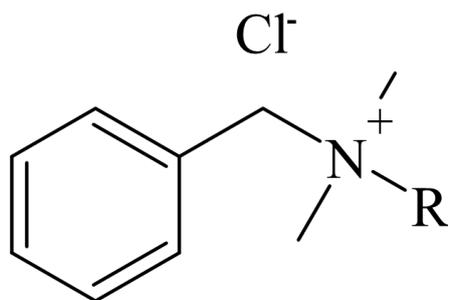


Fig. 1 塩化ベンザルコニウムの構造式

【抽出】
 試料 5 g (50 mL容PP製遠沈管)
 + 0.2%アンモニア含有メタノール 20 mL
 ホモジナイズ (11,000rpm, 1min)
 0.2%アンモニア含有メタノールで25 mLにメスアップ
 遠心分離 (3,000rpm, 5min)
 上清【抽出液】

【精製】
 固相カラム OASIS WCX (150 mg/6 cc)
 <コンディショニング>
 メタノール 3 mL
 水 3 mL
 0.2%アンモニア含有メタノール 3 mL
 抽出液 5 mL負荷 (流出液は廃棄)
 <洗浄 (流出液は廃棄)>
 5%アンモニア水 4 mL (流出液は廃棄)
 メタノール 4 mL (流出液は廃棄)
 <溶出 (流出液を採取)>
 2%ギ酸含有メタノール 4 mL (流出液を採取)
 2%ギ酸含有メタノールで 5 mLに定容
 試験溶液【LC-MS/MS測定液】

Fig. 2 抽出及び精製方法

【参考文献】

- 株式会社島津製作所 アプリケーションニュース「消毒剤中ベンザルコニウムの高速分析」
https://www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/pim/pim_document_file/an_jp/applications/application_note/17752/an_01-00249-jp.pdf
- 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)

Table.1 LC-MS/MS測定条件

装置	LC : Shimadzu LC-20AD MS : Sciex Triple Quad 5500
カラム	Imtakt scherzo SM-C18 (2 mm×150 mm, 3 μm)
移動相	A液…20 mMギ酸アンモニウム水溶液 B液…20 mMギ酸アンモニウム含有80%アセトニトリル
グラジエント条件(B液%)	0 min(5%) → 7 min(100%) → 15min(100%) → 16 min(5%) → 20 min(5%)
カラム温度	40℃
流速	0.4 mL/min
注入量	5 μL
イオン化モード	ESI (+)
Spray voltage(V)	4500 (V)
SRM条件	DDAC …326.4 > 186.2 BAC12 …304.0 > 91.2 BAC14 …332.1 > 90.9 BAC16 …360.0 > 90.9

Table.2 妥当性評価確認結果

成分名	試料中濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
BAC12	0.01	88.5	18.7	19.7
	0.05	92.5	5.14	8.45
BAC14	0.01	87.6	13.9	16.6
	0.05	87.3	5.26	8.91
BAC16	0.01	80.8	9.09	14.1
	0.05	79.1	5.43	11.0

Table.3 陽イオン性界面活性剤の検出結果 (生卵の殻)

生卵	DDAC	塩化ベンザルコニウム		
		BAC12	BAC14	BAC16
A	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
B	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
C	<0.01	0.05	0.02	<0.01
D	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
E	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
F	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
G	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
H	0.03	<0.01	<0.01	<0.01

単位: ppm

Table.4 陽イオン性界面活性剤の検出結果 (卵加工品の殻)

卵加工品	DDAC	塩化ベンザルコニウム			備考
		BAC12	BAC14	BAC16	
A	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	半熟卵
B	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	半熟卵
C	<0.01	0.01	0.02	0.01	半熟卵
D	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	半熟卵
E	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	ゆで卵
F	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	ゆで卵
G	—	—	—	—	ゆで卵 (殻無し)
H	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	ゆで卵

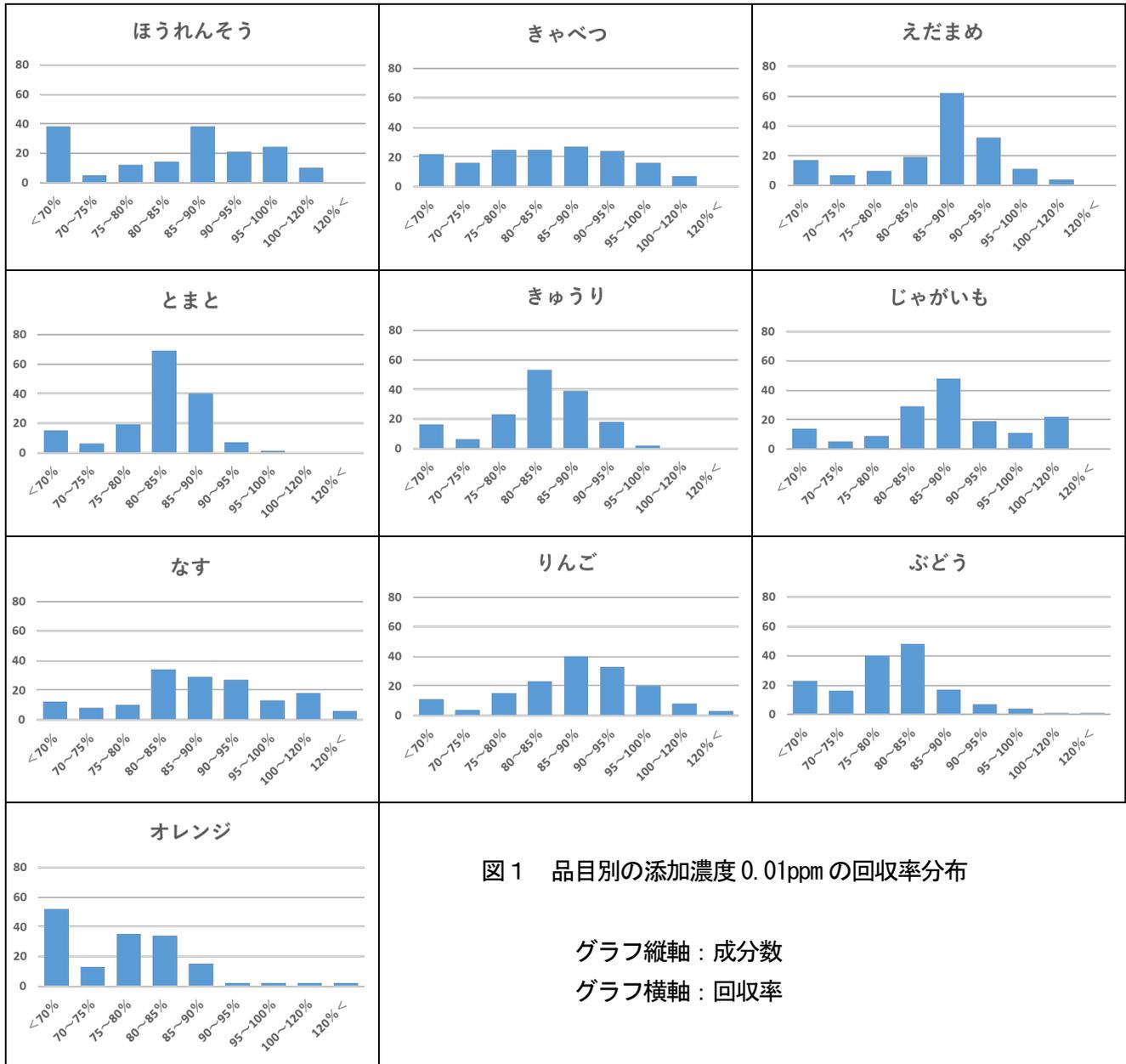
単位: ppm

研究成果報告書（3）

研究課題名	残留農薬検査における GC-MS/MS 分析の水素キャリアガス使用の検討																																	
担 当	衛生科学部 主任専門研究員 川村 あさひ																																	
<p>1 目的</p> <p>当センターでは、食品衛生法に基づく収去検査により、年間 100 検体程度の野菜、果実等の残留農薬検査を実施しており、当該検査は、GC-MS/MS 及び LC-MS/MS により分析している。</p> <p>このうち、GC-MS/MS 分析で使用するキャリアガスについては、測定感度の高いヘリウムを使用していたが、近年、日本国内へのヘリウム供給が不安定化し、価格も高騰するなどの問題が発生しており、当センターへの供給もいつまで続くか不透明となっている。</p> <p>ヘリウムの供給が停止されれば、GC-MS/MS 分析による検査ができなくなるため、ヘリウムの代替ガスとして水素による分析に切り替えを行うこととし、その妥当性評価試験を実施することで、収去検査測定成分の再設定を行い、検査体制の維持継続を図ることを目的として検討を行ったので、その概要を報告する。</p> <p>2 方法</p> <p>前処理方法は、株式会社アイスティサイエンスが開発した STQ 法（GC-B 法）により行った。</p> <p>品目毎に、試験対象である農薬を含まない試料に試験対象の農薬を 2 濃度（0.01ppm 及び 0.04ppm）添加した試料を調製し、1 日（1 回）2 併行、5 日間の枝分かれ試験を行った。</p> <p>品目は、代表農産物 10 品目（ほうれんそう、きゃべつ、えだまめ、とまと、きゅうり、じゃがいも、なす、りんご、ぶどう、オレンジ）とし、試験対象の農薬は、162 成分とした。</p> <p>GC-MS/MS の測定条件は、表 1 のとおりである。</p> <p>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、回収率、精度及び定量限界を求め、目標値に適合しているかを確認した。</p> <p>3 結果</p> <p>妥当性評価の結果について、表 2 に妥当性評価項目毎の適合数を、図 1 に品目別の添加濃度 0.01ppm の回収率の分布を示した。</p> <p>水素キャリアガスによる分析においても、多くの農薬成分の定量が可能であることが示された。</p> <p>一方、オレンジは、他の品目に比べて低回収率で精度も低く、妥当性評価不適合となる成分が多くあった。オレンジは、以前にもキャリアガスがヘリウムの際に妥当性評価を行っているが、あまり良好な結果は得られていなかった。これは、柑橘類に含まれるフラボノイド類などの夾雑成分の影響と推定されたことから、今回の検討では、夾雑成分除去のために固相カラム（GCK-20mg）を追加して前処理を行ったが、平面構造を有する対象農薬も除去されてしまい、回収率が改善した成分よりも悪くなった成分のほうが多くなってしまった。そのため、オレンジの前処理や機器分析の方法については、今後も検討を要する。</p> <p>4 今後の研究方向等</p> <p>本検討により、水素キャリアガス分析による残留農薬検査実施標準作業書を作成したため、収去検査を維持継続することが可能となった。今後は、収去検査対象品目を拡充するため、今回妥当性評価を実施した代表農産物に類似する食品についても添加回収試験を実施し、試験検査体制の充実強化を図りたい。</p>	<p style="text-align: center;">表 1 GC-MS/MS 測定条件</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;">機 器</td> <td style="width: 15%;">GC : Agilent社製 7890B</td> <td style="width: 15%;">MS/MS : Agilent社製 7000D</td> </tr> <tr> <td>キ ャ リ ア ガ ス</td> <td colspan="2">水素</td> </tr> <tr> <td>注 入 口 温 度</td> <td colspan="2">250 °C</td> </tr> <tr> <td>オ ー プ ン 温 度</td> <td colspan="2">70 °C (2 min) - 25 °C/min - 150 °C - 3 °C/min - 200 °C - 8 °C/min - 310 °C (5 min) → 310 °C (ポストラン5 min)</td> </tr> <tr> <td>トランスファーライン温度</td> <td colspan="2">290 °C</td> </tr> <tr> <td>カ ラ ム</td> <td colspan="2">Agilent社製 VF-5MS (0.25 mm × 30 m , 0.25 μm)</td> </tr> <tr> <td>注 入 モ ー ド</td> <td colspan="2">パルスドスプリットレス</td> </tr> <tr> <td>試 料 注 入 量</td> <td colspan="2">3 μL</td> </tr> <tr> <td>イ オ ン 化 方 式</td> <td colspan="2">EI (70 eV)</td> </tr> <tr> <td>イ オ ン 源 温 度</td> <td colspan="2">320 °C</td> </tr> <tr> <td>測 定 モ ー ド</td> <td colspan="2">MRM</td> </tr> </table>	機 器	GC : Agilent社製 7890B	MS/MS : Agilent社製 7000D	キ ャ リ ア ガ ス	水素		注 入 口 温 度	250 °C		オ ー プ ン 温 度	70 °C (2 min) - 25 °C/min - 150 °C - 3 °C/min - 200 °C - 8 °C/min - 310 °C (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	パルスドスプリットレス		試 料 注 入 量	3 μL		イ オ ン 化 方 式	EI (70 eV)		イ オ ン 源 温 度	320 °C		測 定 モ ー ド	MRM	
機 器	GC : Agilent社製 7890B	MS/MS : Agilent社製 7000D																																
キ ャ リ ア ガ ス	水素																																	
注 入 口 温 度	250 °C																																	
オ ー プ ン 温 度	70 °C (2 min) - 25 °C/min - 150 °C - 3 °C/min - 200 °C - 8 °C/min - 310 °C (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	パルスドスプリットレス																																	
試 料 注 入 量	3 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2 妥当性評価項目毎の適合数（対象農薬 162 成分中）

品目	選択性	0.01 ppm			0.04 ppm			定量下限	全評価項目 適合数
		回収率	併行精度	室内精度	回収率	併行精度	室内精度		
ほうれんそう	161	124	151	121	146	147	149	155	108
きゃべつ	162	140	156	142	147	152	148	157	128
えだまめ	162	145	153	147	147	152	150	158	138
とまと	157	142	155	151	143	148	148	157	136
きゅうり	157	141	153	150	138	151	144	157	135
じゃがいも	157	143	152	141	142	152	145	151	128
なす	157	139	154	139	138	146	137	151	117
りんご	157	143	154	147	144	147	146	153	133
ぶどう	156	133	149	142	141	134	148	152	121
オレンジ	153	103	148	117	111	118	100	143	87



研究成果報告書（4）

研究課題名	残留動物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 技師 藤田 涼斗

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・豚・鶏の筋肉、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、分析対象成分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の標準品の入手が難しくなっているほか、動物用医薬品の使用実態との乖離が危惧されるため、分析対象成分と併せて試験法を変更することとした。

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こととした。初年度は、分析条件の検討を行った。今年度は、本県での陽性事例などをもとに妥当性評価試験を実施する化合物を選定し、それらについて妥当性評価試験を実施し、収去検査における分析対象化合物を選定したのでその概要を報告する。

2 方法

はじめに、食肉衛生検査所に聞き込み調査を行い、近年の動物用医薬品の使用薬剤と残留薬剤のデータを得た。また、農林水産省動物医薬品検査所による令和4年動物用医薬品等製品販売高年報¹⁾を参照した。それらのデータをもとに、これまで収去検査で対象としていた48成分と当センターで過去にLC-MS/MS分析条件を設定した54成分に新たに12成分を加え、計114成分にて分析条件の検討を実施することとした。

初年度に5種類の前処理方法にて実施した添加回収試験の結果について、分析条件の検討を行う114成分のうち最も回収率等が良好であったことから、QuEChERS法による抽出、SPEEDIA(三浦工業社製)を用いて精製する方法を採用した。前処理方法および精製方法は、昨年度の実施方法を一部改訂し、図1の通りとした。液体クロマトグラフ(LC)の条件および質量分析計(MS/MS)の条件は、今年度の収去検査と同じ条件にて実施することとした。

妥当性評価の方法は、以下の通りに実施することとした。

- ・品目：5品目(牛・豚・鶏の筋肉、鶏卵、魚類(サケ目))

※県で行っている収去検査の品目に基づき決定

- ・添加濃度：低濃度0.01ppm、高濃度0.04ppm
- ・枝分かれ試験の方法：分析者1人、1日(1回)2併行、5日間

測定結果については、妥当性評価ガイドライン²⁾に基づき、回収率及び精度を求めた。適合基準は、本ガイドラインの目標値に基づき、回収率が70~120%であり、併行精度は低濃度(0.01ppm)で25%未満、高濃度(0.04ppm)で15%未満、室内精度は低濃度で30%未満、高濃度で20%未満であることとした。

また、回収率が50~150%となった成分におけるその品目については、定性可能成分とすることとした。

3 結果

妥当性評価の結果について、成分・品目ごとに適合となったものを表1に示す。5品目すべてで、適合した成分は45成分となった。使用傾向などを勘案し、当センターの収去について43項目、45成分を対



図1：分析前処理方法

象とすることとした。また、回収率が 50~150%となった品目ごとの成分を表2に示す。これらは収去対象品目に併せて、事件事故対応時の検査またはモニタリング検査において定性可能な成分とする。

表1：妥当性評価適合成分

• clenbuterol	• marbofloxacin	• oxibendazole	• sulfamethoxazole
• dicloxacillin	• mebendazole	• oxolinic acid	• sulfamethoxypridazine
• difloxacin	• miloxacin	• pyrimethamine	• sulfamonomethoxine
• ethopabate	• nalidixic acid	• sulfabenzamide	• sulfapyridine
• famphur	• nicarbazin	• sulfacetamide	• sulfaquinolaxine
• fenbendazole	• ofloxacin	• sulfachlorpyridazine	• sulfathiazole
• florfenicol	• orbifloxacin	• sulfadiazine	• thiabendazole
• flubendazole	• ormetoprim	• sulfadimethoxine	• tiamulin
• flumequine	• oxacillin	• sulfadimidine	• trimethoprim
• flumixim	• oxfendazole	• sulfadoxine	• valnemulin
• ketoprofen	• oxfendazole sulfone	• sulfamerazine	• xylazine
• lebamisole			

表2：定性可能成分（回収率：50~150%）

成分名	牛筋肉	豚筋肉	鶏筋肉	鶏卵	魚類（サケ科）	成分名	牛筋肉	豚筋肉	鶏筋肉	鶏卵	魚類（サケ科）
イソプロチオラン	○	○	○	○	×	サラフロキサシン	○	○	○	○	○
フェノブカルブ	○	○	○	○	○	チアベンダゾール代謝物	○	○	○	○	○
ブレドニゾン	○	○	○	○	×	プロカイン	○	○	○	○	○
ヒドロコルチゾン	○	×	○	○	○	ベタメタゾン	○	○	○	○	○
リンコマイシン	○	×	○	○	×	スルフィソキサゾール	○	○	○	○	○
アルベンダゾール代謝物	○	○	○	○	○	デキサメタゾン	○	○	○	○	○
αトレンボロン	○	○	○	○	○	ベンジルペニシリン	○	○	×	○	×
βトレンボロン	○	○	×	×	×	フェノキシメチルペニシリン	○	○	○	○	○
メレンゲステロール	×	×	○	×	×	クロキサリシン	○	○	○	○	○
エンロフロキサシン	○	○	○	○	○	ナフシリン	×	○	×	○	○
ダノフロキサシン	×	○	×	×	×	セファゾリン	×	×	×	○	○
スルファモイルダブソン	○	○	○	○	○	セフチオファル	○	×	○	○	○
オキシテトラサイクリン	○	×	×	○	×	ノルフロキサシン	○	○	○	○	○
クロルテトラサイクリン	○	○	○	○	○	シプロフロキサシン	○	○	○	○	○
テトラサイクリン	○	○	○	○	○	スピラマイシン	×	○	○	○	○
ドキシサイクリン	○	○	×	○	○	オレアンドマイシン	○	○	○	○	○
セフロキシム	×	×	×	○	○	トリクラベンダゾール	○	○	○	○	○
2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール	○	○	○	○	○	モランテル	×	×	×	×	○
スルファニトラン	○	○	○	○	○	クロビドール	○	○	○	○	○
チアンフェニコール	○	○	○	○	○	ピランテル	○	○	○	○	×
ゼラノール	○	○	○	○	○	クロルマジノン	×	○	○	×	×
ジクラズリル	○	○	○	○	○	カルバドックス	○	○	○	○	○
クララムフェニコール	○	○	○	○	○	ボスカリド	○	○	○	○	○
クロルスロン	○	○	○	○	○	ワルファリン	○	○	○	○	○
						ジフルベンズロン	×	○	×	○	×

4 今後の研究方向等

動物用医薬品等検査実施標準作業書(SOP No. : 5-53-9)を作成し、当所における動物用医薬品検査の検査体制を整備した。一方、テトラサイクリン系、アミノグリコシド系、セファム系、ペニシリン系の薬剤では妥当性が取れない成分が目立った。今後は、それらの系統の動物用医薬品の妥当性が取れる分析方法を検討することで、引き続き、本県の食の安全を支えるための検査体制の拡充を図ることとする。

(参考文献)

- 1) 農林水産省 動物用医薬品検査所「令和4年動物用医薬品、医薬部外品、医療機器及び再生医療等製品販売高年報」
- 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」

研究成果報告書（5）

研究課題名	岩手県における小児呼吸器ウイルスの疫学に関する研究
担 当	保健科学部 主任専門研究員 岩淵香織
<p>1 目的</p> <p>新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は2020年2月1日に指定感染症に定められ、当センターでも新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の遺伝子検査が実施されたが、検査対象の大部分はSARS-CoV-2不検出であり、他の呼吸器感染症が疑われた。COVID-19流行下で、SARS-CoV-2の他にどのような呼吸器ウイルスの流行があったのかを明らかにするため、これらCOVID-19不検出症例からウイルス等の検索を行った。その結果、998検体中119検体から病原ウイルス等が検出されている。これら結果について、ひとつは、COVID-19流行前と第8波以降（流行後とする）の感染症発生動向調査に基づく病原体サーベイランスの検査結果を比較し考察すること、もうひとつは、最も検出数の多かったヒトライノウイルス（HRV）52例の詳細な解析を行うこととした。</p> <p>2 方法</p> <p>(1) COVID-19流行前と流行後の感染症発生動向調査に基づく病原体サーベイランスの検査結果の比較集計をする期間（検体採取期間）は下記のとおりとし、検出されたウイルス別のグラフを作成した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・流行前：2019年1月～12月（平成31年1月～令和元年12月） ・流行後：2023年4月～8月（令和5年4月～令和5年8月） <p>なお、SARS-CoV-2不検出症例からの検査期間（検体採取期間）は、2020年2月～12月（令和2年2月～令和2年12月）であり、流行中と呼ぶこととする。</p> <p>(2) HRVの解析</p> <p>HRVは、3つの遺伝子群HRV-A、B及びC群に分類されており¹⁾、さらに遺伝子配列の違いから多数の血清型が存在する（A:81種類、B:31種類、C:60種類²⁾）。COVID-19不検出症例から検出された52例のHRVは、VP4/VP2領域を増幅するコンベンショナルRT-PCRを行い、そのPCR産物をダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。得られた遺伝子配列はRVdb²⁾及びEnterovirus Genotyping Tool Version 0.1³⁾により同定し、33例がHRV-Aに、1例がHRV-Bに、18例がHRV-Cに分類され、同時に50例（A:31、B:1、C:18）の血清型が特定された。また、シーケンスデータはMEGA6を使用しClustal Wを用いてアライメントを行い、参照配列はRVdb²⁾を参照しNJ法による系統樹を作成し検出されてウイルスのクラスター分類などを行った。</p> <p>3 結果及び考察</p> <p>(1) SARS-CoV-2不検出症例から検出されたウイルス等について、COVID-19流行前と流行後の感染症発生動向調査に基づく病原体サーベイランスの検査結果の比較したグラフを図1に示す。流行前と流行後は、インフルエンザウイルス（それぞれ34%、47%）が多くを占めているが、流行中は、インフルエンザウイルスは減少しHRVが46%（52例）と多くを占めていた。</p> <p>HRVが検出された症例の年齢層別では、0-9歳及び29-39歳が12名、19-29歳が10名の順に多くなっていた（図2）。「10歳未満の小児では、COVID-19の流行拡大後もSARS-CoV-2はほとんど検出されなかったが、HRVの検出率が著しく上昇した。」との報告があり⁴⁾、10歳未満の小児について県内でも同様であったことが推察された。また、HRV-Aが20歳代、30歳代の年齢層に多く検出されており病原体サーベイランスでは対象が小児科であることから把握できていなかった年齢層にライノウイルスの発生があったことが認められた。</p> <p>なお、HRVはエンベロープを持たないため、アルコールが効きにくいことが知られており^{5) 6)}、COVID-19流行下でのHRVの流行は、アルコールによる予防効果が低かったことも関連すると考えられた。ただし、石鹸と水を使う手洗いはHRVにも有効であり⁵⁾、感染症対策としては特定のウイルスに絞った個別的な対策ではなく総括的な対策が必要と考えられた。</p>	

(2) 52例のHRVは、19の多様な血清型に分類された。HRV-Aは、33株から8つの血清型が検出された。集積の多い血清型は3つで、A82が11例、A106が8例、A103が6例である。また、HRV-Cは18例から10の血清型が検出された。集積した血清型はC43のみである。それらの地区別の状況は図3、4のとおりである。なお、HRV-Bは、1例検出され、血清型はB84であった。

系統樹解析は、HRV-AとHRV-Cに分けて実施した。HRV-Aで集積のあったA82の11例のうち9例、A106の8例、A103の6例はそれぞれの血清型によるクラスターを作った(図5)。A82の2例は9例のクラスターとは別のクラスターとなった。HRV-Cで集積のあったC43についてもクラスターを作った(図6)。同じ血清型でも塩基配列は異なっていることもあり(家族内、同一人物からの異なる検体は一致)、クラスターは作ったものの広域散発事例かどうかの判断は難しい。

HRV感染症の多くは軽症と考えられる一方で、児童の喘鳴や喘息の憎悪の60-70%にHRVが関与すると言われて¹⁾いるが、多様な血清型等のためワクチンが開発されていない^{1) 2)}。さらなる調査・研究が必要である。

4 今後の研究方向等

本研究は終了となるが、研究が進んでいない小児呼吸器感染症の原因ウイルスがあること、また、さらなる新興感染症等の流行が危惧されることから、積極的に病原体サーベイランスを行っていくことが必要である。

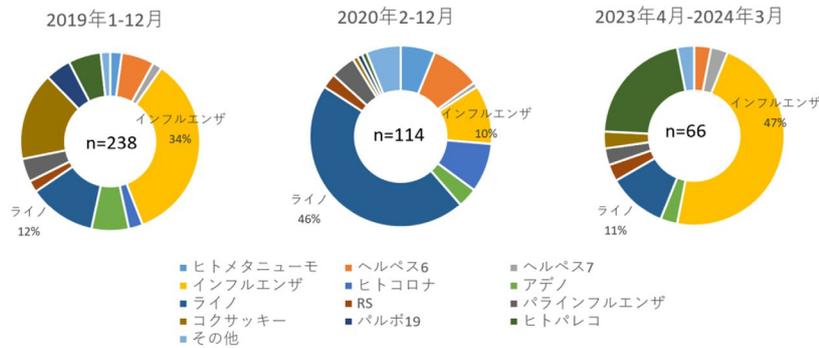


図1 COVID-19流行前と流行後の感染症発生動向調査に基づく病原体サーベイランスの検査結果の比較

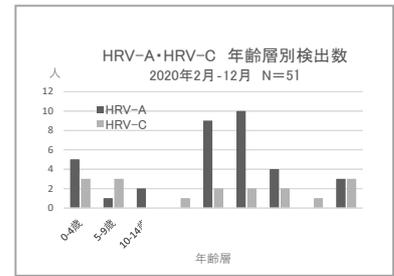


図2 HRV検出数 年齢層別

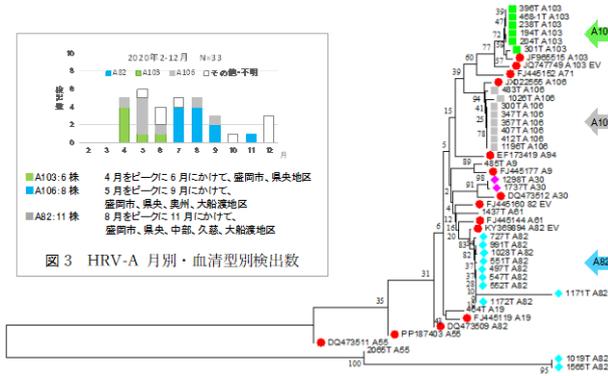


図3 HRV-A 月別・血清型別検出数



図5 HRV-Aの分子系統樹
NJ法 P4/VP2領域 (435bp) ●参照配列

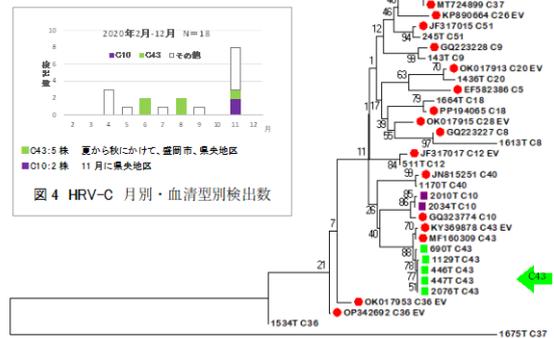


図4 HRV-C 月別・血清型別検出数



図6 HRV-Cの分子系統樹
NJ法 P4/VP2領域 (435bp) ●参照配列

参考文献

- 1) 国立感染症研究所 ライノウイルス検査マニュアル
- 2) Rvdb: rhinovirus database (<http://rvdb.mgc.ac.cn>)
- 3) Enterovirus Genotyping Tool Version 0.1 (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus/>)
- 4) Emi Takashita, *et al.*, Influenza and Other Respiratory Viruses15: 488-494, 2021
- 5) Savolainen-Kopra C, *et al.*, J Med Virol 84: 543-547, 2012
- 6) 厚生省保健医療局結核感染症課監修, 消毒と滅菌のガイドライン, へるす出版, p36-80
- 7) 尾家重治, 消毒薬の選び方・使い方, じほう, p71-109

研究成果報告書（6）

研究課題名	環境水サーベイランスにおける病原ウイルスアセスメント
担 当	保健科学部 専門研究員 梶田弘子
<p>1 目的</p> <p>当センターでは、感染症流行予測調査事業のポリオウイルス感染源調査のため、環境水（流入下水）サーベイランスを毎月実施している。感染源調査で実施している下水濃縮法（陰電荷膜濃縮法）は、ポリオウイルス以外のエンテロウイルス等ウイルスを効率的に捕捉できるため、感染症発生动向調査における病原体サーベイランスの一助となっている。また、顕性、不顕性を問わず多くの病原ウイルス RNA を検出できるため、患者発生の状況を把握するだけでなく感染症の早期探知や流行を予測することが期待される。</p> <p>本研究は、下痢症を引き起こす腸管系病原ウイルスや新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) について、流入下水の実態調査を行い、感染症発生动向調査事業の充実に資することを目的に実施した。</p>	
<p>2 方法</p> <p>(1) 令和元年度以降の感染症流行予測調査事業で月 1 回の頻度で採水し濃縮した流入下水について、下痢症を引き起こす腸管系病原ウイルスを対象として PCR 検査を実施した。検出されたウイルスについては、感染性胃腸炎集団発生事例の原因ウイルスと比較した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・令和元～5 年度 60 検体 (12 検体/年 × 5 年) ・検査対象ウイルス：ノロウイルス G I (NV G I)、ノロウイルス G II (NV G II)、サポウイルス (SaV)、アデノウイルス (AdeV)、アイチウイルス (AichiV)、アストロウイルス (AstV)、パレコウイルス (ParechoV) <p>(2) SARS-CoV-2 感染症の流行状況把握の一助とすべく、5 年度の検体を用いて、検査法を検討した。下水濃縮法については、ポリオウイルス検出で実施している陰電荷膜濃縮法と市販キット「Promega Wizard Enviro TNA kit」の 2 つの手法を用いた。リアルタイム PCR 法は、QIAGEN QuantiTect Probe RT-PCR kit (NIID_N2) と TaKaRa SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater (CDC_N1/N2) の 2 種類の Primer/Probe セットを検討した。</p>	
<p>3 結果及び考察</p> <p>(1) 腸管系病原ウイルスの検出状況</p> <p>① NV G I 及び NV G II は、年度により検出状況に違いはあったが、概ね秋季から翌年初夏に検出され、季節による変動が認められた。令和 3 年 4・5 月は流入下水から G II. 4 が検出され、同時期、下水処理場の流域医療圏では、G II. 4 による感染性胃腸炎の集団感染事例が発生していることから、流入下水から検出されたウイルス遺伝子が地域での流行状況を反映していることが示された。しかし、令和 4 年 1・2 月の流入下水から G II. 2 が検出されているが、同時期は G II. 4 による集団感染事例が多発し、流行状況を反映していなかった。地域での流行を把握するには、月 1 回の採水頻度では難しいと考えられる。</p> <p>② SaV は、概ね通年検出され、特に、冬季から初夏にウイルス RNA 量が増加した。特に、令和 4 年 1 月から増加し、4～6 月にかけて高い値で推移した (図 1)。この時期、県内では 33 件の感染性胃腸炎集団感染事例が発生し、サポウイルスによるものが 22 件とサポウイルスが主流となっていた。地域での流行状況が流入下水に反映していることが示された。</p> <p>③ AstV は、流入下水からほぼ通年検出された。感染性胃腸炎の原因ウイルスとして検出頻度は低いが、県内で集団感染事例の発生が確認されており、今後、定量及び遺伝子型について検討予定である。</p> <p>(2) 下水中の SARS-CoV-2 検査法の検討</p>	

① 令和5年度採水した12検体について、陰電荷膜濃縮法で処理して得られた上清検体と沈渣検体を QIAamp Viral RNA Mini Kit で RNA 抽出し、上述の TaKaRa キットで定量した結果、全検体とも沈渣検体の RNA 量が多かった。しかし、上清検体の RNA 量は沈渣検体の 1/100 から 1/2 量とばらつきが大きく、両方の検体を定量する必要があり、作業時間もほぼ1日を要した。

市販キット「Promega Wizard Enviro TNA kit」の場合、約3時間で下水の濃縮-RNA 抽出を行うことが可能で、上清と沈渣検体を1つのカラムで精製し定量可能なことから、「Promega Wizard Enviro TNA kit」で濃縮-RNA 抽出することとした。

② 「Promega Wizard Enviro TNA kit」で濃縮-RNA 抽出した下水検体を2つの Primer/Probe セットで定量した結果(n=2)、CDC_N1/N2 法の RNA コピー数の方が NIID_N2 法より 10^2 オーダー程度高かった。また、NIID_N2 法では、ばらつきが大きく、下水検体には適していないことから CDC_N1/N2 法で検査することとした。

③ 検討した下水中の SARS-CoV-2 検査法を用いて、令和6年2月から岩手県感染症情報センターHP に新型コロナウイルス感染症情報の1つとして、毎週「下水サーベイランス調査結果」を県民に情報発信している(図2)。

4 今後の研究方向等

流入下水からの検出が多かったウイルスについて、流行シーズンに週1回の頻度でのデータ集積を図り、感染症の早期探知や流行予測の可能性を検討し、感染症発生動向調査事業の充実を図る。

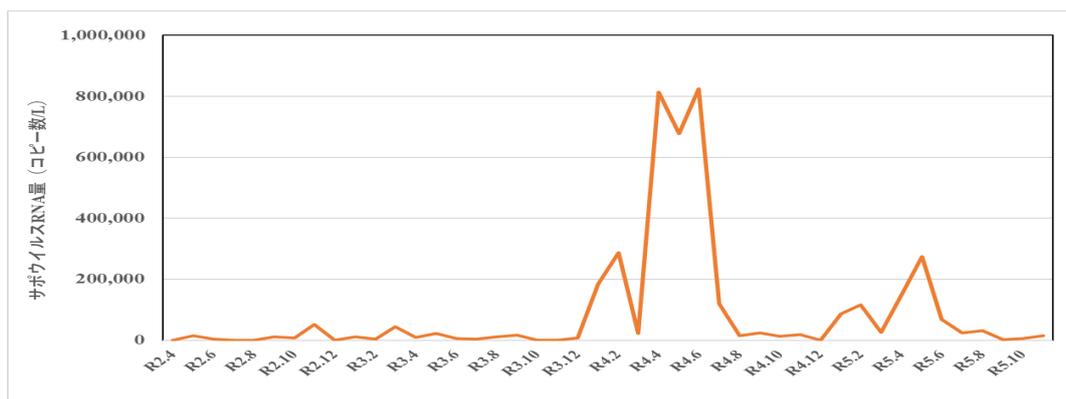


図1 流入下水中のサポウイルス RNA 量の推移 (令和2年4月～令和5年11月)

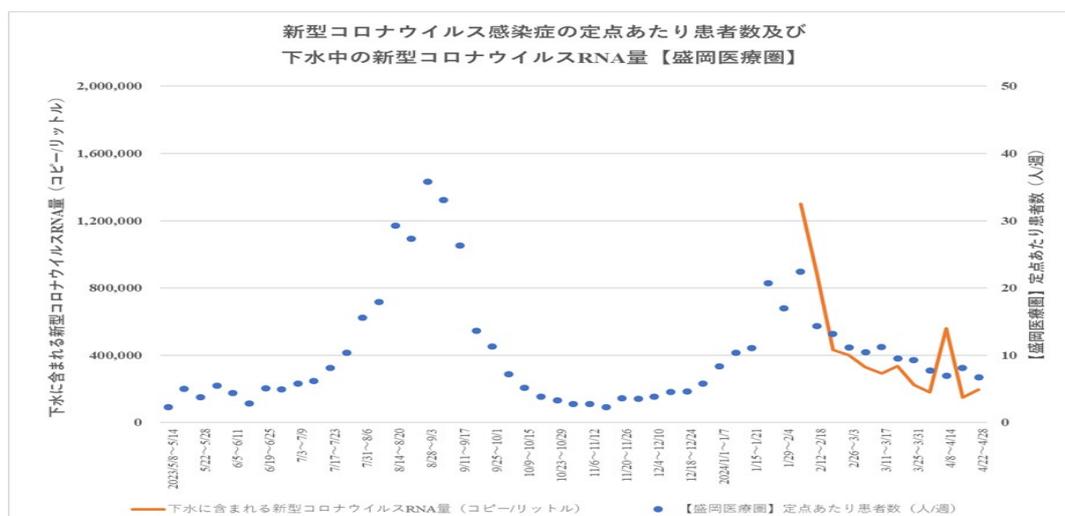


図2 岩手県感染症情報センターHP での下水中の新型コロナウイルス RNA 量に関する情報提供 (一部抜粋)

研究成果報告書（7）

研究課題名	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
担 当	保健科学部 主任専門研究員 並岡 亜希子、上席専門研究員 三浦 紀恵、 主査専門研究員 平野 春菜

1 目的

本研究は、当センターの保健情報について、データ活用の実態に即した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。

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。

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。

2 方法

(1) 保健情報の効果的活用に向けた情報還元の評価・検討

関係機関を対象に保健情報の活用状況及び課題、ニーズ等に関する調査を実施。回答を集計し、調査結果を基に当センターの情報還元の内容や方法等について評価・検討した。

(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

保健情報の活用に関する調査結果及び当センターの解析項目・解析法の評価を踏まえ、具体的な解析項目・解析法・還元内容等を検討した。また、検討した解析項目について、NDB オープンデータや岩手県医療等ビッグデータ等の各種データを用いてデータ解析を行った。

3 結果

(1) 保健情報の効果的活用に向けた情報還元の評価・検討

ア 効果的な情報還元の推進に向けた保健情報の活用に関する調査

[調査期間] 令和5年7月3日～7月28日

[調査対象機関] 433 機関 } 県関係室課、市町村（保健担当課、国保担当課、教育委員会）、
小・中・高等学校、医療保険者等、大学（保健師・管理栄養士養成施設）

[回答率] 75.5%（回答数 327/433）

[調査結果] 県・市町村（抜粋）（回答率：県本庁・保健所 100.0%、市町村保健担当課・国保担当課 81.8%）

当センターが提供する保健情報を活用している（「活用している」及び「やや活用している」）割合は、県本庁 42.9%、県保健所 100.0%、市町村保健担当課 92.3%、市町村国保担当課 37.0%であった（図1）。

また、当センターの保健情報を各種計画やモニタリング、現状分析等の指標として活用している割合は、県本庁 57.1%、県保健所 100.0%、市町村保健担当課 92.6%、市町村国保担当課 27.6%であった（図2）。保健情報を指標として活用していると回答した機関のうち、最も活用している計画は、健康増進計画で、県保健所 100.0%（9/9）、市町村保健担当課 84.0%（21/25）であった。県・市町村ともに、健康づくりや食育、母子保健、自殺対策、また、市町村では医療保険者に策定が義務付けられているデータヘルス計画等、様々な領域で活用されていた（図3）。

図1 当センターが提供する保健情報の活用状況 ※市町村については、保健所が提供する保健情報を含む。

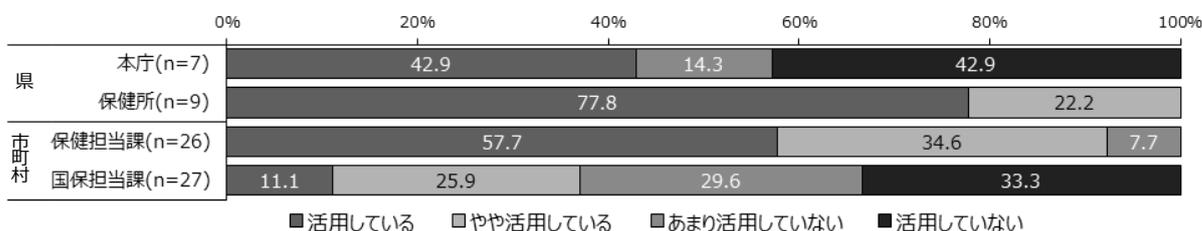


図2 当センターの保健情報を各種計画やモニタリング、現状分析等の指標として活用している割合

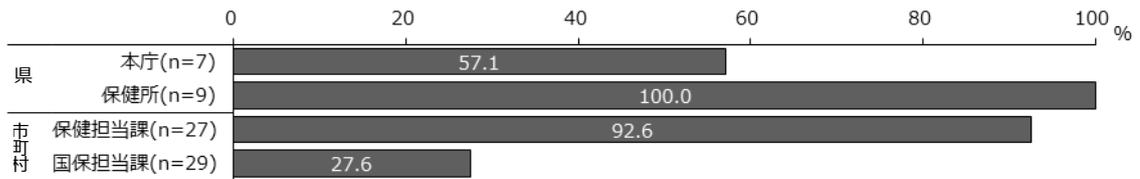
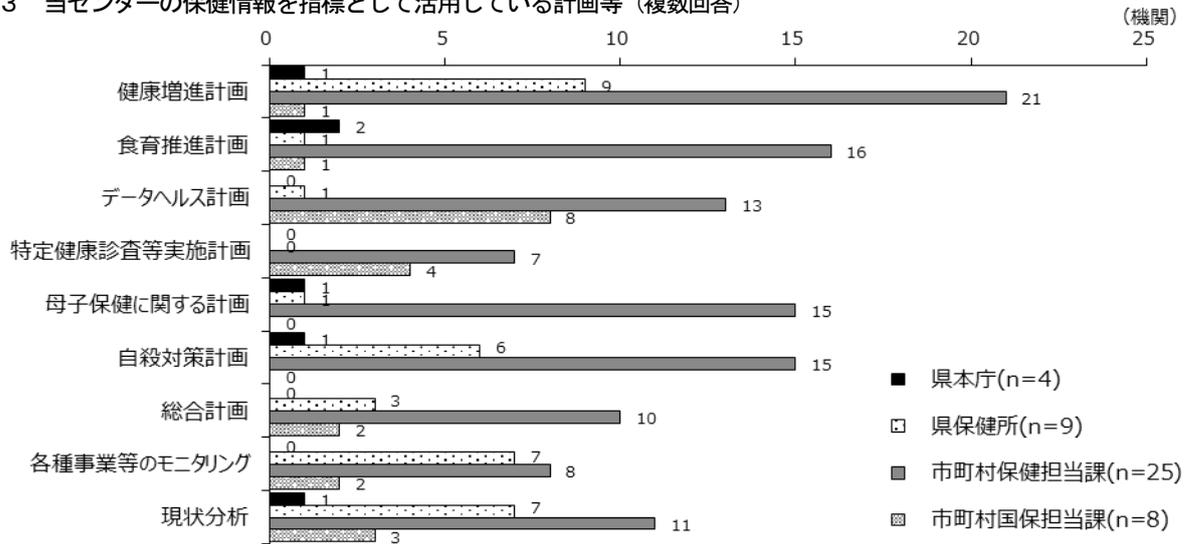


図3 当センターの保健情報を指標として活用している計画等（複数回答）



(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

ア 解析項目・解析法・還元内容の検討

解析項目として計63項目を選定。また、データ解析の効率化・省力化を図るため、当センターの従来の解析方法を見直し、新たなデータ解析用の各種テンプレート（標準化該当比算出用・NDB オープンデータ処理用等）を作成した。これにより、データ解析作業に要する時間の大幅な削減に繋がった。

区分	項目数
特定健診・特定保健指導の実施状況	2
特定健診結果の状況	32
生活習慣の状況	29
計	63

イ データ解析

第8回NDB オープンデータ、岩手県医療等ビッグデータ（令和2年度）の特定健診データを用いて、標準化該当比を算出した。また、主催する特定健診・特定保健指導従事者を対象とした研修会において、解析結果の一部を公表した。全国における県の現状について、圏域別、性・年代別で示すことにより、県全体及び圏域の現状・健康課題の把握、また各種施策の立案・評価等の基礎資料になり得ると考える。

4 今後の研究方向等

本研究により、これまで把握が難しかった、関係機関における保健情報活用の実態に関する基礎資料を得ることができたと考える。本研究を踏まえ、今後は下記について取り組む。

(1) 保健情報の効果的活用に向けた情報還元の評価・検討

本研究の調査結果について、更に分析・評価を行い、より効果的な情報還元を行うための検討を進め、情報還元反映させていく。また、調査結果を取りまとめ、関係機関へ還元する。

(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

本研究で検討した解析項目等について、解析用テンプレートを用いてデータ解析を進める。また、他の解析項目についても、並行して取り組んでいる情報還元の評価・検討の内容を考慮するとともに、作業の効率化も視野に入れて検討を進める。得られた解析結果については、関係機関へ還元していく。

研究成果報告書（8）

研究課題名	化学物質による環境リスクの把握・低減化に向けたスクリーニング分析法の開発
担 当	環境科学部 上席専門研究員 伊藤 朋子、専門研究員 今野 博貴

【研究①】 LC-QTOFMS Data independent acquisitionによる化学物質スクリーニング手法の検討

1-1 目的と方法

近年開発された LC-QTOFMS 用自動同定・定量システム (AIQS-LC)¹⁾は、QTOFMS による精密質量測定と、MS スペクトル、保持時間 (RT) 及び検量線を登録したデータベースにより、標準物質を用いることなく、約 540 種の化学物質ターゲットスクリーニングを可能としている。しかし、AIQS-LC では、AIQS-GC のような RT 補正機能がなく、ラボにより登録 RT と実測 RT が大きくずれる場合があった。MS スペクトルを精密質量で取得することで、物質同定精度を高めているものの、RT が大きくずれる場合には、誤同定や誤不検出が生じる恐れがある。この問題を解決するため、LC 用保持指標 (RI) 物質 N-Alkylpyridinium sulfonates (NAPS)²⁾を用いて、AIQS-LC の RT 補正が可能か検討した。

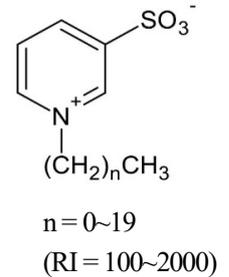


図1 NAPS

国立環境研究所、北九州市立大学、大阪市立環境科学研究センター及び当センターにおいて、NAPS と農薬混合標準 (112 物質) を AIQS-LC の装置条件で測定し、各物質の実測 RT を得た。農薬 RI は、北九大の測定結果と式 (1) から算出した。次に、北九大以外の NAPS RT と算出済み農薬 RI から、(1) 式を展開して、各機関における農薬の補正 RT を算出した。NAPS RI による補正効果は、実測 RT と補正前後の RT の残差により確認した。

$$RI = RI_0 + (RI_1 - RI_0) \frac{RT - RT_0}{RI_1 - RI_0} \quad (1)$$

RI、RT は対象物質の保持指標と保持時間
 RI₀、RT₀ は対象物質の直前に溶出する NAPS の RI 及び RT
 RI₁、RT₁ は対象物質の直後に溶出する NAPS の RI 及び RT

1-2 結果

各ラボにおける農薬の実測 RT に対する AIQS 登録 RT (補正前) 及び NAPS RI 補正 RT の残差を図 2 に、二乗平均平方根誤差 (RMSE) を表 1 に示す。NAPS による RT 補正を行わなかった場合、いずれの機関も平均してデータベースの登録 RT より 0.3 min 以上のずれが見られるが、NAPS 補正 RT は全ての機関で実測 RT との差の平均が ±0.3 min 以下となり、残差のばらつきや RMSE も小さくなった。このことから、NAPS を用いて、AIQS-LC の RT 補正を行い、物質同定精度を向上することが可能であると考えられた。

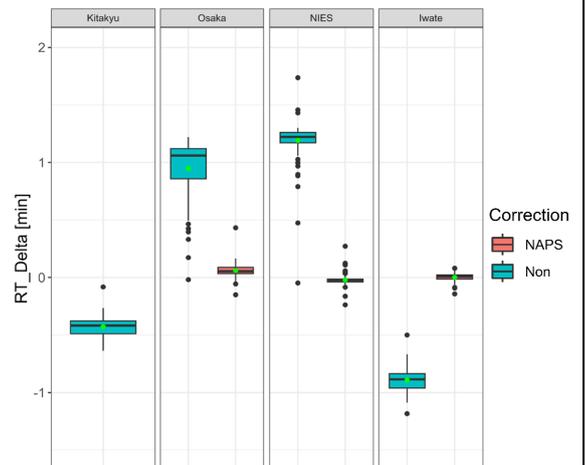


図2 各機関の実測 RT と補正前後の RT 残差の Box Plot

表1 各機関の RMSE

RMSE(min)	補正無し	NAPS補正有
北九大	0.44	-
大阪市	0.98	0.09
国環研	1.20	0.05
岩手県	0.90	0.03

【研究②】 環境リスク物質の環境残留実態の把握

2-1 目的と方法

環境中に放出された化学物質の残留実態と濃度推移を明らかにするため、県南地域に位置する下水処理施設 (STP) の処理水及び処理水が流入する河川の上流・下流並びに支流において、シーズンごとに採水と流量測定を実施し、門上らの方法¹⁾に従い、AIQS-LC によるターゲットスクリーニングを行った。

2-2 結果

採水地点の模式図を図3に、シーズン毎流量を図4に示す。また、各地点におけるカテゴリーごとの検出物質数を表2に、下水処理水中の検出率と検出濃度が高かった10物質について、下流1地点と上流域の総量の比を表3、採取地点・季節ごとのカテゴリー別最大検出濃度のヒートマップを表4に示す。

検出物質数は、下水処理水が最も多く、年間で約80物質を検出した。カテゴリー別では医薬品類が多く検出されたが、防さび剤に使用される1H-benzotriazolが高頻度で検出されていることも特徴的であった。また、下水処理水流入前の上流河川においても、Distyrylbiphenyl disulfonate(蛍光増白剤)やFexofenadine(抗ヒスタミン剤)などのPPCPsが高頻度かつ比較的高濃度に検出されており、浄化槽などを通じた生活排水の影響が伺われた。検出濃度のヒートマップでは、下水処理水の検出濃度が高く、流入後の下流地点が影響を受けていたほか、支流河川の春季の農薬類がやや高濃度となり、種類と用途、土地利用形態から、春季に水稲用に使用される農薬の影響であることが推察される。

下流1地点における総量と上流域の総量の比較から、多くの物質は水量により希釈されるのみで、そのまま拡散・流下していると考えられた。

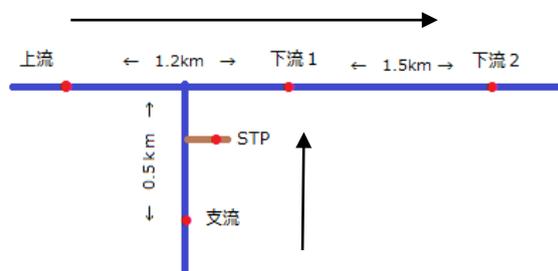


図3 採取地点の模式図

表2 各地点のカテゴリー別検出物質数

カテゴリー	支流	上流	下流1	下流2	STP
農薬	23	18	20	21	14
工業薬品	10	6	7	7	14
医薬品	17	10	22	20	44
生活関連物質等	7	5	6	5	7
合計	57	39	55	53	79

※生活関連物質等：ボディケア製品、人工甘味料、蛍光増白剤等の化学物質をカテゴライズ

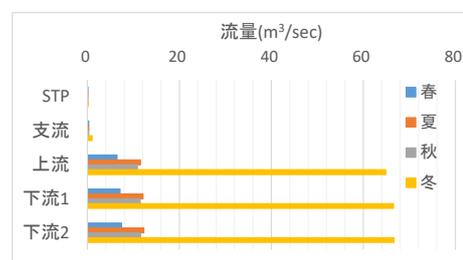


図4 採取時の各地点流量

※冬季採水時、降雨と雪解け水の影響で流量が大きくなった

表3 下流1と上流域の総量比*

検出物質	総量比		
	春季	夏季	秋季
Sucralose	0.9	1.2	0.9
Distyrylbiphenyl disulfonate (FB351)	1.0	0.9	1.1
Fexofenadine	2.2	1.6	2.1
Metformin	1.1	1.1	1.2
Fluorescent brightener 71 (FB71)	1.6	0.0	0.0
Diphenhydramine	0.8	0.7	1.0
Sulpiride	1.4	1.6	1.6
Tetraglyme	0.6	0.0	0.7
Lidocaine base	1.2	1.5	1.3
1H-Benzotriazole	6.7	24.5	9.5

※総量比=下流1総量/(上流総量+支流総量+STP総量)

総量は水質濃度と流量から算出(降雨影響が大きい冬季の結果を除外)

表4 採取地点・季節ごとのカテゴリー別最大検出濃度のヒートマップ(単位: ng/L)

カテゴリー	支流				上流				下流1				下流2				STP			
	spring	summer	autumn	winter	spring	summer	autumn	winter												
農薬	157.2	240.3	103.8	311.3	30.3	18.2	12.0	23.3	40.8	20.7	19.2	27.4	45.9	20.8	21.8	32.6	183.3	115.7	75.1	393.9
工業薬品	343.0	242.0	24.9	15.0	6.1	0.4	3.4	20.5	153.5	280.3	68.7	29.7	206.6	360.4	58.8	68.3	826.0	964.4	2212.5	1211.1
医薬	126.7	47.2	97.0	30.5	24.1	16.5	12.2	2.9	289.5	131.3	186.5	43.6	302.7	135.6	229.1	47.3	5240.9	5696.6	6128.2	6035.0
生活関連物質	450.7	338.9	261.1	411.8	50.5	55.6	70.6	28.9	453.1	339.7	223.4	119.5	515.4	340.6	258.2	48.8	22992.7	24884.6	14068.5	11466.7

【参考文献】

- 1) Kadokami, K.; Ueno, D. Anal. Chem. 2019, 91(12), 7749–7755
- 2) Rainer Stoffel et al., 2022, Anal. Bioanal. Chem. 414, 7387-7398

研究成果報告書（9）

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。

令和5年5月22日及び23日は全国各地で黄砂が観測され¹⁾、岩手県の大気常時監視システムにおいても各測定局でPM2.5濃度の上昇が認められた。本研究では、令和5年度春期（令和5年5月10日～令和5年5月24日）の成分分析結果について検討することで、岩手県で採取されたPM2.5の成分組成と黄砂の関係について考察する。

2 方法

サンプラーとして Thermo 社製 FRM2025i 型を使用し、毎日午前0時から24時間採取した。PTFE及び石英フィルターに捕集した試料は「大気中微小粒子状物質（PM2.5）成分測定マニュアル」（環境省）²⁾に準拠して分析し、質量濃度、イオン成分（Cl⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻、NH₄⁺、Na⁺、K⁺、Ca²⁺及びMg²⁺）、炭素成分（有機炭素（OC）及び元素炭素（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。なお、令和5年度の測定地点は滝沢市巣子局及び久慈市八日町局であるが、令和5年度春季においては巣子局で機器トラブルによる欠測があったため、本研究では主に八日町局の結果について扱う。

3 結果と考察

（1）PM2.5 質量濃度及び主要成分

八日町局で採取されたPM2.5試料についてPM2.5質量濃度を見ると、全国各地で黄砂が観測された5月22日～23日の他、5月18日～19日にも上昇が見られた（図1）。なお、巣子局で採取されたPM2.5試料についても同様の傾向が見られた。

主要成分の内訳を見ると、5月18日～19日については硫酸イオン（SO₄²⁻）の濃度が他の日よりも高く、硫酸イオンがPM2.5質量濃度の上昇に寄与したと考えられる。一方で、5月22日～23日については、同じくPM2.5質量濃度の上昇が見られた5月18日～19日に比べると主要成分の濃度の合計は小さく、主要成分に分類されない成分の割合が高くなっていることが分かった。5月22日～23日のPM2.5には、通常はPM2.5質量濃度への寄与が少ないとされる無機元素成分が多量に含まれていると考えられる。

（2）無機元素成分

無機元素成分は、PM2.5質量濃度への寄与が僅かな成分であっても発生源の情報を多く含んでいることがあり、濃度やその比を用いた解析が発生源の推定に有効である。

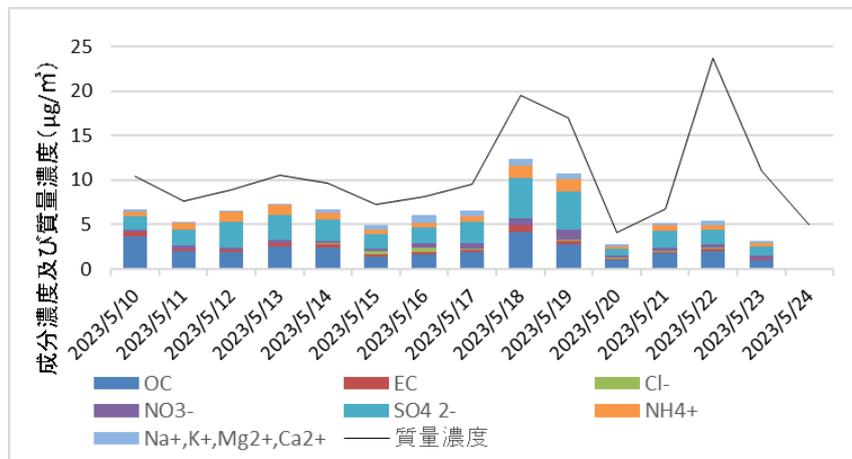


図1 主要成分の質量濃度（八日町局） 5月24日は炭素成分の採取をしない日であったため、主要成分の内訳は示さずPM2.5質量濃度のみ示す。

日本上空に飛来する黄砂粒子は、鉱物の組成としては石英、長石、雲母(イライト)、緑泥石、カオリナイト、方解石、石膏、カルサイト及び硫酸アンモニウム等が主成分とされる³⁾。また、無機元素の種類に着目して組成を捉える場合、ケイ素、アルミニウム、カルシウム及び鉄が主成分とされる⁴⁾。そこで、主成分の元素のうち ICP-MS のデータのないケイ素を除いたアルミニウム、カルシウム及び鉄と、一般に長石や雲母に含まれるナトリウム及びカリウムの計5元素について、PM2.5 質量濃度に対する各元素の含有率を見ると、5月22日～23日はアルミニウム、カリウム、カルシウム及び鉄の含有率が前後の日と比較して上昇していたことが分かった(図2)。

また、黄砂とは地上から巻き上げられた砂であること^{3) 4)}を考慮し、土壌由来のPM2.5の指標成分とされているスカンジウム²⁾についても見ると、5月22日～23日はPM2.5質量濃度に対する含有率の上昇が見られた(図3)。

これは、八日町局における令和4年度のスカンジウム含有率の年間平均が 4.8×10^{-5} %程度であったのに対し、20倍程度高い値であった。

一方、黄砂が観測されず、無機元素成分の質量濃度への寄与も大きくなかった5月18日～19日についても、5月22日～23日で上昇していたアルミニウム、カリウム、カルシウム、鉄及びスカンジウムの含有率が高い傾向にあることから、5月18日～19日のPM2.5成分組成にも黄砂の影響があった可能性がある。

4 今後の研究方向等

黄砂の影響下におけるPM2.5成分組成は無機元素成分の増大が見られ、金属元素としてはアルミニウム、カリウム、カルシウム、鉄及びスカンジウムが増大するという特徴があることが分かった。この結果により、PM2.5成分の解析を通して黄砂の影響の有無について推定できる可能性が見出された。今後も黄砂等の気象イベント時のPM2.5成分の情報を蓄積していくことで発生源ごとの特性について検討し、もって岩手県における大気環境保全対策に寄与できることが期待される。

<参考文献>

- 1) 気象庁: "2023年黄砂観測日および観測地点の表", https://www.data.jma.go.jp/env/kosahp/kosa_table_2023.html (2024/3/24 閲覧)
- 2) 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
- 3) 環境省: "黄砂問題検討会報告書", 2005年9月
- 4) 西川 雅高: "黄砂(こうさ)エアロゾル", 国環研ニュース, Vol.17, No.2, 14(1998)

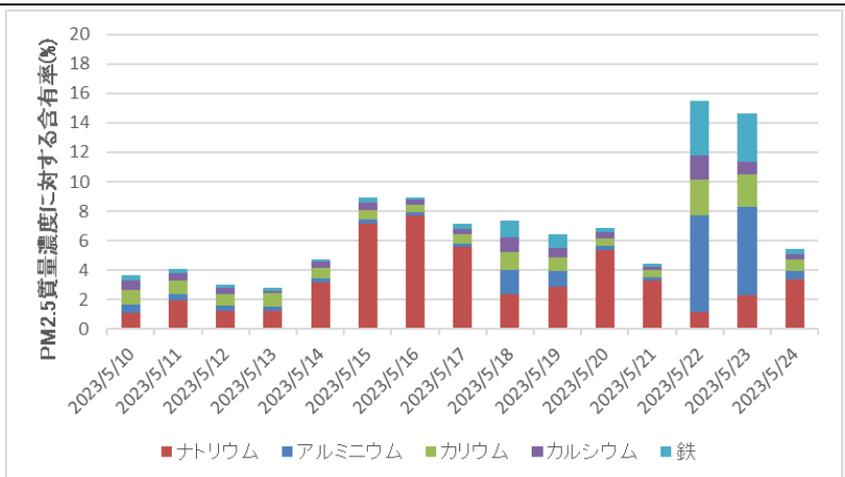


図2 PM2.5 質量濃度に対する主要な金属元素の含有率 (八日町局)

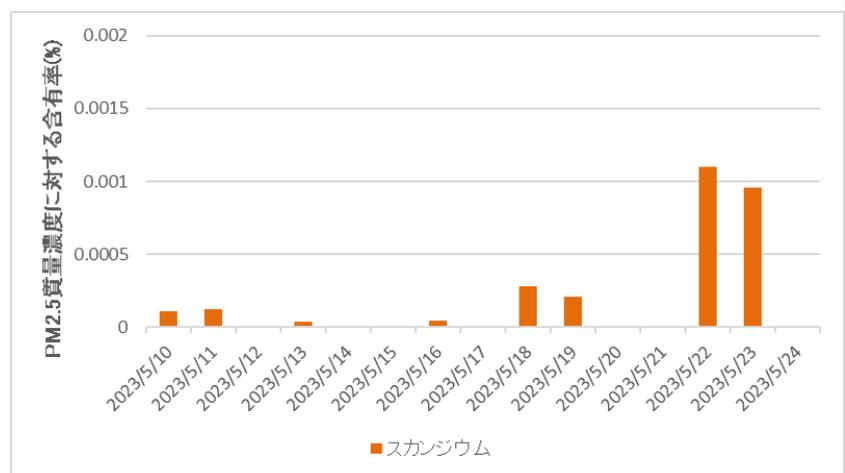


図3 PM2.5 質量濃度に対するスカンジウムの含有率 (八日町局)

研究成果報告書（10）

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	<p>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搭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。</p>		
	【研究の対象とした絶滅危惧植物】		
	研究分類	対象植物名	いわてRDB
	Ⅰ	アツモリソウ	Aランク
	Ⅰ	ムラサキ	Aランク
	Ⅰ	ナツエビネ	Aランク
	Ⅱ	ハマナデシコ	Aランク
	Ⅱ	スナビキソウ	Aランク
	Ⅱ	エゾツルキンバイ	Aランク
	Ⅱ	オオアカバナ	Aランク
	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		
2 実施内容	<p>(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。</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 主な成果	<p>(1) 自生域外保全を進めるために、アツモリソウ、ムラサキ、ナツエビネの苗生産試験に取り組み、自生地由来の種子を用いた発芽と育苗試験に着手した。アツモリソウについては環境省新宿御苑管理事務所（国の種子保存機関）に自生地由来の種子を提出した。また、ムラサキについては、山中に設置した野生復帰試験区に苗を移植し、一部の苗について開花を確認した。</p> <p>(2) 環境省より依頼を受けて取り組んだチョウセンキバナアツモリソウの発芽をとりまとめた論文が受理され、自然環境復元研究 14 巻に掲載された。長期保存種子を用いた発芽と苗生産の成功は世界的にも初の報告例となる。</p> <p>(3) 日本大震災津波後の希少植物調査の調査結果を取りまとめて、自然環境復元学会で発表した。関連して、環境省新宿御苑管理事務所に岩手県内のオオアカバナ自生地から採種・保存処理を行った種子を提出した。更に、環境省新宿御苑管理事務所が主催した「第1回東日本地域植物多様性保全拠点ネットワーク会議」で発表した。</p>		
4 今後の取り組み	<p>(1) 内陸に自生する希少植物3種（Ⅰ）について、野生復帰を目的にした種子保存と苗生産の技術開発を進める必要がある。特に、南部紫根染の原料となるムラサキについては、根系の成長を促進する育苗技術の開発が必要であり、課題として取り組む予定である。</p> <p>(2) 東日本大震災後から継続してきた沿岸部の希少植物調査の結果を取りまとめて学会誌への投稿を検討する。また、海浜性希少植物4種（Ⅱ）の種子確保と保存法の検討や苗生産技術の開発を進めるが、エゾツルキンバイについては採種が困難であることから、開発等による自生地の消失がないように自生域内保全を進めて行く。</p>		

表1 主な発表業績(令和5年度)

No.	主催団体	掲載誌名刊号頁	発表年月日	カテゴリー	タイトル名	発表者	査読審査
1	自然環境復元学会	自然環境復元研究第14巻	2024/3/〇	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	小山田智彰・鞍懸重和・千崎剛正	有
2	自然環境復元学会	第24回自然環境復元学会研究発表会要旨	2024/2/16	口頭発表	岩手県における海浜性希少植物の消失リスクの推移と生息域外保全に関する取り組み～絶滅する前にできること～	小山田智彰・鞍懸重和・千崎剛正	無
3	環境省新宿御苑管理事務所	第1回東日本地域植物多様性保全拠点ネットワーク会議	2024/3/29	講演	岩手県における海浜性希少植物の消失リスクの推移と生息域外保全に関する取り組みから～絶滅する前にできること～	小山田智彰・鞍懸重和・千崎剛正	無

〈第24回自然環境復元学会全国大会の発表スライドより〉

a. 繁殖	c. 採集	e. 自然災害の影響
・自然状態での繁殖能力	・選択的採集の危険度	・東日本大震災後の自然災害(台風・高潮)
5 ほとんど増殖が認められない	5 極めて強い	5 完全に消失
4 弱い増殖力がある	4 強い	4 ほとんどが消失し復元が困難
3 中位の増殖力が認められる	3 中	3 個体の減少が激しい
2 著しい増殖力がある	2 弱い	2 個体の現象がある
1 強大な増殖力がある	1 無い	1 変化なし
b. 立地	d. 個体数	f. 生育基盤の変化
・ハビタットの消失危険度	・分布地点における個体数	・復興工事等の人為的な改変によるもの
5 極めて強い	5 消失	5 完全な改変あり
4 強い	4 10個体未満	4 大規模な改変あり
3 中	3 10個体以上数十個体	3 部分的な改変あり
2 弱い	2 100個体以上数百個体	2 一部に改変あり
1 無い	1 1000個体以上	1 変化なし

図1 独自の消失リスク評価

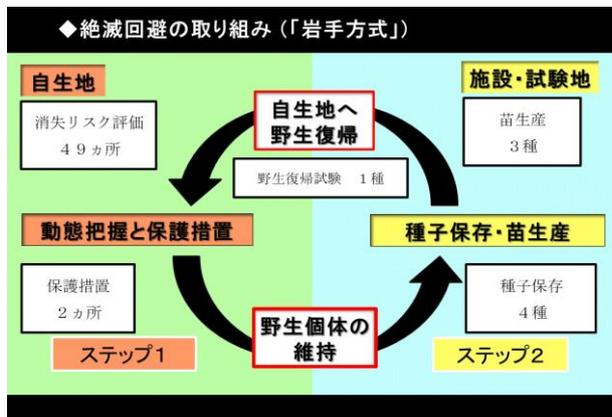


図2 「岩手方式」による絶滅回避の取り組み

〈第1回東日本地域植物多様性保全拠点ネットワーク会議の発表スライドより〉

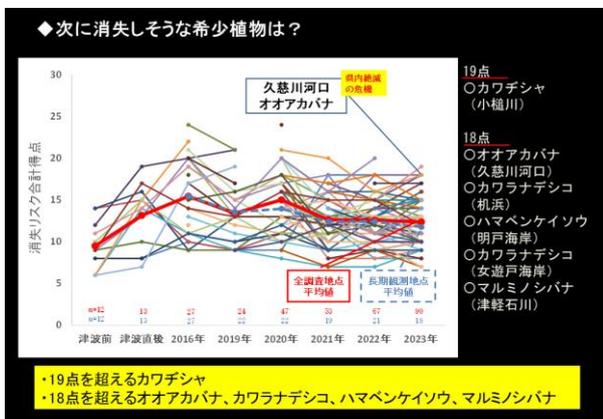


図3 消失する植物の予測

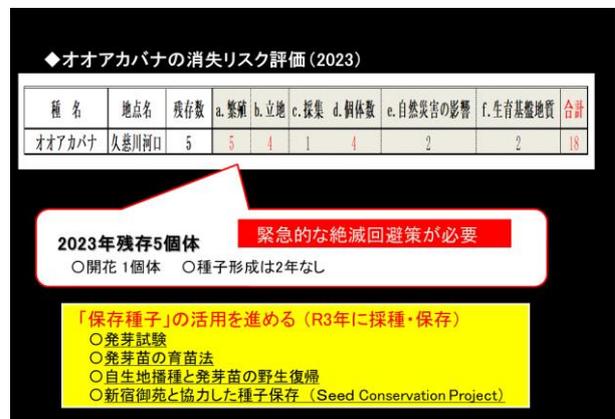


図4 オオアカバナの種子保存と活用

研究成果報告書 (11)

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>1 目的</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、つがいの消失が知られるようになり、その数は 2023 年時点で 11 つがいに増えている。その背景には、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。今後生息数を回復させていくためには、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、巣の形態等を考慮した分析により、そのしくみを明らかにすることが求められる。本研究では、こうした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知見を増やし、保全手法を明らかにすることを目的とした。</p> <p>5 年度 (2023 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) 標高や巣の形態を考慮した繁殖成績の解析。</p> <p>2 方法</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、個体の行動圏、移動分散、つがい関係等を明らかにした。</p> <p>(4) 標高や巣の形態を考慮した繁殖成績の解析</p> <p>岩手県北上高地でこれまでに発見された 107 か所の巣のうち、67 か所は岩棚に 40 か所は樹上に造られている。また、巣の標高も最低 179m から最高 844m まで幅広い違いがある。こうした巣の形態や標高の違いによって、抱卵期以降の繁殖成績 (産卵が確認された事例における雛の巣立ち成否) がどの程度予測可能か、一般化線形混合モデルによるロジスティック回帰を用いて検討した。</p>	

3 結果

(1) つがいの動向および繁殖状況の調査

2023年には県全体で24つがいの生息が確認され、このうち8つがいで抱卵、6つがいで育雛、3つがいでひなの巣立ちが確認された。繁殖成功率は12.5%で、10%に満たなかった過去4年間に比べるとやや回復した。繁殖失敗の直接的原因が確認できた事例はなかったが、写真撮影者が営巣地に張り付いて繁殖活動に影響を及ぼしている事例が2つがいで見られた。新たなつがいや巣の発見はなかった。

(2) ビデオを用いた繁殖行動調査

撮影されたビデオ映像を元に、育雛期の食物供給について解析したところ、第1ひなの孵化後4日間、親鳥による餌の持ち込みがなかったことが明らかになった。過去の例では5日間の絶食でひなの死亡が知られており、もう1日供給が遅れたなら、繁殖中止になっていたと予想された。その後は著しい餌不足は生じなかったため、ひなは巣立ちを迎えることができたが、一時的な不足であっても、繁殖成績に大きく影響しうることが推察された。2011年から断続的に記録されている、魚類を餌としての持ち込む行動は、2023年はひなの孵化前に1回のみ確認された。

(3) 映像を用いた個体識別による移動分散調査

収集した写真に基づく個体識別の結果、岩泉町の東部で記録された若鳥(およそ3~4歳)が、4か月後に52 km離れた久慈市の東部で目撃されたことが明らかになった。また、秋田県北部で巣立ちした幼鳥が、30 km離れた青森県南部で目撃された後、また秋田県の出生地に戻っていた事例も明らかになった。

(4) 標高やや巣の形態を考慮した繁殖成績の解析

2002~2022年に確認された242件の産卵事例のうち、73件で雛が巣立ちに至った。これら巣立ちの成否を応答変数、巣の形態と標高を説明変数、つがい差をランダム効果としてモデル解析を行なった結果、標高のみを用いたモデルが最も予測が良く、巣の形態を含めると予測が悪くなった。標高の低い巣ほど繁殖に有利である一方、岩棚か樹上かの違いは繁殖成績に影響しないと考えられた。詳細は9月の日本鳥学会大会で発表した。

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見られる地域を中心に、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) つがいごとに過去の繁殖成績の経年変化のパターンを明らかにし、営巣地の条件や採餌環境の面積などの指標と関係があるか解明を進める。

研究成果報告書 (12)

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、地域ごとの個体数を推計し、生息密度とクマの出没数の関係を解析する必要がある。本年度の研究では多数の地域での生息密度を明らかにするため、空間明示標識再捕獲最尤法の個体数推定プログラム”Density”（Efford, 2004）を用い、クラスター状のトラップ配置から得た 2012 年および 2019 年の北上山地南部地域のデータから、クラスターごとの個体数推定を試みるとともに、その推定精度により地域間差を検出できるかを明らかにする。

2 方法

2012 年および 2019 年の 5 月下旬に北上山地南部地域において、ヘア・トラップ（以下、トラップ）を 1 つのクラスター単位が 8 基から 24 基となるよう構成し、2012 年には計 169 基、2019 年には計 137 基設置した（図 1）。体毛の回収は概ね 14 日間間隔で 4 セッション実施した。トラップの設置方法、体毛の処理方法、DNA の抽出、PCR 法およ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、MU23、MU05、D2、D103 および D118 とした。DNA 分析により個体識別を行った後、個体、利用トラップおよ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クマの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 を用い、各試験区の全セッションの捕獲履歴及びトラップから 5 km 内のハビタットマスク（500m メッシュ）をデータとし、モデルをクマの生息密度 (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、検出確率関数を half-normal に設定し、D および D の変動係数 (CVD) を推定した。また、クラスターごとに個体数を推定するため、各トラップにクラスター ID を設定し（図 1）、secr 内に実装されている derived 関数によりクラスターごとに D および CVD を推定した。また D と CVD の関係を明らかにするため、クラスターごとの D の推定値と CVD の推定値についてスピアマンの順位相関係数を算出した。

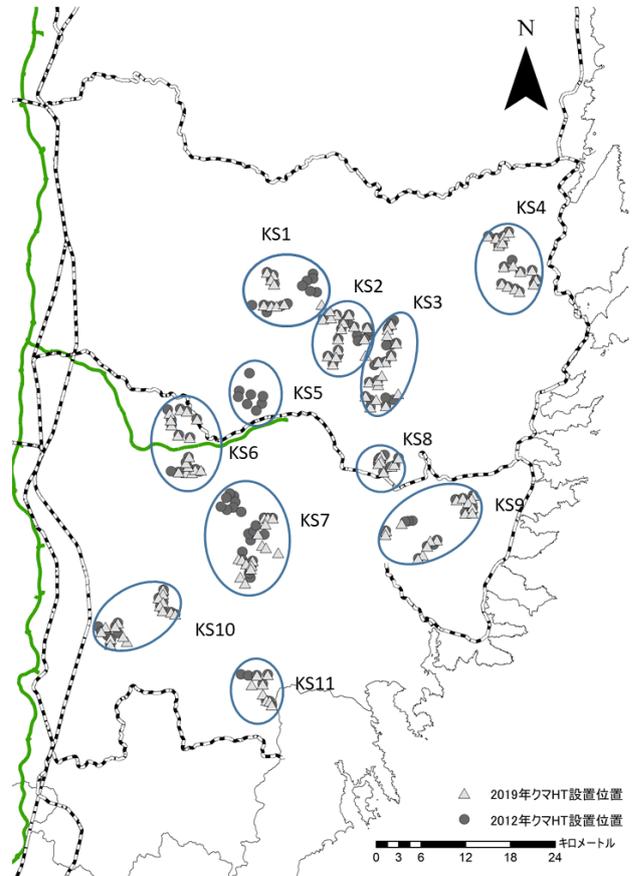


図 1 2012 年および 2019 年の北上山地南部地域におけるトラップ設置位置とクラスター ID

3 結果

2012年の北上山地南部全域におけるクマのDの推定値およびCVDは、0.286頭/km²および0.089であった。クラスター別のDは全クラスターで推定され、CVDのレンジは0.179-0.504であった（表1）。

2019年の北上山地南部全域におけるクマのDの推定値およびCVDは、0.238頭/km²および0.141であった。クラスター別のDはks11を除き推定され、CVDのレンジは0.223-0.458であった（表1）。

2012年のクラスター別のDの推定値とCVDのスピアマンの順位相関係数は-0.75（P=0.010）であり、2019年のクラスター別のDの推定値とCVDのスピアマンの順位相関係数は-0.83（P=0.008）であった。これらのことから、本手法でクマのDが0.25頭/km²前後の条件下においてクラスター別に個体数推定をした場合、クラスター別のDとCVDは負の相関をもつことが明らかになった。

4 考察

本手法では2019年のクラスターks11を除き、クラスターごとのDを推定することが可能であり、クラスターごとのDの推定精度は概ね0.25前後であった。データが同一で推定するパラメーター数が増加するという解析上の性質から、全域の推定と比較しクラスター別のCVDは低くなるものの、Dの推定値はほぼ全クラスターで得られ95%信頼区間が重複しないクラスターが散見されることから、地域差を検出する精度は保たれているものと考えられた。一方でクラスター別のDとCVDには負の相関がみられたこと、また体毛の採取が少なかった2019年のks11のDが推定困難であったことから、本手法によるクラスター別の個体数推定では、クマの生息密度が低くサンプルの得にくい地域において推定精度が低下する、ないしは推定困難となることが推察された。今後これらの地域の推定精度を向上し、より生息密度の地域間差を検出するためには、セッション数の増加や、クラスターあたりのトラップ基数の増加が有効と思われる。

表1 2012年および2019年の北上山地南部地域と各クラスターの推定生息密度と変動係数

2012年北上山地南部地域					2019年北上山地南部地域				
cluster	density(n/km ²)	2.5%cl	97.5%cl	CVD	cluster	density(n/km ²)	2.5%cl	97.5%cl	CVD
2012年ks全域	0.286	0.240	0.341	0.089	2019年ks全域	0.238	0.181	0.314	0.141
ks1	0.241	0.153	0.382	0.237	ks1	0.245	0.121	0.498	0.374
ks2	0.346	0.233	0.512	0.202	ks2	0.431	0.279	0.664	0.223
ks3	0.344	0.237	0.500	0.192	ks3	0.323	0.202	0.517	0.243
ks4	0.246	0.154	0.392	0.242	ks4	0.172	0.091	0.325	0.334
ks5	0.620	0.402	0.955	0.223					
ks6	0.187	0.101	0.346	0.321	ks6	0.117	0.050	0.276	0.458
ks7	0.360	0.254	0.509	0.179	ks7	0.362	0.226	0.581	0.245
ks8	0.482	0.300	0.774	0.245	ks8	0.279	0.138	0.566	0.373
ks9	0.188	0.114	0.309	0.258	ks9	0.195	0.108	0.355	0.312
ks10	0.094	0.043	0.205	0.412	ks10	0.112	0.051	0.248	0.421
ks11	0.103	0.040	0.261	0.504	ks11	0.001	NA	NA	NA

5 引用文献

- Efford, M. G. 2004. Density estimation in live-trapping studies. *Oikos* 106: 598-610.
- Yamauchi, K., Kurakake, S., Morosawa, T., Kondo, M., Uno, R., Yuasa, T., Tamate, B. H. and Yoneda, M. 2014. A pilot study of the hair-trapping method in Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*): determination of optimal survey period for estimating population size. *Mammal Study* 39: 191-200.

研究成果報告書 (13)

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 吉田 由佳、 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1年度から令和2年度まで）」においては、告示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・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6菌種が確認された。

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・組成及び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

令和4年度に希釈水にグラム陽性球菌を添加した菌液を用いたモデル試験を実施し、「ラウリル硫酸ナトリウム（以下「SDS」という。）の最終濃度を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」という仮定条件を定め、令和5年度はその条件について、実際の検体とその比較を想定して調製した以下の模擬検水を用いて検証した。なお、発育の有無はグラム陽性球菌の青色コロニーが2個以上確認された時点を発育有と判断した。

〔模擬検水1〕複数地点分を混合した河川水（以下「混合河川水」という。）6本に、グラム陽性球菌6菌種をそれぞれ添加したもの

〔模擬検水2〕滅菌混合河川水6本に大腸菌を添加し、グラム陽性球菌6菌種をそれぞれ添加したもの

〔模擬検水3〕滅菌混合河川水6本に、グラム陽性球菌6菌種をそれぞれ添加したもの

〔模擬検水4〕希釈水6本に大腸菌を添加し、グラム陽性球菌6菌種をそれぞれ添加したもの

3 結果

模擬検水1～4について、特定酵素基質培地のSDS濃度別に発育状況をまとめたものを図に示す。

この時、培養開始後20時間時点でグラム陽性球菌の青色コロニーの形成が確認されないこと（図中の灰色部）が最も望ましい結果であり、培養開始後18時間時点で同コロニーの形成が確認されること（図中の濃点線部）は、グラム陽性球菌の発育抑制効果が不十分であることを意味する。

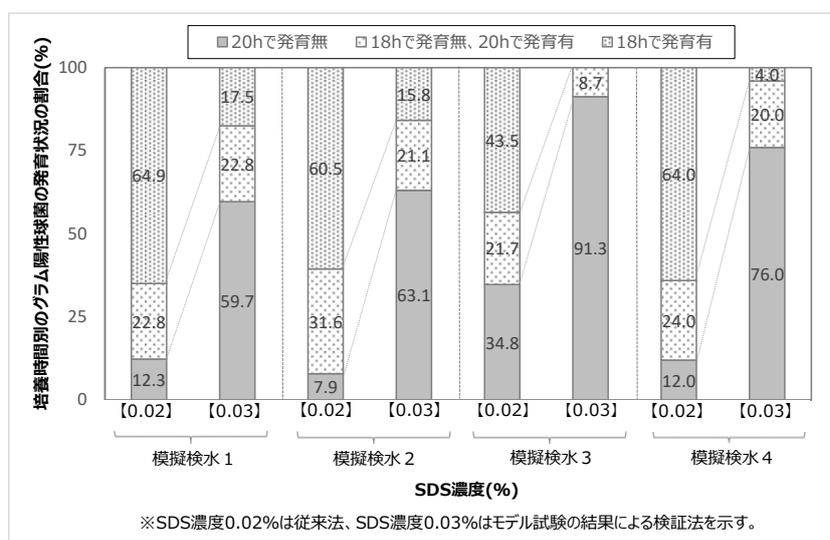


図 模擬検水を用いた検証結果

ア 培地A (SDS 濃度 0.02%) の時間別の発育状況について

図中の【0.02】に各検水の培地A (SDS 濃度 0.02%) の時間別の発育状況を示した。添加したグラム陽性球菌以外の細菌が存在する検水 (模擬検水 1、2 及び 4) では 60.5~64.9%で培養開始後 18 時間においてグラム陽性球菌の青色コロニーの形成が確認され、グラム陽性球菌以外の細菌が存在しない河川由来成分 (河川水中の有機物、無機物等) のみを含む検水 (模擬検水 3) でも、43.5%で培養開始後 18 時間においてグラム陽性球菌の青色コロニーの形成が確認された。

イ SDS 最終濃度 0.03%培地の時間別の発育状況について

図中の【0.03】に各検水の SDS 最終濃度 0.03%培地の時間別の発育状況を示した。SDS 最終濃度 0.03%培地では、培地A (SDS 濃度 0.02%) と比べると全ての模擬検水で改善が見られ、59.7~91.3%で培養開始後 20 時間においてもグラム陽性球菌の青色コロニーの形成が確認されないという結果になった。しかし、SDS 最終濃度 0.03%培地でも、河川由来成分を含み、かつ、添加したグラム陽性球菌以外の細菌が存在する検水 (模擬検水 1 及び 2) では 15.8~17.5%が培養開始後 18 時間でグラム陽性球菌の青色コロニーの形成が確認された。この結果は、グラム陽性球菌の種類によってもばらつきが見られた。また、グラム陽性球菌以外の菌が存在しない模擬検水 3 や河川由来成分を含まない模擬検水 4 では SDS 最終濃度 0.03%培地で比較的高いグラム陽性球菌の発育抑制効果が見られたことから、細菌数や河川由来成分が少ない河川では SDS 添加による効果が期待できる可能性はあるものの、検体として搬入される公共用水の大部分は原液から 10 倍希釈程度の濃度で計数することが多く、当然、模擬検水 1 の条件に当てはまることとなる。河川水の状況やグラム陽性球菌の種類により結果が異なるため、SDS 最終濃度 0.03%培地によるグラム陽性球菌の発育抑制効果は必ずしも十分とは言えず、採水地点や時期毎に細菌数や河川由来成分の状態を予測して、使用する培地を使い分ける等の対応も適切ではないことから、SDS の添加を実用化するためにはまだ検討を要すると考えられた。

なお、検証を進める中で、稀に発育の遅い大腸菌が、いずれの SDS 濃度の培地においても 18 時間以降に青色コロニーを形成することも確認された。

4 まとめ

環境基準に適合しているかどうかを検査、判定する上で重要なのは、その方法を一定の条件とすることである。告示法に定まる検査方法に基づき検討した場合、判定時間については、時間の経過とともにグラム陽性球菌の数は増加する傾向があること、ほとんどの大腸菌は 18 時間でコロニーの形成が確認できることから、稀な発育遅延の大腸菌については考慮せず、培養開始後 18~20 時間で計数することに統一することが望ましいと考えられた。組成については、培地A (SDS 濃度 0.02%) では培養開始後 18~20 時間でも多くの試験でグラム陽性球菌の青色コロニーの発育が確認されたが、SDS 最終濃度 0.03%培地では SDS の添加による改善効果は見られるもののその効果は必ずしも十分でなく、SDS を添加することが過信につながり、かえって SDS を添加してもなお発育が抑制されずに青色コロニーを形成するグラム陽性球菌を誤計数し、大腸菌の過剰計数につながるおそれがあると考えられた。

以上のことから、当センターにおいては、グラム陽性球菌が青色コロニーを形成する可能性があることを改めて共有しつつ、「SDS の添加は行わず、培地Aを用いてグラム陽性球菌が形成する青色コロニーの数が少ない培養開始後 18~20 時間で計数すること」を検査、判定条件にすることとした。なお、グラム陽性球菌が疑われる青色コロニーについては、担当者の経験に基づく判定技術の向上を図るとともに、引き続き必要に応じたグラム染色等による確認を行い、グラム陽性球菌による大腸菌数の過剰報告の防止に努めるとともに、今後もより適切な検査を行うために、検査方法の改善について検討を行っていきたい。