

岡山県環境保健センター年報

第43号
(平成30年度)

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

No.43

2019

ま え が き

岡山県環境保健センターは、県民の生活環境の保全及び健康の保持増進に資するため、昭和51（1976）年4月に、旧公害防止センターと旧衛生研究所を発展的に統合して設置されました。環境保全及び保健衛生に関する調査研究、試験検査、研修指導及び情報の提供等を行い、県民の安全・安心を科学的・技術的側面から保障する総合的な試験研究機関としての役割を担っております。

平成30年度は、7月に西日本を中心とした集中豪雨（平成30年7月豪雨）により大きな災害が発生し、その後猛暑に見舞われるなど、本県も大きな環境及び健康危機事象に直面いたしました。当センターにおいても定例的な業務はもとより、危機事象に臨機に対応するべく努めてきたところです。

本年報においては、平成30年度まで取り組んでまいりました調査研究、更には試験検査や監視測定から得られた情報をまとめて掲載いたしました。特に調査研究は当センターの主要な業務として、外部の有識者の御意見を踏まえながら行政ニーズや県民ニーズに沿った課題を選定し、必要に応じ外部の研究機関と連携しながら推進してきております。例えば、大気中の微小粒子状物質（PM2.5）の地域ごとの発生源別寄与割合の推定や季節的地域的特徴の把握、水質中の有害化学物質の分析法の開発、感染症起因菌（腸管出血性大腸菌やレジオネラ等）の検査データを集積した菌株データベースの構築など、各科の専門性を生かした課題に取り組んでまいりました。平成30年度は、平成28年度からの3か年の調査研究の最終年度で、これまでの成果をお示しします。

御高覧いただき、御意見をお寄せいただけましたならば幸いです。今後とも当センターの活動につきまして、より一層の御支援を賜りますようお願いいたします。

令和2年3月

岡山県環境保健センター

所 長 望 月 靖

目 次

調査研究・資料

大気科

【調査研究】

- 1 岡山県における微小粒子状物質の成分分析結果について（平成28～30年度）
赤木正章，間野遼太，山田克明，西村佳恵，野村 茂，小川 登…………… 1
- 2 岡山県内4地点の大気環境中微小粒子状物質の発生源解析について
山田克明，間野遼太，西村佳恵，赤木正章，野村 茂，小川 登…………… 11

水質科

【調査研究】

- 3 事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究
-3-クロロ-2-プロペン-1-オールの水質分析法の検討-
山本浩司，大月史彦，浦山豊弘，吉岡敏行…………… 17
- 4 事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究
-3-クロロ-2-プロペン酸の水質分析法の検討-
浦山豊弘，大月史彦，山本浩司，吉岡敏行…………… 27
- 5 事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究
-3-ベンジリデンカンファーの分析法の検討-
大月史彦，浦山豊弘，山本浩司，吉岡敏行…………… 39
- 6 児島湖隣接区域（北七区）における汚濁負荷量調査
藤田和男，小川知也，吉岡敏行…………… 47
- 7 活性炭カラム及びフェントン処理による1,4-ジオキサンの処理方法の基礎的検討
浦山豊弘，吉岡敏行，小川知也…………… 63

放射能科

【資 料】

- 8 人形峠周辺の環境放射線等測定に係る補完調査-野菜・精米-（第1報）
蜂谷博郎，加藤大貴，信森達也…………… 69

細菌科

【調査研究】

- 9 志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査（平成30年度）
森本晃司，仲 敦史，河合央博，中嶋 洋，狩屋英明…………… 73
- 10 腸管出血性大腸菌の検査におけるMLVA法の整備
河合央博，森本晃司，仲 敦史，中嶋 洋，狩屋英明…………… 79
- 11 感染症起因菌の疫学調査（平成28年度～平成30年度）
岡山県内のレジオネラの疫学調査について
狩屋英明，河合央博，森本晃司，仲 敦史，中嶋 洋…………… 87

【資 料】

- 12 結核菌DNA解析調査事業報告（平成28～30年度）
河合央博，森本晃司，仲 敦史，中嶋 洋，狩屋英明…………… 93

ウイルス科

【調査研究】

- 13 胃腸炎ウイルスの疫学的研究
－岡山県の散発胃腸炎患者におけるロタウイルスAの流行状況（2009-2017）－
木田浩司, 野宮加代子, 松岡保博, 梶原香代子, 濱野雅子, 橋本清美, 北村雅美, 井上 勝,
濃野 信, 金谷誠久…………… 99
- 14 岡山県におけるインフルエンザ流行の疫学的解析（2017/2018年シーズン）
松岡保博, 野宮加代子, 梶原香代子, 濱野雅子, 橋本清美, 木田浩司, 爲房園実, 浜辺美千子…………… 107
- 【資 料】
- 15 平成29年度感染症流行予測調査（ポリオ感染源調査）
橋本清美, 松岡保博, 野宮加代子, 濱野雅子, 木田浩司, 浜辺美千子…………… 111

衛生化学科

【調査研究】

- 16 LC-MS/MSを用いた牛の筋肉中の動物用医薬品に関する一斉分析法の検討
難波順子, 筒井みちよ, 池田和美, 金子英史, 林 隆義…………… 115
- 17 繊維製品に含まれるアゾ化合物由来の特定芳香族アミン類試験法の検討
金子英史, 難波順子, 林 隆義, 筒井みちよ, 池田和美, 吉岡敏行…………… 125
- 18 岡山県で発生した植物性自然毒による食中毒事例への対応について（平成21～30年）
難波順子, 筒井みちよ, 池田和美, 金子英史, 林 隆義, 赤木正章…………… 135
- 業務報告 …………… 145
- 他誌発表論文抄録 …………… 163
- 報告書等 …………… 170
- 学会発表 …………… 175

【調査研究】

岡山県における微小粒子状物質の成分分析結果について（平成28～30年度）
Component Analysis Result of PM2.5 in Okayama Prefecture (FY2016～2018)

赤木正章, 間野遼太, 山田克明, 西村佳恵, 野村 茂, 小川 登 (大気科)
AKAKI Masaaki, MANO Ryouta, YAMADA Katsuaki, NISHIMURA Yoshie,
NOMURA Shigeru, OGAWA Noboru (Atmosphere Section)

要 旨

平成28～30年度に実施した県内4地点における微小粒子状物質（以下「PM2.5」という。）のイオン成分、炭素成分及び無機元素成分の分析結果をとりまとめた。主要成分の年平均濃度及び構成割合は、全ての調査地点で高い順に、イオン成分 (5.0～8.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 34～62%), 炭素成分 (3.4～5.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 25～37%), 無機元素成分 (0.14～0.57 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 1.4～3.9%) であった。PM2.5質量濃度が4地点とも春季・夏季に高いのは、秋季・冬季に比べ、 SO_4^{2-} 及び NH_4^+ のイオン成分濃度が春季・夏季に高いことが要因であった。幹線道路沿いの長津測定局では、元素炭素濃度が最も高く、自動車排ガスの影響が考えられた。また、水島工業地帯に近接する塩生測定局では、Fe, Zn, Mn及びV濃度が他の3地点に比べて高かった。新見測定局では、 Ca^{2+} イオン濃度が季節にかかわらず、他の3地点より高かった。いずれも、地域的な影響を反映していると考えられた。

[キーワード：微小粒子状物質, PM2.5, 質量濃度, 成分分析]

[Key words: Fine Particulate Matter, PM2.5, Mass Concentration, Component Analysis]

1 はじめに

微小粒子状物質（以下「PM2.5」という。）は粒径が約2.5 μm 以下の非常に小さな粒子で、肺の奥深くまで入り込みやすいため、人の健康への影響が懸念されており¹⁾、平成21年9月9日付け、環境省告示第33号により大気汚染に係る環境基準が設定された。これを受けて本県では、PM2.5の実態把握に取り組み、観測結果を報告してきた²⁾～¹⁵⁾。

本報では、平成28～30年度に実施したPM2.5の主要成分の分析結果をとりまとめたので報告する。

2 調査方法

2.1 調査地点及び調査期間

調査地点を図1に示す。調査は、新見市に位置する新見測定局（以下「新見局」という。）、総社市に位置する総社測定局（以下「総社局」という。）、早島町に位置する長津測定局（以下「長津局」という。）、倉敷市に位置する塩生測定局（以下「塩生局」という。）の4局とした。新見局及び総社局は大規模な事業場等の少ない市街地にある一般環境大気測定局、長津局は幹線道路沿線に位置する自動車排出ガス測定局、塩生局は瀬戸内海沿岸の水

島工業地帯の東側に位置する一般環境大気測定局である。

調査期間を表1に示す。調査は1年を4季節（春・夏・秋・冬）に分け、各季節1～2週間程度連続した期間で行った。



図1 調査地点

表1 調査期間

	平成28年度	平成29年度	平成30年度
春季	H28/5/9～5/22	H29/5/10～5/23	H30/5/9～5/22
夏季	H28/7/25～7/31	H29/7/24～7/30	H30/7/23～7/29
秋季	H28/10/19～11/1	H29/10/19～11/1	H30/10/18～10/31
冬季	H29/1/23～1/29	H30/1/22～1/28	H31/1/21～1/27

2.2 試料採取方法

試料採取は「大気中微小粒子状物質（PM2.5）成分測定マニュアル」（以下「成分測定マニュアル」という。）¹⁶⁾の捕集法に準じて、各測定局の屋上（地上2 m程度）に設置したサンプラー（Thermo製 FRM-2000, FRM-2025, FRM-2025i）を使用し、流量16.7 L/minで1日分として23時間採取した。フィルタは石英繊維フィルタ（PallFlex製 2500QAT-UP）及び四ふっ化エチレン樹脂製（以下「PTFE」という。）フィルタ（PallFlex製 Teflo）を使用した。

2.3 分析方法

石英繊維フィルタを分割し、成分測定マニュアルに示されたイオン成分（ Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ）及び炭素成分（（有機炭素（以下「OC」という。）、元素状炭素（以下「EC」という。））の分析を行った。また、PTFEフィルタを用いて無機元素（Mn, Cr, Ni, Be, As, Al, Fe, Zn, Cu, V, Pb, Se, Cd）の分析を行った。

イオン成分は、石英繊維フィルタを超純水に浸して超音波抽出を行い、イオンクロマトグラフ装置（Thermo Fisher Scientific製 ICS-1600）で分析した。炭素成分は、カーボンエアロゾル分析装置（Sunset Laboratory製 CAA-202M-D）で分析した。無機元素は、PTFEフィルタを、マイクロウェーブ加熱濃縮装置（平成29年度まではMilestone製 ETHOS 900, 平成30年度はMilestone製 ETHOS UP）で酸分解し、誘導結合プラズマ質量分析計（平成28年度は島津製 ICPM8500, 平成29年度以降はAgilent製 7800）で分析した。

2.4 解析方法

質量濃度は、試料採取した23時間に対応する自動測定

機による常時監視データの1時間値から算出した。成分濃度の解析には、検出下限値未満の測定値は検出下限値の1/2の値を使用し、検出下限値以上の測定値はそのままの値を使用した。季節の平均値は日ごとの値から算出した。年平均値は、季節の平均値から算出した。

3 結果及び考察

3.1 質量濃度及び構成成分

自動測定機による常時監視データから、平成28～30年度のPM2.5質量濃度の年平均値及び日平均値の年間98%値の経年変化を図2に示す。

年平均値は、長津局>塩生局>総社局>新見局であった。長津局の値は、新見局の2倍程度であった。日平均値の年間98%値も、年度によって異なるが、概ね長津局>塩生局>総社局>新見局であった。

年平均値は、やや低下傾向であった。一方、日平均値の年間98%値は、塩生局以外は、上昇傾向であった。長期基準（年平均値が $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下）及び短期基準（日平均値の年間98%値が $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下）の環境基準を達成したのは、新見局の3年間、総社局の平成28年度及び塩生局の平成30年度であった。

次に、平成28～30年度の調査期間におけるPM2.5構成割合を表2及び図3に示す。PM2.5質量濃度の年平均値は、長津局が $16.8 \sim 17.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ と最も高く、塩生局が長津局よりやや低い $15.4 \sim 16.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、次いで総社局が $12.5 \sim 15.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、新見局が $9.3 \sim 10.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ で最も低かった。長津局と新見局の差は $7.4 \sim 7.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。また、同じ局の年度間の差については、最も差の大きい総社局が $2.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、その他の局は $0.7 \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり年度間の差は小さかった。

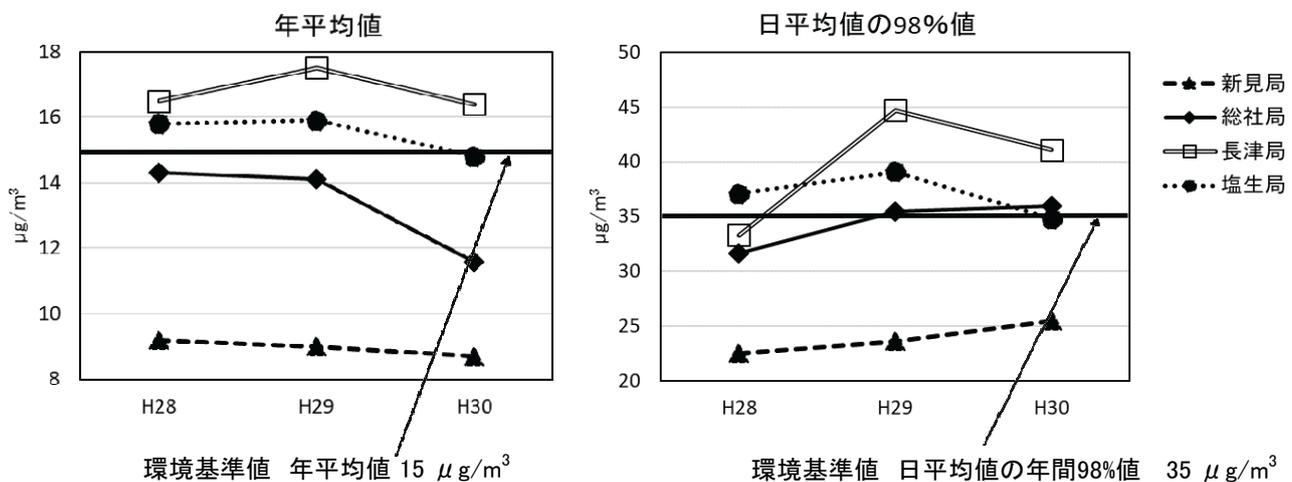


図2 平成28～30年度のPM2.5質量濃度の年平均値及び日平均値の年間98%値の経年変化

表2 平成28～30年度のPM2.5質量濃度及び構成成分濃度

		($\mu\text{g}/\text{m}^3$)				
		PM2.5質量濃度	イオン成分	炭素成分	無機元素成分	その他
H28	新見局	10.0	5.2	3.6	0.14	1.1
	総社局	14.9	5.0	3.8	0.33	5.7
	長津局	17.4	6.2	4.9	0.25	6.0
	塩生局	15.7	6.7	4.3	0.44	4.3
H29	新見局	9.8	5.5	3.6	0.20	0.5
	総社局	15.1	6.5	3.8	0.33	4.4
	長津局	17.6	7.0	5.0	0.49	5.1
	塩生局	16.4	8.2	4.5	0.57	3.1
H30	新見局	9.3	5.8	3.4	0.19	0.0
	総社局	12.5	6.6	3.8	0.33	1.9
	長津局	16.8	6.6	4.9	0.48	4.8
	塩生局	15.4	7.7	4.5	0.60	2.7

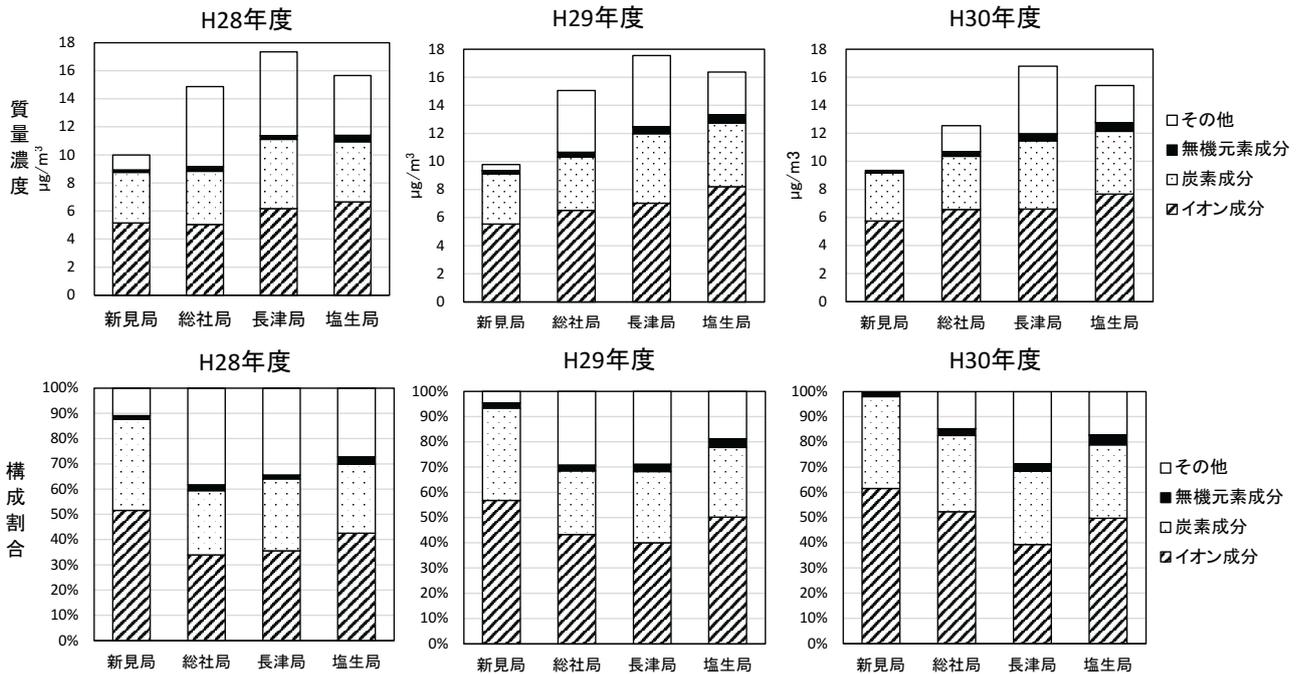


図3 平成28～30年度のPM2.5質量濃度の年平均値及び構成割合

構成成分については、全ての年度で4局とも、濃度の高い順にイオン成分、炭素成分、無機元素成分の順であった。濃度範囲については、イオン成分濃度が $5.0 \sim 8.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、炭素成分 $3.4 \sim 5.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、無機元素成分 $0.14 \sim 0.57 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。各成分の濃度範囲は、4局とも年度間の違いは小さいと考えられた。また、局間で比較すると、長津局では3年間ともに炭素成分濃度が高かった。塩生局では、3年間ともにイオン成分濃度及び無機成分濃度が高かった。

季節ごとのPM2.5質量濃度の推移を図4に示す。4局とも春季や夏季で高く、秋季や冬季で低くなる傾向があった。同じ季節で局間の差で最も大きかったのは、平成30年度夏季の長津局と新見局の差で $12.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。最も小さかったのは、平成28年度夏季の長津局と新見局

の差で $4.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。また、同じ季節では長津局が最も質量濃度が高い傾向があったが、平成29年度及び30年度の冬季については、塩生局が最も質量濃度が高かった。これは、秋季から冬季にかけての質量濃度は、塩生局以外の局では、平成28年度の長津局及び総社局を除くと低下しているが、塩生局では3年とも上昇する傾向が見られたためであった。なお、平成28年度の秋季から冬季にかけての質量濃度の上昇幅は、長津局及び総社局では、それぞれ、 $0.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、 $1.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であったが、塩生局は、 $3.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ とその幅が大きかった。また、塩生局では、平成29年度及び30年度にも、それぞれ $3.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、 $3.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ と大きく上昇した。図5に示すように塩生局では、3年とも冬季には他の季節に比べて西～西北西の風が卓越しており、塩生局の西に位置する工業地帯の影響により、秋

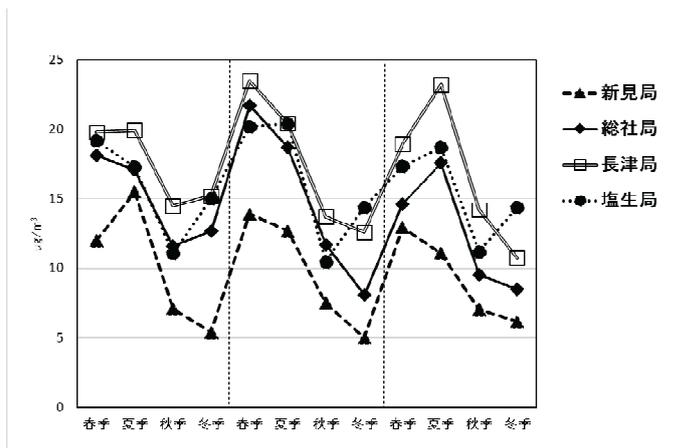


図4 平成28～30年度の季節ごとのPM2.5質量濃度の推移

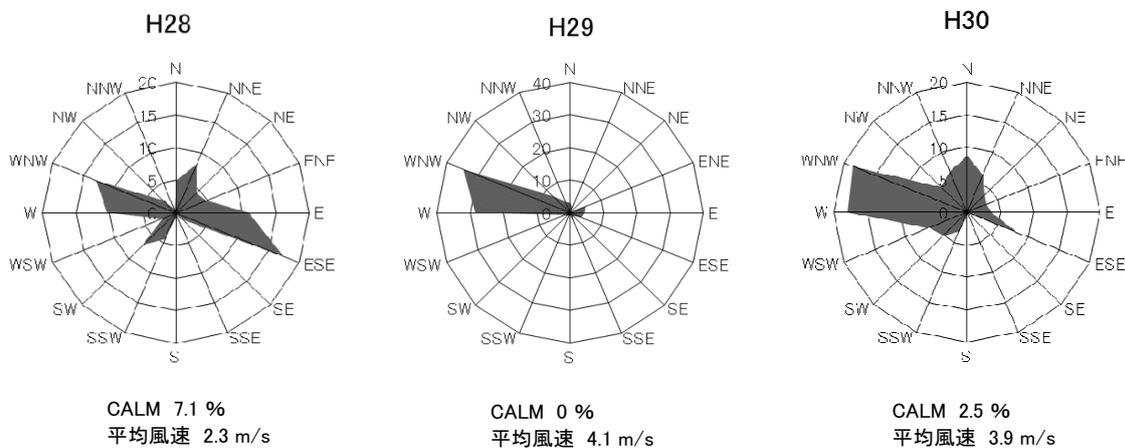


図5 平成28～30年度の塩生局の冬季風配図

季から冬季にかけて質量濃度が上昇していると考えられた。

3.2 イオン成分

イオン成分の平成28～30年度の年平均濃度を図6に示す。イオン成分では、4局とも SO_4^{2-} と NH_4^+ が主要な成分であり、 SO_4^{2-} がイオン成分の全体の57～65%、 NH_4^+ が18～22%と、この2種で79～87%を占めていた。局間で比較すると、 SO_4^{2-} 濃度は毎年度塩生局が最も高かった。

主要なイオン成分の季節ごとの濃度の推移を図7に示す。 SO_4^{2-} 及び NH_4^+ 濃度について、濃度は異なるものの、春季及び夏季に高濃度となり、秋季及び冬季に低濃度となるというよく似た推移をしていた。新見局における SO_4^{2-} 及び NH_4^+ 濃度は、ほとんどの季節で他局に比べて低濃度を示しており、新見局周辺に、 SO_4^{2-} 及び NH_4^+ の主要な発生源はないことから、各局と新見局との差が地域的な影響を反映している可能性も考えられた。質量濃度に

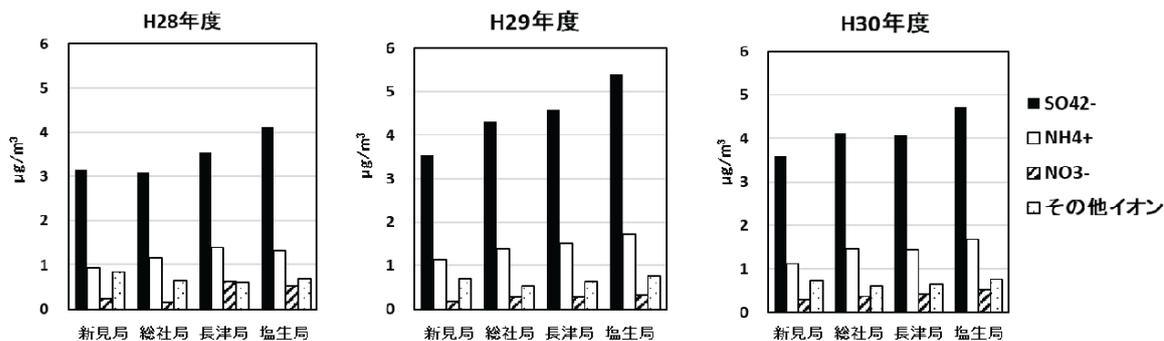


図6 イオン成分の年平均濃度

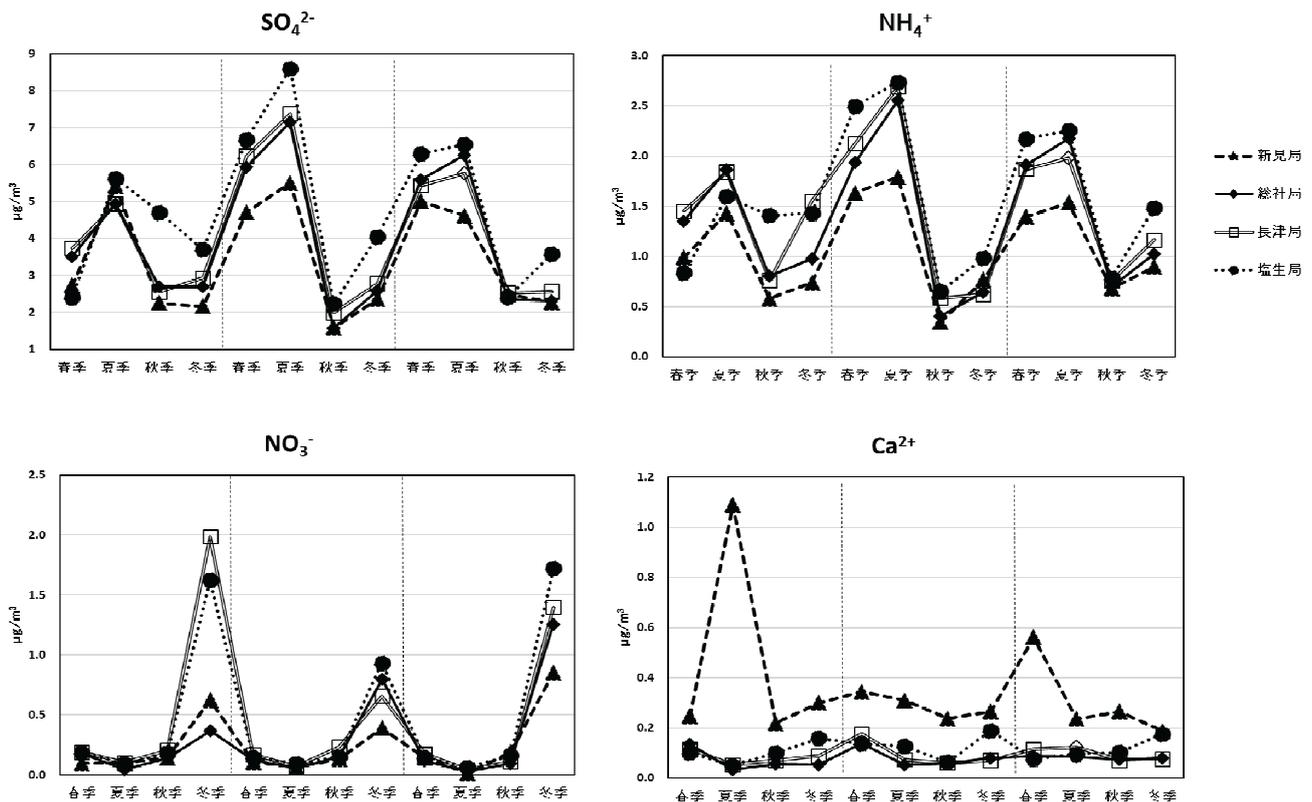


図7 平成28～30年度の季節ごとのイオン成分濃度の推移

占める割合が大きいSO₄²⁻及びNH₄⁺濃度の変動が、PM2.5質量濃度の季節推移に影響を与えていると考えられた。NO₃⁻濃度は、4局とも冬季に濃度が上昇する傾向が見られた。気温が低い冬季には、HNO₃(g) + NH₃(g) ⇌ NH₄NO₃(s)の平衡が粒子側に偏ることが知られており^{4), 16), 17)}、粒子状の硝酸アンモニウムが高濃度となったことが考えられた。Ca²⁺濃度は、3年間季節にかかわらず新見局が最も高く、ほとんどの季節で他局の2倍以上であった。Ca²⁺は土壌由来の指標¹⁸⁾とされており、新見市には石灰岩の地質があり、地場産業としての石灰製品の生産の影響が考えられた。

3.3 炭素成分

炭素成分の平成28～30年度の年平均濃度及び構成割合を図8に示す。炭素成分の年平均濃度については、3年間とも炭素成分濃度の高い順に、長津局、塩生局、総社局、新見局であった。4局ともOC濃度がEC濃度よりも高かった。また、OC濃度及びEC濃度ともに、3年間で大きい濃度変化はなかった。炭素成分中のOC濃度とEC濃度の割合について局間で比較すると、総社局と新見局では炭素成分全体のうちOCが80%程度、ECが20%程度であったのに対して、長津局と塩生局ではOCが65～70%程度、ECが30～35%程度とやや差がみられた。年平均濃度の同一年度の局間の比較では、3年間ともEC濃度の差の

ほうが、OC濃度の差に比べて大きく、OC濃度は平成30年度の長津局と新見局との差の0.6 µg/m³が最大であり、EC濃度は平成29年度の長津局と新見局との差の1.1 µg/m³が最大であった。ECは、自動車排ガス及び石炭燃焼の指標¹⁶⁾とされており、長津局でEC濃度が高いのは、幹線道路沿線に位置しているため、自動車排ガスの影響であると推察された。

OC及びECの季節ごとの濃度の推移を図9に示す。OC濃度は塩生局以外の3局は比較的類似した推移を示しており、平成28年度では秋季に大きく減少し、平成29年度では冬季に大きく減少していた。しかし、平成30年度は、秋季又は冬季に減少したものの、平成28年度及び平成29年度ほどの減少は観られず、総社局では秋季が低濃度であり、新見局と長津局では冬季が低濃度と、3局の推移が異なる結果となった。塩生局については、平成29年度は、冬季の大きな減少は観られず、平成30年度は、冬季に大きく上昇した。また、ECについては、塩生局の平成29年度と平成30年度の冬季を除くと、長津局において高濃度の傾向が認められ、塩生局の2カ年の冬季以外は、4局とも概ね似た推移をしていた。塩生局の冬季にEC濃度が高いのは、自動車排ガスの影響は季節で大きな違いはないと考えられるので、冬季に西～西北西の風が卓越することによる工業地帯の石炭燃焼の影響と推察された。

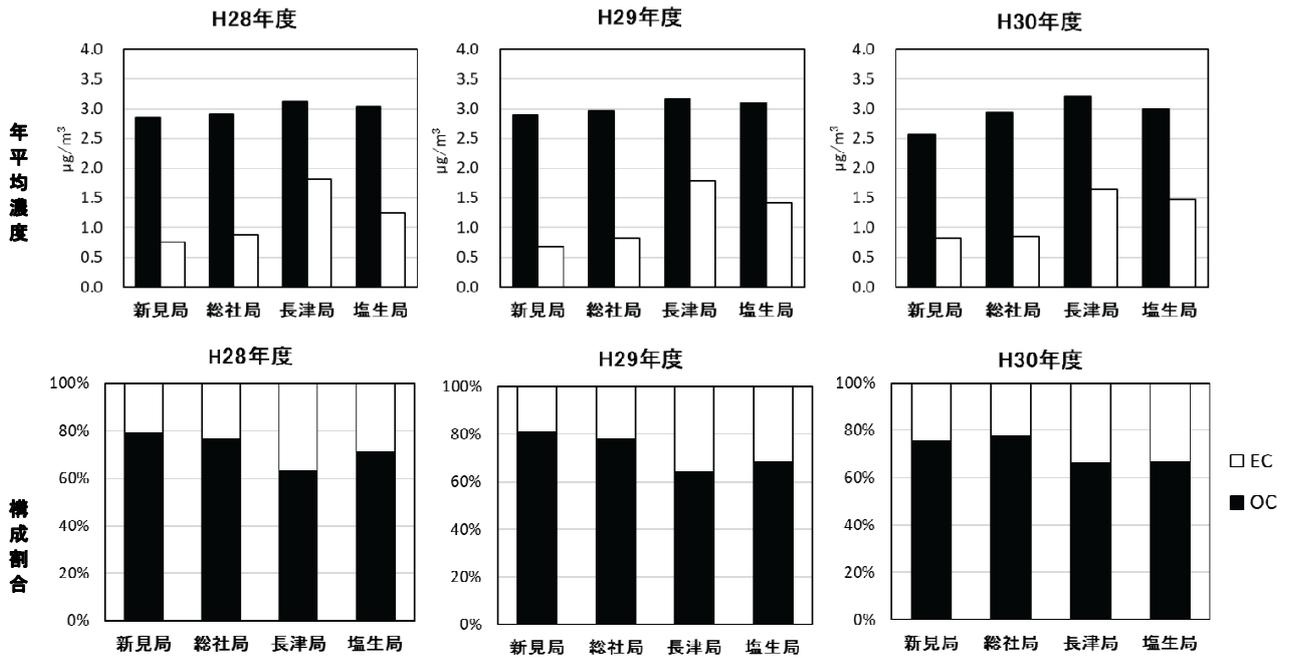


図8 平成28～30年度の炭素成分の年平均濃度及び構成割合

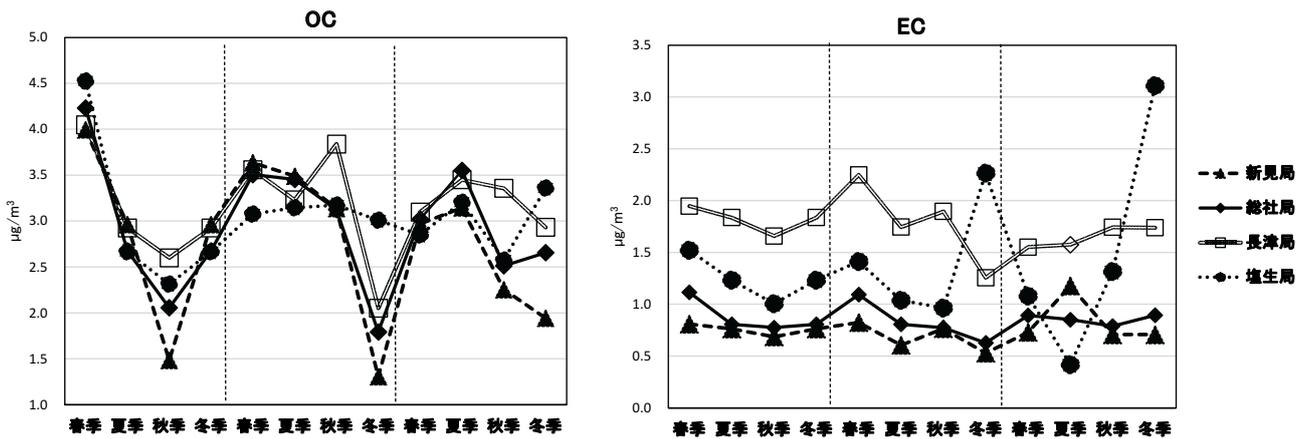


図9 平成28～30年度の季節ごとの炭素成分濃度の推移

3.4 無機元素

無機元素で濃度の高いFe, Al, Znについて平成28～30年度の年平均濃度を図10に示す。4局とも濃度の高い順はFe, Al, Znであった。これら3元素の合計濃度は、測定した無機元素のうちの80～90%程度を占めていた。局別に比較すると、毎年度、塩生局の無機元素濃度が最も高く、最も低い新見局の無機元素濃度の3倍程度であった。年度間の平均濃度を比較すると、Fe濃度の変動が大きく、平成28年度の長津局と塩生局のFe濃度は、平成29～30年度に比べて低く、長津局は1/2程度、塩生局は2/3程度であった。

無機元素の中で濃度が高いFe, Al, Znとともに主要な無機元素であるMn, V, As, Se, Cd濃度の季節ごとの

推移を図11に示す。Fe濃度については、塩生局を除く3局では春季に高くなる傾向があった。他方、塩生局では冬季に高くなる傾向があり、特に平成29～30年度では、約800 ng/m³と、他の3局と比べ著しい高濃度を示した。Feは、道路粉じん、ブレーキ粉じん及び鉄鋼工業の指標¹⁶⁾とされており、塩生局では、冬季に西～西北西の風が卓越することによる風上の工業地帯にある製鉄所の影響を受けたものと推察された。Alは、土壌や道路粉じんの指標¹⁶⁾とされており、4局とも春季に濃度が高くなる等似た傾向が見られ、地域的な影響よりも広域的な影響を受けていると推察された。Zn及びMn濃度は、塩生局が3年間とも冬季に高濃度となる点や、長津局で春季に高濃度となる点など、よく似た推移を示した。Zn及びMnは、

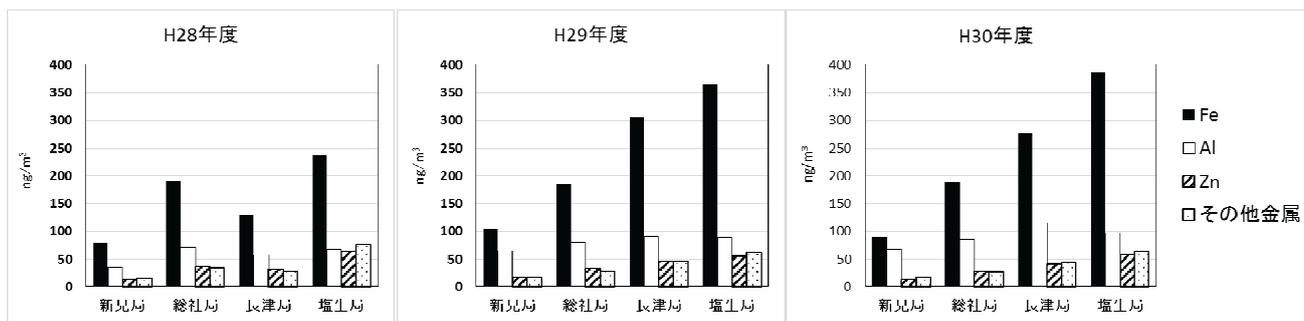


図10 平成28～30年度の無機元素の年平均濃度

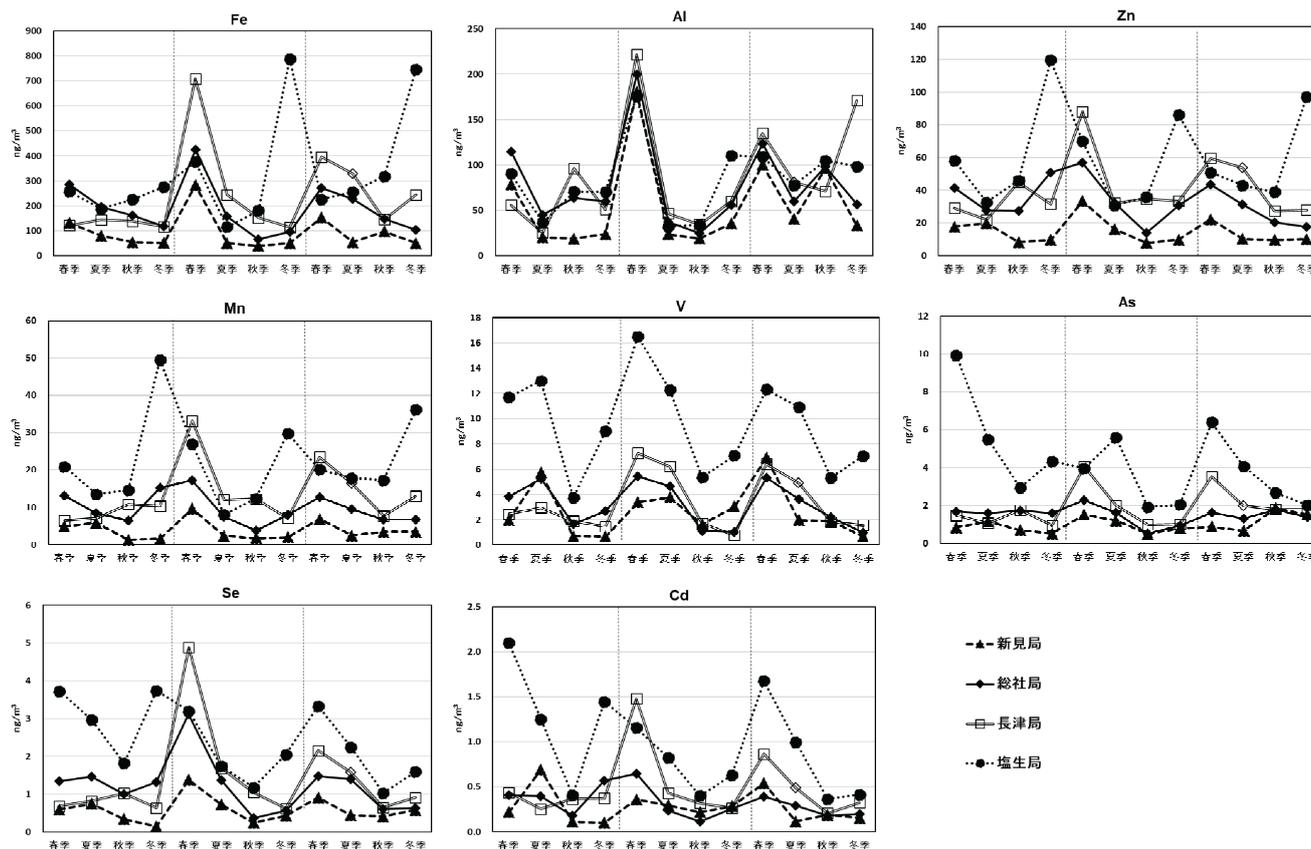


図11 平成28～30年度の季節ごとの無機成分濃度の推移

鉄鋼工業の指標¹⁶⁾とされており、塩生局において、Zn及びMn濃度が高いことは、工業地帯の製鉄所の影響と考えられた。塩生局のV濃度は、他局の2倍以上あり、Vは石油燃焼の指標¹⁶⁾とされることから、工業地帯の影響と推察された。As、Se、Cd¹⁶⁾は、鉄鋼工業や石油燃焼の指標とはされていないものの、ほとんどの季節で塩生局が最も高い濃度であった。しかしながら、Fe、Zn、Mn濃度のように、他局と比較して、冬季に必ずしも大きな上昇を示していないことから、工業地帯の影響の可能性について更なる検討が必要と考えられた。

4 まとめ

平成28～30年度における県内4局のPM2.5成分分析結果をとりまとめたところ、次に示す特徴がみられた。

(1) PM2.5質量濃度の長期基準（年平均値が $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下）及び短期基準（日平均値の年間98 %値が $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下）の環境基準を達成したのは、新見局の3年間、総社局の平成28年度及び塩生局の平成30年度であった。年平均値は、幹線道路沿線に位置する長津局が最も高かった。次に、塩生局、総社局の順であり、県北に位置する新見局が最も低かった。

(2) 主要な構成成分は、4局とも、濃度の高い順にイオン成分、炭素成分、無機元素成分の順であった。

(3) 4局ともPM2.5質量濃度は春季や夏季に高く、秋季や冬季に低かった。これは、 SO_4^{2-} 及び NH_4^+ 濃度の季節推移が要因と考えられた。

(4) 塩生局は、秋季と比べて冬季にPM2.5質量濃度が上昇する傾向が見られた。

(5) 新見局は Ca^{2+} 濃度が他局より高く、石灰岩の地質や石灰製品生産の影響が考えられた。

(6) 長津局は、EC濃度が高く自動車排ガスの影響と考えられた。また、塩生局の冬季にEC濃度が高いのは、西～西北西の風が卓越することによる工業地帯の石炭燃焼の影響と考えられた。

(7) Fe, Zn, Mnは塩生局では、冬季に著しい濃度上昇があり、風上に位置する工業地帯の製鉄所の影響と考えられた。

(8) 塩生局では、石油燃焼の指標とされるVの濃度が常に他局と比べて2倍以上の濃度であり、工業地帯の影響と考えられた。

謝 辞

本調査の実施に際して、調査場所の提供などに御協力いただきました倉敷市の環境政策課、環境監視センターに感謝いたします。

文 献

- 1) 環境省：微小粒子状物質曝露影響調査報告書，2007
- 2) 杉山広和，信森達也，野村 茂，前田 泉：環境中の大気汚染物質に関する研究（微小粒子PM2.5による大気汚染）-第2報-，岡山県環境保健センター年報，32，7-10，2008
- 3) 杉山広和，信森達也，前田 泉：環境中の大気汚染物質に関する研究（微小粒子PM2.5による大気汚染）-第3報-，岡山県環境保健センター年報，32，11-16，2008
- 4) 杉山広和，石井尚志，野村 茂，門田 実，前田 泉：環境中の大気汚染物質に関する研究（微小粒子状物質PM2.5による大気汚染）-第4報-，岡山県環境保健センター年報，33，1-5，2009
- 5) 石井尚志，野村 茂，中桐未知代，山辺真一：環境中の大気汚染物質に関する研究（微小粒子PM2.5による大気汚染）-第5報-，岡山県環境保健センター年報，34，7-10，2010
- 6) 林 隆義，中桐未知代，野村 茂，小川 登，片岡敏夫ら：環境中の大気汚染物質に関する研究（微小粒子PM2.5による大気汚染）-第6報-，岡山県環境保健セ

ンター年報，35，1-7，2011

- 7) 中桐未知代，吉岡敏行，林 隆義，野村 茂，中桐基晴：環境中の大気汚染物質に関する研究（微小粒子PM2.5による大気汚染）-第7報-，岡山県環境保健センター年報，35，9-18，2011
- 8) 林 隆義，中桐未知代，野村 茂，小川 登，深見武史ら：環境中の大気汚染物質に関する研究（微小粒子状物質PM2.5による大気汚染）-第8報-，岡山県環境保健センター年報，36，1-8，2012
- 9) 中桐未知代，林 隆義，野村 茂，小川 登，深見武史ら：環境中の大気汚染物質に関する研究（微小粒子状物質PM2.5による大気汚染）-第9報-，岡山県環境保健センター年報，36，9-16，2012
- 10) 中野温朗，深見武史，喜多真帆，野村 茂，信森達也ら：岡山県におけるPM2.5に係る平成23年度の観測結果について，岡山県環境保健センター年報，37，1-8，2013
- 11) 喜多真帆，中野温朗，野村 茂，信森達也，鷹野 洋：自動測定機を用いたPM2.5 とSPM及びその他の物質の相関について，岡山県環境保健センター年報，38，1-5，2014
- 12) 中野温朗，間野遼太，喜多真帆，野村 茂，信森達也ら：岡山県下における微小粒子状物質の成分の実態について，岡山県環境保健センター年報，39，1-9，2015
- 13) 中野温朗，間野遼太，喜多真帆，野村 茂，信森達也ら：岡山県下における微小粒子状物質の成分の実態について（第2報），岡山県環境保健センター年報，39，11-19，2015
- 14) 中野温朗，間野遼太，喜多真帆，野村 茂，信森達也ら：岡山県下における微小粒子状物質の成分の実態について（第3報），岡山県環境保健センター年報，40，1-12，2016
- 15) 間野遼太，山田克明，中野温朗，野村 茂，信森達也ら：岡山県における微小粒子状物質の成分分析結果（平成29年度），岡山県環境保健センター年報，42，1-8，2018
- 16) 環境省：大気中微小粒子状物質（PM2.5）成分測定マニュアル，<https://www.env.go.jp/air/osen/pm/ca/manual.html>（2019.11.22アクセス）
- 17) 兼保直樹，吉門 洋，近藤裕昭：広域・高時間分解能観測による初冬季高濃度SPMの主要化学組成および水分影響の解析，大気環境学会誌，37，108～121，2002
- 18) 米持真一，梅沢夏実，松本利恵：埼玉県北部のPM2.5

濃度と化学組成の5年間の観測結果, 大気環境学会誌,
42, 129-142, 2007

【調査研究】

岡山県内4地点の大気環境中微小粒子状物質の発生源解析について
Source Characterizations of PM2.5 in Atmospheric Environment at Four Sites in Okayama Prefecture

山田克明, 間野遼太, 西村佳恵, 赤木正章, 野村 茂, 小川 登 (大気科)
YAMADA Katsuaki, MANO Ryouta, NISHIMURA Yoshie, AKAKI Masaaki,
NOMURA Shigeru, OGAWA Noboru (Atmosphere Section)

要 旨

岡山県内4地点で観測された平成28～30年度の環境大気中の微小粒子状物質の構成成分の分析結果を用いて、Positive Matrix Factorization (PMF) 解析を行い、発生源を推定した。推定発生源として9つの因子を抽出したところ、主にバイオマス等燃焼因子、道路交通等因子及び硫酸系二次粒子因子が岡山県におけるPM2.5の主要な因子であると推測された。測定地点ごとの違いとしては、新見測定局及び総社測定局では硫酸系二次粒子因子が全体濃度の40%近くを占め、長津測定局では道路交通等因子が最も寄与した結果になった。塩生測定局では石炭燃焼及び重油燃焼因子による寄与が他の3地点に比べ多大であった。また、季節による寄与濃度の変化としては、秋季において、バイオマス等燃焼因子が他の季節に比べ増加する傾向を示した。

[キーワード：環境大気, 微小粒子状物質, 発生源解析, PMF解析]

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

1 はじめに

微小粒子状物質（以下「PM2.5」という。）については、本県でも以前から実態把握に取り組んでおり、観測結果を報告してきた^{1)～14)}。本報では、平成28～30年度のPM2.5構成成分の分析結果を用いて、Positive Matrix Factorization（以下「PMF」という。）解析を行い、発生源の影響を推定したので報告する。

2 調査方法

2.1 調査地点

図1に調査地点を示す。調査地点は、県北西部の新見測定局（新見市）、県南部の総社測定局（総社市）、長津測定局（早島町）及び塩生測定局（倉敷市）とした。新見測定局及び総社測定局は大規模な事業場等の少ない市街地に設置された一般環境大気測定局（以下「一般局」という。）であり、長津測定局は幹線道路沿いに設置された自動車排出ガス測定局（以下「自排局」という。）である。塩生測定局は石油精製や石油化学、鉄鋼、自動車等の業種が集積している瀬戸内海沿岸の水島工業地帯の東側に位置する一般局である。

2.2 試料採取及び成分測定

試料採取及び成分測定の詳細は既報¹¹⁾と同様に、「大気中微小粒子状物質成分測定マニュアル」（環境省水・大

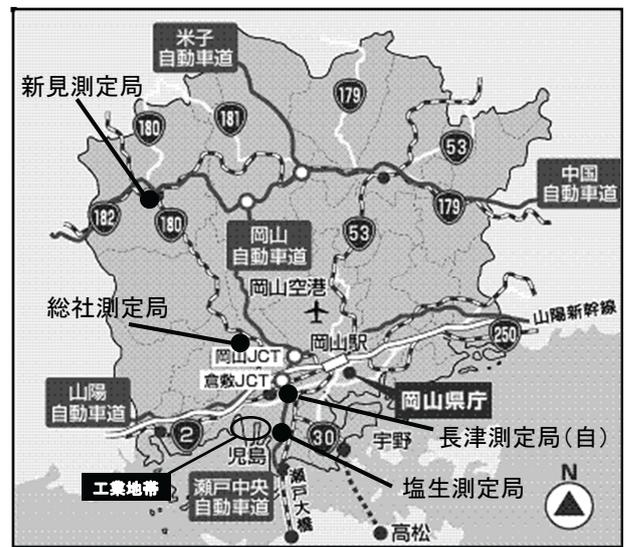


図1 調査地点

気環境局, 平成24年4月)に準じているが、試料採取数には季節間で偏りがある（基本的に春季・秋季14日間, 夏季・冬季7日間）。構成成分の分析結果は有効数字2桁で取り扱い、検出下限値未満の場合は同値の1/2を用いて解析した。

2.3 発生源寄与解析

発生源寄与の推定は、既報¹³⁾と同様に、レセプターモデルであるPMF解析により行った。解析ソフトウェアは米国環境保護庁が公開しているEPA-PMF5.0を利用した

15)。PMF解析は、多変量解析の一種で、成分濃度の時系列データセット(x)をいくつかの因子に分解し、それぞれの因子寄与(g)と因子プロファイル(f)を求める手法である。

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

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

$$Q = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \left(\frac{x_{ij} - \sum_{k=1}^p g_{ik} f_{kj}}{u_{ij}} \right)^2$$

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

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

2.4に記述した不確かさの算出や各成分の重み付け、その他の実行手順はソフトウェアのユーザーガイドに準じた¹⁵⁾。

2.4 解析条件

表1に解析条件を示す。本報では、ソフトウェアで計算する前に、イオンバランス及びマスクロージャーモデルを利用してデータスクリーニングを行った。PM2.5構成成分の分析結果の中で、イオンバランス（陽イオン/陰イオン式量比）が0.7～1.3の範囲から外れるデータを除外し、さらにマスクロージャーモデル（推定質量濃度 = 1.375[SO₄²⁻] + 1.29[NO₃⁻] + 2.5[Na⁺] + 1.4[OC] + [EC] + 9.19[Al] + 1.4[Ca²⁺] + 1.38[Fe] + 1.67[Ti]、なおTi濃度は測定していないため、[Ti] = 0.1[Fe]として算出した。）を用いた推定値が0.7～1.3の範囲から外れるデータを除外した。各成分で25%値から75%値の四分位範囲から3倍を超えるデータについても除外した。その他に、解析結果の統計的な安定性についてソフトウェアの評価ツール（3.1に記述したBootstrap runなど）により確認し、安定した解が得られるまでデータスクリーニングを行った¹⁵⁾。

不確かさのデータマトリクスは各成分の検出下限値と誤差割合（15%）により算出して作成した。モデル全体に係る不確かさ（Extra Modeling Uncertainty）は0%に設定した。

各成分の重み付けについては、検出下限値未満のデータ数の割合を基に行った。検出下限値未満の割合が3%を超過する項目（Cr, Ni, Al, Cu, Mg²⁺, Ca²⁺, NO₃⁻）はWeak（不確か性を3倍）に、50%を超過する項目（Cl⁻）はBad（解析から除外）に、それら以外の項目はStrong（変更無し）に設定した。なお、PM2.5（質量濃度）はWeak, Total Variableに設定した。

表1 解析条件

対象期間	平成28年度	平成29年度	平成30年度
春季/	H28/5/9～5/22	H29/5/10～5/23	H30/5/9～5/22
夏季/	H28/7/25～7/31	H29/7/24～7/30	H30/7/23～7/29
秋季/	H28/10/19～11/1	H29/10/19～11/1	H30/10/18～10/31
冬季/	H29/1/23～1/29	H30/1/22～1/28	H31/1/21～1/27
検出下限値未満の濃度データ	検出下限値の1/2で置換		
解析データ数	288		
解析対象項目	OC, EC, Mn, Cr, Ni, As, Al, Fe, Zn, Cu, V, Pb, Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , PM2.5		
不確か性データ	検出下限値 誤差割合 15%, EMU 0%		
重み付け	Strong	OC, EC, Mn, As, Fe, Zn, V, Pb, Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , SO ₄ ²⁻	
	Weak	Cr, Ni, Al, Cu, Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , NO ₃ ⁻ , PM2.5	
	Bad	Cl ⁻	

3 結果

3.1 因子数の決定

図2に因子数とQ値の関係を示す。図中の両者の関係は、因子数を5から10の間で変化させて、繰り返し計算数20回で得られたQ (True)（外れ値を除外せずに算出したQ値）とQ (Robust)（外れ値を除外して算出したQ値）の平均値及び相対標準偏差の変化を表している。表1の条件で解析したところ、因子数9において計算値Q (True)とQ (Robust)が理論値Q (Theory)に近づき、相対標準偏差RSD (True)とRSD (Robust)も最小になった。さらに因子数9としたときには、Bootstrap run（計算回数100回、Minimum Correlation R-Value 0.6）によるマッ

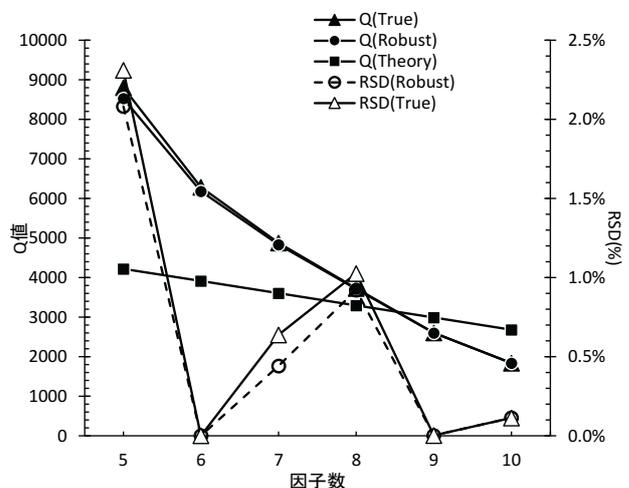


図2 因子数とQ値の関係

表2 Bootstrapの結果 (因子)

Base Bootstrap	因子1	因子2	因子3	因子4	因子5	因子6	因子7	因子8	因子9	Unmapped
因子1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
因子2	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
因子3	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
因子4	0	0	0	94	1	0	5	0	0	0
因子5	0	1	0	0	99	0	0	0	0	0
因子6	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
因子7	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
因子8	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
因子9	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0

ピングの当てはまりは、表2に示すとおり、いずれの因子も計算回数とほぼ同じで良好な結果を示した。Q値及びBootstrap runのマッピングから、因子数9で解析した結果が統計的に安定な解であると判断した。

3.2 因子の推定

図3に表1の解析条件の下、繰り返し計算100回で抽出された9つの因子に占める各成分の相対比を示す。各成分は因子1～9の合計で100%になる。因子間の成分相対比の

中で、負荷の大きい指標成分に着目し、調査地点周辺の状況を勘案した上で次のとおり発生源を推定した^{16)～22)}。

因子1は、石炭燃焼の指標成分とされるAsやPbの負荷が大きいために石炭燃焼の寄与を表すと解釈された。

因子2は、NO₃の負荷が大きく、廃棄物燃焼の指標成分であるZn、Pb、Cr、Cu成分の負荷も大きいことから、二次生成された硝酸系エアロゾル+廃棄物燃焼の複合因子と解釈された。

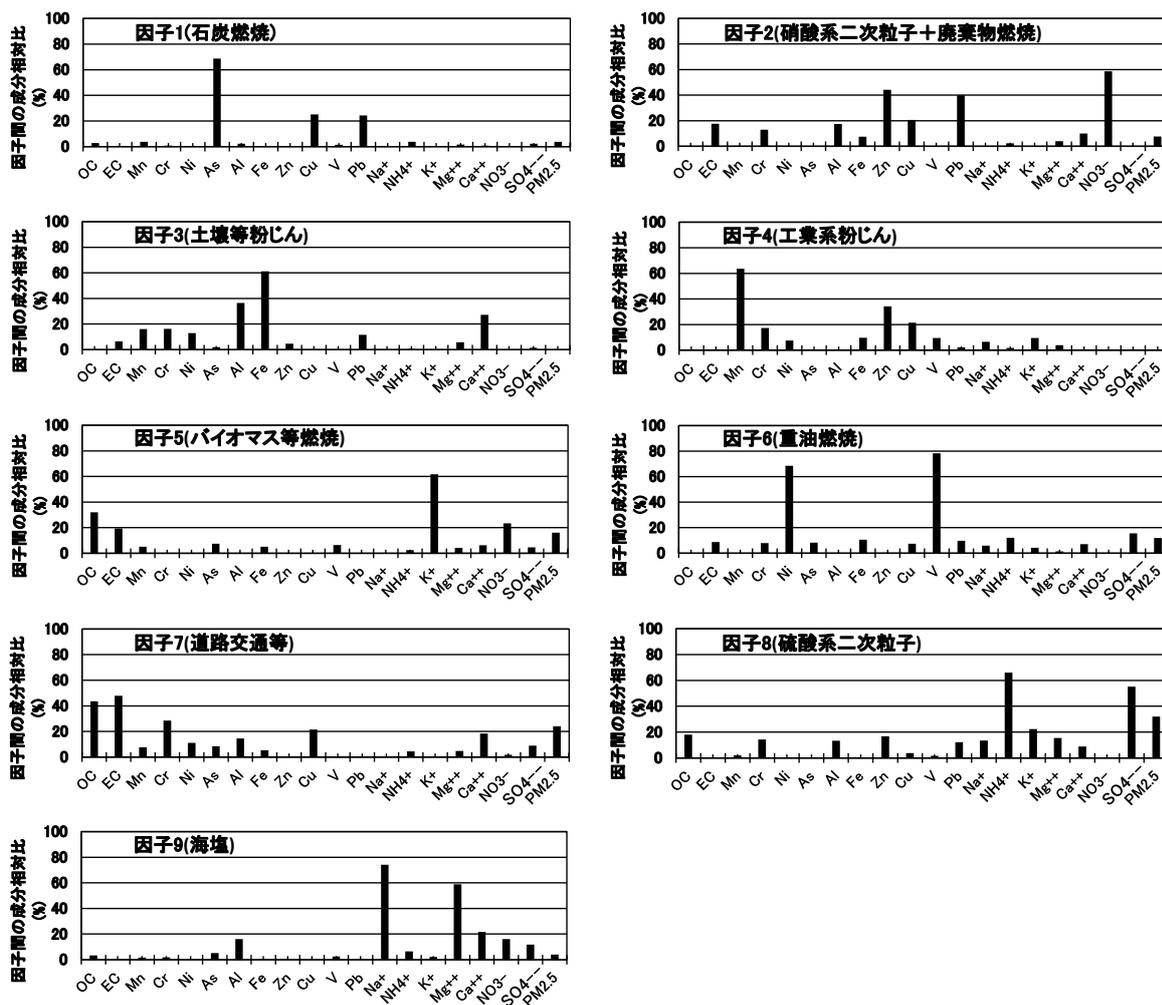


図3 抽出された因子間の成分相対比 (成分相対比から推定される発生源を因子に括弧で記載)

因子3は、土壌粒子の指標成分とされるAl、Fe及びCa²⁺の負荷が大きい上に様々な無機元素の負荷があるため、土壌粒子などを含んだ粉じんの寄与を表す因子と解釈された。

因子4は、無機元素であるMnやZnの負荷が大きいため、工業系の粉じんと解釈された。

因子5は、バイオマス燃焼の指標成分とされるOCやEC、K⁺の負荷が大きいことから、バイオマス等燃焼の寄与を表す因子と解釈された。

因子6は、重油燃焼の指標成分とされるNiやVの負荷が大きいため重油を燃料とする内燃機関の寄与を表す因子と解釈された。

因子7は、自動車排気の指標成分とされるECの負荷が大きく、タイヤ粉じんやブレーキ粉じんの指標成分とされるCuの負荷もあったことから、道路交通等因子と解釈された。

因子8は、NH₄⁺やSO₄²⁻の負荷が大きいため、二次生成された硫酸系エアロゾルと解釈された。

因子9は、海塩の指標成分とされるNa⁺の負荷が大きいため、海塩の寄与を表す因子と解釈された。

3.3 地点別の因子の寄与濃度

PMF解析の結果に基づいて地点別に各因子寄与濃度を推定した結果を図4に示す。

いずれの地点においても因子8（硫酸系二次粒子）の寄与が大きく、新見測定局及び総社測定局ではPM2.5質量濃度の40%近くを占めて他の2地点よりも高くなった（総社5.2 μg/m³ > 長津3.9 μg/m³ > 新見3.7 μg/m³ = 塩生3.7 μg/m³）。幹線道路沿いに位置する長津測定局では、他の3地点と比べて因子7（道路交通等）が高くなった（長津4.9

μg/m³ > 総社2.6 μg/m³ > 塩生2.4 μg/m³ > 新見2.2 μg/m³）。水島工業地帯の東側に位置する塩生測定局では、他の3地点に比べて因子1（石炭燃焼）及び因子6（重油燃焼）が他の3局に比べて倍以上高くなった（塩生1.1 μg/m³ + 3.0 μg/m³ > 長津0.37 μg/m³ + 1.2 μg/m³ > 総社0.26 μg/m³ + 1.1 μg/m³ > 新見0.22 μg/m³ + 0.7 μg/m³）。

3.4 季節別の因子の寄与濃度

県内4地点における季節別の因子の寄与濃度を図5に示す。

いずれの地点においても、気温が高く、日射量の多い春季及び夏季において因子8（硫酸系二次粒子）の割合が多く確認された。光化学反応による二次生成が促進されたためと推察された。

秋季において、塩生測定局以外の3地点では、因子5（バイオマス等燃焼）がPM2.5の主要な因子（新見2.2 μg/m³、総社2.0 μg/m³、長津3.0 μg/m³）の一つになった。それぞれの測定地点の付近には耕作地が存在しており、わら焼き等の野焼きによる影響が考えられた。塩生測定局は付近に耕作地が少ないため、大きな変化はなかったものと考えられた。なお、塩生測定局では因子5が通年高濃度傾向を示したが、この原因は現時点では不明である。

また、冬季において、塩生測定局では因子2（硝酸系二次粒子+廃棄物燃焼）の寄与が他の季節より増加した。冬季は風向きが工業地帯から塩生測定局に向かう傾向があることから、工業地帯の影響と推察された。

4 まとめ

岡山県内4地点で観測された平成28～30年度の環境大気中のPM2.5の成分分析結果を用いてPMF解析を行った

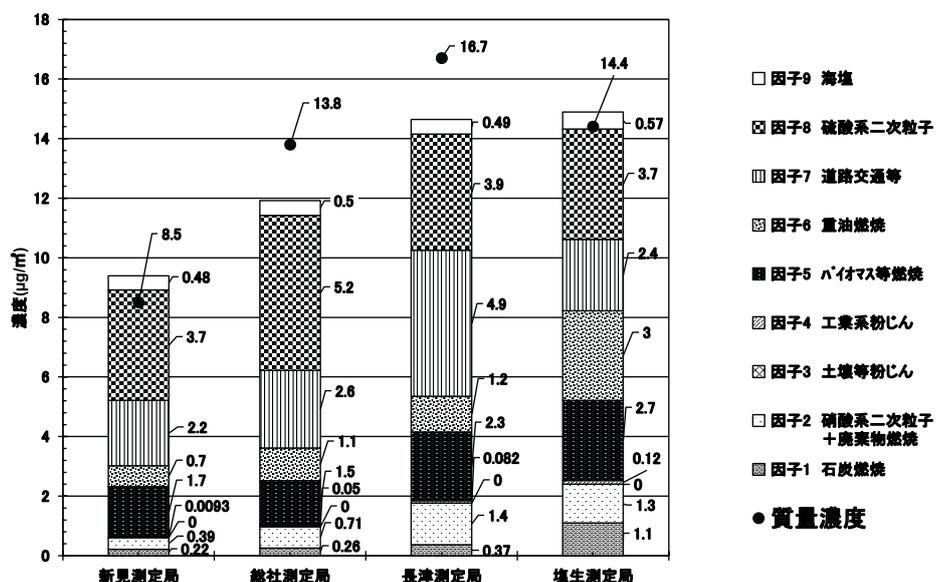


図4 地点別各因子寄与濃度の推定結果

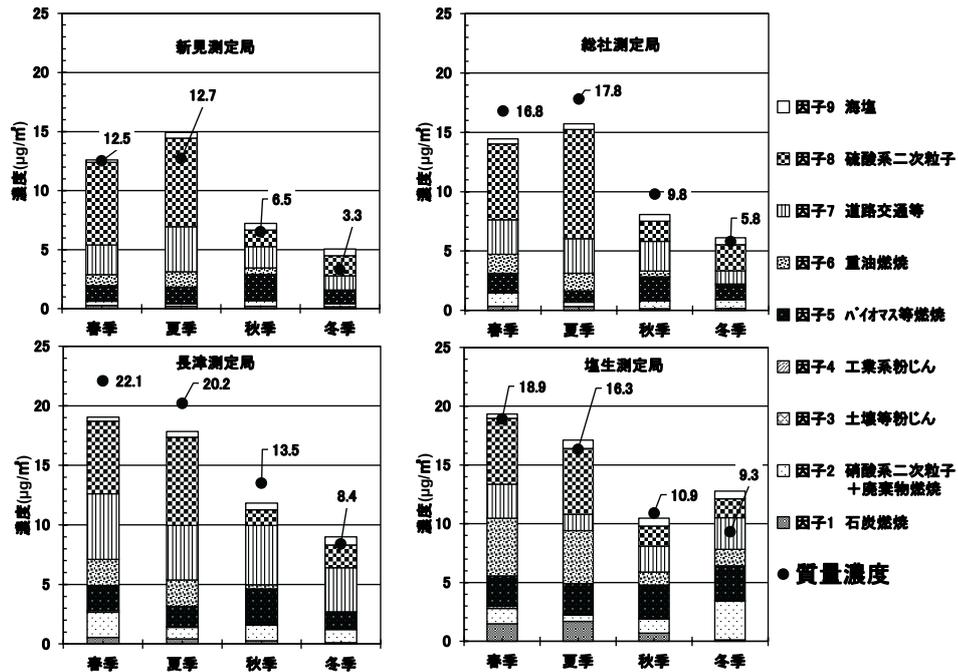


図5 季節による寄与濃度の変化

ところ、発生源として9つの因子（石炭燃焼，硝酸系二次粒子+廃棄物燃焼，土壤等粉じん，工業系粉じん，バイオマス等燃焼，重油燃焼，道路交通等，硫酸系二次粒子，海塩）が推定された。

抽出できた因子からは，岡山県におけるPM2.5の主要な発生源が因子5(バイオマス等燃焼)，因子7(道路交通等)及び因子8(硫酸系二次粒子)であることが推測できた。

測定地点ごとの違いとしては，新見測定局及び総社測定局では因子8(硫酸系二次粒子)が全体濃度の40%近くを占め，長津測定局では因子7(道路交通等)が最も寄与した結果になった。塩生測定局では因子1(石炭燃焼)及び因子6(重油燃焼)による寄与が他の3地点に比べ多であった。

季節による寄与濃度の変化としては，気温が高く，大気中で光化学反応による硫酸系二次粒子の生成が促進される春季及び夏季において，因子8(硫酸系二次粒子)の寄与が大きく，気温が低くなる秋季及び冬季には寄与濃度が大きく低下した。また，耕作地で野焼きが行われる秋季において，因子5(バイオマス等燃焼)による寄与が大きくなる傾向を示した。さらに，工業地帯から塩生測定局の方向に風が吹く傾向がある冬季において，因子2(硝酸系二次粒子+廃棄物燃焼)による寄与が大きかった。

文 献

1) 喜多真帆，中野温朗，野村 茂，信森達也，鷹野 洋：自動測定機を用いたPM2.5 とSPM及びその他の物質

の相関について，岡山県環境保健センター年報，38，1-5，2014

2) 中野温朗，深見武史，喜多真帆，野村 茂，信森達也ら：岡山県におけるPM2.5に係る平成23年度の観測結果について，岡山県環境保健センター年報，37，1-8，2013

3) 杉山広和，信森達也，野村 茂，前田 泉：環境中の大気汚染物質に関する研究（微小粒子PM2.5による大気汚染）-第2報-，岡山県環境保健センター年報，32，7-10，2008

4) 杉山広和，信森達也，前田 泉：環境中の大気汚染物質に関する研究（微小粒子PM2.5による大気汚染）-第3報-，岡山県環境保健センター年報，32，11-16，2008

5) 杉山広和，石井尚志，野村 茂，門田 実，前田 泉：環境中の大気汚染物質に関する研究（微小粒子状物質PM2.5による大気汚染）-第4報-，岡山県環境保健センター年報，33，1-5，2009

6) 石井尚志，野村 茂，中桐未知代，山辺真一：環境中の大気汚染物質に関する研究（微小粒子PM2.5による大気汚染）-第5報-，岡山県環境保健センター年報，34，7-10，2010

7) 林 隆義，中桐未知代，野村 茂，小川 登，片岡敏夫ら：環境中の大気汚染物質に関する研究（微小粒子PM2.5による大気汚染）-第6報-，岡山県環境保健センター年報，35，1-7，2011

- 8) 中桐未知代, 吉岡敏行, 林 隆義, 野村 茂, 中桐基晴: 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子PM2.5による大気汚染)-第7報-, 岡山県環境保健センター年報, 35, 9-18, 2011
- 9) 林 隆義, 中桐未知代, 野村 茂, 小川 登, 深見武史ら: 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子状物質PM2.5による大気汚染)-第8報-, 岡山県環境保健センター年報, 36, 1-8, 2012
- 10) 中桐未知代, 林 隆義, 野村 茂, 小川 登, 深見武史ら: 環境中の大気汚染物質に関する研究(微小粒子状物質PM2.5による大気汚染)-第9報-, 岡山県環境保健センター年報, 36, 9-16, 2012
- 11) 中野温朗, 間野遼太, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也ら: 岡山県下における微小粒子状物質の成分の実態について, 岡山県環境保健センター年報, 39, 1-9, 2015
- 12) 中野温朗, 間野遼太, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也ら: 岡山県下における微小粒子状物質の成分の実態について(第2報), 岡山県環境保健センター年報, 39, 11-19, 2015
- 13) 中野温朗, 間野遼太, 喜多真帆, 野村 茂, 信森達也ら: 岡山県下2地点の大気環境中微小粒子状物質の発生源解析について, 岡山県環境保健センター年報, 41, 5-10, 2017
- 14) 間野遼太, 山田克明, 中野温朗, 野村 茂, 信森達也ら: 岡山県における微小粒子状物質の成分分析結果(平成29年度), 岡山県環境保健センター年報, 42, 1-8, 2018
- 15) U.S.EPA:Positive Matrix Factorization Model for environmental data and analyses(2014), <https://www.epa.gov/air-research/positive-matrix-factorization-model-environmental-data-analyses> (2019年6月20日アクセス)
- 16) 環境省:微小粒子状物質(PM2.5)の成分分析ガイドライン, 2011
- 17) 環境省:大気中微小粒子状物質成分測定マニュアル無機元素測定法, 2012
- 18) 飯島明宏:大気モデル-第5講 レセプターモデル-, 大気環境学会誌, 46 (4), A53-A60, 2011
- 19) 大内伸保, 山内正信:PMF法を用いた微小粒子状物質(PM2.5)の発生源寄与の推定, 愛媛県立衛生環境研究所年報, 18, 10-17, 2015
- 20) 中坪良平, 竹本智美, 平木隆年:兵庫県におけるPM2.5の発生源解析に関する研究-その1-, 兵庫県環境研究センター紀要, 7, 1-7, 2016
- 21) 山村由貴, 山本重一, 力 寿雄, 梶原佑介:福岡県における微小粒子状物質(PM2.5)濃度の実態把握, 福岡県保健環境研究所年報, 43, 93-98, 2016
- 22) 豊永悟史, 出納由美子, 北岡宏道, 村岡俊彦:レセプターモデルを用いた熊本県におけるPM2.5発生源寄与の推定-離島との比較による越境/地域汚染の影響の解析-, 大気環境学会誌, 52 (5), 2017

【調査研究】

事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究
- 3-クロロ-2-プロペン-1-オールの水質分析法の検討 -

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

- Study of water quality analysis method of 3-chloro-2-propen-1-ol -

山本浩司, 大月史彦, 浦山豊弘, 吉岡敏行 (水質科)

YAMAMOTO Koji, OTSUKI Fumihiko, URAYAMA Toyohiro, YOSHIOKA Toshiyuki (Water Section)

要 旨

環境基本法に基づき公共用水域の水質汚濁に係る環境基準及び地下水の水質汚濁に係る環境基準が定められている1,3-ジクロロプロペンの分解生成物¹⁾である3-クロロ-2-プロペン-1-オールについて、水質試料の高感度分析法を検討した。3-クロロ-2-プロペン-1-オールには異性体としてシス-3-クロロ-2-プロペン-1-オール及びトランス-3-クロロ-2-プロペン-1-オール（以下それぞれ「シス体」、「トランス体」という。）が存在する。誘導体化後、ガスクロマトグラフ質量分析計で分析することにより、検出下限値がシス体3.9 ng/L、トランス体3.4 ng/Lの高感度な同時分析法を開発することができた。河川水及び海水を用いた添加回収試験の回収率は、それぞれシス体が95%、87%、トランス体が80%、79%と良好な結果であった。

[キーワード：3-クロロ-2-プロペン-1-オール, 水質, 1,3-ジクロロプロペン, GC-MS]

[Key words：3-Chloro-2-propen-1-ol, Water quality, 1,3-Dichloropropene, GC-MS]

1 はじめに

当センターは事故時等緊急時における分析のため、最新の化学物質情報の入手や分析技術の習得等を目的に、毎年、環境省が実施する化学物質環境実態調査に参画し、化学物質の新規分析法開発及び環境中濃度の調査に取り組んでいる。今回、平成27～30年度化学物質環境実態調査で3-クロロ-2-プロペン-1-オールの水質分析法について検討した。

3-クロロ-2-プロペン-1-オールは、環境基本法に基づき公共用水域の水質汚濁に係る環境基準及び地下水の水質汚濁に係る環境基準が定められている1,3-ジクロロプロペンの分解生成物¹⁾である。本物質には異性体としてシス-3-クロロ-2-プロペン-1-オール及びトランス-3-クロロ-2-プロペン-1-オール（以下それぞれ「シス体」、「トランス体」という。）が存在する。

今回、ガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）を用いて、シス体及びトランス体の分離分析法を検討し、誘導体化による高感度な同時分析法を開発したので報告する。

2 試験方法

2.1 試薬等

(Z)-3-クロロ-2-プロペン-1-オール（シス体）：林純薬製特注品（純度99.9%）

(E)-3-クロロ-2-プロペン-1-オール（トランス体）：林純薬製特注品（純度99.9%）

ナフタレン-*d*₈：Cambridge Isotope Laboratories製（純度99%）

アセトン：富士フィルム和光純薬製 残留農薬・PCB試験用（5000倍濃縮）

ジクロロメタン：富士フィルム和光純薬製 残留農薬・PCB試験用（5000倍濃縮）

N,O-ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミド（BSTFA）：GL Sciences製

無水硫酸ナトリウム：関東化学製 残留農薬・PCB試験用

固相カートリッジ：Waters製Sep-Pak Plus AC-2

ガラスウール：予めアセトン洗浄し、乾燥させたもの

精製水：ミリポア製Milli-Q Advantageにより調製

ミネラルウォーター：Volvic

2.2 GC-MSの測定条件

使用機種：GC：Agilent7890A, MS：JMS-Q1000GC Mk II

使用カラム：DB-17HT（Agilent製, 60 m×0.32 mm,0.15 μm）

カラム温度：45℃（2 min）→7℃/min→180℃（0 min）→20℃/min→250℃（5 min）

注入方法：Pulsed splitless（20 psi（1.6 min））

表1 3-クロロ-2-プロペン-1-オールの物理化学的性状

分子量 (平均分子量)	92.52
分子量 (モノアイソトピック質量)	92.0029
融点(°C)	-50.09 (推定値) ²⁾
沸点(°C)	132.59 (推定値) ²⁾
蒸気圧(hPa, 25°C)	4.72 (推定値) ²⁾
溶解性(mg/L, 25°C)	1.291×10 ⁵ (推定値) ²⁾
log P _{ow}	0.57 (推定値) ²⁾

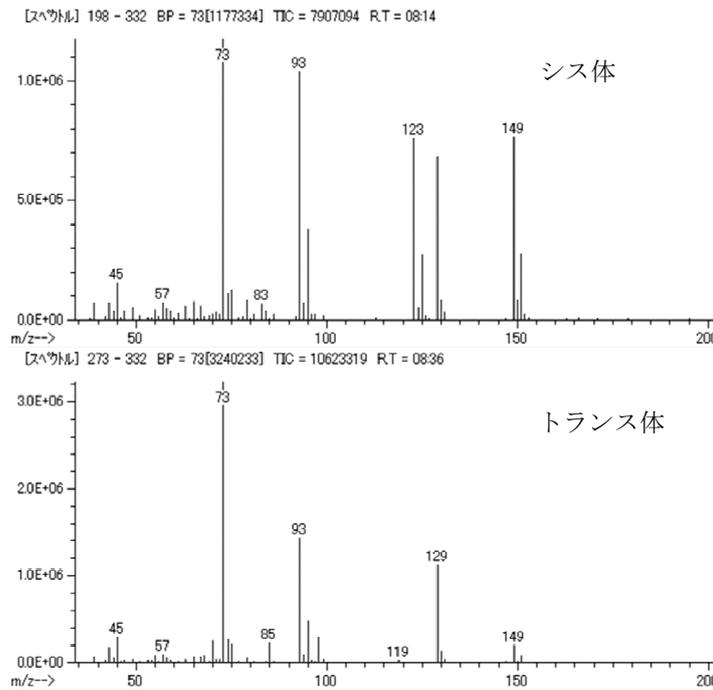


図1 シス体及びトランス体 (誘導體化) のマススペクトル

注入口温度：250 °C

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min)

インターフェース温度：240 °C

イオン源温度：210 °C

イオン化電圧：70 eV

検出モード：SIM

モニターイオン：m/z 93 (シス体定量イオン), 129 (トランス体定量イオン), 95 (シス, トランス体定性イオン), 136 (ナフタレン-*d*₈定量イオン)

2.3 シス体及びトランス体混合標準液の調製

2.3.1 混合標準液の調製

シス体及びトランス体を各100 mg量り取り、アセトンを加えて100 mLに定容し、1000 μg/mLの混合標準原液を調製した。混合標準原液をアセトンで順次希釈して100, 10, 1 μg/mLの混合標準液を調製した。

2.3.2 内標準液の調製

ナフタレン-*d*₈を100 mg量り取り、アセトンを加えて

100 mLに定容し、1000 μg/mLの内標準原液を調製した。内標準原液を分取し、アセトンで希釈して5 μg/mLの内標準液を調製した。

2.3.3 検量線用標準液の調製

測定用バイアルにジクロロメタン1 mLを入れ、各濃度の混合標準液を添加し、BSTFAを50 μL添加後、蓋をして室温で16時間静置し、検量線用標準液を調製した。検量線用標準液の各濃度は1.0 ~ 500 ng/mLとし、各濃度の検量線用標準液には、内標準液を5 μL添加した。

2.4 前処理方法

分析法のフローチャートを図2に示す。

試料200 mLを量り採り、アセトン10 mL、精製水10 mLでコンディショニングした固相カートリッジに10 mL/minで通水した。通水終了後の固相カートリッジを精製水10 mLで洗浄した。試験管の上に、ガラスウール及び無水硫酸ナトリウムを入れたロート、固相カートリッジをセットし、ジクロロメタンでバックフラッシュ溶出

及び脱水後、溶出液4 mLを試験管に受けた。溶出液量は固相カートリッジのロットによって必要量が異なる場合があるため、事前に確認した。溶出液を窒素ガスで1 mLに濃縮した後、測定用バイアルに移し、BSTFAを50 μ L添加後、蓋をして室温で16時間静置した。静置後、内標準液を5 μ L添加したものを試験液とした。

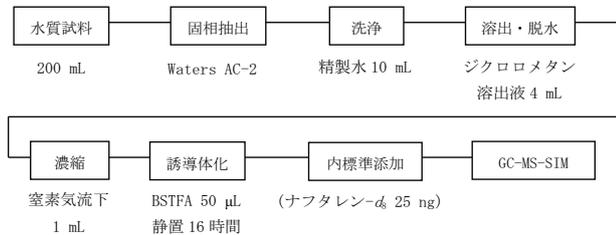


図2 分析法のフローチャート

2.5 装置検出下限値 (IDL), 分析法の検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL)

IDL, MDL及びMQLの算出は、「化学物質環境汚染実態調査の手引き(平成27年度版)」³⁾(以下「手引き」という。)に従った。IDLは、2.3に従い1.0 ng/mLの検量線用標準液を7個作製し、GC-MSで測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。MDL及びMQLは、河川水(笹ヶ瀬橋)200 mLに、IDLの5倍程度の濃度となるように1 μ g/mL混合標準液を5 μ L添加し、2.4に従い前処理を行ったものを7個作製し、GC-MSで測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。

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

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

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

$t(n-1,0.05)$: 危険率5%, 自由度n-1のt値(片側)

$\sigma_{n-1,I}$: IDL算出のための測定値の標本標準偏差

$\sigma_{n-1,M}$: MDL算出のための測定値の標本標準偏差

2.6 シス体及びトランス体の添加回収試験及び環境試料の分析

海水試料(水島沖)200 mLに10 μ g/mL混合標準液を2 μ L添加し、2.4に従い前処理を行ったものを、GC-MSで測定した。環境試料として、無添加の河川水及び海水も分析した。河川水はMDL試験の結果を添加回収試験結果として採用した。

また、操作ブランクとして精製水200 mLを2.4に従い前処理を行ったものをGC-MSで測定した。

2.7 シス体及びトランス体の分解性スクリーニング試験及び保存性試験

手引きに従い、分解性スクリーニング試験及び保存性試験を実施した。

分解性スクリーニング試験の試験液は精製水を用いてpH 5, pH 7及びpH 9のものを作製し、各200 mLに10 μ g/mLの混合標準液を5 μ L添加し、1時間後及び7日後(約20 $^{\circ}$ Cの明所及び暗所に保存)に2.4に従い前処理を行ったものをGC-MSで測定した。

保存性試験は、酸化防止剤としてアスコルビン酸を添加(1.0 g/L)したものと無添加の2種類の採水ビンに河川水(笹ヶ瀬橋)及び海水(児島湾)を満水に入れ、対象物質の濃度が100 ng/Lになるように10 μ g/mL標準液を添加し、冷暗所で1~7日間保存後、分析フローに従いGC-MSで測定した。

また、検量線最高濃度の保存性試験として500 ng/mLの検量線用標準液を冷暗所に保存し、1か月後に再調製した検量線用標準液と測定結果を比較した。

2.8 抽出後の固相カートリッジへの窒素パージによる回収率への影響

本分析法では無水硫酸ナトリウムを使用した脱水を採用しているが、窒素パージを使用した脱水によるシス体及びトランス体の回収率への影響についても検討した。精製水200 mLに100 μ g/mLの混合標準液を2 μ L添加し、固相カートリッジに通水後、固相カートリッジに対して窒素パージを5分間行った。その他の工程は2.4と同様の操作を行い、GC-MSで測定した。

2.9 誘導体化に要する反応時間の検討

BSTFAによる3-クロロ-2-プロペン-1-オール誘導体化に要する時間について検討を行った。ジクロロメタン1 mLに100 μ g/mLの混合標準液を5 μ L添加し、BSTFA 50 μ Lを添加後1~20時間静置し、内標準液を5 μ L添加後GC-MSで測定を行った。

2.10 測定装置の検討

誘導体化GC-MS法以外での分析方法として、液体クロマトグラフ質量分析計(以下「LC-MS/MS」という。)及びヘッドスペースガスクロマトグラフ質量分析計(以下「HS-GC-MS」という。)による検討も行った。

LC-MS/MSでは、シス体及びトランス体各1 μ g/mLのメタノール溶液を10 μ L/minでインフュージョンにより注入し、マススペクトルを確認した。

MS (LC-MS/MS) 測定条件

使用機種: Micromass Quattro micro API (Waters製)

キャピラリー電圧: 3.0 kV, ソース温度: 100 $^{\circ}$ C

デゾルベーションガス温度: 500 $^{\circ}$ C

コーンガス流量: 50 L/hr

デソルベーションガス流量：600 L/hr
 イオン化法：ESI Negative
 コーン電圧：10 V
 スキャン範囲： m/z 30～150
 スキャンタイム：0.4 s（インタースキャンタイム：0.1 s）

HS-GC-MSでは、塩化ナトリウム（富士フィルム和光純薬製：水質試験用）3 gを加えたバイアルにミネラルウォーター（Volvic）を10 mL入れ、メタノール溶液で作製した混合標準液を添加し、HS-GC-MSで測定した。

HS測定条件 [トラップモード]
 使用機種：12031HSA（JEOL製）

トラップ管：GLトラップ1
 抽出回数：3回
 サンプルブロック温度：80℃
 攪拌時間：30 min

トランスファーライン温度：150℃
 バルブブロック温度：100℃
 トラップ管温度：23℃

加圧

圧力：40 kPa，加圧時間：10 s，トラップ流量：20.0 SCCM，サンプリング終了時圧力：3 kPa

ドライパージ時間：2 min 30 s，サンプリング後平衡時間：3 s

GCインジェクション

トラップ管温度：220℃，時間：3 min，トラップ管流量：20.0 SCCM

GC-MSの測定条件

使用機種：GC：Agilent7890A，MS：JMS-Q1000GC K9
 使用カラム：AQUATIC-2（ジーエルサイエンス製，60 m×0.32 mm，1.8 μm）

カラム温度：40℃（5 min）→10℃/min→100℃（0 min）→20℃/min→220℃（5 min）

注入方法：ダイレクト

キャリアーガス：ヘリウム（2 mL/min）

インターフェース温度：200℃

イオン源温度：200℃

イオン化電圧：70 eV

検出モード：SIM

モニターイオン： m/z 57（定量イオン），55（定性イオン）

3 結果及び考察

3.1 GC-MS測定条件の検討結果

シス体及びトランス体の検量線を図3～6に、500 ng/mL検量線用標準液のクロマトグラムを図7に示す。1.0～20 ng/mLの低濃度領域，20～500 ng/mLの高濃度領域でも相関の高い直線性のある検量線が得られた。

3.2 IDL, MDL及びMQL

IDL, MDL及びMQLを表2に示す。IDL試料換算値はシス体1.4 ng/L，トランス体0.80 ng/L，MDLはシス体3.9 ng/L，トランス体3.4 ng/L，MQLはシス体10 ng/L，トランス体8.8 ng/Lであり，環境省の要求感度（5.6 ng/L）を十分満足できる分析方法を開発することができた。

3.3 添加回収試験及び環境試料分析結果

添加回収試験結果を表3に示す。河川水の回収率はシス体95%，トランス体80%，海水の回収率はシス体87%，トランス体79%と良好な結果であった。無添加の河川水及び海水（環境試料）からは，シス体，トランス体とも

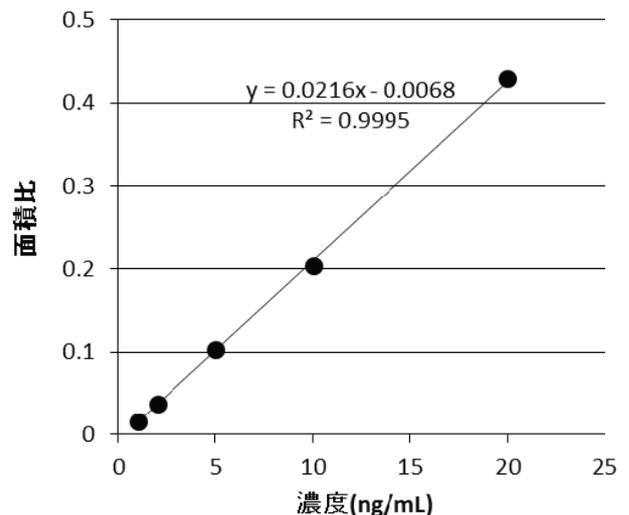


図3 シス体低濃度領域検量線

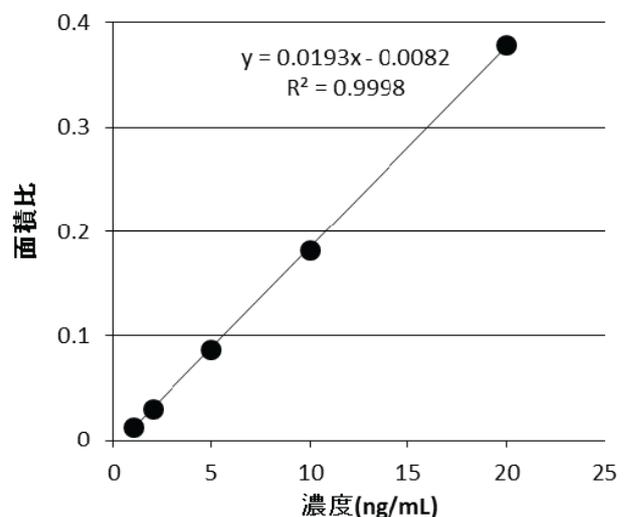


図4 トランス体低濃度領域検量線

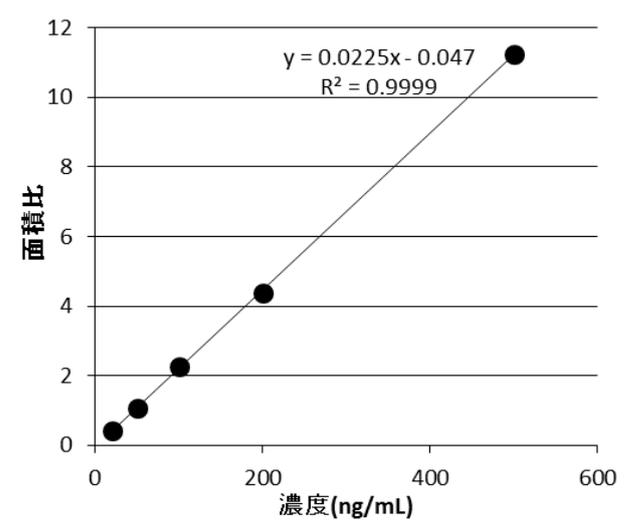


図5 シス体高濃度領域検量線

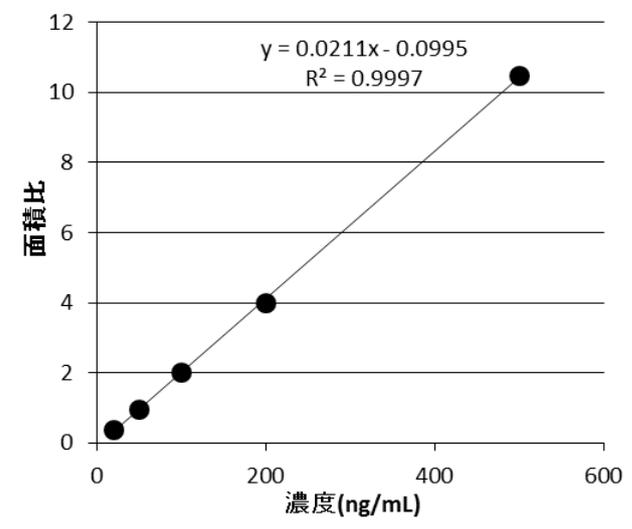


図6 トランス体高濃度領域検量線

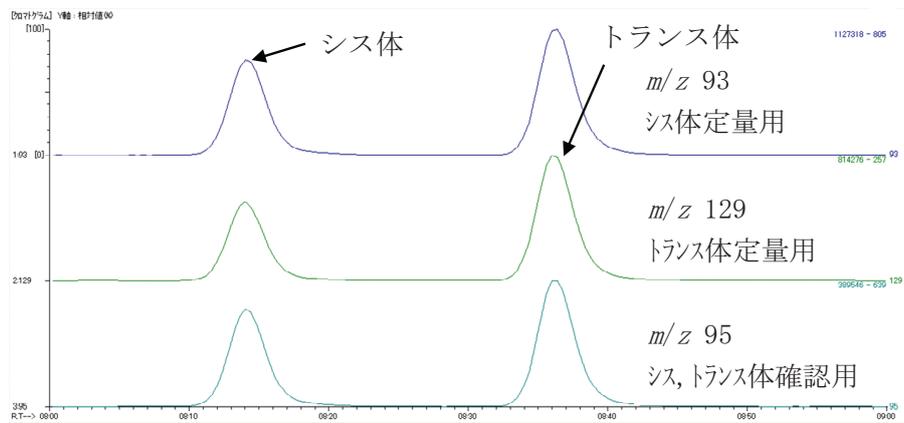


図7 500 ng/mL検量線用標準液のクロマトグラム

に検出されなかった。

また、操作ブランクのクロマトグラムを図8に示す。操作ブランクからシス体のリテンションタイム付近に m/z 129, トランス体のリテンションタイムに m/z 93の妨害ピークが観測された。よってシス体の定量には m/z 93, トランス体の定量には m/z 129を使用することとした。

3.4 分解性スクリーニング試験及び保存性試験結果

分解性スクリーニング試験結果を表4に示す。7日後における、いずれの条件においても、シス体及びトランス

体の残存率は70 %以上と安定した結果が得られた。

保存性試験結果を表5に示す。アスコルビン酸無添加の河川水では1日後にシス体, トランス体ともに残存率約10 %となり, 3日後にはシス体, トランス体ともに0 %となった。アスコルビン酸無添加の海水では1日後はシス体82 %, トランス体100 %と良好な結果が得られたが, 3日後はシス体22 %, トランス体80 %と特にシス体の残存率が大幅に減少した。

一方, アスコルビン酸を添加した場合は, 7日後の河川

表2 IDL, MDL及びMQL

対象物質名	IDL (pg)	IDL 試料換算値 (ng/L)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
3-クロロ-2-プロペン-1-オール (シス体)	0.27	1.4	3.9	10
3-クロロ-2-プロペン-1-オール (トランス体)	0.16	0.80	3.4	8.8

表3 添加回収試験結果

試料名	試料量 (L)	添加量 (ng)	最終液量 (mL)	検体数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)	
河川水 (笹ヶ瀬橋)	シス体	0.20	0	1	1	< 3.9	-	-
		0.20	5	1	7	23.8	95	4.2
	トランス体	0.20	0	1	1	< 3.4	-	-
		0.20	5	1	7	20.0	80	4.4
海水 (水島沖)	シス体	0.20	0	1	1	< 3.9	-	-
		0.20	20	1	5	86.6	87	3.7
	トランス体	0.20	0	1	1	< 3.4	-	-
		0.20	20	1	5	79.2	79	3.7

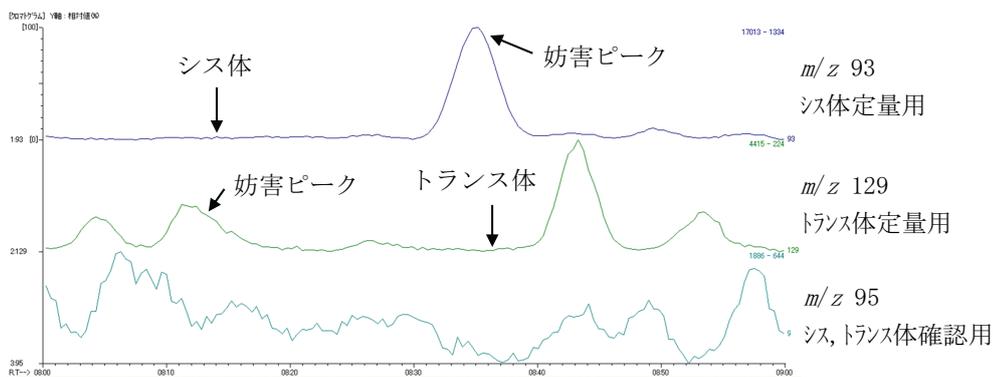


図8 操作ブランクのクロマトグラム

水及び海水でシス体、トランス体ともに残存率約90%であった。

本結果から、3-クロロ-2-プロペン-1-オールの分析はあらかじめ採水ビンにアスコルビン酸を添加して採水し、7日以内に分析することが望ましいことが分かった。

また、検量線用標準液については、1か月後にシス体、トランス体ともにほぼ残存率100%であったことから、誘導体化した検量線用標準液はジクロロメタン中で長期間保存可能であった。

3.5 抽出後の固相カートリッジへの窒素パージによる回収率への影響結果

窒素パージ操作の有無によるシス体及びトランス体の回収率への影響結果を表6に示す。窒素パージ有ではシス体32%、トランス体20%、窒素パージ無ではシス体92%、トランス体79%の回収率であったため、抽出後の固相カートリッジへの窒素パージは脱水方法として不適當であった。

た。

3.6 誘導体化に要する反応時間の検討結果

誘導体化条件の検討結果について図9に示す。静置16時間でシス体、トランス体ともにピーク面積値がほぼ最大となることがわかったため、本分析法の誘導体化に要する時間は16時間とした。

また、検量線用標準液を密閉性の高い容器で60℃に加温することで、静置の半分の8時間でピーク面積値がほぼ最大となることがわかった。しかし、この方法では密閉性の高い容器でジクロロメタン（沸点：40℃）を、長時間60℃に加温する必要があるため、前処理の安全性を考慮した結果、本分析法は静置による誘導体化を採用した。

3.7 測定装置の検討結果

LC-MS/MSによるインフュージョン測定の結果、ESI Negativeでは、3-クロロ-2-プロペン-1-オールの[M-H]⁻に相当するm/z 91のイオンは痕跡程度しか確認できなかった。

表4 分解性スクリーニング試験結果

	pH	調製濃度 (ng/L)	検出濃度 (ng/L) (残存率(%)*)		
			1時間放置後	7日間放置後	
				暗所	明所
シス体	5	250	211 (84)	205 (82)	-
	7	250	218 (87)	232 (93)	209 (84)
	9	250	218 (87)	215 (86)	-
トランス体	5	250	198 (79)	186 (74)	-
	7	250	190 (76)	192 (77)	176 (70)
	9	250	199 (80)	193 (77)	-

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

表5 保存性試験結果

試料名	アスコル ビン酸	調製濃度 (ng/L)	残存率(%)*				
			1日間	3日間	7日間	1か月	
河川水 (笹ヶ瀬橋)	シス体	無添加	50	12	0	0	-
		添加	100	94	92	93	-
	トランス体	無添加	50	12	0	0	-
		添加	100	87	86	90	-
海水 (児島湾)	シス体	無添加	50	82	22	0	-
		添加	100	86	85	89	-
	トランス体	無添加	50	100	80	56	-
		添加	100	87	86	87	-
検量線用 標準液	シス体	-	500 (ng/mL)	-	-	-	102
	トランス体	-	500 (ng/mL)	-	-	-	100

* 残存率(%)：調製濃度に対する検出濃度の割合

表6 窒素パージによる回収率への影響結果

	窒素パージ	試料量 (L)	添加量 (ng)	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)
シス体	有	0.2	200	315	32
	無	0.2	200	915	92
トランス体	有	0.2	200	195	20
	無	0.2	200	785	79

た。一方、ESI Positiveでの測定も行ったが、 $[M+H]^+$ に相当する m/z 93のイオンは確認できなかった。以上の結果からLC-MS/MS分析は困難であった。

環境省の要求感度 (5.6 ng/L) を満たすことはできなかった。ただし、高濃度での対象物質の存在確認及び簡易な定量といったスクリーニング検査には、適用可能と考えられた。

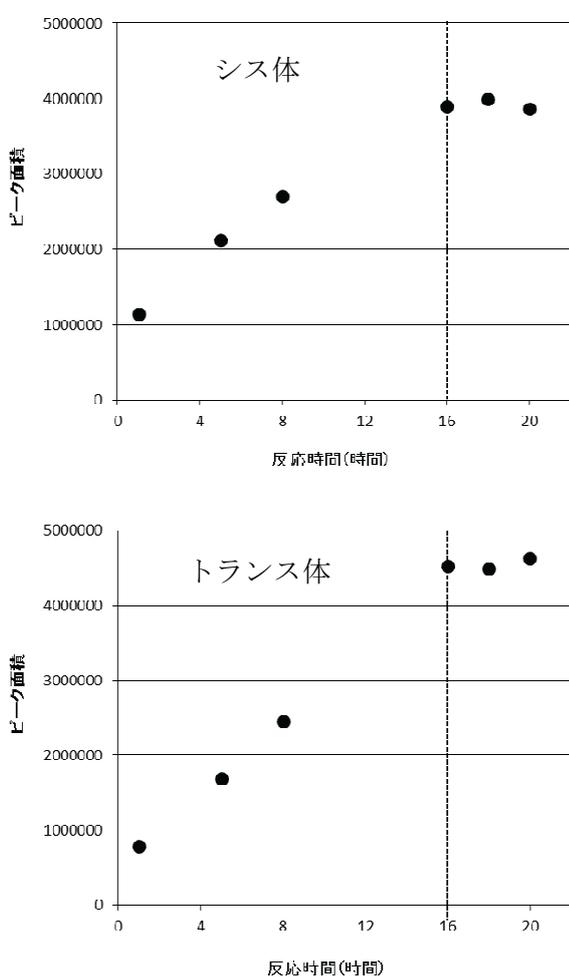


図9 誘導体化に要する反応時間の検討結果

HS-GC-MSによる測定結果を図10, 11に示す。10000 ng/Lの高濃度ではシス体、トランス体ともに良好なピークが観測された。

一方、操作ブランクからはシス体、トランス体ともに妨害ピークが観測されたため、シス体200 ng/L、トランス体1000 ng/L以下の測定は困難であり、HS-GC-MSでは

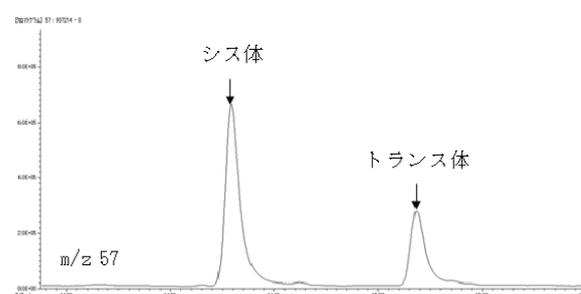


図10 HS-GC-MSでの10000 ng/Lのクロマトグラム

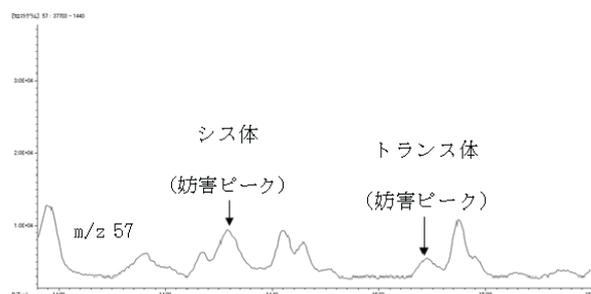


図11 HS-GC-MSでの操作ブランクのクロマトグラム

4 まとめ

3-クロロ-2-プロペン-1-オールの分析法を検討した結果、次に示すとおり高感度な分析法が開発できた。

- (1) BSTFAによる誘導体化を行うことで、高感度に分析できることが分かった。
- (2) 3-クロロ-2-プロペン-1-オールの検出下限 (MDL) はシス体3.9 ng/L、トランス体3.4 ng/L、定量下限 (MQL) はシス体10 ng/L、トランス体8.8 ng/Lであった。
- (3) 河川水及び海水を用いた3-クロロ-2-プロペン-1-オールの添加回収試験の回収率は、河川水はシス体95%、トランス体80%、海水はシス体87%、トランス体79%と良好な結果であった。
- (4) 環境試料水中での分解性が確認されたが、アスコルビ

ン酸を添加することで、冷暗所で7日間の保存が可能であった。

(5) LC-MS/MSによる分析では3-クロロ-2-プロペン-1-オールに関連イオンは確認されず、分析は困難であった。

(6) HS-GC-MSによる分析はシス体200 ng/L、トランス体1000 ng/L以上であれば測定可能であり、高濃度の3-クロロ-2-プロペン-1-オールの簡易なスクリーニング検査として適用可能であった。

なお、本研究は環境省委託の平成27～30年度化学物質分析法開発調査(環境省環境安全課)と連携して実施した。

文 献

- 1) IPCS(1993)Environmental Health Criteria,146
- 2) U.S.EPA, Estimation Programs Interface (EPI) Suite v4.11
- 3) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：化学物質環境実態調査実施の手引き（平成27年度版），2016

【調査研究】

事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究
 - 3-クロロ-2-プロペン酸の水質分析法の検討 -

Study on the development of analysis method of chemical substances at the time of water quality accidents
 - Study of water quality analysis method of 3-chloro-2-propenoic acid -

浦山豊弘, 大月史彦, 山本浩司, 吉岡敏行 (水質科)

URAYAMA Toyohiro, OTSUKI Fumihiko, YAMAMOTO Koji, YOSHIOKA Toshiyuki (Water Section)

要 旨

環境基本法に基づき水質汚濁に係る環境基準等が定められている1,3-ジクロロプロペンの分解生成物である3-クロロ-2-プロペン酸について、水質試料の分析法を検討した。水質試料にギ酸を加えて酸性にし、グラファイトカーボン固相カートリッジで抽出して前処理を行い、Amide系カラムを用い、移動相の初期条件をアセトニトリル99%とすることで異性体をそれぞれ分離した定量が可能となった。保存性試験の結果、水質試料中での分解性が確認されたが、ギ酸を添加することで7日間は安定であった。本法の検出下限値はtrans体が0.10 µg/L、cis体が0.12 µg/Lであった。

[キーワード：3-クロロ-2-プロペン酸, 水質, 1,3-ジクロロプロペン, LC-MS/MS]

[Key words : 3-Chloro-2-propenoic acid, Water quality, 1,3-Dichloropropene, LC-MS/MS]

1 はじめに

事故時等緊急時に対応するためには、最新の化学物質情報の入手や分析技術の習得等が必要であり、当センターは毎年、環境省が実施する化学物質環境実態調査に参画し、化学物質の新規分析法開発及び環境中濃度の調査を行っている。平成27～30年度の化学物質環境実態調査においては、3-クロロ-2-プロペン酸の水質分析法を検討してきた。

3-クロロ-2-プロペン酸は、環境基本法に基づく水質汚濁に係る環境基準等が定められている1,3-ジクロロプロペンの分解生成物¹⁾である。本物質には異性体としてtrans体とcis体が存在し、それぞれを分離して定量する分析法の開発が緊急時の的確な対応実施のために必要不可欠となっている。今回、当センターにおいて、同物質についてグラファイトカーボン固相カートリッジで抽出し、LC-MS/MSで測定する方法によるtrans体及びcis体の分離分

析法を開発したので報告する。

2 試験方法

2.1 対象物質の構造と性状

対象物質の構造を図1に、物理化学的性状を表1に示す。

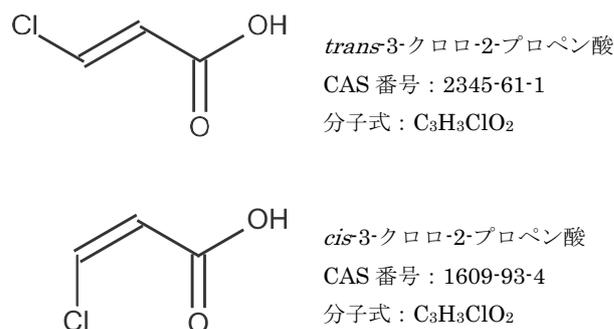


図1 対象物質の構造

表1 3-クロロ-2-プロペン酸の物理化学的性状

物質名	分子量 (モライトビック質量)	比重 (g/cm ³)	沸点 (°C)	融点 (°C)	水溶解度 (mg/mL)	log P _{ow}
<i>trans</i> -3-クロロ -2-プロペン酸	106.51 (105.9822)	1.2288 (概算)	118.27 (概算)	82-85	57.6 (推定値)	0.80 (推定値)
<i>cis</i> -3-クロロ -2-プロペン酸	106.51 (105.9822)	1.2288 (概算)	118.27 (概算)	60-64	68.77 (推定値)	0.87 (推定値)

2.2 試薬等

trans-3-クロロ-2-プロペン酸：Acros Organics製（純度99 %）

cis-3-クロロ-2-プロペン酸：Acros Organics製（純度99 %）
1 mol/L酢酸アンモニウム溶液：HLPC用 富士フィルム和光純薬製

アセトニトリル，ギ酸：LC/MS用 富士フィルム和光純薬製

トルエン，アセトン：残留農薬・PCB試験用（濃縮5000）
富士フィルム和光純薬製

精製水：メルクミリポア製 Milli-Q Advantageにより調製

固相カートリッジ：シグマアルドリッチ製 Supelclean ENVI-Carb Plus, 400 mg, 1 mL, reversible tube

0.45 μmフィルター：メルクミリポア製 MILLEX-LCR 13 mm

2.3 LC-MS/MSの測定条件

[LC条件]

使用機種：Waters製 Alliance 2695

カラム：Waters XBridge Amide (150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm)

移動相：A：アセトニトリル

B：10 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液（pH 9.5）

（1 mol/L酢酸アンモニウム水溶液10 mLに精製水を加えて1 Lに定容した後，アンモニア水を加えてpHを調整したもの）

0→15 min A :99→70, B :1→30 linear gradient

15→15.1 min A :70→50, B :30→50 linear gradient

15.1→20 min A : B = 50 : 50

20→20.1 min A :50→99, B :50→1 linear gradient

20.1→40 min A : B = 99 : 1

流量：0.2 mL/min

カラム温度：40 °C

試料注入量：5 μL

[MS条件]

使用機種：Waters Quattro micro API

キャピラリー電圧：3 kV

ソース温度：100 °C

デソルベーション温度：500 °C

コーンガス量：50 L/h

デソルベーション流量：600 L/h

イオン化法：ESI-Negative

測定モード：SRM

コーン電圧：13 V

コリジョン電圧：7 eV

モニターイオン：m/z 104.9 > 34.9（定量用）

m/z 106.9 > 36.9（確認用）

2.4 混合標準溶液の調製

2.4.1 混合標準溶液の調製

trans-3-クロロ-2-プロペン酸10.0 mgをアセトニトリルで10 mLに定容し，1000 mg/Lのtrans体標準原液を調製した。cis-3-クロロ-2-プロペン酸についても同様の操作で，1000 mg/Lのcis体標準原液を調製した。

trans体標準原液，cis体標準原液を各1 mL分取し，アセトニトリルで10 mLに定容し，各100 mg/Lの混合標準溶液を調製した。

2.4.2 添加用標準液及び検量線用標準液の調製

混合標準溶液をアセトニトリルで段階的に希釈し，1 mg/L及び10 mg/Lの添加用標準液（添加回収試験，分解性スクリーニング試験等に使用）並びに2～200 μg/Lの検量線用標準液を調製した。

2.5 固相抽出の検討

2.5.1 固相溶出溶媒の検討

精製水10 mLに標準物質各0.01 μg，ギ酸20 μLを添加し，グラファイトカーボン固相カートリッジのENVI-Carb Plus（以下「固相カートリッジ」という。）に通水後，窒素を10分間通気（以下「窒素通気」という。）及びアセトン2 mLを通液（以下「アセトン通液」という。）して脱水した。これを組成を変えた6通りの溶媒で試料水の通液時とは逆の方向から通液して溶出（以下「バックフラッシュ溶出」という。）し，溶出液を窒素気流下で濃縮後，アセトニトリル1 mLに転溶し，回収率を比較した。

2.5.2 固相カートリッジのコンディショニング条件の検討

固相カートリッジを4通りの条件でコンディショニングした後，標準物質各0.01 μgを添加した精製水10 mLを通水した。窒素通気及びアセトン通液で脱水後，アセトニトリル/アセトン（4:6）10 mLでバックフラッシュ溶出し，溶出液を窒素気流下で濃縮した後，アセトニトリル1 mLで定容し，回収率を比較した。

2.5.3 pH調整条件の検討

精製水100 mLに標準物質各0.01 μgを添加し，ギ酸又は塩酸を用いてpHを計6通り調整して固相カートリッジに通水し，窒素通気及びアセトン通液で脱水後，アセトニトリル/アセトン（4:6）10 mLでバックフラッシュ溶出し，溶出液を窒素気流下で濃縮後，アセトニトリル1 mLで定容し，回収率を比較した。

2.5.4 最終液量の検討

マトリックス成分に起因する回収率の低下の有無を検討するため、海水（倉敷市水島沖で採水）100 mLに標準物質各0.01 µg、ギ酸200 µLを添加し、固相カートリッジに通水し、窒素通気及びアセトン通液で脱水後、アセトニトリル/アセトン（4:6）10 mLでバックフラッシュ溶出し、溶出液を窒素気流下で濃縮後、最終試験液1 mLとしてアセトニトリルで定容したものと、同じ最終試験液をアセトニトリルでそれぞれ10倍希釈したものについて、回収率を比較した。

2.6 前処理方法

採用した分析法のフローチャートを図2に示す。なお、対象物質は試験液に水が混入すると保持時間が短くなる性質があり、窒素通気及びアセトン通液による脱水で検討を進めていたが、アセトン通液による保持時間の差が認められなかったため、窒素通気のみ実施することとした。

水質試料100 mLにギ酸200 µLを添加した後、あらかじめトルエン10 mL、アセトン10 mL、精製水10 mLで順次コンディショニングした固相カートリッジに10 mL/minで通水した。通水後、固相カートリッジを精製水10 mLで洗浄し、窒素通気で脱水後、アセトニトリル/アセトン（4:6）10 mLでバックフラッシュ溶出した。溶出液を窒素気流下で1 mL程度まで濃縮してアセトンを除去し、アセトニトリルで10 mLに定容後、0.45 µmフィルターでろ過したものを試験液とした。

2.7 試料注入量の検討

海水又は河川水（笹ヶ瀬川の笹ヶ瀬橋で採水）100 mLに標準物質各0.02 µgを添加し、2.6に従い前処理を行ったものを測定試料とした。LC-MS/MSへの試料注入量を5

µL、10 µL、20 µLと変更し、回収率を比較した。

2.8 IDL, MDL及びMQLの算出

装置検出下限値（以下「IDL」という。）、分析法の検出下限値（以下「MDL」という。）及び定量下限値（以下「MQL」という。）の算出は、「化学物質環境汚染実態調査の手引き（平成27年度版）」²⁾に従った。IDLは、5 µg/Lの検量線用標準液を7回繰り返し測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。MDL及びMQLは、海水100 mLに、試料中濃度がIDL試料換算値の5倍程度に当たる0.5 µg/Lとなるように標準物質各0.05 µgを添加し、2.6に従い前処理を行ったものを7検体作製し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。

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

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

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

t(n-1, 0.05)：危険率5%，自由度n-1のt値（片側）

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

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

2.9 添加回収試験, 環境試料及び操作ブランクの分析

河川水100 mLに標準物質各0.1 µgを添加し、2.6に従い前処理して測定した。なお、海水はMDL試験の結果を添加回収試験結果として採用した。環境試料として、無添加の河川水及び海水を同様に前処理して測定し、その結果を添加回収試験の試料ブランクとし、また、操作ブランクとして、精製水100 mLを同様に前処理して測定した。

2.10 分解性スクリーニング試験及び保存性試験

試料中で対象物質の安定性を確認するため、手引き²⁾に従い7日間の分解性スクリーニング試験及び保存性試験を実施した。

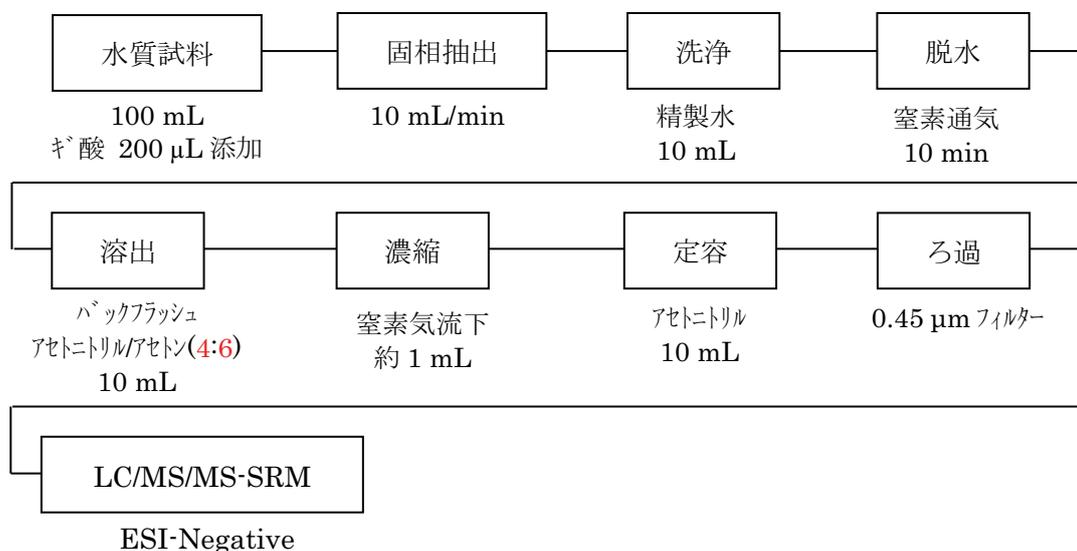


図2 分析法のフローチャート

分解性スクリーニング試験の試験液は、精製水のpHを5、7及び9に調整後、各100 mLに標準物質各10 µgを添加し、1時間後及び7日後（約20 °Cの明所及び暗所に保存）に精製水で100倍に希釈し、2.6に従い前処理して測定した。

保存性試験は、新鮮な河水水を用い、各1 µg/Lになるよう試料100mLに標準物質各0.1 µgを添加した後、分解の抑制のためのギ酸200 µLを添加したものと添加していないものの2種類を作製し、それぞれ冷暗所で1～7日間保存後、2.6に従い前処理して測定した。

また、抽出液（試験液）の保存性試験として、試験液濃度が各10 µg/Lになるよう試料100mLに標準物質各0.1 µgを添加し、2.6に従い前処理した試験液を測定した後、試験液を冷暗所で14日間保存し、当日の測定値と14日後の測定値を比較した。

併せて、検量線用標準液の保存性試験として10 µg/Lの検量線用標準液を冷暗所に保存し、1か月後に再調製し

た検量線用標準液と測定値を比較した。

3 結果及び考察

3.1 測定イオンの検討結果

cis-3-クロロ-2-プロペン酸のメタノール溶液をESI Negativeでインフュージョン測定したマススペクトルを図3に示す。³⁵Clの[M-H]⁻に相当するm/z 104.9とその同位体 (³⁷Cl) の[M-H]⁻のm/z 106.9が検出された。

次に、プレカーサーイオンm/z 104.9に対するプロダクトイオンのスペクトルを図4に示す。³⁵Cl⁻と考えられるm/z 34.9のみが検出された。同様にプレカーサーイオンm/z 106.9に対するプロダクトイオンは図5のとおり³⁷Cl⁻と考えられるm/z 36.9のみであり、また、trans-3-クロロ-2-プロペン酸のプレカーサーイオン、プロダクトイオンもcis体と同様であった。

このことから、測定イオンをm/z 104.9 > 34.9 (定量用)、m/z 106.9 > 36.9 (確認用)とした。

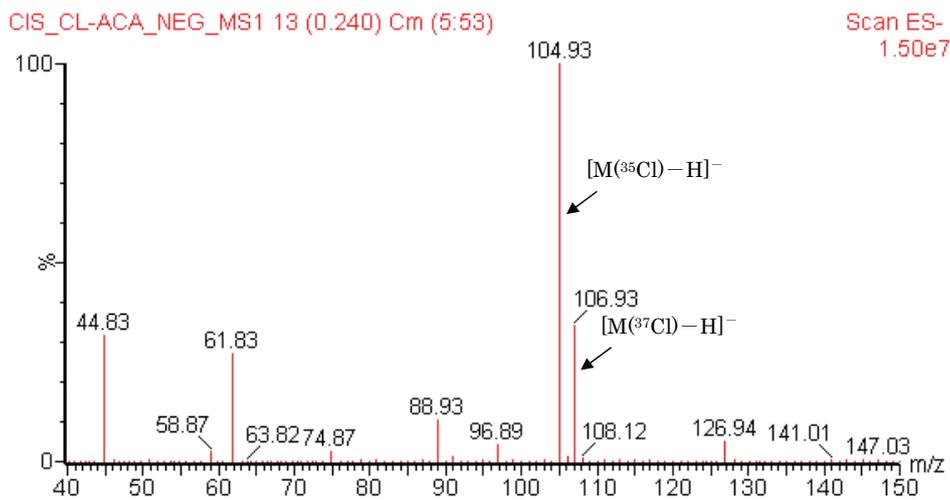


図3 cis-3-クロロ-2-プロペン酸のマススペクトル

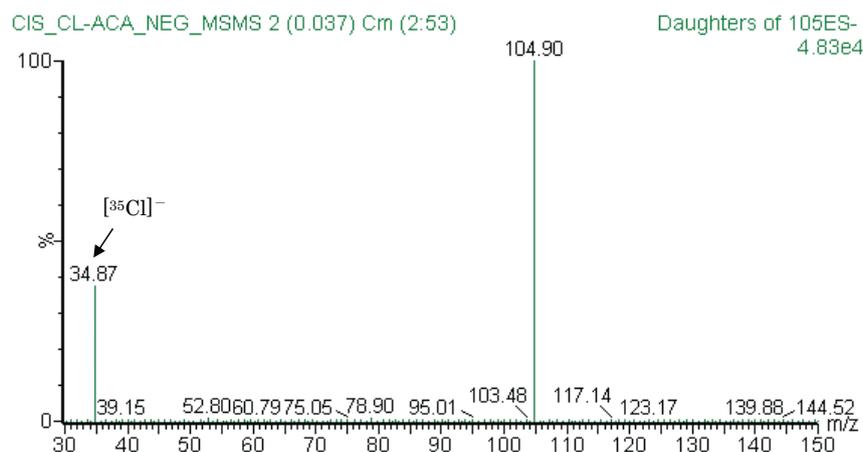


図4 プレカーサーイオンm/z 104.9に対するプロダクトイオン

3.2 測定カラム及び移動相の検討結果

対象物質は表1のとおり水溶解度が大きく $\log P_{ow}$ が小さく親水性の高いことから、一般に用いられているC18等の逆相系測定カラムでは測定が困難であり、逆逆相カラムであるAmideカラムを使用した。更に、水又はメタノールの割合が多くなるとカラムに保持しにくくなるため、移動相の初期条件をアセトニトリル：水溶液=99:1とすることで、十分な保持時間を得ることができ、異性体分離も可能であった。

また、逆逆相カラムの場合、目的物質をイオン化させた方が保持しやすくなることから移動相をアルカリ性にする事とし、アルカリ性でも使用できるXBridge Amideを使用し、水系移動相のpHを9.5とした。標準液のクロマトグラムを図6に示す。

3.3 検量線の測定結果

検量線を図7及び図8に示す。trans体及びcis体の低濃度域検量線及び高濃度域検量線のいずれも $r^2 > 0.999$ で良好な直線性があった。

3.4 固相抽出の検討結果

3.4.1 固相溶出溶媒の検討結果

溶媒ごとの回収率を表2に示す。アセトニトリル/アセトン (4:6) 10 mL溶出でほぼ100%の回収が可能であった。

3.4.2 固相カートリッジのコンディショニング条件の検討結果

コンディショニング条件ごとの回収率を表3に示す。トルエン10 mL, アセトン10 mL, 精製水10 mLの順にコンディショニングした場合にほぼ100%の回収率となった。なお、trans体において、他のコンディショニング条件では回収率が低くなった。

3.4.3 pH調整条件の検討結果

酸の種類及び添加量ごとの回収率を表4に示す。精製水100 mLにつきギ酸を200 μ L又は400 μ L加えてpH調整した場合に回収率が高く、塩酸でpH調整した場合は回収率が低くなった。なお、ギ酸添加量は400 μ Lで最も高い回収率が得られたが、200 μ Lでも十分な回収率が得られたので、ギ酸添加量は200 μ Lとした。

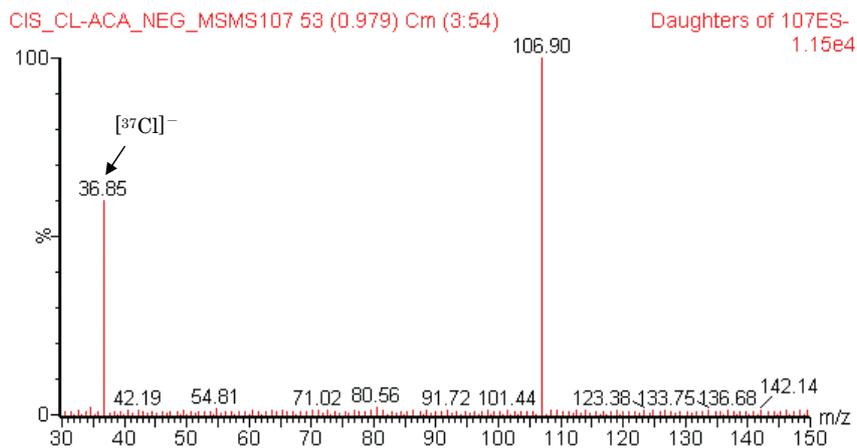


図5 プレカーサーイオン m/z 106.9に対するプロダクトイオン

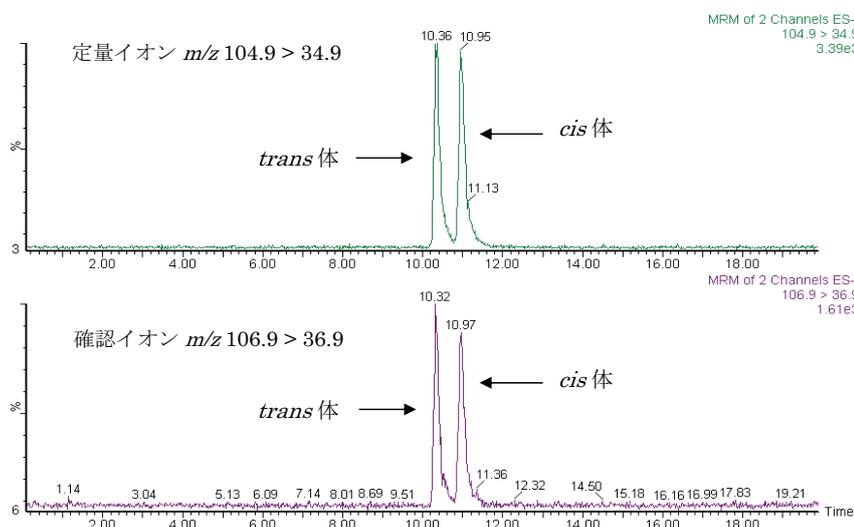


図6 標準液のクロマトグラム

3.4.4 最終液量の検討結果

表5の①及び②のとおり，最終液量を1 mLにすると回収率が低下し，値もばらつきが見られた。これに対し，アセトニトリルで希釈して最終液量10 mLにすると，表5

の③及び④のとおりマトリックスの影響を抑えることができ，回収率70%を確保できたので，最終液量は10 mLとした。

3.5 試料注入量の検討結果

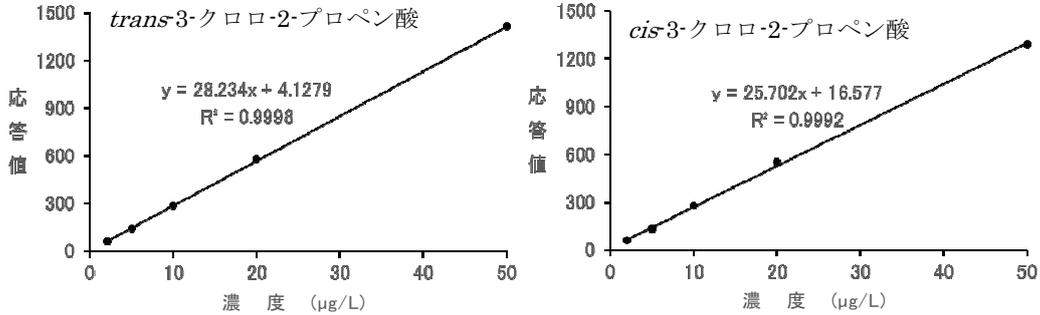


図7 低濃度域検量線

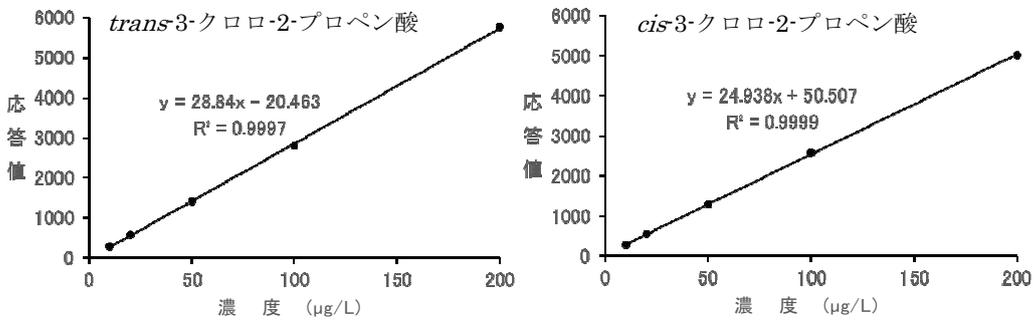


図8 高濃度域検量線

表2 溶出溶媒組成と回収率

溶媒組成	回収率(%)			
	0-10 mL		10-20 mL	
	<i>trans</i> 体	<i>cis</i> 体	<i>trans</i> 体	<i>cis</i> 体
アセトニトリル/アセトン(2:8)	58	58	-	-
アセトニトリル/アセトン(4:6)	104	100	1.5	1.0
アセトニトリル/アセトン(5:5)	81	90	5.8	7.9
アセトニトリル/アセトン(6:4)	96	91	5.5	2.5
トルエン/アセトン(2:8)	75	69	-	-
アセトニトリル	90	90	10	10

表3 コンディショニング条件と回収率

コンディショニング条件	回収率(%)	
	<i>trans</i> 体	<i>cis</i> 体
コンディショニングなし	28	60
アセトニトリル 10 mL + アセトン 10 mL + 精製水 10 mL	82	94
アセトニトリル 20 mL + アセトン 20 mL + 精製水 20 mL	87	116
トルエン 10 mL + アセトン 10 mL + 精製水 10 mL	98	103

試料注入量と回収率の関係を表6に示す。注入量が少ないほど回収率が高くなったので、試料注入量は5 µLとした。検出下限値を下げるためには試料注入量が多い方が有利であるが、注入量が多いほど回収率が低下しており、これはマトリックス成分によるイオン化抑制が原因と考えられた。

3.6 IDL, MDL及びMQLの算出結果

IDLを表7に、MDL及びMQLを表8に示す。IDL試料換算値はtrans体0.074 µg/L, cis体0.094 µg/L, MDLはtrans体0.10 µg/L, cis体0.12 µg/L, MQLはtrans体0.25 µg/L, cis体0.30 µg/Lであった。

3.7 添加回収試験及び環境試料分析結果

添加回収試験結果を表9に、環境試料及び添加回収試

料のクロマトグラムを図9～12に示す。海水の回収率はtrans体80%, cis体81%, 河川水の回収率はtrans体83%, cis体78%と良好な結果であった。無添加の河川水及び海水並びに操作ブランクからは、trans体, cis体ともに検出されなかった。

3.8 分解性スクリーニング試験

分解性スクリーニング試験結果を表10に示す。1時間後の残存率と7日後の残存率に差は確認されず、pH又は光による分解性は確認されなかった。

3.9 保存性試験結果

試料水の保存性試験結果を表11に示す。

ギ酸を添加していない試料水中では、trans体, cis体ともに7日間で残存率が10%未満まで分解していたが、ギ

表4 酸の種類・添加量と回収率

調整試薬	調整条件 (pH(添加量))	回収率(%)	
		trans 体	cis 体
	無調整	5.5	16
	pH 2.3 (400 µL)	95	83
ギ酸 (精製水 100 mL)	pH 2.4 (200 µL)	92	83
	pH 2.6 (100 µL)	83	73
	pH 1	19	59
塩酸 (精製水 100 mL)	pH 2	27	66
	pH 4	26	44

表5 海水試料における最終液量と回収率

海水試料 (100 mL)	回収率(%)		
	trans 体	cis 体	
最終液量 1 mL	①	52	31
	②	56	60
最終液量 10 mL	③	72	71
	④	75	72

表6 試料注入量と回収率

注入量 (µL)	回収率(%)			
	trans 体		cis 体	
	海水	河川水	海水	河川水
20	88	91	36	80
10	86	91	54	86
5	91	98	78	86

表7 IDLの算出結果

物質名	IDL (pg)	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	IDL試料換算値 (µg/L)
trans-3-クロロ-2-プロペン酸	3.7	100	10	0.074
cis-3-クロロ-2-プロペン酸	4.7	100	10	0.094

表8 MDL及びMQLの算出結果

物質名	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	MDL (µg/L)	MQL (µg/L)
trans-3-クロロ-2-プロペン酸	100	10	0.10	0.25
cis-3-クロロ-2-プロペン酸	100	10	0.12	0.30

酸を試料100 mLにつき200 μL添加することで、7日間保存可能であった。

本結果から、当日中に抽出操作ができない場合、抽出時に添加するギ酸（試料100 mLにつき200 μL）をあらかじめ添加すれば保存できることが分かった。

なお、表12に示すとおり、抽出液（試験液）及び検量線用標準液については、保存性の問題は確認されなかった。

表9 添加回収試験結果

物質名	試料	試料量 (mL)	添加量 (μg)	最終液量 (mL)	試験数	検出濃度 (μg/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
<i>trans</i> -3-クロロ-2-プロペン酸	海水	100	0	10	1	< 0.10	-	-
		100	0.05	10	7	0.40	80	7.8
	河川水	100	0	10	1	< 0.10	-	-
		100	0.1	10	5	0.83	83	6.9
<i>cis</i> -3-クロロ-2-プロペン酸	海水	100	0	10	1	< 0.12	-	-
		100	0.05	10	7	0.40	81	7.4
	河川水	100	0	10	1	< 0.12	-	-
		100	0.1	10	5	0.78	78	7.1

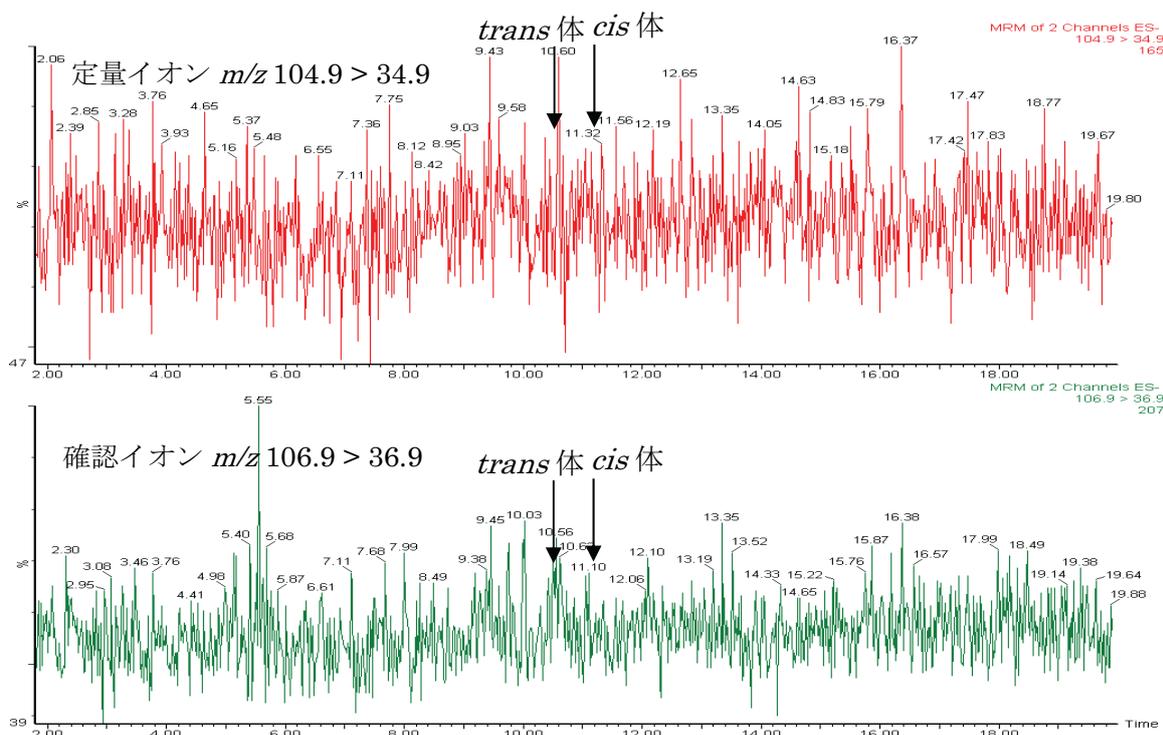


図9 無添加試料（海水）のSRMクロマトグラム

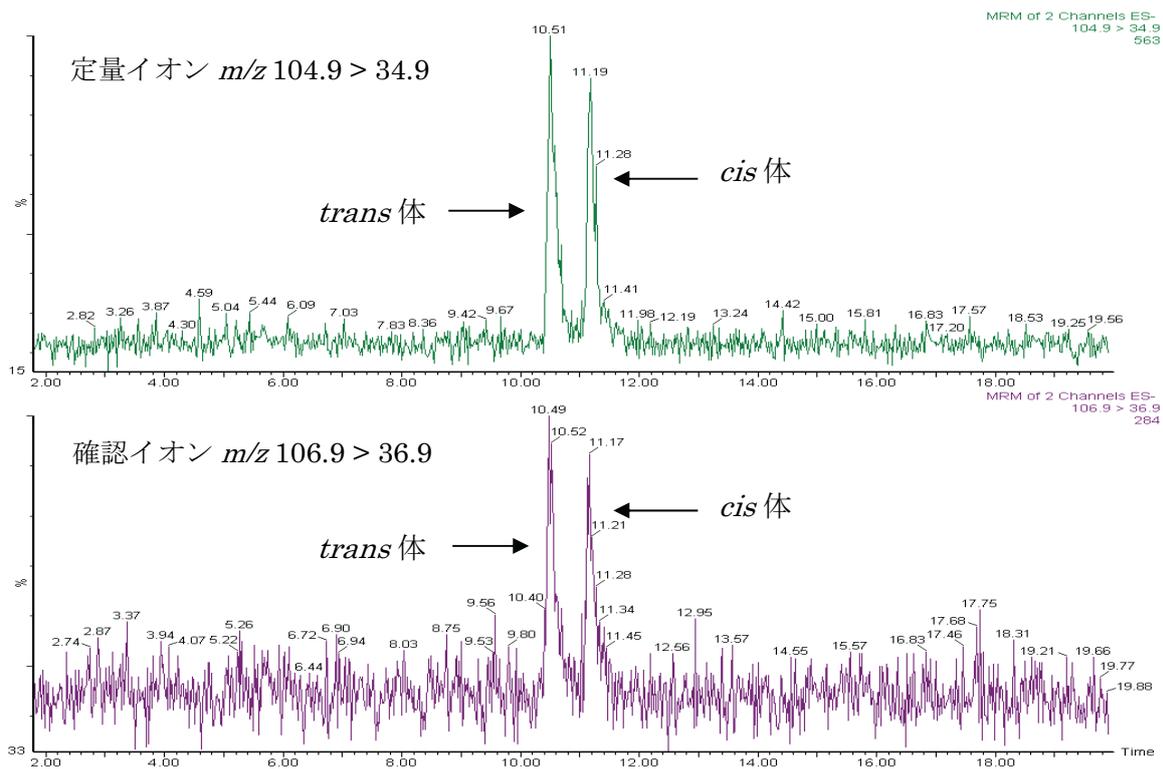


図10 添加試料 (海水) のSRMクロマトグラム

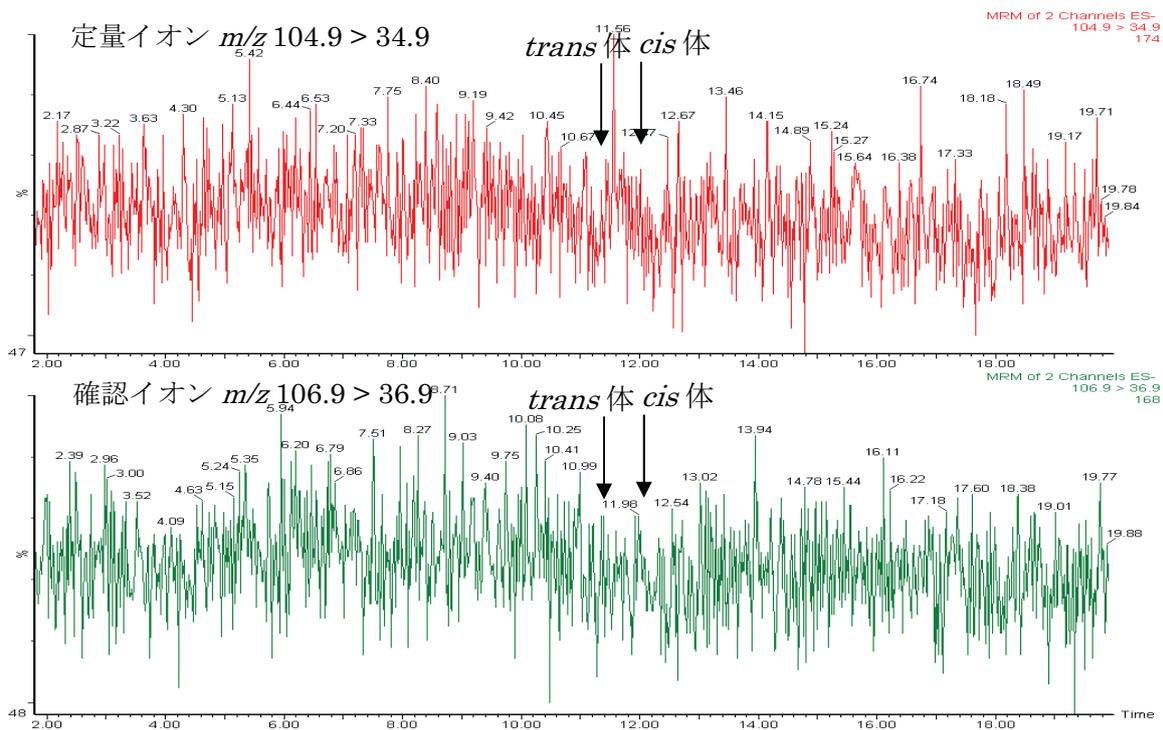


図11 無添加試料 (河川水) のSRMクロマトグラム

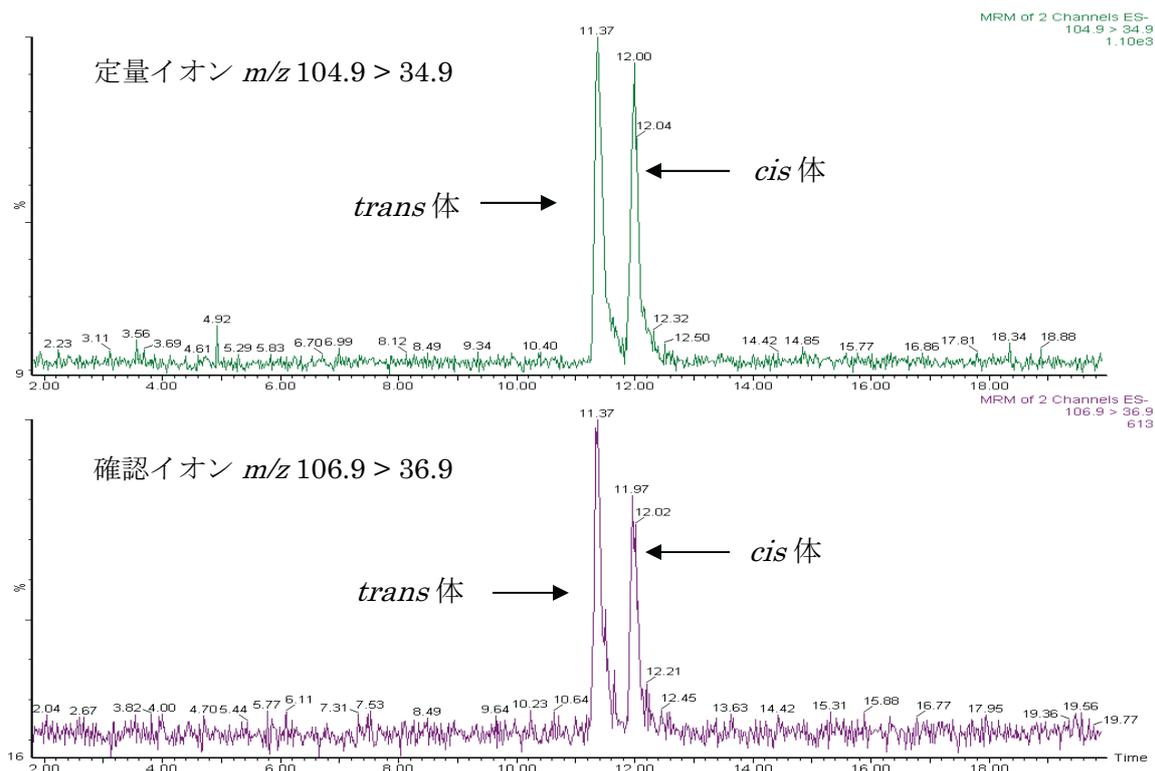


図12 添加試料（河川水）のSRMクロマトグラム

表10 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	精製水中の 調製濃度 ($\mu\text{g/L}$)	残存率(%)*		
			1 時間後	7 日後	
				暗所	明所
<i>trans</i> -3-クロロ-2- プロペン酸	5	100	87	87	-
	7	100	100	100	99
	9	100	96	95	-
<i>cis</i> -3-クロロ-2- プロペン酸	5	100	77	76	-
	7	100	88	88	86
	9	100	85	82	-

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

表11 保存性試験結果（試料水）

試料名	試験数	調製濃度 ($\mu\text{g/L}$)	残存率(%)*				
			1日間	3日間	7日間		
河川水 (100 mL)	無添加	<i>trans</i> 体	2	1.0	74	43	9
		<i>cis</i> 体	2	1.0	47	6	<2
	ギ酸添加 (200 μL)	<i>trans</i> 体	2	1.0	—	—	101
		<i>cis</i> 体	2	1.0	—	—	96

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

表12 保存性試験結果（抽出液及び標準液）

試料名	試験数	調製濃度 ($\mu\text{g/L}$)	残存率(%)*		
			14日間	1か月	
抽出液 (試験液)	<i>trans</i> 体	2	10	101	—
	<i>cis</i> 体	2	10	96	—
検量線用 標準液	<i>trans</i> 体	2	10	—	100
	<i>cis</i> 体	2	10	—	100

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

4 まとめ

3-クロロ-2-プロベン酸の分析法を検討し、次の結果を得た。

- (1) 親水性の高い物質であり、グラファイトカーボン固相カートリッジで抽出し、Amideカラムで測定する方法で、*trans*体及び*cis*体の分離分析ができた。
- (2) 最終液量1 mL又は注入量10 μL では回収率が低くなる傾向があったが、最終液量10 mLで注入量5 μL とすることにより、回収率70%以上の安定した回収率となった。
- (3) MDLは*trans*体0.10 $\mu\text{g/L}$ 、*cis*体0.12 $\mu\text{g/L}$ 、MQLは*trans*体0.25 $\mu\text{g/L}$ 、*cis*体0.30 $\mu\text{g/L}$ であった。
- (4) 添加回収試験の回収率は、海水で*trans*体80%、*cis*体81%、河川水で*trans*体83%、*cis*体78%と良好な結果であった。

(5) 精製水中でのpH又は光による分解性は、7日間確認されなかった。

(6) 試料水中での分解性が確認されたが、ギ酸を添加することで、7日間の保存が可能であった。

なお、本研究は環境省委託の平成27～30年度化学物質分析法開発調査（環境省環境安全課）と連携して実施した。

文 献

- 1) IPCS(1993)Environmental Health Criteria,146
- 2) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：化学物質環境実態調査実施の手引き（平成27年度版），2016

【調査研究】

事故時等緊急時の化学物質の分析技術の開発に関する研究
 - 3-ベンジリデンカンファールの水質分析法の検討 -

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

- Study of water quality analysis method of 3-benzylidene camphor -

大月史彦, 浦山豊弘, 山本浩司, 吉岡敏行 (水質科)

OTSUKI Fumihiko, URAYAMA Toyohiro, YAMAMOTO Koji, YOSHIOKA Toshiyuki (Water Section)

要 旨

環境試料(水質中)の3-ベンジリデンカンファールの分析法について検討した。分析法は固相カートリッジで濃縮後、固相を有機溶媒含有水、アルカリ、酸の順に洗浄した後、アセトニトリルで溶出し、LC-MS/MS (SRM法)で測定する方法とした。対象物質は紫外線吸収剤でもあり、光によるピークの減少が起るため、前処理時に注意が必要であった。開発した分析法では、要求感度を満足する検出下限値が得られ、回収率や保存性等の試験も良好であった。環境試料を分析したところ、3-ベンジリデンカンファールは検出されなかった。

[キーワード: 3-ベンジリデンカンファール, LC-MS/MS, 紫外線吸収剤]

[Key words: 3-Benzylidene camphor, LC-MS/MS, Ultraviolet absorber]

1 はじめに

3-ベンジリデンカンファールは紫外線を吸収する能力が高く、日焼け止めや化粧品に含有されているが、内分泌かく乱作用が疑われている物質でもあり、その環境中での実態はよくわかっていない。今回、当該物質が環境省の実施する化学物質環境実態調査の調査対象物質に選定され、岡山県に分析法の開発が委託されたことから、当該物質をLC-MS/MSを用いて分析する方法を検討するとともに、環境試料の濃度レベルを測定したので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

3-ベンジリデンカンファール: SIGMA-ALDRICH製

(analytical standard, $\geq 97.0\%$ (GC))

1 mol/L塩酸: 富士フィルム和光純薬製

1 mol/L水酸化ナトリウム: 富士フィルム和光純薬製

アセトニトリル, メタノール: 富士フィルム和光純薬製

LC/MS用

精製水: ミリポア製 Milli-Q Advantageにより調製

固相カートリッジ: Waters製 Oasis HLB Plus LP (225 mg)

固相カートリッジ: GL Sciences製 InertSep PLS-3 (200 mg)

ろ過フィルター: ミリポア製 Millex FilterUnit (13mm,

0.45 μ m)

5 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液: 富士フィルム和光純薬製高速液体クロマトグラフ用

1 mol/L酢酸アンモニウム水溶液と精製水で調製

2.2 LC/MSの測定条件

LC/MSの測定条件を次に示す。

(LC条件)

カラム: Atlantis T3 150 mm \times 2.1 mm, 3 μ m (Waters製)

移動相: A (5 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液): B (アセトニトリル)

0 ~ 0.1 min A : B = 80 : 20

0.1 ~ 9 min A : 80 \rightarrow 2 B : 20 \rightarrow 98 linear gradient

9 ~ 20 min A : B = 2 : 98

20 ~ 20.5 min A : 2 \rightarrow 80 B : 98 \rightarrow 20 linear gradient

20.5 ~ 33 min A : B = 80 : 20

流量: 0.2 mL/min

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

注入量: 10 μ L

(MS条件)

使用機種: Micromass Quattro micro API (Waters製)

キャピラリー電圧 : 3.0 kV

ソース温度 : 100 $^{\circ}$ C

デゾルベーション温度：500℃
 コーンガス流量：50 L/h
 デゾルベーションガス流量：600 L/h
 イオン化法：ESI Positive
 測定モード：SRM
 コーン電圧：30 V
 コリジョンエネルギー：10 eV (241.2>241.2のみ), 20 eV (それ以外)

モニターイオン(m/z)：241.2>241.2, 241.2>223.2,
 241.2>213.2, 241.2>198.1,
 241.2>181.1, 241.2>171.1,
 241.2>157.1, 241.2>143.1,
 241.2>131.1, 241.2>111.1,
 241.2>105.1, 241.2>97.1
 (本分析では, 241.2>198.1を定量に使用)

2.3 分析法

分析法は、既報^{1)~5)}を基に、図1のフローチャートで示す方法とした。

あらかじめアセトニトリル10 mL, 精製水10 mLの順でコンディショニングした固相カートリッジに水質試料100 mLを10 mL/minの速さで通水し、捕集する。固相カートリッジを精製水10 mL (使用器具を洗込), 40%アセトニトリル水溶液5 mL (同洗込), 精製水5 mL (同洗込), 30%アセトニトリル含有0.01 mol/L水酸化ナトリウム5 mL, 精製水5 mL, 30%アセトニトリル含有0.01 mol/L塩酸5 mL, 精製水5 mLの順に洗浄し、窒素窒素を5分間通気する。これをアセトニトリル5 mLで溶出し、窒素気流下で0.4 mL程度まで濃縮し、アセトニトリルで1 mLに定容し、試験液とする。なお、懸濁物がある場合にはフィルターでろ過を行い、試験液とする。試験液をLC-MS/MS-SRMにて分析する。

対象物質は、光に対して分解性(異性体化)があるため、操作はなるべく手早く暗めの部屋で行う。暗室を使用す

る必要はないが、ブラインドを下ろし、直射日光を避ける、必要以上の蛍光灯は点灯しない等の配慮が必要である。目安として、照度500 lux未満で1~2時間程度の作業の場合は著しい分解は生じない。

2.4 装置検出下限値(IDL), 分析法検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)

IDL, MDL及びMQLの算出は、「化学物質環境汚染実態調査の手引き(平成27年度版)」⁶⁾(以下「手引き」という。)に従った。IDLは、5 ng/mLの検量線用標準液を7回測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。MDL及びMQLは、河川水(霞橋)に、IDL試料換算値の5倍程度の濃度となるように1 µg/mL標準液を10 µL添加し、分析フローに従い前処理を行ったものを7個作製して測定し、得られた測定値の標準偏差を用いて算出した。

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

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

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

t(n-1,0.05)：危険率5%, 自由度n-1のt値(片側)

$\sigma_{n-1,I}$ ：IDL算出のための測定値の標本標準偏差

$\sigma_{n-1,M}$ ：MDL算出のための測定値の標本標準偏差

2.5 分解性スクリーニング試験, 保存性試験(新鮮試料及び粗抽出液), 添加回収試験

手引きに従い、分解性スクリーニング試験, 保存性試験及び添加回収試験を実施した。

分解性スクリーニング試験の試験液は精製水を用いてpH 5, pH 7及びpH 9のものを各100 mL作製し、これにMDL試料換算値の30倍程度の濃度となるように1 µg/mLの標準液を100 µL添加し、1時間後及び14日後(約20℃の明所及び暗所に保存)に分析フローに従い前処理を行ったものを測定した。光照射による分解性が確認されたため、照射時間を変更して同様の測定を実施した。

保存性試験は、新鮮な河川水(高梁川水系の霞橋で採水)及び海水(倉敷市水島地先海域で採水)を満水に入れ、

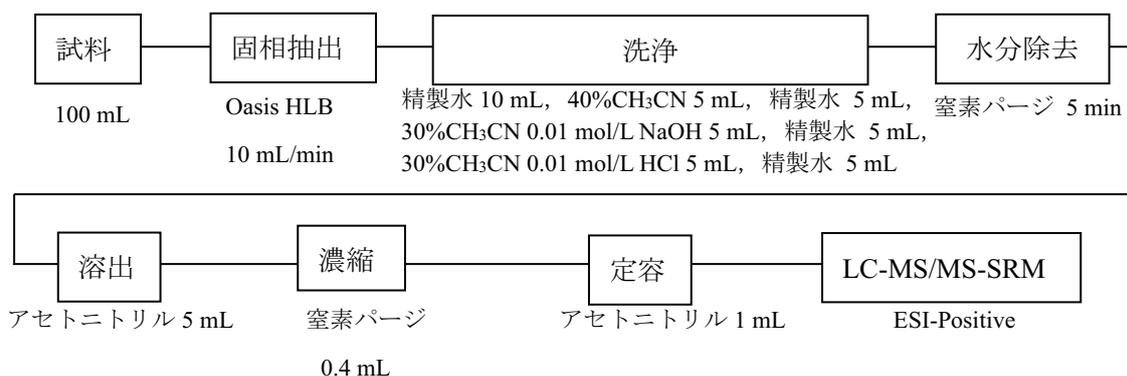


図1 分析法のフローチャート

対象物質の濃度がMDL試料換算値の10倍程度の300 ng/Lになるように1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準液を添加し、当日及び8日後（約4 $^{\circ}\text{C}$ の冷暗所に保存）に分析フローに従い前処理後に測定した。

また、併せて粗抽出液による保存試験も実施した。これは、河川水（霞橋）及び海水（水島地先海域）を固相カートリッジ通水からアセトニトリルで溶出するまで前処理したものに、対象物質の濃度がMDL試料換算値の10倍程度の300 ng/Lになるように1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準液を添加し、当日及び15日後（約4 $^{\circ}\text{C}$ の冷暗所に保存）に以降の前処理を分析フローに従って実施した後に測定したもので、抽出後の有機溶媒中における保存性が確認できる。

標準溶液の保存性試験として最高濃度の100 ng/mL及びMDLの10倍程度の20 ng/mLの検量線用標準液を33日間約4 $^{\circ}\text{C}$ の冷暗所に保存し、33日後に新たに再調製した検量線用標準液と測定結果を比較した。

添加回収試験として海水（水島地先海域）100 mLにMDL試料換算値の30倍程度の濃度となるように1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準液を100 μL 添加し、分析フローに従い前処理

を行ったものを測定した。環境試料として、無添加の河川水及び海水も分析した。河川水はMDL試験の結果を添加回収試験結果として採用した。

また、操作ブランクとして精製水100 mLを分析フローに従い前処理を行ったものを測定した。

3 結果及び考察

3.1 各種条件の検討結果

3.1.1 質量分析条件の検討

MS条件の検討を行った結果を以下の図2-1、2-2に示す。3-ベンジリデンカンファーは、プレカーサーイオンとして水素が付加した m/z 241のイオンができ、更にそのプロダクトイオンとして12種類のイオンが生じた。

図3に最低濃度（5 ng/mL）の標準液のクロマトグラムを示す。イオンは代表例を6つと12イオンのTICを示している。選択するイオンによっては近接ピーク等に注意が必要なことがわかった。

12種類のイオンを測定に用いることができ、感度、ブランク、ばらつき等を考慮して、最適なイオンを選択す

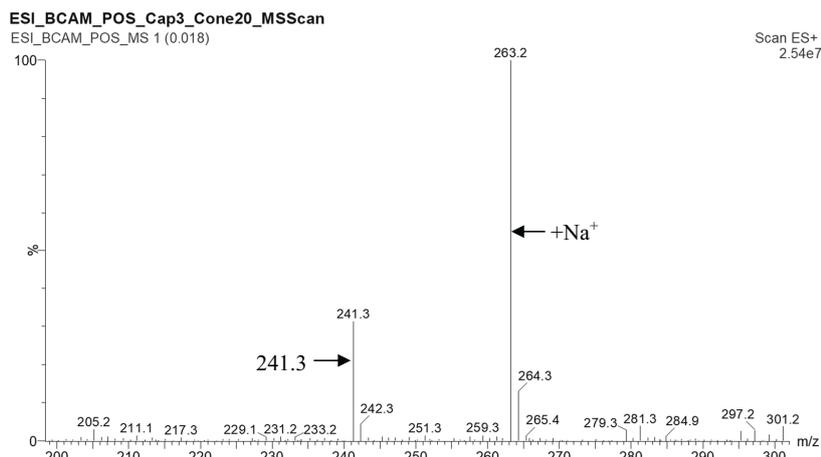


図2-1 3-ベンジリデンカンファー（プレカーサーイオン）のマススペクトル

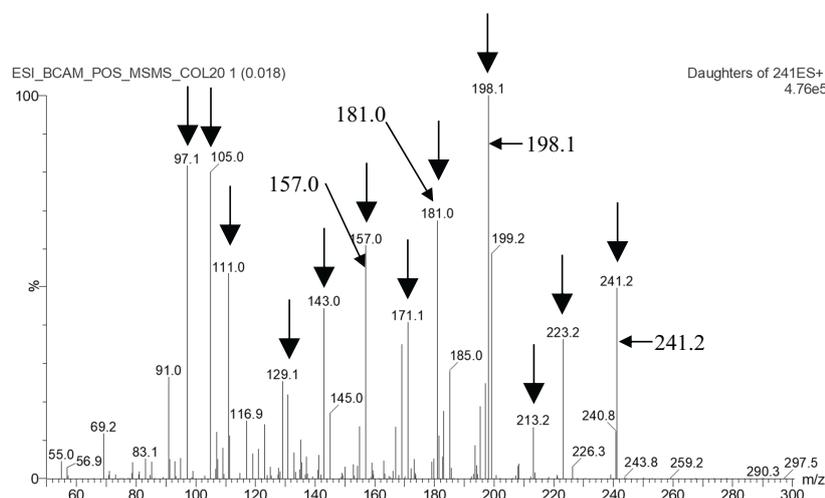


図2-2 プレカーサー m/z 241に対するプロダクトイオンのマススペクトル

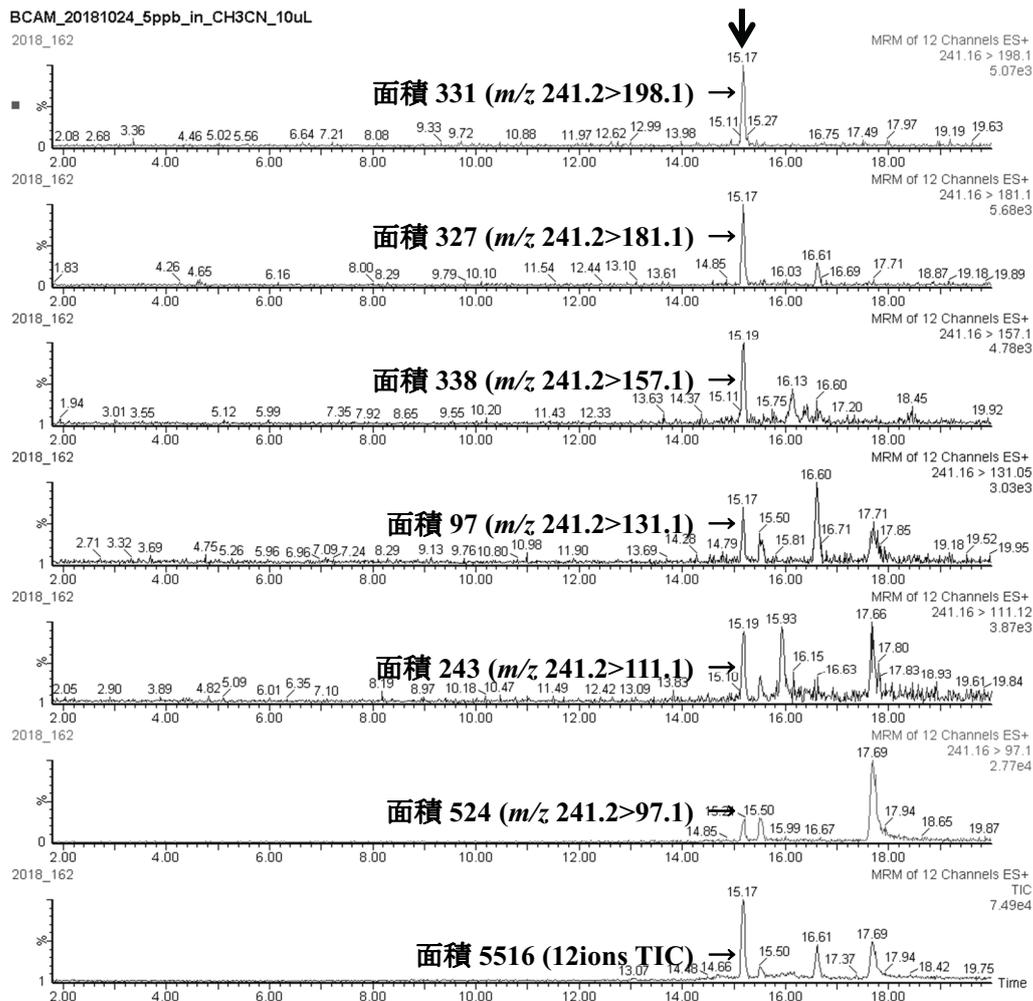


図3 3-ベンジリデンカンファアの代表的なイオンのクロマトグラム

ることが可能であった。本分析においては、241.2>198.1が感度も高く、ブランク等を考慮して良好であったため定量に用いた。

3.1.2 前処理法の検討

前処理法の検討を行った。各種の評価を実施し、次のようなことがわかった。

- ①固相カートリッジのHLBとPLS-3で比較したところ同程度の回収率であったが、HLBの方が通水時の抵抗が少なく操作が容易であった。
- ②夾雑物除去のため、酸やアルカリで洗浄しても、良好な回収率が得られた。
- ③HLBからの溶出時に、アセトニトリル濃度を順に変更した積み上げ回収率の結果を図4に示す。50%アセトニトリルでわずかに溶出が見られたため、40%アセトニトリルで洗浄することとした。40%アセトニトリルまでは保持され、同溶媒による洗浄が可能であった。

これらの結果を基に、前処理法を決定した。

3.2 分解性スクリーニング試験結果

分解性スクリーニング試験結果を表1に示す。pHに対しては安定性が高いが、光で残存率が低下した。

光照射時間を変更したクロマトグラム結果を図5-1～図5-5に、また照射時間による濃度減少のグラフを図5-6にそれぞれ示す。

光を照射し始めてすぐに3-ベンジリデンカンファアの濃度が減少し、同一イオンを持ち保持時間の異なる物質のピークが増加し始めるが、この増減は8時間程度で止

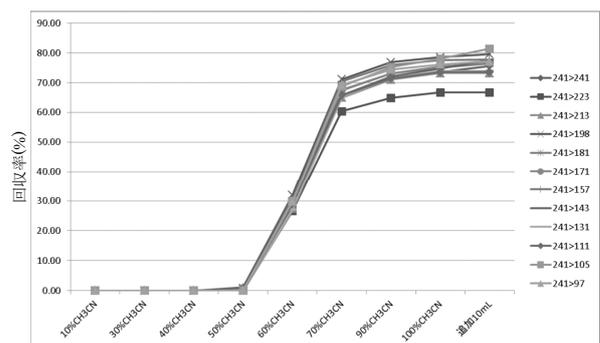


図4 HLB使用時の積み上げ回収率

まった。十分長時間（概ね8時間）光を照射すると、3-ベンジリデンカンファーと生成物の比は、一定の割合となった後に安定し、その後光照射を継続しても変化しなかった。14日光照射を継続しても、8時間照射時の濃度とほぼ同程度であった。これらの結果から、光に対して分解性（光による構造異性体化）があると考えられる。

3.3 保存性試験結果

保存性試験結果を表2に示す。各種保存性は良好であった。標準液は暗所、冷蔵の有機溶媒中で1か月以上安定である。また、暗所、冷蔵の河川水や海水中では1週間以上

安定に保存された。更に、河川水や海水をアセトニトリルに抽出した粗抽出液中（暗所、冷蔵）では2週間以上安定に保存された。

3.4 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表3に示す。添加回収試験には河川水（霞橋）及び海水（水島地先海域）をそれぞれ水質試験料として使用した。河川水、海水ともに良好な添加回収試験結果が得られた。

3.5 環境試料の分析結果

平成30年11月に採取した河川水（霞橋）及び海水（水

表1 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験数	調製濃度 ($\mu\text{g/L}$)	1時間後の 残存率(%) [*]	14日後の残存率(%) [*]	
					暗所	明所
3-ベンジリデンカンファー	5	2	1.0	0.90(90)	0.91(91)	-
	7	2	1.0	0.92(92)	0.89(89)	0.47(47)
	9	2	1.0	0.96(96)	0.95(95)	-

* 各残存率は、調製濃度に対する検出濃度の割合。

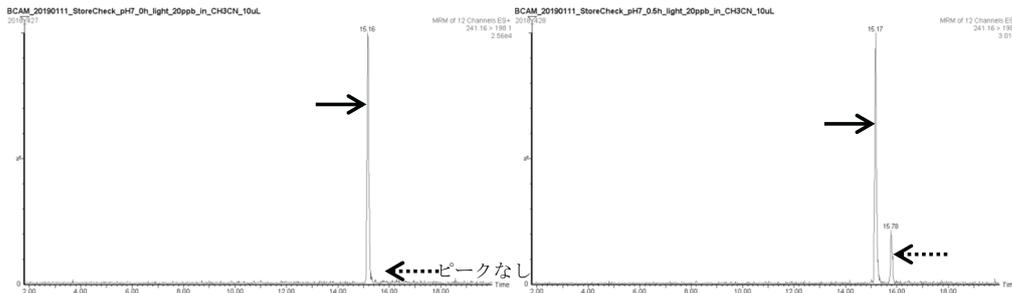


図5-1 光照射前のクロマトグラム

図5-2 光照射（0.5時間）後のクロマトグラム

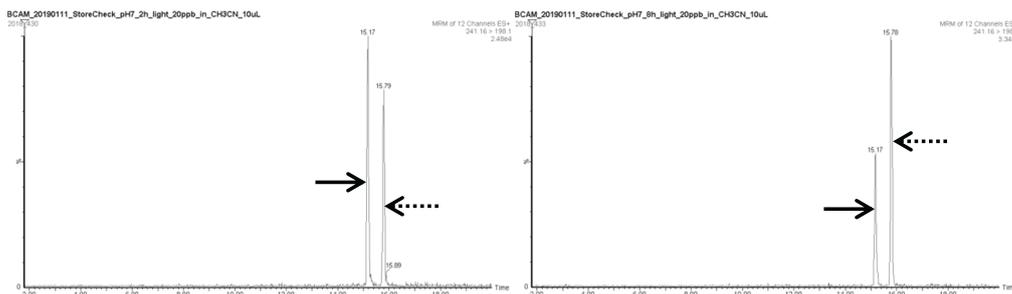


図5-3 光照射（2時間）後のクロマトグラム

図5-4 光照射（8時間）後のクロマトグラム

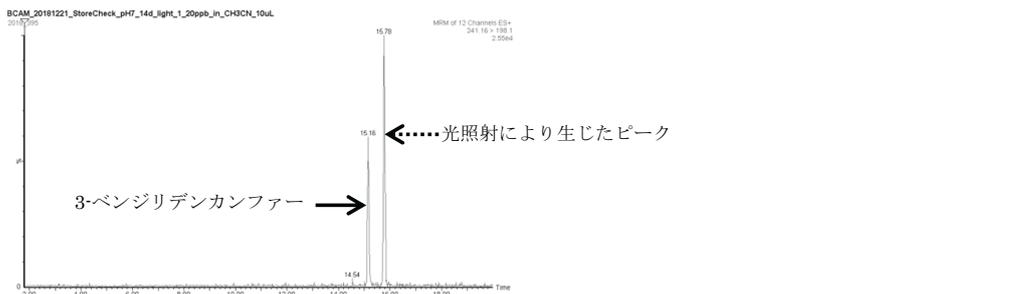


図5-5 光照射（14日）後のクロマトグラム

島地先海域)からは、対象物質は検出されなかった。装置検出下限値 (IDL), 分析法検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL) はそれぞれ試料換算値で 0.015 $\mu\text{g/L}$, 0.023 $\mu\text{g/L}$ 及び0.059 $\mu\text{g/L}$ であった。

4 まとめ

3-ベンジリデンカンファアの分析法を検討し、次の結果を得た。

(1) 対象物質はESI Positive モードでイオン化され、LC-

MS/MS (SRM) 法による測定が有効であった。12種類のイオンを測定に用いることができ、感度やブランク、ばらつき等を考慮して、最適なイオンを選択することができた。

(2) 移動相溶媒に酢酸アンモニウム/アセトニトリルを用いた測定で、良好な感度と装置安定性等を得ることができた。

(3) 固相抽出による前処理方法を検討し、有機溶媒含有水、アルカリ、酸の順に洗浄することで、クリーンナップ

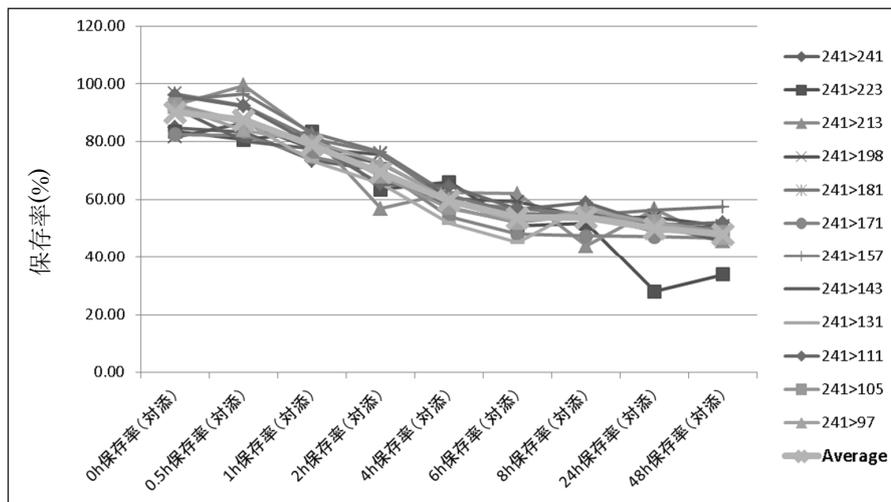


図5-6光照射時間による濃度減少 (保存率は、添加濃度を100%とした値) (対添は、添加濃度に対する各経過時間における保存率を示す。)

表2 保存性試験結果

物質名	試験対象	試料名	調製濃度 ($\mu\text{g/L}$)	残存率(%)*			
				当日	8日後	15日後	33日後
3-ベンジ リデンカン ファア	新鮮試料	河川水	0.30	27.3(91)	27.5(92)	—	—
		海水	0.30	24.5(82)	27.1(90)	—	—
	粗抽出液	河川水	30	28.1(94)	—	30.2(101)	—
		海水	30	27.5(92)	—	30.3(101)	—
標準液	標準液(低)	20	20.6(103)	—	—	20.5(102)	
	標準液(高)	100	96.6(97)	—	—	100(100)	

* 各残存率は、調製濃度に対する検出濃度の割合。

表3 添加回収試験結果

物質名	試料名	試料量 (mL)	添加量 (μg)	試験数	検出 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	回収率 (%)	変動 係数 (%)
3-ベンジ リ デンカン ファア	河川水	100	0	1	<0.023	—	—
		100	0.010	7	0.078	78	7.6
	海水	100	0	1	<0.023	—	—
		100	0.10	5	0.77	77	4.0

- 効果を持たせつつ、良好な回収率が得られた。
- (4) モニターイオンによっては妨害があることから、複数のイオンをモニターする等の注意が必要であった。
 - (5) 添加回収試験結果は、河川水及び海水ともに良好であった。
 - (6) 分解性スクリーニング試験結果は、pHに対しては安定性が高いが、光照射でピークの減少が生じた。
 - (7) 保存性試験の結果、保存性は良好であった。
 - (8) 河川水（霞橋）及び海水（水島地先海域）から、対象物質は検出されなかった。

なお、本研究は環境省委託の平成30年度化学物質分析法開発調査（環境省環境安全課）と連携して実施した。

文 献

- 1) 宮本道子, 中村義昭, 横山敏郎, 伊藤弘一, 寺島 潔ら：医薬部外品および化粧品中の紫外線吸収剤の分析に関する研究（第2報）ビスエチルヘキシルオキシフェノールメトキシフェニルトリアジン, ホモサレートおよびメチルベンジリデンカンファを含む17成分同時分析法, 東京都健康安全研究センター研究年報, 60, 97-102, 2009
- 2) 松本比佐志, 足立伸一, 鈴木定彦：紫外線吸収剤及びその関連化合物によるエストロゲン様作用, 薬学雑誌, 125(8), 643-652, 2005
- 3) Agilent technologies, Inc. Application Note : Agilent 1290 Infinity LC with Agilent Poroshell columns for simultaneous determination of eight organic UV filters in under two minutes, Publication Number 5990-6861EN, 2010 December 1, 2010
- 4) 横山敏郎, 森謙一郎, 中村義昭, 寺島 潔, 大貫奈穂美ら：医薬部外品及び化粧品中の紫外線吸収剤同時分析法についての改良, 東京都健康安全研究センター研究年報, 57, 145-150, 2006
- 5) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：平成24年度化学物質分析法開発調査報告書（4-メチルベンジリデンカンファー, 水質, 岡山県環境保健センター）, 578-624, 2013
- 6) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：化学物質環境実態調査実施の手引き（平成27年度版）, 2016

【調査研究】

児島湖隣接区域（北七区）における汚濁負荷量調査 Estimation of Pollution Load from an Area Adjacent to Lake Kojima (Kita Nanaku)

藤田和男, 小川知也, 吉岡敏行（水質科）

FUJITA Kazuo, OGAWA Tomoya, YOSHIOKA Toshiyuki (Water Section)

要 旨

児島湖に隣接する岡山市南区北七区（水質保全に係る流出水対策地区）において、水田から流出する汚濁負荷量の調査を行った。フーリエ級数により10年間の水質の季節変動が概ね再現された。北七区の正味の排出負荷量の平均値は、CODが117 kg/ha/年、全窒素が16 kg/ha/年、全りんが4.6 kg/ha/年であった。10年間の流入負荷量と排出負荷量はCOD、全窒素及び全りんのいずれも夏期に大きく冬期に小さく、長期的な変化は小さく、一定のパターンで推移する傾向が見られた。

[キーワード：COD, 窒素, リン, 汚濁負荷量]

[Key words : COD, Nitrogen, Phosphorus , Pollution loading amount]

1 はじめに

児島湖の水質汚濁については、湖沼水質保全計画等に基づき、過去33年間にわたり様々な水質保全施策を実施してきたが、未だ環境基準は達成されておらず、更なる水質改善が課題となっている。

平成29年3月には「児島湖に係る第7期湖沼水質保全計画」が策定され、水質汚濁メカニズムの解明に向けた様々な調査研究の推進が盛り込まれている。

本報では、流出水対策地区に指定されている岡山市南区北七区（以下「北七区」という。）の農地に起因する汚濁負荷量の実態等を解明することを目的とし、当地区の10年間のCOD、窒素及びリンの物質収支等について調査、解析を行うとともに、調査結果に基づき、CODや窒素、リン等の汚濁物質の物質収支のシミュレーション計算を行った。

月までの10年間、月1回現地測定及び採水を行った。現地では気温と水温を測定した。降雨の水質については平成24年度に北七区から約5 kmの地点にある岡山県環境保健センター屋上に採水器（口径30 cmのろうとで容量10 Lの容器に捕集するもの）を設置して採取（33回）し、毎月に水質の平均値を求めた。

2 材料及び方法

2.1 調査対象地点及び調査方法

北七区は図1に示すとおり児島湖に隣接する区域で、面積4.64 km²の73 %が農地¹⁾で、その大部分が水田である。北七区への流入水は用水と排水で、用水は地点1（5号排水機場）に流入する倉敷川河川水と、地点2（北十条用水路）に七区用排水機場から隣接する西七区を經由して流入する倉敷川河川水である。排水は西七区の農業排水が地点3（七区小学校前）から流入する。排水は地点4（七区排水機場）から児島湖に排出される（以下、「排水水」という）。この4地点において、調査期間は平成19年4月～平成29年3

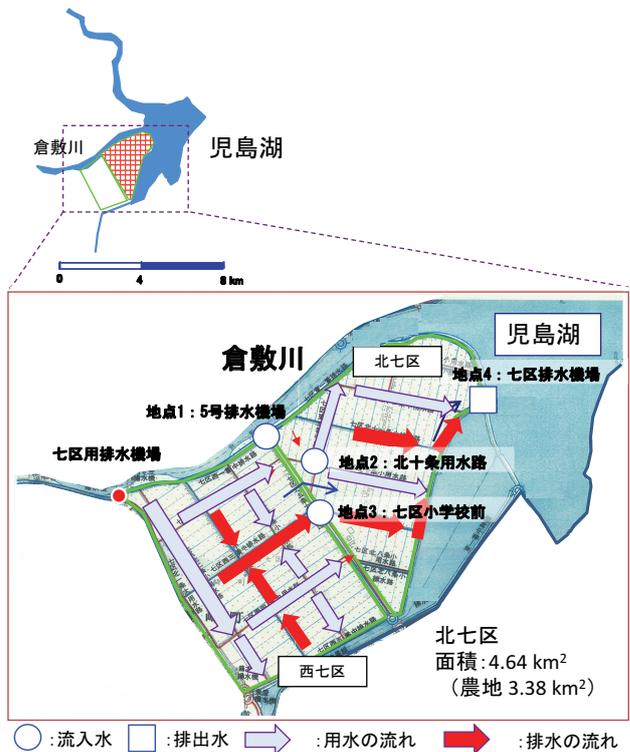


図1 調査地点

採取した検体についてCOD, 全窒素及び全りんを測定した。COD, 全窒素及び全りんはJIS K0102 (工場排水試験法)²⁾ に準じて測定した。地点1の用水量は現地調査結果 (平成23年度130回/年, 平成21～22年度及び平成24～28年度1～2回/月) と地点1の樋門開門時間調査結果 (6～10月は10.5時間/日, 11～5月は10時間/日) に基づき推計¹⁾ した。地点2の用水量は七区用排水機場のポンプ稼働時間から西七区と北七区への用水量の総量を求め, 西七区と北七区の用水の比率の調査結果から北七区への用水量を推計¹⁾ した。地点3の水量は西七区からの排水量で, 七区用排水機場による西七区への用水量に西七区の降水量¹⁾ を加え西七区の蒸発散量を引いた値¹⁾ とした。地点4の排出水量は地点1～3の流入水量に北七区の降水量¹⁾ を加え北七区の蒸発散量を引いた値¹⁾ とした。降水量, 蒸発散量についても文献値¹⁾ を用いた。

2.2 負荷量の算出方法

各地点の水質 (COD, 全窒素, 全りん) は年度毎に似た増減を繰り返す傾向が見られることから, 年間の変動の様子を周期的なパターンの解析に用いられるフーリエ級数³⁾ により近似した。

$$C = a_0 + \sum_n (c_1 + c_2) e^{i\theta} \quad (1)$$

ここでC: 水質 (COD, 全窒素又は全りん (mg/L)), a_0 , c_1 及び c_2 : 係数 (mg/L), n : 次数, i : 虚数単位, θ : $2\pi nt$, t : 時間 (year) である。次数 n が1の場合は $Y = a_0 + (c_1 + c_2 i) e^{i\theta}$ である。

また年度毎の最大値や最小値の長期的な変化は一般的に用いられる指数関数 e^θ による関数で近似した。最大値は $c_3 \cdot e^{c_5 \theta}$, 最小値は $c_4 \cdot e^{c_6 \theta}$, ここで $c_3 \sim c_4$: 係数 (mg/L) である。上述のように次数 n が1の場合には, 平均値は最大値と最小値の平均であり以下の式で表される。

$$C = (c_3 \cdot e^{c_5 \theta} + c_4 \cdot e^{c_6 \theta}) / 2 \quad (2)$$

振幅は, 最大値と最小値の差から以下の式で表される。

$$C = (c_3 \cdot e^{c_5 \theta} - c_4 \cdot e^{c_6 \theta}) / 2 \quad (3)$$

長期的 (10年間) な平均値が式 (2), 最大値と最小値が式 (3) で表され, 1年間の短期的な変動パターンが式 (1) に基づいて推移するモデルは, 式 (1) の右辺第1項 a_0 に式 (2) を代入し, 式 (1) の右辺第2項に式 (3) を掛ける以下の式で表される。

$$C = (c_3 \cdot e^{c_5 \theta} + c_4 \cdot e^{c_6 \theta}) / 2 + (c_3 \cdot e^{c_5 \theta} - c_4 \cdot e^{c_6 \theta}) / 2 \cdot \sum_n (c_1 + c_2) e^{i\theta} \quad (4)$$

水量も水質と同様に以下の近似式で表した。

$$Q = (c_9 \cdot e^{c_{11} \theta} + c_{10} \cdot e^{c_{12} \theta}) / 2 + (c_9 \cdot e^{c_{11} \theta} - c_{10} \cdot e^{c_{12} \theta}) / 2 \cdot \sum_n (c_7 + c_8) e^{i\theta} \quad (4)'$$

ここでQ: 水量 (m^3 /月), $c_9 \sim c_{10}$: 係数(m^3 /月)である。

負荷量は, 式 (4) の水質Cに式 (4)'の水量Qを乗じた以下の式により推算した。

$$L = C \cdot Q \times 10^3 \quad (5)$$

ここでL: 負荷量 (COD, 全窒素又は全りん (kg/月)) である。

各地点の水質と水量から各地点の負荷量を計算した。負荷量は, 排出負荷量, 正味の排出負荷量, 差し引き負荷量に分類される^{2,4)}。以下では, 地点1から地点4の負荷量を $L1 \sim L4$, 降水負荷量を L_{rain} とし, 地点4の負荷量($L4$)は, 北七区から児島湖へ排出される負荷量であり排出負荷量とした。地点4の負荷量 ($L4$) から北七区へ流入する負荷量 ($L1 + L2 + L3$) を引いた値を正味の排出負荷量とした。正味の排出負荷量から降水負荷量を引いた値を差し引き負荷量とした。これらを式で表すと次のようになる⁴⁾。

$$[\text{正味の排出負荷量}] = L_4 - (L_1 + L_2 + L_3) \quad (6)$$

$$[\text{差し引き負荷量}] = [\text{正味の排出負荷量}] - [\text{降水負荷量}] \\ = L_4 - (L_1 + L_2 + L_3) - L_{rain} \quad (7)$$

なお, 一般に議論されている水田の原単位は, 正味の排出負荷量を水田の単位面積当たりにした値⁴⁾ である。

2.3 実測汚濁負荷量と水量を変数とするモデル計算

モデル計算の方法の一つとして, 流入水や降水が農地を通過する際に汚濁負荷 (COD, 全窒素及び全りん) となる成分が農地から水中に混ざり流出する状況を仮定して, 水量のみを変数とするモデル計算を試みた。計算に必要な入力値は用水が流入する2地点 (地点1と地点2) の水量, 降水量及び蒸発散量であり (図2), 降水量は実測値¹⁾, その他 (各地点の水量と蒸発散量) はモデル式による推計値を用いた。

降水量及び流入水量 (地点1と地点2からの流入水量から降水量及び蒸発散量を除いた値) Q_{in} と負荷量Lの関係が

$$L = \sum_i a_i \cdot Q_i \\ = a_1 \cdot (Q_1 + Q_2 - Q_{ev}) + a_2 \cdot (Q_{rain}) \quad (8)$$

の式で表されるとして, 重回帰分析により最近10年間分のデータを用いて式 (8) の係数 (a_1 と a_2) を決定し, 北七区の正味の汚濁負荷量を以下の式で表した。

$$L^{COD} = 13 (Q_1 + Q_2 - Q_{ev}) + 99 (Q_{rain}) \\ L^{TN} = -3.0 (Q_1 + Q_2 - Q_{ev}) + 22 (Q_{rain}) \\ L^{TP} = 0.75 (Q_1 + Q_2 - Q_{ev}) + 4.5 (Q_{rain}) \quad (9)$$

ただし, L^{COD} , L^{TN} 及び L^{TP} : 北七区から排出される正味の排出負荷量 kg/月, Q_1 , Q_2 : 地点1と地点2からの流入量 m^3 /月, Q_{ev} : 蒸発散量 m^3 /月, Q_{rain} : 降水量 m^3 /月とした。

3 結果及び考察

3.1 水質及び降水量

図3に10年間（平成19～28年度）の北七区の各地点の水質の実測値及び近似計算値を示す。実測値では、10年間の水質の季節変動は、CODは春期に、全窒素は冬期に、全りんは夏期に高い傾向があった。近似計算ではこの10年間の水質の季節変動が概ね再現された。また北七区への流入水の水質が、北七区を通過し、どの程度変化するのかを図4～6に示す。ここで流入水の水質 C_{in} は、地点1～3からの流入水が全て混合されたと仮定した推算値で、水質と水量から以下の式で計算した。

$$C_{in} = (C_1 \cdot Q_1 + C_2 \cdot Q_2 + C_3 \cdot Q_3) / (Q_1 + Q_2 + Q_3) \quad (10)$$

排水の水質は地点4の水質 $C_{out} = C_4$ 、流入水と排水の差は $\Delta C = C_{out} - C_{in}$ で表す。水質と水量の実測値から推算した流入水の水質 C_{in} （10年間の平均値）はCODが9.6 mg/L、全窒素が2.07 mg/L、全りんが0.33 mg/Lであった。これに対し排水の水質 C_{out} （10年間の平均値）はCODが11.5 mg/L、全窒素が2.13 mg/L、全りんが0.38 mg/Lで、北七区を通過することによりCODが1.9 mg/L、全窒素が0.05 mg/L、全りんが0.05 mg/L増加すると推計された。全りん濃度の増加分0.05 mg/Lは全りんの環境基準値0.1 mg/Lの半分を占め、CODや全窒素と比較して水質への影響度が大きくなっている。流入水より排水のCODが高くなる要因として、土壌や肥料に由来する有機物が考えられる⁴⁾。ただし、非かんがい期に流入水の濃度よりも排水の濃度が僅かに低い場合があった。この原因は、

非かんがい期には肥料成分などによる濃度の増加が殆どないことや、流入水の大部分は北七区の水田を通過することなく水路を流れるため水質の変化が少ないこと、水量が少なく相対的に降雨による希釈や懸濁物の沈降の影響がかんがい期と比べて大きいことが考えられる。

CODや全りんと比較して全窒素の増加分が小さい理由として、水田では脱窒により全窒素を低減させる作用が大きい⁴⁾ことや、水稻の窒素吸収量が大きいこと（水稻の窒素吸収量は窒素施肥量とほぼ同程度⁴⁾）が考えられる。

図4～6に示す流入水、排水及び両者の差の近似値の推移をみると、CODは流入水と排水が、10年間でばらつきはあるものの長期的に若干減少していく傾向が見られるが、両者の差については長期的な減少傾向は小さかった。全窒素は排水の月毎の値がばらついていたが、長期的には流入水、排水とも概ね1.5～4 mg/Lの範囲にあり、増加や減少傾向などは見られなかった。両者の差もばらつくものの一定の範囲内にあると考えられた。全りんは長期的には流入水、排水とも概ね0.1～0.7 mg/Lの範囲にあり、増加や減少傾向などは見られず、両者の差も一定の範囲内にあると考えられた。これらのことから、COD、全窒素及び全りんとも、10年間では流入水と排水の差に大きな変化や改善は見られなかった。

図7に北七区における流入水量、排水量、降水量及び蒸発散量¹⁾を示す。

北七区への流入水量は以下の式で表される。

$$Q_{in} = (Q_1 + Q_2 + Q_3) + (Q_{rain} - Q_{ev}) \quad (11)$$

ここで $Q_1 \sim Q_3$ ：地点1～3の流量（ m^3 /年）、 Q_{rain} ：降

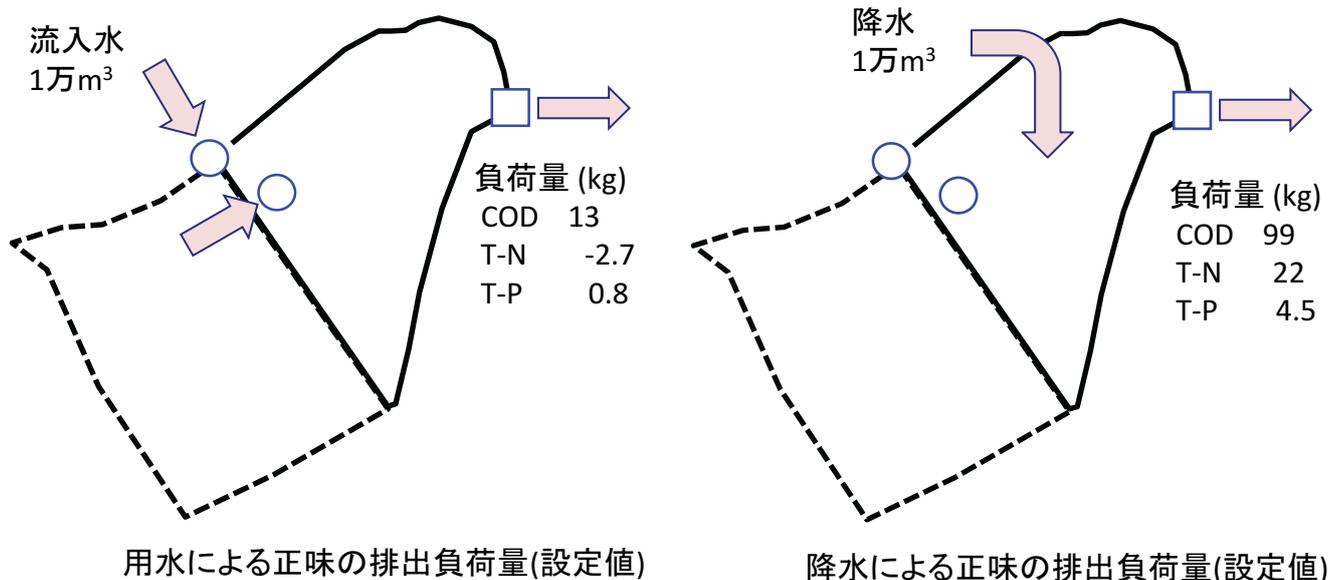
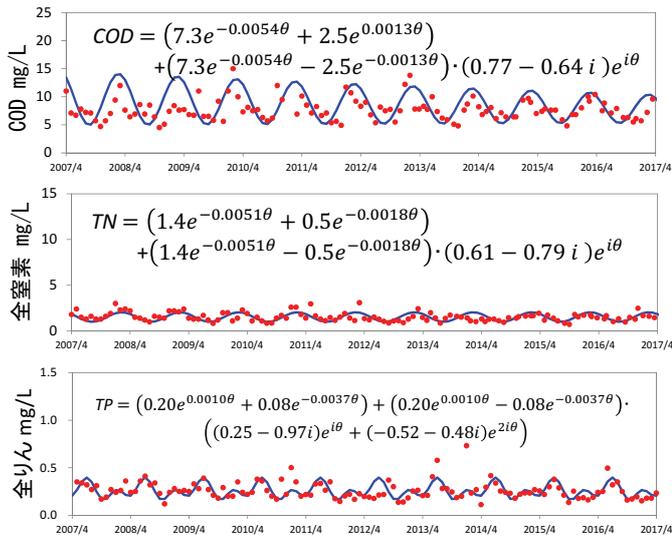
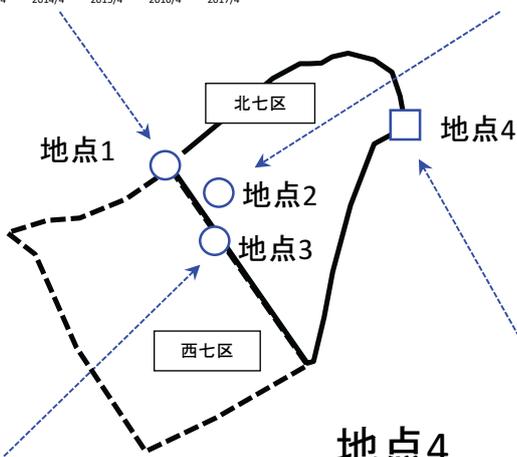
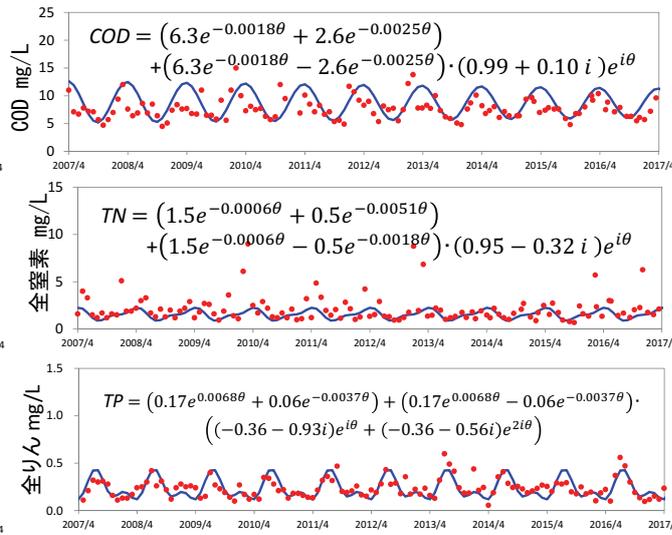


図2 水量を変数とする正味の排出負荷量の計算モデル

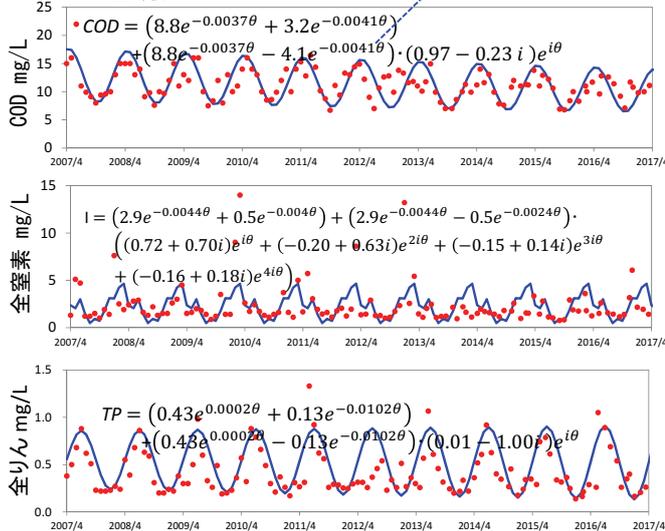
地点1



地点2



地点3



地点4

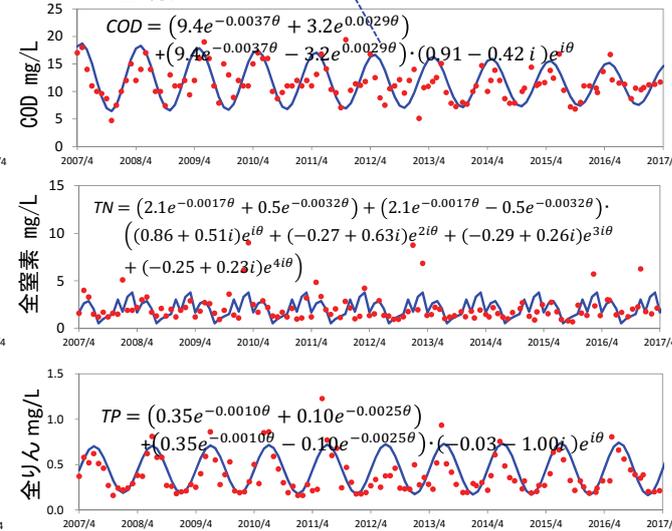


図3 水質測定結果及び近似計算結果
 ● : COD、T-N及びT-P (実測値)
 — : 近似値

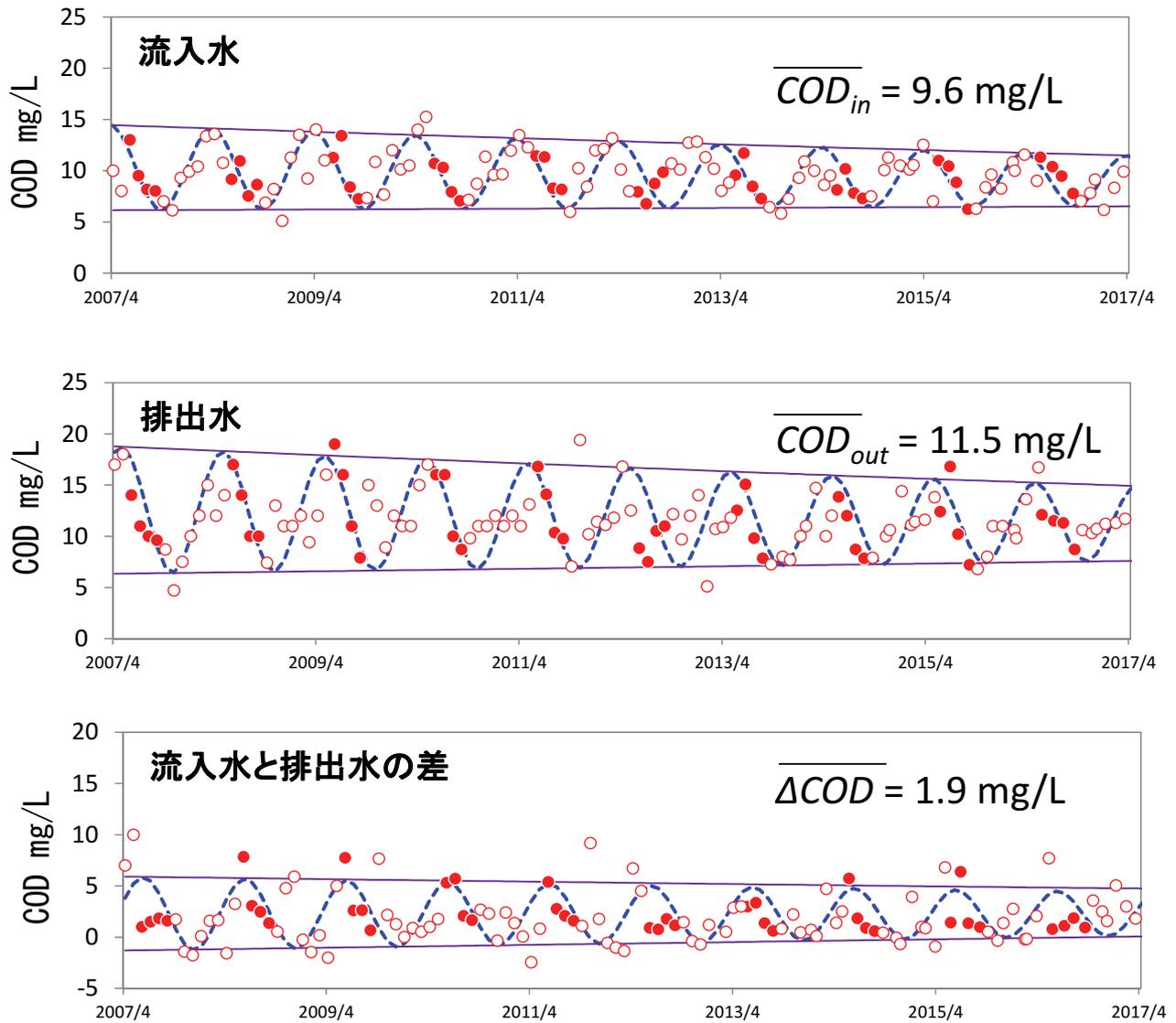


図4 流入水と排水水のCOD
 ●：かんがい期の実測値，○：非かんがい期の実測値¹⁾，
 ---：近似値，—：近似値の最大及び最小値

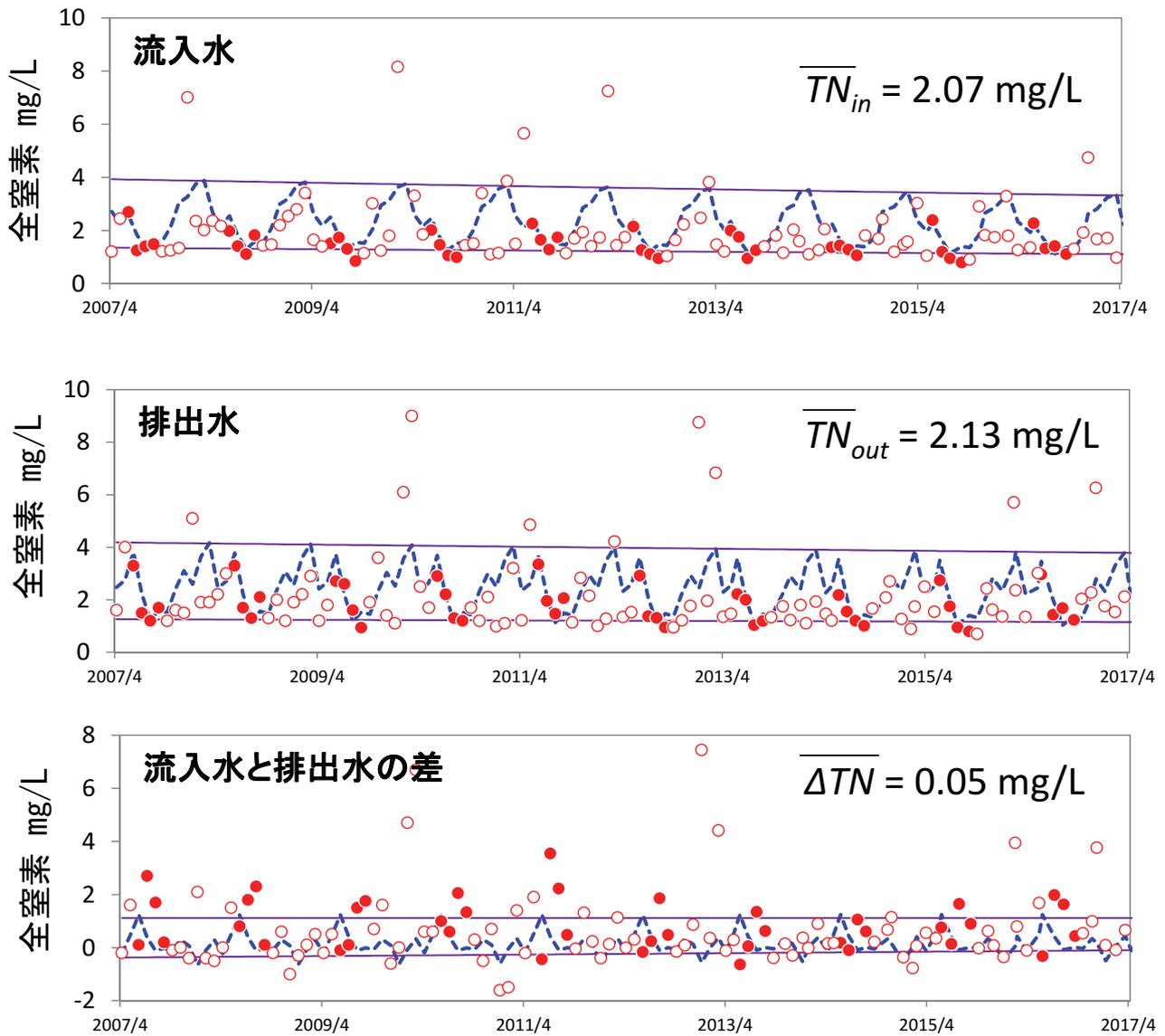


図5 流入水と排水水の全窒素
 ●：かんがい期の実測値, ○：非かんがい期の実測値¹⁾,
 ---：近似値, —：近似値の最大及び最小値

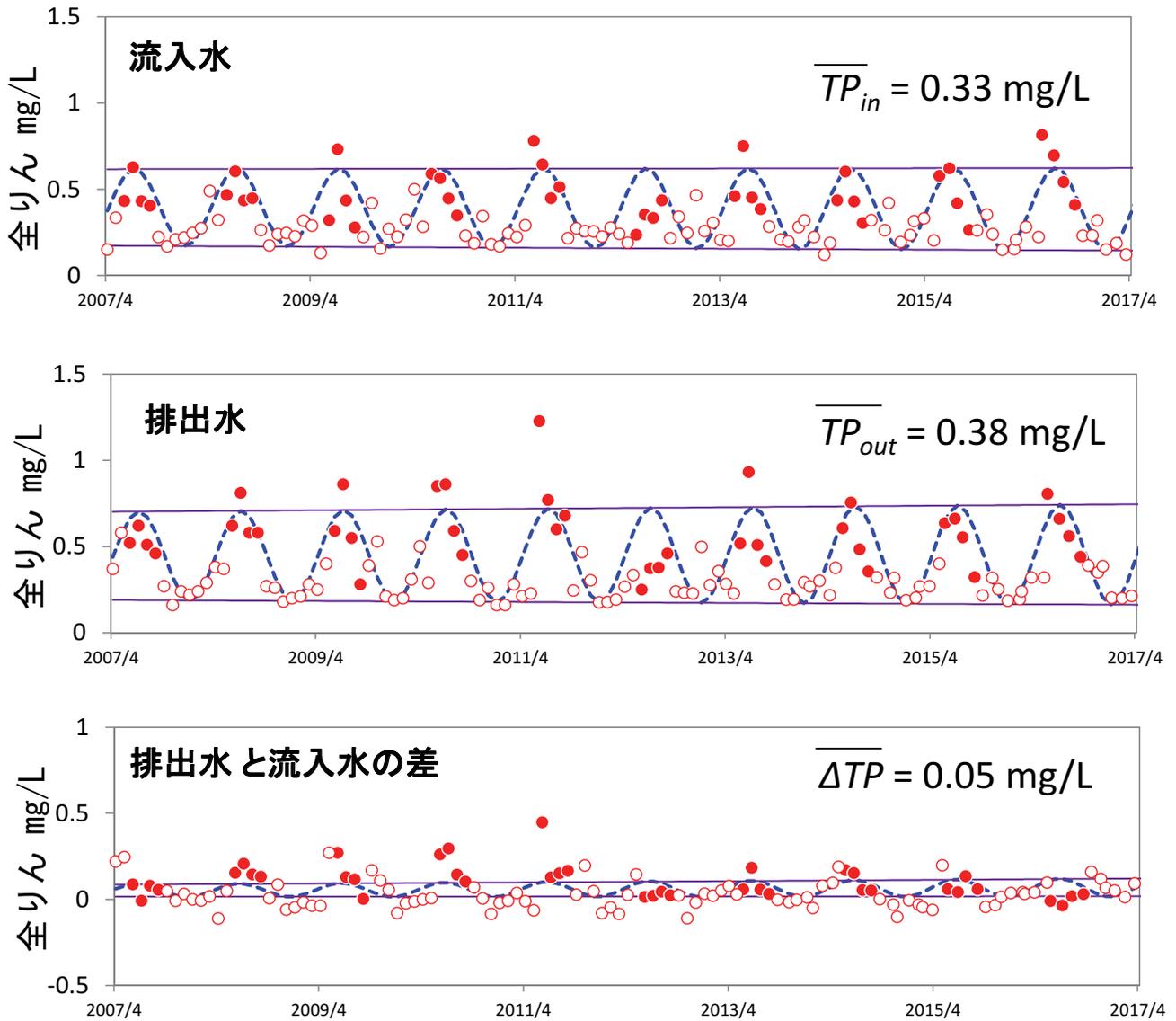


図6 流入水と排水水の全りん
 ●：かんがい期の実測値，○：非かんがい期の実測値¹⁾，
 ---：近似値，—：近似値の最大及び最小値

水量 ($\text{m}^3/\text{年}$)、 Q_{ev} ：蒸発散量 ($\text{m}^3/\text{年}$)である。10年間の平均値は地点1の用水量 Q_1 が $5.4 \times 10^6 \text{ m}^3/\text{年}$ 、地点2の用水量 Q_2 が $5.2 \times 10^6 \text{ m}^3/\text{年}$ 、地点3の排水量 Q_3 が $1.1 \times 10^7 \text{ m}^3/\text{年}$ 、地点4の排水量 Q_4 が $2.2 \times 10^7 \text{ m}^3/\text{年}$ 、北七区の降水量 Q_{rain} が $5.2 \times 10^6 \text{ m}^3/\text{年}$ 、蒸発散量 Q_{ev} が $4.3 \times 10^6 \text{ m}^3/\text{年}$ であった。北七区への流入水のうち西七区からの農業排水である Q_3 が約半分を占める。このことは、北七区の水収支や負荷量の収支を考える上で Q_3 が大きな影響を与えていることを示す。

北七区への降水量 Q_{rain} は北七区からの排水量 Q_{out} の24% (10年間の平均値)であった。年度毎の降水量はばらつき、10年間の平均値は1127 mm/年に対し最大値は平成23年度の1720 mm/年、最小値は平成19年度の747 mm/年、変動係数は17%であった。月毎の降水量は平成23年の9月に612mmと最も大きく、10年間の9月の平均値178 mmと比較して3.4倍と特に大きい、これは9月中旬に発生した大型で強い台風による豪雨の影響によるものであった。次いで平成28年6月に降水量が434 mmと大きい、

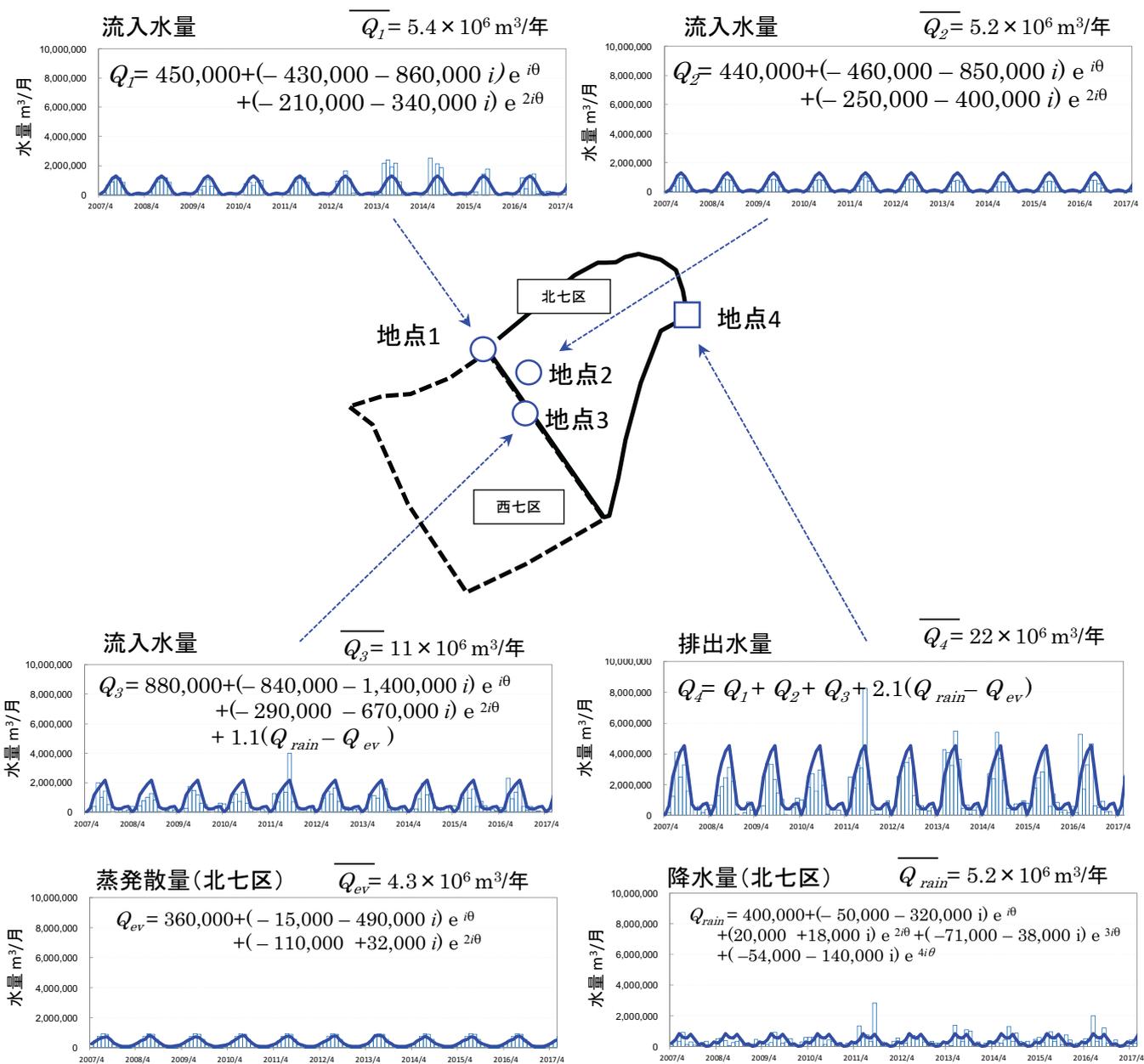


図7 水量、降水量及び蒸発散量

□ : 文献値¹⁾
 — : 近似値

これは梅雨の時期が例年より長引いたことによる。また平成25年の6月に降水量が298 mm、平成23年5月に降水量が294 mmと大きく、いずれも台風の影響があった。

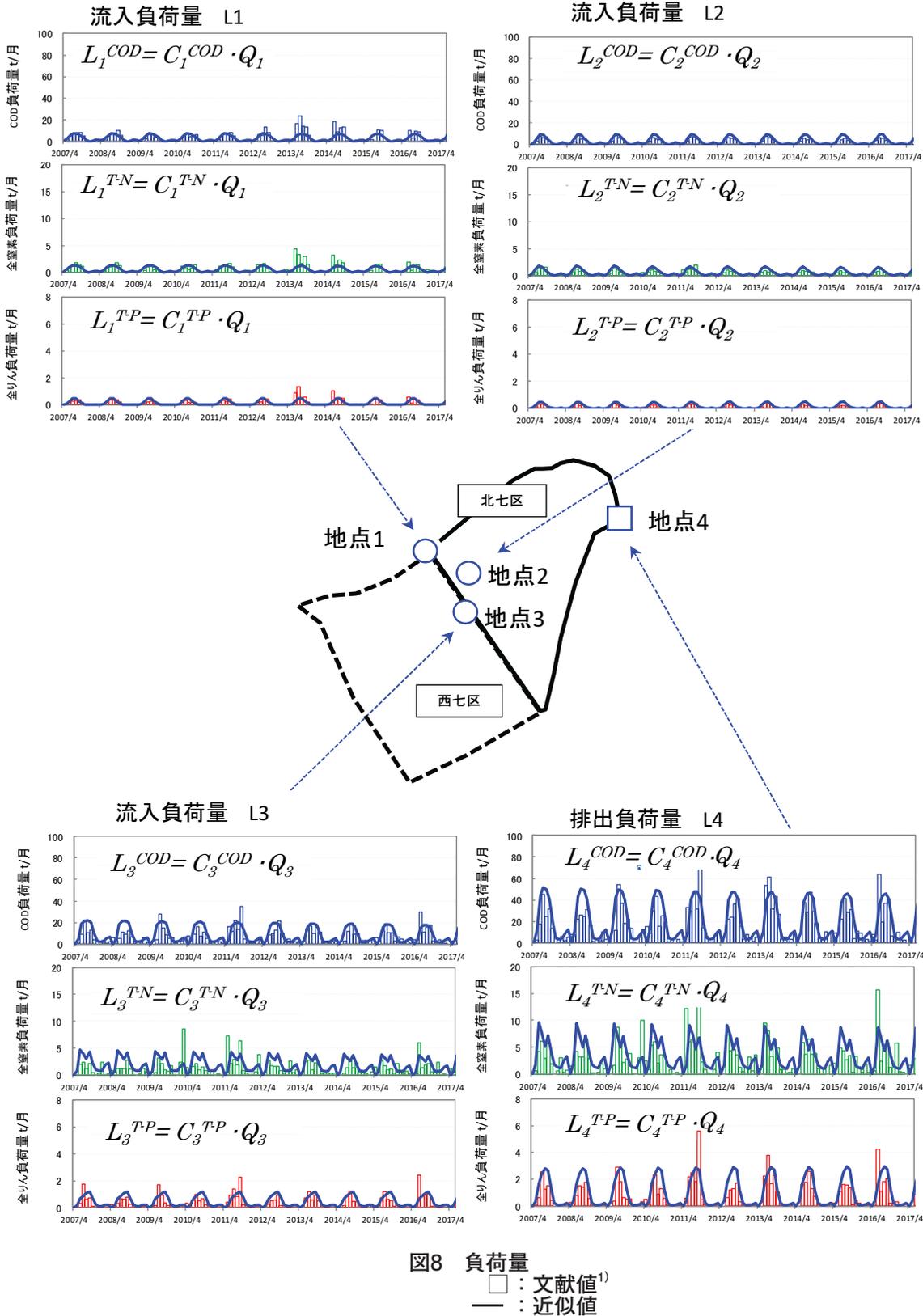
3.2 負荷量

3.2.1 各地点の負荷量と排出負荷量

各地点の負荷量を図8に示す。

COD排出負荷量の大きい年度について、10年間の平均値を20%以上上回った年度は平成23年度と平成25年度で、それぞれ平均値より33%及び22%大きかった。平成23年度は9月に負荷量が大きく、水質は9月の月平均値より10

%だけ高かったが、水量は76%大きかった。平成25年度は6～7月に負荷量が大きく、各月の値を10年間の平均値と比べると6月の水質は12%低く、7月の水質は12%高い程度であった一方、水量は6月に月平均値より78%大きく、7月に24%大きかった。したがって、平成23年度と平成25年度の増加要因は、水質より水量の増加の影響が大き



いと考えられた。

全窒素排出負荷量の大きい年度について、10年間の平均値より20%以上上回った年度は平成23年度で、平均値より60%大きかった。平成23年度は5月と9月に負荷量が大きく、水質は5月の月平均値より101%高かったが、水量は76%大きかった。また9月の水質の月平均値より56%高かったが、水量は76%大きかった。

全りん排出負荷量が、10年間の平均値より20%以上上回った年度はCODと同様に平成23年度と平成25年度で、それぞれ平均値より48%及び23%大きかった。平成23年度はCODと同様に9月に負荷量が大きく、水質は9月の月平均値より53%高かったが、水量は76%大きかった。よって要因として水質より水量の増加の影響がやや大きいと考えられた。平成25年度は7月に負荷量が大きく、各月の値を10年間の平均値と比べると水質は28%高く、水量は24%大きかった。よって要因として水質と水量の増加の影響が同程度と考えられた。

COD、全窒素及び全りんの排出負荷量は特に平成23年9月が大きい、この時期に発生した大型の台風による降水量の増加の影響が大きかった。また平成23年5月に全窒素排出負荷量、平成25年6月にCOD排出負荷量が大きいのが台風による降水量の増加の影響が大きいと考えられた。

図8に示す負荷量の近似値は、図3に示す各地点の水質の近似値と図7に示す各地点の水量の近似値を掛けて計算した値で、規則的なパターンで推移している。

3.2.2 正味の排出負荷量

図9～11に正味の排出負荷量の10年間の変遷を示す。実測値から計算された北七区の10年間の正味の排出負荷量の平均値は、CODが54 t/年、全窒素が7.6 t/年、全りんが2.1 t/年であった。単位面積当たりの負荷量（原単位）に換算するとCODが117 kg/ha/年、全窒素が16 kg/ha/年、全りんが4.6 kg/ha/年であった。また、年度毎の正味のCOD排出負荷量は58～200 kg/ha/年、全窒素排出負荷量は4.5～35 kg/ha/年、全りん排出負荷量は1.3～11 kg/ha/年の範囲にあり、いずれの年度においても流入水量や降水量が大きい月に負荷量が大きい傾向が見られた。正味の排出負荷量は排出負荷量と比べると小さく、その割合は正味のCOD排出負荷量が22%、正味の全窒素排出負荷量が18%、正味の全りん排出負荷量が18%であった。北七区の正味の排出負荷量の割合が小さいことから、推計結果は排出負荷量や流入負荷量のばらつきや誤差の影響を受けやすく、図8から、特に西七区から流入する負荷量の影響が大きいと考えられた。表1に流入負荷量、排出負荷量及び正味の負荷量の10年間の年度毎の

データの平均値とばらつきを示す。流入負荷量及び排出負荷量の変動係数（CV）は12～26%の範囲であるのに対して、正味の負荷量の変動係数は36～62%と大きい。これは、正味の負荷量が流入負荷量や排出負荷量と比較して小さく、相対的に両者の値のばらつきの影響を受けやすいためと考えられる。

近似値をみると、COD、全窒素及び全りんの流入負荷量、排出負荷量及び正味の排出負荷量は10年間で一定のパターンで推移している傾向があると考えられた。

治多等⁵⁾は汚濁負荷量に関する過去の報告（479件）を整理し、慣行農法の水田（水田群・一筆水田）の排出負荷量（灌漑期と非灌漑期の平均値）はCOD排出負荷量216 kg/ha/年（かんがい期157 kg/ha/年、非かんがい期59 kg/ha/年の合計）、全窒素排出負荷量29 kg/ha/年、全りん排出負荷量3.9 kg/ha/年を述べている。今回の結果（COD排出負荷量117 kg/ha/年、全窒素排出負荷量16 kg/ha/年、全りん排出負荷量4.6 kg/ha/年）と比較すると、CODと全窒素がそれぞれ46%及び45%小さく、全りんが19%大きかった。

また、改善農法が取り入れられている水田では、正味のCOD排出負荷量41.5 kg/ha/年、全窒素排出負荷量34.8 kg/ha/年、全りん排出負荷量2.81 kg/ha/年と述べられており、今回の結果と比較すると、CODが182%大きく、全窒素は54%小さく、全りんは63%大きかった。改善農法では耕方改善（無代かき、浅水代かき、止め水）、施肥

表1 年度ごとの負荷量データの平均値と標準偏差

	流入負荷量		
	COD	全窒素	全りん
平均値 kg/ha/年	414	73	21
σ	52	16	3.8
CV %	12	21	18

	排出負荷量		
	COD	全窒素	全りん
平均値 kg/ha/年	531	90	25
σ	83	23	5.5
CV %	16	26	22

	正味の排出負荷量		
	COD	全窒素	全りん
平均値 kg/ha/年	117	16	4.6
σ	42	10	2.7
CV %	36	62	58

方法改善（緩効肥料，側条施肥，苗箱），かんがい方法改善（循環かんがい）が挙げられており，全りんの削減率は無代かき又は減代かきで39～73%，苗箱で44%，循環かんがい⁶⁾で28%のデータが示されている。

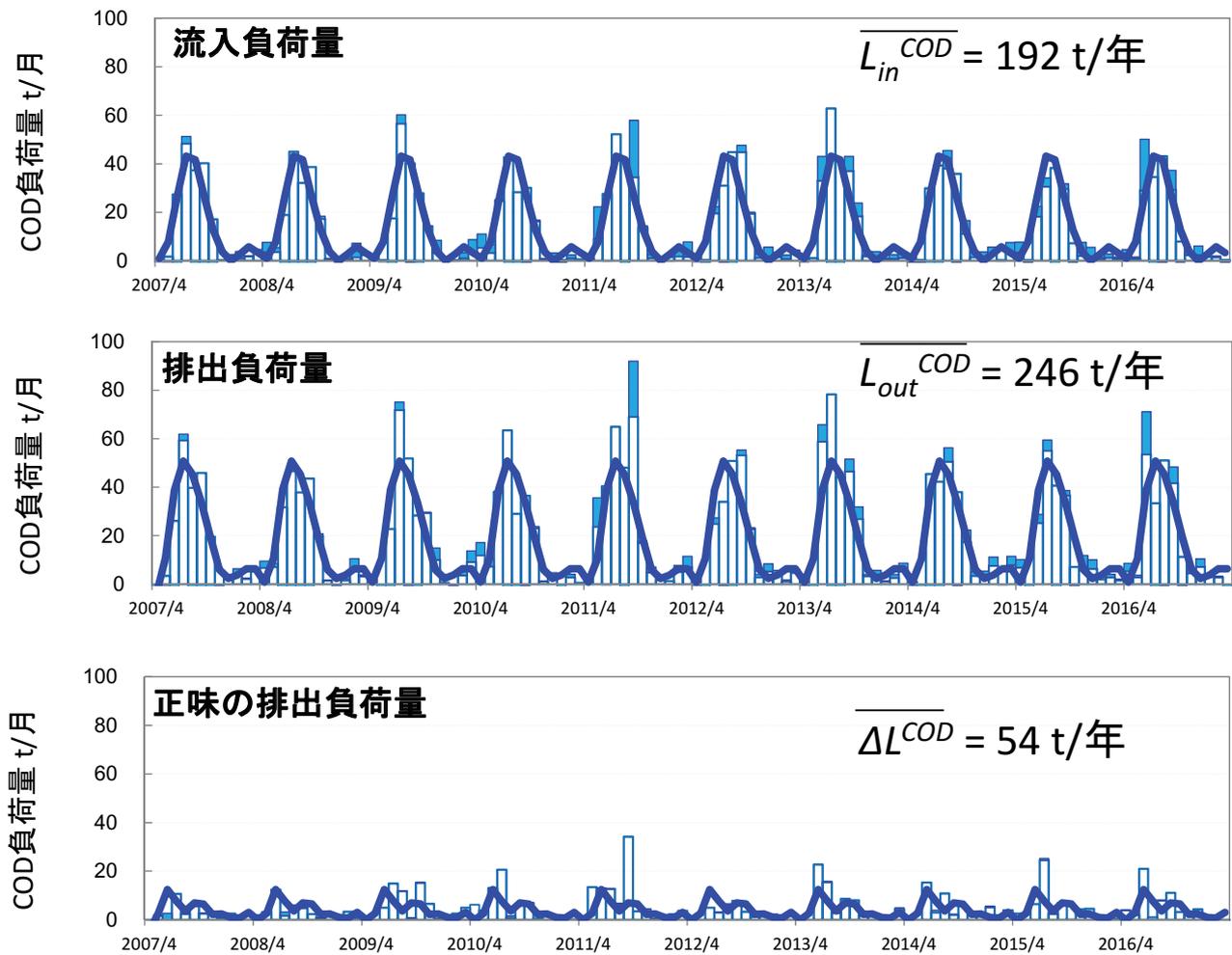


図9 正味のCOD排出負荷量

- : 実測値 (水質×用水量) から計算される負荷量
- : 実測値 (水質×(降水量－蒸発散量)) から計算される負荷量
- : 近似値

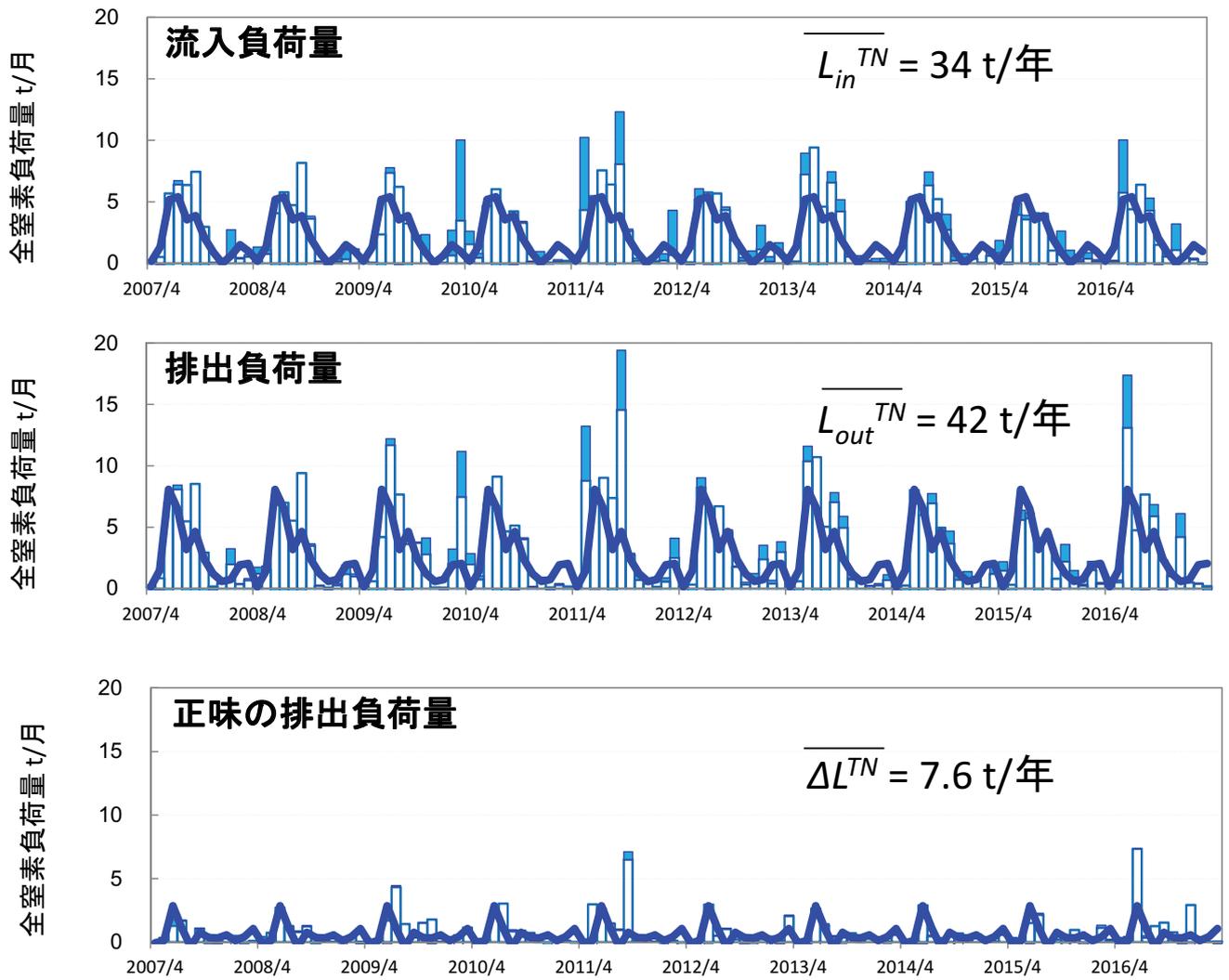


図10 正味の全窒素排出負荷量

- : 実測値 (水質×用水量) から計算される負荷量
- : 実測値 (水質×(降水量-蒸発散量)) から計算される負荷量
- : 近似値

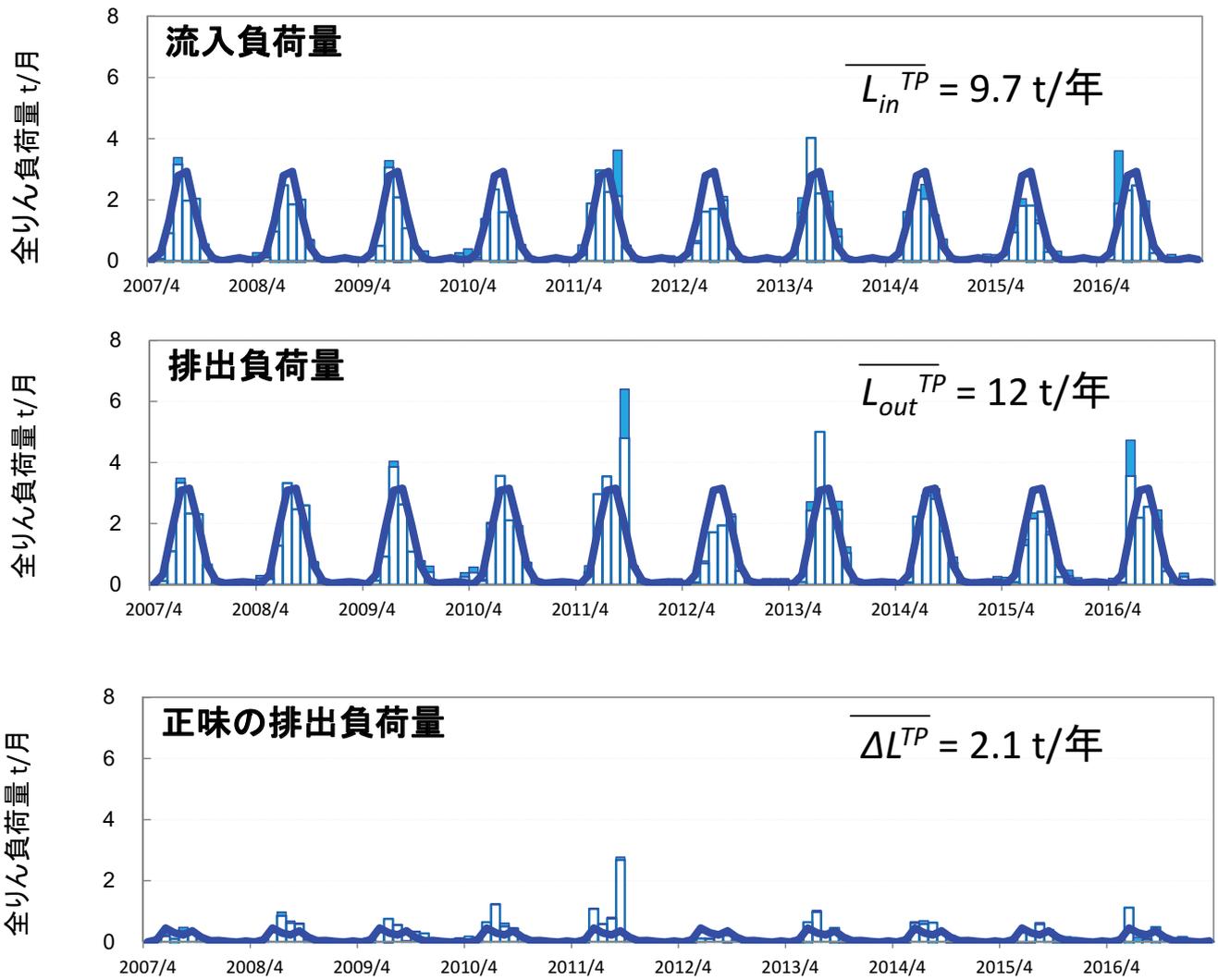


図11 正味の全りん排出負荷量

- : 実測値 (水質×用水量) から計算される負荷量
- : 実測値 (水質×(降水量-蒸発散量)) から計算される負荷量
- : 近似値

3.2.3 差し引き負荷量

図12にCOD, 全窒素及び全りんものの差し引き負荷量と降水負荷量の推計値を示す。降水負荷量を正味の排出負荷量と比較すると, CODで23%, 全窒素で39%, 全りんもので7%と推計された。窒素は他の項目と比べて, 正味の排出負荷量に対する降水負荷量の比率が大きいが, その理由として, 図5に示すように水田では脱窒により流入水と排出水の濃度の差が小さく, 相対的に降水の負荷量の比率が大きく推計されたと考えられる。

3.3 実測汚濁負荷量と水量を変数とするモデル計算による汚濁負荷量の比較

水量を変数とする北七区からの正味の排出負荷量(式9)の推計結果を図13に示す。正味の排出負荷量はかんがい期に大きく, モデル計算では10年間の正味の排出負荷量の季節変動が概ね表された。10年間分の月毎の計算結果と実測値から得られた結果の相関係数はCODが0.82, 全窒素が0.79, 全りんが0.65であった。相関係数の評価の指針として文献値⁶⁾の0.2以下:とても弱い, 0.2~0.4:弱い,

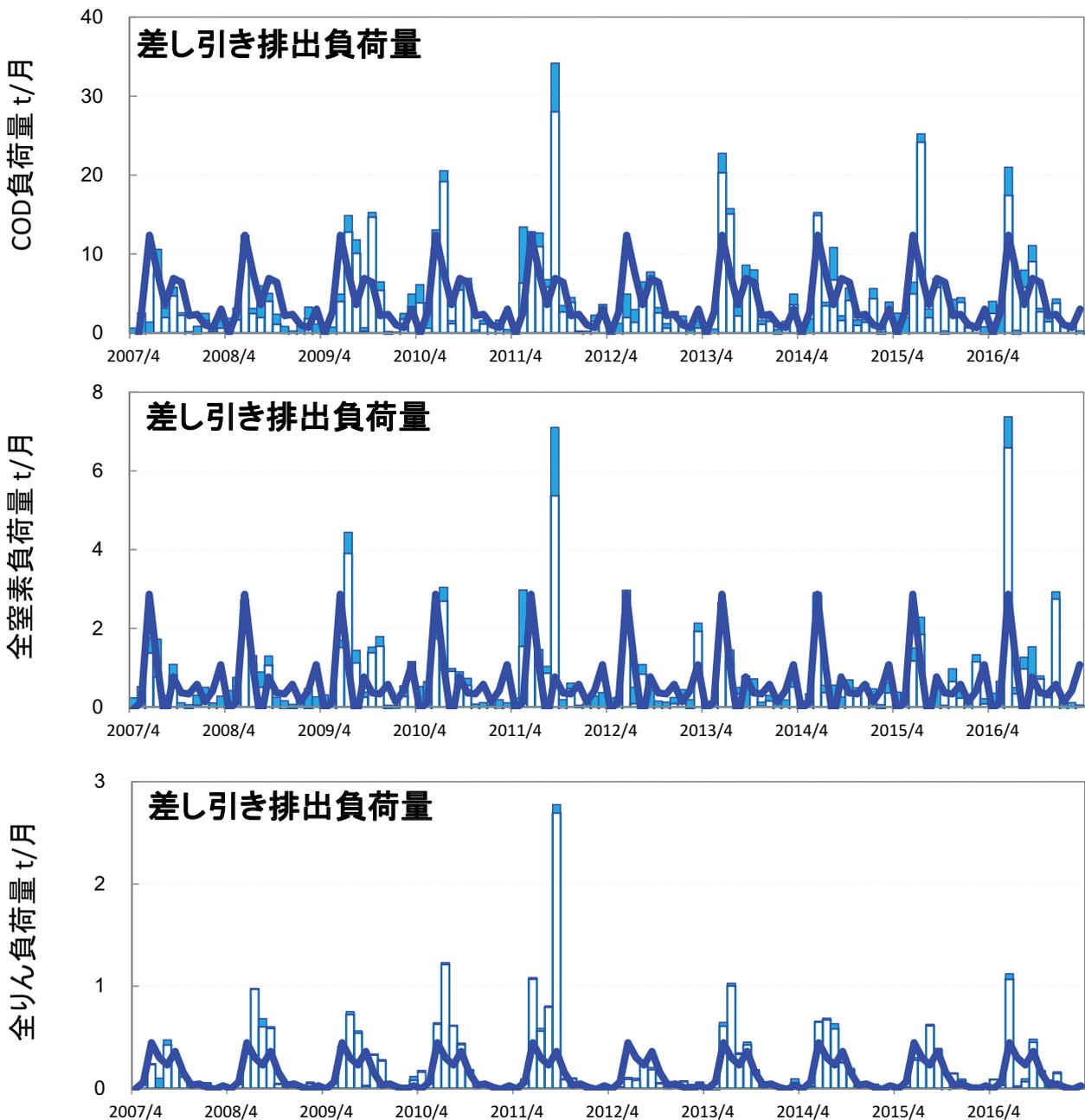


図12 差し引き排出負荷量と降水負荷量
 □ : 差し引き排出負荷量
 ■ : 降水負荷量
 — : 正味の排出負荷量の近似値

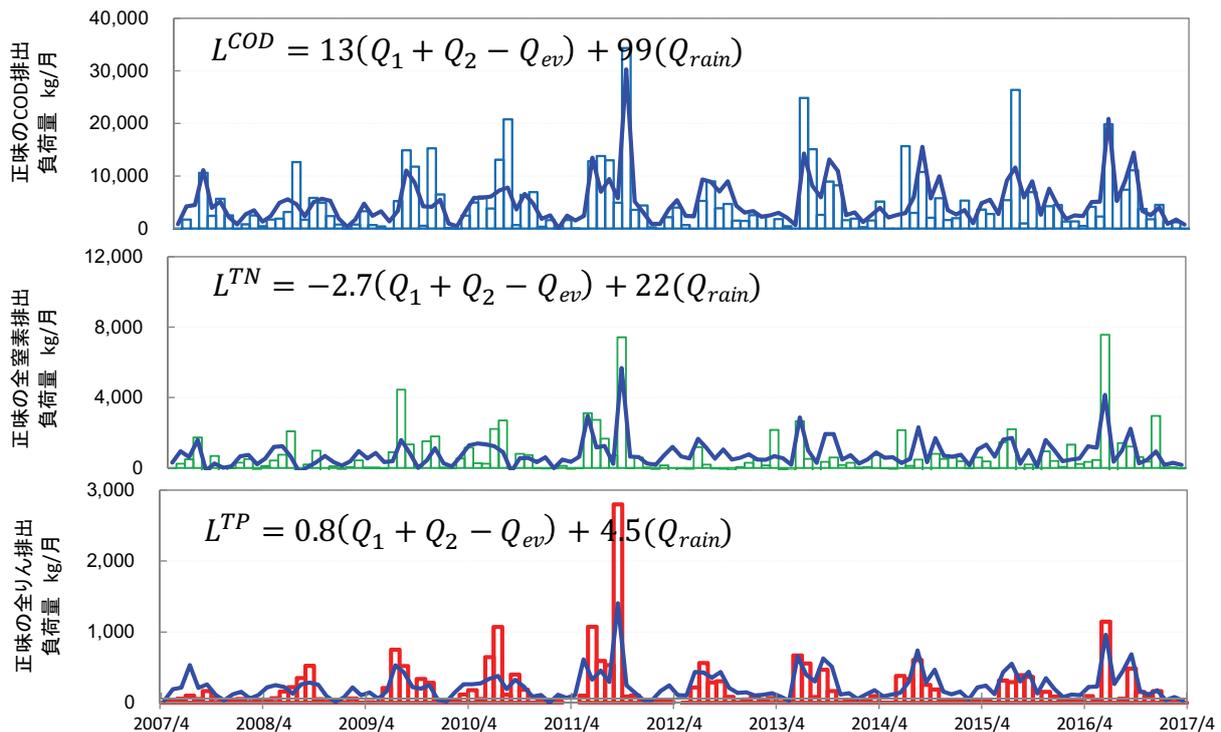


図13 正味の排出負荷量のモデル式による推計
□：文献値²⁾からの計算値
—：モデル式による計算値

0.4～0.7：中程度，0.7～0.9：強い，0.9以上：とても強い，を用いると，CODと全窒素では強い，全りんは中程度と評価され，モデル計算結果は，ある程度相関があると考えられた。

4 まとめ

北七区で水田から流出する汚濁負荷量の調査を行った。流入水と流出水の水質の差は，CODが1.9 mg/L，全窒素が0.05 mg/L，全りんが0.05 mg/Lで，10年間での変化は小さかった。10年間の水質の季節変動はフーリエ級数により概ね再現された。

実測値から計算された北七区の正味の排出負荷量はCODが117 kg/ha/年，全窒素が16 kg/ha/年，全りんが4.6 kg/ha/年であった。10年間の流入負荷量と排出負荷量はCOD，全窒素及び全りんのいずれも夏期に大きく冬期に小さく，長期的な変化は小さく，一定のパターンで推移する傾向が見られた。

- 1) 岡山県：平成30年度指定湖沼汚濁負荷量削減状況調査報告書，2019
- 2) 島弘志編：工場排水試験法 JIS-K0102，日本規格協会，東京，2010
- 3) 大石進一：フーリエ解析，7，岩波書店，東京，1989
- 4) 武田育郎：よくわかる水環境と水質，161，オーム社，東京，2010
- 5) 日本水環境学会ノンポイント汚染研究委員会：非特定汚染源からの流出負荷量の推計手法に関する研究，12-14，2012
- 6) D.ロウンリー：新・涙なしの統計学，191，新世社，1991

文 献

【調査研究】

活性炭カラム及びフェントン処理による1,4-ジオキサンの処理方法の基礎的検討 Fundamental Study on Treatment Method of 1,4-Dioxane with Activated Carbon Column and with Fenton Treatment

浦山豊弘, 吉岡敏行, 小川知也 (水質科)

URAYAMA Toyohiro, YOSHIOKA Toshiyuki, OGAWA Tomoya (Water Section)

要 旨

活性炭カラム法及びフェントン処理法による1,4-ジオキサンの基礎的な処理方法を検討した。活性炭カラム法では、φ50 mmのカラムに活性炭400 gを充填した時の吸着限界が620 mg/kgであり、1,4-ジオキサン1 mg/Lを含有する排水を100 m³/日 (3000 m³/月) 処理するために必要な活性炭量は4900 kg/月となるため、活性炭の交換が高頻度となり現実的でないと判断された。光照射を加えたフェントン処理法では、鉄イオン濃度が水質汚濁防止法に基づく一律排水基準 (溶解性鉄含有量) に適合する試薬濃度で検証したところ、1,4-ジオキサン1 mg/Lの模擬排水を約47分で環境基準以下まで減少させることのできる条件を見出した。

[キーワード：1,4-ジオキサン, 排水処理, 活性炭カラム, フェントン処理]

[Key words : 1,4-Dioxane, Wastewater treatment, Activated carbon column, Fenton treatment]

1 はじめに

1,4-ジオキサンは、平成21年11月に公共用水域及び地下水の水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準 (0.05 mg/L) が設定され、これを踏まえ、環境基準の維持・達成を図るため、平成24年5月に水質汚濁防止法に基づく排水基準 (0.5 mg/L) が設定された。

1,4-ジオキサンは、有機合成反応用溶媒や溶剤としての用途がある物質で、分子量が88と比較的小さく、水と無制限に混和する¹⁾。また、廃棄物最終処分場の浸出水や浸透水から検出される1,4-ジオキサンの濃度範囲は0.0001 mg/L ~ 1.37 mg/Lと報告されており²⁾、今回この濃度レベル (1 mg/L) の1,4-ジオキサンを含む排水の処理について検討した。

1,4-ジオキサンは、難分解性で活性汚泥や凝集沈殿等の一般的な排水処理では除去が困難な物質であり、処理技術としては、生物活性炭、酸化分解法 (フェントン処理法、UV/オゾン法、UV/過酸化水素法) 又は逆浸透膜によるものが除去効果が高く、有効な方法とされている³⁾。

既報⁴⁾では、1,4-ジオキサンを活性炭カラムにより吸着処理を行う基礎検討結果を報告したが、諸条件等について追加検討を実施するとともに、フェントン処理法についても検討したので報告する。

2 材料及び方法

2.1 材料

活性炭：活性炭A：クラレコール®浄水用GW30~60メッシュ (0.25 ~ 0.5 mm) (クラレ製)

活性炭B：クラレコール®水処理・脱色用KW18 ~ 42メッシュ (0.355 ~ 0.850 mm) (クラレ製)

活性炭C：破碎炭20*50メッシュ (0.3 ~ 0.78 mm) (ユーイーエス製)

カラムクロマト管：50 mmカラム：内径50 mm×1,000 mm (VIDTEC製)

100 mmカラム：内径100 mm×1,000 mm (VIDTEC製)

ろ紙：ウエットストレングス濾紙No.42489 (ADVANTEC製)

白色LED：エコリオアームパワー (2.0 W) (GEX製)

300 mLビーカー、PTFE製25 mm回転子

2.2 標準品及び試薬等

1,4-ジオキサン：GR (≥99.5 %) (ナカライテスク製)

1,4-ジオキサン-d₈標準液：1 mg/mL メタノール溶液 (富士フィルム和光純薬製)

固相カートリッジ：Sep-Pak AC-2 Plus (Waters製)

ジクロロメタン：残留農薬・PCB試験用5000倍濃縮溶媒 (富士フィルム和光純薬製)

アセトン：残留農薬・PCB試験用5000倍濃縮溶媒（富士フィルム和光純薬製）

無水硫酸ナトリウム：残留農薬・PCB試験用（関東化学製）

硫酸鉄(Ⅲ)n水和物：和光一級（富士フィルム和光純薬製）

過酸化水素：和光一級（富士フィルム和光純薬製）

しゅう酸二水和物：和光一級（富士フィルム和光純薬製）

2.3 GC-MSの測定条件

GC機種：7890A（Agilent製）

GCカラム SP-2380 60 m 0.25 mm × 0.2 μm（シグマアルドリッチ製）

昇温条件 45 °C (2 min)→7 °C /min→180 °C (0 min) →20 °C /min→260 °C (5 min)

注入方法 スプリットレス

キャリアガス ヘリウム

カラム流量 1 mL/min

注入量 1 μL

MS機種：JMS-Q1000GC Mk II（日本電子製）

注入口温度 250 °C

インターフェース温度 240 °C

イオン源温度 210 °C

イオン化電圧 70 eV

測定法 SCAN測定 (m/z 30～300)

モニターイオン 1,4-ジオキサン m/z 88, 58

1,4-ジオキサン-d₈ m/z 96, 64

2.4 1,4-ジオキサンの分析方法

あらかじめアセトン10 mL及び精製水10 mLでコンディショニングしたSep-Pak AC-2 Plusに、試料水を10 mL/minのスピードで負荷した後、遠心脱水した。ジクロロメタン10 mLで溶出し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、1 mL～10 mLに定容し、GC-MS測定に供した。

なお、サロゲートとして1,4-ジオキサン-d₈を定容後の最終溶液で0.5 μg/mLとなるようSep-Pak AC-2 Plusに負荷前の試料水に添加した。

2.5 検討に使用する水の選定

既報⁴⁾では、精製水又は少量の最終処分場浸透水等を使用した。今回の検討では夾雑成分を含む水を大量に使用する必要があったため、模擬排水として当センター周辺の農業用水路の水を使用した。

この用水路の水のCODは10 mg/L程度であり、最終処分場の水処理施設で生物処理や凝集沈殿処理等を行い、COD 10 mg/L程度まで浄化した水を想定した。

なお、均一化の目的で、用水路の水はろ紙であらかじめろ過して用いた。

2.6 活性炭カラム法による1,4-ジオキサン吸着試験

2.6.1 活性炭の比較

φ50 mmカラムに3種類の活性炭A,B,Cを各400 g充填し、1,4-ジオキサンを1 mg/Lとなるよう添加した模擬排水を通水し、一定量毎に分取して2.4に従って1,4-ジオキサンの分析を行い、1,4-ジオキサン濃度が環境基準（0.05 mg/L）を超過（以下「破過」という。）する通水量を比較した。

2.6.2 逆洗工程の検証

活性炭吸着塔では、一般に逆洗工程があることから、逆洗に伴う吸着能力の変化を調べるため、活性炭A 200g（φ50mmカラム）を通過した模擬排水を分取し1,4-ジオキサンの破過を確認後、逆洗工程を模して活性炭を取り出しかくはんした後、再度カラムに充填後模擬排水を通水して、通過した水を分取して1,4-ジオキサン濃度を求めた。

2.6.3 再生処理の検討

破過した活性炭をメタノール洗浄と加熱処理の2方式で再生処理し、新品の活性炭カラムとの吸着能力を比較した。メタノール洗浄は、破過した活性炭A 200g（φ50mmカラム）をカラムから取り出し、メタノールに浸漬して洗浄した後、蒸留水でよくすすぎ、メタノールを除去し、再度カラムに充填して模擬排水を通水・分取して1,4-ジオキサン濃度を求めた。加熱処理は、破過した活性炭B 400g（φ50mmカラム）をカラムから取り出し、磁性皿で350 °Cで4時間加熱処理した後、再度カラムに充填して模擬排水を通水・分取して1,4-ジオキサン濃度を求めた。

2.6.4 活性炭の量及び積層厚の比較

活性炭Aを①（φ50 mmカラム, 200 g）、②（φ50 mmカラム, 400 g）、③（φ100 mmカラム, 400 g）のとおりに充填し、1,4-ジオキサンを1 mg/Lとなるよう添加した模擬排水を通水し、破過する通水量を比較した。

2.7 フェントン処理による1,4-ジオキサン処理試験

2.7.1 フェントン処理法の選定

前川の報告⁵⁾（以下「文献」という。）を参考に、300 mLビーカーに精製水250 mLを入れ1,4-ジオキサンを濃度100 mg/Lとなるよう添加し、1 mol/Lの硫酸でpH 3に調整した後、各試薬を初期濃度Fe（Ⅲ）イオン：1.0 mmol/L、しゅう酸：1.0 mmol/L、過酸化水素：10 mmol/Lとなるよう添加した。ビーカー中の試料を回転子でかくはんしながら白色LEDをビーカー側面から照射し、0分後と20分後の1,4-ジオキサンの濃度を測定した。

更に、低濃度の1,4-ジオキサンを含有する排水処理の検

討のため、1,4-ジオキサンの濃度を文献の半分とするともに、各試薬の濃度も半分にした。精製水：250 mL、1,4-ジオキサン濃度：50 mg/L、Fe(Ⅲ)イオン：0.50 mmol/L、しゅう酸：0.50 mmol/L、過酸化水素：5.0 mmol/Lで試験をし、0分後と20分後の1,4-ジオキサンの濃度を測定して除去率を求めた。

2.7.2 模擬排水を用いた検討

フェントン処理は1,4-ジオキサンだけを分解するのではないため、他に含まれる有機物の分解にフェントン試薬が消費されて、1,4-ジオキサンの分解能力が落ちることも想定された。そこで、実際の排水処理を想定した模擬排水を用いて、使用する各試薬の濃度を変えて検討した。

模擬排水250 mLに1,4-ジオキサンを濃度1 mg/Lとなるように添加し、各試薬の濃度を表1のとおりとし、0分後と20分後の1,4-ジオキサンの濃度を測定した。

2.7.3 反応時間の検討

20分での処理で効果が認められた各設定濃度の中で、

特に低濃度における反応に着目し、時間を延長した場合の反応の詳細を明らかにするため、模擬排水250 mLに1,4-ジオキサンを濃度1 mg/Lとなるように添加し、各試薬を20分の1の濃度、Fe(Ⅲ)イオン：0.050 mmol/L、しゅう酸：0.050 mmol/L、過酸化水素：0.50 mmol/Lで、0分後から80分後まで20分毎に1,4-ジオキサンの濃度を測定して濃度の変化を求めた。

3 試験結果及び考察

3.1 活性炭カラム法による吸着試験結果

3.1.1 活性炭の比較結果

2.6.1に従い3種類の活性炭の破過する模擬排水の通水量を比較した結果を図1に示す。活性炭Bでは64 Lで、活性炭Cでは79 Lで破過したのに対し、活性炭Aは249 Lで破過した。活性炭Aは活性炭Bの3.9倍の吸着能力があり、活性炭の種類により大きな差があることが明らかとなった。

表1 フェントン処理における模擬排水中の各試薬の濃度と1,4-ジオキサン濃度

	試薬量 (mmol/L)			1,4-ジオキサン濃度 (mg/L)	
	Fe(Ⅲ)イオン	しゅう酸	過酸化水素	0分後	20分後
文献値	1.0	1.0	10	-	-
①(1/2)	0.50	0.50	5.0	1.0	<0.01
②(1/5)	0.20	0.20	2.0	1.0	<0.01
③(1/10)	0.10	0.10	1.0	1.0	0.10
④(1/20)	0.050	0.050	0.50	1.0	0.30

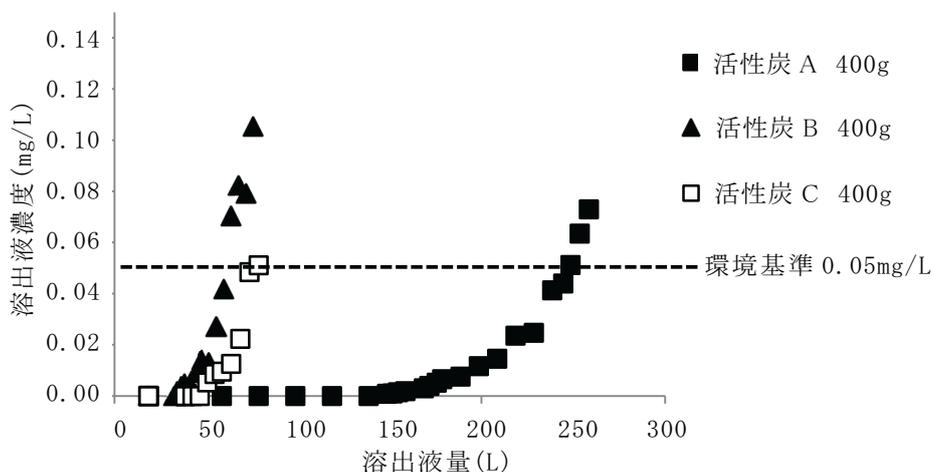


図1 活性炭の種類と溶出液濃度

3.1.2 逆洗工程の検証結果

2.6.2に従い逆洗工程の検証をした結果を図2に示す。かくはん前までは溶出液濃度が徐々に増加していたのに対し、かくはん直後に2倍以上に増加し、その後の増加の傾きも急になっていた。1,4-ジオキサンが吸着された活性炭カラムをかくはんする操作を行うと、吸着能力が低下することから、活性炭吸着塔の活性炭の表面に付着した泥

分除去のため逆洗を行うと、1,4-ジオキサンを吸着する能力が著しく低下する可能性が示唆された。

3.1.3 再生処理の検討結果

2.6.3に従い、メタノール洗浄と加熱処理の2方式で再生処理したところ、メタノール洗浄による再生では、図3に示すとおりメタノール洗浄後は半分程度の溶出液量で破過しており、1,4-ジオキサン吸着能力は新品時の65%程度

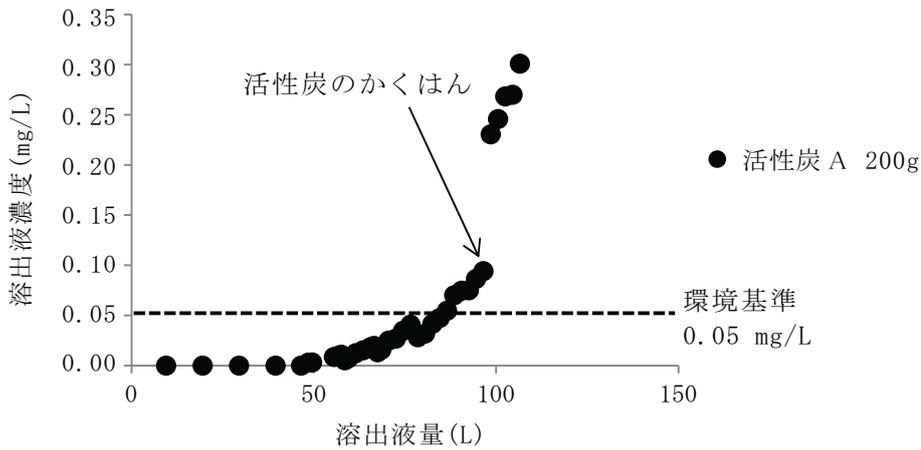


図2 活性炭の逆洗に伴う溶出液濃度の変化

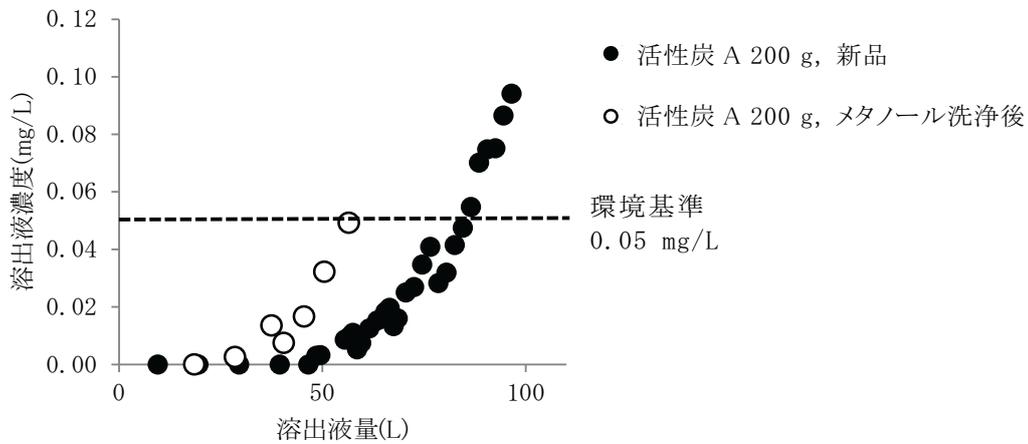


図3 メタノール洗浄による活性炭の回復

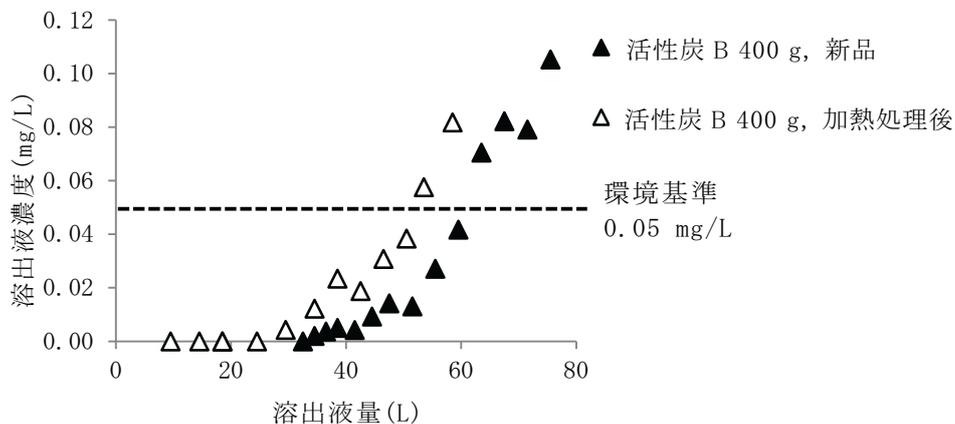


図4 加熱処理による活性炭の回復

までしか回復しなかった。加熱処理では図4に示すとおり新品時の87 %程度まで回復した。

3.1.4 活性炭の量及び積層厚の比較結果

2.6.4に従い活性炭の充填量及びカラム径と溶出液濃度を比較した結果の関係を図5に示す。同じφ50 mmカラムで200 g充填と400 g充填を比較すると、200 gでは87 Lで破過したのに対し、400 gでは249 Lで破過し、活性炭の使用量は2倍であるが、破過するまでの通水量は3倍近くにまで増加した。

一方、同じ400 g充填でφ50 mmカラムとφ100 mmカラムを比較すると、φ50 mmカラムでは249 Lで破過したのに対し、φ100 mmでは178 Lで破過する直前となり、φ50 mmカラムの約7割程度となった。

これらのことから、同じ活性炭を用いた場合でも、積層厚による影響を受け、積層厚が厚いほど除去率が高くなることがわかった。

破過するまでの通水量が最も多かった2.6.4の②（活性炭A、φ50 mmカラム、400 g充填）の結果を活性炭吸着塔の規模にスケールアップして計算をしたところ、1,4-ジオキサン1 mg/Lの排水を100 m³/日（3000 m³/月）処理するために必要な活性炭量は1か月当たり4900 kgとなった。処理する1,4-ジオキサン濃度によって必要な活性炭量は異なるが、水処理施設の活性炭吸着塔の活性炭を高頻度で交換する必要があると考えられ、活性炭吸着での1,4-ジオキサンの処理はコストの点から実用化は難しいと判断された。

3.2 フェントン処理による1,4-ジオキサン処理試験結果

3.2.1 試薬添加量の検討結果

2.7.1に従い、文献の条件で検証したところ、20分後の1,4-ジオキサンの残存率が25 %（除去率75 %）であり、ほぼ文献どおりの結果であった。また、各試薬の濃度を文

献の半分にして検討を行った結果、1,4-ジオキサンの初期濃度50 mg/Lに対し20 分後の濃度は17.5 mg/L、残存率35 %（除去率65 %）であり、試薬量が半分でも除去効果が認められた。

3.2.2 模擬排水を用いた検討結果

2.7.2に従い、20 分後の1,4-ジオキサンの濃度を測定した。結果は表1のとおりであり、1,4-ジオキサンが文献の1/100であるため、③の条件（文献の1/10の試薬量）でも20分後の残存率10 %（除去率90 %）と文献よりも高い除去率であり、②の条件（文献の1/5の試薬量）では20 分後には検出下限値（0.01 mg/L）以下となったものと考えられた。

3.2.3 反応時間の検討結果

3.2.2の④の結果でも20分後の除去率70 %（残存率30 %）と一定の除去率が確認されたので、2.7.3に従い0分後から80分後まで20分毎に1,4-ジオキサンの濃度を測定した。

なお、フェントン処理後の鉄イオンを水酸化鉄として沈殿させて回収する場合は、発生する水酸化鉄スラッジの処理が問題となるため、鉄イオンの沈殿による回収を行わないこととした場合、④の条件での溶解性鉄含有量は2.8 mg/Lであった。（溶解性鉄含有量の一律排水基準：10 mg/L）

結果を図6に示す。約47 分で環境基準（0.05 mg/L）以下に減少させることが可能であった。このことから、実際の排水処理施設に④の条件（各試薬の濃度が文献値の1/20）が適用できた場合、滞留時間を50 分程度確保できれば、排水中に含まれる1 mg/Lの1,4-ジオキサンを環境基準以下まで処理できると考えられた。

3.2.4 今後の展望

今回は、250 mLの規模で試験をしたが、実際の排水処理施設に適用する場合、かくはんや光照射を試験と同等

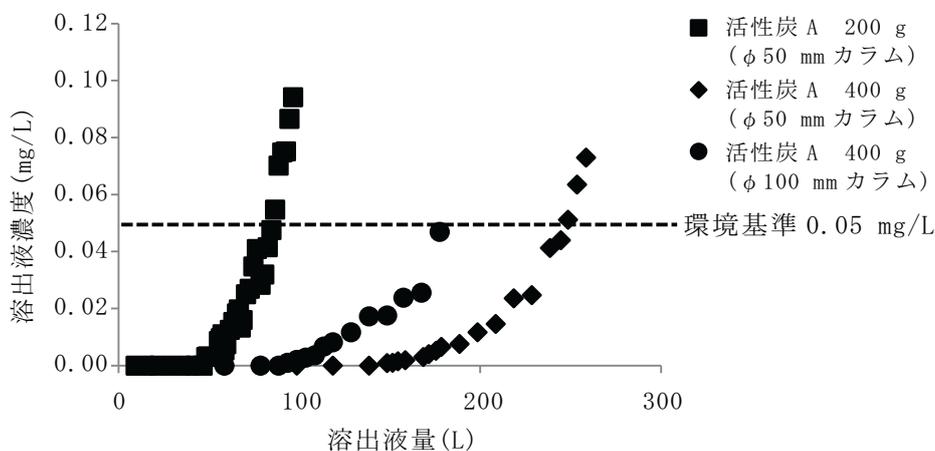


図5 活性炭の充填量及びカラム径と溶出液濃度

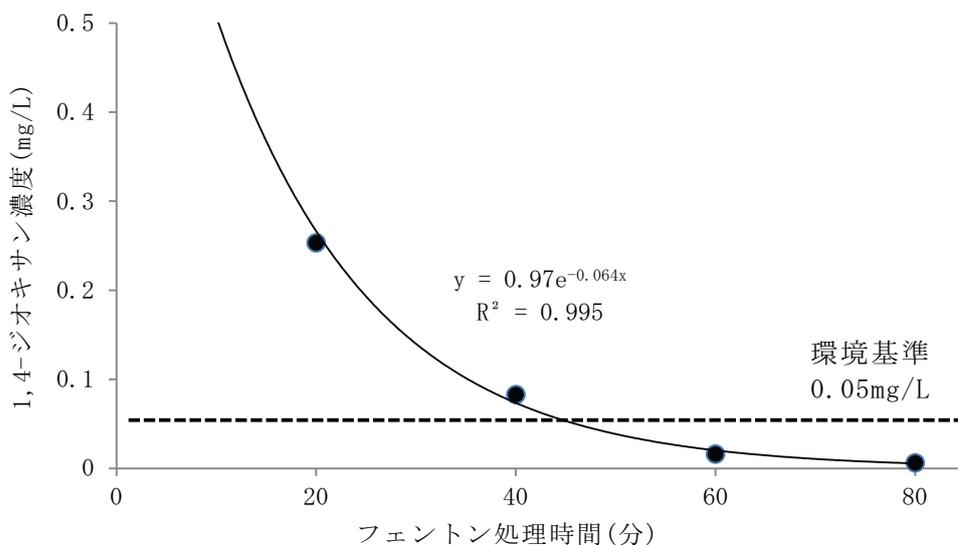


図6 フェントン処理時間と1,4-ジオキサン濃度の変化

の効率で実用化できるかを検証する必要がある。また、今回は文献の試薬量の比率で一括して試薬量を変更したが、排水の1,4-ジオキサン濃度や有機物成分に応じて最適な試薬（Fe（Ⅲ）イオン、過酸化水素及びしゅう酸）の量の比率があると考えられ、これについても検証の必要があると考えられる。

4 まとめ

活性炭カラム法及びフェントン処理法による1,4-ジオキサンの処理方法を検討し、次の結果を得た。

- ①活性炭の再生方法は、溶媒洗浄では吸着能力の回復が見られなかったが、加熱処理では新品時の87%程度まで回復が見られた。
- ②活性炭カラム法では、活性炭の種類のほか、積層厚も吸着能力に与える影響が大きかった。
- ③活性炭カラム法での結果を実際の規模で計算した場合、1,4-ジオキサン1 mg/Lの排水を100 m³/日処理するために必要な活性炭量は4900 kg/月であり、コストの点から実用化は難しいと判断された。
- ④フェントン処理では、模擬排水中に含まれる1,4-ジオキサン1 mg/Lを文献の1/5の試薬濃度で20分反応させることで検出下限値以下まで分解できた。
- ⑥フェントン処理では、1 mg/Lの1,4-ジオキサンでは、溶解性鉄の濃度が排水基準値以下となる文献の1/20の試薬濃度でも、反応時間を50分程度にすることで、1,4-ジオキサンを環境基準以下まで処理することが可能であった。

文 献

- 1) 環境省環境保健部環境リスク評価室：1,4-ジオキサン，化学物質の環境リスク評価第2巻，112-126，2003
- 2) 環境省：最終処分場の1,4-ジオキサン濃度とその処理技術（中央環境審議会廃棄物・リサイクル部会 廃棄物処理基準等専門委員会（第3回）資料2-3参考1），https://www.env.go.jp/council/former2013/03haiki/y0323-03/mat02_3-2.pdf（2019.12.11アクセス）
- 3) 環境省：1,4-ジオキサンの処理技術に関する状況（中央環境審議会水環境部会 排水規制等専門委員会（第4回）資料7），<https://www.env.go.jp/council/09water/y0912-04/mat07.pdf>（2019.12.11アクセス）
- 4) 浦山豊弘，吉岡敏行，林 隆義：活性炭による1,4-ジオキサンの処理方法の基礎的検討，岡山県環境保健センター年報，42，19-22，2018
- 5) 前川 淳：促進酸化を利用した難分解性有機物の新規酸化分解法に関する研究，京都大学学術情報リポジトリ（KURENAI），DOI:10.14989/doctor.k18953，2015

【資 料】

人形峠周辺の環境放射線等測定に係る補完調査－野菜・精米－（第1報）
Complement Survey of Environmental Radiation Level around Ningyotoge
－ Vegetables and Polished rice －（1st Report）

蜂谷博郎, 加藤大貴, 信森達也（放射能科）

HACHIYA Hiroo, KATOU Daiki, NOBUMORI Tatsuya（Environmental Radiation Section）

要 旨

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構人形峠環境技術センター周辺の環境放射線等測定結果を評価する上で参考となるデータの蓄積を目的として、平成30～令和2年度の3年間、県内で栽培された野菜（ホウレン草及びハクサイ）並びに精米を購入し、放射性核種（ウラン238（以下「U-238」という。）、ラジウム226（以下「Ra-226」という。））及びふっ素濃度を調査する。平成30年度に調査した結果、全ての試料のU-238、Ra-226及びふっ素濃度は人形峠周辺における監視測定結果と同程度であった。

[キーワード：環境放射線, ウラン238, ラジウム226, ふっ素]

[Key words：Environmental Radiation, U-238, Ra-226, Fluorine]

1 はじめに

岡山県では、国立研究開発法人日本原子力研究開発機構人形峠環境技術センター（以下「人形峠センター」という。）周辺において環境放射線等の監視測定（以下「監視測定」という。）を昭和54年度から継続して行っている。監視測定対象項目である野菜や精米に含まれる放射性核種（ウラン238（以下「U-238」という。）、ラジウム226（以下「Ra-226」という。））及びふっ素濃度のデータは、人形峠センター周辺の測定結果は十分なデータの蓄積があるが、全国的なデータ等については過去に報告されている文献が少ない。

そこで、人形峠センター周辺における環境放射線等の測定結果を評価する上で参考となるデータを蓄積することを目的として、監視測定に用いている野菜（ホウレン

草及びハクサイ）並びに精米を対象として岡山県内の環境放射線等の濃度レベルの調査を実施したので、その結果を報告する。

2 調査方法

2.1 試料入手方法, 調査時期及び検体数

試料入手に当たっては、県内全域を対象とし、農業協同組合直売所等から地域の偏りがないよう購入した。また、調査時期及び検体数については、上半期にホウレン草を6検体、下半期にハクサイ及び精米をそれぞれ7検体とした。

2.2 測定項目, 測定方法等

測定項目、測定方法及び使用した測定機器を表1に示す。監視測定では、U-238、Ra-226及びふっ素濃度について、

表1 測定項目, 測定方法, 測定機器一覧

測定項目	測定方法	測定機器
U-238	TBP 抽出分離法＋ α線スペクトロメトリ法	α線波高分析装置 (CANBERRA 製 α-Analyst)
Ra-226	EDTA-4Na 分解・BaSO ₄ 再沈法 ＋全 α 計数法	2π ガスフロー自動測定装置 (日立アロカティイカル製 LBC-4311B)
ふっ素	ふっ素イオン電極法	ふっ素イオンメーター (サーモフィッシャーサイエンティフィック製 VERSA STAR)

文部科学省放射能測定法シリーズ¹⁾に準拠して試料の採取及び前処理を行い、測定については、U-238及びRa-226濃度は同シリーズに準拠し、ふっ素濃度はふっ素イオン電極法²⁾に準拠して測定しており、本調査においても同じ測定項目、測定方法によった。

2.3 放射性核種及びふっ素濃度の測定

ハウレン草は根部を取り除いた葉部及び茎部を、ハクサイは根部及び芯を取り除いた葉部を分析対象試料とし、それぞれ水洗後に生重量を測定し、前処理を行った。精米については生重量を測定後、前処理を行った。U-238及びRa-226の濃度測定に供する試料の前処理は、試料を熱風循環式乾燥装置(富士科学器械製 S7P)で十分に乾燥し、消煙脱臭装置付電気炉(東京技術研究所製 TFF80-C)で灰化し、灰試料とした。ふっ素濃度測定に供する試料の前処理は、ハウレン草及びハクサイは、定常恒温器(ヤマト科学製 DK63)で試料を十分に乾燥し、乾燥試料とした。精米は、超遠心粉碎機(Retsch ZM200)で粉碎した後、定常恒温器で試料を十分に乾燥し、乾燥試料とした。

U-238濃度測定については、 α 線波高分析装置(CANBERRA製 α -Analyst)を用いた。

Ra-226濃度測定については、 2π ガスフロー自動測定装

置(日立アロカメディカル製LBC-4311B)を用いた。

ふっ素濃度測定については、ふっ素イオンメーター(サーモフィッシャーサイエンティフィック製VERSA STAR)を用いた。なお、ふっ素濃度測定については、水分率から生重量当たりのふっ素濃度への換算も行った。

3 調査結果

各試料の測定結果と、比較のための人形峠周辺における監視測定結果^{3)~7)}を表2~4に示す。

なお、放射線計測による測定結果については、計数誤差の3倍以上の場合を有意値とし、3倍未満の場合はND(不検出)と表記した。

ハウレン草の放射性核種及びふっ素濃度測定結果(表2)について、各検体のU-238濃度はND~0.004 Bq/kg生、Ra-226濃度は全ての検体で不検出、ふっ素濃度は0.1~0.4 mg/kg生であった。

ハクサイの放射性核種及びふっ素濃度測定結果(表3)については、各検体のU-238濃度は全ての検体で不検出、Ra-226濃度はND~0.05 Bq/kg生、ふっ素濃度は<0.3~0.05 mg/kg生であった。

精米の放射性核種及びふっ素濃度測定結果(表4)につ

表2 ハウレン草の放射性核種及びふっ素濃度測定結果

検体名	灰化率 (%)	U-238 (Bq/kg生)	Ra-226 (Bq/kg生)	ふっ素 (mg/kg)		
				乾	生 (換算値)	水分率 (%)
A	2.70	ND (0.004±0.002)	ND (0.05±0.02)	3.0	0.4	87.4
B	2.06	ND (0.001±0.001)	ND (0.01±0.02)	1.6	0.1	92.4
C	2.65	ND (0.004±0.002)	ND (0.00±0.02)	1.4	0.1	90.1
D	2.15	ND (0.002±0.001)	ND (0.05±0.02)	1.8	0.1	92.0
E	1.67	0.004 ± 0.001	ND (0.02±0.01)	3.6	0.2	93.4
F	1.70	ND (0.004±0.001)	ND (0.00±0.01)	2.5	0.2	93.6
測定値の範囲		ND ~ 0.004	ND	1.4 ~ 3.6	0.1 ~ 0.4	
調査地点	灰化率 (%)	U-238 (Bq/kg生)	Ra-226 (Bq/kg生)	ふっ素 (mg/kg)		
				乾	生 (換算値)	水分率 (%)
人形峠 周辺 (参考)	天王	0.016 ± 0.003	ND (0.02±0.01)	2.8	0.2	91.3
	赤和瀬	0.007 ± 0.002	ND (0.02±0.01)	8.6	0.6	92.7
	中津河	0.006 ± 0.002	ND (0.02±0.02)			
【参考】過去5年の測定値の範囲(H25~H29)		0.004 ~ 0.057	ND ~ 0.08	1.6 ~ 6.1	<0.3 ~ 0.5	

いては、各検体のU-238濃度、Ra-226濃度及びふっ素濃度はいずれも全ての検体で不検出であった。

表3 ハクサイの放射性核種及びふっ素濃度測定結果

検体	灰化率 (%)	U-238 (Bq/kg生)	Ra-226 (Bq/kg生)	ふっ素 (mg/kg)			
				乾	生 (換算値)	水分率 (%)	
A	0.53	ND (0.001±0.000)	0.05 ± 0.01	1.2	0.05	95.7	
B	0.57	ND (0.000±0.000)	ND (0.01±0.00)	0.5	0.02	96.0	
C	0.55	ND (0.000±0.000)	0.02 ± 0.01	0.3	0.01	96.8	
D	0.56	ND (0.000±0.000)	0.02 ± 0.01	0.4	0.02	95.1	
E	0.56	ND (0.000±0.000)	ND (0.01±0.00)	< 0.3	< 0.3	96.3	
F	0.55	ND (0.000±0.000)	ND (0.00±0.00)	0.5	0.02	95.9	
G	0.65	ND (0.000±0.000)	ND (0.00±0.00)	0.4	0.02	95.0	
測定値の範囲		ND	ND ~ 0.05	< 0.3 ~ 1.2	< 0.3 ~ 0.05		
調査エリア	調査地点	灰化率 (%)	U-238 (Bq/kg生)	Ra-226 (Bq/kg生)	ふっ素 (mg/kg)		
					乾	生 (換算値)	水分率 (%)
人形峠 周辺 (参考)	天王	0.73	ND (0.001±0.000)	0.03 ± 0.01	0.6	0.03	95.9
	赤和瀬	0.92	0.002 ± 0.001	0.03 ± 0.01	1.7	0.09	94.6
【参考】過去5年の測定値の範囲(H25~H29)			ND ~ 0.008	ND ~ 0.05	0.4 ~ 2.8	0.01 ~ 0.10	

表4 精米の放射性核種及びふっ素濃度測定結果

検体	灰化率 (%)	U-238 (Bq/kg生)	Ra-226 (Bq/kg生)	ふっ素 (mg/kg)			
				乾	生 (換算値)	水分率 (%)	
A	0.72	ND (0.000±0.000)	ND (0.00±0.00)	< 0.3	< 0.3	14.4	
B	0.53	ND (0.000±0.000)	ND (0.01±0.00)	< 0.3	< 0.3	13.0	
C	0.54	ND (0.000±0.000)	ND (0.01±0.00)	< 0.3	< 0.3	14.1	
D	0.54	ND (0.000±0.000)	ND (0.01±0.00)	< 0.3	< 0.3	13.8	
E	0.57	ND (0.000±0.000)	ND (0.00±0.00)	< 0.3	< 0.3	10.7	
F	0.62	ND (0.000±0.000)	ND (0.00±0.00)	< 0.3	< 0.3	14.1	
G	0.55	ND (0.000±0.000)	ND (0.00±0.00)	< 0.3	< 0.3	14.9	
測定値の範囲		ND	ND	< 0.3	< 0.3		
調査エリア	調査地点	灰化率 (%)	U-238 (Bq/kg生)	Ra-226 (Bq/kg生)	ふっ素 (mg/kg)		
					乾	生 (換算値)	水分率 (%)
人形峠 周辺 (参考)	天王	0.67	ND (0.000±0.000)	ND (0.00±0.00)	< 0.3	< 0.3	15.1
	赤和瀬	0.79	ND (0.000±0.000)	ND (0.02±0.01)	< 0.3	< 0.3	13.6
	中津河	0.55	ND (0.000±0.000)	ND (0.01±0.00)			
【参考】過去5年の測定値の範囲(H25～H29)			ND	ND	< 0.3	< 0.3	

4 まとめ

3に示す調査結果を人形峠周辺における監視測定結果と比較すると、全ての試料のU-238濃度、Ra-226濃度及びふっ素濃度は同程度であった。

なお、次年度も引き続き調査を実施し、継続的にデータを蓄積したいと考えている。

- 6) 岡山県：人形峠周辺の環境放射線等測定報告書，40，2018
- 7) 岡山県：人形峠周辺の環境放射線等測定報告書，41，2019

文 献

- 1) 文部科学省：放射能測定法シリーズ
http://www.kankyo-hoshano.go.jp/series/pdf_series_index.html (2019.7.30アクセス)
- 2) 柳沢三郎：植物体中のフッ化物の測定法の検討，環境保健レポート，8，33-37，1972
- 3) 岡山県：人形峠周辺の環境放射線等測定報告書，37，2015
- 4) 岡山県：人形峠周辺の環境放射線等測定報告書，38，2016
- 5) 岡山県：人形峠周辺の環境放射線等測定報告書，39，2017

【調査研究】

志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査（平成30年度）
Epidemiological Investigation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (FY2018)

森本晃司, 仲 敦史, 河合央博, 中嶋 洋, 狩屋英明（細菌科）

Koji Morimoto, Atsushi Naka, Hisahiro Kawai, Hiroshi Nakajima, Hideaki Kariya (Bacteriology Section)

要 旨

岡山県内で発生する志賀毒素産生性大腸菌（以下「STEC」という。）感染症の感染源及び感染経路の究明、また発生予防対策及び感染拡大防止対策の一助とすることを目的として、平成30年度にヒトから分離されたSTEC菌株を疫学情報とともに収集し、性状解析を実施した。その結果、ヒト由来株70株のうち、O血清群（以下「O」という。）157が34株（48.6%）、O26が28株（40.0%）であり、例年よりもO26株の検出率が高かった。反復配列多型解析法によるクラスター解析では、41株が14種類のクラスターに分類された。また、薬剤感受性試験では、STEC感染症治療の第一選択薬の一つであるホスホマイシンに対する耐性株が3株確認され、1株からホスホマイシン不活化酵素が検出されたが、他の2株は別の耐性機構が疑われた。

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

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

1 はじめに

志賀毒素産生大腸菌（以下「STEC」という。）感染症は、時に生命を脅かす重篤な症状に至る場合があり、また多くの自治体に渡る広域的な感染拡大を示すこともあるなど、保健衛生上注目すべき感染症である。例年、全国的に多くの患者が報告されており、県内でも毎年約70件程度の散発事例が発生している。しかしながら、感染源や感染経路の特定が困難なため、効果的な感染予防や拡大防止対策を講じることが難しい現状にある。そこで、当センターではこれらの対策の一助とすることを目的として、県内で発生したSTEC感染症について、分離菌株の性状を詳細に解析し、疫学情報を加えたデータベースを構築している。これまでも反復配列多型解析法¹⁾ (multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis, 以下「MLVA法」という。)及びIS-printing system (以下「IS法」という。)によるDNA解析結果や薬剤耐性試験結果の蓄積を行ってきたが^{2)~4)}、今年度はパルスフィールドゲル電気泳動法（以下「PFGE法」という。）による解析結果も一部の株で追加し、データベースの更なる充実化を図ったので報告する。

2 材料及び方法

2.1 菌株及び疫学情報

県内の保健所、医療機関、検査機関等でSTEC感染者から分離されたヒト由来株70株を対象とした。患者の疫学情報については、保健所から提供を受けた。

2.2 検査法

2.2.1 血清型別試験

病原性大腸菌免疫血清（デンカ生研）を用いて血清型別試験を実施し、O血清群（以下「O」という。）及びH血清型（以下「H」という。）を決定した。また、市販血清で同定できなかった菌株の血清型別試験は、国立感染症研究所に依頼した。

2.2.2 志賀毒素遺伝子及びインチミン遺伝子検出試験

志賀毒素遺伝子（以下「*stx*」という。）及びインチミン遺伝子（以下「*eae*」という。）の検出は、井口らの報告した方法⁵⁾に準拠し、*stx1*、*stx2*及び*eae*の3種類の遺伝子を対象としたマルチプレックスPCR法により実施した。

2.2.3 *stx*サブタイプ型別試験

*stx*サブタイプ型別試験は、Scheutzらの報告した方法⁶⁾に準拠し、*stx1*は3種類（*stx1a*、*stx1c*、*stx1d*）、*stx2*は7種類（*stx2a*、*stx2b*、*stx2c*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f*、*stx2g*）を型別するPCR法により実施した。

2.2.4 MLVA法、PFGE法及びIS法によるDNA型別

O26、O111及びO157株のDNA型別については、MLVA法による解析（以下「MLVA型」という。）を実施した。

他の株については、PFGE法による解析を国立感染症研究所に依頼した。また、一部の O26株については、当センターでPFGE法による解析を実施した。制限酵素は *Xba* I を使用し、マーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812株を用いた。

O157株については、更にIS法によってDNA型（以下「IS型」という。）を決定した。PCR法による目的遺伝子増幅後、まずは2種類のプライマーセット（1st set primer及び2nd set primer）について、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」として数値化した。次に、各プライマーセットについて、この数値を高分子量側から並べ、3バンド毎に「1」、「2」、「4」の係数を順に乘じた。最後に、1st set primerから2nd set primerの順に、3バンド毎の加算値を並べてIS型（12桁の文字列）とし、菌株間の解析を実施した。

2.2.5 ヒト由来STECのクラスター解析

MLVA型が一致したものを同一クラスターとして分類した。なお、リピート数が1遺伝子座で異なる single locus variant等、関連性が推測される型をまとめた様式であるコンプレックス（以下「MLVAコンプレックス」という。）が一致した場合も同一クラスターに分類した。また、O157株についてはIS型、O26株の一部はPFGE法の結果を加えて解析した。

2.2.6 薬剤感受性試験

センシ・ディスク（日本バクテック・ディッキンソン）を用い、Kirby-Bauer法により薬剤感受性試験を実施した。薬剤はアンピシリン（ABPC）、セファゾリン（CEZ）、セフメタゾール（CMZ）、セフトキシム（CTX）、セフェピム（CFPM）、イミペネム（IMP）、メロペネム（MEPM）、カナマイシン（KM）、テトラサイクリン（TC）、クロラムフェニコール（CP）、ホスホマイシン（FOM）、ナリジクス酸（NA）、ノルフロキサシン（NFLX）、レボフロキサシン（LVFX）、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤（ST）の15種類を用いた。

2.2.7 ホスホマイシン不活化酵素の検出

薬剤感受性試験の結果、FOMに耐性を示した菌株については、Nakamuraらの方法⁷⁾に準拠し、ホスホマイシン不活化酵素（以下「GST」という。）の阻害剤であるホスホノギ酸を含有するディスクによるGST産生試験を実施

した。

3 結果及び考察

ヒト由来STECの月別検出状況を表1に示した。ヒト由来STECの検出数は、8月が最も多く13株（18.6%）であったが、6月から11月にかけて平均10.2株とあまり大きな増減は認められなかった。

ヒト由来STECの血清型、志賀毒素（以下「Stx」という。）型、*stx*サブタイプ、*eae*の有無及び感染者の症状を表2に示した。ヒト由来STECは、O157が34株（48.6%）、O26が28株（40.0%）と、例年と同様にこの2つの型が多く、全体の88.6%を占めた。特にO26は、例年よりも高い検出数及び検出率であった^{2)~4)}。これら以外の型では、O111が3株、O115、O137及びO174がそれぞれ1株、またO型別不能（以下「OUT」とする。）が2株検出された。Stx1型の32株は、全て*stx*サブタイプ*stx1a*であった。Stx2型の5株は、*stx2a*、*stx2b*、*stx2c*、*stx2d*及び*stx2a* + *stx2c*がそれぞれ1株であり、Stx1、2型の33株は、*stx1a* + *stx2a*が28株、*stx1a* + *stx2c*が5株であった。*eae*は66株（94.3%）が保有しており、保有していない4株は、全て無症状病原体保有者からの分離株であった。*eae*は、STEC感染症の発症及び重症化に関与するとされているが⁸⁾、本調査の結果は、*eae*保有株に感染した無症状病原体保有者が一部に認められたものの、おおむねこれに一致するものと考えられた。

今年度に菌株を収集したSTEC感染者数70名の内訳は、患者（有症者）が46名、無症状病原体保有者が24名であった。患者のうち、血便を呈した者（以下「重症者」という。）は28名であったが、溶血性尿毒症症候群を発症した者はいなかった。患者の60.9%が重症者であり、検出されたSTECは、O157:H7（Stx1、2、*stx1a* + *stx2a*）が12株（42.9%）と最も高く、次いでO26:H11（Stx1、*stx1a*）が7株（25.0%）であった。*stx1a*及び*stx2a*の両サブタイプ保有株は、全体的に有症者から検出される傾向が認められた。

ヒト由来STECのMLVA法等によるクラスター解析結果を表3に示した。STEC70株のうち41株が14種類（A～N）のクラスターに分類された。家族内感染や食中毒等、菌株間に疫学的関連性があるグループ事例は13件（グループ事例①～⑬）であった。O157株によるグループ事例5

表1 ヒト由来株の月別検出状況

月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
株数	3	0	12	9	13	7	9	11	2	0	1	3	70
%	4.3	0	17.1	12.9	18.6	10.0	12.9	15.7	2.9	0	1.4	4.3	

件（事例①, ③, ④, ⑤及び⑥）ではMLVA型及びIS型が、O26株によるグループ事例5件（事例⑦, ⑧, ⑨, ⑩及び⑪）及びO111株によるグループ事例1件（事例⑬）ではMLVA型が、各事例内の菌株間でそれぞれ完全に一致した。また、グループ事例②では、MLVA型は一致しなかったが、MLVAコンプレックス及びIS型が一致した。一般的に、疫学的関連性が強い場合、MLVAコンプレックスの一致は、菌株間に密接な関連性を有するものとして解釈される⁹⁾。グループ事例⑫については5株中1株のみがMLVA型及びMLVAコンプレックスが異なっていた。しかしながら、MLVAコンプレックスが「18c220」のサブコンプレックスである「18c220p」であったこと、また家族内感染を疑う事例であったことから、同一由来株又は近縁株であると考えられた。そのため、その株も同一クラスターに分類した。クラスターJ及びKでは、異なる事例間で同一のMLVA型又はMLVAコンプレックスとなった。特にクラスターJからは、グループ事例⑨及び⑩を含む9菌株が検出され、MLVA型及びPFGE型が一致した。

ヒト由来STECの薬剤感受性試験結果を表4に示した。15種類の薬剤のうちいずれかの薬剤に対して耐性を示し

た菌株が、70株中12株（17.1%）確認され、平成29年度（10.4%）と比較して高い検出率となった。このうち、O157は8株、O26は2株、O115及びOUTは各1株であった。昨年度はCTXに耐性を有するESBL産生O26が検出されたが⁴⁾、今年度は検出されなかった。他方、今年度はO157:H7（Stx2）1株及びO26:H11（Stx1）2株でFOM耐性が確認された。FOMは、NFLX、KM及びニューキノロン系抗菌薬とともにSTEC感染症治療の第一選択薬の一つとされ¹⁰⁾、臨床で極めて重要な抗菌薬である。そこで、FOM耐性の3株について、FOM不活化酵素であるGSTの産生試験を実施したところ、O26:H11（Stx1）の1株のみが陽性となった。このことから、他の2株については、別の機構による耐性を持つものと考えられる¹¹⁾。FOMをはじめとする第一選択薬に対する耐性菌は、STEC感染症の早期治療に支障をきたすだけでなく、感染拡大防止にも影響を及ぼす可能性があるため、今後も継続して調査を行う予定である。

広域的な食中毒事案の早期探知には、自治体、保健所等における詳細な病原体情報の共有が不可欠となっている。そのため、当センターでは、収集したSTECについて、DNA型、血清型、薬剤耐性等の菌株性状と疫学情報を併

表2 ヒト由来STECの性状及び感染者の症状

血清型	Stx型	stx サブタイプ	eae	株数(%)	患者数 (有症者 数)	重症者数		無症状 病原体 保有者数
						HUS*+血便	血便	
O26:H11	Stx1	stx1a	+	25(35.7)	16	0	7	9
	Stx1,2	stx1a+stx2a	+	3(4.3)	1	0	1	2
O111:H-	Stx1	stx1a	+	1(1.4)	0	0	0	1
	Stx1,2	stx1a+stx2a	+	2(2.9)	1	0	1	1
O115:H10	Stx1	stx1a	-	1(1.4)	0	0	0	1
O137:H41	Stx1	stx1a	+	1(1.4)	1	0	0	0
O157:H7	Stx1	stx1a	+	3(4.3)	2	0	2	1
	Stx2	stx2c	+	1(1.4)	1	0	1	0
	Stx1,2	stx1a+stx2a	+	23(32.9)	18	0	12	5
O157:H-	Stx1	stx1a	+	1(1.4)	1	0	0	0
	Stx2	stx2a+stx2c	+	1(1.4)	1	0	1	0
	Stx1,2	stx1a+stx2c	+	5(7.1)	4	0	3	1
O174:H21	Stx2	stx2d	-	1(1.4)	0	0	0	1
OUT:H25	Stx2	stx2a	-	1(1.4)	0	0	0	1
OUT:H45	Stx2	stx2b	-	1(1.4)	0	0	0	1
計				70	46	0	28	24

* 溶血性尿毒症症候群

せた菌株データベースの構築を進めている。今後は、食品衛生部門及び感染症部門との情報共有化をはじめとし

た網羅的な疫学情報を収集できる体制の構築が必要と考える。

表3 ヒト由来STECのクラスター解析結果

クラスター	血清型 (Stx型)	菌株No.	事例種	MLVA型	MLVA コンプレックス	IS型	PFGE型
A	0157:H7 (Stx1,2)	1	グループ事例①	16m0039	18c016	717557611657	
		2					
B	0157:H7 (Stx1,2)	3	散発事例	17m0258		317575611657	
		4	散発事例				
C	0157:H7 (Stx1,2)	5	グループ事例②	18m0080	18c015	717577211657	
		6		18m0137			
D	0157:H7 (Stx1,2)	7	グループ事例③	18m0274		317577611657	
		8					
E	0157:H7 (Stx1,2)	9	グループ事例④	18m0451	18c051	317577611657	
		10					
F	0157:H7 (Stx1,2)	11	グループ事例⑤	18m0530		317577611657	
		12					
G	0157:H7 (Stx2)	13	グループ事例⑥	13m0285	18c008	305457211442	
		14					
H	026:H11 (Stx1)	15	グループ事例⑦	16m2062			
		16					
		17					
I	026:H11 (Stx1,2)	18	グループ事例⑧	18m2013			
		19					
		20					
J	026:H11 (Stx1)	21	グループ事例⑨	18m2024			同一バンドパターン
		22					
		23	グループ事例⑩				
		24					
		25	散発事例				
		26	散発事例				
		27	散発事例				
		28	散発事例				
29	散発事例						
K	026:H11 (Stx1)	30	散発事例	18m2051	18c210		
		31	散発事例	18m2064			
L	026:H11 (Stx1)	32	グループ事例⑪	18m2089			
		33					
M	026:H11 (Stx1)	34	グループ事例⑫	18m2113	18c220		
		35					
		36					
		37		18m2153	18c220p		
		38					
39							
N	0111:H- (Stx1,2)	40	グループ事例⑬	18m3045			
		41					

表4 ヒト由来STECの薬剤感受性試験結果 (O血清群別)

O血清型	株数	耐性株数	血清型 (Stx型)	薬剤耐性パターン (株数)
0157	34	8	0157:H- (Stx1)	GP (1)
			0157:H- (Stx1, 2)	ABPC・TC・ST (1)
			0157:H7 (Stx1, 2)	ABPC (2)
			0157:H7 (Stx1, 2)	GP (2)
			0157:H7 (Stx1, 2)	TC・ST (1)
			0157:H7 (Stx2)	ABPC・FOM (1)
026	28	2	026:H11 (Stx1)	FOM (2)
0115	1	1	0115:H10 (Stx1)	ABPC・KM・TC・ST (1)
OUT	2	1	OUT:H45 (Stx2)	TC・NA (1)
0111	3	0		
0137	1	0		
0174	1	0		
計	70	12		

謝 辞

本調査の実施に際して、MLVA型別等をお願いしました国立感染症研究所の泉谷秀昌先生、伊豫田淳先生、菌株の分与に御協力いただきました関係機関の先生方に感謝いたします。

文 献

- Izumiya, H., Yingxin, P., Terajima, J., Ohnishi, M., Hayashi, T. et al. : New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups : O157, O26, and O111, *Microbiol. Immunol.*, 54, 569-577, 2010
- 河合央博, 大島律子, 檀上博子, 中嶋 洋, 井上 勝: 感染予防対策に向けたヒト及び環境等における感染症起炎菌の調査 (平成27年度), 岡山県環境保健センター年報, 40, 51-56, 2016
- 河合央博, 仲 敦史, 畑ますみ, 中嶋 洋: 志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査 (平成28年度), 岡山県環境保健センター年報, 41, 51-57, 2017
- 仲 敦史, 河合央博, 中嶋 洋, 狩屋英明: 志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査 (平成29年度), 岡山県環境保健センター年報, 42, 35-42, 2018
- 井口 純, 秋吉充子, 伊豫田淳, 大西 真: 腸管出血性大腸菌の主要なO血清群と病原性遺伝子を判定するOne-shotマルチプレックスPCR法の開発と評価, *日本食品微生物学会雑誌*, 32 (4), 215-218, 2015
- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G. et al. : Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature, *J. Clin. Microbiol.*, 50, 2951-2963, 2012
- Nakamura, G., Wachino, J., Sato, N., Kimura, K., Yamada, K. et al. : Practical Agar-Based Disk Potention Test for Detection of Fosfomycin-Nonsusceptible *Escherichia coli* Clinical Isolates Producing Glutathione S-Transferases, *J. Clin. Microbiol.*, 52, 3175-3179, 2014
- 仲西寿男, 丸山 務監修: 食品由来感染症と食品微生物, 281-296, 中央法規出版, 東京, 2009
- 泉谷秀昌: 腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について, *獣医公衆衛生研究*, 20-2, 6-11, 2018
- 厚生労働省: 一次, 二次医療機関のための腸管出血性大腸菌 (O157等) 感染症治療の手引き改訂版 (平成9年8月),

<https://www.mhlw.go.jp/www1/houdou/0908/h0821-1.html> (2019.3.29 アクセス)

- 11) 小原康治, 橋本 一: 臨床分離株を中心としたホスホマイシンの耐性機序, *Jpn. J. Antibio.*, 49, 533-543, 1996

【調査研究】

腸管出血性大腸菌の検査におけるMLVA法の整備

Study on Introduction of Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Examination in a Prefectural Institute

河合央博, 森本晃司, 仲 敦史, 中嶋 洋, 狩屋英明 (細菌科)

KAWAI Hisahiro, MORIMOTO Koji, NAKA Atsushi, NAKAJIMA Hiroshi, KARIYA Hideaki
(Bacteriology Section)

要 旨

腸管出血性大腸菌（以下「EHEC」という。）O157, O26, O111の反復配列多型解析法（multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis, 以下「MLVA法」という。）による検査の整備を行った。MLVA法の検査精度の確認のため、平成30年度に収集したEHECの65株について、当センターと国立感染症研究所（以下「感染研」という。）の解析結果（17遺伝子座のリピート数）を比較した。その結果、56株（86.2%）で結果が一致したが、9株（13.8% 内訳：O157株：2株、O26株：7株）はそれぞれ1か所の遺伝子座のリピート数が異なった。結果が異なったO157株のうち1株は、菌の継代時のDNA複製エラーによってリピート数が変化しと考えられたが、他の1株については原因の特定には至らなかった。O26株は、7株全てで遺伝子座O157-37でのリピート数が異なり、当センターでは増幅産物が確認できなかった。これは、これらの菌株の遺伝子座O157-37でのPCR増幅効率の悪さが原因と考えられたが、通常のマルチプレックスPCRと並行してプライマー組成を変更した追加のマルチプレックスPCRを実施することで解消された。以上のことから、当センターで整備したMLVA法は、一部の株の一部の遺伝子座で感染研の結果と異なったものの、その精度はおおむね良好であると考えられた。また、菌の継代によるMLVA法への影響を調査したところ、頻度としては非常にまれであるが、1回の継代であってもリピート数に変化が生じ得ることが確認された。そのため、MLVA法による解析に当たっては、菌株の継代の回数を極力減らすことが望ましいと考える。

[キーワード：腸管出血性大腸菌, 反復配列多型解析法, 疫学調査]

[Key words : Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis, epidemiological investigation]

1 はじめに

腸管出血性大腸菌（以下「EHEC」という。）感染症は、時に生命を脅かす重篤な症状に至る場合があり、また多くの自治体に渡る広域的な感染拡大を示すこともあるなど、保健衛生上注目すべき感染症である。例年、全国的に多くの患者が報告されており、岡山県でも毎年約60件程度の事例が発生している。その多くは散发事例であり、実地疫学調査では感染源の特定ができないケースが多い。しかし、食品流通が進展した近年、広域流通食品を原因とした多数の自治体をまたぐ食中毒事例のようなdiffuse outbreak（散在的集団発生）が問題となっており、一見散发事例と思われる事例が同一の集団事例の1つであることもある。このようなdiffuse outbreakや集団事例の感染源究明には、実地疫学調査と併せた分子疫学解析が有効となる。反復配列多型解析法¹⁾ (multiple-locus

variable-number tandem-repeat analysis, 以下「MLVA法」という。)は、近年注目されている分子疫学解析法であり、複数の遺伝子座のリピート配列をPCR法によって増幅し、高精度な電気泳動によって解析・数値化して遺伝子型別を行う手法である。従来から実施されてきたIS-printing法と比較して型別能に優れ、パルスフィールドゲル電気泳動（以下「PFGE法」という。）と比較しても同等の型別能を有し、かつ検査日数が短い。更には、検査結果が数値化できるため、施設間での比較や共有化も容易であるといったメリットがある。他方、MLVA法による解析には、手技、試薬、機器等、全ての要素に対して高い精度が要求される。また、同一集団事例からの分離株であるにも関わらず遺伝子型が一致しないことがあり、そのほとんどが1か所の遺伝子座でのリピート数が異なるsingle-locus variant（以下「SLV」という。）で、これは

菌が増殖する際のDNA複製エラーに起因するとされる²⁾。これらのことから、結果の解釈に当たっては細心の注意が必要である。

当センターでは、これまでPFGE法又はIS-Printing法によりEHECの分子疫学解析を行ってきたが、今回、高精度の解析結果をより迅速に行政に還元するため、MLVA法を導入した。平成28年度から平成29年度の間に必要な試薬・機器等の整備を行ったが、MLVA法の実用化に当たっては、分離株を用いた検証による問題点の把握や精度の確認が必要不可欠である。そこで、平成30年度に岡山県内で分離されたヒト由来EHECの65株について、MLVA法による解析を行うとともに、国立感染症研究所(以下「感染研」という。)にも解析を依頼し、それぞれの解析結果を比較した。また、菌の継代による解析対象遺伝子座のリピート数への影響を評価するため、継代前後の菌株の解析結果を比較した。

2 方法

2.1 菌株

平成30年度に県内で分離されたヒト由来EHECの65株(O157:34株, O26:28株, O111:3株)を解析対象とした。

2.2 MLVA法

MLVA法は、EHECのうち主要なO157, O26, O111に

ついて、既報の方法^{1), 3)}に準じた方法(以下「通常法」という。)で実施した。すなわち、菌株を滅菌超純水に浮遊し、100℃10分間加熱してDNAテンプレートを作成した。次に、解析対象とする17か所の遺伝子座(EH111-11, EH111-14, EH111-8, EH157-12, EH26-7, EHC-1, EHC-2, EHC-5, EHC-6, O157-3, O157-34, O157-9, O157-25, O157-17, O157-19, O157-36, O157-37)について、2種類のマルチプレックスPCRを行った。各プライマーミックスの組成、PCR反応液の組成及びPCR条件を表1に示す。増幅産物は、シーケンサーを用いた高精度電気泳動によってフラグメント解析を行い、各遺伝子座のリピート数を決定した。なお、サーマルサイクラーはVeriti Thermal Cycler (Applied Biosystems)、シーケンサーは3500 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)、フラグメント解析ソフトはGeneMapper Software v4.1 (Applied Biosystems)を使用した。

2.3 フラグメント解析の最適化

当センターにおけるフラグメント解析の最適化に当たり、平成29年度以前に感染研でMLVA解析を実施した県内分離ヒト由来EHECの161株(O157:128株, O26:25株, O111:8株)の結果を、各遺伝子座のリピート数の指標とした。これらの株について、当センターの試験環境で各遺伝子座のマルチプレックスPCRを行い、

表1 MLVA法におけるマルチプレックスPCR法(通常法)の条件

(1)反応液組成(μL)(1検体あたり)

テンプレート	1
H ₂ O	11.1
2×QIAGEN Multiplex PCR Master Mi (Qiagen multiplex PCR kit #206143)	12.5
プライマーミックス	0.4
計	25

(2)PCR反応条件

95℃ 15分
↓
95℃ 20秒
60℃ 90秒
72℃ 60秒
↓
72℃ 10分

(35サイクル)

(3)プライマーミックス組成

①プライマーミックス1

*各プライマーは100μM

遺伝子座	Forward			Reverse	
	プライマー名	蛍光	添加量(μL)	プライマー名	添加量(μL)
EHC-2	EHC-2F	VIC	1	EHC-2R	1
O157-25	O157-25F	PET	1	O157-25R	1
O157-9	O157-9F	VIC	1	O157-9R1	3
				O157-9R	2
EH157-12	EH157-12F	PET	1	EH157-12R	1
EH111-8	EH111-8F1	PET	0.75	EH111-8R1	0.75
	EH111-8F	PET	0.75	EH111-8R	0.75
EHC-1	EHC-1F	VIC	1	EHC-1R	1
EHC-5	EHC-5F	NED	1	EHC-5R	1
O157-3	O157-3F	NED	1	O157-3R	1
O157-34	O157-34F	6-FAM	1	O157-34R	2
計			9.5	計	14.5

+ TE 76μL
計 100μL

②プライマーミックス2

*各プライマーは100μM

遺伝子座	Forward			Reverse	
	プライマー名	蛍光	添加量(μL)	プライマー名	添加量(μL)
EH26-7	EH26-7F	PET	2	EH26-7R	2
O157-19	O157-19F	NED	1	O157-19R	1
EH111-11	EH111-11F	6-FAM	1	EH111-11R	1
EHC-6	EHC-6F	NED	1	EHC-6R	1
O157-37	O157-37F	PET	1	O157-37R	1
O157-17	O157-17F	VIC	1	O157-17R	1
O157-36	O157-36F	NED	1	O157-36R	1
EH111-14	EH111-14F	6-FAM	1	EH111-14R	1
計			9	計	9

+ TE 82μL
計 100μL

GeneMapper Software v4.1を用いて増幅産物の大きさを求め、指標のリピート数と紐付けすることでリピート数の判定範囲となるBinを設定した。指標に存在しなかったリピート数のBinについては、感染研から別途提供されたBin Setデータを参考にして設定し、Bin Setデータにも存在しなかったリピート数のBinについては、設定済みのBinからリピートサイズを基に算出して設定した。また、各Binのoffsetについては、基本的に遺伝子座のリピートサイズが10 bp以下の場合は1 (±1)、10 bpを超えた場合はその数値の1/10に設定した。

2.4 MLVA法の検査精度の確認

平成30年度に県内で分離されたヒト由来EHECの65株(O157:34株, O26:28株, O111:3株)について、当センターの試験環境に最適化したMLVA法により解析し、感染研の解析結果と比較して検査精度、問題点等を把握した。なお、増幅産物のピークがBinの範囲から外れた場合、近傍のBinのリピート数を採用した。また、1か所の遺伝子座に複数のピークが認められた場合は、最も高いピークが示すリピート数を採用した。

2.5 PCR増幅効率の低い遺伝子座に対するマルチプレックスPCR追加法

通常法で増幅効率が低い遺伝子座について、通常法と並行して追加のマルチプレックスPCR(以下「追加法」という。)を実施した。O157株には、遺伝子座O157-34及びEH111-8に対応するプライマーミックス3を(組成は表2-①に示す。)、O26株及びO111株には、遺伝子座O157-37, O157-9, EH26-7にそれぞれ対応するプライマーミックス4(組成は表2-②に示す。)を使用した。

また、O26株の遺伝子座O157-37での増幅効率を確認するため、単独プライマーセットによるPCR法も実施した。

この場合のプライマー組成は、プライマーミックス4におけるO157-37プライマー以外を全てTE bufferに置き換えた。

2.6 菌の継代による解析結果への影響の評価

EHECの12株(O157:9株, O26:2株, O111:1株)について、TSA平板培地で37℃で一晩培養後、1個の単独コロニーを釣菌し、これを起点株とした。次に、この起点株を再度TSA平板培地で同様に培養し、それぞれ8個の単独コロニーを無作為に釣菌したものを継代株とした。起点株12株及び継代株96株をそれぞれMLVA法で解析し、継代前後の結果を比較することで菌の継代による解析対象遺伝子座のリピート数への影響を評価した。

3 結果及び考察

3.1 MLVA法の検査精度の確認

平成30年度に収集したEHECの65株をMLVA法で解析した結果、増幅産物のピークが認められた遺伝子座は、全1105か所(65株×17遺伝子座)のうち816か所であった。このうち1か所は、増幅産物のピークがBinの範囲から外れたため、近傍のBinが示すリピート数を採用した。これらを感染研の結果と比較したところ、56株(86.2%)については、17遺伝子座におけるリピート数の組み合わせ(以下「MLVAパターン」という。)が完全に一致した。しかし、残りの9株については、それぞれ1か所の遺伝子座でリピート数が異なっていた(表3)。このうち、O157株No.2071は、遺伝子座EHC-6のリピート数が異なった。この結果は、再検査でも変わらなかったことから、菌の継代時のDNA複製エラーによってリピート数が変化したのではないかと考えられた。O157株No.2089は、遺伝子座O157-37のリピート数が異なった。この株の遺伝子座

表2 MLVA法におけるマルチプレックスPCR追加法の条件

①プライマーミックス3 (O157株用プライマーセット)

*各プライマーは100μM

遺伝子座	Forward			Reverse	
	プライマー名	蛍光	添加量(μL)	プライマー名	添加量(μL)
EH111-8	EH111-8F1	PET	1.1	EH111-8R1	1.1
	EH111-8F	PET	1.1	EH111-8R	1.1
O157-34	O157-34F	6-FAM	1.5	O157-34R	3
	計		3.7	計	5.2

+ TE 91.1μL
計 100μL

②プライマーミックス4 (O26株, O111株用プライマーセット)

*各プライマーは100μM

遺伝子座	Forward			Reverse	
	プライマー名	蛍光	添加量(μL)	プライマー名	添加量(μL)
EH26-7	EH26-7F	PET	3	EH26-7R	3
O157-37	O157-37F	PET	2	O157-37R	2
O157-9	O157-9F	VIC	1.5	O157-9R1	4.5
				O157-9R	3
	計		6.5	計	12.5

+ TE 81μL
計 100μL

O157-37では、リピート数が「5」及び「13」の2本のピークが認められ、当センターではより高いピークの「13」を採用したが、感染研では逆であった。今回、複数のピークを認めた遺伝子座を有する株は5株であったが、感染研の結果と異なったのはNo.2089のみであった。ピークの高さが施設間で異なった原因は、現段階では不明である。また、O26株No.2066を含む7株は、全株でMLVAパターンが一致したが、両施設で遺伝子座O157-37のリピート数が異なった。当センターではこの遺伝子座でピークが認められず、すなわち判定は「-2」（増幅産物なし）であったのに対し、感染研では「1」であった。これらの菌株について、遺伝子座O157-37の単独プライマーを用いて解析を行ったところ、リピート数「1」のピークが非常に小さいながらも認められた（図1）。このことから、これらの菌株は、遺伝子座O157-37の増幅効率が悪いために通常法でピークが認められなかったと考えられた。特定の遺伝子座でピークが低くなる現象については、O157株の遺伝子座O157-34及びEH111-8、O26株の遺伝子座O157-37、

O157-9及びEH26-7、O111株の遺伝子座O157-9で、それぞれ複数認められた（図2）。これらの遺伝子座のピークは、菌液濃度が低下するとさらに小さくなり、判定が困難になると推察された。そこで、通常法と並行して、特定の遺伝子座の増幅率向上を目的としたプライマー組成の追加法を実施した。その結果、どの株の遺伝子座においても、通常法と比較して明瞭なピークが得られた（図2）。このことから、この追加法は、当センターでのMLVA法実施において有用な補助手法になると考えられた。

3.2 菌の継代による解析結果への影響の評価

EHECの起点株12株及び継代株96株について、継代前後のMLVAパターンを比較したところ、継代株のうちO157株No.1940の1株及びNo.2000の1株でそれぞれMLVAパターンに変化が認められた（図3）。No.2000の変化は、遺伝子座EHC-6で生じ、リピート数は起点株の「14」が継代株で「15」となった。他の継代株7株は、全て起点株と同じMLVAパターンであったことから、この変化は菌の継代時に偶然生じたDNA複製エラーによるものと考え

表3 感染研のMLVAパターンと異なった株（内訳）

菌株No.	O血清型	遺伝子座	リピート数*		内容
			感染研	当センター	
2071	O157	EHC-6	14	13	リピート数の変化
2089	O157	O157-37	5	13	リピート数「5」及び「13」の2本のピークの高さが感染研と逆
2066	O26	O157-37	1	-2	全ての株でMLVAパターンが一致 当センターではピークが確認出来ず、「増幅産物なし」と判定
2067					
2068					
2069					
2072					
2073					
2074					

*「-2」:増幅産物なし

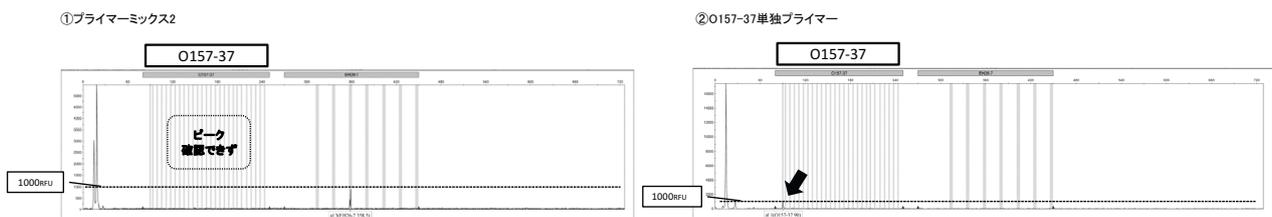


図1 O26株No.2066の遺伝子座O157-37における増幅産物のピーク
 (左側：①プライマーミックス2を用いた際のSamples Plot
 右側：②O157-37単独プライマーを用いた際のSamples Plot
 ①、②ともに同一テンプレートを使用して比較)

られた。また、O157株No.1940の変化は、遺伝子座O157-36及びO157-37の2か所で生じた。遺伝子座O157-36のリピート数は、起点株の「9」が継代株で「-2」に、また遺伝子座O157-37のリピート数は、起点株の「2, 6, 9」（ピークの高さは、「6」>「2」>「9」）が継代株で「2, 9」（ピークの高さは、「2」>「9」）になった。つまり、遺伝子座O157-36では「9」のピークが消失し、遺伝子座O157-37では3本のピークのうち「6」のみが消失した。今回解析した17か所の遺伝子座のうち、O157-36、O157-37及びEHC-6はプラスミドに由来しているため、プラスミドが

クの高さは、「2」>「9」）になった。つまり、遺伝子座O157-36では「9」のピークが消失し、遺伝子座O157-37では3本のピークのうち「6」のみが消失した。今回解析した17か所の遺伝子座のうち、O157-36、O157-37及びEHC-6はプラスミドに由来しているため、プラスミドが

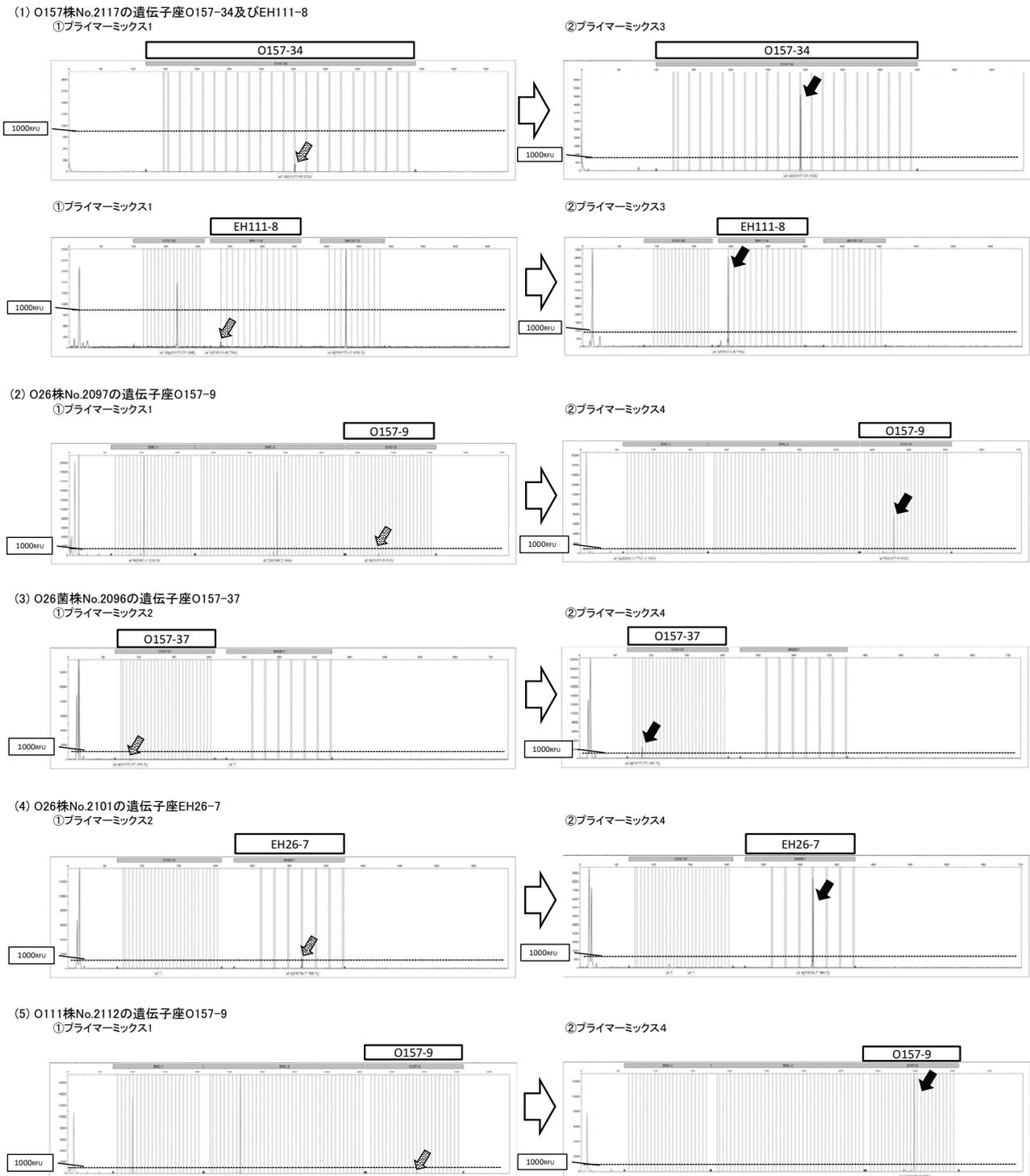


図2 マルチプレックスPCR追加法による増幅産物のピークの改善
(左側①：通常法のマルチプレックスPCRによるSamples Plot、右側②：マルチプレックスPCR追加法によるSamples Plot
①、②ともに同一テンプレートを使用して比較)

(1) SLV事例(O157株No.2000)

		遺伝子座																
起点株		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
		2	-2	1	4	-2	6	4	6.9	14	13	12	10	5	6	6	11	7.10
		継代																
継代株数		遺伝子座																
起点株との比較		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
1	SLV	2	-2	1	4	-2	6	4	6.9	15	13	12	10	5	6	6	11	7.10
7	変化なし	2	-2	1	4	-2	6	4	6.9	14	13	12	10	5	6	6	11	7.10

(2) DLV事例(O157株No.1940)

		遺伝子座																
起点株		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
		2	-2	1	4	-2	5	5	2.10	6	9	12	11	5	7	6	9	2.6.9
		継代																
継代株数		遺伝子座																
起点株との比較		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
1	DLV	2	-2	1	4	-2	5	5	2.10	6	9	12	11	5	7	6	-2	2.9
7	一致	2	-2	1	4	-2	5	5	2.10	6	9	12	11	5	7	6	9	2.6.9

図3 継代によるMLVAパターンの変化
 複数のピークが認められた遺伝子座には複数の数字を示す。また、ピークの高さをフォントサイズの大小で表す。
 「-2」：増幅産物なし SLV：single-locus variant DLV：double-locus variant

これらの遺伝子座を複数保有していた場合、脱落によって2か所の遺伝子座のリピート数が変化するとされている²⁾。このことから、No.1940で変化が見られた継代株は、遺伝子座O157-36及びO157-37を保有するプラスミドが継代時に何らかの要因で脱落したdouble-locus variant (以下「DLV」という。)であると考えられた。また、この株のO157-37の「2, 9」は、「6」とは別のプラスミド上にあったために残存した可能性があるが、原因の特定には至っていない。

本検証によって、たとえ1回の継代であってもSLVやDLVといった変化が生じることが明らかとなった。その頻度は2.1% (2/96株)であったが、今回検証した菌株数は少なく、また変化は偶発的に生じると考えられるため、変化の正確な頻度を求めるには更なる調査が必要と考える。

4 まとめ

今回、当センターで整備したMLVA法の検査精度を確認するため、平成30年度に収集したEHECの65株を用いて当センターと感染研の結果を比較したところ、①各遺伝子座の増幅産物のピークがおおむね設定したBinの範囲内に認められたこと、②一部の株の一部の遺伝子座でリピート数の相違が認められたものの、その他の株ではMLVAパターンが完全に一致したこと、③一部の遺伝子

座で増幅効率が悪かったが、追加法を通常法と並行して実施することで明確な結果を得られたことから、おおむね高い精度で実施できていると考えられた。

また、菌の継代時のDNA複製エラーが要因と考えられるMLVAパターンの変化は、頻度としては非常にまれではあるが、実際の検査中にも起こり得ることが明らかになった。そのため、MLVA解析に当たっては、継代の回数を極力減らすことが望ましいと考える。

平成30年に厚生労働省は、EHECによる広域的な感染症・食中毒に関する調査において、O157, O26, O111の遺伝子型検査法をMLVA法に統一し、解析データを自治体間で共有することとした。そのため、当センターにおいても引き続きMLVA法の精度確認を行い、必要に応じて改善する予定である。

謝 辞

MLVA法導入にあたり御指導をいただき、そして菌株のMLVA解析結果の提供をいただきました国立感染症研究所の泉谷秀昌先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Hidemasa Izumiya, Yingxin Pei, Jun Terajima, Makoto Ohnishi, Tetsuya Hayashi et al. : New system for multilocus variable-number

tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups : O157,O26,and O111, Microbiol. Immunol. , 54, 569-577, 2010

- 2) 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について，獣医公衆衛生研究，20-2, 6-11, 2018
- 3) 地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編：腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック（O157, O26, O111編）第1版, 2017

【調査研究】

感染症起因菌の疫学調査（平成28年度～平成30年度）
岡山県内のレジオネラの疫学調査について

Epidemiological investigation of pathogenic bacteria (2016～2018)

Epidemiological study of *Legionella* in Okayama prefecture

狩屋英明, 河合央博, 森本晃司, 仲 敦史, 中嶋 洋 (細菌科)

KARIYA Hideaki, KAWAI Hisahiro, MORIMOTO Koji, NAKA Atsushi, NAKAJIMA Hiroshi
(Bacteriology section)

要 旨

平成29年度～平成30年度に県内で発生したレジオネラ症患者から分離されたレジオネラ属菌7株及び平成28年度～平成30年度に県内公衆浴場の浴槽水等から分離されたレジオネラ属菌115株について、PCR法により菌種を同定した。また、*Legionella pneumophila*と同定された株については、血清群別試験を実施した。その結果、患者由来株は血清群1が6株及び血清群3が1株であった。浴槽水由来株は、3年間を通じて血清群6, 3, 1の順に多く、平成27年度の当センターの調査と比較して血清群6が多かった。血清群1の24株及び血清群3の8株について、sequence-based typing法による遺伝子型別を実施したところ、同一施設で同一の遺伝子型（sequence type, 以下「ST」という。）を示す分離株が年を隔てて確認された事例、分離年は異なるものの患者由来株と浴槽水由来株が同一のSTを示す事例が見られた。また、平成30年7月に発生した西日本における豪雨の直後に県南部地域で発症した患者2名から同一のSTを示す株が分離された事例があったが、感染源は特定できなかった。さらに、今回の調査では、患者及び浴槽水から複数の新規STを示す株が分離された。

[キーワード：レジオネラ, 血清群, 遺伝子型, 疫学調査]

[Keywords: *Legionella*, Serogroup, Sequence type, epidemiological investigation]

1 はじめに

レジオネラ症は *Legionella pneumophila* (以下「*L.p*」という。)を代表とするレジオネラ属菌による細菌感染症であるが、時に生命にかかわる重篤な肺炎を引き起こすことがあり、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における四類感染症に位置づけられる。日本全国において、レジオネラ症は毎年多くの患者が報告されており（平成28年1602件、平成29年1733件、平成30年2130件）、時に集団感染も発生している。岡山県内においても、全国と同様に毎年レジオネラ症が発生しており、近年の患者届出数は平成28年が26件、平成29年が30件であったが、平成30年は83件に急増した。レジオネラ属菌は土壌や水環境の常在菌であるが、エアロゾルを発生させる人工環境が感染機会を増やすとされている¹⁾。レジオネラ症の事例が発生した場合、感染拡大防止対策には分離株の分子解析等による感染源の究明が重要である。しかしながら、一般にレジオネラ症は、尿中抗原又は遺伝子検出によって診断するため、医療機関等から分離株を得ることは困難である。今回我々は、レジオネラ属菌

を分離している県内1医療機関から患者由来株を入手し、保健所で分離された浴槽水等の由来株と併せて分子解析等を実施した。その結果、若干の知見を得たので報告する。

2 材料及び方法

2.1 材料

県内の1医療機関から分与されたレジオネラ症患者に由来するレジオネラ属菌7株（平成29年度3株及び平成30年度4株）、また保健所から分与された公衆浴場の原水、浴槽水及びジャグジー並びに建築物における衛生的環境の確保に関する法律に規定する特定建築物の冷却塔水にそれぞれ由来するレジオネラ属菌115株（平成28年度62株、平成29年度30株及び平成30年度23株）の合計122株を解析の対象とした。

なお、分離については、医療機関、保健所ともに定法²⁾に従ってBCYE α 培地 (buffered charcoal-yeast extract agar with 0.1 % α -ketoglutarate) 等を用いて実施し、分離株がレジオネラ属菌であることは、血液寒天培地に発育しないこと、また斜光法における特徴的な外観構造

を有することで確認した。

2.2 PCR法による菌種の同定

全ての分離株について、5S rRNA遺伝子を標的としたレジオネラ属菌を特異的に検出するPCR法を実施した。また、陽性を示した株については、*mip*遺伝子を標的とした*L.p*を特異的に検出するPCR法を実施した。

2.3 血清群別試験

*L.p*と同定された分離株について、レジオネラ免疫血清（デンカ生研）を用い、血清群別試験を実施した。

2.4 分子解析

血清群1の24株及び血清群3の8株については、

sequence-based typing（以下「SBT」という。）法による遺伝子型別を国立感染症研究所に依頼し、遺伝子型（sequence type, 以下「ST」という。）を決定した。

また、血清群1の分離株については、Kozakらの方法³⁾により、病原性との関連が指摘されている*lag-1*遺伝子を標的としたPCR法を実施した。

3 結果

3.1 分離株の菌種及び血清群

平成28～30年度の分離株について、検体の種類、検体数、菌株数、菌種及び血清群を表1（平成28年度）、表2（平

表1 平成28年度に分離されたレジオネラ属菌

検体の種類	施設数	検体数	分離株数	菌種及び血清群
浴槽水	32	46	53	<i>L.p</i> SG1(9), SG2(1), SG3(13), SG5(5), SG6(16), SG9(3), SG10(3), UT(2) 他のレジオネラ属菌(1)
ジャグジー	4	6	6	<i>L.p</i> SG1(1), SG6(3) 他のレジオネラ属菌(2)
冷却塔水	1	2	3	<i>L.p</i> SG1(2), SG3(1)
計	37	54	62	

SG：血清群， UT：血清群別不能，（）：株数， *L.p*： *L. pneumophila*

表2 平成29年度に分離されたレジオネラ属菌

検体の種類	施設数	検体数	分離株数	菌種及び血清群
浴槽水	16	20	26	<i>L.p</i> SG1(3), SG3(6), SG4(1), SG5(5), SG6(1), SG7(1), SG8(2), SG9(1), SG10(1), UT(5)
原水	2	2	2	<i>L.p</i> SG 5(1), UT(1)
ジャグジー	1	1	1	<i>L.p</i> SG1(1)
冷却塔水	1	1	1	<i>L.p</i> SG6(1)
患者		3	3	<i>L.p</i> SG1(2), SG3(1)
計	20	27	33	

SG：血清群， UT：血清群別不能，（）：株数， *L.p*： *L. pneumophila*

表3 平成30年度に分離されたレジオネラ属菌

検体の種類	施設数	検体数	分離株数	菌種及び血清群
浴槽水	12	16	18	<i>L.p</i> SG1(2), SG3(1), SG4(1), SG5(1), SG6(8), SG10(1), UT(3) 他のレジオネラ属菌(1)
ジャグジー	3	5	5	<i>L.p</i> SG1(2), SG6(1), SG10(1), UT(1)
患者		4	4	<i>L.p</i> SG1(4)
計	15	25	27	

SG：血清群， UT：血清群別不能，（）：株数， *L.p*： *L. pneumophila*

成29年度), 表3(平成30年度)及び表4(平成28~平成30年度)に示す。なお, 同一検体から同一血清群の株が複数分離された場合は, 株数を1として集計した。

*L.p.*の血清群別試験の結果, 患者由来の7株(平成29年度3株,平成30年度4株)については, 平成29年度の1株は血清群3であったが, それ以外は全て血清群1であった。浴槽水由来株を年度別にみると, 平成28年度は血清群6(16株), 3(13株), 1(9株), 平成29年度は血清群3(6株), 5(5株), 1(3株), 平成30年度は血清群6(8株), 1(2株), 3(1株; 血清群4, 5及び10も1株)の順に多かった。3年間を通じて見ると, 浴槽水由来株については, 血清群6(25株), 3(20株), 1(14株)の順に多かった。ジャグジー由来株については, 血清群1(4株)及び6(4株)が多かった。また,

冷却塔水由来株については, 血清群1(2株), 3(1株)及び6(1株)であった。

3.2 分子解析の結果

*L.p.*血清群1の分離株のSBT法の結果及び*lag-1*遺伝子の検出結果を表5に, 血清群3のSBT法の結果を表6にそれぞれ示す。

SBT法では, 同一施設のジャグジーで年を隔てて同一のST(ST286)を示す事例(表5 分離株No.2016-26及びNo.2018-8), 分離年は異なるが, 浴槽水由来株(表5 分離株No.2016-22)と患者由来株(表5 分離株No.2017-1)が同一のST(ST1077)を示す事例が見られた。また, 施設は異なるが浴槽水から同一のSTを示す株が分離された事例も複数見られた(表5 分離株No.2016-41及び2018-

表4 平成28年度~平成30年度に分離されたレジオネラ属菌

検体の種類	施設数	検体数	分離株数	菌種及び血清群
浴槽水	60	82	97	<i>L.p.</i> SG1(14), SG2(1), SG3(20), SG4(2), SG5(11), SG6(25), SG7(1), SG8(2), SG9(4), SG10(5), UT(10) 他のレジオネラ属菌(2)
原水	2	2	2	<i>L.p.</i> SG 5(1), UT(1)
ジャグジー	8	12	12	<i>L.p.</i> SG1(4), SG6(4), SG10(1), UT(1) 他のレジオネラ属菌(2)
冷却塔水	2	3	4	<i>L.p.</i> SG1(2), SG3(1), SG6(1)
患者		7	7	<i>L.p.</i> SG1(6), SG3(1)
計	72	106	122	

SG: 血清群, UT: 血清群別不能, (): 株数, *L.p.*: *L. pneumophila*

表5 *L.p.*血清群1のST及び*lag-1*遺伝子の有無

分離株No.	採水又は届出月	検体種別	ST	ST比較	<i>lag-1</i>	備考
2016-16	2016.6	浴槽水 公衆浴場	2340		+	
2016-22	2016.6	浴槽水 公衆浴場	1077	2017-1と同じ	+	
2016-24	2016.7	浴槽水 公衆浴場	2341		-	
2016-26	2016.7	ジャグジー プール	286	2018-8と同じ	-	施設は同じジャグジー
2016-30	2016.7	浴槽水 公衆浴場	129		-	
2016-34	2016.7	冷却塔水 冷却塔	154		-	
2016-35	2016.8	浴槽水 公衆浴場	687		+	
2016-41	2016.9	浴槽水 公衆浴場	305	2018-36と同じ	-	施設は異なる
2016-42	2016.8	浴槽水 公衆浴場	2342		-	
2016-61	2016.12	浴槽水 公衆浴場	150		-	
2016-68	2017.1	浴槽水 公衆浴場	115		+	
2017-1	2017.5	患者 喀痰	1077	2016-22と同じ	+	
2017-3	2017.5	ジャグジー プール	976		-	
2017-7	2017.6	浴槽水 公衆浴場	2477	新規遺伝子型	-	
2017-13	2017.8	患者 喀痰	22	新規遺伝子型	-	国内臨床株として新規
2017-14	2017.8	浴槽水 旅館業浴場	260		-	
2017-25	2017.10	浴槽水 公衆浴場	1857		-	
2018-2	2018.6	患者 喀痰	300	国内3例目	+	
2018-8	2018.7	ジャグジー プール	286	2016-26と同じ	-	
2018-9	2018.7	患者 喀痰	2655	新規遺伝子型	+	県南
2018-10	2018.7	患者 喀痰	2655	新規遺伝子型	+	県南
2018-26	2018.9	患者 気管内分泌物	739	国内臨床由来株	-	6例目
2018-29	2018.10	浴槽水 公衆浴場	1		-	
2018-36	2018.11	浴槽水 旅館業浴場	305	2016-41と同じ	-	施設は異なる 国内固有遺伝子型

注) 分離株No. 2016-26及び2018-8は同じ施設由来。その他は異なる施設由来。

表6 *L. p*血清群3のST

分離株No.	採水又は届出月	検体種別	ST	ST比較	備考
2016-51	2016.10	浴槽水 公衆浴場	2343	2017-27と同じ	
2017-6	2017.6	浴槽水 公衆浴場	2476	新規遺伝子型	
2017-16	2017.8	浴槽水 旅館業浴場	2495	新規遺伝子型	
2017-24	2017.9	患者 喀痰	93	岡山県10例目	
2017-27	2017.10	浴槽水 旅館業浴場	2343	2016-51と同じ	
2017-32	2017.10	浴槽水 旅館業浴場	1613	2018-11と同じ	
2017-34	2017.10	浴槽水 ゴルフ場浴場	1610		
2018-11	2018.7	浴槽水 公衆浴場	1613	2017-32と同じ	

注 分離株の由来施設は全て異なる

36 : ST305, 表6 分離株No.2016-51及び2017-27 : ST2343, No.2017-32及び2018-11 : ST1613)。平成30年7月に発生した西日本における豪雨（以下「平成30年7月豪雨」という。）の後、レジオネラ症の報告数に特別な変化はなかったが、直後（7月）に県南部地域の患者2名から同一のST(ST2655)を示す株が分離された事例があり、新規STであった。（表5 分離株No.2018-9及び2018-10）。また、表6の分離株No.2017-24の患者由来株は岡山県でのみ分離されるST93であり、今回は県内10例目の事例であった。

更に、表5の*L. p*血清群1の分離株No.2017-7（ST2477 : 浴槽水由来）及び2017-13（ST22 : 患者由来）並びに表6の*L. p*血清群3の菌株No.2017-6（ST2476 : 浴槽水由来）及び2017-16（ST2495 : 浴槽水由来）のように、世界又は国内で初めてのSTを示す株も分離された。

*L. p*血清群1の*lag-1*遺伝子については、浴槽水等由来株18株のうち4株(22.2%)及び患者由来株6株のうち4株(66.7%)が保有していた(表5)。

4 考察

レジオネラ症患者由来の7株（平成29年度3株,平成30年度4株）のうち6株が*L. p*血清群1であり、日本国内のレジオネラ症患者の80%以上から*L. p*血清群1が分離されるとの報告^{4)・5)}と一致する傾向であった。

当センターが行った平成27年度の調査⁶⁾では、保健所分離の浴槽水から*L. p*血清群1, 3及び5が多く分離されていたが、本研究では3年間を通じて、血清群6, 3, 1の順に多く分離された。血清群6が増加した理由については不明である。SBT法では、同一施設のジャグジーで分離された株が、年を隔てて同一のST（ST286）を示す事例が認められた。理由として、レジオネラはviable-but-not-culturable (VBNC) の状態で長期間生残することが報告されているため⁷⁾、施設配管等の中で同一菌株が長期生残した可能性が考えられる。外部からの継続的な汚染に起因する可能性もあるが、現段階で結論付けることは困難である。分離年は異なるが、浴槽水由来株（表5 菌株

No.2016-22）と患者由来株（表5 菌株No.2017-1）が同一のST（ST1077）であった事例も見られたが、その関連性は不明であった。平成30年7月豪雨の直後に県南部地域の患者2名から同一のST（ST2655）を示す株が分離された事例（表5 菌株No.2018-9及び2018-10）があった。この患者の発生場所は異なるが、どちらも豪雨被害を受けた場所であり、1名は大雨の後の河川の清掃作業も行ったことから、豪雨に関連したレジオネラ症であったことが推測される。

平成29年9月に届出された患者の喀痰から*L. p*血清群3のST93が分離された。この遺伝子型は本県特有の型^{6), 8), 9)}であり、今回は10例目であったが、感染源は不明であった。今後、同様の株が患者から分離された場合は、積極的に環境調査を行い、感染源を明らかにする必要があると考えられる。

*lag-1*遺伝子については、病原性との関連が指摘されており³⁾、今回の調査では、浴槽水等由来株はその保有率が22.2%と、患者由来株（66.7%）に比較して低かったが、この結果は他の報告³⁾と同様であった。平成27年度の当センターの調査結果⁶⁾と同様に、患者由来株は*lag-1*遺伝子を高率に保有していたが、*lag-1*遺伝子を保有しない株が分離された患者でも、呼吸困難や意識障害など、症状が比較的重篤な場合も見られたことから、更に多くの事例についての検討が必要であると思われる。

平成30年度は県内のレジオネラ症が急増し、対策が急務であることから、今後も患者由来株と環境由来株の分子解析等により、感染源の究明、感染予防対策及び感染拡大防止対策のための調査研究を継続する予定である。

謝 辞

本研究に御協力いただきました岡山県内保健所関係者各位、患者株を分与していただきました倉敷中央病院臨床検査技術部細菌ウイルス検査室の藤井寛之先生と大森章恵先生に、また、SBT法によるSTの型別解析を行っていただきました国立感染症研究所の前川純子先生に深謝

いたします。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：レジオネラ症とは, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ra/legionella/392-encyclopedia/530-legionella.html> (2019.9.2アクセス)
- 2) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル レジオネラ症, 平成23年10月7日改訂
- 3) Kozak, N.A., Benson, R.F., Brown, E., Alexander, N. T., Taylor, T. H. et al. : Distribution of *lag-I* Alleles and Sequence-Based Types among *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Clinical and Environmental Isolates in the United States, *J. Clin. Microbiol.*, 47(8), 2525-2535, 2009
- 4) Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Helbig, JH., Chang, B., Kaneko, A. et al. : Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types, *J. Med. Microbiol.*, 59 (6), 653-9, 2010
- 5) Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Chida, K., Ohya, H., Kanatani, J. et al. : *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* Species Isolated from Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84(18), e00721-18, 2018
- 6) 中嶋 洋, 檀上 博子, 河合 央博, 大島 律子: 感染予防対策に向けたヒト及び環境等における感染症起因菌の調査(平成27年度) ②岡山県内のレジオネラの疫学調査と小児科受診患者等のエルシニア抗体保有調査について, 岡山県環境保健センター年報, 40, 57-61, 2016
- 7) Dietersdorfer, E., Kirschner, A., Schrammel, B., Ohradanova-Repic A., Stockinger, H. et al. : Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages, *Water Res.*, 141, 428-438, 2018
- 8) 西山 明宏, 石田 直, 興梠 陽平, 小西 聡史, 坪内 和哉ら: *Legionella pneumophila* serogroup 3による呼吸器感染症の4症例, *感染症誌*, 85, 373-379, 2011
- 9) 中嶋 洋, 大島 律子, 河合 央博, 前川 純子, 倉 文明ら: 患者由来*Legionella pneumophila*血清群3 sequencetype 93 の疫学調査—岡山県, *病原微生物検出情報月報*, 34(6), 164-165, 2013

【資 料】

結核菌DNA解析調査事業報告（平成28～30年度）

Report of Investigation with DNA Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* (Fiscal Years 2016～2018)

河合央博, 森本晃司, 仲 敦史, 中嶋 洋, 狩屋英明（細菌科）

KAWAI Hisahiro, MORIMOTO Koji, NAKA Atsushi, NAKAJIMA Hiroshi, KARIYA Hideaki
(Bacteriology Section)

要 旨

当県では、結核まん延状況の把握及び感染源・感染経路の究明、二次感染の予防等結核対策に資するため、県内の新登録結核患者から分離された結核菌のDNA解析を実施している。今回、平成28～30年度の3年間に収集した患者由来株171株についてVariable number of tandem repeats (VNTR) 解析法により解析を行った。サーベイランスとして解析を行ったところ、クラスターが5組見られたが、そのうち調査等で疫学的関連性が確認できたのは3組であった。さらに、疫学情報から患者間での感染が疑われた4事例について解析を行ったところ、2事例で患者由来株の遺伝子型がそれぞれ一致し、関連性が考えられた。また、収集した菌株の遺伝系統分布では、北京型が121株と全体の71.3%を占め、その中で新興型が若年者層で高く分離される傾向が示された。

[キーワード：結核菌, VNTR解析, 疫学調査, 北京型]

[Key words : *Mycobacterium tuberculosis* , VNTR analysis, epidemiological investigation, Beijing type]

1 はじめに

厚生労働省「平成29年 結核登録者情報調査年報集計結果について」(<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095.html>)によると、平成29年(2017)の全国の新登録結核患者数は16,789人であり、罹患率(人口10万人対)は13.3であった。年々減少傾向が見られているものの、罹患率を諸外国と比較すると、近隣アジア諸国よりは低い水準にあるが、欧米諸国と比べると未だ高く、中まん延国に位置づけられる。また、岡山県では新登録結核患者数は212人で、罹患率は11.1と全国の数値よりは低く減少傾向も見られているが、未だ注意を要する状況である。

このような中、当県では、結核の感染源・感染経路の究明や二次感染予防等結核対策に資することを目的に「結核菌DNA解析調査事業実施要領」(以下「要領」という。)を定め、これを基に現在、Variable number of tandem repeats(以下「VNTR」という。)解析法を用いた分子疫学解析を行っており、各菌株についてデータベースを作成し感染事例の疫学調査に活用している。結核菌株の分子疫学解析を行うことは、疫学調査で感染が疑われた患者由来株間の遺伝子型が一致した場合にはその関連性の証明に役立ち、また、サーベイランスとして解析した患者由来株間で遺伝子型が一致した場合には、追加調査

等の実施によって、当初は疫学的に考えられなかったような新たな感染経路の発見の可能性も期待できる。今回、平成28～30年度の3年間に収集した患者由来株171株を用い、サーベイランスとしてこれらの菌株内でのクラスター解析を行った。併せて、これらの菌株のうち疫学情報から患者間で感染が疑われた4事例について解析を行ったので報告する。

また、結核菌は検出される遺伝系統の割合が地域により異なるが、日本では、北京型(Beijing genotype strain)が7～8割を占めると言われている¹⁾。北京型は、感染伝播力が強く、薬剤耐性と関係が大きいことが報告されており²⁾、結核対策上重要である。県内で分離された結核菌の系統を把握するため、収集した菌株について北京型及び非北京型に分類し、さらに北京型については祖先型、新興型の分類を行い、系統の解析を実施したので報告する。

2 材料及び方法

2.1 解析対象株

県内の医療機関又は検査機関において分離された結核菌のうち、要領に定められた以下の項目のいずれかに該当し、かつ保健所所長が必要と判断した菌株171株(平成28～30年度収集株：疫学情報から感染が疑われた4事例9

株及び散発事例162株)をVNTR解析の対象とした。

- (1) 60歳以下の塗抹陽性患者（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第19条適用者）の菌株
- (2) 社会福祉施設等（集団生活等）で発生した患者（利用者、職員）の菌株
- (3) 接客業、看護師、保健師、保育士、教員、医師他多集団との接触がある患者の菌株
- (4) その他、事業の目的から調査が必要と認められる患者の菌株

2.2 菌株からのDNA抽出

DNA抽出は、結核菌VNTRハンドブック（地研協議会保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編 第1版）の「菌懸濁液の加熱死菌上清の作成方法」に準じて行った。

2.3 VNTR解析

VNTR解析は、国内標準法として提唱されているJATA (12) -VNTR解析法³⁾、さらに、JATA (12) VNTRの型別能力を補うために、JATA (12) -VNTRに3領域を加えたJATA (15) -VNTR解析法と3つの多型性に富んだ領域を解析する超多変（hypervariable, HV）領域のVNTR解析法を加えた計18領域で行った^{4), 5)}。PCR法及びアガロースゲル電気泳動法で得られた増幅産物のサイズ情報から各領域のリピート数を決定し、18領域のリピート数の組み合わせを遺伝子型（以下「VNTR型」という。）とした。VNTR解析及びデータベース作成には、解析ソフトBioNumerics ver 7.6 (APPLIED MATHS)を用いた。1か所のVNTR領域で複数の明瞭なバンドを検出した菌株（以下「複数バンド株」という。）は、それぞれのリピート数のVNTR型を作成した。すなわち、1か所の領域で2本の明瞭なバンドを検出した場合は、1株の菌株で2パターンのVNTR型を割り当てた。また、クラスター解析は、18領域でリピート数が完全に一致、又はこれに

準ずる程度に酷似した株を同一クラスターとした。

2.4 系統分類解析

各菌株の北京型（祖先型、新興型）及び非北京型の系統分類は、Setoら⁶⁾の最大事後確率推定法（以下「MAP推定法」という。）を用いVNTR型から推定した。MAP推定法で推定確率が低くなり判定が困難となった株、また複数バンド株でそれぞれのリピート数で割り当てたVNTR型についてMAP推定法で解析した結果、複数の型と判定された株については、北京型と非北京型の区別をWarrenらによる方法⁷⁾、祖先型と新興型の区分は、Mokrousovらによる方法⁸⁾に準じて実施し確認を行った。

3 結果

3.1 解析した菌株

収集した菌株の患者年齢階層別・男女別菌株数を表1に示す。解析を行った171株の患者の年齢分布は21～99歳、平均年齢は68歳であった。年代別で見ると80代が一番多く52人（30.4%）、次いで70代が33人（19.3%）で、70代以上が60.2%を占め高齢者が多かった。男女別では男性99人（57.9%）、女性72人（42.1%）であった。

3.2 VNTR解析結果 サーベイランスとしてのクラスター解析

171株についてクラスター解析を実施した結果、10株が5組のクラスターA～Eに分類された（クラスター形成率5.9%）（表2）。クラスターA, B, Dはそれぞれ18領域のリピート数が完全に一致した菌株が2株ずつ分類された。クラスターCは、No.1839が領域V4120における複数バンド株であったが、そのうちの1つのバンド（リピート数）がNo.1819と一致したことからVNTR型が酷似するものと考え、同一クラスターとした。また、クラスターEは、感染が疑われた事例4の2株が分類されたが、共に領域Q11aで1500 bpより大きい高分子量側の位置にバンドが見られリピート数の判定が不能であった。両株の増幅

表1 年齢階級別・男女別菌株数

年齢階級	男		女		計	
	株数	%	株数	%	株数	%
20代	11	11.1 %	7	9.7 %	18	10.5 %
30代	6	6.1 %	5	5.1 %	11	6.4 %
40代	5	5.1 %	5	5.1 %	10	5.8 %
50代	9	9.1 %	0	0.0 %	9	5.3 %
60代	10	10.1 %	10	10.1 %	20	11.7 %
70代	23	23.2 %	10	10.1 %	33	19.3 %
80代	29	29.3 %	23	23.2 %	52	30.4 %
90代	6	6.1 %	12	12.1 %	18	10.5 %
計	99		72		171	

産物を並べて電気泳動したところ、概ね同じ位置にバンドが出現したため、これら2株のVNTR型は極めて酷似しているものと考え、同一クラスターとした。

これらのクラスターのうち、クラスター B, D, Eは、保健所の調査で疫学的関連性が確認できたが、クラスター A,Cは不明であった。

3.3 事例の検討結果

疫学情報から感染が疑われた4事例についてVNTR解析を行ったが、その結果は表3に示すとおりであった。事例2は接触者検診対象であった同一通所施設利用者が発病した事例であったが、両株のVNTR型が一致したことから両者間での感染が示唆された。また、事例4は職場での接触者検診対象者が発病した事例であったが、先述したとおり両患者由来株は酷似したVNTR型であったことから関連性が考えられ、両者間での感染の可能性が示された。一方、事例1は、病院で同室であった患者間での感染が疑

われたが、患者由来株のVNTR型を比較したところ不一致であり、また、事例3は、職場において2人への感染が疑われた事例であったが、それぞれの株間でVNTR型が不一致という結果であった。

3.4 系統分類解析

系統分類解析の結果は、171株中、北京型は122株（71.3%）、非北京型は49株（28.7%）であり、北京型の内訳は祖先型が97株（79.5%）、新興型が25株（20.5%）であった（図1）。また、祖先型と新興型の割合を年齢階級別に見ると、30代、40代でそれぞれ57.1%、50.0%と新興型の割合が他の年代に比べ高かった（図2）。

4 考察

今回、平成28～30年度に収集した171株についてVNTR法によるクラスター解析を実施したところ、10株が5組のクラスターに分類された。これらのクラスターは

表2 クラスター解析結果

クラスター	菌株No.	年代	性別	検体採取年月	居住地(市町村)	疫学情報等	系統解析	VNTR型																	
								JATA12							JATA15			HV							
								J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	Q18	Q11a	EA	V3232	V3820	V4120
A	1766	90代	男	2017.2月	同一市町村	不明	非北京型	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	10	11	4	1	8	4
	1849	50代	男	2018.3月	同一市町村	不明	非北京型	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	10	11	4	1	8	4
B (事例2)	1788	90代	女	2017.4月	同一市町村	同一の通所施設	非北京型	2	5	1	1	2	3	1	2	3	15	8	4	7	7	3	5	6	4
	1804	80代	女	2018.1月	同一市町村			2	5	1	1	2	3	1	2	3	15	8	4	7	7	3	5	6	4
C	1818	60代	女	2017.7月	同一市町村	不明	北京型祖先型	4	3	3	3	6	3	7	4	5	7	8	3	10	8	4	15	13	6
	1839-2	70代	男	2017.7月	同一市町村			4	3	3	3	6	3	7	4	5	7	8	3	10	8	4	15	13	6
D	1824	60代	男	2018.2月	同一市町村	友人	北京型祖先型	4	1	3	2	6	2	6	4	5	7	7	5	10	9	4	15	14	9
	1846	50代	男	2018.7月	同一市町村			4	1	3	2	6	2	6	4	5	7	7	5	10	9	4	15	14	9
E (事例4)	1866	20代	男	2018.9月	隣接する市町村	同一の職場	北京型祖先型	4	3	3	5	6	3	6	4	5	7	7	3	10	>19	4	19	14	8
	1871	20代	女	2018.12月				4	3	3	5	6	3	6	4	5	7	7	3	10	>19	4	19	14	8

*「>19」:1500 bpより大きい増幅産物

表3 感染が疑われた事例

事例No.	菌株No.	年代	性別	疫学情報等	VNTR型																	
					JATA12							JATA15			HV							
					J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	Q18	Q11a	EA	V3232	V3820	V4120
1	1731	80代	女	病院で同室	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	8	9	4	16	14	15
	1734	80代	女		4	3	3	3	6	3	7	4	5	7	8	3	10	8	4	15	14	5
2	1788	90代	女	同一の通所施設 1804は1788の接触者検診対象者	2	5	1	1	2	3	1	2	3	15	8	4	7	7	3	5	6	4
	1804	80代	女		2	5	1	1	2	3	1	2	3	15	8	4	7	7	3	5	6	4
3	1815	20代	女	1815が1744及び1805と職場で接触	4	3	3	3	4	2	7	4	5	7	8	5	10	9	>17	22	18	9
	1744	90代	男		4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5	6	9	4	17	6	11
4	1805	80代	女	同一の職場 1871は1866の接触者検診対象者	4	3	3	3	3	7	4	5	7	9	4	14	8	4	13	15	7	
	1866	20代	男		4	3	3	5	6	3	6	4	5	7	7	3	10	>19	4	19	14	8
4	1871	20代	女	同一の職場 1871は1866の接触者検診対象者	4	3	3	5	6	3	6	4	5	7	7	3	10	>19	4	19	14	8
	1871	20代	女		4	3	3	5	6	3	6	4	5	7	7	3	10	>19	4	19	14	8

*「>17」及び「>19」:1500 bpより大きい増幅産物

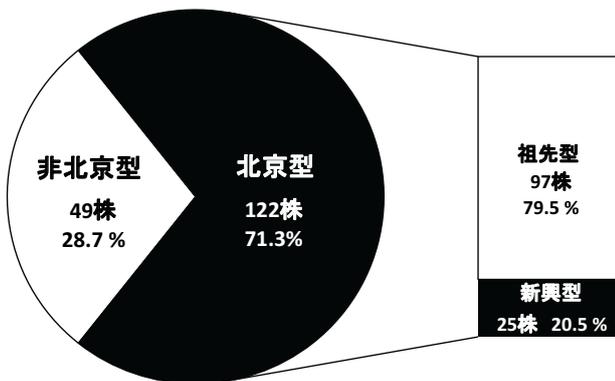


図1 系統分類解析

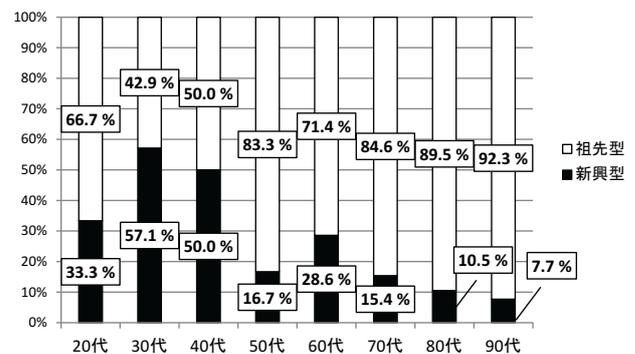


図2 北京型における祖先型・新興型の年齢階級別割合

それぞれ2株ずつ分類された小さいクラスターであり、収集した菌株内では大きな集団発生や県内で流行している株の傾向等は推察されなかった。クラスターを個々に見ると、クラスター B, D, Eは疫学情報から同一の通所施設の利用等何らかの関連性が見られた。一方、クラスター Aの患者は、ともに居住地（市町村）が同じであったが、検体採取時期が1年近く離れていたこともあり、疫学情報からは患者間の関連性は不明であった。また、クラスター Cの患者は、ともに居住地（市町村）が同じで検体採取時期も近かったため、何らかの接点があった可能性が考えられたが、疫学情報では関連性は不明であった。クラスター CのNo.1839は領域V4120における複数バンド株であり、複数バンドのうち1つがNo.1819とリピート数が一致していたことで同一クラスターと判断された。複数バンドとなった原因として、単一の株が増殖する際に起きたVNTR 領域の複製エラーによって生じたものと考えられた。結核は空気感染という特殊な感染様式を取ることから、クラスター A, Cともに今回の疫学情報では解明できなかった隠れた接点が存在した可能性も考えられる。

事例解析では、事例2及び4はVNTR解析から関連性が見られ、それぞれ通所施設、職場での接触による感染であると考えられた。一方、事例1, 3は、ともに株間のVNTR型が異なり、VNTR解析から関連性は考えられなかった。このように疫学調査で感染が疑われた事例検討でVNTR解析を活用することにより、推定された感染経路の科学的な裏付けができることが示された。

クラスター解析結果は、疫学情報と併せて解析すれば感染源・感染経路の発見や究明の一助となり、さらには集団感染や流行株の探知等にも有用になるため、今後も積極的に菌株を収集して解析を行い、引き続き行政側へ情報提供を行うことが重要と考えられる。

系統分類解析の結果では、71.3 %の菌株が北京型に分類された。北京型が73.8 %とする全国的な調査結果¹⁾があるが、当県でも同様の結果となった。北京型のうち新興型は祖先型よりも感染伝播力が強く発病しやすいと言われており^{1), 9)}、さらには集団感染に関与する遺伝系統であると示唆されている。北京型の分離状況の特徴として、他国では新興型が7割以上を占めているのに対して、日本では祖先型が8割程度を占めている一方で¹⁾、若年者層の結核患者から新興型が分離される割合が高いことが挙げられる¹⁰⁾。今回の結果でも30代及び40代での新興型の割合が高く、他の年代、特に50代以上と比べると割合が高いことから、当県でも若年者層の新興型の割合が高い傾向が示された。若年者層の結核患者は、その発病の

ほとんどが高齢者の患者で多く見られる内因性再燃ではなく、現在の流行状況が反映されているものと考えられる。今回のクラスター解析では新興型のクラスターは見られなかったが、今後の結核対策には特に新興型について、そして若年者層の発生状況に注視する必要があると考えられた。

文 献

- 1) 岩本朋忠：結核菌分子疫学研究の将来展望，結核，84，789-791，2009
- 2) Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN：Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains, Trends Microbiol., 10, 45-52, 2002
- 3) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗 聡, 菅原 勇, 加藤 誠：国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型（VNTR）分析システム，結核，83，673-678，2008
- 4) 和田崇之, 長谷 篤：結核菌の縦列反復配列多型性（VNTR）解析に基づく分子疫学とその展望，結核，85，845-852，2010
- 5) 前田伸司, 和田崇之, 岩本朋忠：国内結核菌を効率よく型別するための標準反復配列多型（VNTR）分析法，日本細菌学雑誌，65，201，2010
- 6) Junji Seto, Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto, Aki Tamaru, Shinji Maeda, et al.：Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation, Infect. Gene. Evol., 35, 82-88, 2015
- 7) Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, et al.：Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen, Am. J. Respir. Crit. Care. Med., 169, 610-614, 2004
- 8) Igor Mokrousov I, Jiao WW, Valcheva V, Vyazovaya A, Otten T：Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-Based inverse PCR, J. Clin. Microbiol., 44, 2851-2856, 2006
- 9) Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy C. R. E, et al.：A Recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is Associated with an increased ability to spread and cause disease, J.

Clin. Microbiol., 45, 1483-1490, 2007

- 10) Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, Wada T, Shirai C, et al. : Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan, J. Clin. Microbiol., 47, 3340-3343, 2009

【調査研究】

胃腸炎ウイルスの疫学的研究
—岡山県の散発胃腸炎患者におけるロタウイルスAの流行状況(2009-2017)—
Epidemiological Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama
—Surveillance of Rotavirus A from Sporadic Gastroenteritis in Okayama Prefecture (2009-2017)—

木田浩司, 野宮加代子, 松岡保博, 梶原香代子*, 濱野雅子,
橋本清美, 北村雅美*, 井上 勝**, 濃野 信**, 金谷誠久**** (ウイルス科)
*岡山県感染症情報センター, **岡山赤十字病院小児科, ***のうの小児科,
****国立病院岡山医療センター小児科

KIDA Kouji, NOMIYA Kayoko, MATSUOKA Yasuhiro, KAJIHARA Kayoko*, HAMANO Masako,
HASHIMOTO Kiyomi, KITAMURA Masami*, INOUE Masaru**, NOUNO Shin***,
KANADANI Tomohisa**** (Virology Section)

*Okayama Prefectural Infectious Disease Surveillance Center,

Department of Pediatrics, Okayama Red-Cross Hospital, *Nouno Pediatric Clinic,

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

要 旨

2011年に導入されたロタウイルスAワクチンの県内における流行への影響を検証するため、これまで用いてきた Multiplex-PCR法で生じるG遺伝子型の誤判定を、VP7遺伝子の解析によって2011年まで遡って修正し、2009年から2017年までの県内のロタウイルスAの流行状況について、4,961検体を対象として再解析した。その結果、G1と誤判定されたG3が29株、G3と誤判定されたG8が1株確認された。これらの株のVP7遺伝子は、近年出現した、ヒトロタウイルスと動物由来株との遺伝子再集合体とされる株と高い相同性を示した。また、いずれもワクチン導入後に県内に侵入したと推定された。しかしながら、ワクチン導入以降、特定のG遺伝子型の連続的な流行が確認されていないこと、胃腸炎患者におけるロタウイルスAの検出率が低下していること、ロタウイルスA流行期における感染性胃腸炎の定点あたり患者数が減少傾向にあること等を勘案すると、現在のところ、ワクチンは効果的に機能しているものと推察された。

[キーワード：ロタウイルスA, 胃腸炎, 逆転写PCR, 遺伝子再集合体, ワクチン]

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

1 はじめに

ロタウイルスA (以下「RVA」という。)は、レオウイルス科に属し、11分節の2本鎖RNAゲノムを有する¹⁾。このうちウイルスの中和に深く関わる外殻たん白をコードするゲノムは2分節あり、第9分節にコードされた外殻糖たん白 (VP7) の塩基配列に基づきG遺伝子型が、第4分節にコードされた外殻スパイクたん白 (VP4) の塩基配列に基づきP遺伝子型が分類されている。現在までに、G遺伝子型はG1～G27が、P遺伝子型はP[1]～P[35]がそれぞれ確認されており²⁾、さらに両者の組み合わせによって多くの遺伝子型が存在しうが、ヒトから検出される頻度が高いのはG1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8]及びG9P[8]である^{1), 3)}。

RVAは小児の主要な胃腸炎起因ウイルスであり、重篤な症状を引き起こすこともあるため、本ウイルスの感染制御を目的として、生ワクチンの開発導入が世界的に進められてきた⁴⁾。主なものとしては、ヒトRVA株 (G1P[8])由来の単価ワクチンであるRotarix[®] (グラクソ・スミスクライン社製) 及びウシRVAにヒトRVAのG1～G4のVP7遺伝子とP[8]のVP4遺伝子を組み込んだ遺伝子組換え株に由来する5価ワクチンであるRotaTeq[®] (メルク社製) が知られており、我が国においては前者が2011年7月に、後者が2012年1月にそれぞれ製造承認され導入が開始された。

これまで我々は、県内におけるRVA流行状況及び感染性胃腸炎患者を継続的に調査し、ワクチン導入前後の

RVA遺伝子検出率、G遺伝子型、感染性胃腸炎患者数等を比較解析することで、ワクチンの効果及び流行遺伝子型への影響を把握してきた^{5)~11)}。G遺伝子型については、1990年にGouveaらの開発したMultiplex-PCR法¹²⁾（以下「型別PCR法」という。）により決定してきたが、2017年、国立感染症研究所の藤井によって本法の再検証が行われ、現在の流行株において、ウマロタウイルスとヒトロタウイルスの遺伝子再集合体とされるEquine-like G3¹³⁾がG1に、また一部のG8がG3に、それぞれ誤判定されることが報告された¹⁴⁾。そこで我々は、既報の5シーズン(2011/2012～2015/2016)^{7)~11)}に2016/2017シーズンを加えた計6シーズンで型別PCR法においてG1又はG3と判定されたRVA検出株について、VP7遺伝子の塩基配列を解析することでG遺伝子型を修正した。また、得られた結果をもとに型別PCR法の誤判定の原因を推定するとともに、既報^{6)~11)}を含む8シーズン(2009/2010～2016/2017)におけるRVAの正確な流行状況について、再解析を行うとともに、ワクチンの効果について再検証を行った。

2 方法

2.1 対象

RVAの流行状況の解析については、2009年9月から

2017年8月までの8シーズン（毎年9月～翌年8月を1シーズンとする）に、県内の3医療機関で採取された胃腸炎患者のふん便4,961検体を対象とした（表1）。このうち、2016年8月までに検出されたRVAの解析結果については、既報^{6)~11)}からの引用を含むが、2009/2010シーズンの91検体、2010/2011シーズンの86検体、2011/2012シーズンの299検体、2012/2013シーズンの115検体、2013/2014シーズンの21検体、2014/2015シーズンの25検体及び2016/2017シーズンの657検体（合計1,294検体）については、冷凍保存ふん便を使用し、今回新たに解析対象に加えた。

2.2 スクリーニング及びRNAの抽出

今回新たに解析対象とした1,294検体について、電子顕微鏡又は市販のRVA検出キット（イムノクロマト法又は酵素抗体法）によりRVAのスクリーニングを行い、陽性となった検体について、市販キット（QIAamp Viral RNA mini kit, キアゲン社製）によりRNAを抽出した。

2.3 型別PCR法によるG遺伝子型の決定

スクリーニングで陽性となった検体から抽出したRNAを用い、Gouveaらの開発した方法¹²⁾に従い、VP7遺伝子を標的とした型別PCR法を実施し、得られた増幅産物の大きさからG遺伝子型を決定した。

表1 シーズン別検体数及びRVA遺伝子検出状況

シーズン	検体数	RVA検出数	参考文献
2009/2010	448 (91)*	94	6)
2010/2011	524 (86)	145	7)
2011/2012	709 (299)	126	7)
2012/2013	745 (115)	139	8)
2013/2014	719 (21)	106	9)
2014/2015	497 (25)	32	10)
2015/2016	662	62	11)
2016/2017	657 (657)	65	
合計	4,961	737	

* : 括弧内は新たに追加した検体数

2.4 VP7遺伝子の塩基配列解析によるG遺伝子型の修正

2011年9月から2017年8月までの6シーズンに、型別PCR法によってG1、G3又は両者いずれかとの混合感染と判定された359検体から抽出したRNAを用い、病原体検出マニュアル¹⁵⁾に従いVP7遺伝子を標的としたRT-PCR法を実施した。一部の検体については、Liuらの報告したnested PCR法¹⁶⁾を実施した。また、型別PCR法で混合感染と判定された4件については、検出されたG遺伝子型の型特異的プライマーセットを個別に用いたPCRをそれぞれ実施した。

得られた増幅産物について、それぞれのPCRで使用したプライマーを用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、RotaC v2.0 (<http://rotac.regatools.be/>)による解析でG遺伝子型を決定した。さらに、誤判定が判明した株については、BLAST検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)を行い、近縁株を確認した。

2.5 型別PCR法による誤判定の原因推定

型別PCR法による誤判定の原因を解明するため、市販ソフトウェア (GENETYX ver.11, 株式会社ゼネティックス) を用いて、同法に使用するG遺伝子型特異的プライマーの結合部位を、誤判定株及び従来株の塩基配列に対するホモロジー検索で推定し、それぞれ比較解析した。

2.6 RVA流行期の定点あたり感染性胃腸炎患者数

2010年から2017年におけるRVA流行期の定点あたり感染性胃腸炎患者数について、岡山県感染症発生動向調査事業に基づき定点医療機関から報告された感染性胃腸炎患者数のうち、第5週から第18週についてシーズンごとに集計し、小児科定点数で除して算出した。

3 結果

3.1 G遺伝子型の修正

VP7遺伝子の塩基配列の解析によるG遺伝子型の修正結果を表2に示す。型別PCR法でG1と判定された株のうち2012/2013シーズンの2株、2013/2014シーズンの3株及び2016/2017シーズンの22株が、それぞれG3に修正された。また、2012/2013シーズンにG1及びG3の混合感染と判定された2件については、いずれもG3の単独感染に修正された。さらに、2016/2017シーズンに型別PCR法でG3と判定された10株のうち1株が、G8へ修正された。

BLAST検索の結果、G3に修正された株 (以下「G3誤判定株」という。) の塩基配列は、ウマロタウイルスとヒトロタウイルスの遺伝子再集合体とされるEquine-like G3株¹³⁾との一致率が約99%と高かった。また、G8に修正された株 (以下「G8誤判定株」という。) の塩基配列は、ウシロタウイルスとヒトロタウイルスの遺伝子再集合体とされるDS-1-like G8株¹⁷⁾との一致率が約99%と高かった。

3.2 型別PCR法による誤判定の原因推定

型別PCR法で使用するG3特異的プライマーのG3誤判定株に対するホモロジー検索によって推測された結合領域及びG3従来株への結合領域をそれぞれ図1-Aに、また、これらの結合領域におけるG3誤判定株及びG3従来株の塩基配列の比較結果を図1-Bに示す。G3従来株に対するG3特異的プライマーの結合領域において、G3従来株は1塩基、G3誤判定株は4塩基がプライマー配列と異なっていた (図1-B β領域)。また、ホモロジー検索によって推測されたG3誤判定株に対するG3特異的プライマー結合領域においては、G3従来株、G3誤判定株ともに認められる10塩基の挿入配列を除いて、G3従来株は4塩基、G3誤判定株は3塩基がプライマー配列と異なっていた (図1-B γ領域)。

G3及びG8特異的プライマーのG8誤判定株に対するホモ

表2 VP7遺伝子の解析によるG遺伝子型の修正

修正内容 (型)	シーズン					
	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015	2015/2016	2016/2017
G1→G3	40→0	* 129→4	63→3	3→0	1→0	25→22
G3→G8	82→0	1→0	2→0	3→0	0→0	10→1

* : 型別PCR法によるG遺伝子型の株数 → VP7遺伝子の解析で修正したG遺伝子型の株数
修正前の株には、型別PCR法でG1又はG3との混合感染とされた株をそれぞれ含む

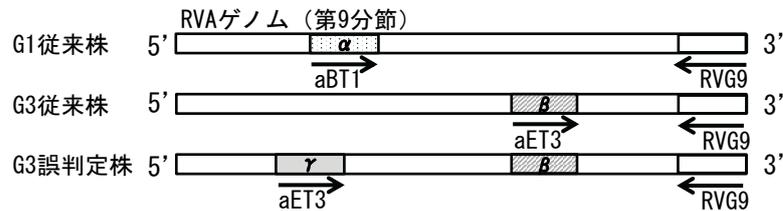
ロジー検索によって推測された結合領域及びG8従来株への結合領域をそれぞれ図2-Aに、また、これらの結合領域におけるG8誤判定株及びG8従来株の塩基配列の比較結果を図2-Bに示す。G8従来株に対するG8特異的プライマーの結合領域において、G8誤判定株は4塩基がプライマー配列と異なっていた（図2-B δ領域）。また、ホモロジー検索によって推測されたG8誤判定株に対するG3特異的プライマー結合領域においては、G8従来株は1塩基、G8誤判定株は2塩基がプライマー配列と異なっていた（図2-B

β領域）。

3.3 G遺伝子型の年別流行状況

VP7遺伝子の塩基配列の解析によって修正したRVAのG遺伝子型の年別流行状況を図3に示す。2009/2010から2016/2017までの8シーズンにおける主流型はそれぞれG3、G3、G3、G1、G1、G9、G2及びG3で、その検出割合はシーズンごとに異なっていた。G3誤判定株は、2012/2013シーズンに初めて4株が確認され、2014/2015及び2015/2016シーズンは確認されなかったものの、

A 型別プライマー結合領域



B 結合領域における塩基配列の比較

β領域	G3従来株	5'	CGTTT	CGAAGAAGTTGCAACAG	3'		
	G3誤判定株 (29株)	5'	CA	TTT	CGAAGAAGTTGCAACAG	3'	
	aET3	5'	CGTTT	GAAGAAGTTGCAACAG	3'		
γ領域	G3従来株	5'	TGTTT	GTA	TTACCCAAGTGAAGCAGCAACAG	3'	
	G3誤判定株	(21株)	5'	TGTTT	GTA	CTATCCTAACGAAGCTGCAACAG	3'
		(3株)	5'	TGTTT	GTA	TTATCCTAACGAAGCTGCAACAG	3'
		(5株)	5'	TGTTT	GTA	ACTATCCTAGCGAAGCTGCAACAG	3'
	aET3	5'	CGTTT	GAA	-----GAAGTTGCAACAG	3'	

図1 G3誤判定株及び従来株に対するプライマー結合領域の塩基配列の比較
aBT1：G1特異的プライマー 囲み文字：プライマーと一致する塩基
aET3：G3特異的プライマー *：G3誤判定株間で塩基が異なる部位
RVG9：共通プライマー

A 型別プライマー結合領域



B 結合領域における塩基配列の比較

δ領域	G8従来株	5'	GTCACACCATTTGTAATTCG	3'		
	G8誤判定株	5'	AT	TACG	CCATTTGTAATTCG	3'
	aAT8	5'	GTCACACCATTTGTAATTCG	3'		
β領域	G8従来株	5'	CT	TTTGAAGAAGTTGCAACAG	3'	
	G8誤判定株	5'	CT	TTTGAAGAAGTTGC	ACAG	3'
	aET3	5'	CGTTT	GAAGAAGTTGCAACAG	3'	

図2 G8誤判定株及び従来株に対するプライマー結合領域の塩基配列の比較
aET3：G3特異的プライマー RVG9：共通プライマー
aAT8：G8特異的プライマー 囲み文字：プライマーと一致する塩基

2016/17シーズンにはG3従来株の9株よりも多い22株が確認された。G8誤判定株については、2016/2017シーズンに1株が確認され、これは県内で初めてのG8検出例であった。

3.4 RVAの遺伝子検出率及び流行期における定点あたり感染性胃腸炎患者数の推移

2009/2010シーズンから2016/2017シーズンまでの8シーズンにおけるRVAの遺伝子検出率及び流行期における定点あたり感染性胃腸炎患者数の推移を図4に示す。RVA遺伝子の検出率は、ワクチン導入前の2009/2010及び2010/2011の2シーズンは20%を超えていたが、ワクチンが導入された2011/2012シーズンから減少傾向を示し、2014/2015から2016/2017の3シーズンは10%を超えることなく推移した。これは、各シーズンにおけるRVAの流行期（第5週から第18週まで）の定点あたり感染性胃腸炎

患者数の推移と類似していた。

4 考察

Multiplex-PCR法による遺伝子型別は、複数のプライマーを混合して塩基の伸長反応を行うため、DNAシーケンサーを用いた塩基配列解析と比較して安価であり、様々な微生物の同定に用いられる。しかしながら、多くのウイルス、特にRNAウイルスのゲノムは容易に変異することが知られており、Multiplex-PCR法に用いるプライマーセットも必要に応じた改良が求められる。Gouveiraらの開発した型別PCR法¹²⁾もその一つであり、2017年、国立感染症研究所の藤井によって誤判定が生じることが報告された¹⁴⁾。そこで我々は、県内の患者から検出した株を用い、誤判定の原因を検証した。その結果、G3誤判定株については、G3特異的プライマーが本来結合すべきβ領域

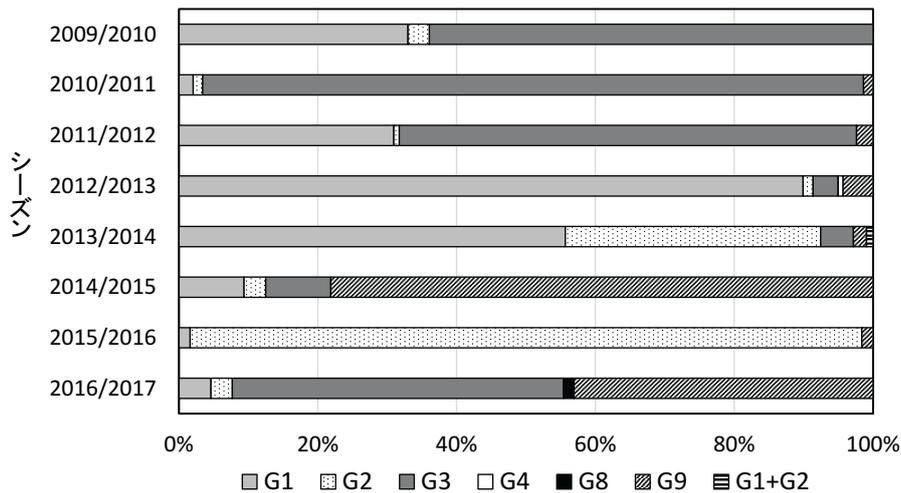


図3 VP7遺伝子の解析により修正したG遺伝子型の年別流行状況

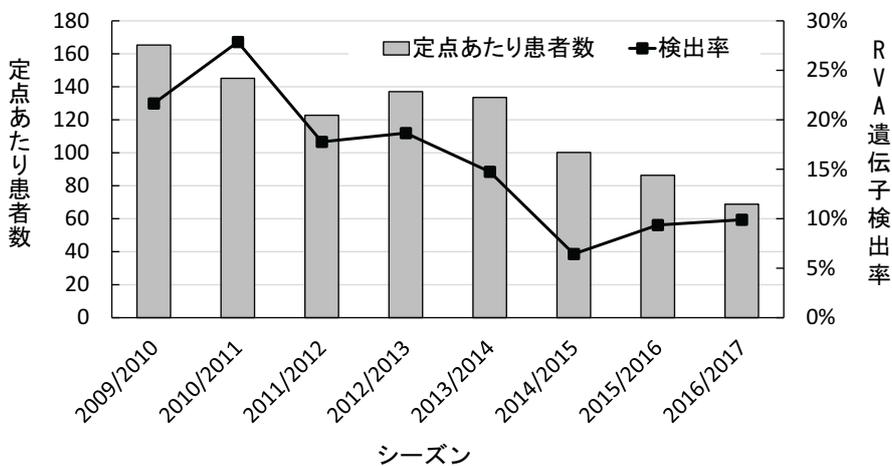


図4 RVAの遺伝子検出率及び流行期における定点あたり患者数の推移

定点あたり患者数は、RVA流行期である第5週～第18週に報告された感染性胃腸炎患者数を小児科定点数で除して算出した。

の塩基配列が従来株よりも3塩基多く異なる配列を示すとともに、誤って結合した γ 領域は従来株に4塩基の不一致があるのに比べ、G3誤判定株は3塩基の不一致しかないことが誤判定の原因と考えられた(図1)。これは、森らの報告¹⁸⁾と同様の結果であった。G8誤判定株については、G8特異的プライマーが本来結合すべき δ 領域の塩基配列のうち、PCR酵素の伸長反応に重要な3'末端を含む4塩基が異なる配列を示すため、G8特異的プライマーの δ 領域への結合よりもG3特異的プライマーの β 領域への結合が優先されたことが原因と考えられた(図2)。RVAの型別PCR法は、全国の地方衛生研究所において、長年標準的に実施されてきた。近年、学術的には次世代シーケンサーを用いた全ゲノム(11分節)の解析による遺伝子型別が主流になりつつあるが、機器、ランニングコストともに未だ高価であり、地方衛生研究所への導入は進んでいない。そのため、型別PCR法については、近年の流行株を考慮に入れたプライマーセットの早急な改良が望まれる。

今回我々は、2011年に導入されたワクチンの導入によるRVA流行への影響を評価するため、2009年まで遡って再解析を行った。G3誤判定株については、ワクチン導入後の2012/2013シーズンに県内で初めて確認され、2016/2017シーズンにはG3従来株よりも多かったことから、年々増加していると考えられた。また、G8誤判定株については、2016/2017シーズンに1株確認され、県内で初めてのG8検出例となった。G8は、国内では2006年に愛知県で初めて確認されたが¹⁹⁾、2016/2017シーズンには全国10道府県で確認されており²⁰⁾、今後も県内の発生動向に注視が必要と考えられた。また、BLAST検索の結果、誤判定株はG3、G8のいずれも近年になって出現した動物のロタウイルスとヒトロタウイルスの遺伝子再集合体であると考えられた^{13), 17)}。このことは、ヒトの集団に免疫がないことが誤判定株の増加の一因であることを示唆している。一方で、ワクチン導入以降のG遺伝子型全体の流行状況に着目すると、その検出割合は毎年異なっており、ワクチン導入前と同様に、特定の遺伝子型の連続的な流行は確認されなかった。また、ワクチン導入以降、胃腸炎患者におけるRVA遺伝子検出率及びRVA流行期における胃腸炎患者数は減少してきている。これらのことから、現在のところ、県内のRVAの流行は、一部の遺伝子型の検出割合が増加しているものの、全体としては抑制されており、ワクチンは効果的に機能しているものと推察された。

文 献

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

報, 41, 67-72, 2017

- 12) Gouvea, V., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F. et al. : Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens, *J. Clin. Microbiol.*, 28, 276-282, 1990
- 13) Malasao, R., Saito, M., Suzuki, A., Imagawa, T., Nukiwa-Soma, N. et al. : Human G3P[4] rotavirus obtained in Japan, 2013, possibly emerged through a human-equine rotavirus reassortment event, *Virus Genes*, 50, 129-133, 2015
- 14) 藤井克樹: ロタウイルスの遺伝子型別法に関する注意, *病原微生物検出情報*, 38, 172-174, 2017
- 15) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル, 感染性胃腸炎 (ロタウイルス 2014年12月版)
- 16) Liu, B., Fujita, Y., Arakawa, C., Kohira, R., Fuchigami, T. et al. : Detection of Rotavirus RNA and Antigens in Serum and Cerebrospinal Fluid Samples from Diarrheic Children with Seizures, *Jpn. J. Infect. Dis.*, 62(4), 279-283, 2009
- 17) Kondo, K., Tsugawa, T., Ono, M., Ohara, T., Fujibayashi, S. et al. : Clinical and Molecular Characteristics of Human Rotavirus G8P[8] Outbreak Strain, Japan, 2014, *Emerg. Infect. Dis.*, 23(6), 968-970, 2017
- 18) 森愛, 奴久妻聡一, 植村卓, 田中忍, 中西典子ら: 2016年4月に神戸市で検出されたA群ロタウイルスVP7遺伝子の解析, *病原微生物検出情報*, 37, 115-116, 2016
- 19) 小林慎一, 藤原範子, 安井善宏, 伊藤雅, 山下照夫ら: 2005～2009年の5年間におけるA群ロタウイルス検出状況—愛知県, *病原微生物検出情報*, 32, 72-73, 2011
- 20) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, ノロウイルス等検出速報, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-noro.html> (2018.11.26アクセス)

【調査研究】

岡山県におけるインフルエンザ流行の疫学的解析 (2017/2018年シーズン) Epidemiological Study of Influenza in Okayama Prefecture (2017 - 2018)

松岡保博, 野宮加代子, 梶原香代子, 濱野雅子, 橋本清美, 木田浩司,
爲房園実*, 浜辺美千子** (ウイルス科)

*岡山県感染症情報センター, **岡山県保健福祉部健康推進課

MATSUOKA Yasuhiro, NOMIYA Kayoko, KAJIHARA Kayoko, HAMANO Masako,
HASHIMOTO Kiyomi, KIDA Kouji, TAMEFUSA Sonomi* and HAMABE Michiko** (Virology Section)

*Okayama Prefectural Infectious Disease Surveillance Center

**Health Promotion Division, Department of Health and Social Welfare, Okayama Prefecture

要 旨

2017/2018年シーズンの岡山県におけるインフルエンザ流行は、感染症発生動向調査事業における患者発生状況から、2017年第48週（11月下旬から12月上旬）に始まり、2018年第3週から第6週（1月中旬から2月中旬）までをピークとし、2018年第15週（4月中旬）に終息したものと考えられた。患者から検出されたインフルエンザウイルスは107株で、AH1pdm09が49株、B型山形系統が35株、AH3亜型が21株、B型ビクトリア系統が2株であった。AH1pdm09がシーズン前半に集団発生事例を中心に多く検出されたが、2018年に入り流行のピークを迎えるにつれて検出数は急激に減少した。一方、AH3亜型及びB型はシーズンを通して検出され、流行のピーク時に最も多く検出されたのは、B型山形系統であった。以上より、2017/2018年シーズンは、B型山形系統を流行の主体とし、シーズン前半はAH1pdm09が、シーズンを通してAH3亜型が混合流行した、例年と異なる流行パターンであったと考えられた。

[キーワード：インフルエンザウイルス、インフルエンザ集団発生、感染症発生動向調査、疫学解析]

[Key words: Influenza virus, Outbreak of influenza, Infectious disease surveillance, Epidemiological study]

1 はじめに

2017/2018年シーズン（2017/9/4～2018/9/2）の岡山県におけるインフルエンザの流行状況を明らかにするため、岡山県感染症発生動向調査事業（以下「発生動向調査」という。）の定点医療機関における患者発生状況及び学校等における集団事例の発生状況を解析した。また、患者等から採取された咽頭拭い液等について、インフルエンザウイルス（以下「Inf.V」という。）の検索を行った。

2 材料及び方法

2.1 インフルエンザ患者発生状況

2017年9月～2018年8月の発生動向調査におけるインフルエンザ定点84医療機関の患者報告数から、1定点医療機関あたりのインフルエンザ患者報告数（1週間に1か所の定点医療機関を受診したインフルエンザ患者報告数の平均値。以下「定点あたり患者報告数」という。）を算出した。また、集団事例の発生状況については、保健福祉部健康推進課が取りまとめた「インフルエンザとみられる

学校等の臨時休業について」を基に集計した。

2.2 ウイルス検索材料

2017年9月～2018年5月に、発生動向調査の指定提出機関及び保健所が実施する積極的疫学調査において、インフルエンザ又はそれを疑う患者121症例（散发事例90症例、集団事例10施設31症例）から採取された咽頭拭い液等を検索材料とした。

2.3 遺伝子検出によるウイルス検索

遺伝子検出によるInf.V検索は、国立感染症研究所から示された「インフルエンザ診断マニュアル（第3版）」¹⁾に従って実施した。

2.4 Inf.V AH1pdm09の薬剤耐性マーカー遺伝子の検索

Inf.V AH1pdm09の薬剤耐性マーカー遺伝子の検索は、国立感染症研究所から示された「A/H1N1pdm09 H275Y耐性株検出法実験プロトコール（2011年8月 ver.2）」²⁾に従って実施した。すなわち、Inf.V AH1pdm09の遺伝子が検出された検体についてMDCK細胞によるウイルス分離を行い³⁾、培養上清から抽出したRNAを用いてリアルタ

イムPCRシステムによるSNPタイピングを実施した。

3 結 果

3.1 患者発生状況

2017/2018年シーズンの発生動向調査における定点あたり患者報告数及びインフルエンザとみられる学校等の臨時休業施設数の推移を図1に示す。今シーズンは、2017年第36週（9月初旬）に県北部から初めての患者が報告され、第46週（11月中旬）まで、県内各地域で散発的な報告が続いた。定点あたり患者報告数は、第47週（11月下旬）から増加し始め、第48週（11月下旬から12月上旬）には流行開始の指標である1.00人を超えた（1.37人）。その後、12月下旬にかけて急激に増加したが、第52週（12月下旬）から第2週（1月中旬）の間は横ばいで推移した。第3週（1月中旬）には再び急激に増加し、県内警報発令基準である30.0人を超え（42.96人）、今シーズンのピークを迎えた。その後も、第6週まで40.0人を超える状態で推移した（第4週：40.87人、第5週：42.71人、第6週：42.31人）。第7週（2月中旬）以降、定点あたり患者報告数は減少に転じ、第15週（4月中旬）には1.00人を下回って流行はほぼ終息した。

一方、2017/2018年シーズンの臨時休業施設数は、1094施設であり、内訳は、小学校723施設（66.1%）、中学校

179施設（16.3%）、幼稚園109施設（10.0%）、高等学校74施設（6.8%）、保育園1施設（0.1%）、その他8施設（0.7%）であった。シーズン初の臨時休業は、2017年第48週（11月下旬）に岡山市内の幼稚園及び倉敷市内の中学校で発生した。臨時休業施設数の報告は、初発の第48週に計7施設報告され、翌週からは倍々に増加し、学校等の休暇期間を挟んで、第3週（1月中旬）からさらに急増し、第5週（1月下旬から2月上旬）にはシーズン最多となる222施設となった。臨時休業施設数の推移は、学校等の休暇期間を除き、シーズンを通して定点あたり患者報告数の動向とよく一致していた。

3.2 Inf.V検出状況

インフルエンザ患者等からの検体採取状況及びウイルス検出状況を表1に示す。検査した121症例（散発事例90症例、集団発生事例7件31症例）からのウイルス検出数は107株で、AH1pdm09が49株と最も多く、次いでB型山形系統が35株、AH3亜型が21株、B型ビクトリア系統が2株であった。散発事例ではAH1pdm09、AH3亜型、B型ビクトリア系統及びB型山形系統が検出されたのに対して、集団発生事例から検出されたのは、AH1pdm09及びB型山形系統のみであった。

発生動向調査における定点あたり患者報告数及び週別のウイルス検出状況を図2に示す。なお、集団事例につい

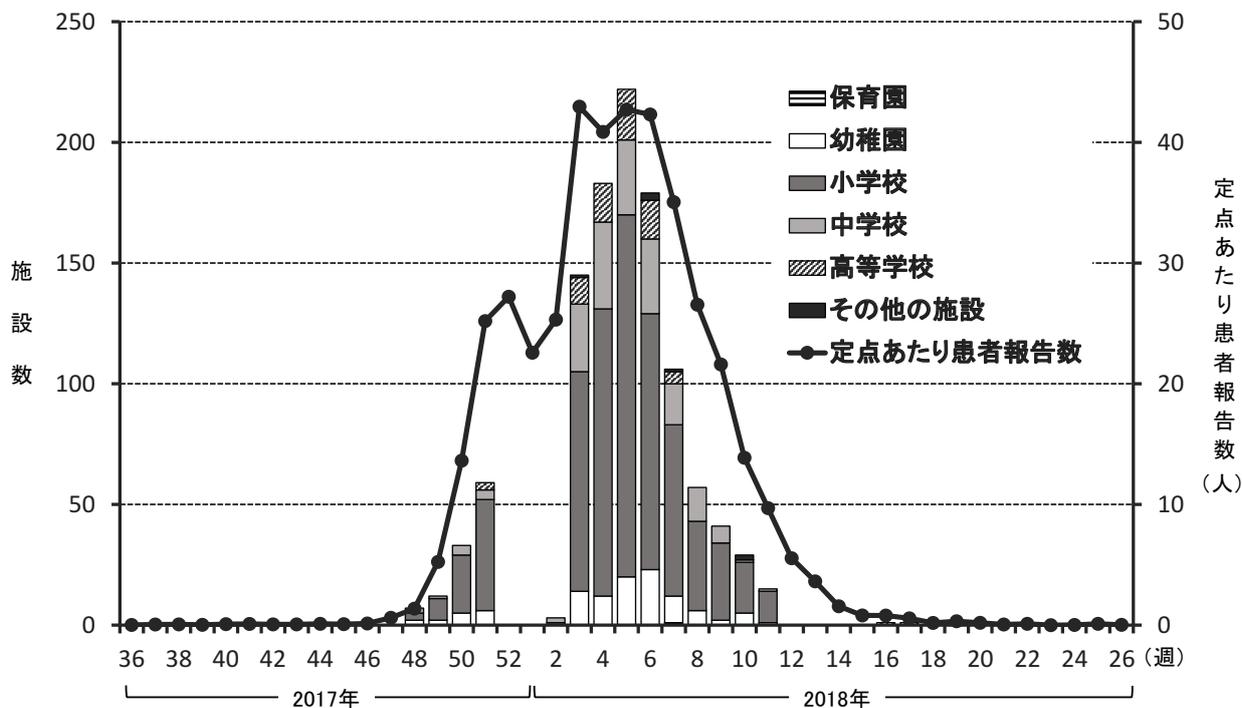


図1 定点あたり患者報告数及びインフルエンザとみられる学校等の週別臨時休業施設数
カラムが施設別の臨時休業数を、折れ線が定点あたり患者報告数を示す。

では、事例内で同一の型が複数株検出されている場合は検出数1として集計している。AH1pdm09がシーズン前半に集団発生事例を中心に多く検出されたが、2018年に入り流行のピークを迎えるにつれて検出数は急激に減少した。一方、AH3亜型及びB型はシーズンを通して検出され、流行のピーク時に最も多く検出されたのは、B型山形系

統であった。

Inf.V AH1pdm09の薬剤耐性マーカー遺伝子の検索を、今シーズン検出されたAH1pdm09のうち分離株の得られた44株について実施したが、耐性マーカー遺伝子を保有する株は見られなかった。

表1 インフルエンザウイルス検出状況

	検体採取状況			ウイルス検出・同定			
	所管保健所名	検体採取年月日	検出*	同定			
				AH1pdm09	AH3亜型	B型 (ビクトリア系統)	B型 (山形系統)
散 発 事 例	備前保健所	2017.12.14	1/1	1			
	備中保健所	2017.12.2~ 2018.4.16	18/22	7	4	1	6
	美作保健所	2018.2.13	1/1				1
	岡山市保健所	2017.9.9~ 2018.5.15	35/40	11	9	1	14
	倉敷市保健所	2017.12.4~ 2018.5.28	26/26	10	8		8
	小計		81/90 (90.0%)	29	21	2	29
集 団 発 生 事 例	施設名	所在地	検体採取年月日				
	A小学校	岡山市	2017.11.28	3/5	3		
	B小学校	美作市	2017.12.4	4/4	4		
	C小学校	早島町	2017.12.5	1/2	1		
	D小学校	津山市	2017.12.11	3/3	3		
	E中学校	笠岡市	2017.12.12	1/2	1		
	F小学校	玉野市	2017.12.18	3/3	3		
	G小学校	新見市	2017.12.19	2/2	2		
	H 高校	新見市	2018.1.17	3/3			3
	I 中学校	真庭市	2018.1.17	3/4	3		
	J 中学校	和気町	2018.1.18~2018.1.19	3/3			3
	合計			26/31 (83.9%)	20	—	—
合計			107/121 (88.4%)	49	21	2	35

* 陽性症例数/検査症例数

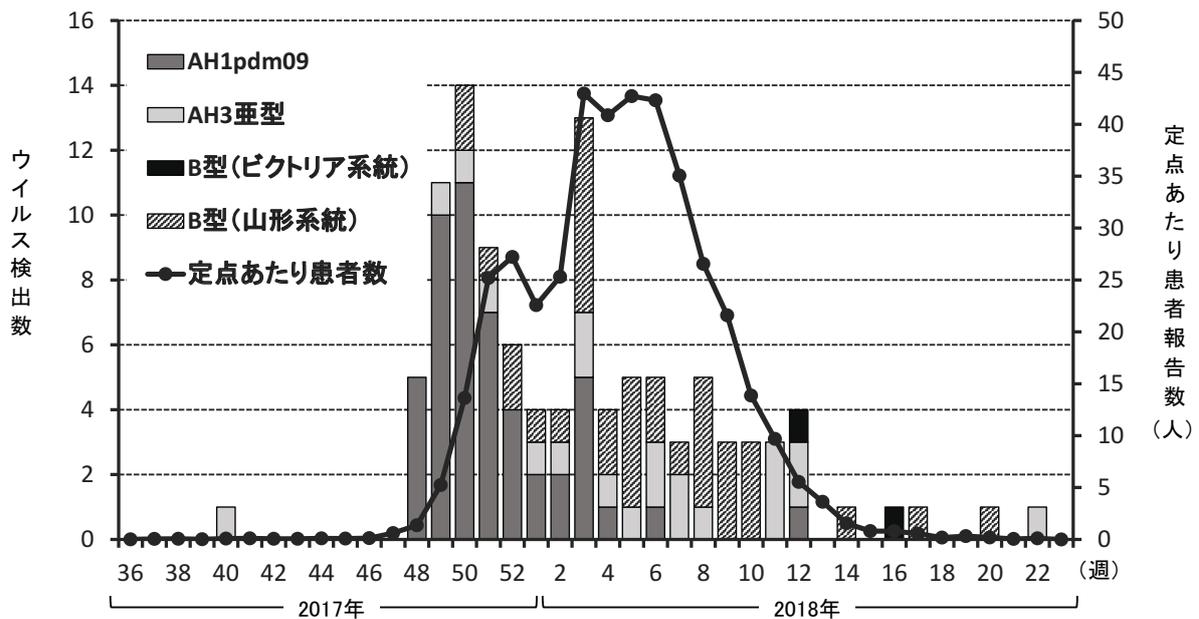


図2 定点あたり患者報告数及びウイルス検出状況
 カラムが型別のウイルス検出数を、折れ線が定点あたり患者報告数を示す。
 なお、集団事例については、1件の事例から同一の型が複数株検出されている場合は、検出数1とした。

4 考 察

2017/2018年シーズンの岡山県の発生動向調査におけるインフルエンザの定点あたり患者報告数及び臨時休業施設数は、2017年12月下旬の小さなピークと2018年1月中旬から2月中旬までの約1か月間を大きなピークとする二峰性を示した(図1)。しかし、1月上旬の定点あたり患者報告数の一時的な減少は、定点医療機関の一部が休診していることが原因と考えられた。そのため、実際には、2018年1月中旬から2月中旬までの約1か月間のみをピークとする一峰性の流行であったと考えられた。また、全国の流行パターン⁴⁾も、県内と同様であった。

ウイルス検出状況では、AH3亜型及びB型山形系統がシーズンを通して検出されたが、流行のピーク時に最も多く検出されたB型山形系統が主流行型であったと考えられた。一方で、検出数が最も多かったAH1pdm09については、2017年の散発事例から検出された29株のうち20株(69.0%)を占めていたこと、2017年に発生した7件全ての集団発生事例の原因であったこと、また2018年に入ると検出数が急激に減少したことから、今シーズンのピークを迎えるまでの主流行型であったと考えられた。B型は通常、流行のピークを越えたシーズンの後半から検出され始め、次第に検出割合が上昇するとされているが、今シーズンの流行パターンは例年と異なり、シーズン前半からB型が流行の主体となった。なお、検出されたB型37株のうち35株が山形系統であった。

全国のウイルス検出状況は、県内と同様に、AH1pdm09がシーズン前半に、AH3亜型及びB型山形系統がシーズンを通して検出され、流行のピーク時に最も多く検出されたのはB型山形系統であった。

以上より、2017/2018年シーズンの岡山県におけるインフルエンザは、B型山形系統を流行の主体とし、シーズン前半はAH1pdm09が、シーズンを通してAH3亜型が混合流行した、例年と異なる流行パターンであったと考えられた。この状況は、全国も同様であり、さらに北半球全体でも同様であった⁴⁾。2012/2013年シーズン以降は、シーズン毎にAH3亜型とAH1pdm09が交互に流行していたため^{4)~9)}、2017/2018年シーズンはAH1pdm09が主流行型となる可能性が高いと考えていたが、実際にはシーズン前半のみの小規模な流行に限られた。このことが、B型山形系統が流行の主体となった一因である可能性も考えられるが、現在のところ原因は不明である。

文 献

1) 国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル

第3版(平成26年9月)

- 2) 国立感染症研究所：A/H1N1pdm09 H275Y 耐性株検出法実験プロトコール(2011年8月ver.2)
- 3) 飛田清毅：MDCK細胞によるインフルエンザウイルスの分離、臨床とウイルス、4、58-61、1976
- 4) 国立感染症研究所 感染症疫学センター：インフルエンザ 2017/18シーズン、病原微生物検出情報、39、181-183、2018
- 5) 国立感染症研究所 感染症疫学センター：インフルエンザ 2012/13シーズン、病原微生物検出情報、34、325-327、2013
- 6) 国立感染症研究所 感染症疫学センター：インフルエンザ 2013/14シーズン、病原微生物検出情報、35、251-253、2014
- 7) 国立感染症研究所 感染症疫学センター：インフルエンザ 2014/15シーズン、病原微生物検出情報、36、199-207、2015
- 8) 国立感染症研究所 感染症疫学センター：インフルエンザ 2015/16シーズン、病原微生物検出情報、37、211-213、2016
- 9) 国立感染症研究所 感染症疫学センター：インフルエンザ 2016/17シーズン、病原微生物検出情報、38、209-211、2017

【資 料】

平成29年度感染症流行予測調査（ポリオ感染源調査）

Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases in Okayama Prefecture (2017-2018)

– Surveillance of Poliovirus in influent sewage water –

橋本清美, 松岡保博, 野宮加代子, 濱野雅子, 木田浩司, 浜辺美千子* (ウイルス科)

*岡山県保健福祉部健康推進課

HASHIMOTO Kiyomi, MATSUOKA Yasuhiro, NOMIYA Kayoko, HAMANO Masako, KIDA Kouji,
HAMABE Michiko* (Virology Section)

*Health Promotion Division, Department of Health and Social Welfare, Okayama Prefecture

要 旨

厚生労働省委託事業である感染症流行予測調査のうち、感染源調査の一環として、ポリオウイルス野生株の侵入及びワクチン由来ポリオウイルス株の伝播の監視を目的に、岡山県内の1下水処理場の流入下水におけるポリオウイルスサーベイランスを実施した。その結果、調査期間を通じてポリオウイルスは分離されなかった。一方で、同じ流入下水からポリオウイルス以外のエンテロウイルスが40株分離され、その遺伝子型は、エコーウイルス3型 (15株)、エコーウイルス6型 (23株) 及びエコーウイルス7型 (2株) と同定された。これらの遺伝子型は、同時期の県内感染症患者からは検出されていなかったことから、本調査で得られたデータをエンテロウイルス起因感染症の流行疫学解析に活用するためには、検出方法の改良、より広域的な感染源調査による情報の集積等が必要であると考えられる。

[キーワード：感染症, サーベイランス, ポリオウイルス, エンテロウイルス, 下水]

[Key words: Infectious disease, Surveillance, Poliovirus, Enterovirus, Sewage]

1 はじめに

ポリオは急性灰白髄炎とも呼ばれ、エンテロウイルス属のポリオウイルスにより引き起こされる感染症である。免疫を持たないヒトがポリオウイルスに感染すると、多くは不顕性感染又はかぜ様症状を呈した後に回復するが、まれに麻痺性ポリオを発症する。現在のところ、ポリオに対する有効な治療薬は存在しないため、流行制御の基本はワクチンによる予防接種である。

厚生労働省委託事業である感染症流行予測調査は、予防接種が実施されている様々な感染症に対する集団免疫の把握 (感受性調査) 及び病原体の検索等の調査 (感染源調査) を行うことで、総合的に感染症の流行を予測するとともに、予防接種事業の効果的な運用を図ることを目的としている。ポリオウイルスの感染源調査はその一環であり、流行地域からのポリオウイルス野生株の侵入及び国内でのワクチン由来ポリオウイルスの伝播を継続して監視するために実施している。本調査は、下水処理場への流入下水を対象としていることから、顕性、不顕性感染に関わらず、地域のヒト集団で伝播しているポリオウイルスを効率よく検出することが可能である¹⁾。また、

付随して検出される他のウイルスについても疫学解析に利用できる。

今回我々は、平成29年4月～平成30年3月に県内の1下水処理場から採取された流入下水を対象に、ポリオウイルスの感染源調査を実施した。

2 材料と方法

2.1 材料

平成29年 (2017年) 4月～平成30年 (2018年) 3月に県内のA下水処理場 (処理人口約3万6千人) で毎月1回採取した流入下水500 mLを用いた。

2.2 ウイルスの分離及び同定

平成29年度感染症流行予測調査実施要領²⁾ 及び感染症流行予測調査事業検査術式 (平成14年6月)³⁾ に従い、材料の流入下水を陰電荷膜吸着誘出法により100倍濃縮したものを検体とし、試験に供した。24ウェルプレートに培養した3種類の細胞 (L20B, RD-A, FL) のそれぞれ6ウェルに検体を0.1 mLずつ接種し、常法どおり培養した。全てのウェルについて1週間ごとに継代し、2週間の観察期間中の細胞変性効果 (cytopathic effect ; 以下「CPE」

という。)の出現を指標として、ウイルス検索を行った。CPEが出現したウェルの培養上清液を回収し、CPEの形態からエンテロウイルスであると推定されたものについて、病原体検出マニュアル「手足口病」⁴⁾に従い、ダイレクトシークエンス法により決定したVP1領域の一部の遺伝子配列を、データベースの既知株と比較してウイルスの種及び遺伝子型を同定した。

3 結果及び考察

調査期間を通じてポリオウイルスは分離されず、A下水処理場の処理地域におけるポリオウイルス野生株の侵入及びワクチン由来ポリオウイルス株の伝播は確認されなかった。一方、ポリオウイルス以外のエンテロウイルスが40株分離され、その遺伝子型の内訳は、エコーウイルス(以下「E」という。)3型が15株(採水月:2017年6月2株, 10月7株, 11月6株), E6型が23株(採水月:2017年8月4株, 9月1株, 10月2株, 12月12株, 2018年1月4株), E7型が2株(採水月:2017年11月1株, 2018年1月1株)であった(表1)。昨年度の調査と比較すると、E6型が主たる分離ウイルスとして昨年度に引き続き分離された。一方、昨年度比較の多く分離されたコクサッキーウイルスB(以下「CB」という。)5型は今年度分離されず、昨年度分離されなかったE3型が分離されるなどの変化が認められた。

今年度の分離株を、調査期間中に感染症発生動向調査で県内の感染症患者から検出されたエンテロウイルスと

比較したところ、双方で一致する遺伝子型は認められなかった(表2)。この要因として、エンテロウイルスは型ごとに株化細胞における増殖効率が異なるため、多くのヒトから排泄された下水中の主流行遺伝子型が、分離培養によって増殖効率に優れる他の型に置き換わった可能性が考えられる。E及びCBは、コクサッキーウイルスA(以下「CA」という。)に比較しての分離培養における増殖効率が非常に高いが、今年度はヒトの間にE及びCBの流行がなかったため、昨年度認められたCB5型での流入下水及び感染症患者からの分離株の遺伝子型の一致のような事象が認められなかった可能性がある。一方、下水処理場の処理地域と感染症患者の居住地域が異なるためである可能性が考えられるが、現状、要因の特定には至っていない。流入下水及び感染症患者からの分離株の不一致傾向は昨年度の調査⁵⁾でも認められているため、現時点では、本調査で得られたデータをエンテロウイルス起因感染症の流行疫学解析に活用できる段階には至っていないと考える。

本調査は、ポリオウイルスの伝播の監視が目的であるが、付随して他のウイルスも分離される。特に、時系列的にその消長を把握できる可能性があり、これらのウイルスから得られた情報を有効活用するため、今後は検出方法の改良、より広域的な感染源調査による情報の集積等に積極的に取り組んでいきたい。

文 献

表1 流入下水からの採水月別ポリオウイルス及びエンテロウイルス検出状況

検出ウイルス	採水月												合計
	2017.04	2017.05	2017.06	2017.07	2017.08	2017.09	2017.10	2017.11	2017.12	2018.01	2018.02	2018.03	
ポリオウイルス													0
エコーウイルス 3 型 (E 3)			2				7	6					15
エコーウイルス 6 型 (E 6)					4	1	2		12	4			23
エコーウイルス 7 型 (E 7)								1		1			2
合計	0	0	2	0	4	1	9	7	12	5	0	0	40

表2 流入下水及び感染症患者からの月別エンテロウイルス検出状況

検出ウイルス	検体採取月												
	2017.04	2017.05	2017.06	2017.07	2017.08	2017.09	2017.10	2017.11	2017.12	2018.01	2018.02	2018.03	
流入下水からの検出			E 3		E 6	E 6	E 6	E 3	E 3	E 6	E 6	E 7	E 7
感染症患者からの検出		CA 6		CA 5									
	CA 16	CA 10	CA 16										
						EV 71	EV 71	EV 71					

E : エコーウイルス CA : コクサッキーウイルスA EV : エンテロウイルス

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課・国立感染症研究所
感染症疫学センター：平成26年度（2014年度）感染症
流行予測調査報告書，8-15，2016
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課：平成29年度感染症
流行予測調査実施要領，5-8，2017
- 3) 厚生労働省健康局結核感染症課・国立感染症研究所
感染症流行予測事業委員会：感染症流行予測検査術
式，2002
- 4) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル「手足口
病」，21-35，2015
- 5) 梶原香代子，磯田美穂子，木田浩司，谷川徳行，松
岡保博ら：平成28年度感染症流行予測調査（ポリオ
感染源調査），岡山県環境保健センター年報，42，
63-65，2018

【調査研究】

LC-MS/MSを用いた牛の筋肉中の動物用医薬品に関する一斉分析法の検討

Study on a Method for Simultaneous Determination of Veterinary Drugs in Cow muscle by LC-MS/MS

難波順子, 筒井みちよ, 池田和美, 金子英史, 林 隆義 (衛生化学科)

NAMBA Junko, TSUTSUI Michiyo, IKEDA Kazumi, KANEKO Hidefumi, HAYASHI Takayoshi
(Food and Drug Chemical Research Section)

要 旨

動物用医薬品の迅速かつ高感度な分析方法の確立を目指し、岡山県では理化学的分析法の確立されていない抗生物質等について、LC-MS/MSを用いたサルファ剤等合成抗菌剤との同時分析法を検討した。牛の筋肉を試料とし、各種標準品を添加し、前処理方法の検討を行った。試料をエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム含有トリス塩酸緩衝液で抽出、遠心分離後、固相カラム (HLB) 及びアセトニトリル/ヘキサン分配による精製を行い、LC-MS/MSで測定を行う分析法を構築した。当方法について妥当性評価を行ったところ、検討を行った抗生物質及び合成抗菌剤86物質のうち37物質で目標値を満たし、実用の可能性が示唆された。

[キーワード：動物用医薬品, 抗生物質, 牛の筋肉, 一斉分析法, 液体クロマトグラフタンデム質量分析計]

[Key words : Veterinary drugs, Antibiotics, Cow muscle, Simultaneous determination, LC-MS/MS]

1 はじめに

動物用医薬品は、安定した高い生産性を得るために畜水産物に用いられる医薬品であり、その畜水産物への移行・残留が懸念されている¹⁾。このため、動物用医薬品が畜水産物に残留し人の健康を損なうことのないよう、食品衛生法の改正により、農薬や飼料添加物と共に動物用医薬品が、一定の量を超えて残留する食品の販売等を原則禁止するポジティブリスト制度が平成18年5月29日に施行され、安全性の確保が図られている。このポジティブリスト制度導入に伴い、規制の対象となる農薬、飼料添加物及び動物用医薬品が大幅に増加したため、高感度かつ迅速に分析できる一斉分析法の開発が求められている。ただし、厚生労働省が定めた「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法」(平成17年1月24日付け食安発第0124001号)については、検体中に夾雑物が多く、その影響を排除するなどの作業が繁雑であることが報告されているため、各地方衛生研究所等において独自にLC-MS/MSを用いた一斉試験法が開発が行われている^{2)~5)}。なお、厚生労働省が定めた「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について」(平成19年11月15日付け食安発第1115001号。以下「ガイドライン」という。)により、食品に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品の分析を実施する場合において、分析機関ごとに妥当性評価

の実施が必要とされている。

岡山県では、畜水産物中のサルファ剤等合成抗菌剤を主とする動物用医薬品についてはLC-MS/MSを用いた一斉分析法⁶⁾により実施しているが、抗生物質等については理化学的分析法が確立されておらず、微生物学的分析法で行っている状況であった。そこで、分析の効率性の向上等を目指し、抗生物質等の一斉分析法を検討すると共に、サルファ剤等合成抗菌剤との同時前処理法も検討し、まず、はちみつを用いて妥当性評価を行った結果を報告した⁷⁾。今回、牛の筋肉を用いた同時前処理法を検討し、妥当性評価を行ったので報告する。

2 方法

2.1 試料

厚生労働省から代表的な畜水産物であると示されている、牛の筋肉(横隔膜等)を使用した。なお、当該試料は、分析対象とする動物用医薬品が検出されないことを確認後、使用した。

2.2 標準品, 固相カラム及び試薬

標準品：既報⁷⁾のとおり調製した。

混合標準溶液1 (抗生物質等動物用医薬品)：既報⁷⁾のとおり調製した。

混合標準溶液1-1 (抗生物質等動物用医薬品)：抗生物質等動物用医薬品 (キノロン系・ニューキノロン系合成

抗菌剤, マクロライド系抗生物質 (マクロライド系駆虫薬を含む), ポリエーテル系抗生物質) を混合標準溶液1と同様に調製した。

混合標準溶液2 (サルファ剤等動物用医薬品) : 既報⁷⁾ のとおり調製した。

マトリックス添加混合標準溶液 : 混合標準溶液を牛の筋肉を用いて作成したブランク試験溶液に混合標準溶液を段階的に添加し, 調製した。(0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 µg/mL)

固相カラム : アジレント製 Captiva EMR-Lipid, 1 mL
その他の試薬等 : 既報⁷⁾ のとおり。

2.3 装置及び測定条件

2.3.1 LC-MS/MS

既報⁷⁾ のとおり。

2.3.2 ゲル浸透クロマトグラフ (以下「GPC」という。)

カラム : 条件① 昭和電工製 GLNpak PAE-2000 AC

20.0 mm × 300 mm, 5 µm

(プレカラム : PAE-G AC 20.0 mm × 100 mm, 9 µm)

条件② 昭和電工製 GLNpak EV-2000 AC 20.0 mm × 300 mm, 16 µm

(プレカラム : EV-G AC 8.0 mm × 50 mm, 16 µm)

移動相 : 条件① アセトン:シクロヘキサン (95 : 5)

条件② アセトン:シクロヘキサン (2 : 8)

カラム温度 : 40 °C

移動相流量 : 4 mL/min

試料注入量 : 2 mL

2.4 分析溶液調製方法

はちみつの分析フロー⁷⁾ 及び牛の筋肉の分析フローを図1に示す。牛の筋肉では脂肪分等の夾雑物が多いため, はちみつの分析フローに脱脂操作を追加し, 検体採取量及び最終溶液量を変更した。牛の筋肉試料2 gを50 mLポリプロピレン製遠沈管に量り取り, 10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (以下「Na₂EDTA」という。) 含有 0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液 15 mLを加えてホモジナイズした後, 10分間振とうし, 6900 × gで20分間, 室温で遠心分離した。上層を分取し, 沈殿を10 mmol/L Na₂EDTA含有 0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液5 mLで再抽出し, 遠心分離後, 上層を合わせ桐山ルートで吸引ろ過した。

HLB 1 gカラムをメタノール 10 mL, 精製水 10 mL, 10 mmol/L Na₂EDTA含有 0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液 10 mLで順番にコンディショニングした。得られた上層全量をHLB 1 gカラムに負荷し, 精製水 10 mLで洗浄し, 遠心脱水後, アセトニトリル 20 mLで溶出させた。溶出液を分液ロートに移し, アセトニトリル飽和ヘキサン20 mLを加えて振とうし, アセトニトリル層を分取した。アセトニトリル層を1 mL以下になるまで減圧濃縮した後にアセトニトリルを約4 mL加えて, 0.5 mL程度まで再濃縮



図1 分析フロー

し、濃縮液をアセトニトリルで4 mLに定容後、0.20 µmメンブレンフィルターでろ過したものをLC-MS/MS測定用分析溶液とした。

2.5 妥当性評価の方法

ガイドラインに示された、分析者1名が2併行5日間実施する枝分かれ実験計画に基づき、添加濃度0.1 µg/g及び0.01 µg/gの2濃度で試料に対する添加回収試験を行い、定量限界、選択性、真度及び精度を評価した。

3 結果及び考察

3.1 定量限界値及び検量線

LC-MS/MSを用いた分析の問題点として、試料中のマトリックスにより、目的成分のイオン化に影響があることが報告されており⁹⁾、実試料におけるこの影響を補正するために、マトリックス添加混合標準液を用いて定量することとした。牛の筋肉試料2 gを前処理し4 mLのLC-MS/MS測定溶液とするので、添加濃度0.01 µg/gはLC-MS/MS測定溶液濃度では0.005 µg/mLとなることから、検量線は0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 µg/mLの6点調製し、各濃度でS/N比を求めた。0.002 µg/mLでS/N比 ≥ 10を満たしていない物質は、混合標準溶液1では、テトラサイクリン系の全4物質（オキシテトラサイクリン (Oxytetracycline)、テトラサイクリン (Tetracycline)、クロルテトラサイクリン (Chlortetracycline)、ドキシサイクリン (Doxycycline))、ペニシリン系の6物質（アスポキシシリン (Aspoxicillin)、アモキシシリン (Amoxicillin)、アンピシリン (Ampicillin)、オキサシリン (Oxacillin)、フェノキシメチルペニシリン (Phenoxymethylpenicillin)、ベンジルペニシリン (Benzylpenicillin)) 及びマクロライド系の2物質（モキシデクチン (Moxidectin)、ネオスピラマイシンI (Neospiramycin I)) の12物質であった。テトラサイクリン系及びペニシリン系は定量限界値の高い物質が多いので、最適な測定条件等を今後検討することとし、今回の検討対象物質からは除外した。このことから、以下の検討は、混合標準溶液1-1として、テトラサイクリン系及びペニシリン系以外のキノロン系、リンコマイシン系、マクロライド系、ポリエーテル系の37物質を用いて行った。混合標準溶液2では、スルフィソキサゾール (Sulfisoxazole)、スルファチアゾール (Sulfathiazole)、スルファメラジン (Sulfamerazine)、スルファニトラン (Sulfanitran)、オルメトプリム (Ormetoprim)、スルファクロロピリダジン (Sulfachlorpyridazine)、トレンボロン (Trenbolone)、キシラジン (Xylazine)、アレスリン

(Allethrin) の9物質が0.002 µg/mLでS/N比 ≥ 10を満たしておらず不合格となった。0.002 µg/mLでS/N比 ≥ 10を満たしていない11物質は0.005 µg/mLでS/N比 ≥ 10を満たしていた。そのため検量線は0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 µg/mLを5点調製し、添加濃度0.1 µg/gの添加回収試験のみを行うこととした。

また、検量線の相関係数が0.99未満の標準品は不合格とした。混合標準品1-1では全ての標準品で、混合標準品2では2物質（フロルフエニコール (Florfenicol)、ナイカルバジン (Nicarbazine)) を除く標準品で良好な直線性 ($r^2 \geq 0.99$) が得られた。

3.2 精製法の検討

牛の筋肉は、はちみつに比べてタンパク質や脂質などの夾雑物を多く含むので、はちみつの分析法に脱脂を目

表1 アセトニトリル/ヘキサン分配検討結果

動物用医薬品	回収率 (%)
Enrofloxacin	79
Ciprofloxacin	86
Oxolinic acid	100
Ofloxacin	77
Orbifloxacin	95
Sarafloxacin	87
Difloxacin	100
Danofloxacin	120
Nalidixic acid	98
Norfloxacin	92
Flumequine	100
Piromidic acid	87
Marbofloxacin	97
Lincomycin	58
Clindamycin	100
Miloxacin	23
Pirlimycin	100
Erythromycin A	85
Erythromycin B	98
Oleandomycin	80
Josamycin	79
Spiramycin I	81
Tylosin	78
Tiamulin	84
Tilmicosin	74
Mirosamicin	85
Clarithromycin	85
Azithromycin	97
Roxithromycin	91
Leucomycin A5	71
Tacrolimus NH ₃	110
Dirithromycin	39
Moxidectin	40
Avermectin B1a NH ₃	100
Eprinomectin	103
Neospiramycin I	75

表2 GPCの分画毎の溶出率(%)

条件	①						②						
	PAE2000						EV2000						
	10-14	14-18	18-22	22-26	26-30	合計	10-14	14-18	18-22	22-26	26-30	30-34	合計
Enrofloxacin	0	0	8.9	11	0	20	0	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oxolinic acid	0	0	20	52	4.1	76	4.5	3.5	0	0	0	0	8.0
Ofloxacin	0	0	0	6.4	0	6.4	0	0	0	0	0	0	0
Orbifloxacin	0	0	3.8	28	3.3	35	0	0	0	0	0	0	0
Sarafloxacin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Difloxacin	0	0	16	21	2.8	40	0	0	0	0	0	0	0
Danofloxacin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nalidixic acid	0	0	50	10	0	60	0	0	0	5.3	2.2	2.6	10
Norfloxacin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flumequine	0	0	94	12	2.6	110	0	0	0	6.5	3.0	2.4	12
Piromidic acid	0	0	52	31	3.5	87	0	0	0	3.5	0	0	3.5
Marbofloxacin	0	0	0	13	7.8	21	0	0	0	0	0	0	0
Lincomycin	0	0	0	0	19	19	6.0	4.8	2.1	0	0	0	13
Clindamycin	0	0	8.0	76	6.9	91	9.0	27	34	0	0	0	70
Miloxacin	0	0	0	33	8.0	41	0	0	0	0	0	0	0
Pirlimycin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erythromycin A	0	0	59	37	3.9	100	11	14	21	4.7	6.8	5.4	63
Erythromycin B	0	0	33	15	0	48	14	17	14	4.6	3.4	2.9	57
Oleandomycin	0	0	39	0	0	39	13	13	13	3.8	3.9	2.6	49
Josamycin	0	87	0	0	0	87	58	27	2.9	0	0	0	88
Spiramycin I	0	0	0	0	0	0	4.4	0	0	0	0	0	4.4
Tylosin	0	80	12	0.0	0	92	62	24	2.4	0	0	0	88
Tiamulin	0	68	31	3.1	0	100	0	0	38	14	13	4.2	70
Tilmicosin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mirosamicin	0	0	71	5.7	0	77	27	30	15	0	0	0	72
Clarithromycin	0	0	120	4.9	0	120	8.1	19	36	10	11	5.1	89
Azithromycin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Roxithromycin	0	6.0	86	2.9	0	95	15	23	21	7.2	4.0	0	70
Leucomycin A5	0	81	3	0	0	84	59	30	1.7	0	0	0	90
Tacrolimus NH ₃	0	100	0	0	0	100	63	36	2.6	0	0	0	100
Dirithromycin	0	0	44	6.3	0	51	10	8.1	9.1	0	0	0	27
Moxidectin	0	110	0	0	0	110	32	59	6.4	0	0	0	98
Avermectin B1a NH ₃	0	110	0	0	0	110	77	38	4.5	0	0	0	120
Eprinomectin	0	93	0	0	0	93	67	29	4.0	0	0	0	100
Neospiramycin I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表3 固相カラムからの溶出率(%)

条件	①				②			
	溶出液	負荷液	溶出液		合計	負荷液	溶出液	
動物用医薬品	1mL	0-1mL	1-2mL	1mL		0-1mL	1-2mL	
Enrofloxacin	9.4	24	10	44	7.7	14	7.6	29
Ciprofloxacin	0	0	0	0	0	5.0	7.6	13
Oxolinic acid	77	18	2.9	98	89	20	0	110
Ofloxacin	3.4	12	14	29	3.4	42	35	81
Orbifloxacin	8.4	33	16	57	7.6	36	11	55
Sarafloxacin	2.7	13	12	27	4.3	48	36	89
Difloxacin	40	33	5.6	79	26	20	4.8	51
Danofloxacin	0	0	0	0	0	0	0	0
Nalidixic acid	73	26	3.9	100	79	23	4.7	110
Norfloxacin	0	0	0	0	0	9.1	16	25
Flumequine	94	18	3.1	110	76	26	3.1	110
Piromidic acid	77	20	5.3	100	64	29	5.7	98
Marbofloxacin	3.0	8.4	8.2	19	2.2	38	21	62
Lincomycin	35	39	0	74	37	0	0	37
Clindamycin	93	22	0	120	35	11	0	46
Miloxacin	82	21	3.4	110	74	26	3.8	100
Pirlimycin	10	40	14	64	4.8	37	28	70
Erythromycin A	4.0	15	13	32	3.2	8.4	4.8	16
Erythromycin B	3.0	13	25	40	7.0	11	4.3	22
Oleandomycin	13	39	35	87	11	21	12	44
Josamycin	83	37	0	120	45	30	3.8	79
Spiramycin I	0	0	0	0	0	0	0	0
Tylosin	52	43	0	95	62	57	0	120
Tiamulin	3.3	15	22	40	4.9	7.9	5.0	18
Tilmicosin	0	0	0	0	0	0	0	0
Mirosamicin	15	40	10	65	5.7	11	5.9	23
Clarithromycin	2.6	10	18	31	5.3	5.0	0	10
Azithromycin	0	0	0	0	0	0	0	0
Roxithromycin	5.4	14	15	34	4.7	3.3	0	8.0
Leucomycin A5	93	36	0	130	57	38	0	95
Tacrolimus NH ₃	104	15	0	120	90	20	0	110
Dirithromycin	2.6	3.0	3.9	10	3.7	2.1	0	5.8
Moxidectin	98	20	0	120	102	19	0	120
Avermectin B1a NH ₃	89	20	0	110	89	16	0	100
Eprinomectin	103	22	0	120	113	6.5	0	120
Neospiramycin I	0	0	0	0	0	0	0	0

的とした精製工程を追加する必要があると推測されたため、(1)アセトニトリル／ヘキサン分配、(2)GPC、(3)固相カラムによる精製法の検討を混合標準溶液1-1の37物質の内、モネンシンを除く、同一のLC条件で測定可能な36物質で行った。

(1) アセトニトリル／ヘキサン分配は、アセトニトリルに標準品を0.02 μg 添加した後、同量のアセトニトリル飽和ヘキサンで液液分配を行い、アセトニトリル層を分取した後濃縮、測定した。結果を表1に示す。回収率が70%以上の物質は、32物質であった。

(2) GPCは2.3.2で示した条件①及び②で行い、移動相2 mLに標準品を0.2 μg 添加した後、両カラムとも2分(8 mL)ごとに分取し、濃縮、測定した。結果を表2に示す。回収率が70%以上の物質は、GPCの条件①では16物質、②では12物質であった。GPCでは回収率が良好な物質数が少なかった。

(3) 固相カラムはCaptiva EMR-Lipidを用いた。このカラムは、サイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせることにより、脂質炭化水素鎖を選択的に保持した上で、目的物質は通過する。また、負荷量の20～25%のアセトニトリル:水(8:2)で溶出させることが推奨されている⁸⁾。アセトニトリル:水(8:2) 1 mLに標準品を0.02 μg 添加した後、カラムに負荷し、条件①アセトニトリル:水(8:2) 2 mL又は条件②アセトニトリル:水(1:1) 2 mLで溶出し

た後に濃縮、測定した。結果を表3に示す。回収率が70%以上の物質は、条件①で16物質、条件②では15物質であった。Captiva EMR-Lipidも回収率が良好な物質数が少なかった。

上記の結果から、追加の精製法はアセトニトリル／ヘキサン分配を採用することとした。

3.3 分析溶液中の含水率の検討

標準品の一部は測定溶媒のアセトニトリルと水の組成比によって、ピーク形状及びピーク面積に変化が見られた。図2にオフロキサシン標準品(0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)をアセトニトリルまたはアセトニトリル:水(1:1)で溶解した場合のMRMクロマトグラムを示す。上段のアセトニトリルに溶解した場合はピークトップが割れているが、下段のアセトニトリル:水(1:1)で溶解した場合は良好なピーク形状になった。ピーク面積は、アセトニトリルに溶解した方が2倍程度大きかった。このことから、標準溶液と試料のアセトニトリルと水の組成比を一定にすることが定量値のバラツキをなくすためには重要であると考えられた。しかし、減圧濃縮は液量が少なくなると沈殿の生成等による突沸が起こりやすくなり、乾固することは困難であったため、濃縮後の液量を一定にし、同様に操作したブランク試料に標準品を添加したマトリックス添加混合標準溶液で定量することとした。

3.4 妥当性評価結果

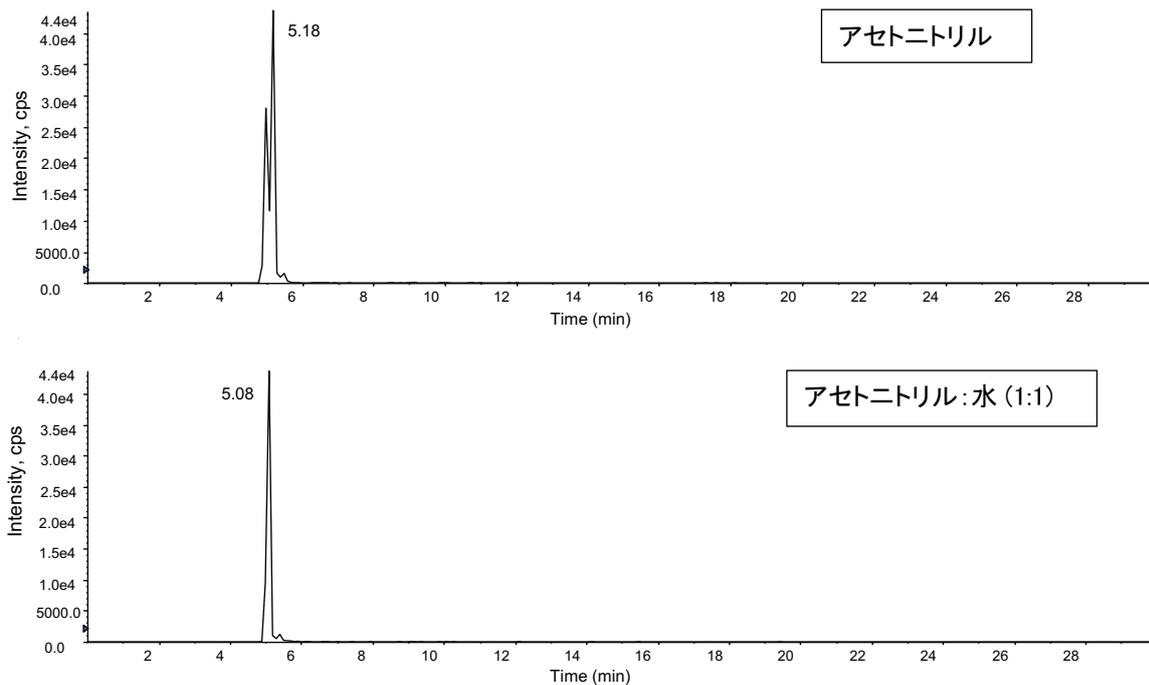


図2 オフロキサシン標準品(0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

3.4.1 選択性

ブランク試料として使用する牛の筋肉を2.4に従って前処理した後、LC-MS/MSで分析し、定量を妨害するピークの有無を確認したが、ガイドラインに示された選択性の目標値（ピークの面積が定量限界値（0.002 µg/mL）のピーク面積の1/10未満）を超えるような妨害成分は認められなかった。

3.4.2 真度及び精度

牛の筋肉2 gに各標準品を0.2 µg（添加濃度 0.1 µg/g）又は0.02 µg（添加濃度 0.01 µg/g）添加し、分析溶液調

製方法に従って前処理した後にLC-MS/MSで分析した時の真度及び精度の結果を、混合標準溶液1-1は表4、混合標準溶液2は表5に示す。なお、混合標準溶液2で定量限界値が0.005 µg/mLの9物質は、添加濃度 0.1 µg/gでの結果のみを示す。

真度の目標値を満たす物質は、混合標準溶液1-1で添加濃度が0.1 µg/gでは15種類、0.01 µg/gでは20種類であり、両添加濃度で目標値を満たす物質は14種類であった。混合標準溶液2では真度の目標値を満たす物質は、添加濃度が0.1 µg/gでは27種類、0.01 µg/gでは27種類であり、両

表4 妥当性評価結果（混合標準溶液1-1）

動物用医薬品名	結果	定量限界 0.002 ug/mL	検量線 $r^2 \geq 0.99$	0.1 µg/g			0.01 µg/g		
				真度(%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度(%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
Enrofloxacin	○			78.2	6.28	14.8	72.5	12.9	16.9
Ciprofloxacin				53.0	12.6	27.7	95.9	25.3	25.3
Oxolinic acid	○			84.4	5.29	7.40	71.9	4.42	11.6
Ofloxacin	○			70.1	4.94	11.7	94.6	7.73	17.1
Orbifloxacin	○			70.3	10.4	10.9	71.0	11.2	11.6
Sarafloxacin				40.2	6.43	22.8	63.1	26.5	26.5
Difloxacin	○			72.0	3.68	19.1	117	12.7	19.0
Danofloxacin	○			75.4	9.42	13.4	96.0	7.48	17.7
Nalidixic acid	○			89.3	5.06	14.7	119	10.7	15.8
Norfloxacin				41.7	8.08	25.9	58.9	30.7	30.7
Flumequine	○			75.4	6.68	6.68	78.8	14.1	21.3
Piromidic acid	○			73.3	7.55	8.07	94.9	7.71	16.3
Marbofloxacin				61.4	8.75	14.8	86.4	26.1	34.8
Miloxacin				37.1	10.5	48.8	28.0	14.7	49.3
Lincomycin				46.1	14.2	21.3	69.3	29.2	29.2
Clindamycin				47.7	14.8	20.1	105	12.9	16.2
Pirlimycin				13.7	8.37	30.9	27.9	33.4	33.4
Erythromycin A	○			83.6	9.01	13.6	82.1	8.22	12.9
Erythromycin B				57.6	6.43	26.1	58.2	30.0	34.2
Oleandomycin				52.5	5.15	23.6	158	5.41	17.0
Josamycin	○			70.2	9.60	17.1	77.4	9.27	10.9
Spiramycin I				74.2	11.3	17.2	42.0	34.5	34.5
Tylosin	○			71.0	5.33	10.9	81.3	13.2	17.1
Tiamulin				60.8	6.86	46.0	21.3	20.8	34.5
Tilmicosin				61.1	7.96	22.9	58.6	26.4	26.4
Mirosamicin				53.3	7.73	34.1	93.3	10.8	19.5
Clarithromycin				72.4	8.98	30.5	73.0	14.7	29.0
Azithromycin				41.1	15.1	20.7	87.3	24.3	35.1
Roxithromycin				59.1	7.66	22.3	164	15.5	22.6
Leucomycin A5				64.1	6.83	13.8	81.9	13.3	19.7
Tacrolimus NH ₃	○			73.3	7.91	8.3	78.6	17.5	17.5
Dirithromycin				12.2	26.3	37.7	0	-	-
Moxidectin		×		11.1	67.3	88.0	-	-	-
Avermectin B1a NH ₃				9.94	23.5	85.9	0	-	-
Eprinomectin				23.8	41.3	74.9	0	-	-
Neospiramycin I		×		31.5	10.4	21.2	-	-	-
Monensin				37.4	14.8	17.6	42.8	10.5	20.2
目標値				70-120	<15	<20	70-120	<25	<30

表5 妥当性評価結果 (混合標準溶液2)

抗菌性物質名	結果	定量限界 0.002 ug/mL	検量線 $r^2 \geq 0.99$	0.1 $\mu\text{g/g}$			0.01 $\mu\text{g/g}$			合成抗 菌剤一 斉分析 法結果
				真度(%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度(%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	
Diaveridine				55.4	7.21	9.66	62.5	16.1	21.5	
Sulfaethoxypyridazine	○			70.5	8.13	9.60	82.0	10.9	14.7	○
Sulfaguanidine				93.2	4.50	6.21	45.7	41.0	42.9	
Sulfabromomethazine				67.3	9.02	9.48	80.5	21.0	21.0	○
Sulfabenzamide				45.4	17.5	17.5	46.1	22.9	22.9	○
Sulfisoxazole		×		56.1	12.6	17.2	-	-	-	○
Sulfisozole	○			73.3	5.54	7.98	79.4	8.4	16.3	○
Sulfisomidine	○			77.8	9.42	9.42	75.8	11.2	18.5	○
Clopidol	○			81.2	6.27	8.52	98.8	11.4	12.4	○
Difurazone				0	-	-	0	-	-	
Sulfathiazole		×		42.1	11.8	15.9	-	-	-	○
Sulfapyridine	○			78.9	6.86	9.26	80.4	13.8	19.8	○
Sulfamerazine		×		73.9	9.52	9.52	-	-	-	○
Sulfadoxine	○			83.9	5.89	5.89	90.2	10.2	19.7	○
Sulfamethoxazole	○			79.9	7.81	8.10	91.3	12.7	16.3	
Sulfadimethoxine	○			75.1	6.22	9.44	81.5	11.6	18.2	○
Sulfaquinoxaline				49.2	11.7	17.4	50.8	11.9	15.2	○
Sulfantran		×		51.8	11.9	15.2	-	-	-	
Trimethoprim				67.4	7.98	8.27	73.7	23.8	24.0	○
Sulfadiazine	○			84.2	7.41	7.77	92.0	13.9	20.0	○
Ormetoprim		×		52.2	7.47	11.5	-	-	-	○
Sulfadimidine	○			78.6	6.22	6.93	77.8	14.8	21.3	○
Sulfamethoxyypyridazine	○			77.9	7.95	7.95	70.0	16.4	21.8	○
Sulfamonomethoxine	○			71.6	5.47	7.98	77.2	13.5	14.2	○
Sulfachlorpyridazine		×		38.3	11.1	11.8	-	-	-	○
Sulfatroxazole	○			80.5	9.60	9.6	85.2	7.9	14.4	○
Levamisole	○			78.8	4.50	10.2	91.7	7.7	19.7	
Thiabendazole	○			76.2	6.13	9.19	89.9	15.7	20.7	
Ethopabate	○			87.0	4.49	7.89	106	8.9	17.1	○
Trenbolone		×		57.2	8.46	9.28	-	-	-	
Melengestrol acetate				16.7	38.5	39.7	25.3	24.3	31.3	
Xylazine		×		0	-	-	-	-	-	
Pyrimethamine				23.5	13.2	33.6	30.4	12.0	61.0	
Allethrin		×		0	-	-	-	-	-	
Dexamethasone	○			73.0	9.92	10.7	106	14.0	15.2	
Hydrocortisone				46.6	21.4	26.6	0	-	-	○
Famphur				46.3	23.2	23.2	60.1	25.1	43.9	
Trichlorfon(DEP)	○			77.1	9.22	14.1	93.4	13.8	14.8	
Fenobucarb(BPMC)				55.4	11.1	11.1	92.2	17.6	22.6	○
Sulfacetamide	○			88.1	7.30	10.1	78.9	9.23	9.23	○
Prednisolone	○			88.8	8.26	8.26	112	6.93	6.93	
Glenbuterol				0	-	-	0	-	-	
Lincomycin	○			91.0	9.18	10.9	95.6	11.4	16.1	
Zeranol				4.00	48.1	48.1	0	-	-	
Thiamphenicol	○			72.4	5.21	6.43	73.5	12.7	21.9	○
2-Acetylamino-5-nitrothiazole	○			72.4	13.7	13.7	90.8	13.0	13.0	
Florfenicol			×	93.1	51.5	51.5	62.5	15.6	46.3	
Clorsulon				0	-	-	0	-	-	
Chloramphenicol	○			74.2	7.31	9.77	97.5	14.5	14.8	
Nicarbazin			×	0	-	-	0	-	-	
目標値				70-120	<15	<20	70-120	<25	<30	

添加濃度で目標値を満たす物質は24種類であった。よって、混合標準溶液1-1と2を合計すると38種類であった。また、スクリーニングとして真度の範囲を50～150%に広げた場合、両添加濃度で目標値を満たす物質は混合標準溶液1で19種類、混合標準溶液2で29種類となり、合計すると48種類で、スクリーニングとしての有用性が示された。目標値から外れる物質は真度が70%未満の物質がほとんどであった。

併行精度の目標値を満たす物質は、混合標準溶液1-1で添加濃度が0.1 µg/gでは32種類、0.01 µg/gでは23種類であり、混合標準溶液2で添加濃度が0.1 µg/gでは38種類、0.01 µg/gでは33種類であった。室内精度の目標値を満たす物質は、混合標準溶液1-1で添加濃度が0.1 µg/gでは17種類、0.01 µg/gでは24種類であり、混合標準溶液2で添加濃度が0.1 µg/gでは38種類、0.01 µg/gでは30種類であった。

真度及び精度の基準を全て満たした物質は、混合標準溶液1-1で13種類、混合標準溶液2で24種類となり、合計すると37種類であった。基準を満たさない物質は、定量限界値でのピーク面積が小さく、測定値が低く、ばらつきが大きくなる傾向があった。

既に鶏の筋肉で妥当性評価が終了し、分析を実施しているサルファ剤等合成抗菌剤の一斉分析法で混合標準溶液2は26種類が真度及び精度の基準を全て満たしていた(表5右端列)。今回検討した分析法で基準を満たしていた物質をサルファ剤等合成抗菌剤の一斉分析法で基準を満たしていた物質と比較すると、9種類は新たに基準を満たした物質であり、両分析法を採用することにより、35物質の分析が可能となった。

4 まとめ

LC-MS/MSを用いた牛の筋肉中動物用医薬品の一斉分析法を検討した。牛の筋肉2 gを10 mmol/L Na₂EDTA含有0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液でホモジナイズした後振とう抽出し、室温で遠心分離し、上層を分取した。HLB 1 gによる固相抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作を追加した。アセトニトリル層を減圧濃縮し、アセトニトリル溶液で4 mLに定容し、LC-MS/MSで測定を行う分析法を構築した。妥当性評価を行ったところ、以下の結果を得た。

(1) LC-MS/MS測定で86種類の動物用医薬品のMRMモードによる測定を行った結果、0.002 µg/mL又は0.005 µg/mLで十分な定量感度(S/N比 ≥ 10)が得られた。また、83種類の標準品で0.002～0.1 µg/mL又は0.005～0.1 µg/

mLの範囲のマトリックス添加検量線で良好な直線性($r^2 \geq 0.99$)が得られた。

(2) 検討した全ての動物用医薬品で、選択性は目標値を満たしていた。

(3) 真度の目標値を2種類の添加濃度で満たす物質は、混合標準溶液1-1では14種類、混合標準溶液2では24種類であり、合計38種類であった。真度の目標値を50～150%に広げた場合、合計48種類で合格となり、スクリーニングとしての有用性が示された。目標値から外れる動物用医薬品は、真度が70%未満の動物用医薬品がほとんどであった。

(4) 妥当性評価で適合と判定される両添加濃度で真度及び精度の基準を全て満たした動物用医薬品は、混合標準溶液1-1で13種類、混合標準溶液2で24種類となり、合計すると37種類であり、実用の可能性が示唆された。

(5) 今回基準を満たさなかった物質は、定量限界値でのピーク面積が小さく、測定値が低く、ばらつきが大きくなる傾向があった。

なお、分析法について次の留意点も明らかになった。

① 牛の筋肉の脂肪分等夾雑物を除去するために、はちみつつの分析法に追加する精製法はアセトニトリル/ヘキサン分配とする。

② 標準品の一部は溶媒のアセトニトリルと水の組成比によって、ピーク形状及びピーク面積に変化が見られた。標準溶液と試料のアセトニトリルと水の組成比を一定にすることが定量値のばらつきをなくすためには重要であるため、ブランク試料に標準品を添加したマトリックス添加混合標準溶液で定量する。

今後は、鶏卵等を用いて検討を行い、現在の一斉分析法で分析可能な畜水産物の種類の追加を目指す。また、現在のLC-MS/MS測定条件では定量限界値の高い物質が多いテトラサイクリン系及びペニシリン系の抗生物質の最適な測定条件等の再検討を行うと共に、個別分析法の検討を行う。

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2015, 490-499, 金原出版, 東京, 2015
- 2) 中郡昭人：豚筋肉及び腎臓における限外ろ過膜を用いた動物用医薬品一斉分析法, 日本獣医師会雑誌, 68, 311-315, 2015
- 3) 藤井良昭, 西村一彦, 橋本 諭, 加賀岳朗：高速液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法による畜肉中のテトラサイクリン系及びβ-ラクタム系抗生

- 物質の一斉分析, 分析化学, 66, 5, 369-374, 2017
- 4) 田頭宗幸, 渡邊利奈, 金丸和博: 蜂蜜及び牛乳中の残留動物用医薬品の迅速分析試験法の検討, 宮崎県衛生環境研究所年報, 27, 81-85, 2015
 - 5) 甲斐茂美, 小管教仁, 脇ますみ, 岸 弘子: LC-MS/MSを用いた畜水産物中の動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価, 神奈川県衛生研究所研究報告, 44, 9-14, 2014
 - 6) 浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 山本 淳: 厚生労働省ガイドラインによる残留動物用医薬品一斉試験法の妥当性評価 (第3報), 岡山県環境保健センター年報37, 137-144, 2013
 - 7) 難波順子, 肥塚加奈江, 金子英史, 赤木正章, 吉岡敏行: LC-MS/MSを用いたはちみつ中の動物用医薬品に関する一斉分析法の検討, 岡山県環境保健センター年報, 42, 67-76, 2018
 - 8) アジレントテクノロジー: Agilent Captiva EMR-LipidカートリッジクリーンアップおよびLC/MS/MSを用いた牛肉中の残留動物用医薬品の多成分同時分析, https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/low_5991-8598JAJP.pdf (2019.11.7アクセス)

【調査研究】

繊維製品に含まれるアゾ化合物由来の特定芳香族アミン類試験法の検討

Study of the testing method of specific aromatic amines derived from azo compounds contained in textile products

金子英史, 難波順子, 林 隆義, 筒井みちよ, 池田和美, 吉岡敏行* (衛生化学科)

*水質科

KANEKO Hidefumi, NAMBA Junko, HAYASHI Takayoshi, TSUTSUI Michiyo, IKEDA Kazumi, YOSHIOKA Toshiyuki* (Food and Drug Chemical Research Section)

*Water Section

要 旨

分散染料が使用されていない繊維製品を対象とした特定芳香族アミン類試験法のGC/MS分析条件等を検討した。試料注入方法はパルスドスプリットレス法を採用し、GCカラムは、DB-35MSとした。しかし、一部の物質はピーク形状が悪く、定量性に問題があったため、SH-Rtx-Waxに変更したところ、良好なピーク形状が得られた。公定法に従って添加回収試験を実施したが、JIS L 1940で回収率の目標値が設定されている20物質のうち7物質は目標値を満たさなかった。水酸化ナトリウム水溶液の濃度の変更とケイソウ土カラムの溶出溶媒量の増加により、全ての物質で回収率の目標値を満たすことができた。

[キーワード：アゾ化合物, 特定芳香族アミン, 家庭用品, GC/MS]

[Key words : azo compounds, specific aromatic amines, household products, GC/MS]

1 はじめに

アゾ染料は、繊維製品や革製品の染色に使用される合成染料の一つであり、世界で3000種類以上と広く使用されている。アゾ染料は、その化学構造中にアゾ結合 (-N=N-) を有しており、腸内の細菌、肝臓等で還元分解され、芳香族アミンを生成する。

有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律第2条第2項の物質を定める政令（以下「政令」という。）が平成27年に一部改正され、芳香族アミンのうち、発がん性又はそのおそれが指摘されている24種類（以下「特定芳香族アミン」という。）が、新たに政令に指定されている。このことから当県でもアゾ染料を含む製品の検査体制を整えるための検討を行っている。

公定法は、有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則（昭和49年厚生省令第34号。以下「法施行規則」という。）別表第1に示されているが、試験実施に当たっては、平成28年6月20日付け、厚生労働省通知¹⁾により、JIS L 1940-1²⁾（以下「JIS」という。）を参考に特定芳香族アミンの回収率試験を予め実施し、JISに規定されている回収率を満たしていることを確認するなど、試験操作手順を確認することが求められている。今回、分散染料が使

用されていない繊維製品を対象とした特定芳香族アミン並びにp-phenylazoanilineから還元され生成する可能性があるaniline及び1,4-phenylenediamin（以下「特定芳香族アミン類」という。）試験法のGC/MS分析条件等の検討を行ったので、その結果を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

綿100%の繊維製品で、白色無地のものを用いた。

2.2 測定対象物質等

特定芳香族アミン類と、検討に使用した内部標準物質3物質を表1に示す（以下No.で示した数字は各表におけるNo.に一致する。）。

2.3 試薬等

特定芳香族アミン類混合標準液：特定芳香族アミン類分析用 26種混合標準液 (SEISHIN-DYE-KIT5) (SPEX製)
Naphthalene-d₈標準品（関東化学製）
2,4,5-trichloroaniline標準品（AccuStandard製）
Anthracene-d₁₀標準品（関東化学製）
ケイソウ土カラム：Chem Elut 20 mL (Agilent製)（以下「カラム」という。）

表1 測定対象物質及び測定パラメーター

No.	物質名	定量イオン	定性イオン	R.T.	
				DB-35MS	SH-Rtx-Wax
1	aniline	93	66	09:58	13:02
2	o-toluidine	106	107	11:13	13:25
3	2,4-dimethylaniline	121	120	12:10	13:58
4	2,6-dimethylaniline	121	120	12:12	13:45
5	o-anisidine	123	108	12:32	14:33
6	p-chloroaniline	127	129	12:55	15:59
7	2-methoxy-5-methylaniline	122	137	13:28	15:09
8	2,4,5-trimethylaniline	135	120	13:28	14:58
9	4-chloro-2-methylaniline	141	106	13:51	16:16
10	1,4-phenylenediamine	108	80	13:56	17:30
11	2,4-diaminotoluene	122	121	15:05	18:23
12	2,4-diaminoanisole	123	138	15:54	19:19
13	2-naphthylamine	143	115	16:31	19:27
14	2-methyl-5-nitroaniline	152	77	16:57	21:12
15	4-aminobiphenyl	169	168	18:10	21:34
16	p-phenylazoaniline	197	92	21:57	-
17	4,4-diaminodiphenylether	200	171	22:51	-
18	4,4-methylenedianiline	198	197	22:59	-
19	benzidine	184	185	23:01	-
20	2-methyl-4-(2-tolylazo)aniline	225	106	23:57	-
21	4,4-diamino-3,3-dimethyldiphenylmethane	226	211	25:02	-
22	3,3-dimethylbenzidine	212	213	25:21	-
23	4,4-diaminodiphenylsulphyde	216	184	27:03	-
24	3,3-dichlorobenzidine	252	254	27:27	-
25	3,3-dichloro-4,4-dimethyldiphenylmethane	231	266	27:33	-
26	3,3-dimethoxybenzidine	244	201	27:36	-
	Naphthalene-d8(1-11)	136		12:24	12:59
IS	2,4,5-trichloroaniline(12,13)	195		16:10	18:48
	Anthracene-d10(DB-35MS 14-26),(SH-Rtx-Wax 14-15)	188		18:20	19:26

表2 装置及び測定条件

分析装置

GC-MS: JMS-Q1000GC Mk II

GCカラム: Agilent製 DB-35MS 30 m 0.25 mm × 0.25 μm

SHIMADZU製 SH-Rtx-Wax 30 m 0.25 mm × 0.25 μm

測定条件昇温条件: DB-35MS : 55 °C(5min) → 15 °C/min → 230 °C(0min) →
5 °C/min → 290 °C(0min) → 20 °C/min →
310 °C(5min)

SH-Rtx-Wax: 55 °C(5min) → 15 °C/min → 250 °C(10min)

注入方法: パルスドスプリットレス

パルスド圧力: 50 psi

パルスド時間: 1.5 min

キャリアガス: ヘリウム

カラム流量: 1 mL/min

注入量: 1 μL

注入口温度: 250 °C

インターフェース温度: 240 °C

イオン源温度: 210 °C

イオン化電圧: 70 eV

測定法: SIMモード

分析パラメーター: 表1

メチル-tert-ブチルエーテル（関東化学製）（以下「MTBE」という。）

その他試薬は、試薬特級など公定法に示されたものを用いた。

2.4 混合標準溶液及び混合内部標準溶液の調製

特定芳香族アミン類分析用 26種混合標準液（24種混合（各1000 µg/mL）、1,4-phenyldiamine（1000 µg/mL）及び2,4-diaminoanisole（1000 µg/mL）を等容量混合し333 µg/mLに調製したもの）を混合標準溶液とした。

また、Naphthalene-d₈標準品、2,4,5-trichloroaniline標準品、Anthracene-d₁₀標準品をそれぞれメタノールに溶解し、1000 µg/mLとした。これらを等容量混合したものにMTBEを加えて希釈し、各100 µg/mLとした。さらにこれをMTBEで希釈し、各20 µg/mLの3種混合内部標準溶液とした。

2.5 試薬の調製

水酸化ナトリウム水溶液：水酸化ナトリウム（和光純薬製、特級）10 gを精製水90 mLに溶解させた。

クエン酸緩衝液：クエン酸一水和物（和光純薬製、特級）12.526 g及び水酸化ナトリウム（和光純薬製、特級）6.320 gを精製水に溶かし、1000 mLとした。

亜ジチオン酸ナトリウム水溶液：亜ジチオン酸ナトリウム（東京化成製、特級）20 gを精製水に溶かし、100 mLとした。

2.6 検量線用混合標準溶液の調製

2.4で調製した混合標準溶液をMTBEで希釈し、各100 µg/mL混合標準溶液とし、さらにこれをMTBEで適宜希釈し、添加回収試験では検量線は、各0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 µg/mLの5点の混合標準溶液を調製し、各混合標準溶液1 mLに3種混合内部標準液25 µLを加えたものをGC/MS測定用検量線用混合標準溶液とした。

2.7 分析装置及び測定条件

装置及び測定条件を表2に示す。

2.8 検出下限値及び定量下限値

予想される検出限界（ノイズレベルの5～10倍以内）に近い濃度の標準溶液を含む検量線を作成し、7回繰り返し測定した定量値を実試料換算した後、標準偏差（σ）から、以下に示す式により検出下限値（µg/g）、定量下限値（µg/g）を算出した。

$$\text{検出下限値} = \sigma \times 3$$

$$\text{定量下限値} = \sigma \times 10$$

2.9 試験溶液調製

回収率試験は、2.4で調製した混合標準溶液30 µLを細切りした白地の繊維試料1.0 gに添加し、特定芳香族アミン類

の各項目が10 µgの添加量となるようにした。分析フローを図1に示す。

50 mL容ガラス製ねじ口びんを反応容器とし、前述の添加試料にメタノール2 mL及び70 °Cのクエン酸緩衝液15 mLを加えて密閉し、70 °Cで30分間加温した。続いて、亜ジチオン酸ナトリウム水溶液3 mLを加えて、激しく振とうし、密閉した後70 °Cで30分間加温し、還元反応後、20 °Cの水浴中でかくはん冷却し、2分以内に室温まで冷却した。その後、水酸化ナトリウム水溶液0.2 mLを加え、激しく振とうし、カラムに負荷した。200 mLナス型フラスコを受器としMTBE 10 mLで反応容器を2回洗浄した後、カラムに負荷し、MTBE 60 mLをカラムに加え、洗浄液と合わせて溶出液を回収し、ロータリーエバポレーターにより50 °C以下、350 mbarで約1 mLに濃縮後³⁾、MTBEで10 mLに定容した。定容した溶液1 mLに3種混合内部標準溶液25 µLを加えたものをGC/MS測定用試験溶液とした。

2.10 添加回収試験の定量

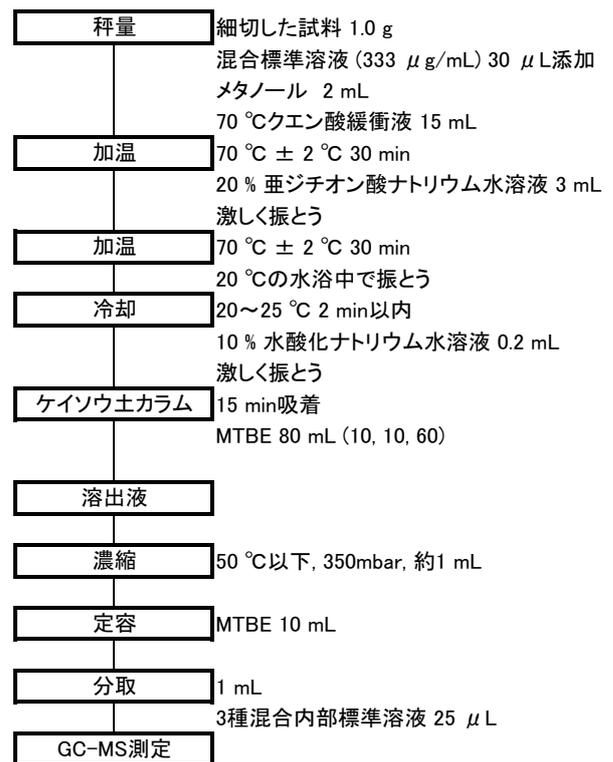


図1 分析フロー

特定芳香族アミン類は、Naphthalene-d₈、2,4,5-trichloroaniline、Anthracene-d₁₀を内部標準物質として用いた内部標準法により定量した。検量線は2.6により作成した。

3 結果及び考察

3.1 GC/MS条件の検討

公定法を参考に、DB-35MS（Agilent製カラム）を用い、試料注入方法としてパルスドスプリットレス法及びスプリット法について検討を行った。結果を表3に示す。

パルスドスプリットレス法では、1,4-phenylenediamine (No.10)及び2,4-diaminoanisole(No.12)以外の24成分は0.02µg/mLでS/N > 10 (S:シグナル,N:ベースラインノイズ)を満たしていた。1,4-phenylenediamine及び2,4-diaminoanisoleは0.1 µg/mLでS/N > 10を満たしていた。

スプリット法では、1,4-phenylenediamine(No.10), 2,4-diaminoanisole(No.12), 2-methyl-5-nitroaniline(No.14)及びp-phenylazoaniline(No.16)以外の22成分は0.1 µg/mLでS/N > 10を満たしていた。1,4-phenylenediamine, 2,4-diaminoanisole, 2-methyl-5-nitroaniline 及び

p-phenylazoanilineは0.2 µg/mLでS/N > 10を満たしていた。

EUでは、規制対象としている22物質の芳香族第一級アミン類の検出下限値を5 mg/kgと設定している。今回は1.0 gを採取し、最終溶液をMTBEで10 mLに定容しているため、試験溶液では0.5 µg/mLを検出することが求められているが、両注入方法ともに、十分に満たしていた。

次に、検量線の相関係数について、パルスドスプリットレス法及びスプリット法の比較を行った。パルスドスプリットレス法では、0.1 µg/mL～2 µg/mLの5点の検量線で、スプリット法では、0.2 µg/mL～5 µg/mLの5点の検量線で、全ての物質で良好な直線性 ($r^2 > 0.999$) が得られた。

一例として、図2に2-methyl-5-nitroaniline (0.2 µg/mL)のマスクロマトグラム ($m/z = 152$)を示す。パルスドスプリットレス法の方が同濃度の面積値が15倍以上と大

表3 パルスドスプリットレス法及びスプリット法の検討 (DB-35MS)

No.	物質名	S/N>10 (S/N>10となる濃度)	
		Pulsed Splitless50	Split
		0.02 µg/mL	0.1 µg/mL
1	aniline	○	○
2	o-toluidine	○	○
3	2,4-dimethylaniline	○	○
4	2,6-dimethylaniline	○	○
5	o-anisidine	○	○
6	p-chloroaniline	○	○
7	2-methoxy-5-methylaniline	○	○
8	2,4,5-trimethylaniline	○	○
9	4-chloro-2-methylaniline	○	○
10	1,4-phenylenediamine	×(0.1)	×(0.2)
11	2,4-diaminotoluene	○	○
12	2,4-diaminoanisole	×(0.1)	×(0.2)
13	2-naphthylamine	○	○
14	2-methyl-5-nitroaniline	○	×(0.2)
15	4-aminobiphenyl	○	○
16	p-phenylazoaniline	○	×(0.2)
17	4,4-diaminodiphenylether	○	○
18	4,4-methylenedianiline	○	○
19	benzidine	○	○
20	2-methyl-4-(2-tolylazo)aniline	○	○
21	4,4-diamino-3,3-dimethyldiphenylmethane	○	○
22	3,3-dimethylbenzidine	○	○
23	4,4-diaminodiphenylsulphyde	○	○
24	3,3-dichlorobenzidine	○	○
25	3,3-dichloro-4,4-dimethyldiphenylmethane	○	○
26	3,3-dimethoxybenzidine	○	○

()内は、S/N>10を満たした濃度 (µg/mL)

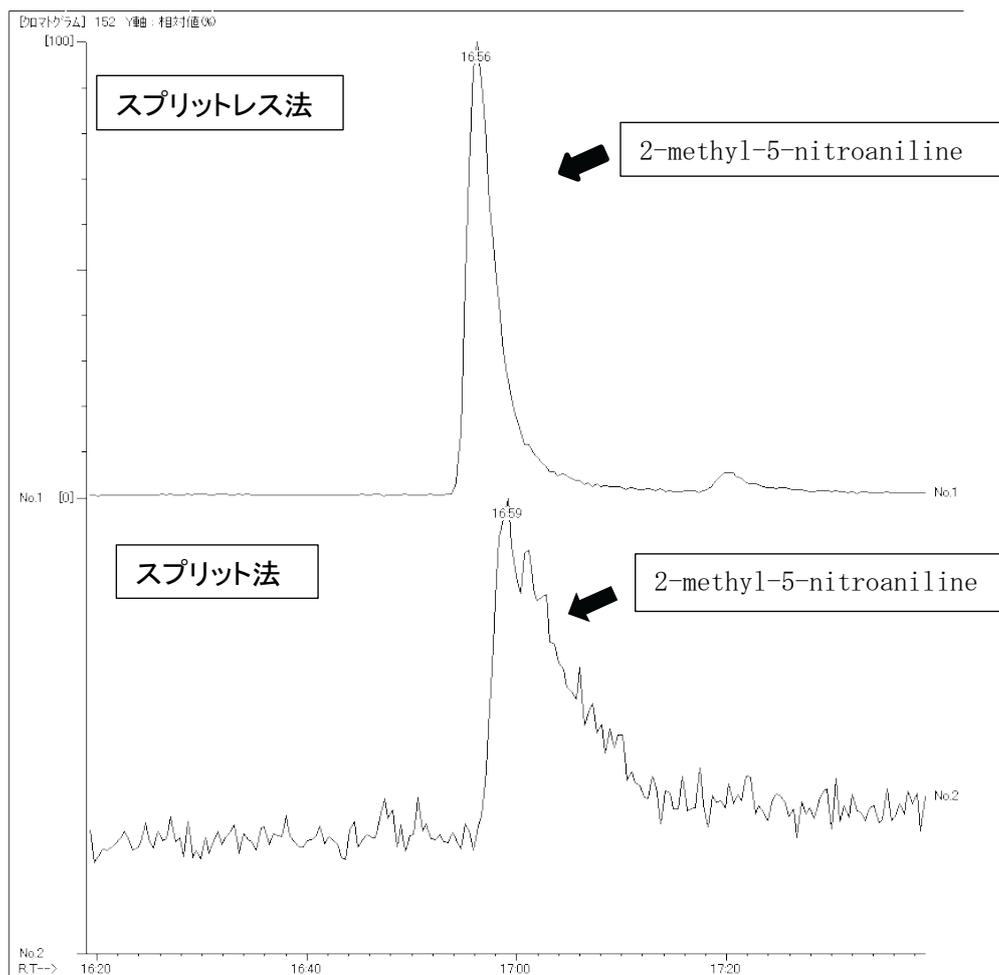


図2 2-methyl-5-nitroaniline (0.2 µg/mL) のマスクロマトグラム (m/z=152)
上段のスケールは下段の15倍

大きく、ピーク形状が良好である。定量限界が低い、検量線がより低濃度で良好な直線性が得られるなど優れた点が多いことから、以降の検討はパルスドスプリットレス法により行うこととした。

3.2 GCカラムの検討

DB-35MSでは、1,4-phenylenediamine及び2,4-diaminoanisoleのピーク形状が悪く定量限界が高いため、高極性カラム (SH-Rtx-Wax) を用いて検討した。

SH-Rtx-Waxは、カラムの試験耐用最高温度が250℃であり、検出できるのは、溶出時間が早い15物質 (表1 No.1～15) であった。

一例として、図3に1,4-phenylenediamine (0.05 µg/mL) のマスクロマトグラム (m/z = 108) を示す。上段のDB-35MSではピーク形状が非常に悪いが、SH-Rtx-Waxでは良好なピーク形状であり、No.1～15の全ての物質でDB-35MSと比較してピーク形状が良好であった。DB-35MSでは2,4-diaminoanisoleと2,4,5-trichloroaniline (内部標

準物質) 及び2,4-Dimethylanilineと2,6-Dimethylanilineは互いにピークが近接していたが、SH-Rtx-Waxでは完全にピークが分離した。SH-Rtx-Waxの検量線はNo.10の1,4-phenylenediamine以外の14物質 (No.1～9, No.11～14) では0.01 µg/mL～2 µg/mLの8点の標準溶液で、1,4-phenylenediamineでは、0.05 µg/mL～2 µg/mLの6点の標準溶液で、良好な直線性 ($r^2 > 0.999$) が得られた。

以上の結果により、これら15物質 (No.1～15) がDB-35MSで検出された場合は、SH-Rtx-Waxを用いて定量することとした。

3.3 添加回収試験結果

GCカラムは一斉分析が可能なDB-35MSを用いて行った。結果を表4に示す。10%水酸化ナトリウム水溶液、MTBE 80 mLで試験を行った場合、JISに回収率の目標値が設定されている20物質のうち2,4-diaminoanisole (No.12), 4,4-diaminodiphenylether (No.17), 4,4-methylenedianiline (No.18), Ben

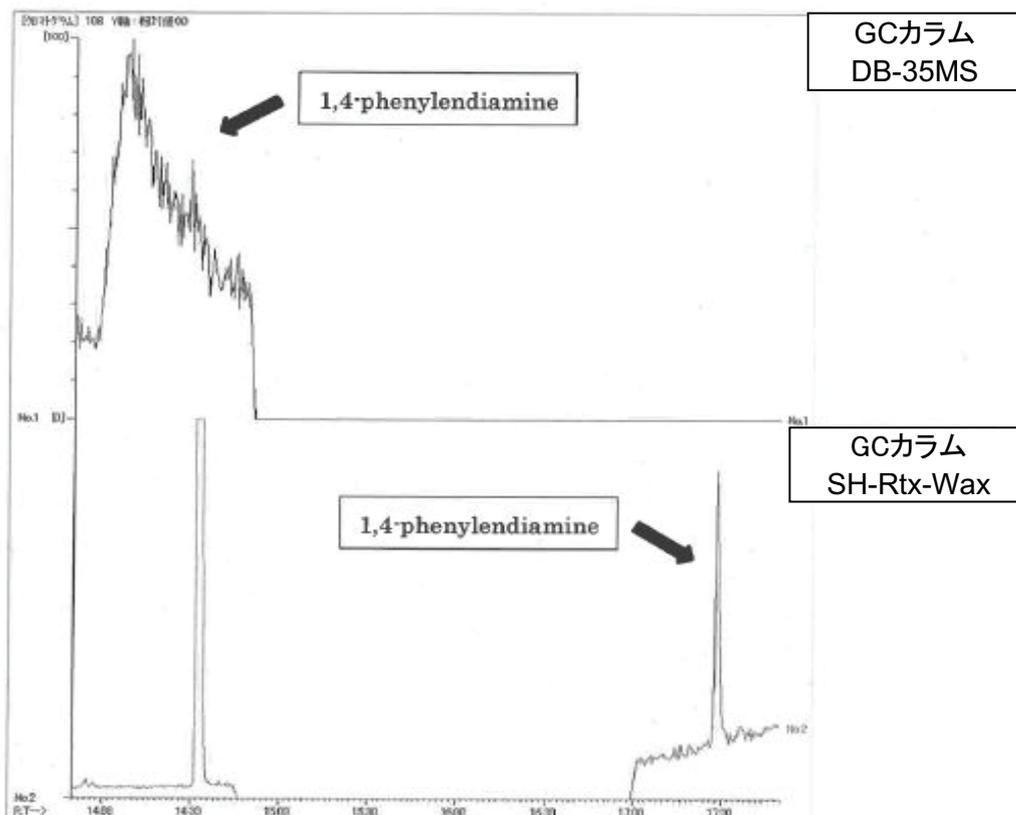


図3 1,4-phenylenediamine (0.05 µg/mL) のマスクロマトグラム (m/z=108)
上段のスケールは下段の1/10

zidine(No.19),4,4-diaminodiphenylsulphyde(No.23), 3,3-dichlorobenzidine(No.24), 3,3-diamino-4,4-dimethyldiphenylmethane(No.25)については目標値を満たさなかった。

他の文献と比較したところ, 2,4-diaminoanisole(No.12), 4,4-diaminodiphenylether (No.17), 4,4-methylenedianiline (No.18), Benzidine(No.19), 4,4-diaminodiphenylsulphyde(No.23)は, 目標値未達成の結果も見受けられ, 前処理の検討の必要性が考えられた^{3)~6)}。

回収率が低かった一因と考えられるカラムの溶出状況を確認した。自然流下後にカラム下端から吸引し, 新たに数mLの溶出液が得られたため, その溶液を測定した結果を表4に示す。吸引した溶液からも目的物質が検出されたことから, 図1に示したMTBE 80 mLの溶出条件ではカラムからの溶出が不十分であることが示唆された。

3.4 添加回収試験再試験結果

衛藤³⁾の報告を参考にし, 水酸化ナトリウム水溶液の濃度を10%から30%に変更し試験を行った。併せて, カラムに負荷するMTBEを80 mL (洗浄10 mL × 2, 溶出60 mL)から90 mL(洗浄10 mL × 2, 溶出70 mL)に変更した。

結果は, 表5のとおりであり, 水酸化ナトリウム水溶液の

濃度を10%と30%で比較したところ, 30%の方が回収率は良好であった。また, MTBEを80 mLと90 mLで比較したところ, 90 mLの方が回収率は良好であった。なお, 水酸化ナトリウム水溶液の濃度30%, MTBE 90 mLの条件下では, JISに規定されている回収率は全て目標値を満たしていた。

3.5 検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL)

GCカラムはNo.1~15はSH-Rtx-Wax, NO.16~26はDB-35MSを用いた。0.01 µg/mL ~ 0.1 µg/mL (No.10は0.05 µg/mL ~ 0.5 µg/mL) の検量線用標準溶液を測定し, 2.8に従い求めた結果を表6に示す。MDLは実試料換算で0.0041 ~ 0.14 µg/g, MQLは実試料換算で0.042 ~ 0.46 µg/gであり, 法施行規則で定める基準値の30 µg/gに対し, 十分に低い値であった。

表4 添加回収試験及び吸引試験結果 (添加量 10 μg) (DB-35MS)

No.	物質名	回収率 (%)		回収率 (%)	JIS目標 (%)	判定
		(n=2)	(n=1)			
		NaOH (%) 10	10	10		
		MTBE (mL) 80	80	カラム残留液		
1	aniline	121	120	3	70	○
2	o-toluidine	123	124	2	50	○
3	2,4-dimethylaniline					
4	2,6-dimethylaniline	81	88	2	-	-
5	o-anisidine	87	91	0	70	○
6	p-chloroaniline	86	94	4	70	○
7	2-methoxy-5-methylaniline	95	99	0	70	○
8	2,4,5-trimethylaniline	83	95	4	70	○
9	4-chloro-2-methylaniline	80	96	4	70	○
10	1,4-phenylenediamine	11	10	0	-	-
11	2,4-diaminotoluene	83	96	4	50	○
12	2,4-diaminoanisole	17	22	0	20	×
13	2-naphthylamine	71	82	2	70	○
14	2-methyl-5-nitroaniline	0	0	0	-	-
15	4-aminobiphenyl	76	84	3	70	○
16	p-phenylazoaniline	0	0	0	-	-
17	4,4-diaminodiphenylether	56	62	6	70	×
18	4,4-methylenedianiline	59	65	0	70	×
19	benzidine	60	66	5	70	×
20	2-methyl-4-(2-tolylazo)aniline	0	0	0	-	-
21	4,4-diamino-3,3-dimethyldiphenylmethane	79	84	5	70	○
22	3,3-dimethylbenzidine	77	83	4	70	○
23	4,4-diaminodiphenylsulphide	55	64	4	70	×
24	3,3-dichlorobenzidine	60	66	4	70	×
25	3,3-dichloro-4,4-dimethyldiphenylmethane	64	74	4	70	×
26	3,3-dimethoxybenzidine	88	85	6	70	○

目標未達成

表5 添加回収試験再試験結果 (添加量10 μg) (DB-35MS)

No.	物質名	回収率 (%)				JIS目標 (%)
		(n=2)		(n=1)		
		NaOH (%) 10	30	10	30	
		MTBE (mL) 80	80	90	90	
1	aniline	121	111	119	120	70
2	o-toluidine	123	116	120	123	50
3	2,4-dimethylaniline					
4	2,6-dimethylaniline	81	79	80	82	-
5	o-anisidine	87	85	88	89	70
6	p-chloroaniline	87	88	89	93	70
7	2-methoxy-5-methylaniline	96	95	97	101	70
8	2,4,5-trimethylaniline	84	85	84	88	70
9	4-chloro-2-methylaniline	81	82	81	86	70
10	1,4-phenylenediamine	11	12	15	19	-
11	2,4-diaminotoluene	84	99	98	108	50
12	2,4-diaminoanisole	18	22	22	25	20
13	2-naphthylamine	71	72	72	74	70
14	2-methyl-5-nitroaniline	0	0	0	0	-
15	4-aminobiphenyl	76	81	82	89	70
16	p-phenylazoaniline	0	0	0	0	-
17	4,4-diaminodiphenylether	57	62	71	72	70
18	4,4-methylenedianiline	59	65	72	73	70
19	benzidine	60	63	70	72	70
20	2-methyl-4-(2-tolylazo)aniline	0	0	0	0	-
21	4,4-diamino-3,3-dimethyldiphenylmethane	80	89	95	100	70
22	3,3-dimethylbenzidine	82	83	88	92	70
23	4,4-diaminodiphenylsulphide	56	64	70	78	70
24	3,3-dichlorobenzidine	61	64	65	73	70
25	3,3-dichloro-4,4-dimethyldiphenylmethane	64	69	71	78	70
26	3,3-dimethoxybenzidine	88	98	106	113	70

目標未達成

表6 検出下限値及び定量下限値

No.	物質名	カラム	検出下限値 μg/g	定量下限値 μg/g
1	aniline		0.013	0.042
2	o-toluidine		0.0065	0.022
3	2,4-dimethylaniline		0.0052	0.017
4	2,6-dimethylaniline		0.0041	0.014
5	o-anisidine		0.0081	0.027
6	p-chloroaniline		0.0049	0.016
7	2-methoxy-5-methylaniline	SH-Rtx-Wax	0.0076	0.025
8	2,4,5-trimethylaniline		0.0045	0.015
9	4-chloro-2-methylaniline		0.0048	0.016
10	1,4-phenyldiamine		0.084	0.28
11	2,4-diaminotoluene		0.016	0.053
12	2,4-diaminoanisole		0.023	0.076
13	2-naphthylamine		0.012	0.041
14	2-methyl-5-nitroaniline		0.032	0.11
15	4-aminobiphenyl		0.012	0.041
16	p-phenylazoaniline		0.069	0.23
17	4,4-diaminodiphenylether		0.072	0.24
18	4,4-methyldianiline		0.066	0.22
19	benzidine		0.062	0.21
20	2-methyl-4-(2-tolylazo)aniline		0.032	0.11
21	4,4-diamino-3,3-dimethyldiphenylmethane	DB-35MS	0.050	0.17
22	3,3-dimethylbenzidine		0.041	0.14
23	4,4-diaminodiphenylsulphyde		0.14	0.46
24	3,3-dichlorobenzidine		0.038	0.13
25	3,3-dichloro-4,4-dimethyldiphenylmethane		0.041	0.14
26	3,3-dimethoxybenzidine		0.093	0.31

4 まとめ

分散染料が使用されていない繊維製品を対象とした特定芳香族アミン類試験法の検討を行ったが、結果は次のとおりであった。

- (1) 試料注入方法はスプリット法とパルスドスプリットレス法を比較検討した。パルスドスプリットレス法が高く、方法として適していた。
- (2) GCカラムは、DB-35MSはピーク形状が悪い物質があったが、SH-Rtx-Waxを検討したところ測定可能な15物質においてピーク形状及び定量性が良好であった。2種類のGCカラムで測定することにより、全ての物質について定量性良く測定できた。
- (3) 水酸化ナトリウム水溶液の濃度を10%から30%に変更し、カラムに負荷するMTBEの量を80 mLから90 mLに変更したところ、JISに示された全ての物質について目標回収率を満たした。

回収率の向上については、カラムでの吸着及び溶出における損失が課題と考えられる。

今後は、JISに定められている目標値を満たすよう回収率の検討を行うとともに、公定法で規定された高速液体クロマトグラフ法による確認試験及びJIS L 1940-3に示されている1,4-phenyldiamine (No.10)が5 μg/g以上検出され

た場合の添加回収試験を行い、実際の試験業務開始に向けた準備を進めることとしている。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課化学物質安全対策室長通知：化学的变化により容易に特定芳香族アミンを生成するアゾ化合物を含有する家庭用繊維製品等について、薬生化発0620第10号、平成28年6月20日
- 2) JIS L 1940-1:2019繊維製品-アゾ色素由来の特定芳香族アミンの定量方法
- 3) 衛藤加奈子, 御手洗広子, 嶋崎みゆき, 鈴木弘統, 伊東達也：新規指定有害物質「アゾ化合物」の測定方法の検討, 大分県衛生環境研究センター年報, 45号, 37-41, 2017
- 4) 味村真弓, 小泉義彦, 大山正幸, 吉田俊明：アゾ染料に由来する2種の特定芳香族アミンの分析における回収率の検討, 大阪健康安全基盤研究所研究年報, 1号, 85-92, 2017
- 5) 宮本道彦, 宮崎悦子：繊維製品に含まれるアゾ化合物由来の特定芳香族アミン類の試験法に関する検討, 福岡市保健環境研究所所報, 42号, 104-111, 2017

- 6) 安田匡志, 佐藤徳子, 大久保祥嗣, 八木正博：特定芳香族アミンを生成するアゾ化合物含有家庭用品の試験法に係る検討, 神戸市環境保健研究所報, 41-43, 2017

【調査研究】

岡山県で発生した植物性自然毒による食中毒事例への対応について (平成21～30年)

Food Poisoning Cases Caused by Phytotoxins in Okayama Prefecture

難波順子, 筒井みちよ, 池田和美, 金子英史, 林 隆義, 赤木正章* (衛生化学科)

*大気科

NAMBA Junko, TSUTSUI Michiyo, IKEDA Kazumi, KANEKO Hidefumi, HAYASHI Takayoshi,
AKAKI Masaaki* (Food and Drug Chemical Research Section)

*Atmosphere Section

要 旨

岡山県内で平成21～30年の10年間に発生し、当センターで対応した8件の植物性自然毒による食中毒事例の原因物質は、①アトロピン及びスコポラミン、②リコリン、③ソラニン及びチャコニンであった。①はキダチチョウセンアサガオを食用植物と誤認して喫食した事例及びチョウセンアサガオを食用の野菜と誤認して喫食した事例であった。②は食用のニラと誤認してスイセンの葉を喫食した事例であった。③は小学校の菜園で栽培し収穫した未成熟又は緑化したジャガイモを喫食した事例であった。これら植物性自然毒による食中毒発生時に早期に効率的に対応するため、味噌汁中のアトロピン及びスコポラミン並びにリコリンの一斉分析法を検討した。前処理法として吸引ろ過後希釈し、Oasis PRIME HLBで精製する分析法を確立し、食中毒発生などの緊急時に、より迅速な対応が可能となった。

[キーワード：アトロピン, スコポラミン, リコリン, ソラニン, チャコニン]

[Key words : Atropine, Scopolamine, Lycorine, Solanine, Chaconine]

1 はじめに

植物性自然毒は、植物が元々保有している成分であり、「天然・自然の植物は安全である」というイメージに反して、植物自体が持つ微量の有毒成分や、大量の摂取により毒性を示す成分による健康被害（食中毒）が発生する場合がある。このため、厚生労働省から例年、植物性自然毒による食中毒発生予防が注意喚起される¹⁾等対策がすすめられているところである。しかし、植物性自然毒による食中毒は、平成21～30年の10年間に全国で176件発生し、780人が嘔吐や下痢などの症状を訴え、死亡数も12人に上っている。原因となる主な有毒植物は件数が多い順に、スイセン、ジャガイモ、チョウセンアサガオであり、この3種類で件数の約半分、患者数の約7割を占めている²⁾。

植物性自然毒による食中毒が発生した場合、有効な治療法の選択のために、原因物質の特定は非常に重要である。また、食中毒の予防のため、原因物質を特定した注意喚起が欠かせない。当センターでは、植物性自然毒による食中毒事例の発生時には、原因究明等を目的として、有毒成分の分析を実施している。今般、過去10年間に岡山県内で発生し、当センターで対応した8件の植物性自然毒の検査結

果について報告する。

また、原因植物が残っておらず、調理、喫食された食品のみが試料となる事例の場合は、妨害物質を除去するために、精製工程を追加した前処理法にすることが必要となる。そこで、LC-MS/MSで同時分析が可能であった①アトロピン及びスコポラミン並びに、②リコリンの3成分について、食品試料として味噌汁を用いた同時前処理法を検討したので併せて報告する。

2 方法

2.1 装置及び分析条件

報告する8件の食中毒事例はいずれもLC-MS/MSを用いて分析を実施した。

1) LC条件

使用機種：島津製 LC-20A 高圧グラジエントシステム

カラム：①アトロピン及びスコポラミン

Sigma Aldrich製 Discovery HS F5, 3 µm,
150 × 2.1 mm

②リコリン、③ソラニン及びチャコニン

Waters製 XTerra MS C18 3.5 μm, 150 × 2.1 mm

カラム温度：40℃

移動相：A液（5 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液）

B液（5 mmol/L酢酸アンモニウムメタノール溶液）

① アトロピン及びスコポラミン, ③ソラニン及びチャコニン

A:B=30:70（アイソクラティック）

②リコリン

グラジエント条件：A/B=85/15(0 min)→

50/50(3 min)→5/95(11-15 min)→

85/15(18-30 min)

移動相流量：0.2 mL/min

試料注入量：5 μL

2) MS/MS条件

使用機種：Applied Biosystems製 API3200 QTrap

インターフェース：Turbo V source

イオン化法：ESI positive

ターボガス温度：600℃

イオンスプレー電圧：①アトロピン及びスコポラミン 4500 V

②リコリン, ③ソラニン及びチャコニン 5500 V

測定モード：MRM法

測定イオン：表1に示した

2.2 固相カラム

Oasis PRIME HLB 3 cc 60 mg（以下「PRIME HLB」という。）

Captiva EMR-Lipid（以下「EMR-Lipid」という。）

Sep-Pak Plus C18（以下「C18」という。）

Oasis MCX 500 mg 6 cc（以下「MCX」という。）

Oasis MAX 500 mg 6 cc（以下「MAX」という。）

3 事例

3.1 アトロピン及びスコポラミンによる食中毒

3.1.1 保健所に届出された事例の概要

事例A：平成21年9月11日、自宅で栽培したエンジェルトランペット（キダチチョウセンアサガオ）の花を煮付けにして喫食したところ、四肢弛緩等の神経症状を呈した。

事例B：平成22年5月31日、自宅で栽培したチョウセンアサガオと推測される植物を炒めて喫食したところ、ふらつきや口渇、酩酊、瞳孔散大等の症状を呈した。

事例C：平成22年12月21日、知人宅で栽培されていたチョウセンアサガオと推測される植物の根をゴボウとして譲り受け、煮込んで喫食したところ、めまいや吐気等の症状を呈した。

事例D：平成30年6月22日、自宅で栽培していたチョウセンアサガオと推測される植物の茎と葉を空芯菜と誤認して喫食したところ、ふらつきや口渇、意識混濁等の症状を呈した。

3.1.2 分析項目及び試料

事例Aの原因植物がキダチチョウセンアサガオであること、事例B, C, Dの原因植物がチョウセンアサガオであることが推測されたので、キダチチョウセンアサガオ及びチョウセンアサガオに含まれる有毒成分であるアトロピン及びスコポラミンの分析を行った。

事例A：キダチチョウセンアサガオのつぼみ、根、茎及び葉と患者尿

事例B：自宅で栽培していた植物の葉と患者尿

事例C：知人からゴボウとして譲り受けた植物の根

事例D：空芯菜として自宅で栽培していた鉢植え植物の茎と葉

図1に事例Aのキダチチョウセンアサガオの根、事例Bの植物の葉、事例Cの植物の根及び事例Dの鉢植え植物の写

表1 MRM測定イオン (precursor ion > product ion)

事例	有毒成分	定量	確認
A~D	アトロピン	290.2 > 124.1	290.2 > 93.0
			290.2 > 77.0
	スコポラミン	304.0 > 138.1	304.0 > 103.0
			304.0 > 156.1
E, F	リコリン	288.1 > 147.1	288.1 > 119.3
			288.1 > 91.1
G, H	ソラニン	868.5 > 98.3	868.5 > 398.5
	チャコニン	852.6 > 98.1	852.6 > 398.5

真を示す。

3.1.3 分析方法

山辺らの方法^{3,4)}に従って行った。

3.1.4 結果

全ての事例の試料からアトロピン及びスコポラミンが検出された。アトロピン及びスコポラミンの標準品 (0.2

μg/mL) 並び事例Aの植物の葉のクロマトグラムを図2に、検出値を表2に示す。事例A～Dの植物からはアトロピンが50～240 μg/g、スコポラミンが61～310 μg/g検出された。事例A, Bの患者の尿からアトロピンがそれぞれ0.041, 0.12 μg/mL, 事例Bの患者の尿からスコポラミンが0.005 μg/mL検出された。

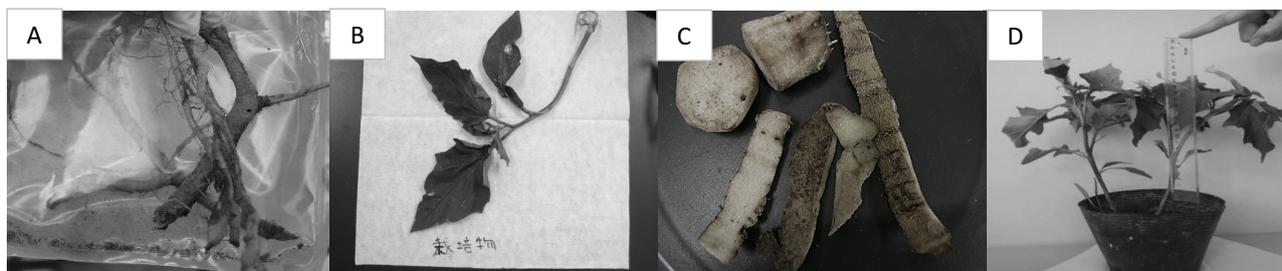


図1 検体の写真

A：事例Aのキダチチョウセンアサガオの根, B：事例Bの植物の葉, C：事例Cの植物の根, D：事例Dの植物

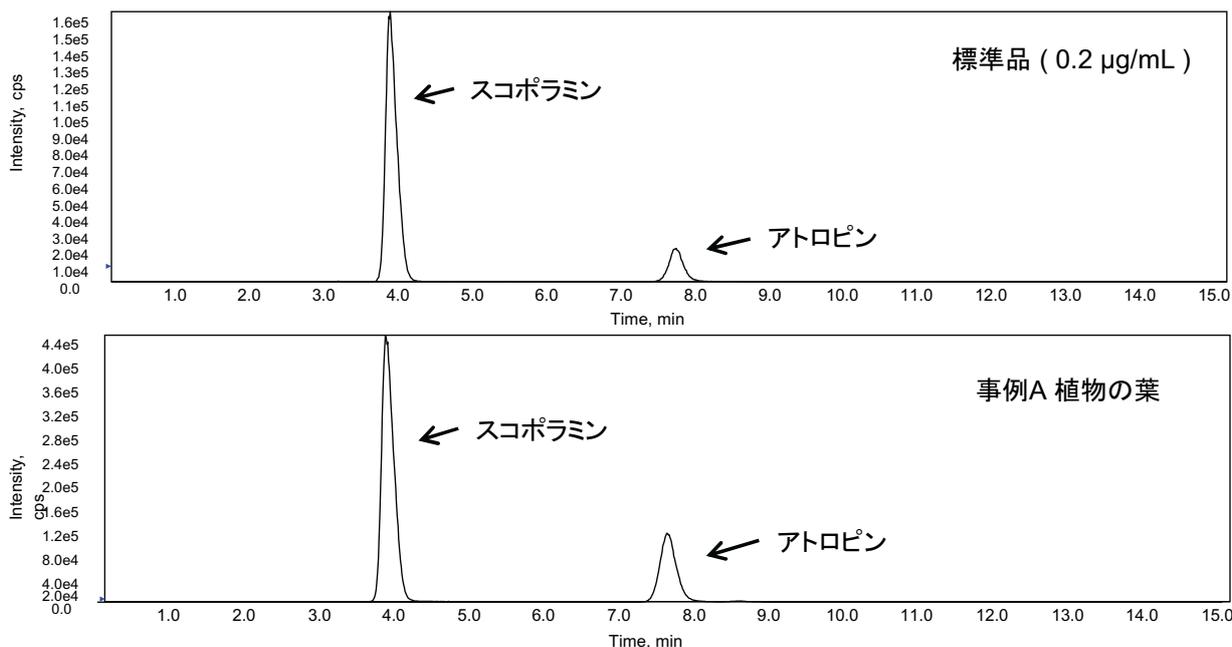


図2 アトロピン及びスコポラミンのMRMクロマトグラム

表2 アトロピン、スコポラミンの検出値

植物: μg/g, 患者尿: μg/mL

事例	A				
	つぼみ	根	茎	葉	患者尿
アトロピン	240	210	190	110	0.12
スコポラミン	240	250	68	190	0.005

植物: μg/g, 患者尿: μg/mL

事例	B			C	D	
	葉-1	葉-2	患者尿	根	茎	葉
アトロピン	77	83	0.041	130	50	111
スコポラミン	160	90	< 0.005	310	61	290

3.1.5 考察

チョウセンアサガオはナス科チョウセンアサガオ属であり、キダチチョウセンアサガオはナス科キダチチョウセンアサガオ属である。チョウセンアサガオ属は一年草又は多年草で上向きの花をつけ、キダチチョウセンアサガオ属は高木又は低木で、下向きの花をつける。ともに有毒成分のトロパンアルカロイドのアトロピン及びスコポラミンを含み、喫食すると口渇、瞳孔散大、意識混濁、心拍促進、興奮、麻痺、頻脈等の症状を呈する⁵⁾。根は20g程度で中毒量に達する場合もあることが知られている⁶⁾。

事例Aでは、アトロピン及びスコポラミンが検出されたことに加えて、食用の野菜と誤認した植物がキダチチョウセンアサガオ属と類似しており、患者の症状も当該食中毒症状に一致していたことから、キダチチョウセンアサガオが食用であるか確認することなく喫食したことによる食中毒と断定された。

事例B, C, Dでは、アトロピン及びスコポラミンが検出されたことに加えて、食用の野菜と誤認した植物がチョウセンアサガオ属と類似しており、患者の症状も当該食中毒症状に一致していたことから、チョウセンアサガオを誤って喫食したことによる食中毒と断定された。チョウセンアサガオの根はゴボウと、開花前のつぼみはオクラと、葉はモロヘイヤやアシタバ等と、種子はゴマと誤認されやすいことが報告されている⁵⁾。開花時期（7～9月）にチョウセンアサガオと認識することは容易であるが、事例B, C, Dともに事例が起こった時には花が咲いておらず、誤認したものと思われる。また、事例Cは栽培者がゴボウとして知人である喫食者に譲ったチョウセンアサガオの根が原因となっており、栽培者及び喫食者自身による食用かどうかの確認が不十分であったものと思われる。

アトロピン及びスコポラミンによる食中毒を防ぐためには、このような事例が発生していることを県民に周知し、食用植物と有毒植物の分かりやすい鑑別方法など有毒植物についての情報を、写真を使用するなどして丁寧かつ継続的に啓発していくことが重要と考えられる。

3.2 リコリンによる食中毒

3.2.1 保健所に届出された事例の概要

事例E：平成27年2月24日、自宅近くに自生していたスイセンと推測される植物をニラと誤認して調理、喫食したところ、嘔吐の症状を呈した。

事例F：平成29年4月5日、自宅近くに自生していたスイセンと推測される植物をニラと誤認して調理、喫食したところ、嘔吐の症状を呈した。

3.2.2 分析項目及び試料

事例E, Fの原因植物が、スイセンであることが推測されたので、スイセンに含まれる有毒成分であるリコリンの分析を行った。

事例E, F：自宅近くに自生していたニラと誤認した植物

図3に事例E, Fの植物の写真を示す。

3.2.3 分析方法

浦山らの方法⁷⁾に従って行った。

3.2.4 結果

事例E, Fともに、自宅近くに自生していたニラと誤認した植物からリコリンが検出された。リコリンの標準品(0.01 µg/mL)及び事例Eの植物の葉のクロマトグラムを図4に示す。検出値は事例Eが130 µg/g、事例Fが1600 µg/gであった。

3.2.5 考察

スイセンは、ヒガンバナ科スイセン属である。有毒成分のアルカロイドのリコリンを含み、喫食すると吐気、嘔吐、頭痛等の症状を呈する。2～3g喫食しただけでも30分以内に中毒症状を起こすことが推測されており、致死量は10gである⁸⁾。スイセン中のリコリンは200 µg/g程度と報告されている⁷⁾。今回の値は、報告値よりも高い値になったが、これは品種、時期、個体の違いによるものと推測される。

事例E, Fでは、リコリンが検出されたことに加えて、食用のニラと間違えた植物がスイセンと類似しており、患者の症状も当該食中毒症状に一致していたことから、スイセンによる食中毒と断定された。スイセンの葉はニラやノビルと、鱗茎はタマネギと誤認されやすいことが報告されている⁸⁾。葉を揉むとニラはニンニクのような強い刺激臭(ニラ臭)があるが、スイセンの臭いは弱く青臭い⁵⁾。スイセンの開花時期(11～4月の間で種類により異なる)にスイセンとニラの区別は容易であるが、事例E, Fともに事例が起こった時には花が咲いておらず、誤認したものと思われる。

リコリンによる食中毒を防ぐためには、アトロピン及びスコポラミンによる食中毒と同様に県民に周知し、丁寧かつ継続的に啓発していくことが重要と考えられる。

3.3 ソラニン及びチャコニンによる食中毒

3.3.1 保健所に届出された事例の概要

事例G：平成22年2月19日、小学校の授業で2月9日に収穫したジャガイモを2月19日に皮は付いたままゆでて喫食したところ、食中毒の症状を呈した。

事例H：平成27年9月10日、小学校の授業で収穫したジャガイモを遮光することなく約2週間ベランダで保管した

後、芽は除去したが、皮は付いたままのものを蒸して喫食したところ、吐気や嘔吐等の症状を呈した。

3.3.2 分析項目及び試料

事例G, Hともにジャガイモに含まれる有毒成分であるソラニン及びチャコニンの含有量の分析を行った。

事例G：生のジャガイモ及びゆでたジャガイモ

事例H：生のジャガイモ及び喫食残である蒸したジャガイモの皮

図5に事例G, Hのジャガイモの写真を示す。

3.3.3 分析方法

西川らの方法⁹⁾に従って行った。

3.3.4 結果

ジャガイモの身と皮からソラニン及びチャコニンが高濃度に検出された。ソラニン及びチャコニンの標準品 (2 µg/mL) 及び事例Gの未成熟ジャガイモのクロマトグラムを図6に、検出値を表3に示す。ソラニンが31～590 µg/g,

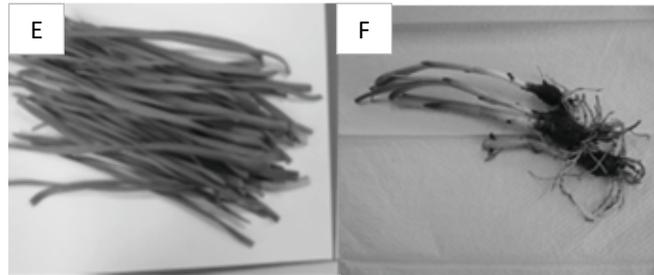


図3 検体の写真
E：事例Eの植物の葉, F：事例Fの植物

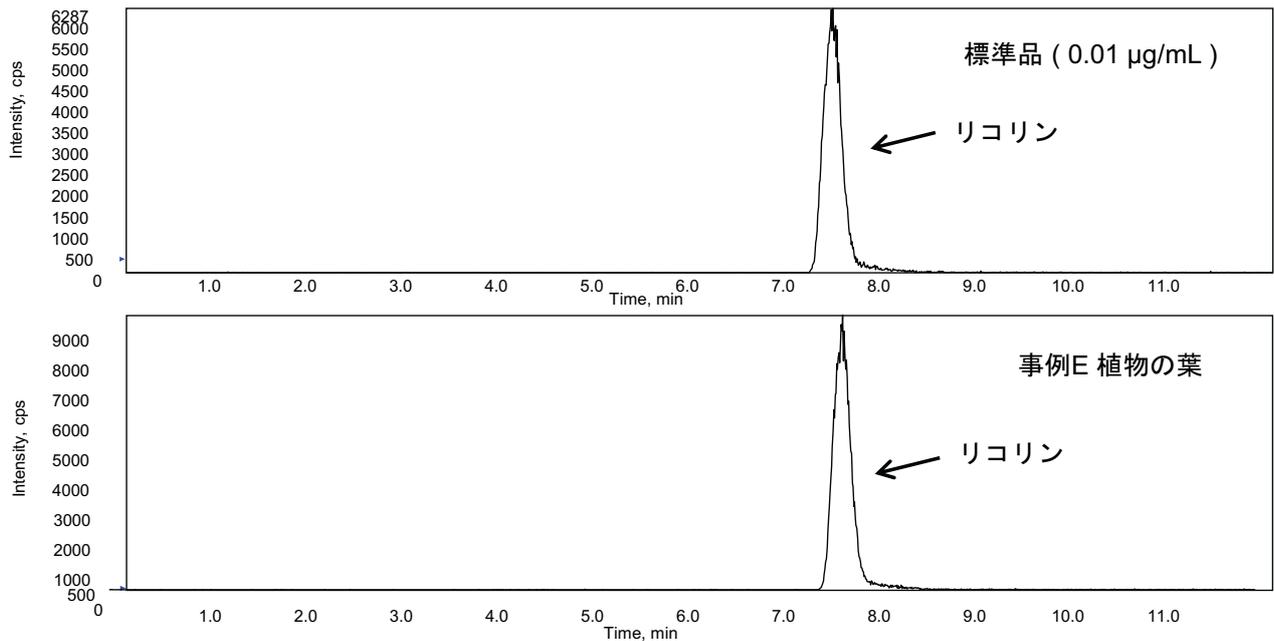


図4 リコリンのMRMクロマトグラム

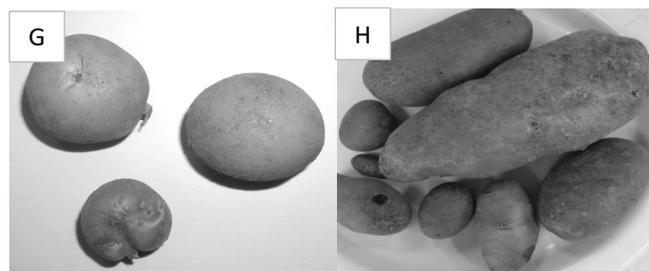


図5 検体の写真
G：事例Gのジャガイモ, H：事例Hのジャガイモ

チャコニンが40～460 μg/g検出された。ジャガイモは大きさが大～中程度のものよりも小さく未成熟の方が検出値が高く、また、身よりも皮の方が検出値が高かった。

3.3.5 考察

ジャガイモは、ナス科ナス属である。有毒成分のグルコアルカロイドのソラニン及びチャコニンは、食中毒を起こすほどの量ではないが、元来ジャガイモに含まれている。しかし、発芽部分や緑に変色した皮の下には、ソラニン及びチャコニンが通常よりも多く含まれており、この部分を取り除かずに食べてしまうことが、食中毒を引き起こす原因となっている。大量のソラニン及びチャコニンを喫食すると嘔吐、下痢、腹痛、目眩、動悸、耳鳴、意識障害、痙攣、呼吸困難等の症状を呈し、重篤な場合は死に至る⁵⁾。ジャガイモの可食部全体では、100 gあたり平均 7.5 mgの

ソラニン及びチャコニンを含んでおり、そのうち 3～8割が皮の周辺にあるといわれている。一方、光に当たって緑に変色した皮の部分は 100 gあたり 100 mg以上のソラニン及びチャコニンを含んでいるといわれている。また、芽や傷のついた部分にもソラニン及びチャコニンが多く含まれる⁵⁾。成人ではソラニンの50 mgの喫食で中毒を起こすことが知られている¹⁰⁾。

今回の事例のように小学校の菜園で栽培し収穫したジャガイモを喫食して食中毒を起こす事例は後を絶たない¹¹⁾。食中毒を防ぐためには、芽と未成熟や緑に変色したジャガイモは食べないこと、皮は出来るだけ剥くことが大事と考えられる。栽培、収穫、保存、調理など各段階での注意点¹²⁾を周知していくことが必要と考えられる。

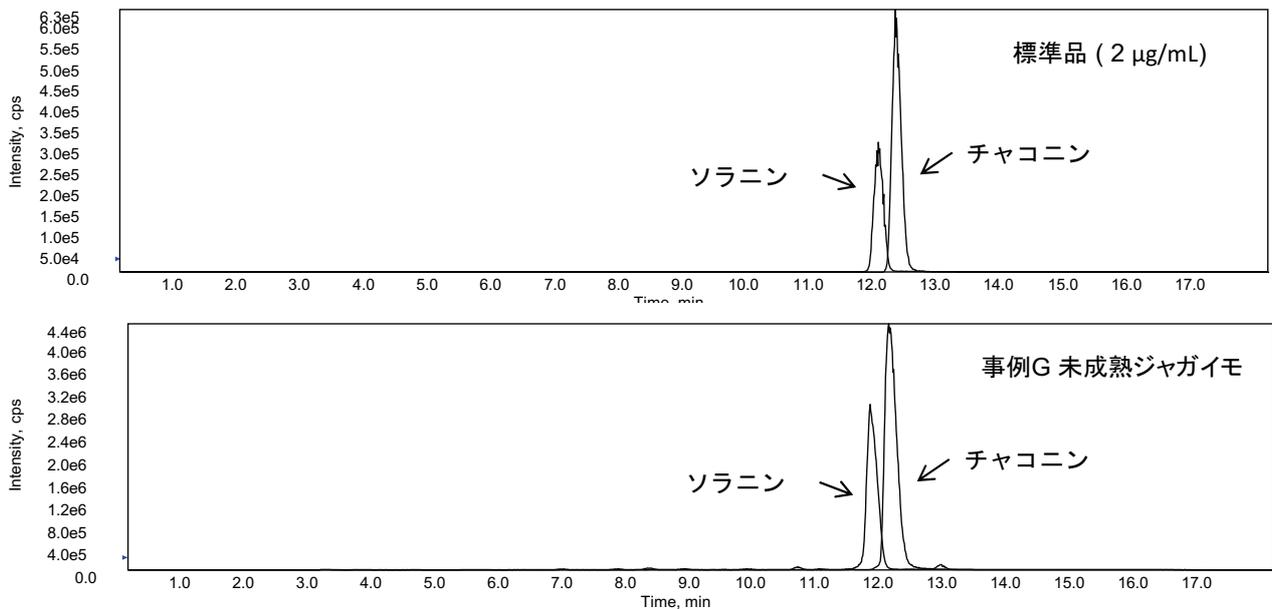


図6 ソラニン及びチャコニンのMRMクロマトグラム

表3 ジャガイモ中のソラニン、チャコニンの検出値

事例	G			
	身と皮	身と皮	身	身と皮
部位	緑変	未成熟	芽と緑変除去	緑変
状態	生	生	生	ゆでた
加熱状況	生	生	生	ゆでた
ソラニン	590	410	280	250
チャコニン	430	330	170	230

事例	H						
	大		中		小(未成熟)		中
大きさ	大		中		小(未成熟)		中
部位	身	皮	身	皮	身	皮	皮
加熱状況	生	生	生	生	生	生	蒸した
ソラニン	31	120	36	66	110	300	190
チャコニン	40	220	45	100	130	460	230

4 味噌汁中のアトロピン及びスコポラミン並びにリコリンの一斉分析法の検討

4.1 前処理法の検討

抽出は、目的物質が添加された味噌汁100 mL(塩分量0.7 g, 蛋白量2.2 g)をGF/Bろ紙を用いて吸引ろ過し、精製水を加えて正確に100 mLとした。そこから1 mLを分取し、メタノールで正確に10 mLとした。

精製はメタノール/ヘキサン分配と固相カラムを検討した。メタノール/ヘキサン分配は、等量のメタノールとメタノール飽和ヘキサンに標準品を0.1 µg添加して検討した。メタノール層の回収率はアトロピンが99%、スコポラミンが100%及びリコリンが110%であった。

固相カラムは、PRIME HLB, EMR-Lipid, C18, MCX及びMAXを用い、標準品を0.1 µg添加して検討した。条件及び結果を表4に示す。回収率はPRIME HLB(溶出条件I及びII), MCX(溶出条件III)及びMAX(溶出条件I)で良好な結果であった。また、MAXとMCXをMAXが上

になるように連結し(以下「連結カラム」という。), 連結カラムに標準液を負荷しメタノールを加えた後にMAXを取り外し、MCXを水3 mLで洗浄後、条件IIIで溶出したところ、3物質ともに110%の回収率であり、良好な結果であった。

味噌汁を用いて添加回収試験を行い、精製法の比較を行った。条件及び結果を表5に示す。全ての条件で良好な結果が得られたが、メタノール/ヘキサン分配のみの条件IではLC-MS/MS分析溶液に味噌汁のにおいが若干残っており、精製不足が懸念された。緊急時に迅速に対応する必要性を考慮して、味噌汁のにおいが残る条件I以外で、最も簡便である条件3(PRIME HLB(溶出条件II)のみで精製)を採用し、決定した前処理法を図7に示す。なお、メタノール/ヘキサン分配と固相カラム(MCX(溶出条件III))で精製を行う条件で、キンピラゴボウに添加したアトロピン及びスコポラミンを分析できることが報告されており⁴⁾、調理、喫食された食品の種類によっては、他の条件を採用

表4 固相カラムからの溶出率 (%)

カラム	PRIME HLB			PRIME HLB			EMR-Lipid		
	なし			なし			なし		
	負荷液	溶出液	合計	負荷液	溶出液	合計	負荷液	溶出液	合計
溶出条件	メタノール	条件 I		メタノール	条件 II		メタノール	条件 I	
	1 mL	1 mL	1 mL	2 mL	1 mL	2 mL			
アトロピン	43	48	91	41	70	110	0	60	60
スコポラミン	55	43	100	53	51	100	79	26	110
リコリン	73	40	110	75	41	120	92	25	120

カラム	EMR-Lipid			C18				MCX			
	なし			メタノール 5 mL, 水 10 mL				メタノール 10 mL, 水 5 mL			
	負荷液	溶出液	合計	負荷液	洗浄液	溶出液	合計	負荷液	洗浄液	洗浄液	溶出液
溶出条件	メタノール	条件 II		メタノール : 水 = 2 : 8	メタノール : 水 = 2 : 8	条件 I		メタノール	メタノール	水	条件 III
	1 mL	1 mL	10 mL	5 mL	15 mL	2 mL	3 mL	3 mL	5 mL		
アトロピン	13	14	27	0	0	32	32	0	0	0	110
スコポラミン	76	16	92	0	0	38	38	0	0	0	120
リコリン	90	16	110	0	23	19	42	0	0	0	120

カラム	MAX			連結カラム (MAX + MCX)			
	メタノール 10 mL, 水 5 mL			メタノール 10 mL, 水 5 mL			
	負荷液	溶出液	合計	負荷液	洗浄液	洗浄液	溶出液
溶出条件	メタノール	条件 I		メタノール	メタノール	水	条件 III
	2 mL	3 mL	2 mL	3 mL	3 mL	10 mL	
アトロピン	38	56	94	0	0	0	110
スコポラミン	43	60	100	0	0	0	110
リコリン	38	54	92	0	0	0	110

溶出液
 条件 I メタノール
 条件 II メタノール : 水 = 1 : 1
 条件 III 5% 水酸化アンモニウム含有メタノール溶液

表5 味噌汁からの回収率 (%)

条件	1	2	3	4	5
ヘキサン分配	+	+	-	+	-
カラム		PRIME HLB		連結カラム (MAX + MCX)	
溶出液	-	メタノール : 水 = 1 : 1 3 mL (負荷液含む)		5% 水酸化アンモニウム含有メタノール溶液 10 mL	
アトロピン	100	97	100	110	110
スコポラミン	97	110	110	100	110
リコリン	110	120	120	110	120

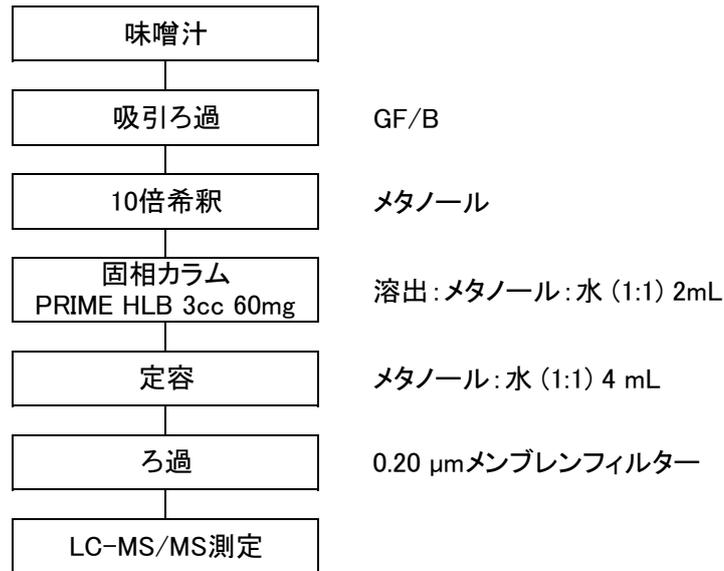


図7 分析フロー

表6 味噌汁からの回収率 (%) (5併行)

	アトロピン	スコポラミン	リコリン
1	100	100	120
2	110	110	120
3	110	110	120
4	98	100	120
5	100	100	120
平均回収率 (%)	100	110	120
併行精度 (%)	4.0	4.7	1.9

する方が良い場合も考えられる。

4.2 LC-MS/MS分析条件

浦山らの方法¹³⁾に従って、アトロピン及びスコポラミン並びにリコリンを同時に分析した。検量線は、20～100 ng/mLの範囲で4点調製したところ、良好な直線性 ($r^2 \geq 0.999$) が得られた。

4.3 添加回収試験

味噌汁100 mLに標準品を各200 μg添加して、図7の分析フローで前処理を行い、5回併行で試験した結果を表6に示す。3物質の平均回収率は100～120%，併行精度は1.9～4.7%であり、十分に満足できる値であった。

5 まとめ

県内で平成21～30年の10年間に発生し、当センターに依頼があった8件の植物性自然毒による食中毒事例の原因物質の分析を行った。また、味噌汁中のアトロピン及びスコポラミン並びにリコリンの一斉分析法を検討したところ、以下の知見が得られた。

(1) アトロピン及びスコポラミンによる食中毒が4件発生

した。キダチチョウセンアサガオを食用植物と誤認して喫食したことによる食中毒、及び食用の野菜と誤認してチョウセンアサガオを喫食したことによる食中毒であった。

- (2) リコリンによる食中毒が2件発生した。食用のニラと誤認してスイセンの葉を喫食したことによる食中毒であった。
- (3) アトロピン及びスコポラミン並びにリコリンによる食中毒を防ぐためには、このような事例が発生していることを県民に周知し、食用植物と有毒植物の分かりやすい鑑別方法等の有毒植物についての情報を、写真を使用するなどして丁寧かつ継続的に啓発していくことが重要と考えられる。
- (4) ソラニン及びチャコニンによる食中毒が2件発生した。小学校の菜園で栽培し収穫した未成熟又は緑に変色したジャガイモを喫食したことによる食中毒であった。ソラニン及びチャコニンによる食中毒を防ぐためには、未成熟又は緑に変色したジャガイモは食べないこと、芽を取り除き、皮は出来るだけ剥くこと

が大事と考えられる。栽培, 収穫, 保存, 調理など各段階での注意点を周知していくことが必要と考えられる。

- (5) 味噌汁中のアトロピン及びスコポラミン並びにリコリンの一斉分析法を検討し, 前処理法として吸引る過後希釈し, PRIME HLBで精製する分析法を確立した。

文 献

- 1) 平成30年4月26日付け厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長通知:薬生食監発0426第1号「有毒植物による食中毒防止の徹底について」
- 2) 厚生労働省: 有毒植物による食中毒に注意しましょう https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/youudoku/index.html (2019.7.10アクセス)
- 3) 山辺真一, 肥塚加奈江, 田邊英子, 北村雅美, 今中雅章: LC/MS/MSによる食品中のアトロピン, スコポラミンの迅速定量, 岡山県環境保健センター年報31, 127-132, 2007
- 4) 山辺真一, 肥塚加奈江, 山本 淳, 石井 学, 今中雅章: LC/MS/MSによる食品中のアトロピン, スコポラミンの迅速定量, 岡山県環境保健センター年報32, 141-143, 2008
- 5) 厚生労働省: 自然毒のリスクプロファイル https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/poison/index.html (2019.7.10アクセス)
- 6) 食品安全委員会: チョウセンアサガオ https://www.fsc.go.jp/sonota/hazard/kosyoku_4.pdf (2019.9.12アクセス)
- 7) 浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美: LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討, 岡山県環境保健センター年報37, 125-128, 2013
- 8) 食品安全委員会: スイセン https://www.fsc.go.jp/sonota/hazard/kosyoku_1.pdf (2019.9.12アクセス)
- 9) 西川 徹, 川口善之, 村上正文: LC/MS/MSによる α -ソラニンおよび α -チャコニンの高感度分析法の検討, 長崎県衛生公害研究所報, 52, 84-86, 2006
- 10) 厚生労働省: 自然毒のリスクプロファイル: 高等植物: ジャガイモ <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000082078.html> (2019.9.12アクセス)
- 11) 平成21年8月10日付け厚生労働省医薬食品局食品安全

部監視安全課長通知: 食安監発0810第4号「ジャガイモの喫食によるソラニン類食中毒について」

- 12) 農林水産省: ジャガイモによる食中毒を予防するために <http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/foodpoisoning/naturaltoxin/potato.html> (2019.7.10アクセス)
- 13) 浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美: LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討, 岡山県環境保健センター年報37, 129-132, 2013

業 務 報 告

2018年岡山県における感染症の患者発生状況について

(岡山県感染症情報センター業務報告 2018.1～2018.12)

1 感染症発生動向調査

1.1 調査方法

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

1.2 届出対象感染症

対象となる感染症は、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(平成10年法律第104号。以下「感染症法」という。)により定められており、一類～五類感染症、新型インフルエンザ等感染症及び指定感染症に分類されている。一類～四類感染症、新型インフルエンザ等感染症及び指定感染症は全数把握対象に、五類感染症は、全数把握対象と定点把握対象に区分されている(表1)。

1.2.1 全数把握感染症

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

1.2.2 定点把握感染症

定点把握感染症とは、発生動向の把握が必要な感染症のうち、患者数が多数で、その全てを把握する必要がないもので、指定された医療機関(定点)から発生状況が週単位又は月単位で届出されることになっている。定点医療機関は、要綱の基準に基づき選定されており、岡山県の場合、定点医療機関数は、小児科定点54、内科定点30、眼科定点12、性感染症定点17、基幹定点5が設定され、小児科定点と内科定点をあわせて、インフルエンザ定点84となっている。

定点把握感染症については、全国や過去のデータの比較においては、全ての定点医療機関から報告される患者数を定点医療機関数で割った値(以下「定点あたり報告数」

という。)、又は年間の患者報告数を定点医療機関数で割った値(以下「定点あたり累積報告数」という。)を用いる。

1.3 調査期間

全数把握感染症(表1-1)及び月報告の定点把握感染症(表1-2-②)の調査期間は、2018年1月1日～12月31日、週報告の定点把握感染症(表1-2-①)については、2018年第1週～第52週(2018年1月1日～2018年12月30日)とした。なお、インフルエンザについては、流行時期にあわせて、第36週～翌年第35週(2017年9月4日～2018年9月2日)とした。また、いずれの感染症も診断日を基準とした。

2 結果

2.1 全数把握感染症の発生状況(表2, 3)

2.1.1 一類感染症

一類感染症の届出はなかった。

2.1.2 二類感染症

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

i) 結核

結核は337例の届出があり、過去5年間と比較して2番目に少なかったが、毎年300例以上の届出が続いている(図1)。病型は、患者190例、無症状病原体保有者140例、疑似症患者5例、死亡者2例で、無症状病原体保有者140例のうち21例が医療・介護関係者(看護師、介護職など)であった。性別は男性189例、女性148例で、年齢階級別(図2)では60歳以上の高齢者が58%を占めていた。また、昨年と同様に、20歳代の男性で届出が多く見られた(39例)。なお、近年は全国的にも20歳代の若年層で新登録患者数が増加傾向にあり(2018年は新登録患者15,590例中1,273例(8.2%))、特に同年代における外国生まれの患者の増加が目されている¹⁾。

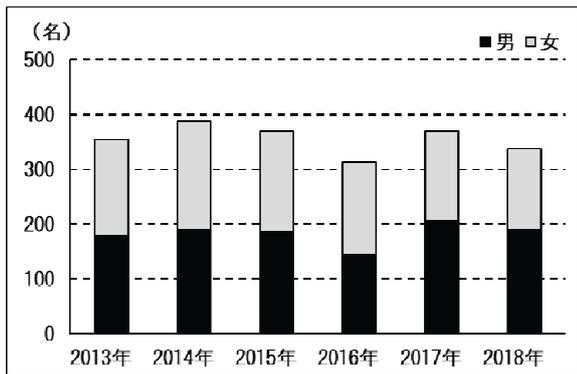


図1 結核 年次別発生状況

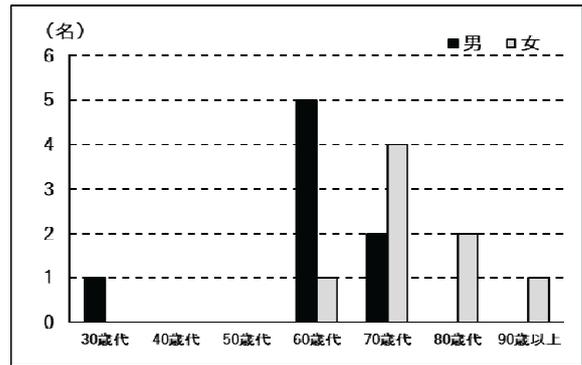


図4 細菌性赤痢 年齢階級別発生状況

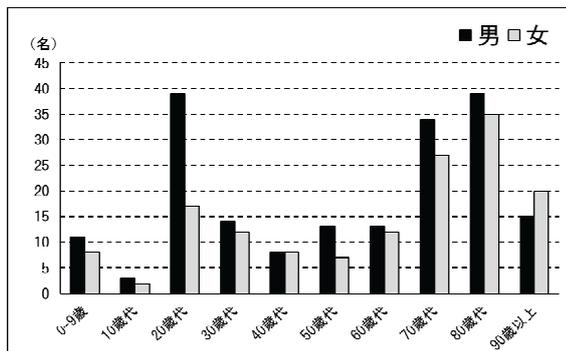


図2 結核 年齢階級別発生状況

ii) 腸管出血性大腸菌感染症

腸管出血性大腸菌感染症は70例の届出があり、前年と同数であった(図5)。病型は、患者47例、無症状病原体保有者23例であった。性別は男性36例、女性34例で、年齢階級別では20歳代以下で全体の半数を占めており、10歳未満が27%と最も多かった。月別発生状況は6月(14例)が最も多く、7月(13例)、8月及び9月(各11例)の順となっており、梅雨～秋にかけて多くの届出があった(図6)。血清群別の内訳は、図7のとおりであった。

2.1.3 三類感染症

三類感染症は、細菌性赤痢、腸管出血性大腸菌群感染症、腸チフスの届出があった。コレラ、パラチフスの届出はなかった。

i) 細菌性赤痢

細菌性赤痢は16例の届出があり、性別は男性8例、女性8例で、例年より多かった。年齢階級別では60歳代から70歳代で75%を占めていた。16例は全て10月に届出があり、山梨県の宿坊で発生した集団食中毒事例(16例のうち1例は赤痢菌に感染した家族からの接触感染)に関わるものであった。

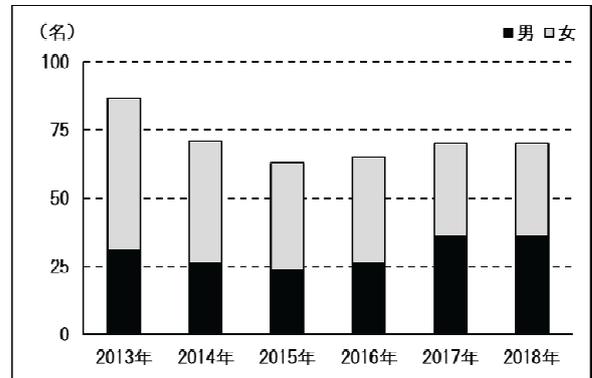


図5 腸管出血性大腸菌感染症 年次別発生状況

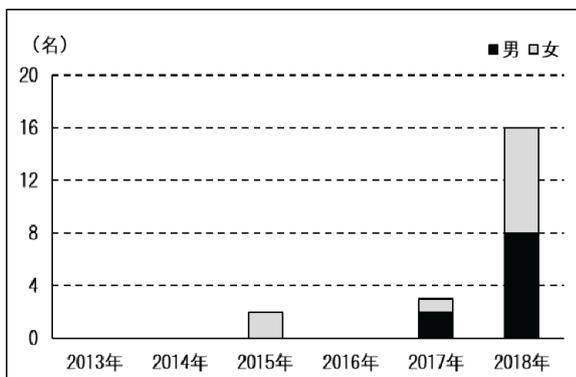


図3 細菌性赤痢 年次別発生状況

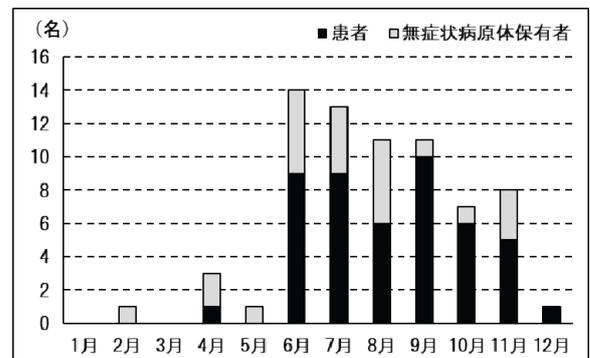


図6 腸管出血性大腸菌感染症 月別発生状況

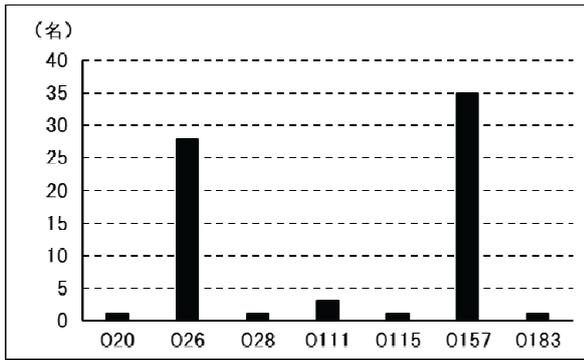


図7 腸管出血性大腸菌感染症 O血清群発生状況

iii) 腸チフス

腸チフスは1例の届出があり、40歳代の女性であった。推定感染地域はネパールで、感染経路は不明であった。

2.1.4 四類感染症

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

i) E型肝炎

E型肝炎は1例の届出があり、60歳代の男性であった。推定感染地域は、国内(都道府県不明)で、感染原因・経路は不明であった。

ii) A型肝炎

A型肝炎は5例の届出があった。性別は全て男性で、年齢階級別では30歳代(2例)、20歳代、40歳代及び60歳代(各1例)の順に多かった。推定感染地域は、国内(県内)が3例、不明が2例で、感染原因・経路は全て不明であった。

iii) 重症熱性血小板減少症候群

重症熱性血小板減少症候群は2例の届出があり、20歳代の男性と30歳代の女性であった。岡山県では2年ぶりの届出となった。7月と10月に届出があり、推定感染地域はどちらも国内(県内)で、感染原因・経路は1例はダニからの感染が推定され、他の1例はSFTSウイルス陽性の動物からの感染であった²⁾。

iv) つつが虫病

つつが虫病は2例の届出があり、60歳代及び80歳代の男性であった。1月と5月に届出があり、推定感染地域は、国内(県内)であった。

v) 日本紅斑熱

日本紅斑熱は5例の届出があり、前年(7例)とほぼ同数であった。2009年10月の県内初の届出以来の累計報告数は31例となった。月別発生状況は5月2例、6月2例、8月1例であった。性別は男性2例、女性3例で、年齢は50～

80歳代であった。

vi) ボツリヌス症

ボツリヌス症は1例の届出があり、乳児男性であった。2011年以来7年ぶりの届出となった。感染原因・経路は不明であった。

vii) レジオネラ症

レジオネラ症は83例の届出があり、例年30例前後で推移していたが、2018年は例年の2倍以上の届出となった(図8)。病型は82例が肺炎型、1例がポンティアック熱型であった。性別は男性73例、女性10例で、年齢階級別では60歳代(27例)が最も多く、次いで50歳代(24例)、70歳代(18例)の順であった(図9)。推定感染原因・経路は、水系感染15例、塵埃感染5例、その他1例、不明64例であった(重複あり)。水系感染のうち、温泉等の利用が8例で確認された。感染症サーベイランスシステムの情報から、水系及び塵埃感染のうち3例は、平成30年7月に西日本で発生した豪雨(平成30年7月豪雨)後の復旧・河川清掃作業の従事歴を有していたことが分かった。また、このうち1例からは、菌が分離された³⁾。

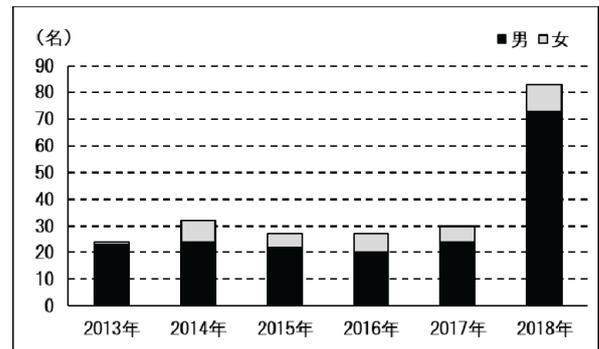


図8 レジオネラ症 年次別発生状況

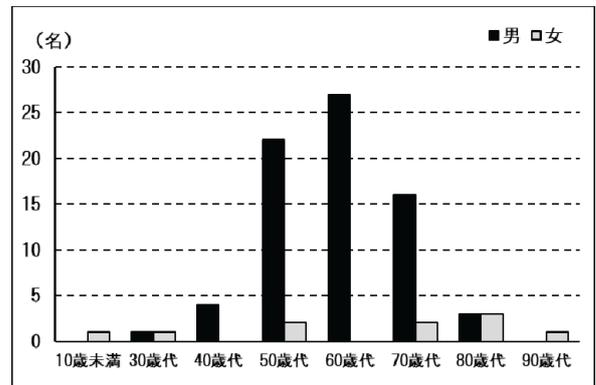


図9 レジオネラ症 年齢階級別発生状況

2.1.5 五類感染症 (全数把握対象)

五類感染症では、18の感染症で届出があった。クリプトスポリジウム症、先天性風しん症候群、破傷風、バン

コマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症, バンコマイシン耐性腸球菌感染症, 麻しん, 薬剤耐性アシネトバクター感染症の届出はなかった。

i) アメーバ赤痢

アメーバ赤痢は15例の届出があり, 前年(22例)からわずかに減少した(図10)。病型は全て腸管アメーバ症であった。性別は男性14例, 女性1例で, 年齢階級別では60歳代(7例), 50歳代(4例), 40歳代(2例)の順に多く, 患者は全て30歳以上の成人であった(図11)。推定感染地域は県内3例, 都道府県不明12例であった。推定感染原因・経路は性的接触1例の他は全て不明であった。

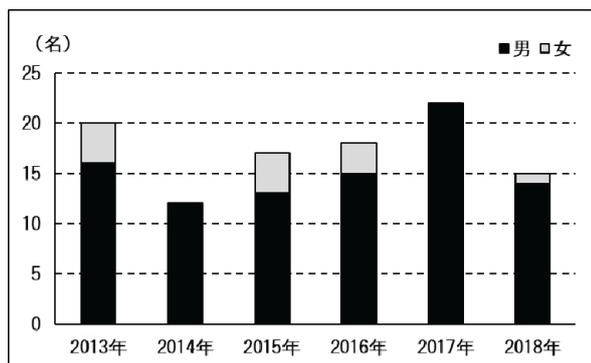


図10 アメーバ赤痢 年次別発生状況

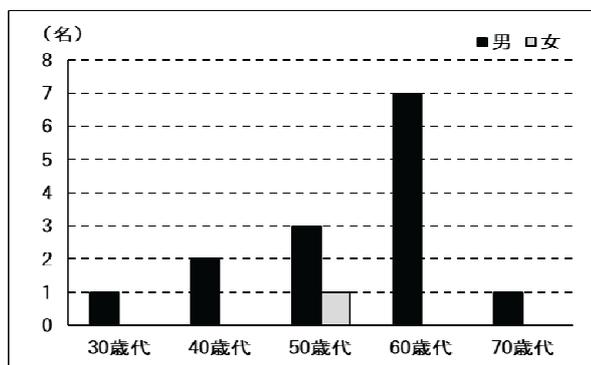


図11 アメーバ赤痢 年齢階級別発生状況

ii) ウイルス性肝炎(E型肝炎及びA型肝炎を除く)

ウイルス性肝炎は5例の届出があり, 前年(12例)から

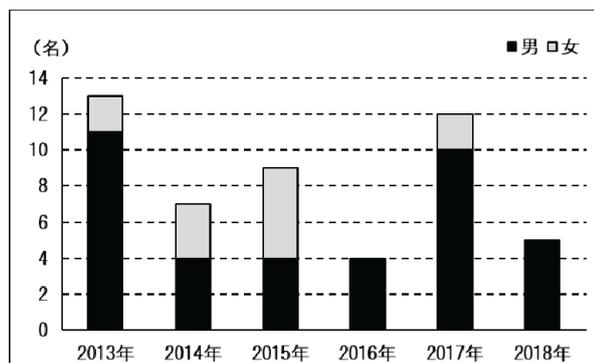


図12 ウイルス性肝炎 年次別発生状況

減少した(図12)。全てB型肝炎で, 性別は全て男性であった。年齢階級別では20歳代2例, 10歳代, 30歳代及び40歳代各1例ずつであった。推定感染地域は国内が4例(県内3例, 県外1例), 不明が1例で, 推定感染原因・経路は, 性的接触4例(同性間2例, 異性間2例), 針等の鋭利なものの刺入による感染1例, 不明1例(重複あり)であった。

iii) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症は26例の届出があり, 前年(17例)から増加した(図13)。性別は男性19例, 女性7例で, 年齢階級別では70歳代(10例), 80歳代(5例), 40歳代, 60歳代及び90歳代(各3例)の順に多く, 70歳以上の高齢者で69%を占めていた(図14)。

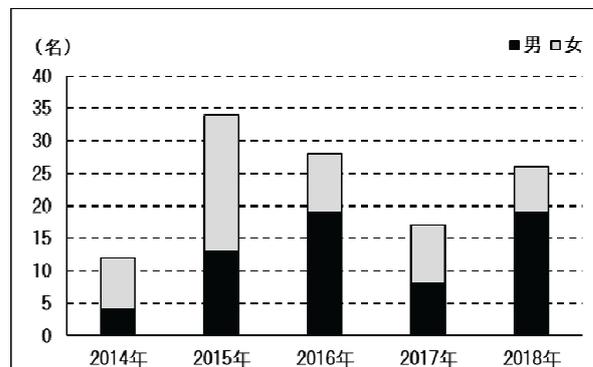


図13 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症 年次別発生状況

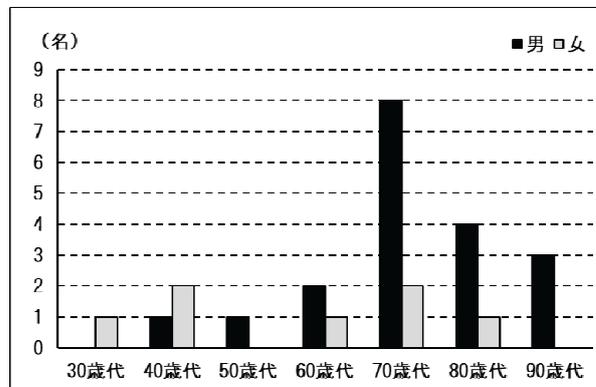


図14 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症 年齢階級別発生状況

iv) 急性弛緩性麻痺(急性灰白髄炎を除く)

急性弛緩性麻痺は3例の届出があり, 男性2名, 女性1名で, 全て2歳以下の幼児であった。3例のうち2例は病原体不明(エンテロウイルス陰性)であったが, 1例からエンテロウイルスD68が検出された。なお, 急性弛緩性麻痺は平成30年5月1日から全数把握の対象として五類感染症に追加されている。

v) 急性脳炎(ウエストナイル脳炎, 西部ウマ脳炎, ダニ媒介脳炎, 東部ウマ脳炎, 日本脳炎, ベネズエラウマ脳炎及びリフトバレー熱を除く)

急性脳炎は6例の届出があり、前年（8例）とほぼ同数であった（図15）。検出された病原体は、インフルエンザウイルスB、エンテロウイルス、単純ヘルペスウイルス及びヒトヘルペスウイルス（HHV-6）が各1例ずつ、病原体不明2例であった。性別は男性4例、女性2例で、年齢階級別では10歳未満（3例）、10歳代（2例）、60歳代（1例）の順に多かった。

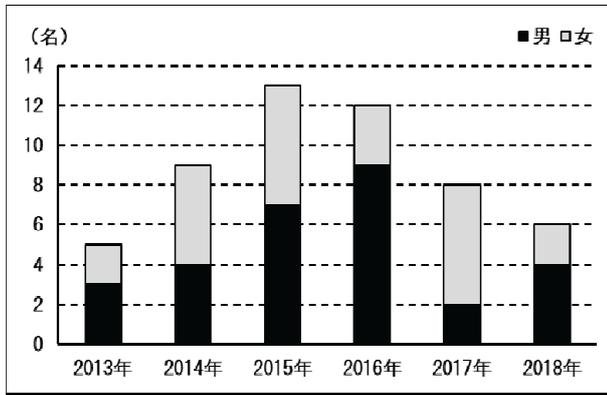


図15 急性脳炎 年次別発生状況

vi) クロイツフェルト・ヤコブ病

クロイツフェルト・ヤコブ病は2例の届出があった。60歳代女性及び80歳代男性であった。

vii) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は14例の届出があり、過去5年間と比較して最も多かった。性別は男性8例、女性6例で、年齢階級別では70歳代（5例）、60歳代（4例）、80歳代（3例）の順に多く、創傷感染2例、その他8例、不明4例であった。

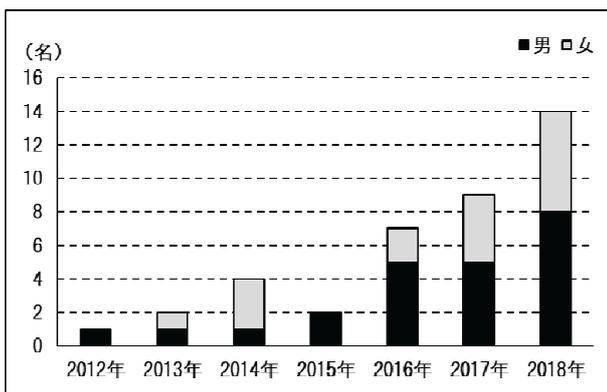


図16 劇症型溶血性レンサ球菌感染症 年次別発生状況

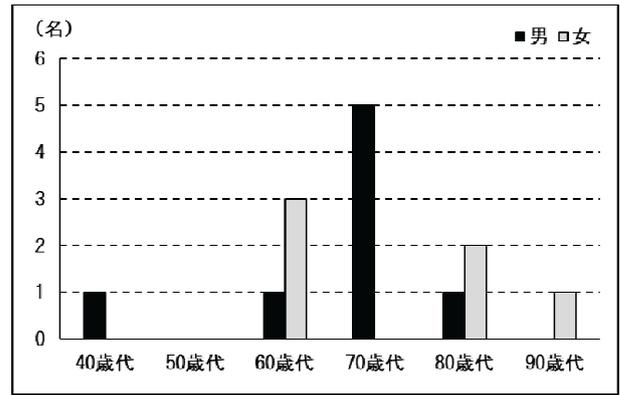


図17 劇症型溶血性レンサ球菌感染症 年齢階級別発生状況

viii) 後天性免疫不全症候群

後天性免疫不全症候群は18例の届出があり、前年（22例）とほぼ同程度であった（図18）。性別は男性15例、女性3例で、年齢階級別（図19）では10～60歳代の幅広い年齢で届出があり、20歳代と30歳代で全体の61%を占めていた。病型はAIDS 3例、無症候性キャリア14例、その他（急性HIV感染症）1例であった。推定感染地域は、国内15例、不明3例であった。推定感染原因・経路は性的接触15例（異性間1例、同性間14例）、不明3例であった。

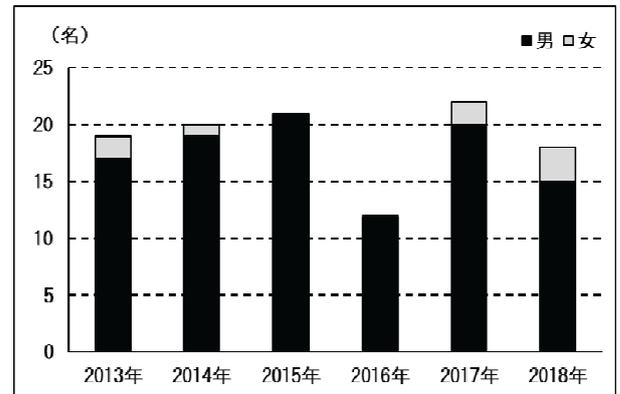


図18 後天性免疫不全症候群 年次別発生状況

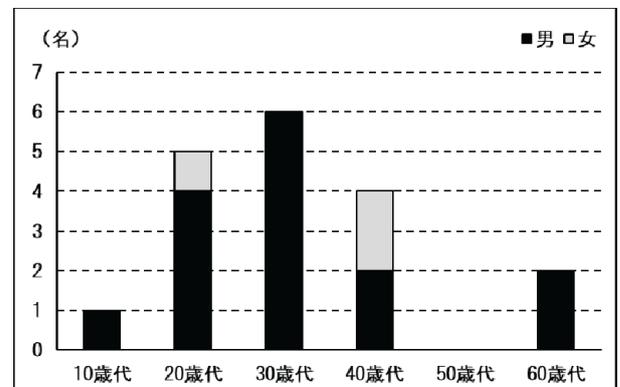


図19 後天性免疫不全症候群 年齢階級別発生状況

ix) 侵襲性インフルエンザ菌感染症

侵襲性インフルエンザ菌感染症は2例の届出があり、10歳代及び70歳代女性であった。感染原因・経路については全て不明であった。

x) 侵襲性髄膜炎菌感染症

侵襲性髄膜炎菌感染症は1例の届出があり、70歳代女性であった。感染原因・経路については不明であった。

xi) 侵襲性肺炎球菌感染症

侵襲性肺炎球菌感染症は45例の届出があり、前年(36例)から増加した(図20)。性別は男性28例、女性17例で、年齢階級別では70歳代(14例)が最も多く、次いで80歳代(11例)、50歳代(7例)の順であった(図21)。ワクチン接種歴別でみると、接種歴あり10例、接種歴なし15例、不明20例であった。

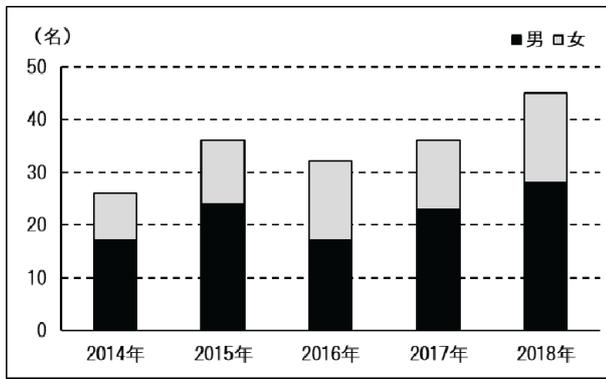


図20 侵襲性肺炎球菌感染症 年次別発生状況

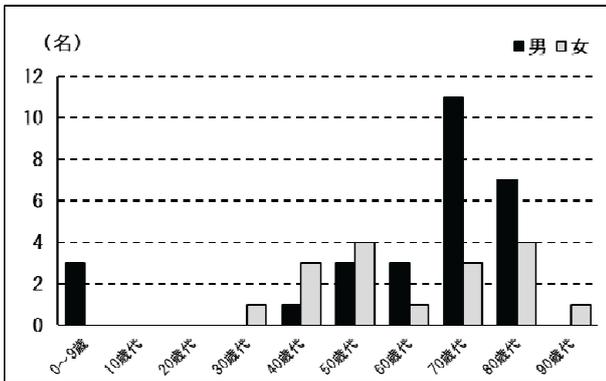


図21 侵襲性肺炎球菌感染症 年齢階級別発生状況

xii) 水痘(入院例に限る。)

水痘(入院例に限る。)は3例の届出があった。性別は全て女性で、幼児、20歳代及び60歳代(各1例)であった。3例のうち2例は、水痘患者との接触が推定された。

xiii) 梅毒

梅毒は160例の届出があった。過去5年間と比較すると、感染症法が施行された1999年以降で最多の届出数となった2017年(172例)とほぼ同程度であった(図22)。病型

は早期顕症梅毒Ⅰ期57例、早期顕症梅毒Ⅱ期72例、晩期顕症梅毒2例、無症状病原体保有者29例であった。性別は男性99例、女性61例で、2017年と比較すると、女性の増加が顕著であった。年齢階級別(図23)では、男性は30歳代(29例)、40歳代(27例)、20歳代(22例)の順、女性は20歳代(29例)、30歳代(10例)、10歳代(9例)の順が多かった。特に女性は10歳代及び20歳代で女性全体の62%を占めており、2017年の10歳代及び20歳代の届出数の1.5倍となった。10歳代及び20歳代の女性の届出数は、年々増加傾向を示している(図24)。推定感染地域は国内139例(県内114例、県外21例、都道府県不明6例)、国外1例(シンガポール)、不明20例であった(重複あり)。推定感染原因・経路は、性的接触152例、不明8例であった。

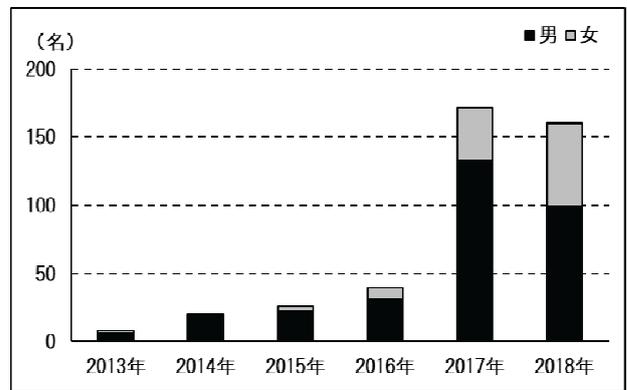


図22 梅毒 年次別発生状況

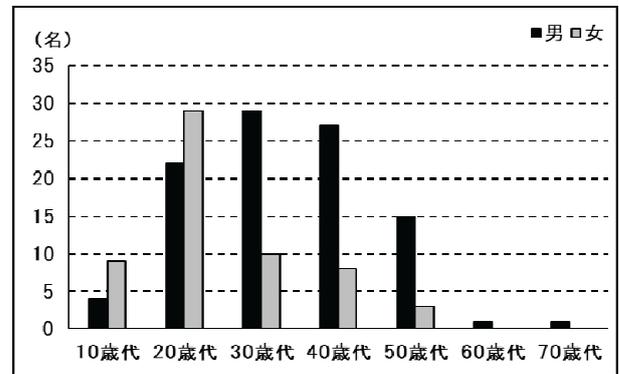


図23 梅毒 年齢階級別発生状況

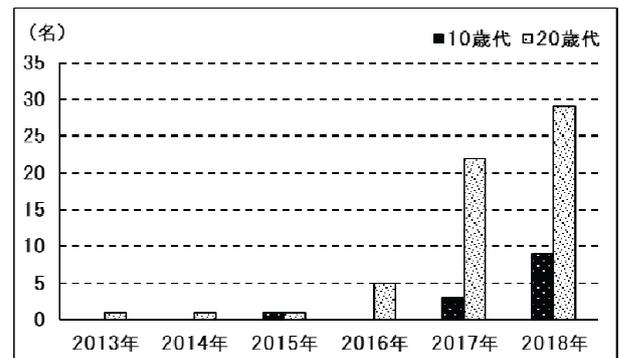


図24 梅毒 年次別発生状況(10歳代・20歳代女性)

xiv) 播種性クリプトコックス症

播種性クリプトコックス症は2例の届出があった。患者は50歳代の男性及び80歳代の女性であり、2例とも推定感染経路は免疫不全、推定感染地域は国内(県内)であった。

xv) 百日咳

百日咳は平成30年1月1日より定点把握の対象から全数把握の対象(五類感染症)に変更されており、187例の届出があった。性別は男性85例、女性102例で、月別の発生状況では、12月が最も届出が多かったが、年間を通して届出があった(図25)。届出年齢階級別では小学生(86例)、20歳代以上(38例)、幼児(24例)の順で多かった(図

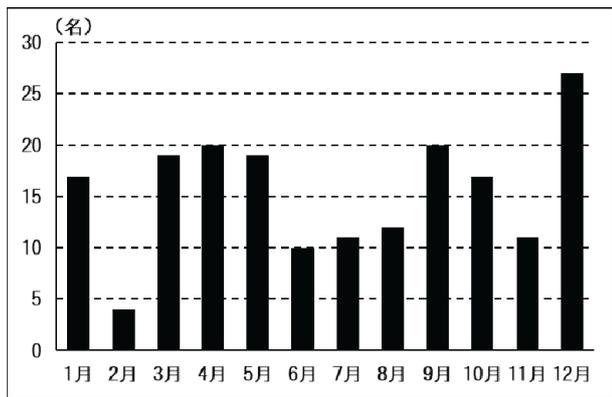


図25 百日咳 月別発生状況

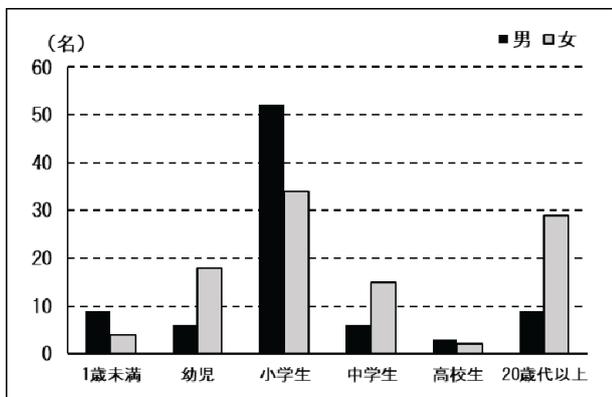


図26 百日咳 年齢階級別発生状況

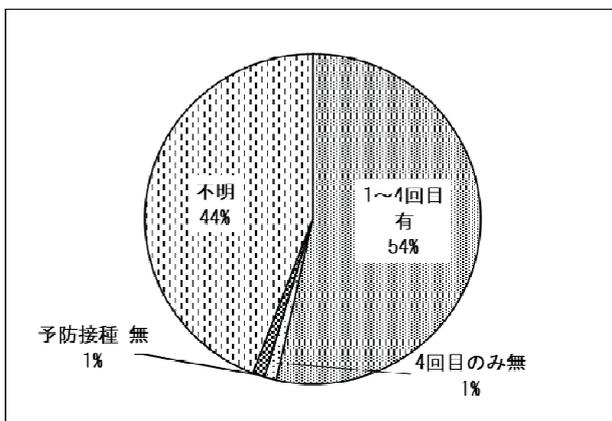


図27 百日咳 予防接種状況 (小学生)

26)。届出が多かった小学生の患者のうち、54%が遅くとも5歳までに百日咳ワクチンの接種を4回受けており(図27)、全国のサーベイランス同様、学童期における百日咳含有ワクチンの追加接種等の対策の必要性が示唆された⁴⁾。また、重症化のリスクが高い6か月未満児では9例の届出があり、4例は同胞から、2例は祖父母や父親からの感染が推定され、9例中2例が入院していた。

2.2 定点把握感染症(五類感染症)の届出状況

2.2.1 小児科・内科定点における週報告の感染症(表4)

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

i) インフルエンザ(2017/18年シーズン流行のまとめ)(図28)

2017/18年シーズン(2017/9/4~2018/9/2)、岡山県の患者報告数は、34,572人であった。これは、過去5シーズンで最も多かった。2017年第36週(9/4~9/10)にシーズン初めての患者が報告され、第48週(11/27~12/3)には定点あたり報告数1.37人となり、過去5年間と比較すると、2016/17年シーズンに次いで2番目に早い流行シーズン入りとなった。その後、流行は拡大し、2018年第3週(1/15~1/21)に定点あたり報告数42.96人となり、警報発令基準の30.00人を上回り、2017/18シーズンのピークを迎えた。第6週以降、患者数は減少し、第11週(3/12~3/18)、第12週(3/19~3/25)と2週連続して定点あたり10.00人を下回ったため、警報から注意報に切り替えた。その後、第15週(4/9~4/15)、第16週(4/16~4/22)に2週連続して1.00人を下回り、インフルエンザの流行は終息した。年間を通して全国とほぼ同様に推移した。年齢階級別では4~6歳が17.8%と最も高かった。昨シーズンと比較すると、15歳以上の各年齢層の割合が減少し、乳幼児・小学生・中学生に該当する年齢層での割合が増加した。

2017/18年シーズンに岡山県環境保健センターで検出されたインフルエンザウイルスは103株であった。その内訳は、AH1pdm09型49株(48%)が最も多く、次いでB型34株[山形系統33株・ビクトリア系統1株](33%)、AH3型20株(19%)であった。2016/17年シーズンは、2シーズンぶりにAH3型が主流となったが、今シーズンは2013/14シーズンから4シーズンぶりにAH1pdm09型が主流となった。

ii) RSウイルス感染症(図29)

RSウイルス感染症は、定点あたり累積報告数が23.70人であり、前年(31.00人)から減少した。第28週(7/9~7/15)から増加しはじめ、第37週(9/10~9/16)には定

点あたり報告数2.31人となり、昨年と同時期にピークを迎えた。年間を通して全国とほぼ同様に推移した。年齢階級別では1歳以下の割合が全体の83 %を占めた。

iii) 咽頭結膜熱 (図30)

咽頭結膜熱は、定点あたり累積報告数が12.96人であり、前年 (18.00人) から減少した。全国と比較すると、ほぼ年間を通して低いレベルで推移した。年齢階級別では6歳以下の乳幼児の割合が全体の89 %を占めた。

iv) A群溶血性レンサ球菌咽頭炎 (図31)

A群溶血性レンサ球菌咽頭炎は、定点あたり累積報告数が82.83人であり、前年 (57.63人) から増加した。全国と比較すると、ほぼ年間を通して低いレベルで推移した。年齢階級別では5歳 (15 %), 4歳 (13 %), 6歳 (12 %) の順で多く、6歳以下の乳幼児の割合が全体の59 %を占めた。

v) 感染性胃腸炎 (図32)

感染性胃腸炎は、定点あたり累積報告数が340.35人であり、前年 (315.94人) とほぼ同数であった。5月～6月及び12月にピークがあり、その他はほぼ横ばいで推移した。全国と比較すると、年間を通して若干多めに推移した。年齢階級別では6歳以下の乳幼児の割合が全体の64 %を占めた。

vi) 水痘 (図33)

水痘は、定点あたり累積報告数が 14.43人であり、前年 (13.17人) からわずかに増加したが、過去5年間と比較すると、昨年に次いで2番目に少なかった。年間を通して全国とほぼ同様に推移した。年齢階級別では6歳以下の乳幼児の割合が全体の63 %を占めた。

vi) 手足口病 (図34)

手足口病は、定点あたり累積報告数が17.48人であり、前年 (97.80人) から大きく減少した (手足口病は隔年で流行する傾向がある)。全国と同様、年間を通して低いレベルで推移した。年齢階級別では1歳以下の割合が全体の

44 %を占めた。

vii) 伝染性紅斑 (図35)

伝染性紅斑は、定点あたり累積報告数が4.76人であり、前年 (2.31人) から増加した。全国では、5月以降徐々に増加し、12月に定点あたり報告数1.00人に迫るピークを迎えたが、岡山県では年間を通して低いレベルで推移した。年齢階級別では6歳以下の乳幼児の割合が全体の74 %を占めた。

viii) 突発性発しん (図36)

突発性発しんは、定点あたり累積報告数が19.33人であり、前年 (20.02人) とほぼ同数であった。年間を通して全国とほぼ同様に推移した。年齢階級別では1歳以下の割合が全体の89 %を占めた。

ix) ヘルパンギーナ (図37)

ヘルパンギーナは、定点あたり累積報告数が15.07人であり、前年 (20.11人) から減少した。全国と比較すると、岡山県では7月から8月にかけての流行のピークがなく、年間を通して低いレベルで推移した。年齢階級別では1歳以下 (47 %), 2～3歳 (34 %), 4～5歳 (10 %) の順が多かった。

x) 流行性耳下腺炎 (図38)

流行性耳下腺炎は、定点あたり累積報告数が5.26人であり、前年 (14.54人) から大きく減少した。年間を通して全国とほぼ同様に推移した。年齢階級別では6歳以下の乳幼児の割合が全体の61 %を占めた。

2.2.2 眼科定点における週報告の感染症 (表4)

i) 急性出血性結膜炎

急性出血性結膜炎は、定点あたり累積報告数が1.33人であり、前年 (0.92人) から増加した。

ii) 流行性角結膜炎 (図39)

流行性角結膜炎は、定点あたり累積報告数が39.17人であり、前年 (35.83人) とほぼ同数であった。年齢階級別では9歳以下 (35 %), 30歳代 (23 %), 20歳代 (14 %)

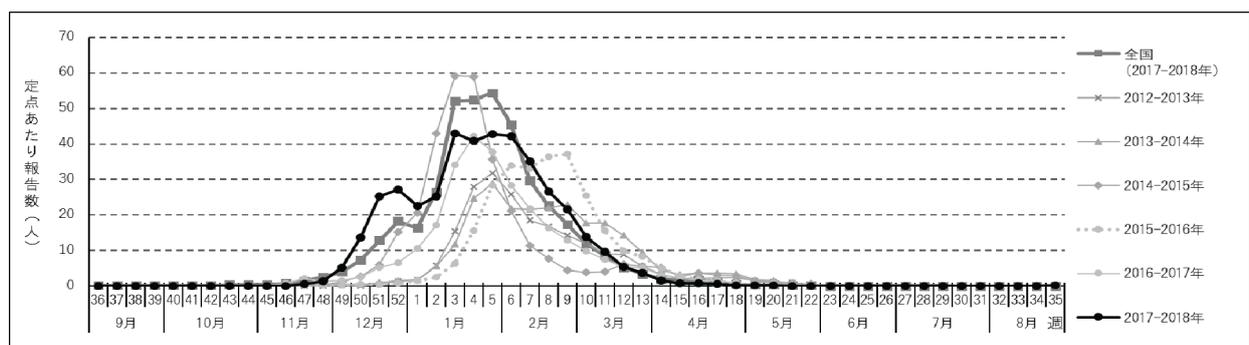


図28 インフルエンザ 発生状況

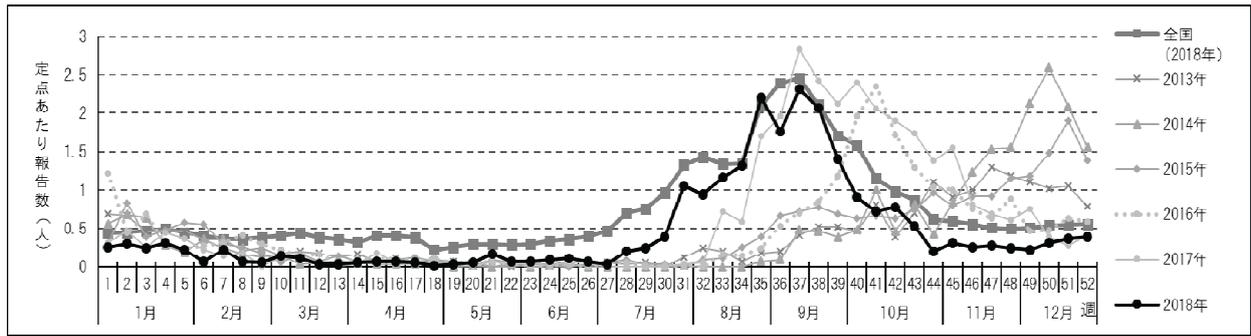


図29 RSウイルス感染症 発生状況

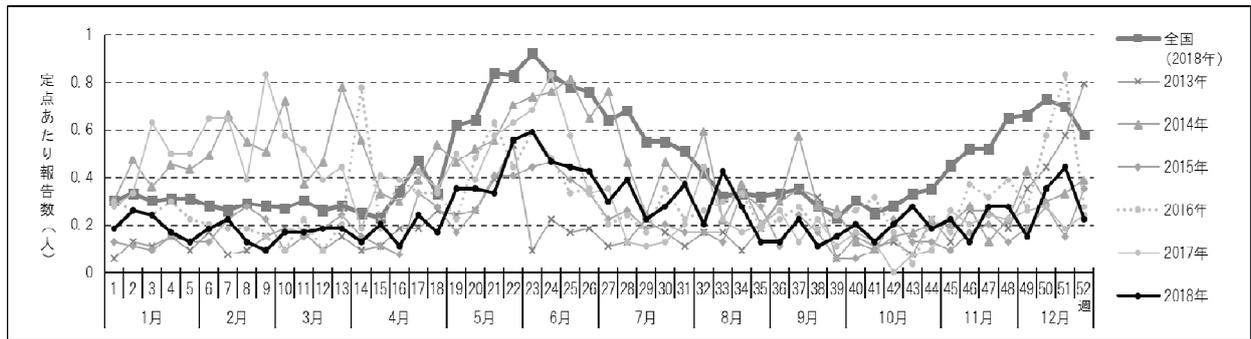


図30 咽頭結膜熱 発生状況

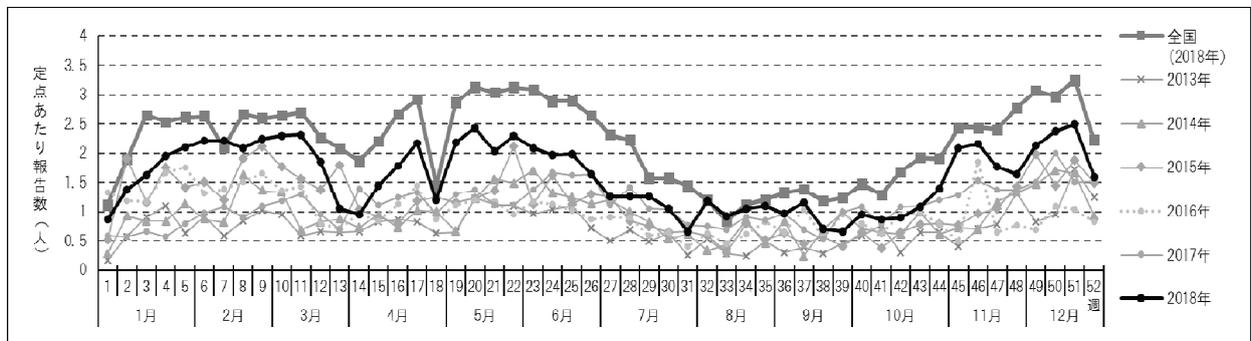


図31 A群溶血性レンサ球菌咽頭炎 発生状況

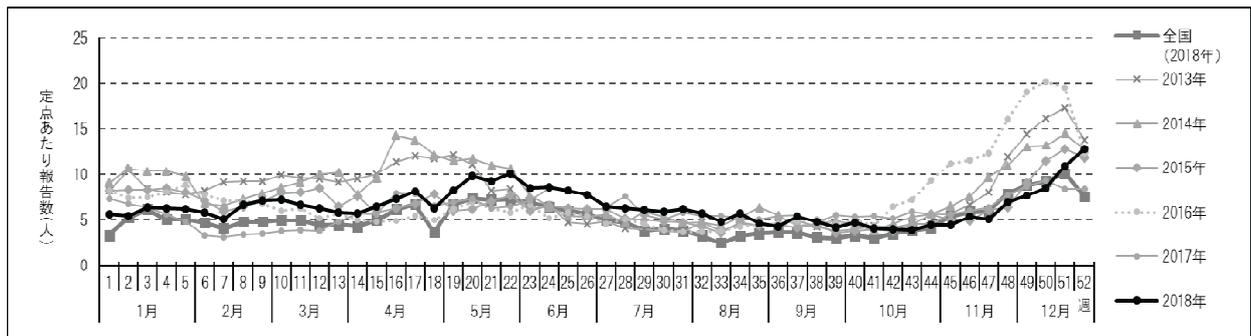


図32 感染性胃腸炎 発生状況

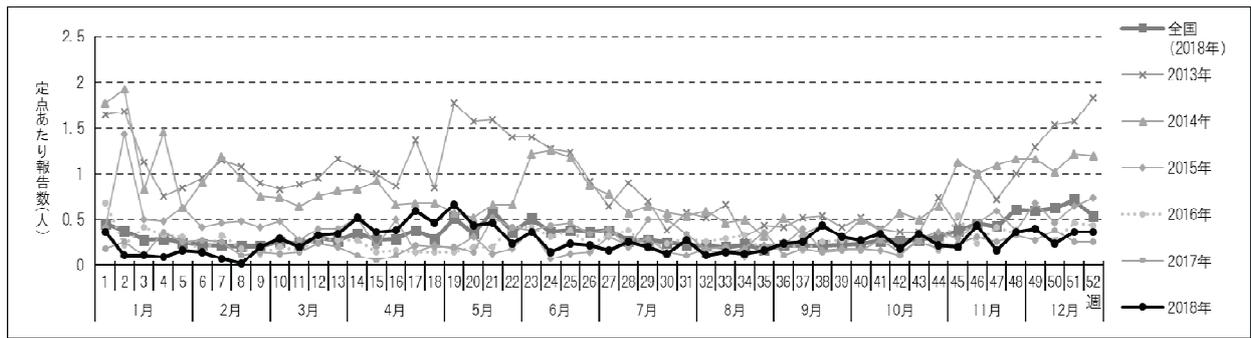


図33 水痘 発生状況

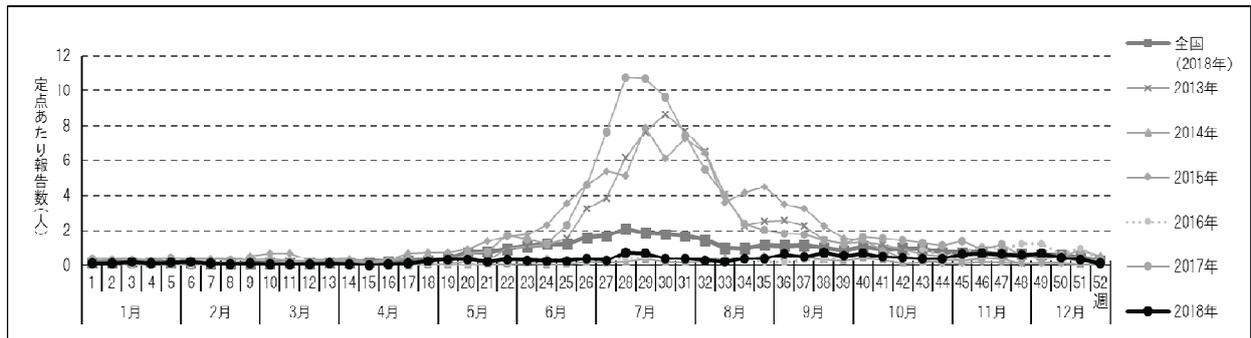


図34 手足口病 発生状況

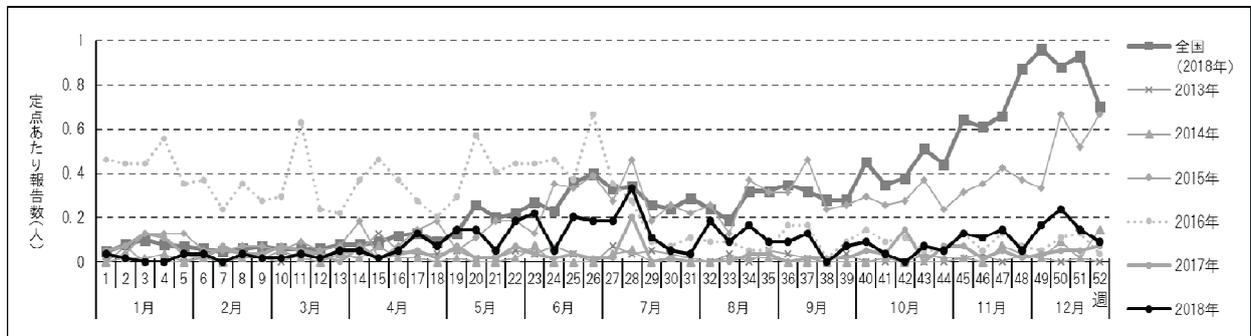


図35 伝染性紅斑 発生状況

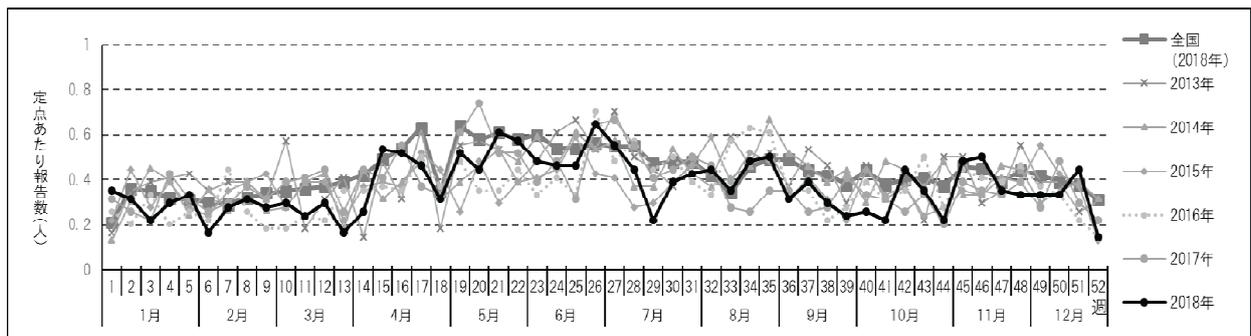


図36 突発性発疹 発生状況

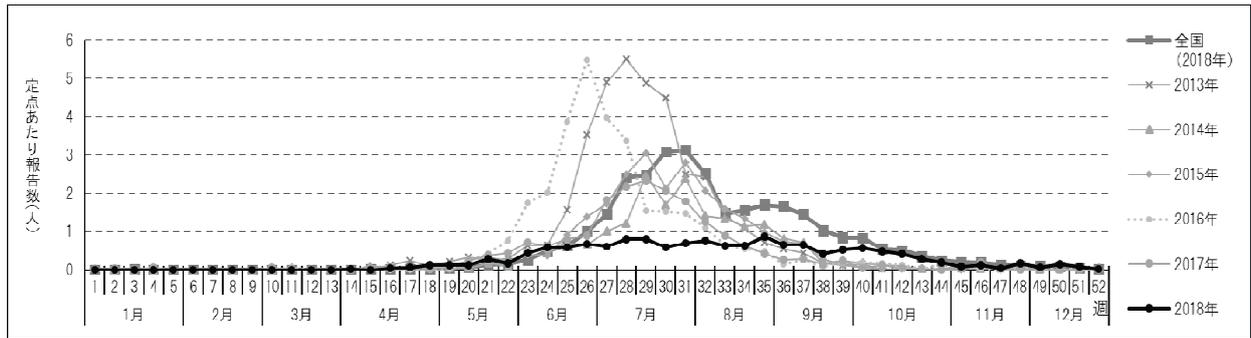


図37 ヘルパンギーナ 発生状況

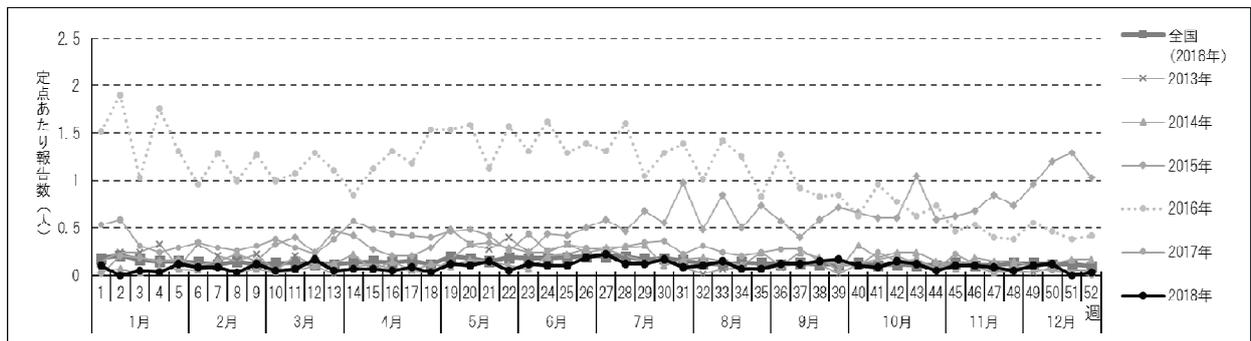


図38 流行性耳下腺炎 発生状況

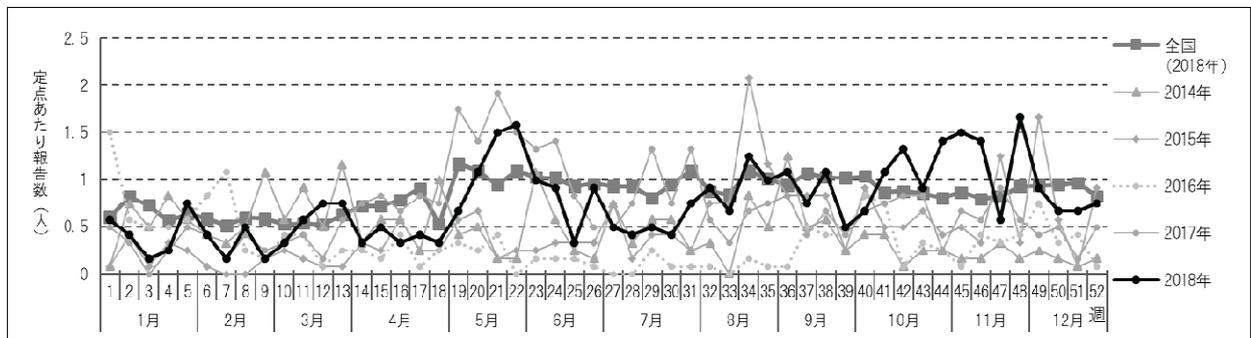


図39 流行性角結膜炎 発生状況

の順で多く、若年層の患者がより多く報告された。

2.2.3 基幹定点における週報告の感染症(表4)

i) 細菌性髄膜炎(髄膜炎肺炎球菌, インフルエンザ菌を原因として同定された場合を除く。)

細菌性髄膜炎は、定点あたり累積報告数が1.40人であり、前年(0.40人)から増加した。

ii) 無菌性髄膜炎

無菌性髄膜炎は、定点あたり累積報告数が0.80人であり、前年(0.80人)と同数であった。

iii) マイコプラズマ肺炎

マイコプラズマ肺炎は、定点あたり累積報告数が4.60人であり、前年(13.60人)から大きく減少した。

iv) クラミジア肺炎(オウム病を除く)

クラミジア肺炎(オウム病を除く)は、定点あたり累積報告数が0人であり、前年(0.20人)から減少した。

v) 感染性胃腸炎(病原体がロタウイルスであるものに限る。)

感染性胃腸炎(病原体がロタウイルスであるものに限る)は、定点あたり累積報告数が6.00人であり、前年(7.60人)から減少した。

2.2.4 性感染症定点における月報告の感染症（表5, 6）

i) 性器クラミジア感染症

性器クラミジア感染症は、定点あたり累積報告数が18.00人であり、前年（18.41人）とほぼ同数であり、昨年と同様、全国と比較して少ない報告数であった（図40）。性別では男性17％、女性83％で、女性の割合が高かった。年齢階級別では10～50歳代で報告されており、20歳代が最も多かった（図41）。

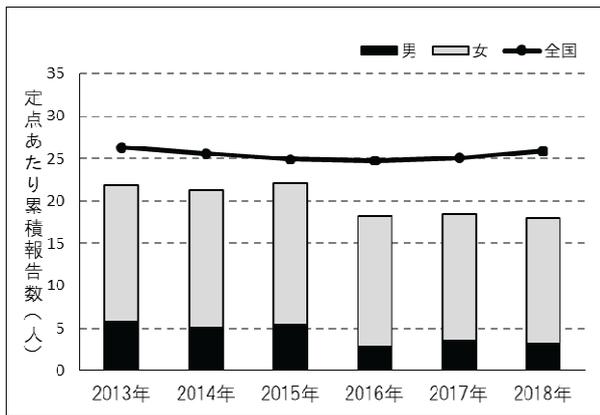


図40 性器クラミジア感染症 年次別発生状況

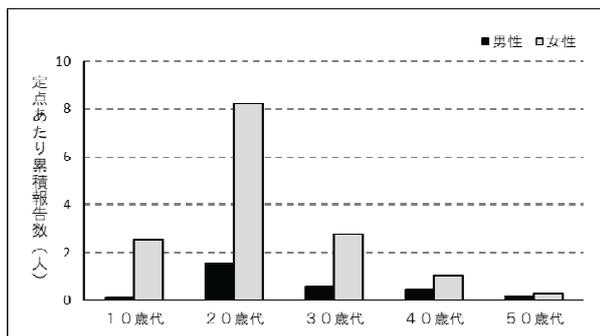


図41 性器クラミジア感染症 年齢階級別発生状況

ii) 性器ヘルペスウイルス感染症

性器ヘルペスウイルス感染症は、定点あたり累積報告数が3.71人で、前年（5.41人）から減少し、全国と比べても少ない報告数であった（図42）。性別では男性16％、

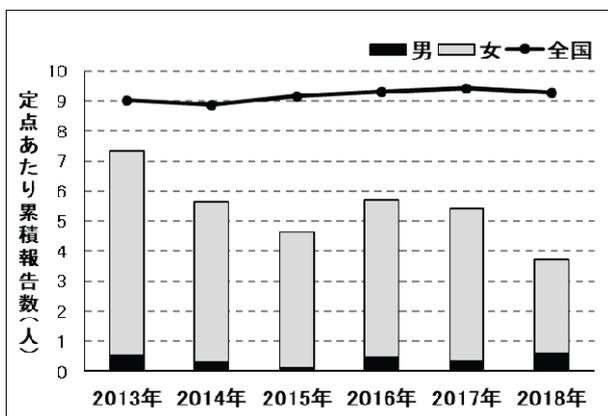


図42 性器ヘルペスウイルス感染症 年次別発生状況

女性84％で、女性の割合が高かった。年齢階級別では20歳代が最も多かった（図43）。

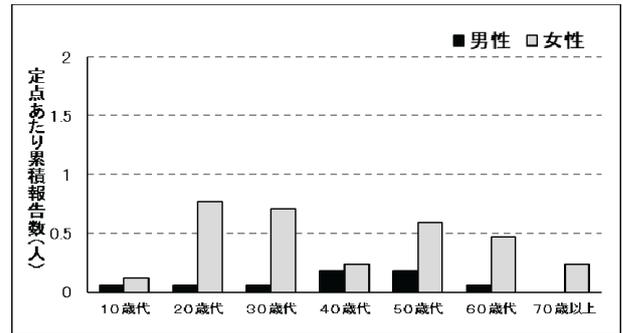


図43 性器ヘルペスウイルス感染症 年齢階級別発生状況

iii) 尖圭コンジローマ感染症

尖圭コンジローマ感染症は、定点あたり累積報告数が6.24人で、前年（5.29人）から増加した。過去5年間と比較して最も多く、全国の定点あたり累積報告数を超えた（図44）。性別では男性60％、女性40％で、男性の割合が多かった。年齢階級別では10～50歳代で多く報告されており、20歳代及び30歳代が最も多かった（図45）。

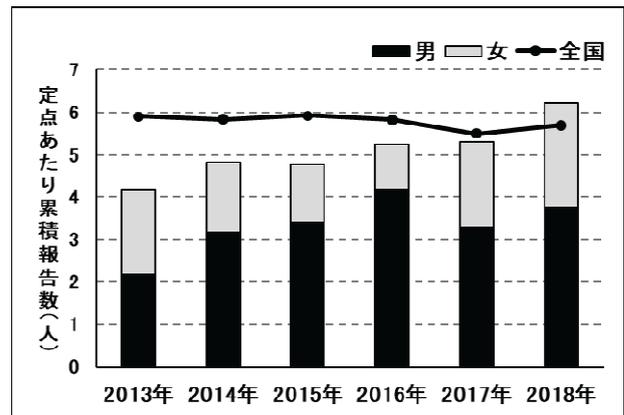


図44 尖圭コンジローマ感染症 年次別発生状況

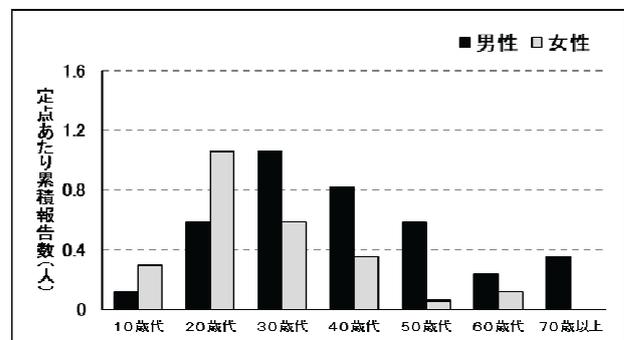


図45 尖圭コンジローマ感染症 年齢階級別発生状況

iv) 淋菌感染症

淋菌感染症は、定点あたり累積報告数が5.06人であり、

前年（4.88人）とほぼ同数であった（図46）。2014年から減少傾向にあり、全国と比べても少ない報告数であった。性別は男性43%、女性57%で、女性の報告数がやや多かった。年齢階級別では10～50歳代で多く報告されており、20歳代が最も多かった（図47）。

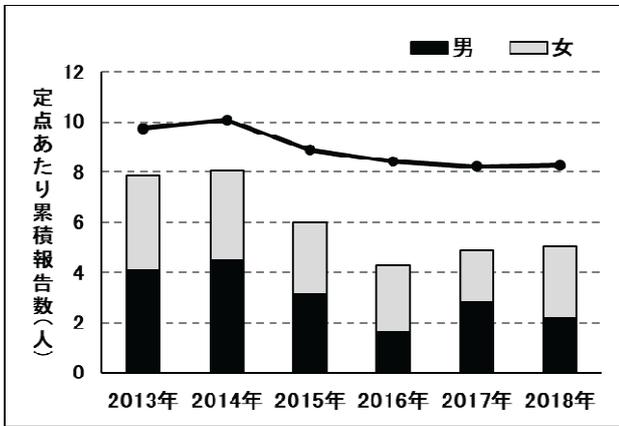


図46 淋菌感染症 年次別発生状況

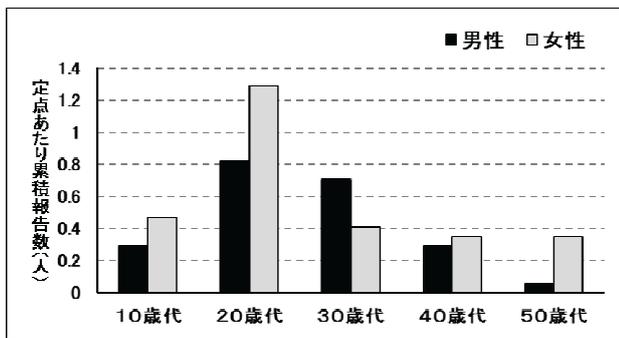


図47 淋菌感染症 年齢階級別発生状況

2.2.5 基幹定点における月報告の感染症（表5、7）

i) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症は、定点あたり累積報告数が18.40人であり、前年（15.80人）より増加した。年齢階級別では60歳以上で85%を占めていた。

ii) ペニシリン耐性肺炎球菌感染症

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

iii) 薬剤耐性緑膿菌感染症

薬剤耐性緑膿菌感染症は、定点あたり累積報告数が0.40人であり、前年（0.40人）と同数であった。年齢階級別では70歳以上で報告された。

3 まとめ

全数把握感染症のうち、結核の届出数は337例であり、2013年以降は横ばいの傾向となっている。年齢階級別で

は、60歳以上の高齢者が全体の58%を占めていた。50歳代以下では、20歳代が最も多かった。重症熱性血小板減少症候群は7月と10月に各1例ずつの届出があり、2013年に感染症法で全数把握対象疾患となってからの累計は7例となった。つつが虫病は1月と5月に各1例ずつの届出があり、2006年からの累計は18例となった。日本紅斑熱は5例の届出があり、2009年からの累計は31例となった。レジオネラ症の届出数は83例であり、例年（30例前後）の2.5倍以上の届出数となった。これらのうち3例は平成30年7月に西日本で発生した豪雨（平成30年7月豪雨）後の復旧・河川清掃作業の従事歴を有していた。梅毒の届出数は160例であり、感染症法が施行された1999年以降で最大の届出となった2017年（172例）とほぼ同程度となった。全国の梅毒患者の届出数は2010年以降増加傾向にあり、岡山県でも2014年以降年々増加し、2017年に続き、2018年も人口100万人あたりの報告数で全国3位の報告数となるなど、全国と比較しても届出数の増加が著しく、特に若年女性を中心に今後の発生動向に十分注意する必要がある。

定点把握感染症に関して、2017/18年シーズンのインフルエンザは、過去5シーズンと比較すると、患者報告数が最も多く、流行シーズン入りは2016/17年シーズンに次いで2番目に早く、終息は最も早かった。全国の流行状況とほぼ同様の推移であった。

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

文 献

- 厚生労働省：平成30年 結核登録者情報調査年報集計結果について、
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000175095_00002.html (2019.8.29アクセス)
- Kida, K., Matsuoka, Y., Shimoda, T., Matsuoka, H., Yamada, H. et al. : A Case of Cat-to-Human Transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus, Japanese Journal of Infectious Diseases, 72, 356-358, 2019
- 狩屋英明, 河合央博, 森本晃司, 仲 敦史, 中嶋 洋：感染症起因菌の疫学調査（平成28年度～平成30年度）岡山県内のレジオネラの疫学調査について、岡山県環境保健センター年報, 43, 87-91, 2018
- 国立感染症研究所：全数報告サーベイランスによる国内の百日咳報告患者の疫学（更新情報）-2018年疫

表1 感染症法に基づく届出対象感染症（2018年）

1. 全数把握感染症:全ての医師が、全ての患者発生について届出を行う感染症

<p>【 一類感染症 】 直ちに届出</p> <p>(1) エボラ出血熱 (2) クリミア・コンゴ出血熱 (3) 痘そう (4) 南米出血熱 (5) ペスト (6) マールブルグ病 (7) ラッサ熱</p>
<p>【 二類感染症 】 直ちに届出</p> <p>(1) 急性灰白髄炎 (2) 結核 (3) ジフテリア (4) 重症急性呼吸器症候群(病原体がベータコロナウイルス属 SARS コロナウイルスであるものに限る。) (5) 中東呼吸器症候群(病原体がベータコロナウイルス属 MERS コロナウイルスであるものに限る。) (6) 鳥インフルエンザ(H5N1) (7) 鳥インフルエンザ(H7N9)</p>
<p>【 三類感染症 】 直ちに届出</p> <p>(1) コレラ (2) 細菌性赤痢 (3) 腸管出血性大腸菌感染症 (4) 腸チフス (5) パラチフス</p>
<p>【 四類感染症 】 直ちに届出</p> <p>(1) E型肝炎 (2) ウエストナイル熱(ウエストナイル脳炎含む) (3) A型肝炎 (4) エキノコックス症 (5) 黄熱 (6) オウム病 (7) オムスク出血熱 (8) 回帰熱 (9) キヤサスル森林病 (10) Q熱 (11) 狂犬病 (12) コクシジオイデス症 (13) サル痘 (14) ジカウイルス感染症 (15) 重症熱性血小板減少症候群(病原体がフレボウイルス属 SFTS ウイルスであるものに限る。) (16) 腎症候性出血熱 (17) 西部ウマ脳炎 (18) ダニ媒介脳炎 (19) 炭疽 (20) チクングニア熱 (21) つつが虫病 (22) デング熱 (23) 東部ウマ脳炎 (24) 鳥インフルエンザ(H5N1及びH7N9を除く。) (25) ニパウイルス感染症 (26) 日本紅斑熱 (27) 日本脳炎 (28) ハンタウイルス肺症候群 (29) Bウイルス病 (30) 鼻疽 (31) ブルセラ症 (32) ベネズエラウマ脳炎 (33) ヘンドラウイルス感染症 (34) 発しんチフス (35) ボツリヌス症 (36) マラリア (37) 野兎病 (38) ライム病 (39) リッサウイルス感染症 (40) リフトバレー熱 (41) 類鼻疽 (42) レジオネラ症 (43) レプトスピラ症 (44) ロッキー山紅斑熱</p>
<p>【 五類感染症の一部 】 7日以内に届出 (侵襲性髄膜炎菌感染症, 風しんおよび麻しんは直ちに届出)</p> <p>(1) アメーバ赤痢 (2) ウイルス性肝炎(E型肝炎及びA型肝炎を除く) (3) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症 (4) 急性弛緩性麻痺(急性灰白髄炎を除く。) (5) 急性脳炎(ウエストナイル脳炎, 西部ウマ脳炎, ダニ媒介脳炎, 東部ウマ脳炎, 日本脳炎, ベネズエラウマ脳炎及びリフトバレー熱を除く。) (6) クリプトスポリジウム症 (7) クロイツフェルト・ヤコブ病 (8) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (9) 後天性免疫不全症候群 (10) ジアルジア症 (11) 侵襲性インフルエンザ菌感染症 (12) 侵襲性髄膜炎菌感染症 (13) 侵襲性肺炎球菌感染症 (14) 水痘(入院例に限る。) (15) 先天性風しん症候群 (16) 梅毒 (17) 播種性クリプトコックス症 (18) 破傷風 (19) バイコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症 (20) バンコマイシン耐性腸球菌感染症 (21) 百日咳 (22) 風しん (23) 麻しん (24) 薬剤耐性アシネトバクター感染症</p>
<p>【 指定感染症 】 直ちに届出</p> <p>該当なし</p>

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

①週単位報告

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

②月単位報告

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

表2 全数把握感染症 月別患者発生状況

2018年

	総数	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
一類感染症	エボラ出血熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	短腸ペリトニウム	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	マールブルグ病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
二類感染症	急性灰白髄炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	重症急性呼吸器症候群	337	28	21	31	22	27	43	21	25	30	27	30
	鳥インフルエンザ(H5N1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
三類感染症	細菌性赤痢	16	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-
	腸管出血性大腸菌感染症	70	-	1	-	3	1	14	9	15	11	7	8
	腸チフス	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
四類感染症	E型肝炎	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A型肝炎	5	-	-	-	-	-	3	1	1	-	-	-
	エボラ出血熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	オウムカサス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	回帰熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Q熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	狂犬病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	重症熱性血小板減少症候群	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-
	腎臓病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ダニ媒介脳炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	炭疽	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	チフス	2	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	東部ウマ脳炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	鳥インフルエンザ(鳥インフルエンザ(H5N1)を除く)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	日本脳炎	5	-	-	-	-	2	2	-	1	-	-	-
	日本脳炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B型肝炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	鼻疽	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	バネズエラウマ脳炎	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ヘンドリウス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ポツリヌス症	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	マールブルグ病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	野兔病	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	リッサウイルス感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	リフトバレー熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	類鼻疽	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	レジオネラ症	83	4	1	2	2	12	13	15	1	9	12	6
ロッキーマウンテン紅斑熱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
アムニオニウム赤痢	15	2	3	1	2	-	2	2	2	1	-	-	
ウイルス性肝炎(E・Aを除く)	5	-	-	-	-	-	2	2	-	-	1	-	
カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症	26	2	2	1	2	-	4	2	1	3	4	2	
急性弛緩性麻痺(急性灰白髄炎を除く)	3	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	
急性脳炎*	6	1	-	-	-	1	1	1	-	1	1	-	
クリプトスポリジウム症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
クロイツフェルト・ヤコブ病	2	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	
劇症型溶血性レンサ球菌感染症	14	4	2	2	-	-	3	-	1	1	-	1	
後天性免疫不全症候群	18	2	1	1	-	2	1	3	1	2	2	2	
ジアセミア症	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
侵襲性インフルエンザ菌感染症	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	
侵襲性髄膜炎菌感染症	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
侵襲性肺炎球菌感染症	45	6	7	3	2	7	3	3	3	1	4	2	
水痘(入院例)	3	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	
先天性風しん症候群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
梅毒	160	13	11	12	14	20	17	15	21	12	7	9	
播種性クリプトコッカス症	2	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	
破傷	2	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	
バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
バンコマイシン耐性腸球菌感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
百日咳	187	17	2	21	15	23	11	9	14	20	13	15	
風しん	29	-	-	-	-	-	-	-	-	9	6	8	
麻疹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
薬剤耐性アシネトバクター感染症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

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

表3 全数把握感染症 年齢別患者発生状況

2018年

		総数	0～9歳	10歳代	20歳代	30歳代	40歳代	50歳代	60歳代	70歳代	80歳代	90歳～
一類感染症	エボラ出血熱	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	クリミア・コンゴ出血熱	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	痘苗	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	南米出血熱	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ベトナム出血熱	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
二類感染症	マールブルグ病	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ラッサ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	急性灰白髄炎	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	結核	337	19	5	56	26	16	20	25	61	74	35
	重症急性呼吸器症候群	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
三類感染症	中東呼吸器症候群	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	鳥インフルエンザ(H5N1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	鳥インフルエンザ(H7N9)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	コレラ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	細菌性赤痢	16	—	—	—	1	—	—	6	6	2	1
四類感染症	腸管出血性大腸菌感染症	70	19	11	5	10	8	3	10	2	2	—
	腸チフス	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—
	パラボラチフス	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	E型肝炎	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—
	ウエストナイル熱	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
五類感染症	A型肝炎	5	—	—	1	2	1	—	1	—	—	—
	エキノコックス症	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	黄熱	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	オウムムスクリフス熱	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	オウムムスクリフス熱	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
六類感染症	キヤサヌル森林病	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Q熱	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	狂犬病	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	コクシジオイデス症	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	サツカウイルス感染症	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
七類感染症	重症熱性血小板減少症候群	2	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—
	腎臓病	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	西部ウマ脳炎	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ダニ媒介脳炎	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	炭疽	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
八類感染症	チクングニア熱	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	つが虫病	2	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—
	デング熱	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	東部ウマ脳炎	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	鳥インフルエンザ(鳥インフルエンザ(H5N1)を除く)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
九類感染症	ニパウイルス感染症	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	日本紅斑熱	5	—	—	—	—	—	2	1	1	1	—
	日本脳炎	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ハンタウイルス肺症候群	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B型肝炎	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
十類感染症	鼻疽	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ブルセラ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ベネズエラウマ脳炎	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ヘンドラウイルス感染症	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	発疹チフス	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
十一類感染症	ボツリヌス症	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	マラリア	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	野兔病	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ライム病	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	リッサウイルス感染症	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
十二類感染症	リフトバレー熱	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	類鼻疽	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	レジオネラ症	83	1	—	—	2	4	24	27	18	6	1
	レプトスピラ症	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ロッキーマウンテン紅斑熱	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
十三類感染症	アムニオニオバ赤痢	15	—	—	—	1	2	4	7	1	—	—
	ウイルス性肝炎(E・Aを除く)	5	—	1	2	1	1	—	—	—	—	—
	カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症	26	—	—	—	1	3	1	3	10	5	3
	急性弛緩性麻痺(急性灰白髄炎を除く。)*	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	急性脳炎*	6	3	2	—	—	—	—	1	—	—	—
十四類感染症	クリプトスポリジウム症	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	クロイツフェルト・ヤコブ病	2	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—
	劇症型溶血性レンサ球菌感染症	14	—	—	—	—	1	—	4	5	3	1
	後天性免疫不全症候群	18	—	1	5	6	4	—	2	—	—	—
	ジアルジア症	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
十五類感染症	侵襲性インフルエンザ菌感染症	2	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—
	侵襲性髄膜炎菌感染症	1	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—
	侵襲性肺炎球菌感染症	45	3	—	—	1	4	7	4	14	11	1
	水痘(入院例)	3	1	—	1	—	—	—	1	—	—	—
	先天性風しん症候群	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
十六類感染症	梅毒	160	—	13	51	39	35	18	1	1	2	—
	播種性クリプトコックス症	2	—	—	—	—	—	1	—	—	1	—
	破傷風	2	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
	バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	バンコマイシン耐性腸球菌感染症	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
十七類感染症	百日咳	187	85	64	6	7	7	10	4	2	2	—
	風しん	29	—	—	4	5	11	7	2	—	—	—
	麻疹	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	薬剤耐性アシネトバクター感染症	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

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

表4 定点把握対象感染症の発生状況

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

2018年

	インフルエンザ	RSウイルス感染症	咽頭結膜熱	A群溶血性レンサ球菌咽頭炎	感染性胃腸炎	水痘	手足口病	伝染性紅斑	突発性発しん	ヘルパンギーナ	流行性耳下腺炎	急性出血性結膜炎	流行性角結膜炎	細菌性髄膜炎	無菌性髄膜炎	マイコプラズマ肺炎	クラミジア肺炎	(ロタウイルス) 感染性胃腸炎
総数	352.01	23.70	12.96	82.83	340.35	14.43	17.48	4.76	19.33	15.07	5.26	1.33	39.17	1.40	0.80	4.60	0.00	6.00
1週	22.57	0.26	0.19	0.87	5.72	0.37	0.13	0.04	0.35	—	0.11	0.17	0.58	—	—	—	—	—
2週	25.31	0.30	0.26	1.37	5.50	0.11	0.13	0.02	0.31	0.02	—	—	0.42	—	—	0.20	—	—
3週	42.96	0.24	0.24	1.61	6.44	0.11	0.22	—	0.22	0.02	0.06	0.17	0.17	—	—	—	—	—
4週	40.87	0.31	0.17	1.94	6.35	0.09	0.09	—	0.30	—	0.04	—	0.25	0.20	—	0.40	—	—
5週	42.71	0.22	0.13	2.09	6.22	0.17	0.15	0.04	0.33	—	0.13	—	0.75	—	—	—	—	—
6週	42.31	0.07	0.19	2.20	5.85	0.15	0.20	0.04	0.17	—	0.09	—	0.42	—	—	—	—	0.20
7週	35.05	0.22	0.22	2.20	5.09	0.07	0.09	—	0.28	—	0.09	—	0.17	—	—	—	—	0.40
8週	26.55	0.07	0.13	2.07	6.72	0.02	0.06	0.04	0.31	—	0.04	0.08	0.50	—	—	—	—	0.20
9週	21.60	0.06	0.09	2.24	7.15	0.20	0.13	0.02	0.28	—	0.13	—	0.17	0.20	—	—	—	0.20
10週	13.87	0.15	0.17	2.30	7.22	0.30	0.07	0.02	0.30	0.02	0.06	—	0.33	—	—	—	—	0.20
11週	9.69	0.11	0.17	2.31	6.69	0.20	0.04	0.04	0.24	0.02	0.07	0.08	0.58	—	—	0.20	—	0.60
12週	5.54	0.04	0.19	1.85	6.28	0.33	0.04	0.02	0.30	0.02	0.17	0.08	0.75	—	—	—	—	1.00
13週	3.63	0.04	0.19	1.06	5.83	0.35	0.11	0.06	0.17	0.02	0.06	0.08	0.75	—	—	0.20	—	—
14週	1.56	0.06	0.13	0.94	5.81	0.52	0.07	0.06	0.26	0.04	0.07	—	0.33	—	—	—	—	0.20
15週	0.80	0.07	0.20	1.44	6.46	0.37	0.02	0.02	0.54	—	0.07	—	0.50	—	—	—	—	0.40
16週	0.79	0.07	0.11	1.78	7.31	0.39	0.04	0.06	0.52	0.06	0.06	0.25	0.33	—	—	—	—	0.40
17週	0.57	0.06	0.24	2.17	8.19	0.59	0.09	0.13	0.46	0.07	0.09	—	0.42	—	—	—	—	0.20
18週	0.18	0.02	0.17	1.20	6.31	0.46	0.28	0.07	0.31	0.15	0.04	—	0.33	—	—	—	—	0.80
19週	0.32	0.04	0.35	2.19	8.28	0.67	0.35	0.15	0.52	0.15	0.13	—	0.67	—	0.20	—	—	0.20
20週	0.19	0.06	0.35	2.43	9.87	0.44	0.35	0.15	0.44	0.13	0.11	—	1.08	—	—	—	—	—
21週	0.05	0.17	0.33	2.02	9.24	0.46	0.22	0.06	0.61	0.30	0.15	0.17	1.50	0.20	—	—	—	0.20
22週	0.11	0.07	0.56	2.30	10.11	0.24	0.35	0.19	0.57	0.19	0.06	0.08	1.58	—	—	0.20	—	0.40
23週	—	0.07	0.59	2.07	8.50	0.37	0.31	0.22	0.48	0.44	0.13	—	1.00	—	—	—	—	—
24週	0.01	0.09	0.46	1.96	8.59	0.15	0.26	0.06	0.46	0.59	0.11	—	0.92	—	—	0.20	—	—
25週	0.11	0.11	0.44	1.98	8.28	0.24	0.26	0.20	0.46	0.59	0.11	—	0.33	—	—	—	—	—
26週	0.02	0.07	0.43	1.63	7.80	0.22	0.41	0.19	0.65	0.69	0.19	—	0.92	—	—	—	—	—
27週	—	0.04	0.30	1.26	6.48	0.17	0.31	0.19	0.56	0.61	0.22	—	0.50	—	—	—	—	—
28週	—	0.20	0.39	1.26	6.35	0.26	0.74	0.33	0.44	0.81	0.13	0.08	0.42	—	—	0.20	—	—
29週	—	0.24	0.22	1.26	6.11	0.20	0.70	0.11	0.22	0.81	0.13	—	0.50	—	—	0.20	—	—
30週	—	0.39	0.28	1.06	5.96	0.13	0.43	0.06	0.39	0.59	0.17	—	0.42	—	—	—	—	—
31週	—	1.06	0.37	0.67	6.26	0.28	0.41	0.04	0.43	0.70	0.09	—	0.75	—	—	0.20	—	—
32週	—	0.94	0.20	1.19	5.81	0.11	0.30	0.19	0.44	0.78	0.11	—	0.92	—	—	—	—	—
33週	—	1.17	0.43	0.93	4.81	0.15	0.20	0.09	0.35	0.63	0.15	—	0.67	—	—	0.20	—	—
34週	—	1.31	0.28	1.06	5.81	0.13	0.41	0.17	0.48	0.63	0.07	—	1.25	—	—	—	—	0.20
35週	0.20	2.20	0.13	1.09	4.70	0.17	0.41	0.09	0.50	0.87	0.07	—	1.00	0.20	—	0.20	—	0.20
36週	0.15	1.76	0.13	0.96	4.33	0.24	0.65	0.09	0.31	0.67	0.13	—	1.08	0.20	—	—	—	—
37週	0.07	2.31	0.22	1.15	5.44	0.26	0.50	0.13	0.39	0.67	0.13	—	0.75	—	—	—	—	—
38週	0.07	2.07	0.11	0.70	4.89	0.44	0.76	—	0.30	0.43	0.15	—	1.08	—	—	—	—	—
39週	0.04	1.41	0.15	0.67	4.22	0.31	0.54	0.07	0.24	0.54	0.17	—	0.50	—	—	0.20	—	—
40週	0.01	0.91	0.20	0.94	4.76	0.28	0.70	0.09	0.26	0.57	0.11	—	0.67	0.20	—	0.20	—	—
41週	0.05	0.72	0.13	0.87	4.13	0.35	0.50	0.04	0.22	0.48	0.09	—	1.08	—	—	0.20	—	—
42週	0.17	0.78	0.20	0.89	4.02	0.19	0.46	—	0.44	0.43	0.15	—	1.33	—	—	0.20	—	—
43週	0.15	0.54	0.28	1.07	3.94	0.35	0.41	0.07	0.35	0.30	0.13	—	0.92	0.20	0.20	—	—	—
44週	0.17	0.20	0.19	1.39	4.44	0.22	0.39	0.06	0.22	0.20	0.06	—	1.42	—	—	—	—	—
45週	0.30	0.31	0.22	2.07	4.46	0.20	0.65	0.13	0.48	0.09	0.11	—	1.50	—	—	0.20	—	—
46週	0.23	0.26	0.13	2.15	5.44	0.44	0.72	0.11	0.50	0.15	0.11	—	1.42	—	—	—	—	—
47週	0.39	0.28	0.28	1.76	5.17	0.17	0.63	0.15	0.35	0.06	0.09	—	0.58	—	—	—	—	—
48週	0.71	0.24	0.28	1.63	6.98	0.37	0.61	0.06	0.33	0.19	0.06	—	1.67	—	0.20	—	—	—
49週	1.17	0.22	0.15	2.13	7.69	0.41	0.69	0.17	0.33	0.07	0.11	0.08	0.92	—	—	0.20	—	—
50週	1.50	0.31	0.35	2.37	8.56	0.24	0.44	0.24	0.33	0.17	0.13	—	0.67	—	—	0.60	—	—
51週	3.48	0.37	0.44	2.48	10.91	0.37	0.35	0.15	0.44	0.09	—	—	0.67	—	0.20	0.40	—	—
52週	5.80	0.39	0.22	1.59	12.81	0.37	0.09	0.09	0.15	0.04	0.04	—	0.75	—	—	—	—	—

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

2018年

疾患名		総計	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	
性 感 染 症 定 点	性器クラミジア 感染症	計	18.00	1.47	1.59	0.88	1.41	1.29	1.71	1.59	1.53	1.24	1.53	1.88	1.88
		男	3.12	0.06	0.29	0.18	0.29	0.24	0.18	0.18	0.53	0.12	0.24	0.35	0.47
		女	14.88	1.41	1.29	0.71	1.12	1.06	1.53	1.41	1.00	1.12	1.29	1.53	1.41
	性器ヘルペス ウイルス感染症	計	3.71	0.29	0.29	0.47	0.41	0.41	0.18	0.24	0.24	0.47	0.29	0.24	0.18
		男	0.59	—	—	0.06	—	0.06	0.12	0.12	0.12	0.06	—	—	0.06
		女	3.12	0.29	0.29	0.41	0.41	0.35	0.06	0.12	0.12	0.41	0.29	0.24	0.12
	尖圭 コンジローマ	計	6.24	0.59	0.41	0.76	0.65	0.29	0.65	0.65	0.47	0.41	0.47	0.29	0.59
		男	3.76	0.29	0.29	0.47	0.41	0.18	0.41	0.35	0.24	0.24	0.35	0.24	0.29
		女	2.47	0.29	0.12	0.29	0.24	0.12	0.24	0.29	0.24	0.18	0.12	0.06	0.29
	淋菌感染症	計	5.06	0.35	0.35	0.18	0.24	0.41	0.35	0.18	1.00	0.41	0.47	0.65	0.47
		男	2.18	0.29	0.18	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.41	0.12	0.06	0.35	0.18
		女	2.88	0.06	0.18	0.06	0.12	0.29	0.24	0.06	0.59	0.29	0.41	0.29	0.29
基 幹 定 点	メチシリン耐性 黄色ブドウ球菌 感染症	計	18.40	1.00	0.60	2.20	1.80	0.80	1.60	2.60	1.40	1.00	2.20	1.40	1.80
		男	12.20	0.80	—	1.60	1.60	0.40	1.20	1.60	0.60	0.80	1.20	1.20	1.20
		女	6.20	0.20	0.60	0.60	0.20	0.40	0.40	1.00	0.80	0.20	1.00	0.20	0.60
	ペニシリン耐性 肺炎球菌感染症	計	0.20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.20
		男	0.20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.20
		女	0.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	薬剤耐性 緑膿菌感染症	計	0.40	—	—	—	0.20	—	—	—	—	—	—	—	0.20
		男	0.40	—	—	—	0.20	—	—	—	—	—	—	—	0.20
		女	0.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

学週第1週～52週-

表6 月報告 定点把握感染症（性感染症定点）年齢階級別患者報告数

2018年

疾患名		0歳	1歳～	5歳～	10歳～	15歳～	20歳～	25歳～	30歳～	35歳～	40歳～	45歳～	50歳～	55歳～	60歳～	65歳～	70歳～	総計
性器クラミジア 感染症	計	—	—	—	—	45	101	66	39	18	20	5	5	3	4	—	—	306
	男	—	—	—	—	2	15	12	5	5	6	2	2	1	3	—	—	53
	女	—	—	—	—	43	86	54	34	13	14	3	3	2	1	—	—	253
性器ヘルペス ウイルス感染症	計	—	—	—	—	3	10	4	9	4	6	1	8	5	2	7	4	63
	男	—	—	—	—	1	—	1	—	1	3	—	2	1	1	—	—	10
	女	—	—	—	—	2	10	3	9	3	3	1	6	4	1	7	4	53
尖圭コンジローマ	計	—	—	—	1	6	13	15	23	5	11	9	10	1	3	3	6	106
	男	—	—	—	—	2	7	3	14	4	5	9	9	1	2	2	6	64
	女	—	—	—	1	4	6	12	9	1	6	—	1	—	1	1	—	42
淋菌感染症	計	—	—	—	—	13	22	14	13	6	7	4	2	5	—	—	—	86
	男	—	—	—	—	5	9	5	9	3	3	2	—	1	—	—	—	37
	女	—	—	—	—	8	13	9	4	3	4	2	2	4	—	—	—	49

表7 月報告 定点把握感染症（基幹定点）年齢階級別患者報告数

2018年

疾患名		0歳	1歳～	5歳～	10歳～	15歳～	20歳～	25歳～	30歳～	35歳～	40歳～	45歳～	50歳～	55歳～	60歳～	65歳～	70歳～	総計
メチシリン耐性 黄色ブドウ球菌感染症		2	—	—	—	—	1	—	—	1	4	4	1	1	4	11	63	92
ペニシリン耐性 肺炎球菌感染症		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
薬剤耐性緑膿菌感染症		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/id/1630-disease-based/ha/pertussis/idsc/idwr-sokuhou/8696-pertussis-190327.html> (2019.8.9アクセス)

他誌発表論文抄録

血清抗体価測定による *Yersinia pseudotuberculosis* 感染症の発生状況調査 (1999年～2016年)

中嶋 洋, 狩屋英明, 岸本壽男

感染症学雑誌, 92(3), 353-357, 2018

Yersinia pseudotuberculosis 感染症の発生状況を把握するため, 主に小児科患者等654名(1,308検体)の血清について, *Y. pseudotuberculosis* 血清群1～6の各菌体抗原に対する抗体価を測定した。その結果, 98名(15.0%)が1種類の血清群に対して抗体陽性($\geq 1:160$)となり, このうち血清群5が42名(42.9%)で最も多かった。*Y. pseudotuberculosis* が便や血液から分離された事例においては, 16名中13名(81.3%)が, また, 環境のみから本

菌が分離された3事例の患者6名中5名(83.3%)が抗体陽性となり, 陽性を示した抗体の血清群は各事例の分離菌の血清群と一致した。抗体陽性者は, 川崎病症状を呈した患者グループ(10.9%)に比べ, *Y. pseudotuberculosis* 感染疑いの患者等のグループ(18.5%)に多く($p < 0.01$), 抗体陰性の者に比べて下痢, 結節性紅斑, 腹痛, 腎不全の症状や, 家族内発症及び山水・井戸水などの使用の割合が有意に高かった($p < 0.025 \sim p < 0.005$)。

Legionella pneumophila and Other *Legionella* Species Isolated from Legionellosis Patients in Japan between 2008 and 2016.

Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Kyoko Chida, Hitomi Ohya, Jun-ichi Kanatani, Junko Isobe, Shinobu Tanaka, Hiroshi Nakajima, Takahiro Hiratsuka, Shuji Yoshino, Miho Sakata, Miyo Murai, Makoto Ohnishi,
Working Group for *Legionella* in Japan.

Applied Environmental Microbiology, 84(18), 2018

The *Legionella* Reference Center in Japan collected 427 *Legionella* clinical isolates between 2008 and 2016, including 7 representative isolates from corresponding outbreaks. The collection included 419 *Legionella pneumophila* isolates, of which 372 belonged to serogroup 1 (SG1) (87%) and the others belonged to SG2 to SG15 except for SG7 and SG11, and 8 isolates of other *Legionella* species (*Legionella bozeman*, *Legionella dumoffii*, *Legionella feeleii*, *Legionella longbeachae*, *Legionella londiniensis*, and *Legionella rubrilucens*). *L. pneumophila* isolates were genotyped by sequence-based typing (SBT) and represented 187 sequence types (STs), of which 126 occurred in a single isolate (index of discrimination of 0.984). These STs were analyzed using minimum spanning tree analysis, resulting in the formation of 18 groups. The pattern of overall ST

distribution among *L. pneumophila* isolates was diverse. In particular, some STs were frequently isolated and were suggested to be related to the infection sources. The major STs were ST23 (35 isolates), ST120 (20 isolates), and ST138 (16 isolates). ST23 was the most prevalent and most causative ST for outbreaks in Japan and Europe. ST138 has been observed only in Japan, where it has caused small-scale outbreaks; 81% of those strains (13 isolates) were suspected or confirmed to infect humans through bath water sources. On the other hand, 11 ST23 strains (31%) and 5 ST120 strains (25%) were suspected or confirmed to infect humans through bath water. These findings suggest that some ST strains frequently cause legionellosis in Japan and are found under different environmental conditions.

2017年に岡山県内の近接地域で連続して発生した関連性不明の2件のコレラ事例

狩屋英明, 岸本壽男

公衆衛生情報, 48(6), 13-15, 2018

集団食中毒事例で分離された腸管出血性大腸菌O157：H7（VT1&2）について －岡山県

仲 敦史, 河合央博, 中嶋 洋, 狩屋英明

病原微生物検出情報, 39, 177-178, 2018

平成28年度ポリオ環境水サーベイランス（感染症流行予測調査事業および
調査研究）にて検出されたエンテロウイルスについて

吉田 弘, 磯田美穂子 他

病原微生物検出情報, 39, 67-69, 2018

Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018

Emi Takashita, Chiharu Kawakami, Hiroko Morita, Rie Ogawa, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, and on behalf of the Influenza Virus Surveillance Group of Japan

Eurosurveillance, 24(3), pii=1800698, 2019

The novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil was approved for the treatment of influenza virus infection in Japan in February 2018. Two influenza A(H3N2) viruses carrying an I38T substitution in the polymerase acidic subunit (PA) were detected

in baloxavir-treated children in December 2018. This mutation is known to confer reduced susceptibility to baloxavir, and the two mutant viruses exhibited 76- and 120-fold reduced susceptibility to baloxavir.

痂皮生検除去後に形成された血痂から病原体DNAが検出された 日本紅斑熱の1例

大道俊介, 川上万里, 高島真理, 原田亮一, 藤岡真一, 池田房雄, 木田浩司,
松岡保博, 岸本寿男, 藤田博己

感染症学雑誌, 93(1), 21-24, 2019

報告書等

3-クロロ-2-プロペン-1-オールの分析法

山本浩司, 浦山豊弘

環境省環境安全課：平成29年度化学物質分析法開発調査報告書, 148-172, 2018

人形峠周辺の環境放射線等測定報告（平成30年度）

信森達也，加藤大貴，蜂谷博郎，小川 登，藤岡敏修，岸本壽男

岡山県：人形峠周辺の環境放射線等測定報告書（第41号）

中四国ブロックにおける食品由来感染症の病原体の解析手法及び共有化システムの構築のための研究（平成30年度）

狩屋英明，河合央博，森本晃司，仲 敦史，中嶋 洋 他

（厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

食品由来感染症の病原体の解析手法及び共有化システムの構築のための研究

平成30年度 総括・研究分担報告書, 81-111, 2019

食品由来感染症の広域事例が発生した場合、各地域の事例間の関連性を明らかにするためには、各事例由来株の分子疫学解析結果等を共有し、病原体分離株の比較・解析を行うことが有用となる。また、得られた病原体情報をデータベース化することも重要となる。その際、地方衛生研究所（地衛研）が実施した分子疫学解析結果を用いて解析等を行うため、各施設(地衛研)における分子疫学解析手法の技術維持や迅速な解析能力とともに解析精度の向上による精度管理体制の強化が不可欠かつ重要となる。そこで、中四国ブロック内の施設を対象に、腸管出血性大腸菌（EHEC）O157菌株を用いたIS-printing System，パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE法）及びmultiple-locus variable-number tandem-repeat analysis（MLVA法）による精度管理を実施した。その結果、ほとんどの施設で良好な結果が得られたが、一部の施設では結果判定に影響する技術の習熟・工夫が必要と思われた。また、MLVA法では、各施設での病原体情報の共有のためには、結果報告基準の詳細なルール化・

明瞭化が重要と思われた。MLVA法を導入している地衛研は少数であるが、中四国ブロックにおける検査精度管理体制の強化には、全国的な普及が予想されるMLVA法を今後導入する施設に対しての、MLVA導入に係る技術的支援や、導入後の継続的な精度管理の実施が必要と考えられた。

平成30年度に中四国ブロックで発生したEHECによる感染事例について、分子疫学解析結果や疫学情報を収集し、厚生労働省健康局結核感染症課及び厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課から平成30年6月29日に発出された事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」に基づいた食品保健総合情報処理システム（NESFD）の全国のMLVA情報も参考としながら比較調査した結果、同一のMLVA型や同一のISコードのEHEC菌株による感染事例が複数の自治体で確認されたが、関東で発生した大規模集団発生を除いて、中四国ブロック内では同一汚染源による広域的な腸管出血性大腸菌食中毒は認められなかった。

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究（平成30年度） （分担課題）地研ネットワークを利用した食品およびヒトから分離される サルモネラ、大腸菌、カンピロバクター等の薬剤耐性の動向調査

四宮博人, 狩屋英明, 森本晃司, 仲 敦史 他

（厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業）

平成30年度 分担研究報告書, 10-31, 2019

薬剤耐性菌を制御するためには、環境—動物—食品—ヒトを包括するワンヘルス・アプローチが重要である。前回の本研究班の調査で、多くの地方衛生研究所（以下、地研）が、食品由来菌の薬剤耐性菌検査を実施していることが明らかにされた。地研ネットワークの協力により、ヒト及び食品由来サルモネラ株、大腸菌株、カンピロバクター株について薬剤耐性状況を調査した。今期（2018年）分離株と合わせ、サルモネラに関しては、2015～2018年に分離されたヒト由来1425株中の574株（40.3%）、及び食品由来433株中の388株（89.6%）株が、18剤中の1剤以上に耐性を示した。年次毎の耐性率はほぼ同様であり、現在の日本の状況を反映していると考えられる。多剤耐性状況については、ヒト及び食品由来株ともに3剤耐性が多く、6から10剤に耐性を示す高度耐性株も、ヒト由来株中に25株、食品由来株中に36株認められた。2015～2018年分離のサルモネラ株について血清型別の詳細な解析を行ったところ、食品由来株では血清型別の耐性傾向に共通する部分が多いがそれぞれに特徴的な点も認められ、ヒト由来株においては血清型別に特徴的な耐性傾向が認められた。また、ヒト由来株のうち食品からも分離された血清型、*S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. Manhattan*株ではヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に

強い類似性があり、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された。一方、大腸菌については、2015～2018年分離のヒト由来1034株中の375株（36.3%）、及び食品由来32株中の18株（56.3%）が1剤以上に耐性を示した。腸管出血性大腸菌（EHEC）以外の下痢原性大腸菌株の耐性率がEHEC株よりも2倍以上高かったが、多剤耐性状況は両者で類似していた。その他の大腸菌株（非病原性大腸菌を含む）は6剤以上の多剤耐性株が多く、下痢原性大腸菌株よりも高度の多剤耐性傾向を示した。カンピロバクター株については、全国の地研で共通のプロトコル及び判定表を新規に作成し、統一した方法で感受性検査と判定を行った。*C. jejuni*株ではヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に強い類似性があり、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された。食品由来菌の薬剤耐性調査に関して、統一された方法による組織だった全国規模の調査は、本研究班で実施されている。これらのデータは、我が国の「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書」及びWHOのGLASSに提供されている。また、JANISやJVARMなど既存の薬剤耐性データベースと統合し一元化することも本研究班で可能となり、ワンヘルス・アプローチに基づく感染制御に繋がることが期待される。

地方衛生研究所が担うHIV検査の現状評価と課題の解決

貞升健志, 長島真美, 松岡保博 他

(厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策政策研究事業)

HIV検査受検勧奨に関する研究

平成30年度 総括・分担研究報告書, 161-171, 2019

2018年に全国32の地方衛生研究所（地研）等を対象にHIV検査に関する研修会を実施した。研修会では地研でHIV検査を行う理由、HIV検査試薬、HIV検査マニュアル改訂のポイント、HIV/AIDSの発生状況、抗体確認検査（WB法）、核酸増幅検査等についての講義を行った。また、スライドでHIV検査に関する問題を提示し、グループ（6名程度）で考える形式の演習を行った。後日、研修会参加施設に対し、HIV精度管理試料4サンプル（血漿各1mL）をジュラルミンケース包装のゆうパックにて送付

し、各地研で実施した結果をメールにて受け取り、集計した。HIV精度管理調査の結果、各サンプルの正答率は93.3-100.0%であり、本研究班で実施した第1回精度管理調査結果よりも高い正答率であった。事前に講義を行ったことで検査に関して理解が深まり、精度管理の正答率の上昇に寄与したことが推察された。改めて、各キットの添付書のみ任せではなく、定期的な研修等を通じたHIV専門知識の教育と精度管理調査の重要性が示唆された。

学会発表

題 名	発表者	学会名
LC/MSによる化学物質分析法の基礎的研究 (73) (1) 水質試料中の3-クロロ-2-プロペン酸の分析	浦山豊弘	第27回環境化学討論会
下水におけるノロウイルスサーベイランス手法の確立	木田浩司, 野宮加代子, 松岡保博, 濱野雅子	第59回日本臨床ウイルス学会
岡山県におけるTarumizu tick virusの侵淫状況調査	木田浩司, 谷川徳行, 松岡保博, 野宮加代子, 梶原香代子, 濱野雅子, 岸本壽男	第26回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー
市販国産食肉のサルモネラ汚染状況及び分離菌の保存菌株との性状比較	狩屋英明	平成30年度岡山県獣医三学会
流行性角結膜炎患者からのヒトアデノウイルス検出法の検討	松岡保博, 木田浩司, 野宮加代子, 橋本清美, 望月 靖	平成30年度岡山県獣医三学会
市販国産食肉のサルモネラ汚染状況及び分離菌の保存菌株との性状比較	狩屋英明	平成30年度獣医学術中国地区学会
流行性角結膜炎患者からのヒトアデノウイルス検出法の検討	松岡保博, 木田浩司, 野宮加代子, 橋本清美, 望月 靖	平成30年度獣医学術中国地区学会
児島湖の底層溶存酸素量及び透明度の状況について	小川知也	平成30年度全国環境衛生職員団体協議会事例研究発表会
平成29年度における岡山県の微小粒子状物質 (PM2.5) 成分分析結果について	山田克明, 間野遼太, 西村佳恵, 赤木正章, 野村茂, 小川登	第45回環境保全・公害防止研究発表会
河川等の白濁事象の原因調査について	浦山豊弘, 吉岡敏行, 藤田和男, 山本浩司	第45回環境保全・公害防止研究発表会
日本紅斑熱リケッチアの薬剤併用に対する感受性	木田浩司, 野宮加代子, 松岡保博, 橋本清美, 濱野雅子, 望月靖, 岸本壽男	第11回日本リケッチア症臨床研究会・第25回リケッチア研究会合同研究発表会
野生動物から検出される <i>Escherichia albertii</i>	仲 敦史, 狩屋英明	第25回岡山県保健福祉学会
VP7遺伝子の解析によるロタウイルスAの正確な流行状況の把握及びG遺伝子型別手法についての一考察	野宮加代子, 松岡保博, 濱野雅子, 橋本清美, 木田浩司	第25回岡山県保健福祉学会
岡山県における魚介類中のPCBの汚染実態調査について	難波順子, 林 隆義	第25回岡山県保健福祉学会
3-クロロ-2-プロペン-1-オール(水質)の分析	山本浩司	平成30年度化学物質環境実態調査環境科学セミナー
農薬の流出による魚へい死事例について	山本浩司, 吉岡敏行	第53回日本水環境学会年会併設全国環境研協議会研究集会

岡山県環境保健センター年報 第43号

(平成30年度)

令和2年3月1日発行

編集・発行 岡山県環境保健センター
〒701-0298 岡山県岡山市南区内尾739-1

TEL 総務課	086-298-2681	企画情報室	086-298-2682
大気科	086-298-2683	水質科	086-298-2684
放射能科	086-298-2685	細菌科	086-298-2686
ウイルス科	086-298-2687	衛生化学科	086-298-2688

FAX 086-298-2088

ホームページ <https://www.pref.okayama.jp/soshiki/185/>
