

秋田県健康環境センター年報

第 9 号

平成 25 年度

ANNUAL REPORT

OF

AKITA RESEARCH CENTER FOR PUBLIC HEALTH AND ENVIRONMENT

No. 9 2013

秋田県健康環境センター

はじめに

秋田県健康環境センターは、平成18年度に旧衛生科学研究所と旧環境センターが統合して設立され、現在9年目を迎えています。平成22年度には、保健所でも行われていた試験検査業務が当センターに移管され、本県の保健・環境に関する試験検査体制が一元化されました。

現在当センターの運営は、今後の方向性を定めた「中長期計画」に沿って進めていますが、その基本方針は、「健康被害の防止」と「環境の保全」という観点から、調査研究のテーマや、主要な試験検査業務の推進分野を決定するとともに、情報収集・解析・発信業務及び危機発生時の対応の充実強化を図ることとしています。

具体的な業務内容は、行政等からの依頼検査が全体の7～8割を占めておりますが、感染症に係る細菌・ウイルス検査をはじめ、食品中の残留農薬検査、河川・湖沼、工場排水等の水質検査、放射能測定、大気・土壌・騒音測定等幅広い分野にわたっています。一方、調査研究では、つつが虫病対策、八郎湖・田沢湖の水質改善等本県特有のものや、日頃の試験検査・分析業務を通して課題解決が必要なものなどをテーマにしています。また、感染症情報センターとして県内における感染症の発生動向を調査・解析し週報・月報を作成しているほか、空間放射線量や大気汚染物質の常時監視データをホームページなどを通して情報発信を行っています。

近年は、新型インフルエンザ、マダニによるSFTS（重症熱性血小板減少症候群）、MERS（中東呼吸器症候群）、デング熱、エボラ出血熱など新興再興感染症の危機が高まっているほか、環境面でも広域的な大気汚染物質であるPM2.5等による新たな健康被害が心配されておりますがこうした中、当センターは、常に県民の皆様の健康・安全・安心を確保するという高い意識と緊張感を持って業務を推進しています。

この年報は、主に平成25年度に当センターが行った調査研究や業務実績の概要についてとりまとめたものです。本書を通じて多くの皆様に当センターの活動への御理解と関心を高めていただければ幸いです。

平成26年12月

秋田県健康環境センター所長 飯塚 政範

目 次

I 健康環境センターの概要

1. 沿革	1
2. 庁舎の概要	1
3. 組織	1
4. 職員名簿	2
5. 業務内容	3
6. 主要機器	4

II 業務実績

1. 試験検査実績	5
2. 研修・学会等	9
3. 研究業務実績	14

III 調査研究報告

・ 秋田県内の医療機関における AmpC 型 β ラクタマーゼ産生菌の分離状況と 薬剤感受性の解析結果	21
・ 稀な血清型 Agbeni が同定された 3 件のサルモネラ感染事例の解析	26
・ 八郎湖水質調査事業における大腸菌群数および大腸菌数の推移と分離された 大腸菌の性状解析	29
・ アシネトバクター属菌の感染疫学解明に関する研究	36
・ 市販食肉から分離された D240G 変異陽性 CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌の解析	41
・ 秋田県における食用牛の腸管出血性大腸菌保菌状況と分離株の細菌学的性状に 関する研究－2001～2003 年と 2012～2013 年の調査成績	45
・ 感染症予防対策への活用に向けたウシ早期初乳のウイルス不活化効果に 関する検討	51
・ 新生児マス・スクリーニングにおける発見患児の追跡調査結果について	55
・ パンソルビン・トラップ法によって食品検体から検出されたノロウイルスの 遺伝子解析法の開発	61
・ 平成 23～25 年度のウイルス行政検査集計結果について	73
・ 農産物中の残留農薬一斉分析法の検討及び妥当性評価について	78
・ 田沢湖の COD 及び全窒素濃度の変動要因に関する一考察	95

IV 発表業績

1. 学会発表	100
2. 他誌掲載論文	109

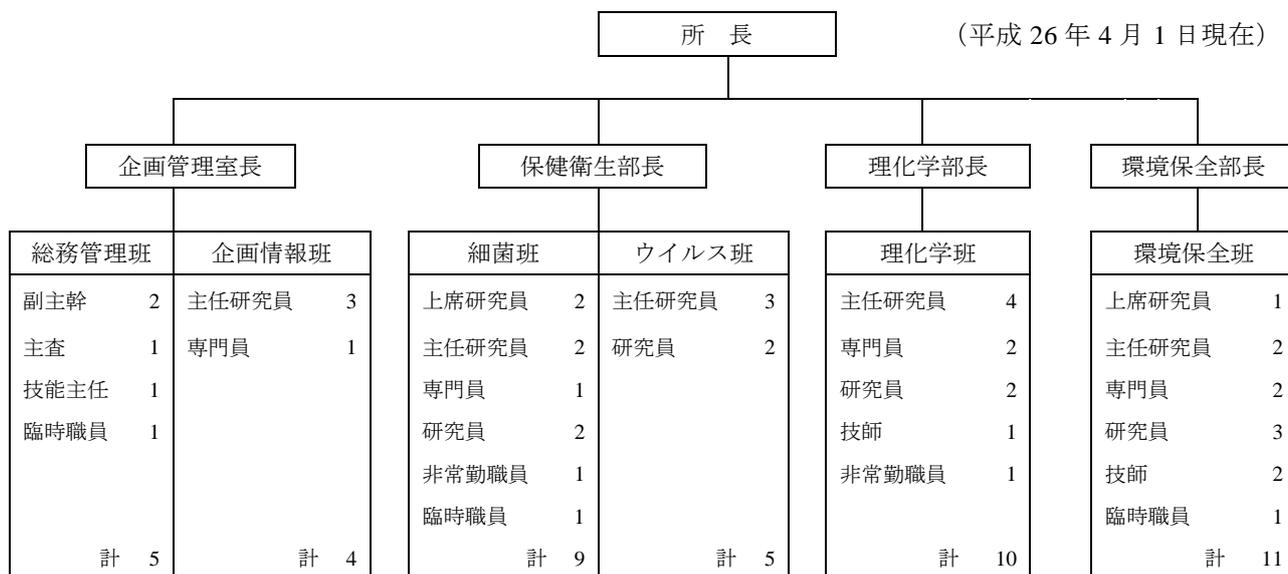
I 健康環境センターの概要

1. 沿革

年月	事項
明治35. 7 明治末期	衛生試験所を秋田市牛島町に設立。 庁舎を秋田市土手長町に移転。
昭和28. 1	衛生研究所に改称。
39. 4	衛生科学研究所に改称。
39. 6	庁舎を秋田市古川堀反町（現千秋明徳町）に新築移転。
45. 7	公害技術センターを秋田市茨島の工業試験場内に設立。
48. 7	庁舎を秋田市八橋に新築移転。
56. 4	環境技術センターに改称。
61. 8	庁舎を秋田市千秋久保田町に新築移転。
平成12. 4	環境センターに改称。 秋田市山王の県庁第二庁舎に総務班及び監視・情報班を置く。
14. 3	八橋分室敷地内にダイオキシン類分析棟を新築。
18. 4	衛生科学研究所と環境センターを組織統合し、健康環境センターとして発足。 千秋庁舎に企画管理室及び保健衛生部を、八橋庁舎に環境部を設置。
21. 4	八橋庁舎の環境部を千秋庁舎に移転し、庁舎を統合。保健衛生部の理化学部門と環境部の化学物質部門を統合した理化学班を環境・理化学部内に設置。組織を企画管理室、保健衛生部及び環境・理化学部とする。
22. 4	保健所の試験検査課を統合。保健衛生部の微生物班を細菌班とウイルス班に再編し、健康科学班を健康科学・管理班に名称変更。環境・理化学部を理化学部と環境保全部に再編。理化学部には、理化学班を再編した食品理化学班と環境理化学班を設置。環境保全部には環境調査班を名称変更した環境保全班を設置。
24. 4	企画管理室の総務・企画班を再編し、総務管理班と企画情報班を設置。保健衛生部の健康科学・管理班を廃止。理化学部の食品理化学班と環境理化学班を統合し、理化学班を設置。

2. 庁舎の概要

- 1) 所在地 秋田市千秋久保田町 6 番 6 号
- 2) 敷地 867.75 m²（建物建床面積）
- 3) 建物 鉄筋コンクリート造 5 階建 延床面積 4,553.52 m²



総職員数 49 名（正職員 38 名，専門員 6 名，非常勤職員 2 名，臨時職員 3 名）

4. 職員名簿

(平成26年4月1日現在)

	職 名	氏 名
	所 長	飯 塚 政 範
企画管理室	室 長	齊 藤 志保子
総務管理班	副主幹(兼)班長	工 藤 正 博
	副 主 幹	黒 政 太
	主 査	朝 倉 由佳理
	技 能 主 任	佐 藤 博 之
企画情報班	主任研究員(兼)班長	川 原 和 志
	主 任 研 究 員	藤 谷 陽 子
	主 任 研 究 員	村 山 力 則
	専 門 員	佐 藤 穰
保健衛生部	部 長	安 部 真理子
細菌班	上席研究員(兼)班長	八 柳 潤
	上 席 研 究 員	田 中 貴 子
	主 任 研 究 員	熊 谷 優 子
	主 任 研 究 員	高 橋 志 保
	専 門 員	和 田 恵理子
	研 究 員	今 野 貴 之
	研 究 員	檜 尾 拓 子
ウイルス班	主任研究員(兼)班長	斎 藤 博 之
	主 任 研 究 員	秋 野 和 華 子
	主 任 研 究 員	佐 藤 寛 子
	(兼)主任研究員	村 山 力 則
	研 究 員	柴 田 ちひろ
	研 究 員	佐 藤 由衣子
理化学部	部 長	岩 谷 金 仁
理化学班	主任研究員(兼)班長	小 林 貴 司
	主 任 研 究 員	珍 田 尚 俊
	主 任 研 究 員	松 瀨 亜 希 子
	主 任 研 究 員	中 村 淳 子
	専 門 員	大 友 久 利
	専 門 員	佐 藤 晴 美
	研 究 員	菅 原 剛
	研 究 員	小 川 千 春
	技 師	今 野 緑 朗
環境保全部	部 長	大 瀨 志 伸
環境保全班	上席研究員(兼)班長	鈴 木 忠 之
	主 任 研 究 員	清 水 匠 司
	主 任 研 究 員	成 田 修 司
	専 門 員	大 畑 博 正 司
	専 門 員	高 嶋 司
	研 究 員	玉 田 将 文
	研 究 員	鈴 木 純 恵
	研 究 員	佐 藤 健 治
	技 師	生 魚 利 隆
	技 師	佐 藤 清

5. 業務内容

(平成 26 年 4 月 1 日現在)

企画管理室	総務管理班	<ul style="list-style-type: none"> ・人事, 服務 ・予算, 決算 ・庁舎管理, 庶務一般
	企画情報班	<ul style="list-style-type: none"> ・研究の企画・評価・進行管理 ・センター中長期計画の進行管理 ・広報, 研修 ・検査業務管理 ・精度管理
保健衛生部	細菌班	<ul style="list-style-type: none"> ・感染症発生動向調査にともなう病原体検査業務 ・細菌感染症と食中毒の試験検査及び調査研究 ・結核登録者情報調査 ・健康づくりに関する調査研究 ・薬剤耐性菌に関する調査研究 ・医薬品等に関する検査 ・収去食品及び環境検体等に関する細菌検査
	ウイルス班	<ul style="list-style-type: none"> ・感染症発生動向調査にともなう病原体検査業務 ・ウイルス感染症と食中毒の試験検査及び調査研究 ・エイズ・性感染症・B型肝炎・C型肝炎の抗体検査 ・つつが虫病の抗体検査及び調査研究 ・感染症情報センター業務
理化学部	理化学班	<ul style="list-style-type: none"> ・食品の安全性に係る試験検査及び調査研究 ・食品放射能の測定 ・有害家庭用品試買検査 ・収去食品の理化学的検査 ・工場・事業場排水中の化学物質の検査 ・廃棄物関係検査 ・環境中の化学物質に関する調査研究
環境保全部	環境保全班	<ul style="list-style-type: none"> ・公共用水域水質調査 ・工場・事業場排水基準検査 ・工場・事業場ばい煙排出基準検査 ・廃棄物関係検査 ・生活衛生関係検査 ・環境放射能の測定 ・大気汚染常時監視 ・航空機騒音調査 ・酸性雨調査 ・アスベスト環境調査 ・環境保全に関する調査研究

6. 主要機器

(平成 26 年 4 月 1 日現在)

機 器 名	規 格
電子顕微鏡	日本電子 JEM-1010
偏光ゼーマン原子吸光光度計	日立製作所 Z-5000
原子吸光分光光度計	バリアン・テクノロジーズ AA-280FS
ICP 発光分光分析装置	サーモフィッシャー iCAP6300Duo
分離用超遠心機	日立工機 CP70MX
ガスクロマトグラフ質量分析計	島津 QP5000
ガスクロマトグラフ質量分析計	島津 QP5050A
ガスクロマトグラフ質量分析計	アジレント・テクノロジー 6890N/5973N
超臨界流体抽出装置	ISCO SFX220
ガスクロマトグラフ質量分析計	島津 GCMS-QP2010 Plus
ガスクロマトグラフタンデム型質量分析計	サーモフィッシャー TSQ QuantumGC
キャピラリーガスクロマトグラフ	ヒューレットパカード HP6890
ガスクロマトグラフ	アジレント・テクノロジー 6890N
FID 付ガスクロマトグラフ	アジレント・テクノロジー 7890A
FPD・ECD 付ガスクロマトグラフ	アジレント・テクノロジー 7890A
高速液体クロマトグラフ	日立製作所 D-7000
高速液体クロマトグラフ	日立製作所 L-7000
高速液体クロマトグラフ	日立製作所 L-7000
高速液体クロマトグラフ	日本ウォーターズ 2695
高速液体クロマトグラフ	日本ウォーターズ 996 アライアンスシステム
高速液体クロマトグラフ	アジレント・テクノロジーDAD・FLD 検出器付 1200 シリーズ
液体クロマトグラフタンデム質量分析計	AB サイエックス API4000
ノルマルヘキサン自動抽出装置	ラボテック HX-1000-8
イオンクロマトグラフ	日本ダイオネクス DX-120
イオンクロマトグラフ	日本ダイオネクス DX-320
高速溶媒抽出装置	DIONEX 社 ASE-200
高速溶媒抽出装置	DIONEX 社 ASE-300
オートアナライザー	ビーエルテック QuAAtro 2-HR
Ge 半導体検出器付波高分析装置	セイコー EG&G GEM20P, MCA7
Ge 半導体検出器付波高分析装置	セイコー EG&G GEM25-70, MCA7600
PCR プロダクト検出定量システム	アプライドバイオシステムズ ABI PRISM 7000
自動核酸精製装置	日本ロシュ MagNA Pure LC2.0
低バックグラウンド放射能自動測定装置	アロカ LBC-4201B
モニタリングポスト	アロカ MAR-22
空間放射線量モニタリングシステム	東芝 SD22-T
大気汚染常時監視テレメータシステム	NEC 他
航空機騒音自動測定装置	リオン NA-37

Ⅱ 業務実績

1. 試験検査実績

1.1 保健衛生部行政依頼検査

項目	年度				
	平成23	平成24	平成25		
細菌・ウイルス等の試験検査	感染症発生動向調査病原体別検査数	ウイルス分離検査	737	850	861
		細菌検査	739	1,078	1,438
	感染症流行予測調査	インフルエンザ感染源調査	100	100	100
		日本脳炎感染源調査	70	70	70
	食中毒等検査	ノロウイルス検査	286	407	—
		胃腸炎ウイルス検査（ノロウイルス等） ^{*1}	—	—	755
		細菌検査	2,969	2,699	3,282
	HIV抗体検査	7	4	1	
	HIV抗体確認検査	4	4	0	
	性器クラミジア抗体検査	156	155	134	
	梅毒抗体検査	154	155	134	
	B型肝炎抗原検査	159	133	124	
	C型肝炎抗体検査	159	133	124	
	麻疹抗体価検査	2	2	0	
	麻疹PCR	28	23	0	
	風疹PCR ^{*2}	—	3	0	
	麻疹・風疹・発疹性ウイルス検査 ^{*3}	—	—	276	
	新型インフルエンザ	10	29	6	
	新型インフルエンザタミフル耐性検査	43	0	0	
	3類感染症に係わる病原微生物検査	589	499	490	
	地研 レファレンスセンター業務	カンピロ感受性試験	66	61	37
		ジフテリア・百日咳・ボツリヌス	83	223	159
	結核菌RFLP検査、VNTR検査	11	96	67	
	つが虫病血清検査	108	87	105	
	その他微生物学的検査	330	826	467	
	食品衛生に係る検査	食品収去検査	1,021	1,013	953
		食中毒菌汚染実態調査	275	190	100
精度管理		3	3	3	
生活衛生に係る検査	公衆浴場水、遊泳プール水の大腸菌検査	34	32	32	
	貸しおしぼり検査	32	32	16	
	公衆浴場等レジオネラ属菌検査	67	56	121	
水質汚濁対策	公共用水域水質環境調査	215	243	47	
	八郎湖水質保全調査	79	84	78	
	工場・事業場排水基準検査	266	244	218	
廃棄物対策	産業廃棄物等基準検査	20	20	20	
マス・スクリーニング	先天性代謝異常、内分泌疾患 ^{*4}	7,777	7,362	2,617	
医薬品等監視指導業務に係る検査	医薬品、医薬部外品、医療機器（細菌）	5	5	3	
国民健康・栄養調査 ^{*5}	栄養調査・解析	871	828	0	
	食生活状況調査・解析	823	—	0	
	身体状況調査・解析 ^{*6}	—	627	0	
	生活習慣調査・解析 ^{*6}	—	775	0	
	血液検査 ^{*6}	—	389	0	
	塩分濃度測定	281	120	0	
合 計		18,579	19,660	12,838	

*1 胃腸炎ウイルス検査（ノロウイルス等）については、平成25年度から新たに項目を起こした。

*2 風疹PCRについては、平成24年度から新たに項目を起こした。

*3 麻疹・風疹・発疹性ウイルス検査については、平成25年度から新たに項目を起こした。

*4 マス・スクリーニングについては、平成25年8月から外部委託となった。

*5 平成23年度は県民健康・栄養調査を実施したが、平成24年度は国民健康・栄養調査を実施した。

*6 身体状況調査・解析、生活習慣調査・解析、血液検査については、平成24年度から新たに項目を起こした。

1.2 保健衛生部一般依頼検査

項目	年度	(件数)			
		平成23	平成24	平成25	
感染症発生动向調査に関わる検査	秋田市保健所依頼分（再掲）	340	410	450	
細菌・ウイルス等の試験検査	ウイルス分離等検査	9	3	0	
	食中毒関係等胃腸炎ウイルス検査（ノロウイルス等）	0	0	24	
	新型インフルエンザ	0	1	3	
	新型インフルエンザタミフル耐性検査	0	0	0	
	細菌培養同定検査	0	0	13	
	細菌遺伝子解析検査	0	0	0	
	血液製剤無菌試験	真菌否定検査	0	0	0
		細菌否定検査	0	0	0
	HIV抗体確認検査	0	2	0	
合 計		349	416	490	

1.3 情報提供業務

項目	年度	(件数)				
		平成23	平成24	平成25		
基幹・地方感染症情報センター (感染症発生动向調査依頼業務)	患者情報	週報	収集	468	468	468
			報告	52	52	52
			還元	52	52	52
			解析	52	52	52
			提供	468	468	468
	月報	収集	108	108	108	
		報告	12	12	12	
		還元	12	12	12	
		解析	12	12	12	
		提供	108	108	108	
	病原体情報	報告	ウイルス	433	503	526
			細菌	295	301	310
		還元	24	24	24	
		解析	24	24	24	
		解析評価委員会資料提供		6	6	6
	結核登録者情報調査依頼業務	患者情報	月報	収集	108	108
報告				12	12	12
還元				12	12	12
解析				12	12	12
提供				108	108	108
年報 ^{*1}		収集	9	9	9	
		報告	1	1	1	
		還元	1	1	1	
		解析	1	1	1	
		提供	9	9	9	
花粉症予防対策依頼業務 ^{*2}	スギ花粉予報作成提供		53	52	—	
	スギ花粉測定数		202	221	—	
	スギ雄花芽調査数		15	15	—	
	花粉症患者調査票数		85	80	—	
合 計			2,806	2,895	2,559	

*1 新規結核登録患者数：137人、年末時結核登録者数：273人（平成24年1月～12月）

*2 花粉症予防対策依頼業務は平成24年度で終了した。

1.4 理化学部行政依頼検査

(件数)

項 目	年 度		平成23	平成24	平成25
食品監視業務に係る検査	残留抗生物質・残留合成抗菌剤検査		926	324	98
	残留農薬検査		7,985	7,782	6,537
	食品収去検査（食品添加物等）		720	657	524
	精度管理		21	36	21
医薬品等監視指導業務に係る検査	医薬品，医薬部外品，医療機器（理化学）		0	0	0
家庭用品試買検査	有害物質		53	55	51
地熱開発地域環境調査	温泉分析		0	0	0
環境放射能水準調査	空間線量		366	2,190	2,190
	全ベータ線		52	139	156
	核種分析		82	123	123
	分析確認		55	55	110
福島原子力発電所事故に伴う 緊急環境放射能調査	空間線量		9,328	12	12
	核種分析	降下物	813	—	—
		蛇口水 ^{*1,2}	831	20	20
		環境試料 ^{*1,2}	626	—	—
		食品等試料 ^{*2}	12	219	339
	県産農産物等試料 ^{*1,2}	897	1,440	642	
水質汚濁対策	環境調査	公共用水域水質調査	48	35	36
		地下水調査	0	0	0
		緊急調査	59	0	0
	工場排水基準検査		98	67	67
土壌汚染対策	汚染土壌処理事業所検査		32	22	22
化学物質対策	化学物質環境調査 ^{*1}		167	—	—
廃棄物対策	産業廃棄物等基準検査		262	198	253
	能代産業廃棄物処理センター環境保全対策	能代地区周辺環境調査	599	860	819
		能代産業廃棄物処理センター関連調査	3,194	1,833	3,297
合 計			27,226	16,067	15,317

*1 福島原子力発電所事故に伴う緊急環境放射能調査の蛇口水，環境試料，畜産試料の一部及び化学物質環境調査については，平成24年度より理化学部から環境保全部に業務移行した。

1.5 環境保全部行政依頼検査

項 目	年 度		(件数)		
			平成23	平成24	平成25
大気汚染対策	大気汚染常時監視 ^{*1}	一般環境大気測定局	56 (462,149)	57 (477,729)	57 (466,452)
		自動車排出ガス測定局	15 (129,504)	15 (129,750)	15 (128,634)
		工場局	74 (540,341)	74 (584,893)	74 (547,254)
	ばい煙排出基準検査		25	0	29
	酸性雨調査	酸性雨実態調査	1,380	1,420	1,390
	アスベスト対策	石綿飛散調査	43	36	44
福島原子力発電所事故に伴う 緊急環境放射能調査 ^{*2}	核種分析	蛇口水 ^{*2}	—	36	36
		環境試料 ^{*2}	—	1,251	919
		畜産試料 ^{*2}	—	38	14
その他緊急環境放射能調査 ^{*3}	核種分析	降下物 ^{*3}	—	30	0
		浮遊じん ^{*3}	—	30	0
水質汚濁対策	環境調査	公共用水域水質調査	4,171	4,107	3,814
		地下水調査	47	0	0
		緊急調査	91	519	674
	工場・事業場排水基準検査	工場排水	2,383	2,189	1,998
		水浴場水	288	336	0
	八郎湖水質保全対策調査	底質調査	36	36	36
		緊急調査	80	158	0
	玉川酸性水影響調査		304	336	317
	十和田湖水質保全対策調査	十和田湖水質生態系調査	256	240	240
十和田湖流入河川調査		0	0	0	
土壌汚染対策	汚染土壌処理事業所検査		36	36	46
生活衛生に係る検査	遊泳用プール水質検査		18	16	24
	公衆浴場水質検査		64	64	32
	食肉衛生検査所自主検査		20	20	20
騒音対策	航空機騒音調査		758	758	714
化学物質対策 ^{*2}	化学物質環境調査 ^{*2}		167	137	195
廃棄物対策	産業廃棄物等基準検査		731	543	529
	能代産業廃棄物処理センター関連調査		1,351	1,322	1,221
	緊急調査		0	0	0
合 計 (大気汚染常時監視を除く)			12,249	13,658	12,292

*1 大気汚染常時監視は、測定対象項目数（実測データ数）を表す。

*2 福島原子力発電所事故に伴う緊急環境放射能調査の蛇口水、環境試料、畜産試料の一部及び化学物質環境調査については、平成24年度より理化学部から環境保全部に業務移行した。

*3 その他緊急環境放射能調査については、平成24年度から新たに項目を起こした。

2. 研修・学会等

2.1 研修等参加

年月日	研 修 名	参加者	開催地
25.07.03～04	アイソトープ放射線研究発表会	玉田将文	東京都
25.07.18	環境測定分析統一精度管理ブロック会議	環境保全部 全員（9人）	秋田市
25.07.19	平成25年度病原体等の包装・運搬講習会	熊谷優子	東京都
25.07.25	残留農薬分析 Q&A セミナー	珍田尚俊	大阪府
25.08.28	平成25年食品衛生検査施設信頼性確保部門責任者等研修会	檜尾拓子	東京都
25.09.17	第20回全国越境大気汚染・酸性雨対策連絡会議	清水 匠	新潟県
25.10.10	全環研協議会酸性雨広域大気汚染調査研究部会	高嶋 司	東京都
25.10.17～18	平成25年度地方衛生研究所全国協議会 北海道・東北・新潟 支部微生物研究部会・研修会	保健衛生部 全員（13人）	秋田市
25.10.18	平成25年度「地域保健総合推進事業」地方衛生研究所地域ブロッ ク（北海道・東北・新潟支部）専門家会議（微生物部門）	保健衛生部 全員（13人）	秋田市
25.10.17～18	全国環境研協議会北海道・東北支部研究連絡会議	高橋英之	北海道
25.10.31～ 11.01	平成25年度北海道・東北・新潟支部公衆衛生情報研究部会研修会	安部真理子 村山力則	新潟県
25.11.05～14	環境放射能分析研修	小川千春	千葉県
25.11.19	全国疫学情報ネットワーク構築会議	柴田ちひろ	東京都
25.11.29	平成25年度指定薬物分析研修会議	菅原 剛	東京都
25.12.13	平成25年度霞ヶ浦環境科学センター成果発表会	玉田将文	茨城県
25.12.18～20	石綿位相差顕微鏡法研修	佐藤 健	埼玉県
26.01.09	食品監視員協議会研修会	柴田ちひろ	秋田市
26.01.09～10	平成25年度食品衛生監視員等研修会	藤谷陽子 中村淳子 高橋志保 柴田ちひろ	潟上市
26.01.23～24	平成25年度環境科学セミナー	玉田将文 生魚利治	東京都
26.01.27～28	厚労省及び内閣府食品安全委員会合同研究班会議	斎藤博之 秋野和華子	東京都
26.01.29～30	全環研協議会酸性雨広域大気汚染調査研究部会	大淵志伸 高嶋 司	茨城県
26.02.01	第1回食品衛生研究者育成基礎セミナー	珍田尚俊 松淵亜希子 天明さおり	東京都
26.02.20～21	平成25年度希少感染症診断技術研修会	今野貴之 檜尾拓子 柴田ちひろ	東京都
26.02.27	全国環境研協議会北海道・東北支部酸性雨専門部会	高嶋 司	岩手県
26.03.19	平成25年度放射線監視結果収集調査検討会	小川千春	東京都

2.2 学会等出席

年月日	学会名	出席者 (○発表者)	開催地
25.05.16～17	第105回日本食品衛生学会学術講演会	齊藤志保子 中村淳子	東京都
25.05.31	秋田応用生命科学研究会第22回講演会	齋藤博之 ○佐藤寛子 天明さおり	秋田市
25.06.21～23	第21回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー	○佐藤寛子	北海道
25.07.03～05	第50回アイソトープ・放射線研究発表会	小川千春	東京都
25.07.04～05	平成25年度全国地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部総会	高橋 浩 ○田中貴子	宮城県
25.07.11～12	衛生微生物技術協議会第34回研究会	八柳 潤 今野貴之 齋藤博之	愛知県
25.07.25～26	第17回腸管出血性大腸菌感染症研究会及び第6回日本カンピロバクター研究会	齊藤志保子 高橋志保 今野貴之	茨城県
25.07.31～ 08.02	第22回環境化学討論会	小林貴司	東京都
25.08.23～24	第40回日本マス・スクリーニング学会	秋野和華子	大阪府
25.08.29	東北食中毒研究会第26回全体会議・研修会	齊藤志保子 八柳 潤	福島県
25.08.30～31	第67回日本細菌学会東北支部総会	○今野貴之	福島県
25.09.18～20	第54回大気環境学会	清水 匠	新潟県
25.10.03～04	第34回日本食品微生物学会学術総会	齊藤志保子 高橋志保 樫尾拓子 ○齋藤博之	東京都
25.10.03～04	平成25年度地研北海道・東北・新潟支部衛生化学研究部会総会	珍田尚俊 ○小川千春	北海道
25.10.22～25	第72回日本公衆衛生学会	○田中貴子	三重県
25.10.24～25	第36回農薬残留分析研究会	松渕亜希子 ○天明さおり	秋田県
25.10.30～ 11.01	第62回日本感染症学会東日本地方会	○今野貴之	東京都
25.11.02～04	第24回廃棄物資源循環学会	佐藤 健	北海道
25.11.07～08	第50回全国衛生化学技術協議会年会	珍田尚俊	富山県
25.11.08	第25回ウイルス性下痢症研究会	齋藤博之	兵庫県
25.11.09～12	第61回日本ウイルス学会学術集会	○齋藤博之	兵庫県
25.11.21～23	第106回日本食品衛生学会学術講演会	○齊藤志保子 今野貴之 ○齋藤博之 天明さおり	沖縄県
25.11.29	秋田応用生命科学研究会第23回講演会	高橋 浩 ○齋藤博之 秋野和華子 佐藤寛子 ○柴田ちひろ	秋田市
26.01.12	第6回日本リケッチア症臨床研究会・第20回リケッチア研究会合同研究発表会	○佐藤寛子	滋賀県
26.01.23～24	第27回公衆衛生情報協議会	村山力則	埼玉県

26.03.17～19	第 48 回日本水環境学会	○小林貴司 菅原 剛 成田修司 生魚利治	宮城県
26.03.26～28	第 87 回日本細菌学会総会	八柳 潤	東京都

2.3 健康環境センター主催研究発表会

開催日 : 平成 25 年 7 月 5 日 (金)

開催場所 : 秋田県総合保健センター

	演 題 名	発表者
1	平成 22～24 年度における収去食品の細菌検査結果について	高橋志保
2	秋田県における莢膜型インフルエンザ菌の分離状況について	今野貴之
3	風疹流行要因と風疹・麻疹疑い例からの発疹性ウイルスの検出について	安部真理子
4	新生児マス・スクリーニング検査における発見患者の追跡調査結果について	秋野和華子
5	ヒトパピローマウイルス (HPV) の検出法における検査精度の向上について	村山力則
6	子宮頸がん検診受診率向上を目指したフォーカスグループインタビューによる若い女性の意識調査結果について	田中貴子
7	山菜加工品における銅葉緑素の分析について	中村淳子
8	秋田県における微小粒子状物質 (PM2.5) の調査結果について	清水 匠
9	東日本大震災による災害廃棄物受け入れに伴う秋田県内の環境放射能調査	玉田将文
10	玉川源泉中和処理による非晶質水酸化鉄の形成がもたらす源泉下流域の水質改善機構	成田修司

2.4 その他の口頭発表

年月日	発表会名・演題名	発表者	開催地
26.01.24	平成 25 年度保健環境業務研究発表会 ・食中毒を起こした非定型の血清型のサルモネラ菌について ・平成 22～24 年度における収去食品の細菌検査結果について ・玉川酸性水の中和強化による pH 挙動とそれに伴う中和澱物量の増加について	今野貴之 高橋志保 佐藤 健	潟上市

2.5 講師派遣等

2.5.1 技術支援

実施日	主 な 内 容	講師氏名	対 象	延人数
25.06.12～10.29	スーパーサイエンスハイスクール 実験試料の分析	高嶋 司	横手清陵学院	1 名
25.07.05	つつが虫病の血清学的検査に関する助言	佐藤寛子	日本医科大学付属病院	1 名
25.10.07～11	牛乳の衛生確保支援	和田恵理子	株式会社栗駒フーズ	2 名
25.10.09～11 25.12.19～21	諫早湾水質浄化試験へのもみ殻炭 リン回収材の利用等	成田修司	長崎県環境保健研究センター	16 名
25.10.11	パンソルビントラップ法の商品開発に関する助言	斎藤博之	メルク株式会社	2 名
25.11.26	パンソルビントラップ法の試薬改良に関する助言	斎藤博之	タカラバイオ株式会社	1 名

25.12.16～ 26.01.17	PFGE 解析に係る技術指導	齊藤志保子	秋田県立大学応用生物科学科4年生	2名
26.03.19	パンソルビントラップ法の添加抗体に関するの助言	斎藤博之	栄研化学株式会社	3名
合 計				28名

2.5.2 出前講座

出前講座	講師氏名	実施回数	延べ参加者数
油断できない結核	田中貴子	1回	60名
細菌性感染症・食中毒について	高橋志保	2回	70名
ウイルス性食中毒について	斎藤博之	5回	235名
	佐藤寛子	1回	25名
ウイルス性感染症について	斎藤博之	2回	75名
環境放射能について	珍田尚俊	2回	65名
環境中の大気汚染物質について	大淵志伸	2回	170名
合 計		15回	700名

2.5.3 その他講師派遣

主 な 内 容	実施日	講師氏名	依 頼 元	参加者数
食品および農産物中の残留農薬のモニタリングと生物影響	25.05.14 25.05.21	小林貴司	秋田県立大学生物環境科学科	8名
難分解物質 1,4 ジオキサンの水処理施設について	25.05.20	小林貴司	秋田県産業廃棄物協会中央支部	70名
パンソルビン・トラップ法に関する技術指導	25.06.09	斎藤博之	日本・タイ感染症共同研究センター	70名
就活に向けた生物環境科学科3年生と県大OB・OG交流会	25.07.24	生魚利治	秋田県立大学生物環境科学科	25名
感染症アラカルト	25.08.06	斎藤博之	秋田周辺地区結核予防婦人会連合会	60名
特殊災害と保安 (放射性物質災害)	25.08.19	斎藤博之	消防学校	96名
風疹と結核について	25.09.10	田中貴子 柴田ちひろ	本荘地区結核予防婦人会連合会	50名
細菌・ウイルス災害	25.10.09	斎藤博之	消防学校	18名
感染症対策～インフルエンザ・ノロウイルスを中心に～	25.10.10	斎藤博之	秋田市保健所	165名
つつが虫病患者情報の効果的な発信について	25.10.10	佐藤寛子	北海道・東北・新潟ブロックリケッチア症レファレンスセンター	26名
個体の反応「生体と微生物」	25.10.22	八柳 潤	秋田大学大学院医学系研究科	140名
風疹アラカルト	25.10.26	安部真理子	秋田県臨床検査技師会	60名

ノロウイルスの特徴と食中毒防止について	25.11.28	斎藤博之	中央ブロック食品安全地域懇談会	50 名
ノロウイルス検査法(パンソルビン・トラップ法)について	25.12.12	斎藤博之	滋賀県衛生科学センター	3 名
感染症アラカルト	25.12.20	斎藤博之	秋田地域振興局福祉環境部	60 名
保健情報学－結核の情報管理・統計－	26.01.09	田中貴子	秋田大学医学部保健学科	80 名
ノロウイルスに関する最新の話題	26.02.07	斎藤博之	公益社団法人秋田県獣医師会	47 名
合計 17 回				1,028 名

2.6 視察・見学等受入

参加者区分	平成 23 年度		平成 24 年度		平成 25 年度	
	人数	(団体数)	人数	(団体数)	人数	(団体数)
小・中学生	2	(1)	2	(2)	0	－
インターンシップ	13	(3)	11	(3)	10	(3)
その他の学生	13	(2)	37	(4)	53	(4)
一般県民	0		0		0	－
業務関係者 (医師臨床研修含む)	20	(1)	9	(3)	9	(1)
県外	4	(1)	10	(7)	2	(1)
国外	3	(2)	3	(2)	2	(1)
合計	55	(10)	72	(21)	76	(10)

注) 括弧内の数字は団体数

2.7 受賞・表彰等

受賞日	表彰名	受賞者	授与機関
25.05.23	平成 25 年度全国環境研協議会北海道・東北支部長表彰	高橋 浩	全国環境研協議会北海道・東北支部
25.07.04	平成 25 年度全国地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部長表彰	田中貴子	地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部
25.10.22	平成 25 年度全国地方衛生研究所全国協議会会長表彰	齊藤志保子	地方衛生研究所全国協議会
25.11.22	生活と環境全国大会 感謝状	高橋 浩	生活と環境全国大会

3. 研究業務実績

細菌班

食用牛の腸管出血性大腸菌保菌状況と分離株の菌学的性状に関する研究

(平成 24～25 年度)

研究概要

腸管出血性大腸菌 (EHEC) の感染源として牛などの反芻動物が重要であるが、当センターでは平成 15 年以降牛の EHEC 保菌率の調査を実施していない。一方、欧州ではこれまで知られていない病原因子の組み合わせを有する EHEC O104 による感染事例が 2010 年に多発し、多数の死者が発生したが、県内における EHEC O104 類似株の侵淫実態は不明であった。このため、県内の食用牛の EHEC 保菌実態解明と分離株の細菌学的性状の精査を目的として本研究を実施した。得られた結果について、2001～2003 年に実施した類似の研究結果と比較し、秋田県における今後の EHEC O157 感染症対策について考察した。

結果

2 年間に EHEC の検索を実施した牛便計 211 検体中 7 検体 (3.3%) から EHEC O157 が検出された。2001～2003 年の調査では 452 検体中 7 検体 (1.5%) から EHEC O157 が検出されており、秋田県における食用牛の EHEC O157 保菌率は 10 年前に比べておよそ 2 倍となっていることが明らかとなった。一方、EHEC O104 やそれに類似する病原機構を有する EHEC (aggR+VT 遺伝子保有株) は検出されなかった。

重症例との関連が疫学的に示されている Clade 8 が患者由来 EHEC O157 に占める割合は、2001～2003 年に 10.3%であったのに対して 2012～2013 年には 25%となり、増加傾向がみられた。Clade 8 に感染した患者全員に血便がみられた。また、2013 年に横手保健所管内で死亡した女児から分離された EHEC O157 も Clade 8 であった。牛由来株では 2001～2003 年には EHEC O157 Clade 8 が検出されなかったのに対して、2012～2013 年には 1 株が Clade 8 であることが確認された。

2001 年以降、県内の EHEC 感染事例発生数は

年間 30～40 事例で推移していたが、生食用牛肉の衛生基準が厳格化された 2011 年は 18 事例、牛生レバーの提供が禁止された 2012 年は 22 事例と減少傾向がみられた。しかし、2013 年には 28 事例となり、再び増加がみられた。食品衛生法の厳格化により EHEC 感染症発生が減少したとされているが、EHEC 感染症発生予防のための更なる対策が必要である。

地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究「アシネトバクター属菌の感染疫学解明に関する研究」(平成 24 年度～)

研究概要

アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属菌は国内で深刻な健康被害を伴う院内感染を惹起しており、健康被害発生予防対策を講じる必要があるが、医療機関等で汎用されている自動同定機器ではアシネトバクターの種を正しく同定することは困難であることから、国内におけるアシネトバクター属菌の分離実態さえも正確に把握されているとは言い難いのが現状である。本研究では、国立感染症研究所が全国の国立病院から収集した 866 株のアシネトバクター属菌疑い株について rpoB 遺伝子のシーケンス解析により菌種同定を行った。また、*A.baumannii* の MLST 解析と次世代シーケンサーを使用して International Clone II の全ゲノム SNP 解析を行い、国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を集積した。さらに、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンスデータから *A.baumannii* の薬剤耐性遺伝子を検索した。

結果

866 株のアシネトバクター属菌疑い株のうち、645 株 (74%) が *A.baumannii*, 84 株 (10%) が *A.nosocomialis*, 60 株 (7%) が *A.pitti*, 15 株 (2%) が *A.sp. close to 13TU* であった。感染症法に規定する MDRA (多剤耐性アシネトバクター) は 2 株のみであった。一方、秋田県と愛知県で分離された *A.baumannii* について MLST 解析を実施したところ、両県ともに *A.baumannii* International clone II がすでに分布していることが明らかとなった。また、全ゲノム SNP 解析により、愛知県と秋田県で分離された *A.baumannii*

International Clone II が非常に近縁であること、国立感染症研究所で解析した MDRA はこれらとはやや距離が離れたクラスターに分類されること、海外で分離された株は、国内株とは遺伝的な隔たりが大きいことが明らかとなった。全ゲノムシーケンスデータの解析により秋田で分離された 7 剤耐性 *A. baumannii* AC18 株と AC45 株はそれぞれ 12 種類と 8 種類、5 剤耐性を *A. baumannii* AC34 株からは 5 種類の耐性遺伝子が検出された。愛知 4 株についても 7 種類から 12 種類の耐性遺伝子が検出された。AC18 株はアミカシン耐性を示し、*aadA1*、*aac(6')iB-cr*、*armA* 遺伝子を保有していた。*armA* 遺伝子は愛知株 4 株中 3 株にも検出されており、アミノグリコシドの高度耐性に関与するこの *methylase* 遺伝子が国内の *A. baumannii* に侵淫していることが明らかとなった。

国内において MDRA は稀であり、侵淫は深刻な状況には至っていないと考えられるが、院内感染防止策構築の基礎となる MDRA の感染疫学に関して、さらなる調査が必要である。

国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究—カンピロバクターレファレンスセンター業務（平成 25 年度～）

研究概要

平成元年から行っている地方衛生研究所技術協議会の北海道・東北・新潟ブロックのカンピロバクターレファレンスセンター活動が本研究の一部として組み込まれた。平成 25 年は県内の散発下痢症患者由来の 37 株（*C. jejuni* 34 株、*C. coli* 3 株）について血清型別法の Penner 法と Lior 法の比較検討を行った。さらに、薬剤耐性化の傾向を把握するため、テトラサイクリン、エリスロマイシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、オフロキサシン、シプロフロキサシンの 6 剤について感受性試験を実施した。また、同様にして鶏肉から分離した 10 株（*C. jejuni* 7 株、*C. coli* 3 株）、集団感染（食中毒）事例から分離した *C. jejuni* 6 株についても調査した。

結果

散発下痢症患者由来の *C. jejuni* 34 株のうち、Penner 法で単一の血清型に型別可能であったも

のは 23 株（67.6%）、Lior 法では 19 株（55.9%）であった。*C. coli* の 3 株はいずれの手法でも単一の血清型には型別されなかった。また、散発下痢症患者由来の *C. jejuni* 34 株中 26 株（76.5%）がキノロン系薬剤に耐性を示した。*C. jejuni* におけるキノロン系薬剤への耐性は、以前は 30～40%程度であったがここ数年その割合が高くなっており、耐性化の進行が危惧される。また、第一選択薬のエリスロマイシンについては、*C. jejuni*、*C. coli* とともに 1 株のみ耐性であった。

鶏肉由来の株については、今年度は患者由来株と同一の血清型の株はなく、薬剤耐性についても、*C. jejuni* においては、1 株がテトラサイクリンに耐性を示すのみであった。しかしながら、集団感染事例では、鶏肉が原因食品と推定された事例もあったことから、鶏肉はカンピロバクターの感染源として重要と考えられる。

秋田県で分離された非定型的な単相性サルモネラ菌の型別法の確立と発生動向の解明（大同生命厚生事業団「地域保健福祉研究助成」助成事業）

（平成 24 年度～平成 25 年度）

研究概要

近年、秋田県では非定型的な単相性のサルモネラの分離が散見され、従来の血清型別では菌型を決定できない事例が報告されている。そこで、非定型的な単相性サルモネラの秋田県における発生動向を把握し、地域の食中毒及び感染症対策に寄与するため、血清型別に代わる新たな遺伝学的な手法を確立し、これらの血清型の決定を試みた。さらに、分子疫学的手法を用いて、これらの系統解析を実施し、菌株間の関連性を調査した。

結果

平成 22 年に分離頻度の高かった非定型的な単相性サルモネラである O7:-:1,5 の血清型を解明するため、サルモネラの H1 抗原遺伝子 (*fliC*) を検出する PCR 法を考案した。それにより、O7:-:1,5 は血清型 Thompson の単相変異株であることを明らかにした。

次に、*NotI* 及び *XbaI* を用いた pulsed field gel electrophoresis (PFGE) により、同年に秋田県北部で分離された Thompson とこれらの単相変異

株が同一の PFGE パターンを示すことを明らかにし、O7:-:1,5 株が秋田県北部に侵淫する Thompson から生じたことを示唆した。

血清型名不明であった O7:-:1,5 株が Thompson であったことが明らかになったことで、平成 22 年に秋田県内で血清型 Thompson によるサルモネラ症の流行があったことが明らかとなった。

サルモネラ菌の迅速な同定のための検出法及び血清型別法の確立

(平成 25 年度～平成 26 年度)

研究概要

サルモネラによる食中毒、感染症の際の迅速な検査体制の構築を目的に、サルモネラの遺伝子解析法による検出法及び血清型別法を確立する。

サルモネラの検出については、ヒトのサルモネラ症の原因となる *S. enterica* の亜種 I の特異的な遺伝子とされている STM4057 についてのリアルタイム PCR 法の検討を行った。

サルモネラの血清型別については、O 抗原と 2 つのべん毛 (H) 抗原の遺伝子について、血清型特異的な PCR 法を検討した。

結果

サルモネラの検出は、Lee *et al.* (J Appl Microbiol, 49, 2954-2965, 2009) の報告を基に STM4057 の 137 bp を遺伝子増幅し、内部に設計した検出用プローブの反応性を確認した。秋田県内で分離される主要な 10 血清型については、検出可能なことを確認した。また、検出限界は、約 10 コピーであり、反応性についても良好であること確認した。

血清型別については、O 抗原 8 種類、H1 抗原 12 種類、H2 抗原 2 種類の PCR 法について反応性を確認した。また、非定型的な単相性変異株である O4:i:- や非常に稀な血清型 Agbeni の感染事例の解析に試行し、有用性を確認した。

ウイルス班

食品からのウイルス検出法としてのパンソルビン・トラップ法の精度向上に関する研究 (厚生労働科学研究費補助金「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」)

(平成 25 年度～平成 27 年度)

研究概要

パンソルビン・トラップ法は、食品検体に含まれるウイルス粒子を黄色ブドウ球菌の表面に吸着させて回収することを基本原理としている。その性質上、抽出された RNA には大量の黄色ブドウ球菌由来の遺伝子が混入することになるが、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度に対してはプラスの効果が見込める。その一方で、大量の黄色ブドウ球菌の遺伝子の中に含まれるウイルス遺伝子を検出するという特異な条件を課されることから、試験機関によって検出精度がバラつくという問題が指摘された。そこで、検出結果に差を生じやすい箇所について反応条件等の最適化を行った。

結果

食品検体中の炭水化物を分解除去する目的で多用されている α -Amylase 粉末に含まれる賦形剤が残留すると、検出感度に影響することから、これをあらかじめ除去した酵素液を調製しておくことで対応した。液化調製品は -20℃ で 2 ヶ月以上安定保存でき、粉末を直接投入した場合と同等の効果があることを確認した。黄色ブドウ球菌由来 DNA を除去する方法として、RNA 抽出過程でのオンカラム DNase 処理と、RNA 抽出後の易熱性 DNase 処理の 2 通りを実施できるようにした。いずれの方法を用いても、これまでの DNase 処理で問題となったコピー数の低下は起こらなかった。逆転写反応は、58℃ での高温逆転写反応が非特異反応による感度低下を抑制するのに有効であった。PCR 反応は酵素製品の選択が重要で、特にホットスタート仕様が必須であることが確認された。

感染症予防対策への活用に向けたウシ早期初乳の抗ウイルス効果に関する検討 (大同生命厚生事業団「地域保健福祉研究助成」助成事業) (平成 24 年度～平成 25 年度)

研究概要

ウシの分娩直後の初乳には、様々な病原体に対する抗体や不活化成分が含まれているとの報告がある。しかし、分娩後 5 日以内の早期初乳

は食品衛生法により飲用が規制されているため、子ウシに給与される以外は全て廃棄されている。そこで、ハンドクリーム等の手指用衛生用品にこの早期初乳を添加することで抗ウイルス効果を付加できれば、間接触感染の簡便な予防対策として活用し得る可能性を考えた。本研究では、インフルエンザウイルスおよびエンテロウイルスに対するウシ早期初乳のウイルス不活化効果について検討した。

結果

インフルエンザウイルスに対する HI 試験の結果、AH3 型については 23 頭全ての分娩後 1 日目の検体で HI 価が確認され、うち 8 検体は 80 倍とワクチン株由来抗血清に匹敵するような値を示した。一方で、AH1pdm09 型については分娩後 1 日目では 14 検体が HI 価を示したが、3 日目以降になると全ての検体が 10 倍未満であった。B 型についてはいずれかの日数で HI 価が確認されたのは 4 頭のみであり、残り 19 頭は全日数をとおして全て 10 倍未満であった。牛はインフルエンザウイルスに感染しないといわれていることから、今回得られた HI 価は抗体ではなくラクトフェリン等の乳清成分によるものであったと推察されるが、これら成分の各型に対する反応性は非特異的であったと考えられる。検討条件として各型の血球凝集能を揃えていたが、株により凝集能には差があることから、実際に含まれていたウイルス量は異なっていたと推測される。そのため、型間の反応性の違いは反応対象であるウイルス量に起因したものであった可能性が高いと考える。HI 試験は本来ウイルスの性状解析等に用いられる手法であるため、手指汚染の想定よりもはるかに多いウイルス量で検討を行った。それにも関わらず HI 価が確認されたことを考慮すれば、手指汚染で想定される少ないウイルス量に対しては十分に不活化効果が期待できるものと考えられた。

エンテロウイルスに対する中和試験の結果、マウスを用いた動物試験では、1 LD₅₀ における死亡率が対照群 46.0% (40/87) に対して乳清添加群 19.6% (18/92)、10 LD₅₀ における死亡率が対照群 89.6% (69/77) に対して乳清添加群 14.8% (12/81) となり、ウイルス量を 10 倍にすると対照群では死亡率が上昇したのに対して、乳清添加群では変化が見られなかった。細胞培

養試験については、1 TCID₅₀ における CPE 発生率が対照群 62.5% (5/8) に対して乳清添加群 23.9% (22/92)、10 TCID₅₀ における CPE 発生率が対照群 87.5% (7/8) に対して乳清添加群 54.3% (50/92) となり、対照群と比較して乳清添加群で CPE 発生率が低下した。これら 2 つの結果から、エンテロウイルスに対する不活化効果が確認されたものとする。

早期初乳を添加剤とすることで手指用衛生用品にウイルス不活化効果を付加できれば、間接触感染の簡便な予防対策として活用し得るだけでなく、現在は廃棄されている膨大な資源の有効活用にも繋がる。今後は他のウイルスに対する効果等、実現化に向けた更なる検討を重ねたい。

詳細は本誌 p.51～p.54 に報告する。

IP 法に使用する抗原の最適化に向けた検討 (厚生労働科学研究費補助金「ダニ媒介性細菌感染症の診断・治療体制構築とその基盤となる技術・情報の体系化に関する研究」) (平成 24 年度～平成 26 年度)

研究概要

つつが虫病の病原体である *Orientia tsutsugamushi* は、各血清型に共通抗原性があることから、患者血清抗体価は実際の感染型以外にも上昇を示す。そのため、病日を追った検査により、最も抗体価が上昇した型を感染型とするのが一般的である。当センターでは、つつが虫の血清診断において、これまで標準 3 株 (Gilliam, Karp, Kato) 抗原とした抗体検査を実施している。この 3 株のうち、Gilliam 株と Karp 株は国外での分離株であるが、国内分離株とは抗原性に違いがあると言われている。標準株を使用した抗体検査においては、抗体価上昇あるいは感染型の確認ができるまで 10 病日以上を要することがあった。そのことから、我々は発病早期の抗体検出および感染型究明を目的とし、患者急性期血清について標準 3 株および秋田県内外の患者あるいは野鼠から分離された JG 型株、Karp 型の亜型である Japanese Karp type 1 (JP-1) 型株、Japanese Karp type 2 (JP-2) 型株を抗原とした IP 法を実施し、その抗体価について比較検討した。

結果

検討に使用した 20 例において、いずれかの抗原に対する抗体価上昇が確認されたのは 6 例であった。このうち標準 3 株の使用において、IgM 抗体価により感染型 (Karp 型) が判明したのは 1 例であった。同様に IgG 抗体価において感染型 (Karp 型) が判定できたのは 3 例であり、それ以外は他型との判別ができなかった。一方、国内分離株を抗原とした抗体検査では、いずれかの抗原に対する IgM 抗体価上昇が確認されたのは 20 例中 6 例で、全例が JP-1 型および JP-2 型に対し最も高い抗体価を示し、感染型は Karp 型の亜型であると判定された。また、これらの抗体価は、標準 Karp 型に対する抗体価よりも有意に高値であった。同様に IgG 抗体価でも 20 例中 6 例が JP-1 および JP-2 型に対し最も高い抗体価を示した。上記 6 例の他型抗原に対する交差反応性をみると、JG に対する IgM および IgG 抗体価は、標準 Giliam 株抗原に対する抗体価よりも有意に低く、最大で 64 倍の差が認められた。国内の患者由来株を利用した抗体検査は、より早期の抗体検出および感染型の推計が期待できるため、今後のルーチン検査においては、国内の株を使用する事が望ましいと思われる。

理化学班

1,4-ジオキサン分解菌の培養と長期保存条件の検討 (平成 25 年度～平成 27 年度)

研究概要

廃水からの除去が難しい 1,4-ジオキサンについて、活性汚泥生物による円滑な処理方式の構築が必要とされている。本研究では、特異的な処理能力を有する 1,4-ジオキサン分解菌についての最適な培養条件の検討を行い、菌にとっての最適な温度や必要とする栄養源、阻害要因などを評価、考察し、実際の廃水処理施設の管理のための指標データとする。また、菌の長期保存方法を構築することにより種の維持を図り、運転方法や環境の変化により菌が死滅する等の不測の事態に備える。

結果

活性汚泥が有する 1,4-ジオキサン分解能を評価するための試験方法を構築した。試験では、

活性汚泥試料 500 ml に対し、1,4-ジオキサン 1 mg 相当を添加し、好気条件下で攪拌、定期的に 1,4-ジオキサン濃度を測定し、減少速度を算出することで評価を行っている。分解能試験を行ううえで一定にする必要がある条件は、温度 25℃、攪拌速度 200 rpm、1,4-ジオキサン添加量 1 mg (2 ppm 相当)、試料採取間隔 24 hour である。この条件のうち温度条件を変え比較すると、15℃ (1.1 mg/L/day)、25℃ (2.8)、30℃ (6.0) と温度上昇に伴い減少速度が顕著に増加する。また、1,4-ジオキサン添加量を多くした場合にも、徐々に減少速度が増加する。1,4-ジオキサンの添加を継続すると減少速度が増加し続け、分解菌の増殖を示唆する結果となり、この試験系により 1,4-ジオキサン分解菌の培養が可能であることがわかった。培養試験では、1,4-ジオキサン添加量の調整に加え、リン等の栄養源も添加することで、初期減少速度 (1.5 mg/L/day) の活性汚泥の分解能を 144 mg/L/day まで増加させることができている。今後は、菌の単離や同定を試み、分解菌の性質を探る予定である。

食品中の残留農薬及び残留動物用医薬品の一斉分析法に関する研究

(平成 24 年度～平成 26 年度)

研究概要

食品中の残留農薬及び動物用医薬品の残留基準値による規制は、ポジティブリスト方式が採られており、当センターでは、現在、農薬、動物用医薬品を合わせ、約 240 項目を GC 及び LC-MS/MS を用いて分析している。

昨今の食品の多様化に伴い、使用される農薬等の種類が増え、加工食品の検査の必要性も高まっていることから、更なる検査項目の拡大と、多様な食品に対応できる迅速で高精度な分析法の開発が急がれる。

また、食品衛生法の規格基準への適合を判断するために用いる分析法については、厚生労働省が通知したガイドラインに準じ、妥当性評価試験を行うことが必須となった。

本研究では、検査項目数の拡大を図り、加工食品にも応用でき、迅速かつ高精度な分析法について検討する。また、検討した分析法の妥当性評価試験を行い、信頼性に関する裏付けをとる。

結果

より効率的かつ高精度な残留農薬一斉分析法を構築するために、迅速簡便な分析法である QuEChERS 法を導入し、抽出と精製操作の改良を行った。改良の結果、GC 測定農薬で 276 成分、LC 測定農薬で 161 成分について、一律基準レベルの測定が可能となった。

新規分析法の妥当性評価試験を、7 食品（りんご、ほうれんそう、玄米、ねぎ、ばれいしょ、キャベツ、レモン）を対象に実施した。その結果、GC 測定農薬では、全食品で概ね 8 割以上の農薬がガイドラインの目標値を満たした。LC 測定農薬では、ねぎを除いた 6 食品で良好な結果が得られた。

動物用医薬品については、通知法 I を参考に、アセトニトリルと 0.1% ギ酸水の混液により抽出を行い、固相カラムにて精製し、LC-MS/MS で測定した。7 食品（鶏肉、牛肉、豚肉、サケ、鶏卵、牛乳、はちみつ）と約 100 成分の組み合わせで妥当性評価試験を実施した結果、サケを除いて概ね良好であった。

環境保全班

玉川上流部における中和対策の効率化と pH を含む水質改善の促進

（平成 25 年度～平成 27 年度）

研究概要

仙北市にある玉川温泉の源泉は、平成 14 年以降、急激な総酸度の上昇がみられた。この変化に対応するため、中和処理施設では石灰石を増量し、処理 pH である 3.5 を維持して中和処理したものの、田沢湖の pH 低下が観測されている。この現象を受け、当センターでは、平成 20～21 年の研究によって中和処理施設を経由しない強酸成分と中和処理施設で処理できない鉄、アルミニウムの成分が流下に伴って加水分解し、 H^+ の放出により、上記玉川流域及び田沢湖における pH 低下を引き起こすことを明らかにしてきた。平成 22 年度からの研究では、それらの対策の手立てを検討し、未処理の強酸成分を処理するための中和技術に一定の目処が立った。その成果を受け、本研究課題では、任意の pH 制御可能な中和により、上記未処理の強酸成分を効

率良く弱める技術を確立する。この中和に伴い、現在、鉄酸化細菌の生息する源泉から約 5 km 下流までの流域で生じている鉄の加水分解反応とそれに伴う H^+ の放出、また、田沢湖までの流域で生じているアルミニウムの同反応を上流側で促進させる。つまり、生成する沈殿物を玉川ダムサイトまでに大部分沈降させることにより、中和強化と併せて、ダムの設計段階で見込まれた本来の重金属等の沈殿・除去機能を有効に活用しながら、玉川流域全体の水質改善を目指している。

平成 25 年度は、10 月に 2 回の中和実証試験とその中和に伴う玉川源泉下流域の調査を行った。上記未処理強酸成分（pH 約 2、流量 20,000 L/min）を中和するために、酸化カルシウム（CaO）を用い pH（7±1）及び pH（5±1）にコントロールした。ここでは、pH（7±1）の結果について報告する。湯川から流入する源泉由来の未処理強酸成分を中和処理することによって、すべての調査地点で pH が改善していた。また、同試験における流域の総酸度も、すべての地点で減少が観測された。特に、鉄酸化細菌が関与する鉄の加水分解の流域は 3 キロ程、上流域にシフトしていた。それに伴い、アルミニウムについても、通常よりも上流側での加水分解に伴う沈殿生成の挙動が見られた。以上より、上記実証試験では、玉川源泉下流域の pH 改善と総酸度の低下が確認され、水質改善が促進された。

国内における化審法関連物質の排出源及び動態の解明

（平成 25 年度～平成 27 年度）

研究概要

当研究は、東京都環境科学研究所を中心とした国立環境研究所と地方公共団体環境研究機関等との共同研究である。この研究の調査対象の一つである有機フッ素化合物（PFCs）については、先行研究「有機フッ素化合物の環境実態調査と発生源の把握」により、全国における汚染実態や分析技術をデータベース化し、地方研究所間での情報の共有化が図られたところである。しかし、課題としては、詳細調査が実施されておらず実態が把握しきれていないこと、PFCs 前駆物質の環境中での挙動が完全に解明

できていないことがあげられる。また、PFCsの中でも残存性の高いパーフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）やパーフルオロオクタン酸（PFOA）といった物質の動向を特に注視していくことが重要であると結論付けられた。そこで本研究では、PFCsの動態解明を進めるとともに、地域ごとの検出状況を参考に発生源の追跡調査等を実施し、その結果を踏まえ現存するデータベースを強化することで、今後の環境行政に資することを研究目的としている。また、PFCs以外の残留性有機汚染物質（POPs）候補物質等についても、実態調査の実施により環境中濃度を把握し、今後の法規制等への判断に活用していく。

結果

平成25年度は、過去の測定データから高濃度汚染が判明している秋田運河水域を対象に、水

質中PFCsのモニタリング調査を行った。運河の流域及びその周辺の計12地点（バックグラウンド1地点を含む）にて河川水をサンプリングし、PFOSやPFOA等の流域における汚染状況の把握を行った。分析は、本研究の分析実施機関の一つである国立環境研究所にて、LC/MS/MSを用いて行った。分析結果から、秋田運河中流域において、PFOSやPFOA等のPFCsが他地点と比較して高濃度になっていることが判明し、現在でもその付近において何らかの形でPFCsの水域への流出が続いていることが懸念される。

今後の方針として、秋田運河流域の詳細調査や周辺の地下水調査により汚染状況の把握と流出源の特定を進め、この流域におけるPFCs汚染状況とその動態について詳細を明らかにしたいと考える。

Ⅲ 調查研究報告

感染症対策事業

秋田県内の医療機関における AmpC 型 β ラクタマーゼ産生菌の 分離状況と薬剤感受性の解析結果

檜尾拓子 熊谷優子 今野貴之 高橋志保 和田恵理子 八柳 潤

AmpC 型 β ラクタマーゼ産生菌のうち AmpC 過剰産生株、プラスミド性 AmpC 産生株は基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌と同様に第 3 世代セフェム系抗生物質等に耐性を示すことから、院内感染原因菌として重要視されている。しかしながら、医療機関で実施可能な AmpC 産生菌の簡便な検査法がこれまで普及していなかったことから、秋田県内の医療機関における AmpC 産生菌の分離状況は不明であった。近年、AmpC 産生菌を簡便に検出可能な AmpC/ESBL 鑑別ディスクが市販されたので、今回これを使用して秋田県内の AmpC 産生菌の分離状況と薬剤感受性について調査した。その結果、平成 25 年 4 月から平成 26 年 2 月まで、県内の医療機関から第 3 世代セフェム系抗生物質耐性のため ESBL 産生疑い株として送付された 636 株のうち、52 株 (8.2%) が AmpC 産生菌であることが明らかとなった。AmpC 産生菌 52 株のうち *E.coli*、*Enterobacter* 属菌、*Citrobacter* 属菌の計 22 株が第 3 世代セフェム系薬の CTX と CAZ の両方に耐性を示した。そのうち、*Enterobacter* 属菌、及び今回確認された *Citrobacter* 属菌は AmpC 過剰産生株であるか、薬剤の誘導により AmpC 産生量が過剰となった株である可能性が考えられた。また、*E.coli* 16 株のうち 4 株がプラスミド性 *ampC* 遺伝子の一種である *bla*_{CMY-2} 遺伝子を保有する株であることが明らかとなり、秋田県内の医療機関にプラスミド性 *ampC* 遺伝子保有株が存在することが初めて確認された。由来については、今回確認された AmpC 産生株の 38.5% が尿由来であった。尿は院内感染の重要な感染源であることから、AmpC 産生株が ESBL 産生菌と同様に尿を介して院内感染を引き起こす可能性に留意する必要がある。耐性菌の蔓延防止と適切な抗菌薬治療の確保のために、今後も秋田県における AmpC 産生菌等、耐性菌の検出動向調査を継続する必要がある。

1. 緒言

AmpC 型 β ラクタマーゼ (AmpC) は Ambler の分類により ClassC に分類され、セファロスポリナーゼとも呼ばれる。多くのグラム陰性桿菌に分布し、ペニシリン系薬とセファロスポリン系薬を加水分解する酵素である。AmpC の構成遺伝子は *ampC* 遺伝子によりコードされ、*ampC* の局在部位の違いにより、非伝達性の染色体性 AmpC と、伝達性のプラスミド性 AmpC に分類される。

染色体性 AmpC 産生株のうち、産生調節機構に関与する遺伝子 (*ampR*, *ampD*) に変異が生じ、調節機構が破綻した株では AmpC が過剰産生され、ESBL 産生株と同様に第 3 世代セフェム系抗生物質に耐性を示す¹⁾。

一方、プラスミド性 AmpC は同様に第 3 世代セフェム系薬に耐性を示すが ESBL と異なり、

セファマイシン、オキサセフェム系抗生物質にも耐性を示す²⁾。加えて、プラスミド性 AmpC は *ampC* 遺伝子をコードするプラスミドが菌種を超えて拡散する可能性があり臨床上大きな問題である。プラスミド性 AmpC の遺伝子は、染色体上に存在する *ampC* 遺伝子がプラスミドに転移したと考えられており、*Enterobacter* 属由来の ACT-1/MIR-1 型、*Citrobacter freundii* 由来の CMY/LAT 型、*Morganella morganii* 由来の DHA 型、*Hafnia alvei* 由来の ACC 型、及び *Aeromonas* 属由来の CMY/MOX 型と FOX 型の 6 種類が知られている³⁾。これらのうち、国内では CMY/LAT 型に属する CMY-2 の分離頻度が高いとされる^{4, 5)}。染色体性 *ampC* 遺伝子を保有しない *Klebsiella* 属菌、*Proteus mirabilis*、*Salmonella* 属菌等、あるいは染色体性 *ampC* 遺伝子を保有するものの、通常は AmpC 産生量が

非常に少ない *E.coli* 等の菌が薬剤感受性パターンから AmpC 産生が疑われる場合、プラスミド性 AmpC 産生の可能性が考えられることから、プラスミド性 *ampC* 遺伝子の検出や AmpC 産生能の確認が必要となる。

現在、医療現場では第3世代セフェム耐性菌が問題となっている。従って、ESBL等と併せて AmpC 産生株の動向を把握することが重要であるが、医療機関の検査室で簡便に実施可能な AmpC 産生の確認方法は実用化されていなかった。このため、秋田県内の医療機関における AmpC 産生菌の分離状況は不明であった。

近年、AmpC の阻害剤と ESBL の阻害剤を組み合わせたディスク法により AmpC 産生と ESBL 産生を簡便に検査可能な AmpC/ESBL 鑑別ディスク（関東化学）が市販され、AmpC 産生の有無を手軽に確認することが可能となった。

そこで今回、秋田県の医療機関における AmpC 産生菌の分離状況と分離株の薬剤感受性、及び *E.coli* を対象としたプラスミド性 *ampC* 遺伝子保有株の検索を行ったので報告する。

2. 方法

2.1 供試株

平成25年4月から平成26年2月まで、医療機関から ESBL 産生疑い株として当センターに送付された636株のうち、ESBL 遺伝子の一種である CTX-M 陰性であった株について、AmpC/ESBL 鑑別ディスク（関東化学）を使用し、AmpC 産生株と判定された52株（CTX-M 陽性の *M.morganii* 1株含む）を供試した。

2.2 菌種同定

供試株の菌種についてはアピ20E（シスメックス・バイオメリュー）及び16SrRNA シークエンス解析⁶⁾により同定した。

2.3 薬剤感受性試験

米国臨床検査基準委員会（CLSI）標準法のドライプレート‘栄研’（DP31）を用いて微量液体希釈法により最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。供試薬剤は、ピペラシリン（PIPC）、セファゾリン（CEZ）、セフォチアム（CTM）、セフォタキシム（CTX）、セフトジジム（CAZ）、

セフェピム（CFPM）、フロモキシセフ（FMOX）、セフポドキシム（CPDX）、スルバクタム/アンピシリン（S/A）、アズトレオナム（AZT）、イミペネム（IPM）、メロペネム（MEPM）、ゲンタマイシン（GM）、アミカシン（AMK）、ミノサイクリン（MINO）、ホスホマイシン（FOM）、スルファメトキサゾールトリメトプリム（ST）、レボフロキサシン（LVFX）の18薬剤である。

2.4 プラスミド性 *ampC* 遺伝子の検出と同定

供試株のうち *E.coli* と同定された16株について、Pérez-Pérez らの報告した PCR 法⁷⁾を用いてプラスミド性 *ampC* 遺伝子の検出を行った。

EBC, CIT, DHA, ACC, MOX, FOX プライマーの6種類の反応系のうち CIT 型が陽性となった株については、*bla*_{CMY-2} 遺伝子の ORF 全長を増幅するプライマー CMY-2F (5'-atg atg aaa aaa tcg tta tgc-3') と CMY-2R (5'-tta ttg cag ctt ttc aag aat-3') を用いる PCR により増幅された DNA 断片を精製した後、ダイレクトシーケンスにより増幅断片の DNA シークエンスを決定し、BLAST により *bla*_{CMY-2} 遺伝子と一致するか確認した。

3. 結果と考察

3.1 AmpC 産生株の検出状況（菌種、由来）

医療機関から ESBL 産生疑い株として送付された636株のうち、52株（8.2%）が AmpC 産生株であった。このことから、医療機関で通常実施されている薬剤感受性試験では ESBL 産生株と AmpC 産生株を鑑別し同定することが困難であることが伺われた。

今回確認された AmpC 産生株の菌種を表1に、由来を表2に示す。

52株のうち、*E.coli* と *Enterobacter* 属菌が最も多く、それぞれ16株（30.8%）、*Serratia* 属菌7株（13.5%）、*Citrobacter* 属菌6株（11.5%）、*Morganella* 属菌5株（9.6%）と続いた。

52株のうち41株で由来が明らかであり、そのうち20株（38.5%）が尿由来であった。このことは、AmpC 産生株が県内の医療機関において尿路感染に関与していることを示していた。

秋田県で以前実施した調査⁷⁾では ESBL 産生

表1 供試株の菌種

属名	種名	菌数 (n=52)	
<i>Escherichia</i> 属	<i>E.coli</i>	16	16 (30.8%)
<i>Enterobacter</i> 属	<i>E.aerogenes</i>	7	
	<i>E.cloacae</i>	7	
	<i>E.cloacae</i> complex	1	16 (30.8%)
	<i>E.kobei</i>	1	
<i>Citrobacter</i> 属	<i>C.braakii</i>	3	
	<i>C.freundii</i>	2	6 (11.5%)
	<i>C.murliniae</i>	1	
<i>Serratia</i> 属	<i>S.marcescens</i>	6	7 (13.5%)
	<i>Serratia sp.</i>	1	
<i>Morganella</i> 属	<i>M.morganii</i>	5	5 (9.6%)
<i>Hafnia</i> 属	<i>H.alvei</i>	1	1 (1.9%)
<i>Providencia</i> 属	<i>P.stuartii</i>	1	1 (1.9%)

表2 AmpC産生株 (52株) の由来

由来	株数 (%)
尿	20 (38.5)
喀痰	12 (23.1)
胆汁	4 (7.7)
血液	2 (3.8)
子宮	1 (1.9)
膿	1 (1.9)
創部	1 (1.9)
不明	11 (21.2)

菌が高頻度に尿から検出されており、尿は院内感染の重要な感染源であることが指摘されている。AmpC産生菌もESBL産生菌と同様に尿を介して院内感染を引き起こす可能性が考えられることに留意する必要がある。

3.2 薬剤感受性試験成績

供試薬剤のうち、CLSIにおいてブレイクポイントが設定されているβラクタム系抗生物質10薬剤に対する供試株の薬剤感受性を表3に示す。

Enterobacter 属菌12株、*Citrobacter* 属菌6株、*E.coli* 4株が第3世代セフェム系抗生物質であるCTXとCAZの両方に耐性を示した。

E.cloacae、*C.freundii* は保有する染色体性

ampC 遺伝子がPérez-PérezらのPCR法で交差反応することから⁷⁾プラスミド性*ampC* 遺伝子の存在をPCRによって検討することは出来なかった。一方、*E.cloacae*、*C.freundii* 以外でCTXとCAZに耐性を示した*Enterobacter* 属菌、*Citrobacter* 属菌でのプラスミド性*ampC* 遺伝子の関与については今後の検討課題であるが、*Enterobacter* 属菌と今回確認された*C.braakii*、*C.freundii*、*C.murliniae* も、染色体性AmpCを産生する株であることが報告されている⁸⁾。このため、CTXとCAZの両方に耐性を示した株はAmpC過剰産生株か、薬剤によりAmpC産生が強く誘導されるタイプの株である可能性が高いと考えられる。*Enterobacter* 属菌と*Citrobacter* 属菌にESBL産生株は殆ど認められないが⁹⁾、AmpCの過剰産生などと考えられる機構により第3世代セフェム系抗生物質に耐性を示す株が存在することが確認されたことから、県内におけるこれらの株の今後の分離動向に注目する必要がある。

一方、第4世代セフェム系抗生物質であるCFPM、カルバペネム系抗生物質であるMEPMに耐性を示す株は認められず、IPMに耐性を示した株は52株中1株のみであり、今回確認されたAmpC産生株は第4世代セフェムとカルバペネムに対して感受性が保持されていることが確認された。

3.3 プラスミド性 *ampC* 遺伝子保有株の検出状況と薬剤感受性

*E.coli*16株について、プラスミド性*ampC* 遺伝子を検索した結果を表4に、*bla*_{CMY-2} 遺伝子陽性*E.coli*の薬剤感受性を表5に示す。

16株中4株(25%)からプラスミド性*ampC* 遺伝子が検出された。検出されたプラスミド性*ampC* 遺伝子は4株全てCIT型であり、シーケンス解析の結果、いずれもプラスミド性AmpCをコードする*bla*_{CMY-2} 遺伝子であることを確認した。

また、表5に示すとおり、4株の*bla*_{CMY-2} 遺伝子陽性*E.coli*はいずれもCTXとCAZに耐性を示すことが確認され、これらの4株はプラスミド性*ampC* 遺伝子を保有しない*E.coli*と比較して第3世代セフェム系抗生物質に強い耐性を

表3 薬剤感受性試験結果

菌種 (菌株数)	耐性菌数 ^{a)} (%)									
	PIPC*	CEZ	CTX	CAZ	CFPM	CPDX	S/A*	AZT	IPM	MEPM
<i>Escherichia</i> 属 <i>E.coli</i> (16)	3(18.8)	13(81.3)	4(25)	4(25)	0(0)	13(81.3)	6(37.5)	1(6.3)	0(0)	0(0)
<i>Enterobacter</i> 属(16)	5(31.3)	16(100)	14(87.5)	12(75)	0(0)	16(100)	15(93.8)	13(81.3)	0(0)	0(0)
<i>E.aerogenes</i> (7)	1(14.3)	7(100)	5(71.4)	4(57.1)	0(0)	7(100)	6(85.7)	5(71.4)	0(0)	0(0)
<i>E.cloacae</i> (7)	4(57.1)	7(100)	7(100)	6(87.5)	0(0)	7(100)	7(100)	6(87.5)	0(0)	0(0)
<i>E.cloacae complex</i> (1)	0(0)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	0(0)
<i>E.kobei</i> (1)	0(0)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	0(0)
<i>Citrobacter</i> 属 (6)	2(33.3)	6(100)	6(100)	6(100)	0(0)	6(100)	6(100)	6(100)	0(0)	0(0)
<i>C.braakii</i> (3)	1(33.3)	3(100)	3(100)	3(100)	0(0)	3(100)	3(100)	3(100)	0(0)	0(0)
<i>C.freundii</i> (2)	0(0)	2(100)	2(100)	2(100)	0(0)	2(100)	2(100)	2(100)	0(0)	0(0)
<i>C.murlinae</i> (1)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	0(0)
<i>Hafnia</i> 属 <i>H.alvei</i> (1)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>Morganella</i> 属 <i>M.morganii</i> (5)	5(20)	5(100)	2(40)	0(0)	0(0)	5(100)	2(40)	0(0)	1(20)	0(0)
<i>Providencia</i> 属 <i>P.stuartii</i> (1)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>Serratia</i> 属 (7)	1(14.3)	7(100)	3(42.9)	0(0)	0(0)	6(85.7)	7(100)	1(14.3)	0(0)	0(0)

^{a)}: CLSI 判定基準に準拠

*: PIPC 64 µg/mlで発育, S/A 8/16 µg/mlで発育したもの

示す傾向が認められた。

なお、プラスミド性 *ampC* 遺伝子を保有していなかった 12 株の *E.coli* も AmpC/ESBL 鑑別ディスクにより AmpC 産生が陽性であることが示された株である。これらの株は *ampC* 遺伝子のプロモーターの変異などにより染色体性 AmpC の産生量が増加したため、鑑別ディスクで AmpC 産生を確認できたものと思われる。

今回の調査により、秋田県内の医療機関においてプラスミド性 AmpC の 1 種である CMY-2 を産生する *E.coli* が初めて確認された。これら CMY-2 産生の 4 株は CTX, CAZ に耐性を示した。また、4 株中 1 株が尿から分離された株、もう 1 株が血液から分離された敗血症起因菌と考えられる株であった。このようなことから、プラスミド性 AmpC 産生 *E.coli* も ESBL 産生菌と同様に院内感染対策や臨床問題となる可能性が懸念される。

染色体性 *ampC* 遺伝子とは異なり、プラスミド性 *ampC* 遺伝子はプラスミドの接合伝達により菌種を超えて拡散することが問題である。今回確認されたプラスミド性 AmpC 産生株は *E.coli* のみであったが、今後プラスミドの拡散により他菌種にもプラスミド性 AmpC 産生株が出現する可能性があることから、県内における検出動向を注視する必要がある。

これまで AmpC 産生菌の簡便な検査法がな

表4 プラスミド性 *ampC* 遺伝子の検出状況

<i>E.coli</i> (16株) 菌株No.	遺伝子	由来
4	—	不明
5	—	不明
6	—	気管内採痰
8	CIT型 <i>bla</i> _{CMY-2}	不明
10	—	採尿カテーテル
13	—	採尿カテーテル尿
14	CIT型 <i>bla</i> _{CMY-2}	尿
23	—	尿
28	—	喀痰
29	—	動脈血
37	—	カテ尿
38	CIT型 <i>bla</i> _{CMY-2}	血液
39	—	胆汁
40	CIT型 <i>bla</i> _{CMY-2}	不明
49	—	尿
50	—	子宮内容物

く、また、*E.coli* にみられるように、染色体性 *ampC* 遺伝子を保有するにもかかわらず AmpC 産生量が非常に少ない株も存在することから、PCR 法によっても AmpC 産生株を正確に特定することはできなかった。このため、秋田県における AmpC 産生株の検出状況が不明であった。しかし、近年市販された AmpC/ESBL 鑑別ディスクとプラスミド性 *ampC* 遺伝子検出用の PCR 法を用いて実施した今回の調査により初めて AmpC 産生株の秋田県における感染疫学の一

表5 *E. coli* の β -ラクタム系抗生物質に対する感受性

菌株No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
	PIPC	CEZ	CTX	CAZ	CFPM	CPDX	S/A	AZT	IPM	MEPM
4	64	>16	1	4	≤ 0.5	>4	>8/16	2	≤ 0.25	≤ 0.25
5	32	4	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	1	>8/16	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.25
6	4	8	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	>4	4/8	1	≤ 0.25	≤ 0.25
8	32	>16	8	16	≤ 0.5	>4	8/16	4	≤ 0.25	≤ 0.25
10	4	8	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	>4	8/16	1	≤ 0.25	≤ 0.25
13	4	4	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	4	4/8	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.25
14	16	>16	8	16	≤ 0.5	>4	8/16	4	≤ 0.25	≤ 0.25
23	32	>16	2	8	≤ 0.5	>4	>8/16	8	≤ 0.25	≤ 0.25
28	16	16	≤ 0.5	4	≤ 0.5	>4	4/8	2	≤ 0.25	≤ 0.25
29	>64	>16	1	4	≤ 0.5	>4	>8/16	2	≤ 0.25	≤ 0.25
37	16	>16	1	2	≤ 0.5	>4	8/16	4	≤ 0.25	≤ 0.25
38	>64	>16	>32	>16	2	>4	>8/16	>16	≤ 0.25	≤ 0.25
39	4	16	2	1	≤ 0.5	>4	8/16	1	≤ 0.25	≤ 0.25
40	>64	>16	32	>16	≤ 0.5	>4	>8/16	8	≤ 0.25	≤ 0.25
49	4	2	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	4	4/8	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.25
50	16	>16	1	2	≤ 0.5	>4	8/16	4	≤ 0.25	≤ 0.25

■ : プラスミド性 *ampC* 遺伝子保有株

を明らかにすることができた。

秋田県内における耐性菌の蔓延防止と適切な抗菌薬治療の確保のために、今後も AmpC/ESBL 鑑別ディスクとプラスミド性 *ampC* 遺伝子検出用 PCR 法により AmpC 産生株の検出動向調査を継続する必要がある。

参考文献

- 1) 山崎勝利,小松方: AmpC 型 β -ラクタマーゼ過剰産生菌,臨床と微生物,**40**,3,2013.5,225-231
- 2) 小栗豊子: 臨床微生物検査ハンドブック,三輪書店,2011,302.
- 3) 中家歩美,山崎勝利,他: 日本赤十字社和歌山医療センターでアウトブレイクが疑われた ESBL およびプラスミド性 AmpC 同時産生 *Klebsiella pneumoniae* に関する解析,日本臨床微生物学雑誌,**24**,2,2014,39-45.
- 4) Yamasaki K,Komatsu M,Abe N et al: Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC β -lactamases in Kinki Region of Japan.J. Clin. Microbiol., **48**,9,2010,3267-3273.
- 5) 山崎勝利,小松方,他: 2011 年に臨床材料から

分離したプラスミド性 AmpC β -lactamase 産生腸内細菌の調査,日本臨床微生物学雑誌,**23**,3,2013,20-27.

- 6) Ferroni A.Serment-Gaudelus,Abachin E et al : Use of 16SrRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center J.Clin.Microbiol.,**40**,10,2002,3793-3797.
- 7) Pérez-pérez F.J.,Hanson N.D. : Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases genes in clinical isolated by using multiplex PCR. J.Clin.Microbiol., **40**,6,2002,2153-2162.
- 8) George A. Jacoby : AmpC β -Lactamases,Clin. Microbiology Reviews,**22**,1,2009,161-182.
- 9) 八柳潤,今野貴之,齊藤志保子: 秋田県内の医療機関における CTX-M 基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離状況,秋田県健康環境センター年報,**6**,2010,40-45.

サルモネラ菌の迅速な同定のための検出法及び血清型別法の確立（平成 25～26 年度）

稀な血清型 Agbeni が同定された 3 件のサルモネラ感染事例の解析

今野貴之 高橋志保 熊谷優子 檜尾拓子 和田恵理子 村山力則 八柳 潤

平成 25 年 8 月 27 日から 9 月 11 日にかけて、サルモネラ血清型 Agbeni (O13,23:g,m,[t]:-) の感染事例を 3 件確認した。稀な血清型が複数確認されたことから、3 株の抗原遺伝子について PCR 法により確認するとともに、薬剤感受性、パルスフィールドゲル電気泳動法による DNA パターンの比較解析を行った。3 株の解析結果はほぼ一致しており、事例間の関連性が疑われた。医療機関の情報から、感染源としてペットのミドリガメが推定されたため、爬虫類に起因するサルモネラ症について、感染症週報等を活用して注意喚起を行った。調査研究で行っている PCR 法は、複数の抗原遺伝子を同時に検出できるため迅速に血清型を推定することが可能である。また、本事例のように稀な血清型が同定された場合は、従来の血清型別法と組み合わせることでより正確な血清型の同定に役立つと考えられた。

1. はじめに

サルモネラは、ヒトに感染すると腸炎などを引き起こし、従来から最も重要な食中毒起因菌のひとつである。サルモネラに起因する健康被害の防止対策の構築には、食中毒及び感染症のサーベイランスが重要であり、それには血清型別による疫学的な解析は必須である。平成 25 年度からの調査研究事業では、サルモネラによる食中毒、感染症発生の際の迅速な検査体制の構築を目的に、サルモネラの遺伝子解析法による検出法及び血清型別法の検討を行っている。

サルモネラの血清型は、主に菌体表面の O 抗原と 2 つのべん毛抗原の組み合わせ (O:H1:H2) で決定され、これまでに 2,500 以上の血清型が報告されている。そのうち、ヒトに病原性を示す *Salmonella enterica* の亜種 I には、それぞれの血清型に固有の血清型名が付けられている。サルモネラの場合、この血清型名が菌種名のように使用される場合が多いのが特徴である。

ヒト由来サルモネラの検出数は、これまで Enteritidis 及び Infantis という血清型が常に上位を占めてはいるものの、それ以外の血清型も多く確認されている¹⁾。今回、その中でも稀なサルモネラ血清型 Agbeni の感染事例を 3 件確認し、調査研究事業で検討している遺伝子解析法を試行したので、その解析結果を報告する。また、稀な血清型が複数確認されたことから、薬剤感受性とパルスフィールドゲル電気泳動法に

よる DNA パターンの比較を行うとともに、医療機関から感染源等の情報を収集したので併せて報告する。

2. 材料と方法

2.1 菌株

菌株は、秋田厚生医療センター、市立秋田総合病院、秋田県総合保健事業団児桜検査センターの協力により分与を受けた。

2.2 血清型別

O 群別は、血液寒天培地上の菌を掻き取り、スライドガラス上で各 O 群血清と混和し、特異的な凝集反応を確認した。

H 型別は、増菌した BHI 培養液に 3%ホルマリン加生理食塩水を加えた抗原液と各 H 型血清を混和し、特異的な凝集反応を確認した。2 つ目の H 抗原を誘導するため、陽性となった H 型の血清を含む相誘導培地に菌を接種し、菌の運動性を確認した。

2.3 PCR 法によるサルモネラの確認及び抗原遺伝子の解析

サルモネラの確認は、サルモネラに特異的な *invA* 遺伝子と亜種 I に特異的とされる STM4057 遺伝子領域を対象にして、Lee ら²⁾の方法を改変して行った。抗原遺伝子の解析については、Franklin ら³⁾の方法を参考に O13 群の *wzx*,

Maurer ら⁴⁾の方法を参考に H1:g,m の *fliC*, H2;1 complex 及び H2;e,n complex の *fljB* を検出することにより行った。

2.4 薬剤感受性試験

アンピシリン, ホスホマイシン, ノルフロキサシン, ゲンタマイシン, テトラサイクリン, クロラムフェニコールの6剤を対象に, ディスク法により行った。

2.5 パルスフィールドゲル電気泳動法による分子疫学的解析

サンプルプラグの調製は既報に従い行った⁵⁾。制限酵素は *XbaI* 及び *NotI* を使用した。泳動条件は, GenePath program 12 (*NotI*)もしくは 16 (*XbaI*) に従った。

3. 結果と考察

3.1 血清型 Agbeni の同定について

事例は,平成25年8月27日から9月11日にかけて確認された。患者は2歳男児,4歳女児,4ヶ月の乳児で,同一市内に在住していた。分離された3株は市販の抗血清を用いた血清型別で O13 群, H1 抗原が g,m, H2 抗原は検出されなかった。血清型を特定するため, Statens Serum Institute の抗血清を用いて O13 群の副抗原 (O22, O23) の検出を行ったところ, 3株はいずれも O23(+)であり, 血清型 Agbeni と同定された(表1)。Agbeni が確認された事例は非常に稀であり, 秋田県では今回初めてであった。国内では, 平成21年に東京都から1件報告がある⁶⁾。また, 海外では平成23年にカナダで患者8名の感染が確認され, 公衆衛生上の問題として注目された⁷⁾。稀な血清型であったことから, PCR 法によるサルモネラ及び亜種 I の確認と各抗原遺伝子の確認を併せて行った。3株はいず

れもサルモネラに特異的な *invA* 遺伝子 (+), 亜種 I に特異的な STM4057 (+), O13 *wzx* (+), H1:g,m *fliC* (+), H2;1 及び H2;e,n *fljB* については(-)であることが確認された(図1)。PCR 法でも従来の血清型別法と一致した結果が得られたことから, 迅速に血清型を推定することが可能な PCR 法は, 感染症の発生動向を把握する上で非常に有用であると考えられた。また, サルモネラの血清型別は, 煩雑で誤同定されるケースもあることから⁸⁾, 本事例のように稀な血清型が分離された場合には, PCR 法により抗原遺伝子の検出を行うことでより正確な血清型の同定が可能であると考えられた。

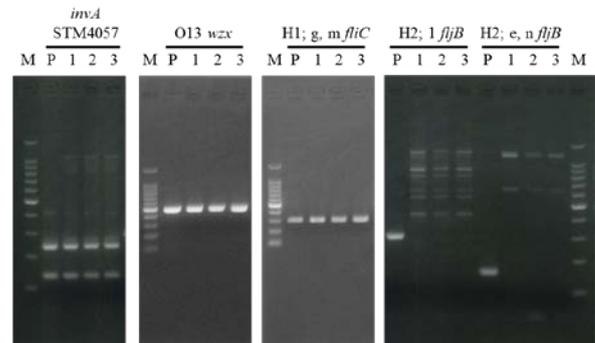


図1 サルモネラの確認と抗原遺伝子の検出
invA (244 bp), STM4057 (137 bp), O13 *wzx* (502 bp), H1; g,m *fliC* (309 bp), H2; 1 complex *fljB* (294 bp), H2; e,n complex *fljB* (152 bp).
Lane M : 100 bp DNA size ladder (Takara),
P : positive control,
1: Sa2675, 2: Sa2680, 3: Sa2681

3.2 分離株の分子疫学的な解析

非常に稀な血清型が複数確認されたことから, 3株の薬剤感受性試験と PFGE 法による菌の DNA パターンを比較した。薬剤感受性試験の結果, 3株は供試した6剤にはいずれも感受性であった。また, PFGE 法の結果, 制限酵素として *NotI* を使用した場合はいずれも同一, *XbaI* を使用した場合は1株がバンド1本異なるのみであった(図2)。今回, 患者同士の接点については不明であったが, 患者の発生地域は, 地理的に非常に近く, 関連性が疑われた。

医療機関からの情報によると, 初発の患者は直近にミドリガメを飼育し始めたとのことであり, 感染源としてはこのミドリガメが強く疑われた。

表1 菌株と血清型別結果の詳細

菌株No. 受付日	患者情報		血清型別		
	年齢	性別	O	H1	H2
Sa2675 8/27	2	男児	O13, 23	g, m	-
Sa2680 9/5	4	女児	O13, 23	g, m	-
Sa2681 9/11	4ヶ月		O13, 23	g, m	-

爬虫類を原因とする感染事例は国内外で散見されている。爬虫類の中でも、特にミドリガメは子供のペットとして人気が高いが、そのサルモネラ汚染は高率で、様々な血清型のサルモネラの保菌が確認されている⁹⁾。平成25年8月12日には米国での子ガメを原因とする感染事例の多発を受け厚生労働省から注意喚起を促す通知が出されている。当センターでは今回の事例確認後、感染症情報センターの感染症週報に爬虫類に起因するサルモネラ症についてトピックスを掲載し、改めて注意喚起を行った。

サルモネラの感染源としては食肉や鶏卵がよく知られている。しかしながら、牛、豚、鶏等の家畜以外にも、イヌ・ネコ等のペット、カメ・ヘビ等の爬虫類など様々な動物でサルモネラの保有が確認されていることから、動物と接触する際にはサルモネラへの感染予防に注意を払うことが大切である。

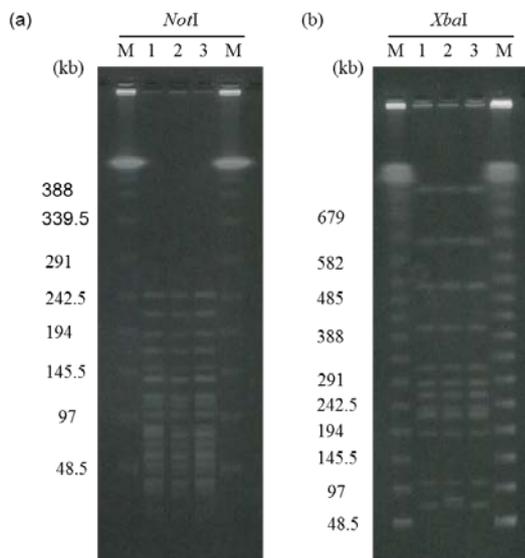


図2 PFGE法による菌のDNAパターンの比較
M: Size Marker,
1: Sa2675, 2: Sa2680, 3: Sa2681

参考文献

1) 国立感染症研究所ホームページ

<http://idsc.nih.go.jp/iasr/virus/bacteria-j.html>
ホーム>病原微生物検出情報 (IASR) >速報集計表・細菌

- 2) Lee K, Iwata T, Shimizu M, Taniguchi T, Nakadai A, Hirota Y, Hayashidani H: A novel multiplex PCR assay for *Salmonella* subspecies identification., *Appl. Microbio.*, **107**, 2009, 805-811.
- 3) Franklin K, Lingohr EJ, Yoshida C, Anjum M, Bodrossy L, Clark CG, Kropinski AM, Karmali MA: Rapid genoserotyping tool for classification of *Salmonella* serovars, *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 2011, 2954-2965.
- 4) Maurer JJ, Lee MD, Cheng Y, Pedroso A: An allelotyping PCR for identifying *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg, and Typhimurium, *J. Vis. Exp.*, **22**, 2011, 1-6.
- 5) Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ: Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet, *Foodborne Pathog. Dis.*, **3**, 2006, 59-67.
- 6) 東京都感染症情報センター: 東京都において分離された赤痢菌およびサルモネラの菌種、血清型および薬剤感受性について, 東京都微生物検査情報 (月報), **31**, 2009.
- 7) Taylor M, Brisdon S, Jeyes J, Stone J, Embree G, Paccagnella A, Hoang L, Galanis E: *Salmonella enterica* serovar Agbeni, British Columbia, Canada, 2011, *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 2012, 1542-1543.
- 8) Hendriksen RS, Mikoleit M, Carlson VP, Karlsmose S, Vieira AR, Jensen AB, Seyfarth AM, DeLong SM, Weill FX, Lo Fo Wong DM, Angulo FJ, Wegener HC, Aarestrup FM: WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for serotyping of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007, 2009, *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 2729-2736.
- 9) 黒木俊郎, 石原ともえ, 伊東久美子, 宇根有美: ミシシippアカミミガメの *Salmonella* 保有実態, 病原微生物検出情報, **30**, 2009, 212-213.

八郎湖水質調査事業

八郎湖水質調査事業における大腸菌群数および大腸菌数の推移と 分離された大腸菌の性状解析

高橋志保 熊谷優子 檜尾拓子 和田恵理子 今野貴之 八柳 潤

八郎潟の干拓事業によりできた八郎湖は、徐々に富栄養化が進み、水質汚濁の問題が顕在化している。当センターでは、八郎湖の水質保全対策の一環として水質環境基準調査を実施しており、調査実施項目の一つとして大腸菌群数を測定している。また、平成 24 年度からは、環境省が検討している「要測定指標」としての大腸菌数も併せて測定し、その推移を比較検討した。その結果、採水地点 5 カ所の大腸菌群数基準適合率は、33.3～66.7%であり、気温が高い時期に基準を超過する傾向にあった。一方、大腸菌数は大腸菌群数と比較して季節による大幅な変動は見られなかった。また、分離した大腸菌の生化学的性状試験や薬剤感受性試験等を実施したところ、下水処理水や生活雑排水の流入が少ないと思われる上流域由来の株と比較して、下流域由来の株ほど多様性を示しており、各種薬剤に対して多剤耐性を示す大腸菌株が存在した。このことは、ヒトの家庭生活環境が八郎湖流入河川に影響を及ぼしていることを示唆している。八郎湖流域河川等への汚濁負荷を少しでも減少させるためにも、下水道等への接続率の向上が望まれる。また、当センターとしても、適切に汚濁状況を把握できるよう、今後も調査を継続していく必要がある。

1. はじめに

八郎潟の干拓事業によりできた八郎湖には、約 20 の中小河川が流入している。湖水は主に干拓地の農業用水に利用されており、湖内では漁業が行われ、釣りなどの親水域としても利用されている。しかし、昭和 52 年に干拓事業が完了してから、八郎湖は徐々に富栄養化が進み、近年はアオコが大量発生するなど、水質汚濁の問題が顕在化している^{1, 2)}。

八郎湖流域の下水道等の整備率は平成 24 年度で 90%に達している¹⁾が、下水道に接続されていない集落においては、下水処理水や生活雑排水等の環境中への排出なども考えられ、河川への汚濁負荷の一因となっていると推察される。

当センターでは、公共用水域水質監視事業として、八郎湖に流入する河川水や湖水の水質環境基準調査を実施している。調査実施項目の一つに、糞便汚染の指標として大腸菌群数があるが、大腸菌群数には、土壌などの自然環境に由来する細菌も含まれるため、直接的な糞便汚染の指標としては適切ではないと考えられている。

環境省では環境基準項目として導入を検討し

ている指標を「要測定指標」と位置付けており³⁾、大腸菌数もそれに含まれている。今後、大腸菌数に項目が変更された場合、検査方法も変更されるため、今回、両方法での結果の比較を行うと同時に、大腸菌群数の結果の推移や、分離される大腸菌の性状等を解析することで、ヒトの家庭生活が流入河川に影響を与えているのか検討した。

2. 調査方法

2.1 対象検体

公共用水域水質監視事業の水質調査のため、図 1 に示す八郎湖へ流入する河川 5 地点（馬場目川上流の杉沢発電所と下流の竜馬橋、井川下流の井川橋、豊川下流の豊川橋、馬踏川下流の馬踏川橋）から採水された検体を供試した。

2.2 大腸菌群数の測定

平成 22～25 年度の偶数月に採水された検体を、「水質汚濁に係る環境基準について」⁴⁾に示された最確数による定量法で測定した。

2.3 大腸菌数の測定

平成 24～25 年度に毎月採水された検体を、平

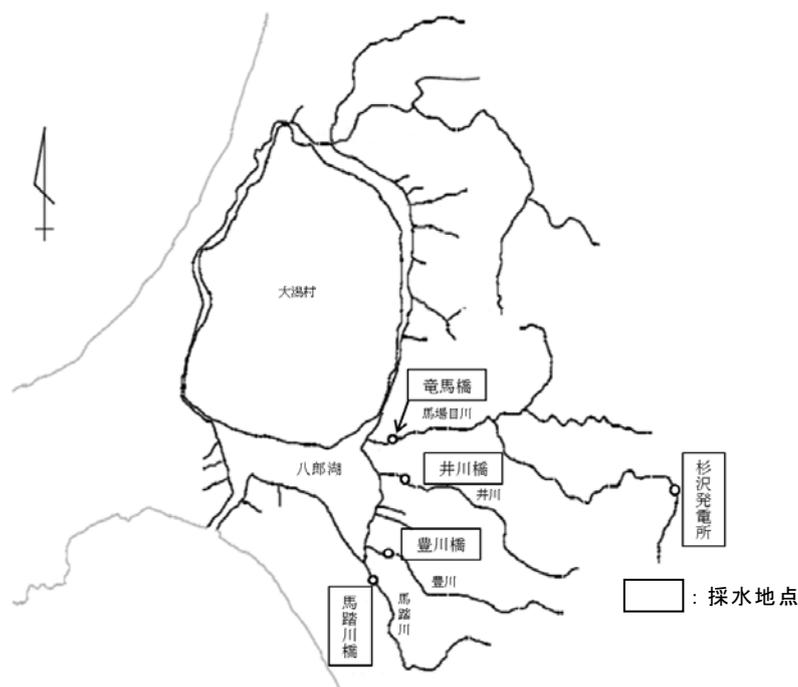


図1 公共用水域水質調査採水地点

成 23 年 3 月 24 日付け環水大発第 110324001 号「要測定指標の測定の実施について（協力依頼）」の別添 2「要測定指標（大腸菌数）の測定について」に示された「4. 大腸菌の測定法（案）（平成 23 年 3 月版）第 2 メンブランフィルター法」に従って検査を実施した。特定酵素基質寒天培地にはクロモアガー-ECC 培地を使用した。

37℃、18～24 時間培養後、メンブランフィルター上に発育した青～濃青色のコロニーを大腸菌と判定し、菌数を測定した。メンブランフィルター上には、紫色のコロニーを形成する大腸菌群が多数発育することから、菌数の測定は、青～濃青色のコロニーが 10～30 個になった希釈段階のフィルター上のコロニー数を計測し、希釈段階を乗じたあと、平均数を求め、大腸菌数とした。

2.4 大腸菌の単離

大腸菌数の測定後、メンブランフィルター上の青色のコロニーを無作為に釣菌し、クロモアガー-ECC 培地で再分離した。分離された単コロニーを普通寒天培地で純培養し、生化学的性状試験や薬剤耐性試験に供する株とした。

2.5 単離した大腸菌の性状等について

2.5.1 生化学的性状試験

TSI 培地、LIM 培地、クエン酸塩培地、CLIG 培地を用い、37℃、18～24 時間（クエン酸塩培地は 4～7 日間）培養し、各性状を確認した。

2.5.2 薬剤耐性試験および MIC 測定試験

馬場目川の上流と下流とで結果を比較できることから、杉沢発電所と竜馬橋で採水された検体から分離された大腸菌計 209 株（杉沢発電所由来 80 株、竜馬橋由来 129 株）を対象菌株とした。非典型的な性状を示す株もあるため、供試するすべての菌株について、大腸菌の 95% が陽性を示す⁵⁾β-D-glucuronidase をコードする遺伝子 (*uidA*) の確認を行った。

米国臨床検査基準委員会 (CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute) の指針を基に、薬剤添加ミュラーヒントン (MH) 寒天平板と、対照として薬剤無添加 MH 寒天平板を作製した。対象とした薬剤と最終濃度は、アンピシリン (ABPC) 32 μg/mL, カナマイシン (KM) 64 μg/mL, テトラサイクリン (TC) 16 μg/mL, ナリジクス酸 (NA) 32 μg/mL, スルファメトキサゾール (SMX) 76 μg/mL の 5 剤である。

対象菌株を滅菌生理食塩水に McFarland 0.5 となるように浮遊させ、区画した各平板に植菌し、発育した菌株について最小発育阻止濃度 (MIC : minimum inhibitory concentration) 測定

試験に供した。MIC 測定試験にはドライプレート‘栄研’を用い、ピペラシリン (PIPC)，セファゾリン (CEZ)，セフトリアム (CTM)，セフトキシム (CTX)，セフトジジム (CAZ)，セフェピム (CFPM)，フロモキシセフ (FMOX)，セフトドキシム (CPDX)，スルバクタム/アンピシリン (S/A)，アズトレオナム (AZT)，イミペネム (IPM)，メロペネム (MEPM)，ゲンタマイシン (GM)，アミカシン (AMK)，ミノサイクリン (MINO)，ホスホマイシン (FOM)，スルファメトキサゾールトリメトプリム (ST)，レボフロキサシン (LVFX) の 18 薬剤について実施した。

3. 結果と考察

3.1 大腸菌群数 (最確数法)

各地点の類型，大腸菌群数水質環境基準は表 1 のとおりである。各採水地点の大腸菌群数の推移を図 2-1，図 2-2 に示した。4 年間の基準適合率は，杉沢発電所 50.0%，竜馬橋 62.5%，井川橋 58.3%，豊川橋 66.7%，馬踏川橋 33.3% で，各地点とも気温が高い時期に基準を超過していた。

表 1 各地点の類型及び大腸菌群水質環境基準

採水地点	類型	環境基準
杉沢発電所	AA	50 MPN/100 mL 以下
竜馬橋	A	1,000 MPN/100 mL 以下
井川橋	A	1,000 MPN/100 mL 以下
豊川橋	B	5,000 MPN/100 mL 以下
馬踏川橋	A	1,000 MPN/100 mL 以下

MPN : Most Probable Number (最確数)

3.2 大腸菌数 (メンブランフィルター法)

100 mL あたりの各採水地点の大腸菌数の推移を図 3 に示した。各採水地点の大腸菌数は，平成 25 年 11 月の豊川橋の結果を除き，0~500 個/100 mL の幅で変動していた。

3.3 単離した大腸菌の性状等について

3.3.1 生化学的性状試験

表 2 に大腸菌の典型的な生化学的性状を示す。分離されたコロニーが典型的な性状を示した割合は，杉沢発電所 69.5%，竜馬橋 55.4%，井川橋 35.5%，豊川橋 54.2%，馬踏川橋 49.6%

であり，杉沢発電所以外の下流域の採水地点ほど，非典型的な性状を示すコロニーが存在していた。そのため，非典型的な性状であっても大腸菌と思われる分離株についてはすべて凍結し，保存株とした。

表 2 大腸菌の典型的な生化学的性状

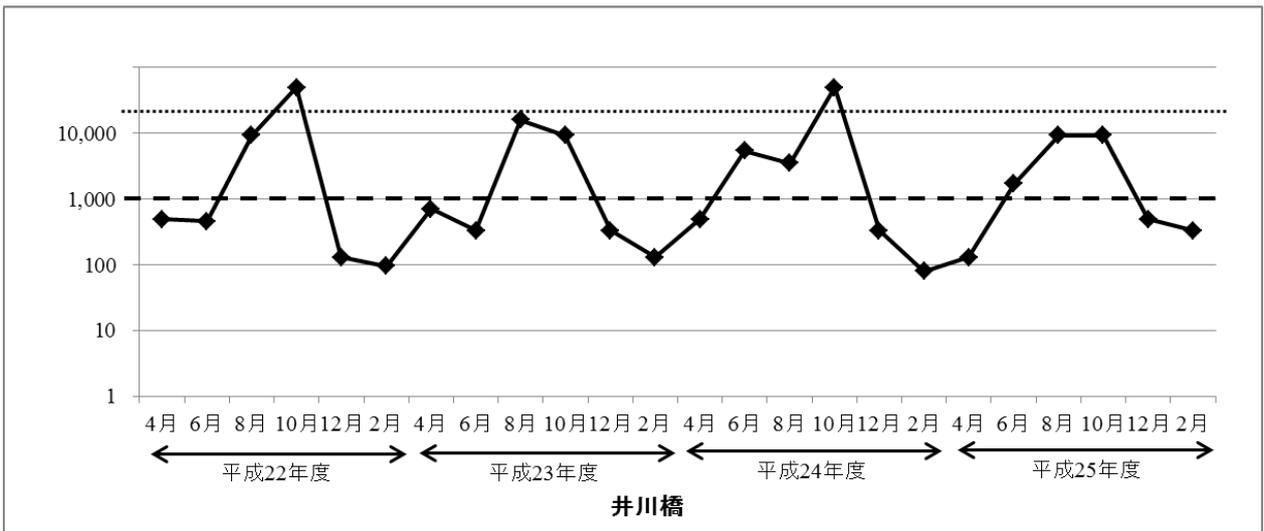
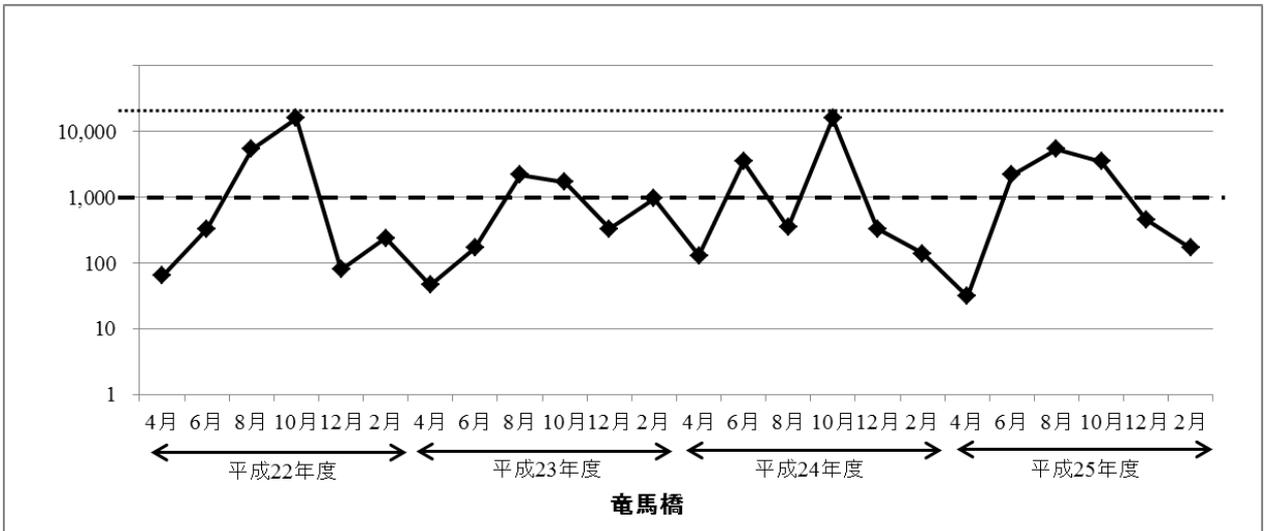
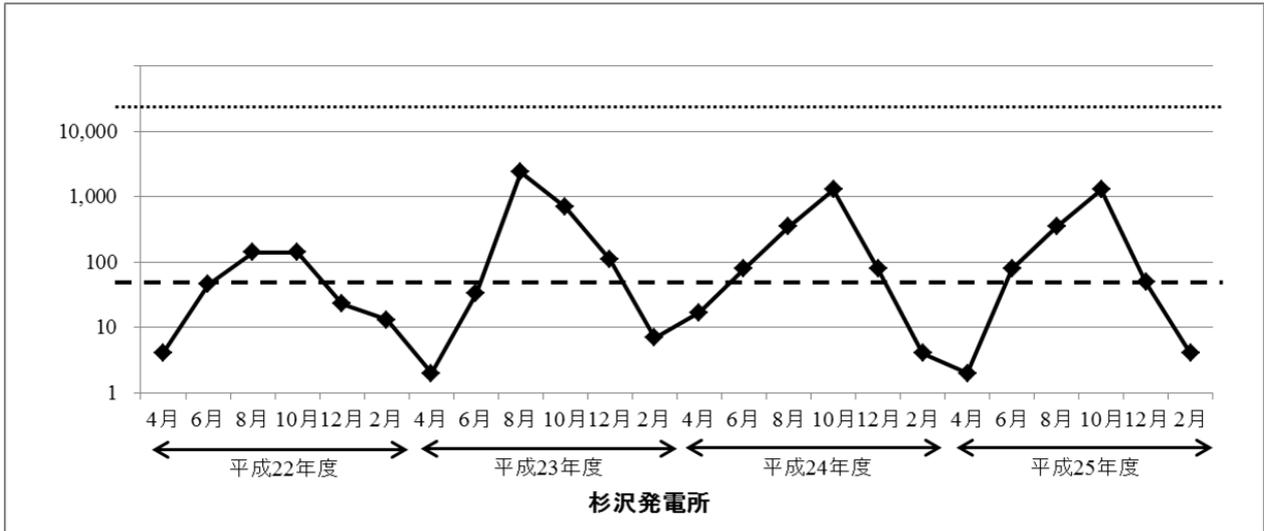
TSI 培地	斜面/高層	黄/黄
	ガス	+
	H ₂ S	-
LIM 培地	リジン	+
	インドール	+
	運動性	+
クエン酸塩培地		-
CLIG 培地	斜面/高層	赤/黄
	蛍光	+

3.3.2 薬剤耐性試験および薬剤感受性試験

表 3 に各薬剤添加 MH 寒天平板に対する耐性パターンを示す。杉沢発電所由来の大腸菌では，SMX のみに耐性を示したのが 6 株，AMPC および SMX の 2 剤に耐性を示したのが 1 株であった。SMX 添加 MH 寒天平板に発育した菌株は，対照とした薬剤無添加 MH 寒天平板と比較し，発育が悪かった。杉沢発電所由来の株は，KM，TC，NA 添加 MH 寒天平板には発育しなかった。竜

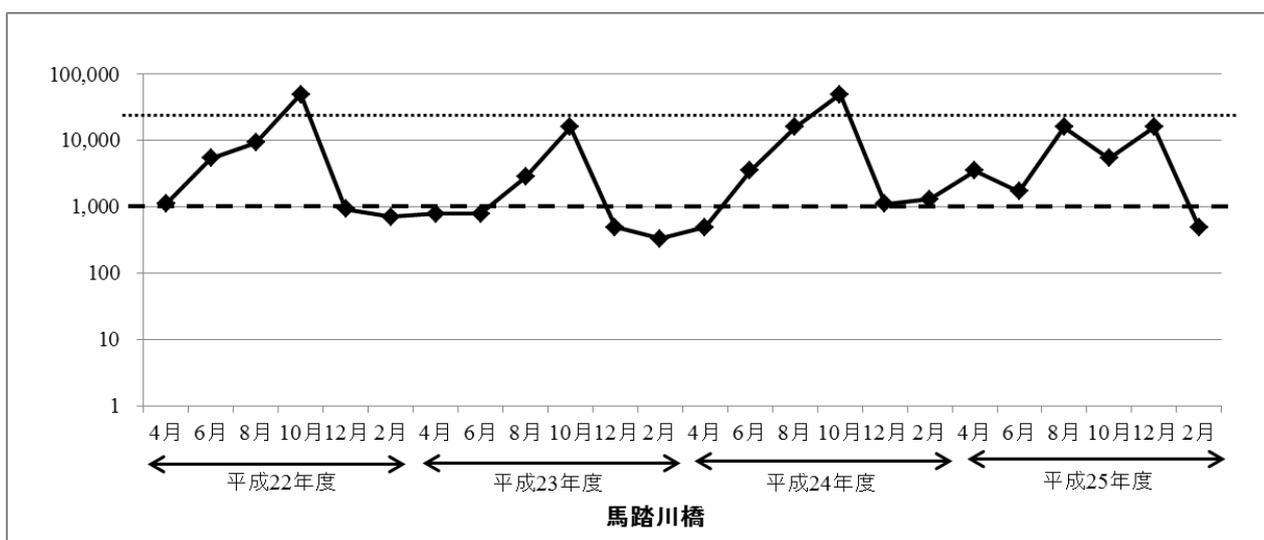
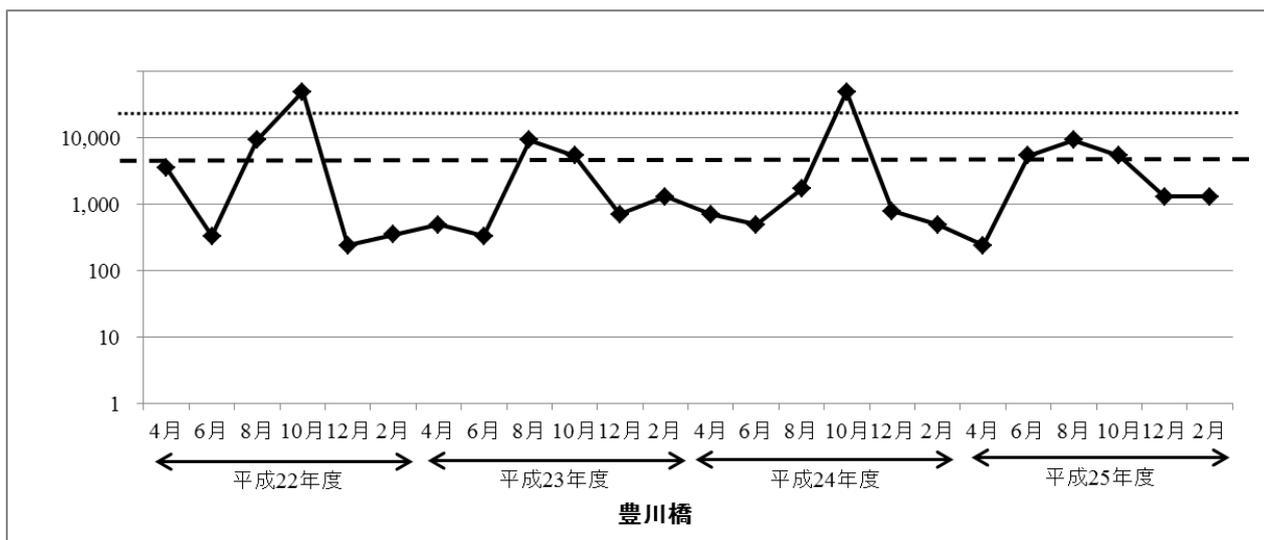
表 3 各薬剤添加 MH 寒天平板に対する耐性パターン

耐性パターン		杉沢 発電所	竜馬橋	
5 剤すべてに耐性なし		73	99	
いずれかに耐性		7	30	
内 訳	1 剤	AMPC	3	
		KM	1	
		TC	3	
		NA	8	
		SMX	6	6
	2 剤	AMPC,NA		2
		AMPC,SMX	1	
	3 剤	AMPC,TC,SMX		2
		AMPC,NA,SMX		2
		KM,TC,SMX		1
		TC,NA,SMX		1
	5 剤	AMPC,KM,TC,NA,SMX		1
	合計		80	129



- - - : 水質環境基準
 : 測定上限値* (MPN 24,000 / 100 ml)
 * : このラインを超えるデータは、最確数法にてすべての試験管が陽性となった検体

図 2-1 各採水地点の大腸菌群数の推移



- - - - : 水質環境基準
 : 測定上限値* (MPN 24,000 / 100 ml)
 * : このラインを超えるデータは、最確数法にてすべての試験管が陽性となった検体

図 2-2 各採水地点の大腸菌群数の推移

馬橋由来の大腸菌では、1剤のみに耐性を示した株が21株、2剤以上への多剤耐性を示した株が9株であり、そのうち1株は5剤すべてに耐性を示した。SMX添加MH寒天平板に発育した菌株は、対照とした薬剤無添加MH寒天平板と比較し、同等に発育した株と、発育が悪い株が存在した。

発育した株のMICは、CLSIの判定基準に照らし合わせ、それぞれ感性(S)、中等度耐性(I)、耐性(R)と判定した。杉沢発電所由来の耐性株7株については、対象としたすべての薬剤に対して感性(S)の範囲であった。

竜馬橋由来の耐性株については、30株のうち18株が対象としたすべての薬剤に対して感性(S)、6株が1剤もしくは2剤に中等度耐性(I)、6株が1～8剤に耐性(R)であった。

耐性(R)を示した菌株のデータを表4に示す。これらの薬剤耐性遺伝子の有無を確認したところ、No.1～3についてはTEM型βラクタマーゼ産生性の株であった。7～8剤に耐性を示したNo.4～6についてはCTX-M型の基質拡張型βラクタマーゼ(ESBL: Extended-spectrum β-lactamases)を産生する耐性遺伝子を保有していた。

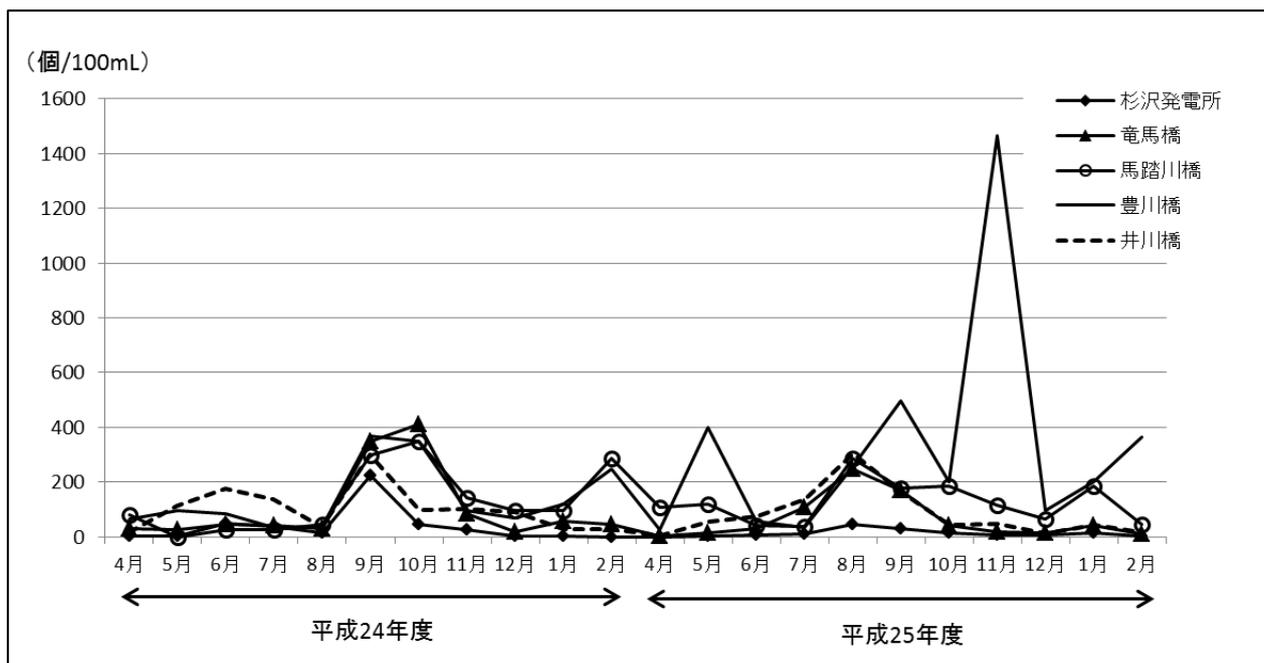


図3 各採水地点の大腸菌数の推移

表4 耐性株の薬剤感受性試験結果（一部抜粋）

No.	PIPC	CEZ	CTM	CTX	CAZ	CFPM	CPDX	S/A	AZT	ST	LVFX
1	R (>64)							I (8/16)			
2	I (32)	I (4)						I (8/16)		R (>38/2)	
3	R (>64)	I (4)						I (8/16)		R (>38/2)	R (>4)
4	R (>64)	R (>16)	R (>16)	R (32)		I (16)	R (>4)	R (>8/16)	R (16)		
5	R (>64)	R (>16)	R (>16)	R (32)		I (16)	R (>4)	R (>8/16)	R (16)		
6	R (>64)	R (>16)	R (>16)	R (>32)	I (8)		R (>4)	R (>8/16)	R (16)		R (>4)

PIPC : ピペラシリン
 CEZ : セファゾリン
 CTM : セフォチアム
 CTX : セフォタキシム
 CAZ : セフトアジジム
 CFPM : セフェピム
 CPDX : セフポドキシム
 S/A : スルバクタム / アンピシリン
 AZT : アズトレオナム
 ST : スルファメトキサゾール・トリメトプリム
 LVFX : レボフロキサシン

4. 考察

4年間の大腸菌群数の推移は、どの採水地点でも夏季を中心に環境基準を超過していることが多かったが、河川への糞便汚染が季節変動的に起こるとは考えにくい。また、下水処理水や生活雑排水等の流入が少ない馬場目川上流にあ

る杉沢発電所においても、環境基準適合率は50.0%でしかない。このことから、大腸菌群数の結果のみで、環境基準超過の原因が糞便汚染であったと結論付けられるものではないと思われる。気温あるいは水温が高くなり、土壌など自然環境由来の細菌が増殖するのに適した環境

となることから、大腸菌群数が増加する一因にもなっていると考えられる。

一方、大腸菌数は、大腸菌群数と必ずしも同じ挙動を示すわけではなく、年間を通してある程度の幅で変動しており、特定の時期に増加するなどの傾向は見られなかった。現段階では大腸菌数の基準値が設定されていないため、今回の結果が環境基準の適合範囲に含まれるのかは判断できない。しかし、大腸菌群数ほどの大きな変動は見られないことから、汚染指標として結果の比較がしやすいと考える。

また、採水地点ごとに大腸菌数を比較すると、馬場目川上流域にある杉沢発電所では大きな変動は見られず、平成24年9月を除き50個/100mL以下で推移しているが、各河川の下流域にある地点では、上流域より大腸菌数は明らかに多く、変動が大きい。加えて、薬剤感受性試験において、杉沢発電所由来の株は対象とした薬剤すべてに対して感性を示したのに対し、竜馬橋由来の株は高度耐性を示しただけではなく、詳細なデータは示さないが、当該株が産生するCTX-M型ESBLと、市販鶏肉や医療機関受診者から分離される大腸菌が産生するCTX-M型ESBLの遺伝子型が同一であった。さらに、竜馬橋由来の大腸菌株の生化学的性状および薬剤耐性パターンは多様であり、単一の由来ではないことが

窺える。このような結果から、河川下流域の汚濁負荷には、下水や生活雑排水の流入といった、ヒトの家庭生活環境が影響を及ぼしているものと推察される。

今回、八郎湖流入河川の水質調査結果をまとめたことにより、ヒトの家庭生活環境が八郎湖流入河川に影響を及ぼしていることが示唆された。八郎湖流域河川等への汚濁負荷を少しでも減少させるためにも、下水道等への接続率の向上が望まれる。また、当センターとしても、適切に汚濁状況を把握できるよう、今後も調査を継続していく必要がある。

参考文献

- 1) 秋田県：八郎湖に係る湖沼水質保全計画（第2期）。平成26年3月。
- 2) 秋田県生活環境部環境管理課：平成24年版環境白書（本編）。平成25年2月。
- 3) 環境省水・大気環境局水環境課長：環水大水発第110324001号 要測定指標の測定の実施について（協力依頼）。平成23年3月24日。
- 4) 環境省：環境省告示78号 水質汚濁に係る環境基準について。平成21年11月30日。
- 5) 坂崎利一：新訂 食水系感染症と細菌性食中毒，中央法規出版株式会社，2000，210-219。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的，疫学的調査解析機能の強化に関する研究

アシネトバクター属菌の感染疫学解明に関する研究

八柳 潤 鈴木匡弘*¹ 綿引正則*² 佐多徹太郎*²

国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を得ることを目的として、国立感染症研究所が全国の国立病院から収集した 998 株のアシネトバクター属菌疑い菌について菌種同定を行った。また、愛知県と秋田県で分離された *Acinetobacter baumannii* の MLST 解析、次世代シーケンサーを使用した全ゲノム解析データに基づいた *A.baumannii* International Clone II の系統樹解析と *A.baumannii* の薬剤耐性遺伝子の検索を実施した。菌種同定に供試した 998 株中 866 株がアシネトバクター属菌であり、そのうち *A.baumannii* が 74% (645 株) と最も多く、次いで *A.nosocomialis* 10%, *A.pittii* 7%, *A.sp.close to 13TU* 2% と続いた。MLST 解析の結果から秋田県と愛知県に *A.baumannii* International Clone II が侵淫していることが確認された。また、SNP 系統樹解析の結果から *A.baumannii* International Clone II についても地域に特異的な感染疫学が成立している可能性が示唆された。さらに、ジーンバンクに登録されているデータと併せた SNP 系統樹解析により、多剤耐性アシネトバクター (MDRA) が他の *A.baumannii* International Clone II クラスターに属する株と異なる起源と感染疫学を持つ可能性が示唆された。今回 *A.baumannii* と同定された 645 株のうち MDRA と確認された株は 2 株のみであったが、院内感染防止策構築の基礎となる MDRA の感染疫学に関して、今後さらなる調査が必要である。

1. 諸言

アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属菌は自然環境中に広く分布し、同じ非発酵菌である緑膿菌と同様にしばしば院内感染を惹起する。さらに、緑膿菌と異なり湿潤環境のみならず、乾燥状態にも耐えることから、ひとたび病院環境内に定着した場合、その除去は容易ではない。アシネトバクター属菌は 19 の Genomic Species に分類され、30 の reference strain が定められている¹⁾が、従来の生化学的性状試験等では種の同定が困難である。とりわけ、医療機関において分離頻度が高いとされる *A.baumannii*, *A.pittii*, *A.nosocomialis*, *A.calcoaceticus* は性状が互いに非常に類似しているために、医療機関等で汎用されている自動同定機器では鑑別が極めて困難であり、このことが国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学解明の大きな障害となっている。実際、JANIS (厚生労働省院内感染対策サーベイランス) の集計は医療機関における自動同定機による検査結果に立脚しているために、国内におけるアシネトバクター属菌

の分離実態が正確に反映されているとは言い難く、その実態は混沌としているのが現状である。

2008 年秋から 2009 年 1 月に福岡大病院で多剤耐性アシネトバクター (MDRA) の院内感染により、26 人が感染し 4 人が死亡するという事例が発生した。また、2010 年 2 月には帝京大学医学部附属病院で入院患者 46 名が MDRA に感染し、死亡者が計 27 名となる深刻な健康被害が発生した。このように、国内では MDRA による、深刻な健康被害を伴う院内感染が既に発生していることから対策を講じる必要があるが、国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見は極めて乏しいことが対策構築上の問題である。

本研究は、国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を得ることを目的として平成 24 年度から実施した。研究初年度である平成 24 年度は、秋田県と愛知県の医療機関において分離されたアシネトバクター属菌の菌種同定と薬剤感受性について検討し、

*¹ 愛知県衛生研究所, *² 富山県衛生研究所

A.baumannii, *A.pittii*, *A.nosocomialis*, *A.calcoaceticus*, *A. sp. Close to 13TU* の分離頻度が高いことを明らかにした一方、秋田県と愛知県で菌種分布に明瞭な違いがあることを示し、地域に特有の感染疫学が存在している可能性を指摘した。MDRA は確認されなかったものの *A.baumannii* には 5 剤以上の薬剤耐性を獲得した株が認められること、*A.baumannii* 以外のアシネトバクター属菌では比較的薬剤耐性株が少ないことを明らかにした。さらに、MLST 解析により愛知県には耐性傾向が強いといわれる European clone II²⁾ が存在していることも示し、これまで殆ど明らかになっていない国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学の一端を明らかにすることができた。

平成 25 年度は、国立感染症研究所が全国の国立病院から収集した 998 株のアシネトバクター属菌疑い株について菌種同定を行った。また、愛知県と秋田県で分離された *A.baumannii* の MLST 解析と次世代シーケンサーを使用して得た全ゲノムシーケンスデータに基づいた *A.baumannii* International Clone II の系統樹解析を行い、国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を集積した。さらに、次世代シーケンサーにより得た全ゲノムシーケンスデータをオンライン解析して *A.baumannii* の薬剤耐性遺伝子を特定した。

2. 方法

2.1 アシネトバクター属菌の菌種同定

国立感染症研究所が全国 78 の国立病院から収集した 998 株のアシネトバクター属菌疑い株を菌種同定に供した。菌種の同定は *rpoB* 遺伝子の DNA シーケンス解析³⁾と、*A.baumannii* に特異的 (Intrinsic) な OXA51-like 遺伝子を標的とする PCR 法⁴⁾を併用して実施した。但し、*rpoB* 遺伝子の増幅には Ac696F と Ac1598R プライマーを使用し、シーケンスプライマーには Ac696F を使用した。PCR には EX Taq DNA Polymerase (Takara Bio) を使用し、シーケンス用テンプレートの精製には Illustra ExoProStar (GE Healthcare) を使用した。*rpoB* 遺伝子の増幅がみられなかった供試株については 16S リボゾーム RNA のシーケンス⁵⁾により菌種を確認した。

2.2 *A. baumannii* の MLST 解析

愛知県で分離された *A.baumannii* 20 株と秋田県で分離され、調査した薬剤に何らかの耐性が認められた *A.baumannii* 18 株についてパスツール研究所 (www.pasteur.fr/mlst) の方法に従い MLST 解析した。

2.3 全ゲノムシーケンスデータに基づいた single nucleotide polymorphisms (SNP) 系統樹解析

愛知県で分離された 4 株の *A.baumannii* International Clone II と秋田県で分離された 3 株の *A.baumannii* International Clone II を供試し、次世代シーケンサーを使用して全ゲノムシーケンスデータを得た。得られたデータと、国立感染症研究所で解析された MDRA 3 株のデータ、GenBank に登録された国内外の株のデータを併せて SNP 系統樹解析を行った。

2.4 全ゲノムシーケンスデータに基づいた薬剤耐性遺伝子の検索

愛知県で分離された 4 株の *A.baumannii* International Clone II と秋田県で分離された 3 株の *A.baumannii* International Clone II から次世代シーケンサーを使用して得られた全ゲノムシーケンスデータを ResFinder 2.1 (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) により解析し、薬剤耐性遺伝子を特定した。

3. 結果

3.1 全国で分離されたアシネトバクター属菌の菌種

998 株のアシネトバクター属菌疑い株のうち、866 株がアシネトバクター属菌であった。これらの株の *rpoB* 遺伝子シーケンスに基づき作成した系統樹を図 1 に示した。*A.baumannii*, *A.nosocomialis*, *A. sp. close to 13TU*, *A.pittii*, *A.calcoaceticus/oleivorans*, その他の菌種のシーケンスが系統樹上でそれぞれ同一のクラスターに集積することが示され、*rpoB* 遺伝子のシーケンス解析がアシネトバクター属菌の同定に極めて有用であることが確認できた。一方、*rpoB* 遺伝子のシーケンスにより *A.baumannii* と同定された 645 株のうち、1 株以外は OXA51-like 遺伝子を標的とする PCR 法が

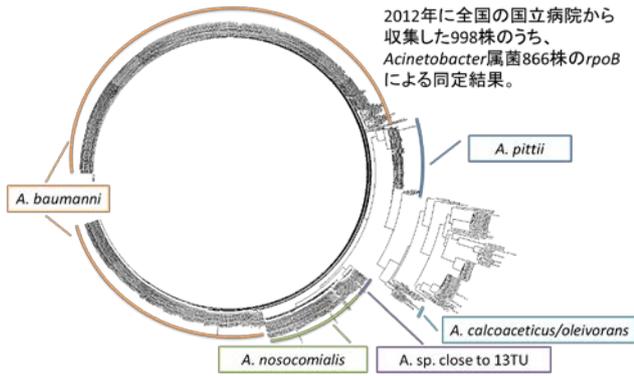


図1 Acinetobacter 属菌 866 株の rpoB 遺伝子シーケンスに基づく系統樹

陽性となることが確認された。OXA51-like 遺伝子 PCR が陰性となった 1 株について OXA51-like 遺伝子のシーケンスを解析した結果、OXA51-like 遺伝子に Insertion Sequence (IS) が挿入されていることが明らかとなった。

図2にアシネトバクター属菌 866 株の菌種を円グラフで示した。菌種は検出数が多い順に *A.baumannii* 645 株 (74%)、*A.nosocomialis* 84 株 (10%)、*A.pittii* 60 株 (7%)、*A. sp. close to 13TU* 15 株 (2%) であった。データは示さないが、感染症法に規定する MDRA の報告基準に該当する *A.baumannii* は 645 株中 2 株のみであった。

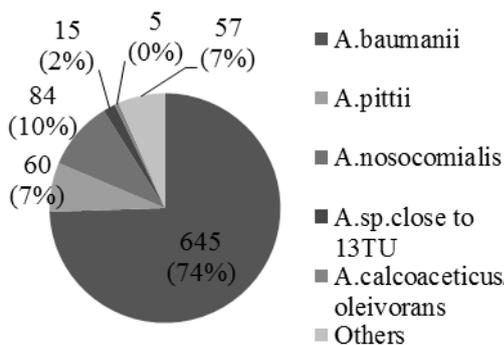


図2 アシネトバクター属菌 866 株の菌種

3.2 愛知県と秋田県で分離された *A. baumannii* の MLST 解析

表1に愛知県で分離された *A.baumannii* 20 株と秋田県で分離された *A.baumannii* 18 株の MLST 解析の結果を示した。愛知県では 20 株中 9 株 (45%) が ST2, 8 株が ST33 から ST235slv の 5 種類の MLST Type, 3 株が既知 Type に該当しない MLST Type であったのに対して、秋田県では 18 株中 17 株 (94%) が ST2 (International

表1 愛知県と秋田県で分離された *A. baumannii* の MLST (Pasteur)

	愛知	秋田
ST2	9	17
ST22	0	1
ST33	2	0
ST34	1	0
ST151	1	0
ST152	2	0
ST213	1	0
ST235slv	1	0
new	3	0
合計	20	18

clone II) , 1 株のみが ST22 であり、両県とも世界流行株である International clone II がすでに分布していることが示された。

3.3 全ゲノムシーケンスデータに基づいた SNP 系統樹解析

愛知県で分離された 4 株の *A.baumannii* International Clone II, 秋田県で分離された 3 株の *A.baumannii* International Clone II, 国立感染症研究所で解析した MDRA 3 株, そして国内外で報告されたデータを併せて作成した SNP 系統樹を図3に示した。国内で分離された *A.baumannii* International Clone II は愛知株, 秋田株と共に同一のクラスターに分類されたが, サブクラスターが異なることが明らかとなった。これに対して, 国立感染症研究所で解析した MDRA はこれらとはやや距離が離れたクラスターに分類された。一方, 海外で分離された株については, 系統樹の外周に位置する多彩な

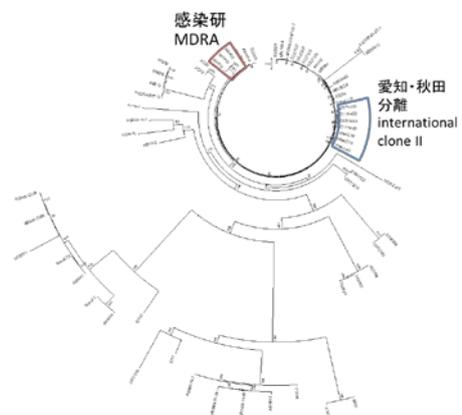


図3 全ゲノムシーケンスデータに基づいた *A. baumannii* の SNP 系統樹

距離に分類され、国内株とは遺伝的な隔たりが大きいことが示された。

3.4 全ゲノムシーケンスデータに基づいた薬剤耐性遺伝子の検索

愛知県で分離された4株の *A.baumannii* International Clone II, 秋田県で分離された3株の *A.baumannii* International Clone II, 計7株の *A.baumannii* の全ゲノムシーケンスをオンライン解析した結果特定された薬剤耐性遺伝子の一覧を表2に示した。秋田県で分離された7剤に耐性を示す AC18 株と AC45 からはそれぞれ12種類と8種類, 5剤に耐性を示す AC34 からは5種類の耐性遺伝子が検出された。一方, 愛知株についても7種類から12種類の耐性遺伝子が検出された。供試株のうち, アミカシン耐性を示した AC18 (7剤耐性) は *aadA1*, *aac(6')iB*, *armA* 遺伝子を保有していた。これらのアミノグリコシド耐性遺伝子のうち, *armA* 遺伝子は愛知株4株中3株にも検出されており, *armA* 遺伝子が国内の *A.baumannii* に侵淫していることが明らかとなった。

4. 考察

今回, 我々は国内の医療機関で分離されたアシネトバクター属菌 866 株の菌種同定を実施した。その結果, *A.baumannii* が 645 株 (74%) と最も多く, 次いで *A.nosocomialis* 84 株 (10%), *A.pitti* 60 株 (7%), *A. sp. close to 13TU* 15 株 (2%) と続くことが明らかとなった。国内の医療機関で分離されるアシネトバクター属菌約 900 株弱について菌種を決定した例はこれまでになく, 今回我々が示した成績は国内初のデータとなる。

アシネトバクター属菌の同定については, 今回も昨年度同様, *rpoB* 遺伝子のシーケンス解析により実施し, *rpoB* 遺伝子のシーケンス解析がアシネトバクター属菌の同定に有用であることが改めて確認できた。同様に, OXA51-like 遺伝子を標的とする PCR 法が *A.baumannii* の同定法として有用であることも示し得たが, OXA51-like 遺伝子に IS が挿入されたことにより, OXA51-like 遺伝子 PCR が偽陰性となる *A.baumannii* が少数ではあるが存在することが確認された。このような株では IS の挿入位置と IS のサイズにもよるが, OXA51-like 遺伝子 PCR において設計サイズよりも大きなエキストラバンド様の増幅断片が検出される可能性も考えられ, そのような分離株に遭遇した場合には *rpoB* 遺伝子のシーケンスを行うことにより *A.baumannii* の確認が必要と考えられる。

SNP 系統樹解析により, 国内で分離された *A.baumannii* International Clone II は非常に近縁な株であること, また, 国内で分離された MDRA はこれらとはやや距離が離れたクラスターに属することが示された。このことは, 国内に侵淫している *A.baumannii* International Clone II の中で MDRA が他株とは異なる起源と感染疫学を持つ可能性を示唆することとして興味を持たれる。

今回同定された *A.baumannii* 645 株中 MDRA に該当する株は2株のみであった。MDRA については国内における分離数が少ないことにより解析データも少なく, 感染予防策の構築に重要な知見が非常に乏しい。そのため, 今後, 国内における MDRA について更に広範囲・長期間にわたる調査を行い, 感染疫学に関するデータを

表2 全ゲノムシーケンス解析の結果特定された薬剤耐性遺伝子

	2007N42 4	2008N49 3	2011N46 3	2011N46 5	AC18	AC34	AC45	
<i>aadA1</i>	-	-	+	+	+	-	-	Aminoglycoside resistance
<i>aac(6')Ib-cr</i>	-	+	+	+	+	-	-	Fluoroquinolone and aminoglycoside resistance
<i>strA</i>	+	+	+	+	+	+	+	Aminoglycoside resistance
<i>strB</i>	+	+	+	+	+	+	+	Aminoglycoside resistance
<i>armA</i>	+	-	+	+	+	-	-	Aminoglycoside resistance
<i>blaOXA-66</i>	+	+	+	+	+	+	+	Beta-lactam resistance
<i>blaADC-25</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>blaTEM-1</i>	-	-	-	-	+	-	+	Beta-lactam resistance
<i>mph(E)</i>	+	-	+	+	+	-	+	Macrolide resistance
<i>msr(E)</i>	+	-	+	+	+	-	+	Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B resistance
<i>sul1</i>	-	-	+	+	+	-	-	Sulphonemide resistance
<i>sul2</i>	+	+	+	-	-	-	-	Sulphonemide resistance
<i>tet(B)</i>	+	+	+	+	+	+	+	Tetracycline resistance

集積することが重要と考えられる。

薬剤耐性菌が保有する耐性遺伝子を特定することは、従来、極めて困難であった。今回、我々は次世代シーケンサーによる全ゲノム解析とオンラインサーチサイトを併用することにより *A.baumannii* の耐性遺伝子の検索を試行した。その結果、供試した株により 5 種類から 12 種類の薬剤耐性遺伝子を特定することができた。次世代シーケンサーとオンラインサーチサイトを併用して薬剤耐性遺伝子を特定する方法は、薬剤耐性機構の解明に極めて有効であり、他の薬剤耐性菌の研究にも広く応用可能であると考えられる。秋田県で分離され、アミカシン耐性を示した AC18 (7 剤耐性株) は、アミノグリコシド耐性に関与する *aadA1*, *aac(6')iB-cr*, *armA* 遺伝子を保有することが明らかになった。これらの遺伝子のうち、*armA* 遺伝子は 16S rRNA methylase 遺伝子であり、これまでも日本国内⁶⁾、韓国⁷⁾、北米⁸⁾で *armA* 遺伝子保有 *A.baumannii* が確認されている。*armA* はアミカシンやトブラマシンなどに対する高度耐性に関与し、プラスミド上のトランスポゾン Tn1548 にコードされている⁸⁾ことから、侵淫拡大が懸念される。

5. まとめ

886 株のアシネトバクテリウム属菌を供試して実施した今年度の研究により、*rpoB* 遺伝子の解析はアシネトバクテリウム属菌の同定に有用であることが改めて確認された。OXA51-like 遺伝子を標的とする PCR 法が *A.baumannii* の同定法として有用であることも同時に確認されたが、IS の挿入による偽陰性の可能性について考慮する必要がある。次世代シーケンサーによる全ゲノム解析は *A.baumannii* の SNP 解析による分子疫学解析に有用であるのみならず、従来は困難であった薬剤耐性遺伝子の検索にも極めて有用であることが示されたことから、今後もこの方法を応用してアシネトバクテリウムの耐性機構の解明に取り組む必要がある。

国内において MDRA は稀であり、侵淫は深刻な状況には至っていないと考えられるが、院内感染防止策構築の基礎となる MDRA の感染疫学に関して、さらなる調査が必要である。

参考文献

- 1) Peleg, A.Y. et al.: *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen, Clin. Microbiol. Rev., **21**, 2008, 538-582.
- 2) Diancourt, L. et al.: The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool, PLoS One, **5**, 2010, c10034.
- 3) Scola, B.L. et al.: Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species, J. Clin. Microbiol., **44**, 2006, 827-83.
- 4) Turton, J.F. et al.: Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species, J. Clin. Microbiol., **44**, 2006, 2974-2976.
- 5) Ferroni, A. et al.: Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center, J. Clin. Microbiol., **40**, 2002, 3793-3797.
- 6) Yamane, K. et al.: Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. Emerg. Infect. Dis., **11**, 2005, 951-953.
- 7) Lee, H. et al.: Dissemination of 16srRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea, Diagn. Microbiol. Infect. Dis., **56**, 2006, 305-312.
- 8) Doi, Y. et al.: Identification of 16SrRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. Antimicrob. Agents Chemother. **51**, 2007, 4209-4210.

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究

市販食肉から分離された D240G 変異陽性 CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌の解析

八柳 潤 檜尾拓子 今野貴之 高橋志保 熊谷優子 和田恵理子

秋田県内の医療機関に CTX-M 型 ESBL 産生株が広く侵淫し、多くの場合入院患者に尿路感染を惹起している。CTX-M 型 ESBL 産生菌による院内感染対策のためには感染疫学を解明することが重要であるが、その詳細は明らかではない。今回、県内の医療機関で分離され、世界流行株の可能性のある CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* と、市販鶏肉から分離された CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* について Sequence Type (ST) と Phylogenetic Group (PG)、尿路感染症の病原因子である P 繊毛の有無について検討した。供試した尿路感染患者由来株はいずれも Pandemic O25b:H4-ST131 clone であることが確認され、秋田県の医療機関に当該 clone が侵淫し、尿路感染症の原因となっていることが初めて確認された。市販鶏肉から分離された CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* 菌株 No.411 株と CTX-M15/27 遺伝子陽性 *E.coli* ES1547 株はいずれも Pandemic O25b:H4-ST131 clone とは異なっていた。ES1547 株は P 繊毛を保有し、尿路感染症の原因となる可能性がある一方、No.411 株は P 繊毛を保有しないために尿路の上皮細胞に付着する能力を欠き、尿路感染症の原因となり得ないと考えられた。秋田県における CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌の感染疫学の詳細を解明するためには、鶏肉から分離される CTX-M 型 ESBL 産生株について尿路感染の発症に関与する病原因子の保有状況を詳細に調査し、CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌の感染源としての鶏肉の意義を明確化していくことが重要であることに加えて、CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* Pandemic O25b:H4-ST131 clone の市中と食品における侵淫実態を解明する必要がある。

1. 緒言

CTX-M 型 ESBL 産生菌の分離頻度が世界的にも増加し、欧米においても TEM-型や SHV-型に代わり、CTX-M 型が ESBL の主流となってきている^{1,2)}。我々は 2003 年から 2010 年までに県内の医療機関から受領した 963 株の ESBL 疑い株のうち、680 株が CTX-M 遺伝子陽性菌であることを示し、秋田県内の医療機関に CTX-M 型 ESBL 産生株が広く侵淫し、多くの場合入院患者に尿路感染を引き起こしていること³⁾を明らかにした。更に、CTX-M3 がポイントミューテーション (D240G 変異) により CAZ にも耐性を獲得した CTX-M15 遺伝子を保有する *E. coli* が県内に侵淫していることを初めて確認した³⁾。近年、CTX-M15 を産生する *E. coli* O25b:H4-Sequence Type (ST)131, Phylogenetic Group (PG) -B2 (Pandemic O25b:H4-ST131 clone) が世界的に侵淫を拡大し^{4,5)}、高頻度に尿路感染症を惹起する^{6,7)}ことが報告されている。尿路感染症の原因となる *E. coli* (Uropathogenic *E. coli*:UPEC) は尿管上皮細胞への付着因子として

P 繊毛を保有⁸⁾することが特徴であり、Pandemic O25b:H4-ST131 clone は P 繊毛の Variant である *papA*-F10 allele を高頻度に保有する⁷⁾。秋田県でこれまで分離された CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* の多くは尿路感染症由来であるが、Pandemic O25b:H4-ST131 clone であるかどうかは未確認であった。

CTX-M 型 ESBL 産生菌の感染疫学には不明な点が多い。CTX-M 型 ESBL 産生菌鶏肉から検出されたとする報告が散見^{9,10,11)}されることから、鶏肉が CTX-M 型 ESBL 産生菌の感染源として重要である可能性が指摘されている一方、鶏肉がヒトへの感染源になっている直接的な証拠はないことも指摘⁹⁾されているなど、CTX-M 型 ESBL 産生菌の感染原としての鶏肉の意義については議論がある。

我々は既報のとおり、秋田市内で購入した市販鶏肉 35 検体から CTX-M1 グループ遺伝子陽性 *E.coli* を 11 株分離し、そのうち 2 株が D240G 変異を持つ CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* と CTX-M15/27 遺伝子陽性 *E.coli* であることを報

告¹²⁾した。今回、県内における Pandemic O25b-clone の侵淫実態と感染源を解明するため、これら鶏肉由来 D240G 変異陽性 CTX-M 遺伝子を保有する *E.coli* と、尿路感染症由来 CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* について ST と PG, 尿路感染症の病原因子である P 絨毛の有無について検討したので報告する。

2. 方法

2.1 供試株

2011年3月2日から2011年4月26日までに県内の医療機関から送付された尿由来 CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* 8株と、既報¹²⁾の市販鶏肉由来 CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* No.411株と CTX-M15/27 遺伝子陽性 *E.coli* ES1547株を供試した。

2.2 P 絨毛関連遺伝子の検出と血球凝集試験

P 絨毛関連遺伝子である *papA*-F10 allele¹³⁾と *papEF*¹⁴⁾遺伝子を PCR により検出した。血球凝集試験は Evans らの報告¹⁵⁾に従いヒト A 型赤血球を使用して実施した。

2.3 ST131, O25b, Phylogenetic Group (PG) の確認

ST131 の確認は *gyrB* SNP を検出する Johnson らの報告した PCR⁷⁾により実施した。O25b O 抗原遺伝子は Clermont らが報告した PCR¹⁶⁾により検出した。*E.coli* の PG は Clermont らの報告¹⁷⁾に従い決定した。

3. 結果と考察

表に示すように、2011年3月2日から2011年4月26日までに県内の医療機関から送付された尿由来 CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* 8株は全て O25b PCR と ST131 PCR が陽性となり、PG は B2, P 絨毛関連遺伝子として *papA*-F10 allele を保有したことから、これらの株は Pandemic O25b:H4-ST131 clone であることが確認され、秋田県の医療機関に CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* Pandemic O25b:H4-ST131 clone が侵淫し、尿路感染症の原因となっていることが初めて確認された。

一方、市販鶏肉から分離された CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* No.411株と CTX-M15/27 遺伝子陽性 *E.coli* ES1547株はいずれも O25b, ST131

陰性であった。また、No.411株は PG B1, ES1547株は PG D であった。これらの結果は、No.411株と ES1547株はいずれも Pandemic O25b:H4-ST131 clone とは異なることを示していた。次に、これら2株の鶏肉由来 CTX-M 遺伝子保有 *E.coli* がヒトに尿路感染症を発症し得るかどうかについての知見を得るために、P 絨毛関連遺伝子の有無について検討した。その結果、ES1547株は P 絨毛関連遺伝子である *papEF* 遺伝子を保有していることが明らかとなった一方、No.411株は *papEF* 遺伝子を保有せず、血球凝集試験においても Mannose-Sensitive Hemmagglutination (MSHA) が観察されることが示された。MSHA は Type 1 絨毛を保有する株が示す表現型であり、Type 1 絨毛と尿路感染症の関連については疑問視する報告が多い⁸⁾。以上の結果から、今回供試した鶏肉由来 CTX-M 遺伝子保有 *E.coli* 2株のうち、ES1547株は P 絨毛を保有してヒトの尿路感染症の原因となる可能性がある一方、No.411株は P 絨毛を保有しないために尿路の上皮細胞に付着する能力を欠き、ヒトの尿路感染症の原因となり得ない株であると考えられた。

鶏肉からの CTX-M 型 ESBL 産生株の分離報告は海外¹⁰⁾のみならず国内でも散見^{9, 11)}されるが、鶏肉から分離された CTX-M 型 ESBL 産生株がヒトに尿路感染症を発症し得るかどうかについて検討した報告はみあたらない。D240G 変異を有する CTX-M 型 ESBL 産生菌2株のみについての検討ではあるものの、今回の我々の結果は、鶏肉由来株がヒトに尿路感染症を発症し得る可能性を示すものであると同時に、鶏肉由来株にはヒトに病原性を示す株と病原性を示さない株が混在する可能性を示すものと考えられる。同一感染源に異なる遺伝的背景を持つ多彩な菌が混在し、そのうちの一部のみがヒトに感染症を惹起する細菌としては、古くからベロ毒素産生性大腸菌 (VTEC) が^{18,19)}知られている。牛は多彩な VTEC を保菌するが、ベロ毒素産生能に加えて、ヒトの感染と発病に関与する病原因子である腸管定着因子などを保有する VTEC のみがヒトに感染して下痢症を引き起こす。我々は、以前の調査において秋田市内で購入した市販鶏肉から CTX-M2 グループ ESBL 産生大腸菌と、CTX-M 遺伝子を保有する *Kluyvera cryocrescens* を分離した²⁰⁾。大腸菌な

表 供試した CTX-M 遺伝子陽性株の解析結果

菌株番号	検体	CTX-M 遺伝子型	D240G	CAZ	Phylogenetic Group	O25b	P 繊毛関連遺伝子	ST131
ES1024	患者尿	CTX-M15	+	R	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1031	患者尿	CTX-M15	+	R	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1032	患者尿	CTX-M15	+	R	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1036	患者尿	CTX-M15	+	I	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1038	患者尿	CTX-M15	+	S	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1049	患者尿	CTX-M15	+	R	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1060	患者尿	CTX-M15	+	R	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1067	患者尿	CTX-M15	+	I	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
411	鶏肉 10/25-10	CTX-M15	+	S	B1	-	(MSHA)*	-
ES1547	鶏肉 10/29-20	CTX-M15/27	+	I	D	-	PapEF	-

*血球凝集試験

どが保有しているプラスミド性 CTX-M 型遺伝子のオリジンは、*Kluyvera* 属が染色体に保有する CTX-M 型遺伝子である²¹⁾と考えられていることから、鶏は *Kluyvera* 属や *E.coli* など多彩な CTX-M 遺伝子保有株を保菌し、鶏の中では異なる菌種間での CTX-M 遺伝子の伝播が発生しているものと推察される。今回の我々の結果は、鶏肉に混在する多彩な CTX-M 遺伝子保有株のうち、ヒトへの感染と発病に関与する病原因子を併せ持つ株のみがヒトに感染して尿路感染症を引き起こす可能性を示唆していると考えられ、CTX-M 型 ESBL 産生菌の感染疫学を理解する上で、この点を考慮に入れることが不可欠である。尿路感染症由来大腸菌は P 繊毛の他、adhesin, Toxin, Shiderphore, Capsule 等の病原因子を保有する事が報告⁷⁾されている。今後、鶏肉から分離される CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌についてこれらの病原因子の保有状況を詳細に調査し、尿路感染症の原因となる ESBL 産生大腸菌の感染源としての鶏肉の意義を明確化していく必要がある。

今回我々が確認した CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* Pandemic O25b:H4-ST131 clone の秋田県における感染疫学を解明することは、O25b:H4-ST131 による院内感染対策の基礎となることから重要であるが、その詳細には不明な点が多い。その解明には市中の人の保菌実態に加えて、鶏肉等の食品における O25b:H4-ST131 の汚染実態を解明することが必要である。我々が既報で市販鶏肉から分離した CTX-M15 遺

子陽性 No.411 株¹²⁾は、O25b:H4-ST131 とは異なる株であることが今回確認された。市販鶏肉からは多彩な CTX-M 遺伝子保有株が分離され¹²⁾るが、CTX-M15 などの D240G 変異を有する CTX-M 遺伝子保有株の分離頻度は高くない¹²⁾。従って、O25b:H4-ST131 の感染疫学解明のためには、食品や市中の無症状保菌者から O25b:H4-ST131 を効率良く分離するための選択分離培養法を使用して調査を実施する必要がある。O25b:H4-ST131 は D240G 変異のために Cefotaxime に対する感受性が低下している傾向があることに加えて、Ciprofloxacin 耐性も獲得している⁶⁾ことから、Cefotaxime, Cefotaxidime, Ciprofloxacin を選択剤とすることにより、より効率の良い選択分離培養が可能となると考えられる。

4. まとめ

今回、秋田県の医療機関に CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* Pandemic O25b:H4-ST131 clone が侵淫していることを初めて確認した。秋田県における CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌の感染疫学の詳細を解明するためには、鶏肉から分離される CTX-M 型 ESBL 産生株について尿路感染の発症に関与する病原因子の保有状況を詳細に調査し、ESBL 産生大腸菌の感染源としての鶏肉の意義を明確化していくことが重要であることに加えて、CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* Pandemic O25b:H4-ST131 clone の市中と食品における侵淫実態を解明する必要がある。

参考文献

- 1) Bonnet R: Growing group of Extended-Spectrum β -lactamases: The CTX-M Enzymes. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48**, 2004, 1-14.
- 2) Canton R, Coque TM: The CTX-M β -lactamase pandemic, *Current Opinion in Microbiology*, **9**, 2006, 466-475.
- 3) 八柳 潤, 今野貴之, 齊藤志保子: 秋田県の医療機関における CTX-M 型基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離状況, 秋田県健康環境センター年報, **6**, 2010, 40-45.
- 4) Lavollay, M. et al.: Clonal dissemination of a CTX-M-15 β -lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, in Tunis and in Bangui, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 2006, 2433-2438.
- 5) Nicolas-Chanoine M.H. et al.: Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M15. *J. Antimicrob. Chemother.*, **61**, 2008, 273-281.
- 6) Cerquetti, M. et al.: Ciprofloxacin-resistant, CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 clone in extraintestinal infection in Italy, *Clin. Microbiol. Infect.*, **16**, 2010, 1555-1558.
- 7) Johnson, J.R. et al.: Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of Antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 2009, 2733-2739.
- 8) Johnson, J.R.: Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection, *Clin. Microbiol. Rev.*, **4**, 1991, 80-128.
- 9) 石畝 史, 永田暁洋, 鈴木里和 他: 福井県内における人および鶏肉由来基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析. 日本獣医公衆衛生学会誌, **63**, 2010, 883-887.
- 10) Doi, Y. et al.: Extended-spectrum and CMY-type β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from clinical samples and retail meat from Pittsburg, USA and Seville, Spain, *Clin. Microbiol. Infect.*, **16**, 2009, 33-38.
- 11) 下島優香子 他: 食肉からの基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の検出, 東京都健康安全研究センター年報, **62**, 2011, 145-150.
- 12) 八柳 潤 他: 秋田県の医療機関, 鶏肉, 市中における CTX-M 型基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離状況, 秋田県健康環境センター年報, **8**, 2012, 38-43.
- 13) Johnson, J.R., et al.: Analysis of the F antigen-specific *papA* alleles of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* using a novel multiplex PCR-based assay, *Infect. Immun.*, **68**, 2000, 1587-1599.
- 14) Johnson, J.R., et al.: Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise, *J. Infect. Dis.*, **181**, 2000, 261-272.
- 15) Evans, D.G., et al.: Hemagglutination of human group A erythrocytes by Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: Correlation with colonization factor, *Infect. Immun.*, **18**, 1977, 330-337.
- 16) Clermont, O., et al.: The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup, *J. Antimicrob. Chemother.*, **61**, 2008, 1024-1028.
- 17) Clermont, O., et al.: Rapid and simple detection of the *Escherichia coli* phylogenetic group, *App. Environ. Microbiol.*, **66**, 2000, 4555-4558.
- 18) Wells, J.G et al.: Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle, *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 1991, 985-989.
- 19) Montenegro, M.A., et al.: Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle, *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 1990, 1417-1421.
- 20) 八柳 潤, 今野貴之, 齊藤志保子: 市販鶏肉からの CTX-M 型基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離と分離株の解析, 秋田県健康環境センター年報, **6**, 2010, 33-39.
- 21) Humeniuk C, et al.: β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **46**, 2002, 4038-4040.

秋田県における食用牛の腸管出血性大腸菌保菌状況と分離株の細菌学的性状に関する研究

秋田県における食用牛の腸管出血性大腸菌保菌状況と分離株の細菌学的性状に関する研究—2001～2003年と2012～2013年の調査成績

八柳 潤 今野貴之 樫尾拓子 高橋志保 熊谷優子 和田恵理子 齊藤志保子

腸管出血性大腸菌（EHEC）の感染予防策を構築するためには、感染源である食用牛の EHEC 保菌実態を把握する必要があるが、当センターでは 2003 年以降当該調査を行っていないことから、秋田県内でと殺される食用牛の EHEC 保菌実態解明と分離株の細菌学的性状の精査を実施した。2001～2003 年の調査と今回の調査結果を比較した結果、食用牛の EHEC O157 保菌率が約 2 倍となっていること、EHEC O157 を保菌する牛が県内の広範囲の農場に分布している実態が明らかとなった。加えて、重症例との関連が疫学的に示されている Clade 8 が患者由来 EHEC O157 に占める割合は、2001～2003 年に 10.3%であったのに対して今回の調査では 25.0%と増加傾向がみられた。以上の結果は、秋田県における EHEC O157 感染リスクと重症化リスクが共に増加していることを示唆していた。2003 年の米国産牛肉輸入禁止後に県内における EHEC 感染事例数は減少しなかったことから国産牛の EHEC 感染源としての重要性が示唆され、県内における EHEC 感染対策としては県産牛を感染源とする感染ルートに対する対策が重要と考えられる。2011 年にユッケ等生食用食肉の衛生基準が厳格化されるなど食品衛生対策が一層強化されたが、秋田県内の EHEC 感染事例発生数に及ぼす効果は限定的と思われた。従って、食品衛生の厳格化による従来の対策のみでは EHEC 感染症の発生を完全にコントロールすることは困難である可能性が考えられ、今後、畜産行政と連携し、感染源対策となる牛の EHEC 保菌コントロールを目的とする研究を企画・立案する必要がある。

1. 諸言

腸管出血性大腸菌（EHEC）はベロ毒素（VT）を産生する大腸菌であり、典型例ではヒトに下痢、激しい腹痛、出血性大腸炎を惹起する。さらに、出血性大腸炎を発症した患者の一部は溶血性尿毒症症候群（HUS）や、時に致命的となる脳症を発症する。1996 年、全国的に EHEC O157:H7 による食中毒事例が多発して以降、学校給食の衛生管理が強化され、更に、牛が EHEC の保菌動物であることから、と畜場の衛生管理も強化されるなど、種々の EHEC 食中毒対策が講じられてきた。それにもかかわらず、2011 年には富山県を中心として 5 名の死者を伴う EHEC O111 食中毒が発生するなど、EHEC による深刻な健康被害が依然として発生している。加えて、同年、ドイツを中心とするヨーロッパで腸管凝集付着性大腸菌（EAggEC）がベロ毒素（VT）遺伝子を獲得したとされる EHEC O104 による多くの死者を伴う大規模な食中毒が発生し、これまでに知られていない新たなタイプの EHEC（EAggEC-EHEC）による深刻な健康被害

の発生も注目された。秋田県においても 2001 年以降、EHEC による感染事例が年間 30 事例から 40 事例発生し、EHEC による健康被害の発生は未だに終息していない。2011 年の富山県の事例を契機として食品衛生法が厳格化され、同年にはユッケ等の生食用食肉の衛生基準が厳格化され、2012 年には生食用牛レバーの提供が禁止されたが、これらの規制強化が EHEC 感染事例発生状況に及ぼす効果については、今後の推移を見守る必要がある。

EHEC による健康被害予防策を構築するためには感染源の実態を把握することが第一歩となる。そのためには、県内における食用牛の EHEC 保菌実態を把握する必要があるが、当センターでは 2003 年¹⁾以降当該調査を行っていない。とりわけ、富山県等で重篤な集団感染事例を惹起した O111 や、欧州で問題となっている O104、あるいは O104 と同様に重篤な症状を惹起する可能性の高い EAggEC-EHEC の県内への侵淫実態は不明である。このような背景から、本研究では秋田県内でと殺される食用牛の EHEC 保菌

実態解明と分離株の細菌学的性状の精査を実施した。得られた結果について、2001～2003年に実施した調査結果と比較し秋田県における EHEC 感染症発生リスクの推移について検討した。また、秋田県における EHEC 感染症発生事例数に及ぼす各種規制強化等の効果についても併せて考察した。

2. 方法

2.1 牛便からの EHEC の分離・同定

秋田市食肉衛生検査所の協力を得て牛便 211 検体を採取し、EHEC の検索に供した。EHEC O157 は牛便をノボビオシン加変法 EC 培地 (NmEC) に接種・培養後、ダイナビーズ O157 と CT 加ソルビトールマッコンキー平板を併用して分離した。O26, O111 は牛便を変法 EC 培地 (mEC) に接種・培養後、免疫磁気ビーズ O26 と CT 加ラムノースマッコンキー平板、免疫磁気ビーズ O111 と CT 加ソルボースマッコンキー平板をそれぞれ併用して分離した。その他の血清型の EHEC は次の方法により分離した。牛便を mEC 培地に接種・培養した後、培養液を塩酸処理²⁾し、DHL 平板に接種・培養した。生じた菌苔について VT のスクリーニングを実施し、VT スクリーニング陽性となった平板について、VT 陽性コロニーを特定した。EHEC O104 を含む EAggEC-EHEC は、塩酸処理後の DHL 平板に発育した菌苔を対象として VT, *aggR*, O104 O 抗原合成遺伝子を標的とする PCR 法³⁾により検索した。VT, *eaeA*, *uidA*, *saa*, 大腸菌 O 抗原合成遺伝子 (O157, O26, O111 他) を標的とする PCR 法は、既報¹⁾のとおり実施した。

2.2 EHEC O157 の Clade 解析

EHEC O157 の病原性と関連すると報告されている Clade 解析を実施した。解析は Manning らの原報⁴⁾に従い、Hairpin Primer 法⁵⁾を応用した SNP 検出により実施し、SNP #96, #89, #36, #47, #93, #6 を解析対象とした。解析には 2001 年～2003 年に牛から分離された 7 株、ヒトから分離された 29 株、2012～2013 年に牛から分離された 7 株、ヒトから分離された 16 株、計 59 株を供試した。

2.3 EHEC O157 Clade 8 株の VT-2 産生

2001 年～2003 年に患者から分離された EHEC O157 Clade 8 の 3 株、2012 年～2013 年に患者と牛から分離された EHEC O157 Clade 8 それぞれ 4 株と 1 株の計 8 株、対照として牛由来 EHEC O157 Clade 7 の 2 株、患者由来 EHEC O157 Clade 7 の 1 株、業態者(無症状)由来 EHEC O157 Clade 7 の 1 株、2014 年 4 月に発生した福島県産馬刺を原因とする食中毒患者から分離された EHEC O157 Clade 2 の 1 株の計 5 株を供試して VT-2 産生を比較検討した。供試株を LB 培地に接種し、35℃ 1 夜培養した後、その培養液 100 μl を 5 ml の LB 培地 2 本に接種し、37℃ で振盪培養した。3 時間後に 1 本の LB 培地にマイトマイシン C (MMC) を 0.2 μg/ml の濃度に添加し、さらに 3 時間振盪培養した。2 本の LB 培地を遠心して得られた上清を試料とし、VTEC RPLA (デンカ生研) を使用して VT-2 の産生量を測定した。VT-2 産生量はタイター(希釈倍数)として表現した。

2.4 薬剤感受性

2001～2003 年及び 2012～2013 年に分離された EHEC O157 牛由来 14 株、ヒト由来 45 株、non-O157 8 株についてドライプレート DP35 により 18 薬剤に対する感受性を検討した。

2.5 秋田県における EHEC 感染事例発生状況の推移

1996 年から 2013 年の EHEC 感染事例発生状況を集計し、BSE 問題による米国産牛肉輸入禁止 (2003 年 12 月)、生牛肉の衛生基準厳格化 (2011 年)、牛生レバーの提供禁止 (2012 年) 後の県内における EHEC 感染事例発生状況の推移について検討した。

3. 結果

3.1 牛便からの EHEC の分離・同定

2012 年～2013 年に牛便 211 検体からの EHEC 分離結果を 2001～2003 年に牛便 452 検体を対象に実施した調査の結果と併せて表 1 に示した。2012～2013 年の調査では O157 が 211 検体中 7 検体 (3.3%) から検出されたのに対して、2001～2003 年の調査では 452 検体中 7 検体 (1.5%) から EHEC O157 が検出されており、秋田県における食用牛の EHEC O157 保菌率が 10 年前と比較して約 2 倍となっていることが明らかとなった。

表1 牛便から分離された EHEC

検体数	2001～2003年		2012～2013年	
	452	(%)	211	(%)
O157	7	(1.5)	7	(3.3)
O26	1	(0.2)	6	(2.8)
O111	0	(0)	1	(0.5)
O103	2	(0.4)	0	(0)
O165	1	(0.2)	0	(0)
O113	1	(0.2)	5	(2.4)
O156:H25	1	(0.2)	0	(0)
O178:H19	2	(0.4)	0	(0)
Out	0	(0)	2	(0.9)
合計	15	(3.3)	21	(9.9)

また、EHECの保菌率も3.3%から9.9%に増加した。EAaggECは1検体から検出されたが、EHEC O104を含むEAaggEC-EHECは検出されなかった。患者から分離されるEHECと同じ血清型の株としては、2012～2013年の調査ではEHEC O111、EHEC O26が、2001～2003年の調査ではEHEC O26、O103、O165が牛便から分離された。いずれの調査においてもEHEC O113が牛便から分離されたが、秋田県においてはこれまでEHEC O113による感染事例は確認されていない。

表2に2001～2003年の調査と2012～2013年の調査で牛便から分離されたEHEC O157 14株の一覧を示す。2001～2003年に分離された7株のうち2株は北海道産牛から分離されたが、2012～2013年に分離された7株は全て県内産牛から分離された。EHEC O157が分離された牛の

産地に関して、県内の特定の地域や特定の農場から出荷された牛からのみEHEC O157が分離される傾向は認められず、県内の広範囲の農場にEHEC O157を保菌する牛が分布している実態が明らかとなった。

3.2 EHEC O157のClade解析

表3に示すように、重症例との関連が疫学的に示されているClade 8が患者由来EHEC O157に占める割合は2001～2003年に10.3% (29株中3株)であったのに対して2012～2013年には25.0% (16株中4株)となり、増加傾向がみられた。Clade 8に感染した患者全員に血便がみられ、また、2013年に横手保健所管内で死亡した女兒から分離されたEHEC O157もClade 8であった。一方、2001～2003年に44.8%を占めていたClade 2は2012～2013年に全く検出されず、県内で患者から分離されるEHEC O157のClade分布に年次推移が認められることが示された。牛由来株では2001～2003年にはEHEC O157

表3 EHEC O157 59株のClade

Clade	2001～2003年		2012～2013年	
	ヒト	牛	ヒト	牛
2	13	1	0	0
3	7	0	6	2
6	2	1	0	0
7	4	5	5	4
8	3	0	4	1
計	29	7	16	7

表2 牛便から分離された EHEC O157

検体採取年月日	血清型	VT型	産地	Clade	菌株番号
2002.7.1	O157:H7	VT-1,2	秋田市	2	EC6741
2002.7.1	O157:H7	VT-2	西木村	7	EC6740
2002.6.14	O157:H7	VT-2	大館市	7	EC6742
2002.9.20	O157:H7	VT-2	湯沢市	7	EC7120
2002.10.29	O157:H7	VT-2	若美町	6	EC7187
2003.6.24	O157:H7	VT-1,2	北海道	7	EC8040
2003.7.22	O157:NM	VT-1,2	北海道	7	EC8068
2012.10.26	O157:NM	VT-2	羽後町	7	EC15423
2012.10.26	O157:H7	VT-1,2	能代市	3	EC15425
2013.5.31	O157:H7	VT-2	由利本荘市	7	EC15657
2013.6.28	O157:NM	VT-1	能代市	3	EC15678
2013.6.28	O157:H7	VT-2	由利本荘市	7	EC15679
2013.8.2	O157:H7	VT-1,2	由利本荘市	7	EC15721
2013.12.10	O157:H7	VT-2	大潟村	8	EC15883

Clade 8 が検出されなかったのに対して、2012～2013 年には Clade 8 が 1 株確認された。

3.3 EHEC O157 Clade 8 株の VT-2 産生

表 4 に示すように、Clade 8 株は全て MMC 非存在下で 640 倍又は 1,280 倍、MMC 存在下では 327,680 倍又は >655,360 倍の VT-2 RPLA タイターを示した。これに対して、2013 年の牛便由来 Clade 7 EC15657 株と 2003 年の無症状業態者由来 EC7496 株の RPLA タイターは MMC 非存在化でそれぞれ <20 倍と 80 倍、MMC 存在化ではいずれも 320 倍と Clade 8 株の RPLA タイターと比較して顕著に低かった。また、2002 年の患者由来 Clade 7 EC6835 株は MMC 存在下での RPLA タイターが 40,960 倍と Clade 8 株と比較して明らかに低かった。なお、2012 年の牛便由来 Clade 7 EC15423 株及び 2014 年馬刺食中毒由来 Clade 2 EC16029 株の RPLA タイターは、Clade 8 株と同等であった。

3.4 EHEC の薬剤感受性

供試した 67 株は全て治療の第一選択であるホスホマイシンに感受性であった。

3.5 秋田県における EHEC 感染事例発生状況の推移

図 1 に秋田県における 1996 年から 2013 年までの EHEC 感染事例数を示す。2001 年以降、EHEC 感染事例発生数は年間 30～40 事例で推移していたが、冷夏であった 2003 年と 2009 年に

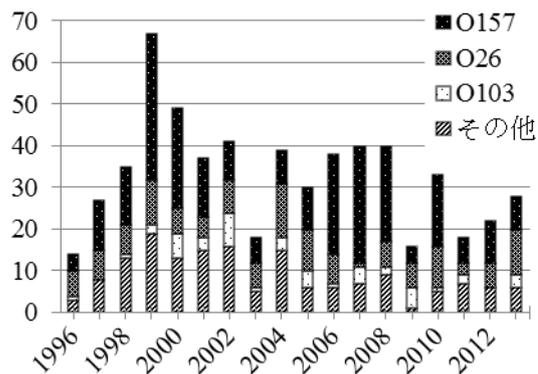


図 1 秋田県における EHEC 感染事例数 (1996-2013 年)

は事例数が 20 事例を下回った。一方、2003 年 12 月に BSE 問題で米国産牛肉の輸入が禁止された以降も、秋田県内における EHEC 感染事例発生数は 30～40 事例で推移する傾向がみられた。ユッケ等の生牛肉の衛生基準が厳格化された 2011 年は 18 事例、牛生レバーの提供が禁止された 2012 年は 22 事例と EHEC 感染事例数に減少傾向がみられたものの、2013 年には 28 事例となり、一旦減少した EHEC 感染事例数が増加に転じる傾向がみられた。

4. 考察

今回の調査では、10 年前の県内における食用牛の EHEC O157 保菌率 1.5% に比して 3.3% と 2 倍の保菌率であることが明らかとなった。また、EHEC O157 を保菌する牛は 2001～2003 年の調査、今回の調査のいずれにおいても県内の広範

表 4 EHEC O157 Clade 8 株の VT-2 産生

菌株番号	由来	VT 型	Clade	VT-2 産生量 (RPLA タイター)	
				-MMC	+MMC
EC5454	2001 年患者	VT-2	8	640	> 655,360
EC5458	2001 年患者	VT-2	8	640	> 655,360
EC7662	2003 年患者	VT-2	8	1,280	> 655,360
EC15233	2012 年患者	VT-2	8	1,280	> 655,360
EC15330	2012 年患者	VT-2	8	1,280	> 655,360
EC15332	2012 年患者	VT-2	8	1,280	327,680
EC15696	2013 年患者 (死亡)	VT-2	8	1,280	> 655,360
EC15883	2013 年牛便	VT-2	8	640	327,680
EC15423	2012 年牛便	VT-2	7	640	> 655,360
EC15657	2013 年牛便	VT-2	7	< 20	320
EC6835	2002 年患者	VT-2	7	640	40,960
EC7496	2003 年業態者	VT-2	7	80	320
EC16029	2013 年馬刺食中毒	VT-1,2	2	1,280	> 655,360

圃の農場に分布している傾向が示された。Manning らはこれまで世界各地で発生した EHEC O157 集団感染事例において、HUS の発症などを指標とする重症化率に顕著な違いがあることに着目し、全染色体遺伝子の SNP 解析に基づいた EHEC O157 の Clade 解析法を確立⁴⁾し、HUS の発症率が Clade 8 で有意に高いことを示した。この報告を受け、我々は秋田県で 2001～2003 年、そして 2012～2013 年にヒトと牛から分離された EHEC O157 計 59 株について Clade 解析を実施した。その結果、患者由来株に占める高病原性 Clade である Clade 8 の比率が 10 年間で 10.3% から 25.0% に増加していること、牛由来株にも Clade 8 が存在することが明らかとなった。確認された EHEC O157 Clade 8 株の VT-2 産生能について RPLA 法により検討した結果、Clade 8 株は MMC 非存在下ではほぼ同程度である 640～1,280 倍のタイターの VT-2 産生能を示し、MMC 存在下では全ての株が高タイターを示した。一方、対照として比較した Clade 7 株の中には Clade 8 株よりも MMC 存在下において明らかに VT-2 産生能が低い株が存在することが示され、また、Clade 7 の牛由来株の 1 株と無症状業態者由来株は VT-2 RPLA タイターが極端に低いことも示された。データは示さないが、これらの 2 株は VT-2a 遺伝子を保有せず、VT-2c 遺伝子のみを保有するタイプであり、このことがこれらの株の VT-2 RPLA タイターが極端に低いことの原因と考えられた。なお、MMC は EHEC O157 に SOS 信号を誘起することにより溶原化していた VT-2 ファージの放出を促し、これにより VT-2 産生を促進するとされており、この現象は腸管内において EHEC O157 が一酸化窒素を含む各種のストレスに暴露された際の状態を模倣するものと考えられている。

本調査の結果は、食用牛の EHEC O157 保菌率と、県内における患者由来株の Clade 8 の比率が増加していることを示すものであり、このことは秋田県における EHEC O157 感染リスクと重症化リスクが共に増加していることを示唆していると考えられる。実際、2013 年に秋田県で 2 人目となる EHEC O157 感染による死者が発生し、その患者から分離された EHEC O157 (EC15696) は Clade 8 であった。なお、治療の第一選択であるホスホマイシンに耐性を獲得し

た EHEC O157 は認められなかったことから、EHEC 感染者の抗菌剤治療におけるリスクは現在においても非常に小さいと考えられる。

一方、EAggEC が VT を獲得することにより派生した EHEC O104 は重症化リスクが大きいですが、この EAggEC-EHEC は今回実施した牛便の調査では全く検出されなかったことから、食用牛を介して県内で EAggEC-EHEC 患者が発生する可能性は非常に小さいと考えられた。なお、今回の調査において牛便 1 検体から EAggEC が分離された。EAggEC の感染源や保菌動物は殆ど明らかとなっていないが、この結果は牛が EAggEC の保菌動物の一つである可能性を示すものとして興味を持たれる。

2003 年 12 月に BSE 問題で米国産牛肉の輸入が禁止された以降も、秋田県内における EHEC 感染事例発生数は 30 から 40 事例で推移し、明らかな減少傾向はみられなかった。このことは、県内で発生する EHEC 感染事例の原因に米国産牛肉は殆ど関与していない実態を示し、その他の感染源、例えば国産牛等の関与が考えられる。このことから、県内における EHEC 感染対策としては県産牛を汚染源とする感染ルートに対する対策が重要と考えられる。これまでに国内で講じられてきた EHEC 感染症対策は、と畜場の衛生管理の厳格化等、食肉生産現場における汚染防止対策と学校給食衛生管理の厳格化等、食品衛生対策に大別される。富山県における EHEC O111 食中毒事例を受けて 2011 年には生牛肉の衛生基準が厳格化され、2012 年には牛生レバーの提供が禁止されるなど、食品衛生対策が一層厳格化されたが、秋田県内の EHEC 感染事例発生数の推移をみるかぎり、それらの効果は限定的と思われる。このことは、秋田県では EHEC 感染症の発生にユッケなどの生肉や牛レバー以外の原因食品も関与していることを示唆していると考えられ、県内における EHEC の感染疫学は複雑であることが伺われる。このため、食品衛生の厳格化を推し進める従来の対策のみでは EHEC 感染症の発生を完全にコントロールすることは困難である可能性が考えられ、今後、EHEC の感染源である保菌牛のコントロールなど、従来は行われてこなかった EHEC の感染源対策を推し進める必要があると考えられる。

5. まとめ

秋田県における EHEC O157 感染リスクと重症化リスクが増加している可能性が示唆された一方、県内における EHEC O104 とその類似株による健康被害発生リスクは小さいことが示された。今後、EHEC の感染源である保菌牛のコントロールなど、従来は行われてこなかった EHEC の感染源対策に取り組む必要があると考えられ、畜産行政と連携し、感染源対策となる牛の EHEC 保菌コントロールを目的とする研究を企画・立案することが必要と考えられる

参考文献

- 1) 八柳 潤, 齊藤志保子, 今野貴之: 腸管出血性大腸菌 (EHEC) の感染疫学解明に関する調査研究, 秋田県衛生科学研究所報, **48**, 2005, 45-53.
- 2) Fukushima, H. et al.: Hydrochloric acid treatment for rapid recovery of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from faeces, foods and environmental samples, *Zentralbl. Bakteriologie*, **289**, 1999, 285-299.
- 3) 八柳 潤, 今野貴之, 齊藤志保子: *E. coli* O104 同定用 PCR の確立と陽性対照専用株の作出, 秋田県健康環境センター年報, **8**, 2012, 31-33.
- 4) Manning, S.D. et al.: Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157 associated with disease outbreaks, *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**, 2008, 4868-4873.
- 5) Hazbon M.H. and alland D.: Hairpin primers for simplified single-nucleotide polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and other organisms, *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 2004, 1236-1242.

公益財団法人大同生命厚生事業団「地域保健福祉研究助成」

感染症予防対策への活用に向けた

ウシ早期初乳のウイルス不活化効果に関する検討

柴田ちひろ 加藤真姫子*¹ 伊藤 隆*² 斎藤博之

ウシの分娩直後の初乳には様々な病原体に対する抗体や不活化成分が含まれているとの報告がある。そこで、食品衛生法により飲用が規制されている分娩後5日以内の早期初乳について、間接接触感染により感染が拡大するインフルエンザウイルスおよびエンテロウイルスに対する不活化効果を検討した。インフルエンザウイルスに対するHI試験では、AH3型についてはHI価80倍とワクチン株由来抗血清に匹敵するような値を示す検体も確認されるほど良好な結果が得られた。一方で、AH1pdm09型とB型については一部の検体でHI価が確認されたものの、AH3型と比較して劣る結果であった。生じた反応性の違いは、試験に供したウイルス量に起因したものであると推察され、手指汚染で想定される少ないウイルス量に対しては十分に効果が期待できるものと考えられた。エンテロウイルスに対する中和試験では、動物試験、細胞培養試験の両法においてそれぞれ死亡率、細胞変性出現率の低下が確認され、エンテロウイルスに対する不活化効果が確認された。今後も他のウイルスに対する効果など検討を重ねたい。

1. はじめに

手指を介して口や鼻に病原体が持ち込まれる間接接触感染は、ウイルス性胃腸炎のみならず、インフルエンザや夏かぜ等の呼吸器ウイルス感染症についても最大の感染要因となっている。予防には手洗いが有効であり、アルコールを主成分とする手指用消毒剤等の製品が多数市販されている。しかし、構造としてエンベロープを持たないなど、これら市販消毒剤の効果が十分には期待できない種類のウイルスも存在する。一方でどのようなウイルスにも効果のある薬剤は手指への侵襲性が強く、日常的な使用には適さない。

ウシの分娩直後の初乳には、様々な病原体に対する抗体や不活化成分が含まれているとの報告がある^{1, 2)}。しかし、分娩後5日以内の早期初乳は食品衛生法により飲用が規制されているため、現状では子ウシに給与される以外は全て廃棄処分されている。そこで、この早期初乳をハンドクリーム等の手指用衛生用品に添加することで、衛生用品にウイルス不活化効果を付加し、間接接触感染の簡便な予防対策として活用

し得る可能性を考えた。今回、間接接触感染によって感染が拡大するインフルエンザウイルスおよびエンテロウイルスに対するウシ早期初乳のウイルス不活化効果について検討したので報告する。

2. 方法

2.1 対象検体

平成23年10月～平成25年3月に分娩した秋田県畜産試験場飼養牛17頭、一般酪農農家飼養牛6頭の初乳を対象とした。分娩後24時間を1日として、1～5日目の早期初乳を各日50 mL採取し、検査実施まで-30℃で冷凍保管した。

2.2 前処理

解凍後4,500×g、10分の粗遠心を行い、上層の脂肪分を除去した。その後、再度10,000×g、20分の遠心を行い、中間層の乳清を孔径0.45 μmのフィルターでろ過滅菌した。粘性が強くフィルター滅菌が不可能であった乳清については、レンネット処理を行い、その上清を検体とした。

*¹ 秋田県畜産試験場、*² 秋田中央家畜保健衛生所

2.3 ウイルス不活化効果の検討

検討対象ウイルスはインフルエンザウイルスおよびエンテロウイルスとした。インフルエンザウイルスは赤血球凝集抑制試験（HI 試験），エンテロウイルスはマウスと培養細胞を用いた中和試験により検討した。

2.3.1 インフルエンザウイルス不活化効果の検討

HI 試験の前処理として、乳清検体に対して RDE 処理とモルモット血球を用いた非特異凝集成分の吸収処理を行った。その後、インフルエンザ診断マニュアル³⁾に従い HI 試験を実施した。試験に供したウイルス株は表 1 のとおりである。

表 1 HI 試験に用いたインフルエンザウイルス株

型	株名	2012/2013シーズン ワクチン株由来抗血清 とのHI価
AH3型	A/Akita/03/2013	640倍
AH1pdm09型	A/Akita/05/2013	320倍
B型 (Yamagata Lineage)	B/Akita/01/2013	80倍

2.3.2 エンテロウイルス不活化効果の検討

動物試験および細胞培養試験には、分娩後 1～5 日目の乳清を等量混合し、1 頭分を 1 検体として試験に供した。動物試験は A 群コクサッキーウイルス 10 型、細胞培養試験はエンテロウイルス 71 型を対象に行った。

2.3.2.1 動物試験

1 LD₅₀ (50%致死量) および 10 LD₅₀ に調整したウイルス溶液と乳清とを等量混合して、37℃で 60 分反応させた。その後、1 週齢の乳飲みマウスに反応液 100 μL を接種し、1 週間の観察を行った。なお、本検討は秋田県健康環境センター動物実験管理要綱を遵守し、秋田県健康環境センター動物実験委員会の承認の下で実施した。

2.3.2.2 細胞培養試験

1 TCID₅₀ (50%組織培養感染量) および 10 TCID₅₀ に調整したウイルス溶液と乳清とを 100 μL ずつ等量混合し 37℃で 60 分反応させた。反応後、HEAJ 細胞をシートさせた 48 穴マイクロプレートに反応液全量と維持培地と

して E-MEM 培地 500 μL を添加した。乳清による細胞毒性の影響を除去するため、翌日に維持培地を交換し、細胞変性 (CPE) の有無を 1 週間観察した。

3. 結果

3.1 インフルエンザウイルス不活化効果の検討

各型に対する HI 試験結果を図 1 に示す。AH3 型については全ての分娩後 1 日目の検体から HI 価が確認された。分娩後日数の経過と共に HI 価も低下する傾向にあったが、分娩後 5 日目においても 20 検体が HI 価を有していた。一方、AH1pdm09 型については分娩後 1 日目では 14

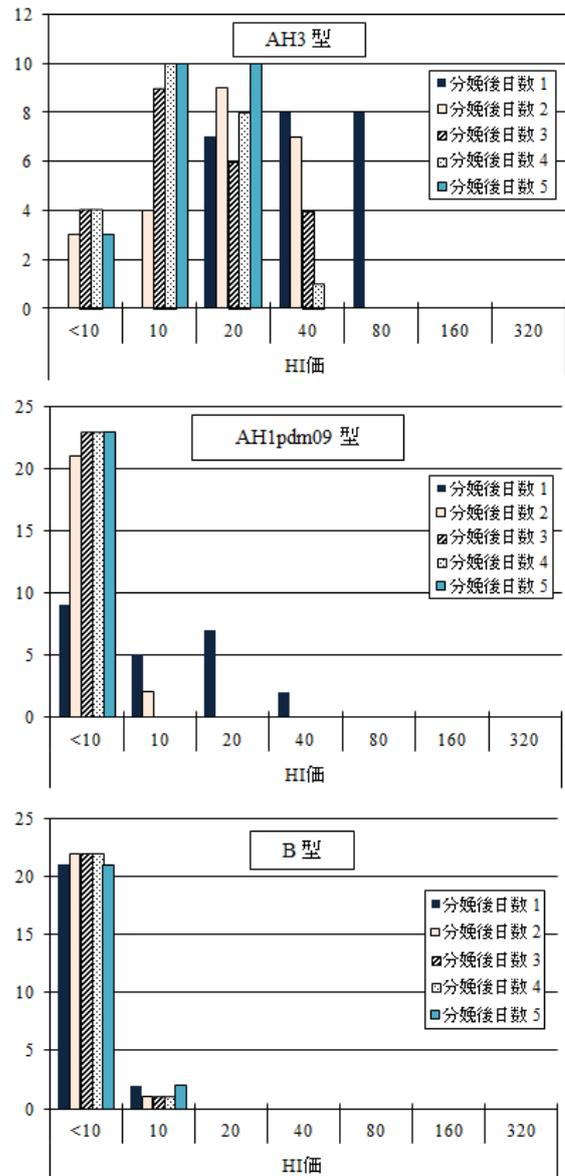


図 1 インフルエンザウイルスに対する HI 試験結果

表2 エンテロウイルスに対する中和試験結果

対象牛		動物試験結果 (死亡数/供試数)				細胞培養試験結果 (CPE出現数/供試数)	
		1 LD ₅₀		10 LD ₅₀		1 TCID ₅₀ (対照群: 5/8)	10 TCID ₅₀ (対照群: 7/8)
		対照群	乳清添加群	対照群	乳清添加群		
畜産試験場飼養牛	1	1/4	1/4	2/3	1/3	0/4	0/4
	2	1/3	1/3	2/3	0/3	1/4	1/4
	3	1/3	0/3	1/2	0/3	1/4	1/4
	4	1/3	0/4	2/3	0/3	3/4	4/4
	5	1/4	2/4	2/4	1/4	0/4	0/4
	6	1/4	1/4	3/3	0/3	1/4	1/4
	7	2/4	1/4	4/4	3/4	1/4	3/4
	8	1/4	3/4	4/4	0/4	2/4	2/4
	9	2/4	1/4	4/4	3/4	0/4	1/4
	10	2/4	2/4	4/4	0/4	2/4	3/4
	11	3/4	3/4	4/4	0/4	0/4	2/4
	12	1/4	0/4	3/3	1/3	0/4	1/4
	13	1/3	0/4	3/3	0/3	1/4	3/4
	14	3/4	1/5	3/3	0/4	1/4	3/4
	15	3/4	0/4	3/3	1/3	2/4	3/4
	16	2/4	1/4	3/3	1/4	0/4	1/4
	17	3/4	1/5	3/3	0/3	1/4	3/4
酪農農家飼養牛	18	2/4	0/4	4/4	0/4	2/4	3/4
	19	1/3	0/4	2/3	0/3	0/4	2/4
	20	2/4	0/4	3/4	0/4	0/4	3/4
	21	1/4	0/4	4/4	0/4	2/4	4/4
	22	2/4	0/4	3/3	1/4	0/4	4/4
	23	3/4	0/4	3/3	0/3	2/4	2/4
計		40/87 (46.0%)	18/92 (19.6%)	69/77 (89.6%)	12/81 (14.8%)	22/92 (23.9%)	50/92 (54.3%)

検体が HI 価を示したものの、3日目以降になると全ての検体が10倍未満であった。B型については、いずれかの日数で HI 価が確認されたのは4頭のみであり、残り19頭は全日数をとおして HI 価10倍未満であった。また、4頭7検体から確認された HI 価も10倍と低値であった。

3.2 エンテロウイルス不活化効果の検討(表2)

3.2.1 動物試験結果

1 LD₅₀における死亡率は、対照群 46.0% (40/87) に対して乳清添加群 19.6% (18/92) であった。10 LD₅₀における死亡率は、対照群 89.6% (69/77) に対して乳清添加群 14.8% (12/81) であり、両濃度において乳清添加群で死亡率が低い結果となった。また、ウイルス量を10倍にすると対照群では致死率が上昇したのに対して、乳清添加群では変化は見られなかった。なお、生存個体中に後脚の弛緩性麻痺や著しい哺乳低下といった感染の兆候を示す個体は確認されなかった。

3.2.2 細胞培養試験結果

1 TCD₅₀における CPE 出現率は、対照群 62.5% (5/8) に対して乳清添加群 23.9% (22/92) であった。10 TCD₅₀における CPE 出現率は、対照群 87.5% (7/8) に対して乳清添加群 54.3% (50/92) であった。

4. 考察

ウシの早期初乳についてインフルエンザウイルスに対する HI 試験を実施したところ、対象となる型によって大きく異なる結果が得られた。AH3型に対しては、23頭全ての分娩後1日目の検体で HI 価が確認され、うち8検体は HI 価80倍とワクチン株由来抗血清に匹敵するような値を示した。一方で、他の2型に対する反応性は乏しく、とりわけ B型に対しては HI 価を示したのは4頭7検体のみと AH3型と比較して著しく劣る結果であった。ウシに対する A型および B型インフルエンザウイルスの感染性は未だ確認されていないことから、今回得られた HI 価は

抗体ではなく、ラクトフェリン⁴⁾や酸性ミルクオリゴ糖⁵⁾等の乳清成分によるものであったと推察される。これら成分の各型に対する反応性は非特異的であると考えられるが、今回の検討では型間で異なる反応性を示した。検討条件として各型の血球凝集能を16 HA 単位に統一していたが、株により血球凝集能には差があることから、調整したウイルス溶液中に実際に含まれていたウイルスの量そのものは、型によりそれぞれ異なっていたと推測される。したがって、各型間の反応性の違いは反応対象であるウイルス量に起因したものであった可能性が高いと考えられた。HI 試験は本来、ウイルスの性状解析やヒトの血中抗体価測定等を目的とした手法であるため、手指汚染の想定よりもはるかに多いウイルス量で検討を行った。それにも関わらず、型により差は見られたものの HI 価が確認されたことから、手指汚染で想定される少ないウイルス量においては、十分に不活化効果が期待できるものと考えられた。

エンテロウイルスに対する中和試験では、in vivo にあたるマウスを用いた動物試験、in vitro にあたる細胞培養試験の両法において、それぞれ死亡率、CPE 出現率の低下が認められた。このことから、乳清のエンテロウイルスに対する不活化効果が確認されたと考える。

早期初乳を添加剤とすることで手指用衛生用品にウイルス不活化効果を付加することが出来れば、間接触感染の簡便な予防対策として活用し得るだけでなく、現在は廃棄処分されている膨大な資源の有効活用にも繋がる。今後も間接触感染によって感染が拡大する他のウイルスに対する効果等、実現化に向けた更なる検討を重ねていきたい。

参考文献

- 1) 牛島廣治, 大楽真健, 本間仁, 他: ウシ初乳中の免疫グロブリン成分—特に抗ロタウイルス抗体—の基礎的研究, 感染症学雑誌, **64**, 3, 1990, 274-279.
- 2) 牛島廣治, 大楽真健, 向山淳司: ウシ初乳の静菌作用, 感染症学雑誌, **65**, 1, 1991, 54-60.
- 3) 国立感染症研究所: インフルエンザ診断マニュアル (第2版), 2012, 17-24.
- 4) Pietrantoni A., Dofrelli E., Tinari A., et al.: Bovine lactoferrin inhibits influenza A virus induced programmed cell death invitro, *Biomaterials*, **23**, 3, 465-475.
- 5) 内田健志, 北郡秀晃, 山口博史, 他: ウシ初乳中酸性ミルクオリゴ糖のインフルエンザウイルス感染阻害作用, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2011, 81.

新生児マス・スクリーニング事業

新生児マス・スクリーニングにおける発見患児の 追跡調査結果について

秋野和華子 安部真理子 柴田ちひろ

新生児マス・スクリーニングは昭和52年に厚生省母子保健事業の一環として導入され、先天性代謝疾患等の早期発見、早期治療により障がい未然に防ぐことを目的に実施されている。秋田県では当センターが昭和52年度から検査に携わってきたが、新検査法（タンデムマス法）の導入にともない外部委託検査となったため、平成25年7月31日出生児をもってセンターでの検査業務を終了した。検査が開始された昭和53年1月から平成25年7月までの間、初回検査数は412,612名、精密検査対象者数は738名、確定患者数は185名であった。当センターでは秋田県の先天性代謝異常検査等実施要綱に基づき、毎年追跡調査を実施してきた。平成25年度追跡調査において、集計対象者115名中、先天性甲状腺機能低下症および関連疾患が95名（男性：38名、女性：57名）と最も多く、そのうち先天性甲状腺機能低下症と診断されたのは78名であった。また、経過観察3名を除くすべての対象者において定期的な通院が認められた。地域別の対象者数では、中央地域が最も多く74名であった。

1. はじめに

秋田県の新生児マス・スクリーニングは、県の先天性代謝異常検査等実施要綱¹⁾に基づき、県内で出生した新生児の血液について、フェニルケトン尿症等6疾患を対象に当センターで検査を行ってきた。また、要綱¹⁾には患者の治療経過等の追跡調査実施も定められており、センターでは治療に当たる医療機関の協力を得て、毎年追跡調査を実施してきた。平成25年8月以降、新検査法（タンデムマス法）の導入にともない、センターでの検査業務が終了となり、追跡調査は秋田県健康福祉部健康推進課で実施することとなったが、移行期となった平成25年度の追跡調査に限っては、当センターと共同で調査が進められた。

今回は、平成25年度追跡調査の結果をもとに、これまでの年度別・疾患別患者数や通院状況等をまとめたので報告する。

2. 追跡調査方法

2.1 対象疾患

フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症、ガラクトース血症、先天性甲状腺機能低下症、先天性副腎過形成症の6疾患およびそれら関連疾患を対象とした。

2.2 対象者

昭和53年1月から平成25年7月31日に当センターで新生児マス・スクリーニングを実施した412,612名中、対象疾患と診断され治療を継続している125名について調査を行った。

2.3 調査実施期間

平成26年1月7日～平成26年1月31日

2.4 調査方法

前記要綱で定められた追跡調査票またはフロッピーディスクを治療機関（19施設）に送付し、回収後集計した。

3. 結果と考察

すべての対象者について回答が得られ、回収率は100%であった。集計は本追跡調査において転居あるいは経過観察フォローが終了したことが確認された10名を除く17施設115名を対象とした。

3.1 疾患別対象者数

年度別・疾患別対象者数を表1に示す。疾患別に対象者をみると、先天性甲状腺機能低下症および関連疾患が115名中95名（82.6%）と最も多く、ついで先天性副腎過形成症が9名（7.8%）、

表1 年度別・疾患別対象者数

年度	秋田県 出生数 (年)	初回 検査数	精密 検査 依頼数	患者 数 *1	疾 患 名						対 象 者 数
					アミノ酸代謝異常			糖質 代謝異常	内分泌疾患		
					フェニル ケトン 尿症 及び 関連疾患	メープル シロップ 尿症	ホモ シスチン 尿症	ガラク トース 血症 及び 関連疾患	先天性 甲状腺 機能 低下症 及び 関連疾患	先天性 副腎 過形成症	
S52～62	167,692	157,218	101	22							0
S63	12,087	13,619	7	4					1		1
H元	11,647	13,134	13	3							0
H2	10,992	12,422	19	6							0
H3	10,743	12,383	13	3	1				1		2
H4	10,715	12,037	20	1							0
H5	10,346	11,730	35	2			1		1		2
H6	10,742	12,107	43	1							0
H7	9,995	11,221	26	0							0
H8	9,744	10,851	30	0					1		1
H9	9,656	10,725	41	6						1	1
H10	9,367	10,453	45	8	1				5		6
H11	9,168	10,277	47	10					7	1	8
H12	9,007	9,911	38	9	1				4		5
H13	8,874	9,735	54	8					7		7
H14	8,456	9,386	46	14					7	1	8
H15	8,062	9,091	17	10	4				3	1	8
H16	7,998	8,956	30	16					13	1	14
H17	7,697	8,598	12	8					4	1	5
H18	7,726	8,683	20	8					5	1	6
H19	7,502	8,391	15	8					5		5
H20	7,421	8,188	14	11	2				7		9
H21	7,013	7,999	9	6					2		2
H22	6,688	7,741	10	2				1	4		5
H23	6,658	7,777	18	11					11	1	12
H24	6,543	7,362	11	7					4	1	5
H25*2	2,094	2,617	4	1					3		3
総数	394,633	412,612	738	185	9	0	1	1	95	9	115

*1：対象疾患と診断された数 *2：4～7月までの集計

フェニルケトン尿症および関連疾患が9名(7.8%)、ホモシスチン尿症が1名(0.9%)、ガラクトース血症および関連疾患が1名(0.9%)であった。メープルシロップ尿症の発見・追跡例はなかった。平成10年度以降の対象者数の増加については、平成11年度に先天性代謝異常症等対策協議会が設置されたことにより追跡調査が強化され²⁾、前年度(平成10年度)の確定患者からすべてを網羅した追跡調査が実施されるよう

になったことが理由としてあげられる。

3.2 疾患別対象者の性別

疾患別対象者の性別を表2に示す。先天性甲状腺機能低下症および関連疾患では男性38名、女性57名(合計:95名)であった。先天性副腎過形成症は男性7名、女性2名(合計:9名)、フェニルケトン尿症および関連疾患では男性3名、女性6名(合計:9名)、ホモシスチン尿

表2 疾患別対象者の性別

	疾患名	男	女	対象者数
内分泌疾患	先天性甲状腺機能低下症 及び関連疾患	38	57	95
	先天性副腎過形成症	7	2	9
アミノ酸代謝異常	フェニルケトン尿症 及び関連疾患	3	6	9
	メープルシロップ尿症	0	0	0
	ホモシスチン尿症	0	1	1
糖質代謝異常	ガラクトース血症 及び関連疾患	1	0	1
	総数	49	66	115

症は女性1名、ガラクトース血症および関連疾患は男性1名であった。

先天性甲状腺機能低下症の85%は甲状腺発生異常に起因するが³⁾、その中でも最も多い異所性甲状腺は女兒に多い(男女比1:2~3)といわれている⁴⁾。本結果において、先天性甲状腺機能低下症および関連疾患は女性に多かったが、病型等の情報が少なかったため、詳細な傾向の把握には至らなかった。今後の調査による評価が望まれる。

3.3 対象疾患別診断名内訳

対象疾患別診断名内訳を表3に示す。先天性甲状腺機能低下症および関連疾患95名のうち、先天性甲状腺機能低下症(クレチン症)が78名と最も多かった。先天性甲状腺機能低下症は対象6疾患中、全国的にも最も頻度が高く⁵⁾、秋田県でも同様の結果であった。フェニルケトン尿症および関連疾患では、9名のうち7名が1999年(平成11年)に発見されたテトラヒドロピオブテリン(BH₄)反応性高フェニルアラニン(Phe)血症⁶⁾であった。先天性副腎過形成症9名のうち、1名については2004年(平成16年)にヒトにおいてはじめて遺伝子変異が同定されたP450オキシドレダクターゼ遺伝子異常症⁷⁾と診断され、他8名は21-水酸化酵素欠損症であった。

3.4 疾患別通院状況

疾患別通院状況を表4に示す。先天性甲状腺機能低下症および関連疾患では1~3ヶ月に1

回通院している患者が95名中87名と最も多く、4~12ヶ月に1回が7名、不定期の経過観察が1名であった。先天性副腎過形成症では経過観察1名を除くすべての患者が1~3ヶ月に1回定期的に通院していた。これら内分泌疾患は投薬治療が主であると推察されるため、薬の処方頻度に合わせた通院状況であることが考えられる。フェニルケトン尿症および関連疾患とホモシスチン尿症の10名については全員定期的な通院が確認された。これらアミノ酸代謝異常は投薬治療のほか食事療法によりコントロールが可能なケースもあるため、患者の状態に合わせた通院状況となっているものと考えられる。ガラクトース血症および関連疾患の1名は受診時期が定まっていない経過観察であった。

3.5 地域別対象者数

地域別対象者数を表5に示す。秋田県内を県北・中央・県南の3地域に分けてそれぞれ集計を行った。治療受診機関の内訳は、県北が4施設(鹿角市:1, 大館市:1, 能代市:2), 中央が7施設(秋田市:5, 由利本荘市:2), 県南が6施設(大仙市:1, 仙北市:1, 横手市:3, 湯沢市:1)であった。秋田市を含む中央地域の対象者数が74名と最も多く、ついで県南地域が29名、県北地域が12名であった。

対象者が居住地以外の施設に受診している場合もあるため、一概に地域間差を述べることは難しいが、人口および治療機関が多い中央地域での受診が多くなっている。

表 3 対象疾患別診断名内訳

	疾 患 名	対象者数
先天性甲状腺機能低下症 及び 関連疾患	先天性甲状腺機能低下症（クレチン症）	78
	先天性甲状腺機能低下症（クレチン症）疑い	3
	潜在性甲状腺機能低下症	6
	新生児一過性甲状腺機能低下症	2
	高 TSH 血症	1
	一過性高 TSH 血症	1
	持続性高 TSH 血症	1
	家族性高 TSH 血症	1
	経過観察	2
先天性副腎過形成症	21-水酸化酵素欠損症	8
	P450 オキシドレダクターゼ遺伝子異常症	1
フェニルケトン尿症 及び関連疾患	フェニルケトン尿症	2
	BH ₄ 反応性高 Phe 血症	7
ホモシスチン尿症	ホモシスチン尿症	1
ガラクトース血症 及び関連疾患	経過観察	1

表 4 疾患別通院状況

	疾患名	通院間隔（ヶ月）							経過観察	総数	
		1	1~2	2	2~3	3	4	6			12
内分泌疾患	先天性甲状腺機能低下症 及び関連疾患	8	1	14		64	1	4	2	1	95
	先天性副腎過形成症	1		5		2				1	9
アミノ酸代謝異常	フェニルケトン尿症 及び関連疾患	1		1	1	1		1	4		9
	メープルシロップ尿症										0
	ホモシスチン尿症					1					1
糖質代謝異常	ガラクトース血症 及び関連疾患									1	1
	総数	10	1	20	1	68	1	5	6	3	115

表5 地域別対象者数

		県北	中央	県南	対象者数
内分泌疾患	先天性甲状腺機能低下症及び関連疾患	10	57	28	95
	先天性副腎過形成症	1	7	1	9
アミノ酸代謝異常	フェニルケトン尿症及び関連疾患	1	8	0	9
	メープルシロップ尿症	0	0	0	0
	ホモシスチン尿症	0	1	0	1
糖質代謝異常	ガラクトース血症及び関連疾患	0	1	0	1
総数		12	74	29	115

4. まとめ

新生児マス・スクリーニングが導入され 37 年が経過した。これまで全国で 1 万人以上の患儿が早期発見により先天性代謝疾患の発症や重症化を防止されたといわれている⁸⁾。当センターでは昭和 52 年度から検査体制の変遷(表 6)に対応しながらスクリーニング業務を行ってきた⁹⁾。新検査法(タンデムマス法)の導入にともない当センターでの検査業務は終了となったが、追跡調査については県健康福祉部健康推進課が継続して実施していくこととなる。新生児マス・スクリーニングの追跡調査を実施している自治体は全国でも少ないが、秋田県では専門医が在籍する秋田大学医学部や県医師会の協力のもと、長期にわたり調査が行われてきた。個人情報保護の観点から患者情報の収集が困難になってきている中、事業開始当初からの患者について継続的に状況を把握できている意義は大

きいと思われる。先天性代謝異常症等疾患患者の多くは継続した投薬や食事療法による一生涯のコントロールが必要となる。患者情報の把握が悪化予防や適切な対応の一助になると思われ、追跡調査を利用した長期的なフォローアップ体制の確立は重要と考える。一方で、秋田県の追跡調査は要綱策定以降、定められた調査票を使用し実施してきた。しかしながら、近年新しい検査・解析方法の開発が進み、より詳細な病型診断や分類が可能となってきたことから、調査票の様式が現状にそぐわない部分も出てきている。今後、項目や内容を再構築し、記入方法の簡便化等も考慮に入れた様式の見直しも必要と考える。

加えて、これまでの追跡調査結果は、一部関係機関のみへの情報提供にとどまっていたため、今後はマス・スクリーニング事業の評価や社会啓発活動、患者およびその家族に対するサ

表6 検査体制の変遷

昭和 53 年 (1 月) ~	昭和 54 年 ~	昭和 60 年 ~	平成元年 ~	平成 4 年 ~	平成 9 年 ~	平成 15 年 ~	平成 16 年 ~	平成 25 年 (8 月) ~
●新生児マス・スクリーニング事業開始 (フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症、ガラクトース血症、ヒスチジン血症の5疾患) 県北・中央：衛生科学研究所(現：健康環境センター) 県南：由利組合総合病院								
●先天性甲状腺機能低下症スクリーニング検査開始 (RIA法のため外注)		○神経芽細胞腫スクリーニング検査開始		●先天性副腎過形成症スクリーニング検査開始 (大学病院にてTSH・17-OHPの2項目を検査)		●ヒスチジン血症が検査対象から除外		
●代謝異常症4疾患(4項目)について全県の検査を当所で実施						○神経芽細胞腫スクリーニング検査事業の休止		
							●全6疾患(6項目)についての検査を当所で実施	
								●全6疾患(6項目)について外部委託

ポート等有効活用が望まれる。

秋田県の出生数は減少の一途をたどっており、少子化は大きな社会問題となっている。ひとりでも多くの患者を発見し健康に成人期を迎えられるよう、きめの細かい対応を行いながら事業が進められていくことを期待する。

参考文献

- 1) 秋田県先天性代謝異常検査等実施要綱：秋田県健康福祉部保健衛生課，平成 12 年 4 月。
- 2) 安部真理子，柴田ちひろ：マス・スクリーニング・神経芽細胞腫患者の追跡調査（In Akita），日本マス・スクリーニング学会誌，**19**，1，2009，39-44。
- 3) 鬼形和道：先天性甲状腺機能低下症，小児科診療，**67**，10，2004，1631-1636。
- 4) 南谷幹史，猪股弘明：先天性甲状腺機能低下症，**48**，11，2007，1630-1639。
- 5) タンデムマス Q&A2012：厚生労働科学研究，2012 年 3 月。
- 6) 新宅治夫：フェニルケトン尿症の新しい治療法，日本小児科医会会報，**43**，2012，163-166。
- 7) 深見真紀，曾根田瞬，矢澤隆志，宮本薫，緒 方勤，日本生殖内分泌学会雑誌，**17**，2012，17-20。
- 8) 青木菊麿他，新生児マススクリーニングをもっと知ろう，公衆衛生情報 2，**42**，11，2013，3-17。
- 9) 安部真理子，山脇徳美：先天性代謝異常症等疾患・神経芽細胞腫追跡調査について，秋田県健康環境センター年報，**2**，2006，41-45。

食品中の病原ウイルスの検出方法に関する研究

パンソルビン・トラップ法によって食品検体から検出された ノロウイルスの遺伝子解析法の開発

斎藤博之 田中智之*¹ 野田 衛*²

パンソルビン・トラップ法は、食品検体に含まれるウイルス粒子を黄色ブドウ球菌の表面に吸着させて回収することを基本原理としている。その性質上、抽出された RNA には大量の黄色ブドウ球菌由来の遺伝子が混入し、遺伝子解析の障害となることがこれまでの研究で明らかとなった。黄色ブドウ球菌の遺伝子そのものは、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度に対してはプラスの効果が見込める。従って、それを排除するのではなく、遺伝子解析に影響が及ばないようにする解決策が求められた。本研究では、逆転写反応時に PCR で用いるものとは異なる専用プライマーを使うことで、遺伝子解析可能な PCR 増幅産物を得ることに成功した。さらに、増幅プロセスにホットスタート&タッチダウン PCR を用いることで一層の改善が認められた。また、ノロウイルス GI.4、及びノロウイルス GII.4 で汚染させたポテトサラダにおける本法の検出限界は、両者とも食品 1g 当たり 35 コピーであった。以上のことにより、黄色ブドウ球菌のキャリアーとしての長所を活かし、遺伝子解析の障害という短所を顕現させないようにするという目的が達成された。

1. はじめに

ウイルス性食中毒の対策として二枚貝の汚染実態調査や、調理従事者への衛生教育等が進められてきた^{1,2)}。しかしながら、原因として疑われる食品からのウイルス検出は、その作業の困難さからこれまでほとんど検討されてこなかったため、具体的な汚染ルートの解明に決め手を欠いていた。原因物質としてはノロウイルス (NoV) が大部分を占めているが、他にもサポウイルス (SaV) やアデノウイルス 41 型 (AdV41) に代表される腸管系アデノウイルスも含まれている。さらに、平成 22 年 3 月に我が国における A 型肝炎ウイルス (HAV) 感染者の報告が急増するなど、食品中のウイルスを検出する方法の確立が急務となっている³⁾。平成 19~21 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルスの制御に関する研究」(H19-食品-一般-016) において、固形、液状、練り物、油物などの一般的な食品から NoV を検出する手法としてパンソルビン・トラップ法 (パントラ法) を開発し、この問題を解決するための糸口を見出すことができた^{4,13)}。その際、各種ウイルスに対する抗体の安定供給が課題となっていたが、平成 22 年度の本研究事業において、市販のガン

マグロブリン製剤を利用することで汎用化に成功した¹⁴⁻¹⁷⁾。普及にあたって、本法の根幹をなすパンソルビンを製造・販売しているメーカーが 1 社しかないことから、在庫切れや製造中止などのリスクが問題となったが、自家調製プロトコルが完成したことで払拭された^{18,19)}。一方で、実際の食中毒事例に用いられ、食品からのウイルス検出に成功したケースもあったが、非特異反応が多すぎるにより遺伝子解析が困難であるという問題が指摘された²⁰⁾。そこで本研究では、パントラ法で抽出された RNA に対して遺伝子解析が可能となるような反応系の開発を行った。

2. 方法

2.1 研究材料

実験に用いる食品として、市販されている焼きそばとポテトサラダを用いた。また、検出対象となるウイルスとして、NoV-GI.4 (AB685383)、及び NoV-GII.4 (AB293424) を用いた。

2.2 試薬類

2.2.1 食品洗滌液

Tris-HCl (pH8.4) – 0.5M NaCl – 0.1% Tween20

*1 堺市衛生研究 *2 国立医薬品食品衛生研究所

を調製して使用した。

2.2.2 5%ガンマグロブリン製剤

米国 Baxter 社の 5% 静注用ガンマグロブリン製剤「Gamagard」を用いた。Alfreds Pharma 社から購入した。

2.2.3 パンソルビン

黄色ブドウ球菌を熱処理してホルマリン固定したものの懸濁液で、メルク社から購入した。

2.2.4 フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen)を使用した。

2.2.5 カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)を使用した。

2.2.6 再懸濁液

2.2.5 の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

2.2.7 逆転写反応エンハンサー

RTmate (ニッポンジーン)を使用した。

2.2.8 DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの製品を使用した。

2.2.9 アミラーゼ

前処理用: 枯草菌由来 α -Amylase 粉末 (和光純薬) を使用した。

後処理用: α -Amylase Ultrapure (ニッポンジーン) を使用した。

2.2.10 食品処理袋

サニスペックテストバッグ (アズワン) を使用した。

2.2.11 逆転写酵素

ReverTra Ace (東洋紡) を使用した。

2.2.12 ノーマル PCR 用酵素

Taq DNA Polymerase High Yield (グライナー) を用いた。

2.2.13 ホットスタート&タッチダウン PCR 用酵素

KOD FX Neo (東洋紡) を用いた。

2.2.14 逆転写反応に用いたプライマー

ランダムプライマー (9 mer, タカラバイオ), G1SKR と G2SKR²¹⁾, 及び新規開発の逆転写反応専用プライマー PANR-G1 と PANR-G2 を用いた。PANR-G1 は表 1 に示した PANR-G1a と PANR-G1b を 1:1 で混合したものである。PANR-G2 は表 1 に示した PANR-G2a, PANR-G2b, 及び PANR-G2c を 2:1:1 で混合したものである。

2.3 パンソルビン・トラップ法の全体の手順

基本的な操作の流れを図 1 に示した。

2.4 ウイルスの検出

図 1 で得られた抽出液 (60 μ L) から 8.5 μ L を取り, DNase I 及び α -Amylase Ultrapure を各 1 μ L, RNase inhibitor を 0.25 μ L, 5 \times 逆転写 buffer (酵素に添付) を 4 μ L 加えた後, 蒸留水で反応量を 15.5 μ L とし, 37 $^{\circ}$ C 10 分, 65 $^{\circ}$ C 5 分のインキュベーションを行った。その後, プライマー (前述のもの), dNTP, RTmate, 及び逆転写酵素を追加して cDNA を合成した (反応容量 20 μ L)。合成した cDNA 溶液を 5 μ L 取り, COG1F²²⁾ / G1SKR²¹⁾, または COG2F²²⁾ / G2SKR²¹⁾ による 1st. PCR と, G1SKF/G1SKR または G2SKF/G2SKR による semi-nested RT-PCR を行った。この増幅反応において, 通常用いられるノーマル PCR と, より特異性の高いホットスタート&タッチダウン PCR の比較を行った。反応温度条件は, 次のとおりである。

【ノーマル PCR】

94 $^{\circ}$ C 4 分 1 サイクル

94 $^{\circ}$ C 30 秒 - 50 $^{\circ}$ C 30 秒 - 72 $^{\circ}$ C 30 秒 40 サイクル

72 $^{\circ}$ C 7 分 1 サイクル

表 1 逆転写反応専用プライマーの配列

名称	配列 (5'→3')	設定位置
PANR-G1a	GT <u>B</u> CKMAC <u>A</u> T <u>C</u> AG <u>C</u> AATCA	5800←5818
PANR-G1b	GGKTCAAGSRYCCTAACATCWGCAATGA	5800←5827
PANR-G2a	TCYARWKKYCTWACATCTAYAATYAYRTGGGGGAACAT	5502←5539
PANR-G2b	ARDGTCCTAACATCWATAATYAYATGAGGGGAACAT	5502←5536
PANR-G2c	CTSACATCCACMAYYACRTGCGGRCACAT	5502←5530

- ・ PANR-G1a と PANR-G1b の設定位置は, Norwalk68 株の配列に相当する塩基番号で表記した。
- ・ PANR-G2a, PANR-G2b, 及び PANR-G2c の設定位置は, Camberwell 株の塩基番号で表記した。
- ・ PANR-G1a の配列中のアンダーラインで示した塩基 (C) は LNA 修飾で合成した。

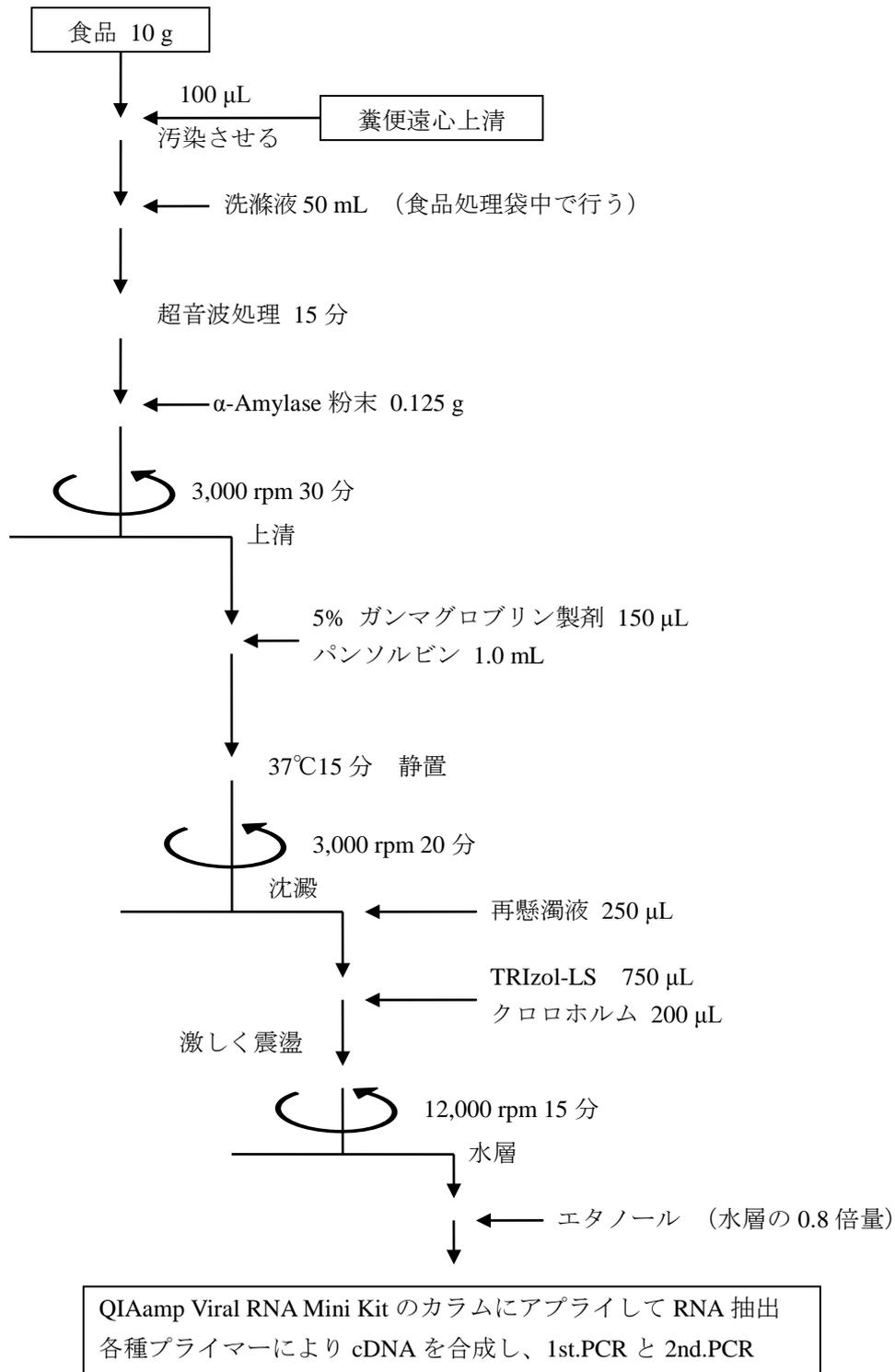


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

【ホットスタート&タッチダウン PCR】

94°C 4 分 1 サイクル
 94°C 30 秒 - (55→50°C) 30 秒 - 72°C 30 秒 5 サイクル：下線部がタッチダウン設定
 94°C 30 秒 - 50°C 30 秒 - 72°C 30 秒 40 サイクル
 72°C 7 分 1 サイクル

PCR 産物のゲル電気泳動で予想位置にバンドが認められた場合は切り出してシーケンスを試みた。また、1st. PCR 産物に対して real-time PCR²²⁾を行い、NoV 特異的な増幅の有無を検討した。使用した real-time PCR 装置はロシュ製「LightCycler 350S」で、反応容量は 20 µL である。

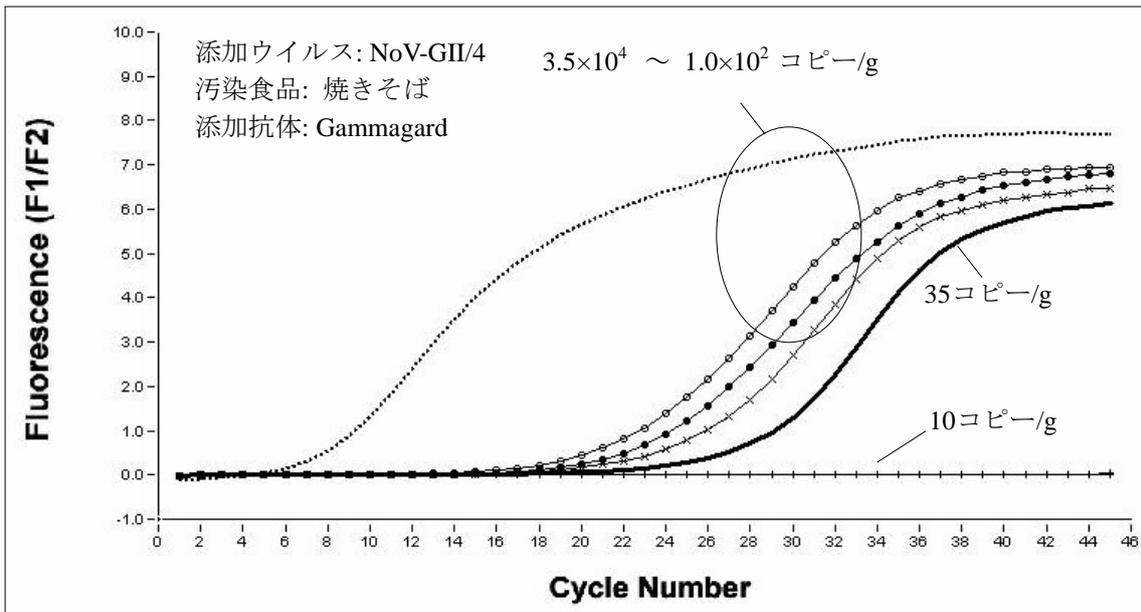


図2 Nested real-time PCRの増幅曲線

・1st. PCRをプライマーCOG2F/G2SKRにて実施し、その増幅産物をプライマー・プローブセットCOG2F/COG2R/RING2-TPを用いたreal-time PCRで検出した。

3. 結果

3.1 遺伝子解析における問題点の把握

問題点を把握するための予備試験としてさまざまなレベルで汚染させた焼きそばから、Gammagardを用いてNoV回収を行った際の増幅曲線を図2に示した。これによると、汚染度35コピー/gと10コピー/gで明確に陽性と陰性が分かれていることがわかる。一方、1st. PCR産物をプライマーG2SKF / G2SKRによるsemi-nested RT-PCRで再増幅し、アガロースゲル電気泳動で確認したところ、汚染度 3.5×10^2 コピー/gまでは344 bpsの増幅バンドが認められた(図3)。しかし、 1.0×10^2 コピー/g以下ではバンドが不明瞭であった。明確なバンドが認められた 3.5×10^3 コピー/gのレーンからバンドを切り出してシーケンスを解析したところ、汚染に用いたNoVの塩基配列であることが確認できた。同様に35コピー/gのレーンから344 bps近傍に位置する部分のゲルを切り出し、そこに含まれるDNA断片のシーケンスを解析したところ黄色ブドウ球菌(ブ菌)の16sリボソームの塩基配列であった。

3.2 問題点の理論的検討

逆転写反応もPCRも、起点はハイブリダイゼーションであることから、反応系を単純すると2種類の分子の会合ということになる。従って、

そこには会合定数(K)というものが存在し、さらにはそれぞれの分子の濃度が関係するため、質量作用の法則から、

$$K = \frac{[PT]}{[P][T]}$$

で表される。ここでは、[P]と[T]はそれぞれプライマーとテンプレートが反応系中で独立して存在している濃度、[PT]はそれらが会合して生じたハイブリダイゼーション分子の濃度とする。この式から、ハイブリダイゼーションが成立した分子の濃度を求めると、

$$[PT] = K[P][T]$$

となる。実際の反応に当てはめると、Kがプライマーの特異性に相当し、理想的な特異反応ならばKが大きくなり、非特異反応ならば小さくなる。ところが、非特異反応においてKが小さかったとしても、[T]が圧倒的に大きければ、結果として[PT]も大きくなる。本研究で直面している問題は、NoVの[PT]よりもブ菌の[PT]ははるかに大きいということに帰結する。食品汚染のNoVは「何コピー・・・」といった数字で論じられているのに対して、パントラ法で投入されるブ菌は肉眼で見える量であることから天文学的なコピー数になることが当然のごとく予想される。従って、個々のプライマーの特異性や

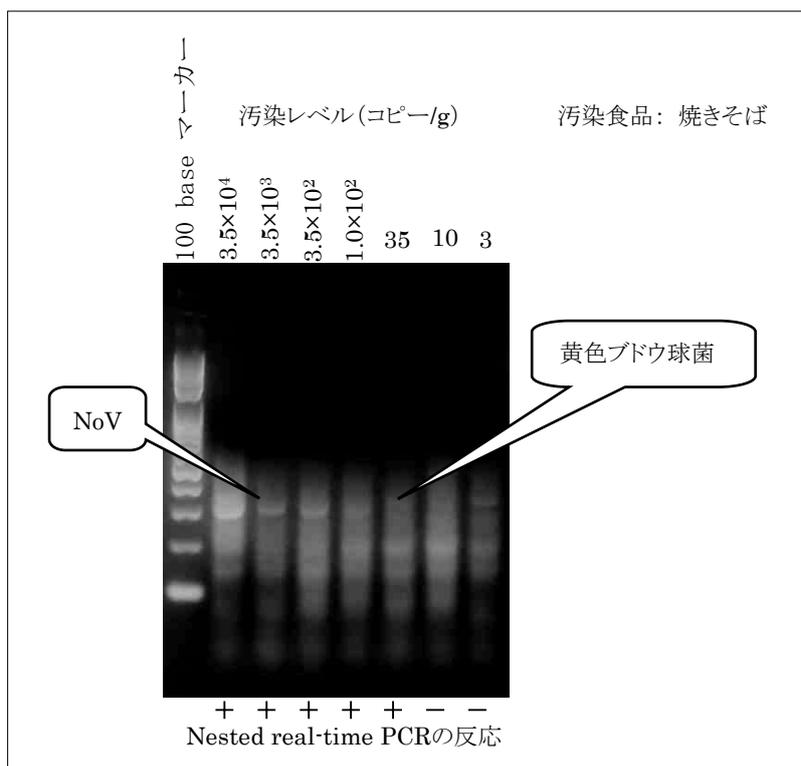


図3 Semi-nested RT-PCR 増幅産物の電気泳動パターン

・図2の1st. PCR産物を、プライマーG2SKF/G2SKRを用いた2nd. PCRで再増幅した。

PCRの反応条件(いずれもKに影響)にのみ着目しても解決には至らない。例えば、非特異反応の割合が1万分の1(Kに相当)である一方で、量的な差が1億倍([T]に相当)あったならば、プライマーの特異性が容易に相殺されてしまうことになる(NoVとブ菌の量的な差はもっと大きい)。

3.3 逆転写反応専用プライマーの設計

個々のプライマーの特異性やPCRの反応条件の改良では問題に対応できないことから、逆転写反応→1st. PCR→2nd. PCRの3段階の反応を一つのものとして俯瞰することで解決の糸口を見出した。すなわち、非特異反応にも種類があり、本来ならばそれぞれの反応段階における非特異反応の内容が違はずである。ところが、実際にはNoVとブ菌の圧倒的な初期濃度差が解消されることなく最後まで反映されていた。そこで、逆転写反応に用いるプライマーの影響を比較しながら、最終的にNoVの遺伝子のみが検出される方法を模索した。

ランダムプライマーで逆転写反応を行うと、 10^5 コピー/gのような高濃度汚染サンプルでは

高い回収率が得られるものの、低濃度汚染になるにつれ急激に回収率が落ちて、PEG沈澱法の方が好成績になるという逆転現象がすでに観察されている⁹⁾。図4のレーン3~6に示したとおり、ポテトサラダをベースとした100コピー/g以下の低濃度汚染サンプルでは、semi-nested RT-PCRを行ってもバンドが観察されず、semi-nested real-time PCRでも増幅が認められなかった。

G2SKRのようなPCRと同じNoV特異的プライマーを使うと、ブ菌の遺伝子が最後まで混入することは予備試験の結果(図3)と同様であった。ランダムプライマーで逆転写反応を行った場合と比べて、semi-nested real-time PCRでは増幅が認められたが、電気泳動で明瞭なバンドが観察できず、遺伝子解析は困難であった(図4レーン8~11)。ゲル上で薄く見えるバンドを切り出してシーケンスしたところ、レーン8と9はノイズが多すぎて判読不能であり、レーン10と11からはブ菌の16Sリボソームの配列が検出された。

以上の結果から、逆転写反応の段階でPCRとは異なる専用プライマーを用いることが重要と

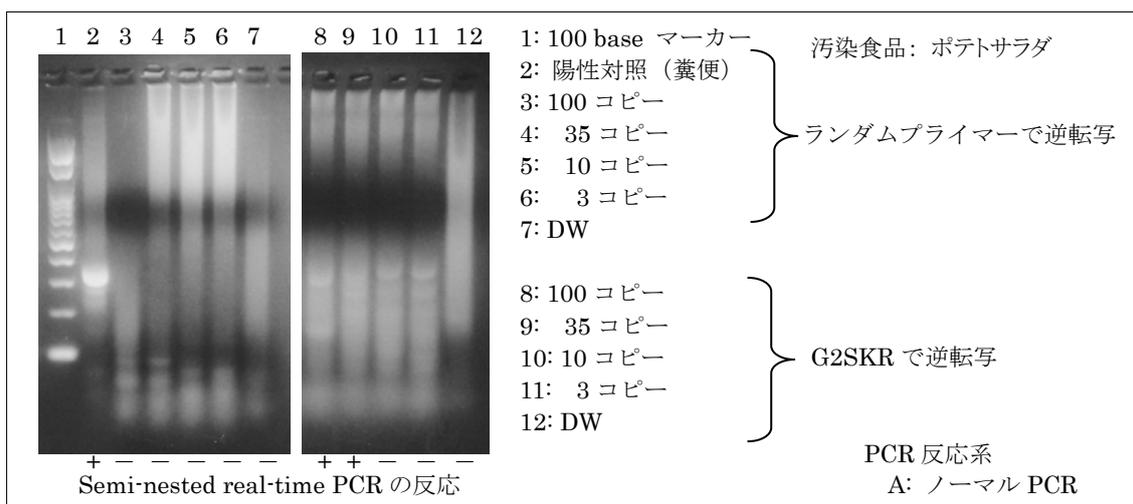


図4 従来の逆転写方法による semi-nested RT-PCR (NoV-GII.4)

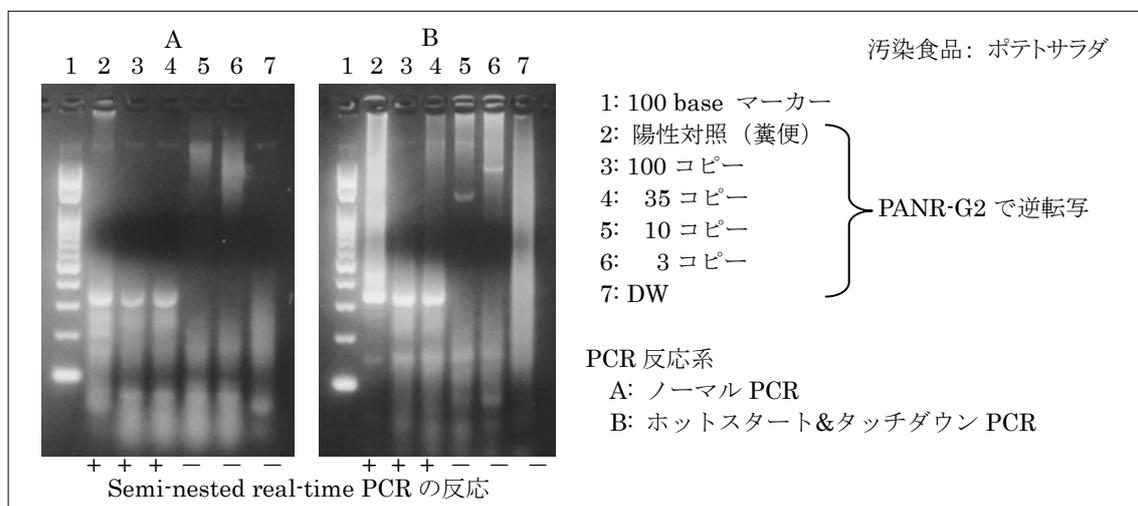


図5 逆転写反応専用プライマーを用いた semi-nested RT-PCR (NoV-GII.4)

考えられたため、表 1 に示すと通りの逆転写反応専用プライマーを設計した。設計にあたっては現行の real-time PCR の原著²²⁾に記載のあるウイルス株の配列を参照し、G1SKR や G2SKR より 3'側に保存領域を求めたが、全てのウイルス株をカバーできる領域は見つからなかった。そこで、ウイルス株を部分的な相同性を指標に 2~3 のグループに分割し、それぞれに対応するプライマーを混合使用する方針をとった。次にこうして得られたプライマー配列が AT-rich で Tm が低く、そのままでは反応効率に影響するため改良を加えた。PANR-G2 では塩基長を長くすることで十分な Tm を確保することができた。PANR-G1 は、塩基長を長くすると縮重度 (特異性に影響する) がランダムプライマーと変わらなくなることから、LNA (Locked Nucleic Acid)

修飾^{23,24)} を使って強制的に Tm を上昇させた。このような方針で設計された逆転写反応専用プライマーを用いて cDNA を合成し、semi-nested RT-PCR を行ったところ、図 5A に示すとおり 35 コピー/g の汚染レベルまで明瞭な増幅バンドが観察され、それをシークエンスしたところ最初に添加した NoV のものであることが確認された。また、2nd.PCR を real-time PCR で行った結果とも一致した。

3.4 PCR の反応系の検討

逆転写反応専用プライマーを用いることで、ブ菌遺伝子の混入を抑制し、遺伝子解析可能な NoV 増幅断片を得ることが可能になった。一方で、現在用いられている PCR の反応系は 10 年以上前のプロトコルを踏襲しており、より高度

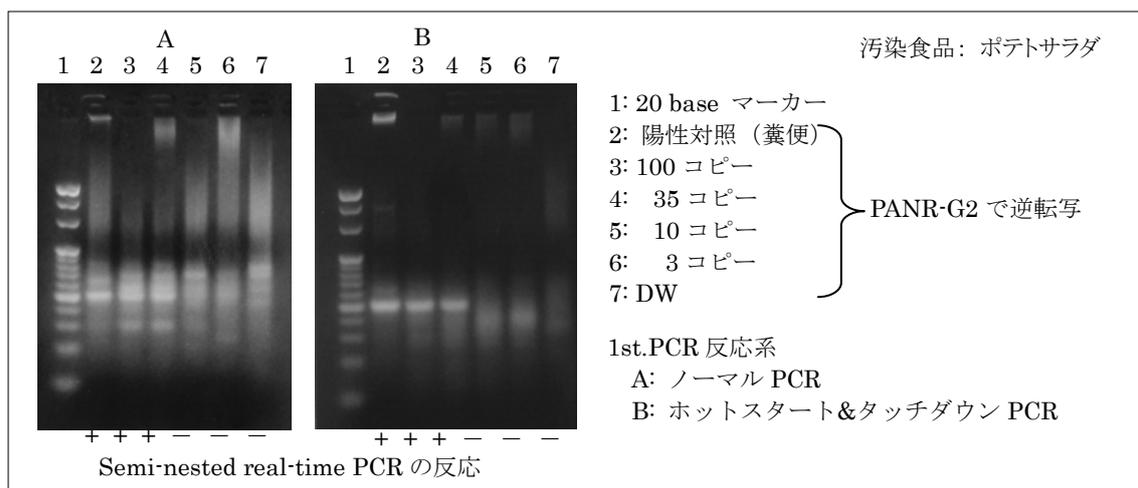


図 6 1st. PCR 反応系の semi-nested real-time PCR への影響 (NoV-GII.4)

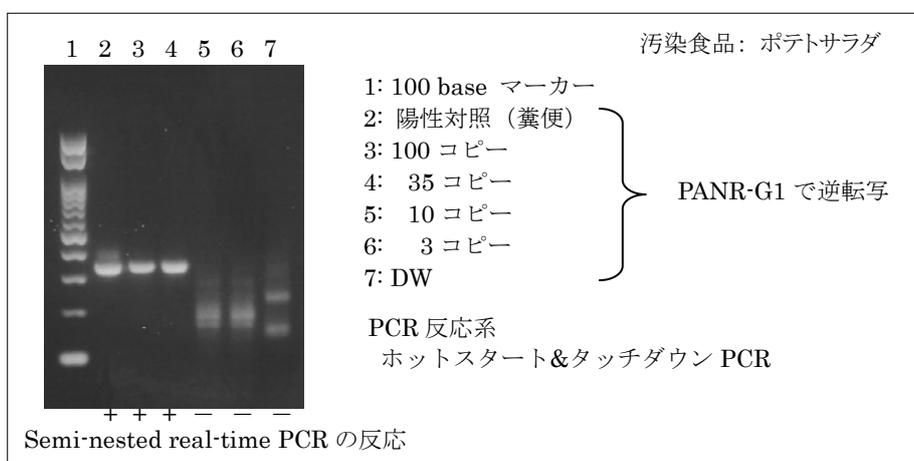


図 7 逆転写反応専用プライマーを用いた semi-nested RT-PCR (NoV-GI.4)

な機能を付加された最新の酵素を活用できていない。そこで、パントラ法の開発を機に PCR 反応系の改良を試みた。図 5B にはホットスタート機能を備えた酵素を用いたタッチダウン PCR による semi-nested RT-PCR の効果を示した。従来の反応系 (ノーマル PCR) である図 5A と比べると増幅バンドがより明瞭になっているのがわかる。そのバンドをシーケンスしたところ、添加したウイルスのものであることが確認できた。また、semi-nested real-time PCR の結果とも一致している。図 5A と図 5B の semi-nested real-time PCR の反応液を回収して電気泳動を行ったものが図 6 である。1st. PCR をノーマル PCR で行った図 6A と比べて、ホットスタート&タッチダウン PCR を行った図 6B の方が非特異的なバンドが少ないのがわかる。この差は、real-time PCR の機器画面における蛍光強度 (増幅カーブ

の高さ) の違いとなって現れる。

3.5 NoV-GI への対応

これまでの検討で、逆転写反応専用プライマーによる cDNA 合成と、ホットスタート&タッチダウン PCR が有効であることが判明したため、引き続き NoV-GI に対する検討を行った。逆転写反応専用プライマーは表 1 に示したとおりである。ポテトサラダを用いた検討では、35 コピー/g の汚染レベルまで semi-nested RT-PCR により明瞭なバンドが認められた (図 7)。このバンドをシーケンスしたところ、添加ウイルスのものであることが確認された。また、semi-nested real-time PCR の結果とも一致した。一方で、逆転写反応専用プライマーである PANR-G1a は、十分な Tm を確保するために LNA 修飾を用いていることから、図 8 においてその効果を検証し

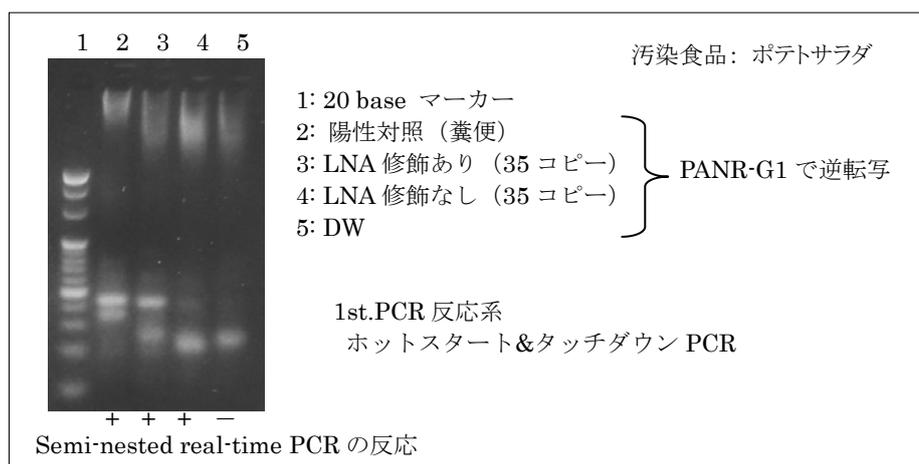


図8 Semi-nested real-time における LNA 修飾塩基の効果 (NoV-GI.4)

た。LNA 修飾をしていない PANR-G1a の配列で合成したプライマーでは増幅が弱いことがわかる (図8 レーン4)。

4. 考察

4.1 混入するブ菌遺伝子の功罪

本法は食品乳剤にブ菌を投入して、菌体表面にウイルス粒子を吸着させて回収することを基本原理とするため、抽出された RNA にブ菌の遺伝子が大量に混入してくるという性質がある。ブ菌の遺伝子は、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度に対してはプラスの効果がある。このことは、サザンブロットハイブリダイゼーション等において、極微量のプローブに大量のサケ精子 DNA を添加するのと同じ理由である。その一方で、検出された遺伝子をさらに詳しく解析しようとする際に妨害物質になるという問題が明らかとなった。しかし、純粋な Protein A を固定化したビーズを使用すると、上記のキャリアー効果が得られなくなることに加えて、単位体積当たりの表面積が小さい (粒子径が大きい) ことから、十分な感度が得られないことがわかっていて、従って、ブ菌遺伝子のキャリアーとしての長所を活かしつつ、遺伝子解析の障害とならないような方法を考案する必要があった。

4.2 逆転写反応と PCR で使用するプライマーと、検出プロセスで起こり得る反応

逆転写反応や PCR には多くの種類のプライマーが用いられるが、本研究の課題においては個々のプライマーの特異性を検討しても有効な策が

打ち出せないことは、

$$[PT]=K[P][T]$$

の式から明らかである (K のみを最適化しても、圧倒的に大量に存在するブ菌の [T] には抗し得ない)。そこで、逆転写反応→1st. PCR→2nd. PCR の3段階の反応を一つのものに見なして、どのような反応が起こっているかを理論的に検討し、実験で確認する作業を行った。ランダムプライマーで逆転写反応を行うと、100 コピー/g 以下の低濃度汚染サンプルでは、全く増幅が起らなかった (図4 レーン3~6)。この場合は、NoV もブ菌も含めて反応系に存在する全ての RNA が基質となるため、逆転写酵素の能力をはるかに超えてしまった (酵素反応速度が飽和した) 状態になっているものと考えられる。オリゴ (dT) を用いた逆転写反応も同様と予測される。

G2SKR のような PCR と同じ NoV 特異的プライマーを使うと、ランダムプライマーよりはブ菌に対する K が小さくなるため、相対的に NoV の RNA を逆転写する割合は増えることが予想される。しかし、ブ菌に対する非特異反応もゼロではなく、元々ブ菌の [T] が圧倒的に大きいため、無視できないくらいのブ菌由来 cDNA が生じることになる。その cDNA は末端が G2SKR の配列になっているため、1st. PCR ではホモロジー100%で効率よく増幅される。最初から多かったブ菌の遺伝子がこの段階でさらに増えるため、NoV の PCR 産物に混入して解析の障害となる (図4 レーン8~11)。

本研究で設計した逆転写反応専用プライマーで cDNA を合成した場合、上記のごとく非特異

反応はゼロではないためブ菌の cDNA が生じるところまでは同じである。しかし、それに続く 1st. PCR でもブ菌の非特異増幅反応は起こるものの、それは逆転写反応時の非特異反応とは異なる、新しい種類の反応が 1 からやり直しとなる。2nd. PCR に移行した際も、ブ菌由来の非特異増幅反応は別の種類のものになる。ここまですを総括すると逆転写反応→1st. PCR→2nd. PCR の 3 段階の反応において、NoV 遺伝子だけが連続したプロセスで効率よく増幅をはたし、ブ菌の非特異反応は 2 か所の矢印の部分でリセットされるため、結果として天文学的な初期濃度の差を超えることが可能になるものと考えられた。このことは、図 5 と図 7 において、遺伝子解析可能な NoV の増幅断片が得られたことで確認できた。検出限界は、NoV-GI と NoV-GII のいずれも食品 1 g 当たり 35 コピーであり、予備試験の結果 (図 2, 3) が再現された。

4.3 PCR 反応系の見直し

現在 NoV 検出のために常用されている PCR 反応系は、10 年以上前に作成されたプロトコルを踏襲しており、最新の生命工学の成果を享受できていない部分もある。かつては、PCR に用いる耐熱性 DNA ポリメラーゼに関して選択の余地はほとんど無かったが、近年は反応速度・正確性・阻害物質耐性などの機能を付加した酵素を目的に応じて使い分けることが可能となっている。本研究の目的が、ブ菌の遺伝子に由来する非特異反応の抑制であることから、ホットスタート機能を備えた酵素によるタッチダウン PCR を用いることでさらなる改善が見込めるものと期待された。こうした改善は、図 5B に示すとおり、増幅バンドの明瞭化として観察することができた。また、real-time PCR においてコピー数算定に直接関与する Ct 値 (増幅曲線の横軸) のみが着目され、蛍光強度 (縦軸) はあまり重視されてこなかったという問題がある。しかし、蛍光強度が低い状態での運用は、実事例の大部分を占めると想定される低レベル汚染サンプルにおいて、検出結果が不安定になるため看過し得るものではない。蛍光強度低下の原因には様々な要素があるが、非特異反応によって

1st. PCR の段階で COG2F と G2SKR が "初めて" 反応系に加えられるところに意義が見出される。DNA ポリメラーゼの活性が NoV 遺伝子以外の増幅に奪われる (競合阻害) ことが大きく影響している。図 6 に示すとおり、ホットスタート & タッチダウン PCR によって、増幅時の非特異反応は大幅に抑制されており、real-time PCR における蛍光強度を確保することに寄与するものと考えられた。

4.4 LNA 修飾塩基導入の効果

NoV-GI に対応した逆転写反応専用プライマーである PANR-G1 を構成するオリゴヌクレオチド PANR-G1a には LNA 修飾塩基が用いられた。この措置は、PANR-G2 のように塩基長を延ばすことでは Tm を確保できない事情 (変異が多すぎてランダムプライマーと同じになる) によるものである。LNA 修飾の効果を検証するために、修飾を施していないオリゴヌクレオチドと比較したものが図 8 であり、レーン 3 と 4 を比較すると増幅効率の違いは明らかである。

4.5 実事例へ適用と今後の課題

本研究で得られた知見を総括すると、パントラ法によって抽出された RNA については、図 9 に示したプロセスで検出を試みるのが妥当と考えられる。ここで構築されたプロトコルは、島根県浜田市の仕出し弁当による食中毒事例²⁵⁾や、静岡県浜松市の学校給食パンによる食中毒事例²⁶⁾に実際に適用されたことで、十分実用に耐えるものであることが証明された。また、厚生労働省通知²⁷⁾に記載されたことで、今後導入を進める機関が拡大するものと予想される。表 1 に記載したプライマーは、将来の状況によって柔軟に変更し得るが、PCR で用いるプライマーとは異なる逆転写反応専用プライマーを設定することが、検出後に遺伝子解析を実施するのに不可欠である。NoV 以外の食中毒起因ウイルスについてもパントラ法が適用できることがすでに明らかとなっているが、遺伝子解析まで踏み込むためには逆転写反応専用プライマーの設計を進める必要がある。

一方で、本法が普及するにつれて、実験室内

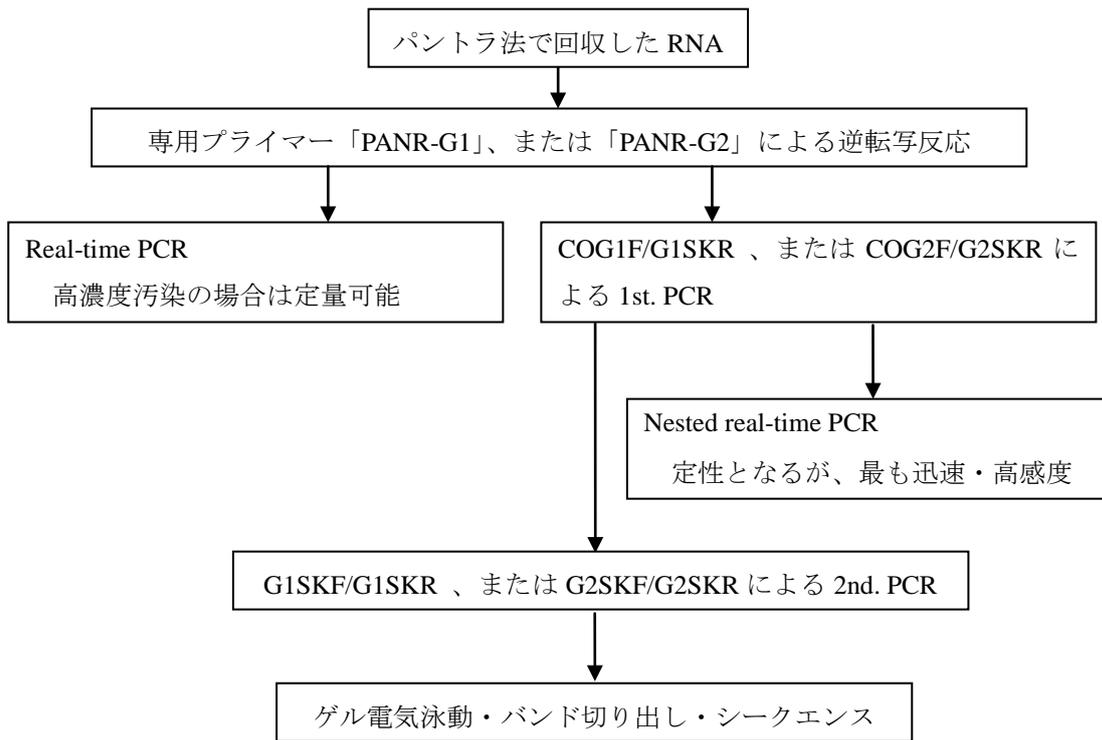


図9 パントラ法による RNA 抽出後のプロセス

汚染による偽陽性の問題が浮上してくることが想定される。本研究では遺伝子解析可能な RNA を得る手法を開発することができたが、それは両刃の剣であることに留意する必要がある。すなわち、遺伝子解析を積極的に実施すれば、それだけ作業環境中の PCR 増幅産物汚染が蓄積されて、新規の食品検査において悪影響を及ぼすというジレンマである。これまでは、作業する実験室を分けて、器具や試薬を分別使用するなど、実験操作を慎重に行うということ以外に積極的な偽陽性対策は取られてこなかった。しかし、食品のウイルス検査が現実的なものとなった段階では、その社会的な影響に鑑みて、一層の偽陽性対策を講じる必要があるものと考えられる。

さらに、本法が有効に活用されるためには、適切な食品サンプルの確保が重要である。具体的には、実際に食卓に供せられる段階の検食（調理から盛り付けのプロセスを経たもの）を保存するという原則を、事業者に周知する必要がある。

5. まとめ

開発途中で浮上した、抽出 RNA の遺伝子解析が困難であるという問題に対して解決策を見出した。PCR で用いるものとは異なる専用プライマーを用いて逆転写反応を行うことで、検出された遺伝子のシーケンスを確認することが可能となった。この方法は島根県浜田市や静岡県浜松市で発生した実際の食中毒事例で活用することができた。今後は、ノロウイルス以外の食中毒起因ウイルスへの対応と、実事例への適用例が増えるにつれて問題となることが予想される偽陽性の抑制が課題となる。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター, 国立感染症研究所ウイルス第二部:ノロウイルス集団発生事例に対して感染症および食品部局が共同で実施する初期実地疫学調査および微生物学的検査のポイント(第1版:平成19年11月18日付け), 2007, 16-17.
- 2) 丸山務(監修):改訂 ノロウイルス現場対策, 2007, 35-36.

- 3) 薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会食中毒部会: ノロウイルス食中毒対策について(提言), 2007, 1-2.
- 4) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 19 年度 総括・分担研究報告書, 2008, 103-111.
- 5) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収(検討2), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 19 年度 総括・分担研究報告書, 2008, 125-133.
- 6) 斎藤博之, 他: 食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の開発, 秋田県健康環境センター年報, 4, 2008, 75-81.
- 7) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収検討(第1報), 福井県衛生環境研究センター年報, 7, 2008, 69-72.
- 8) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良(検討1), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 20 年度 総括・分担研究報告書, 2009, 27-38.
- 9) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良(検討2), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 20 年度 総括・分担研究報告書, 2009, 181-190.
- 10) 斎藤博之, 他: 食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用性向上に関する研究, 秋田県健康環境センター年報, 5, 2009, 54-62.
- 11) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築(検討1), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 21 年度 総括・分担研究報告書, 2010, 45-60.
- 12) 東方美保, 他: パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築(検討2), 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 21 年度 総括・分担研究報告書, 2010, 187-197.
- 13) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品中のノロウイルス検査法の構築, 秋田県健康環境センター年報, 6, 2010, 59-69.
- 14) 斎藤博之, 他: 食品検体の病原ウイルス検出を可能にした汎用型パンソルビン・トラップ法の開発, 秋田県健康環境センター年報, 7, 2011, 43-53.
- 15) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法による食品からのウイルス検出法, 病原微生物検出情報, 32, 12, 2011, 4-5.
- 16) 斎藤博之, 他: 食品中のウイルス検査に向けてのパンソルビン・トラップ法の汎用化, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成 22 年度 総括・分担研究報告書, 2011, 45-57.
- 17) 斎藤博之: 食品のノロウイルス検査の汎用化を目指したパンソルビン・トラップ法の開発, 日本食品微生物学会雑誌, 29, 1, 2012, 32-37.
- 18) 斎藤博之, 他: パンソルビン・トラップ法の実用上の問題点解決に向けた検討, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成 23 年度 総括・分担研究報告書, 2012, 43-60.
- 19) 斎藤博之, 他: 自家調製したパンソルビン相当品による食品中のノロウイルス検出法の検討, 秋田県健康環境センター年報, 8, 2012, 71-78.
- 20) 三好龍也, 他: 食品中からノロウイルス遺伝子が検出された食中毒事例, 病原微生物検出情報, 32, 12, 2011, 13-14.
- 21) Kojima S., et. al.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. J. Virol. Method, 100, 2002, 107-114.
- 22) Kageyama T., et. al.: Broady reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol., 41, 2003, 1548-1577.

- 23) Michael P., et. al.: LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *TRENDS in Biotechnology* **21**, 2003, 74-81.
- 24) Latorra D., et. al.: Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *J. Mol. Cell Probes* **17**, 2003, 253-259.
- 25) 飯塚節子, 他: パンソルビン・トラップ法による食品からのノロウイルス遺伝子の検出—弁当屋を原因施設としたノロウイルス集団食中毒事例—, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究 平成 24 年度総括・分担研究報告書, 2013, 175-180.
- 26) 古田敏彦, 他: 浜松市内におけるノロウイルス集団食中毒事例, 病原微生物検出情報, **35**, 7, 2014, 4-5.
- 27) 厚生労働省通知: 「ノロウイルスの検出法について」の一部改正について, 食安監発 1022 第 1 号, 平成 25 年 10 月 22 日.

感染症対策事業

平成 23～25 年度のウイルス行政検査集計結果について

安部真理子 齋藤博之 秋野和華子 佐藤寛子 柴田ちひろ

当センターは保健所、医療機関等からのウイルス検査依頼に対応している。平成 23～25 年度に保健所から検査依頼のあった嘔吐・下痢等を主症状とする食中毒及び腸管系感染症事例について集計した。3 年間を通じて腸管系感染症事例数が食中毒事例数より多かった。発生施設は幼稚園・保育所、老人施設が多く、時期による依頼件数は感染症事例では 1～3 月の第 4 四半期（38 事例）、10～12 月の第 3 四半期（20 事例）、4～6 月の第 1 四半期（16 事例）の順で多かった。食中毒事例では第 3 四半期、第 4 四半期が 10 事例ずつ、第 1 四半期が 8 事例、第 2 四半期も 5 事例の検査依頼があった。検出ウイルスについては、ノロウイルス（NoV）が単独で検出された事例は食中毒事例で 57.6%（19/33）、腸管系感染症事例で 82.4%（61/74）であった。サポウイルス（SaV）が検出された事例は食中毒事例では 9.1%（3/33）、腸管系感染症事例では 8.1%（6/74）であり、そのうち 1 事例は NoV との混合事例であった。NoV の遺伝子型は定点観測調査の散発例から検出される型が集団事例に先行していた。その他の感染症事例の検査依頼は 3 年間で新型インフルエンザ事例が 45 事例あり、平成 24 年度は 29 事例中 11 事例が陽性であった。麻疹・風疹事例は 3 年間で麻疹 31 事例、風疹 16 事例の依頼があり、そのうち 1 事例、3 事例が陽性であった。

1. はじめに

当センターのウイルス班は感染症発生動向調査にともなう定点医療機関からの臨床検体を対象とした病原体検査の他、食中毒、腸管系感染症の集団事例、インフルエンザ、麻疹、風疹疑い例等の感染症に関わる行政検査を実施している。この他、医療機関からの依頼によるつつが虫病抗体検査、保健所のエイズ相談事業にともなう性感染症の検査、国の流行予測調査事業の一環として豚インフルエンザ、日本脳炎の検査も実施している。本報では保健所から検査依頼のあった食中毒や腸管系感染症集団事例のウイルス検査に関する集計結果を中心に報告する。

2. 方法

2.1 対象

平成 23 年度から平成 25 年度にウイルス班に依頼のあった食中毒および腸管系感染症集団事例に関する行政検査、その他の感染症事例の行政検査を対象とした。食中毒事例は細菌とウイルス両検査依頼を含むが、腸管系感染症依頼事例はウイルス検査依頼のみの事例である。感染症発生動向調査の病原体検査についてはノロウイルスの遺伝子型別結果を散発事例として集計した。

2.2 検査法

- 1) 検体の処理及び検査方法は、厚生労働省通知の「平成 15 年 11 月 5 日付食安監発第 1105001 号」に準じて実施した。
- 2) NoV の遺伝子型はダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、型別した。

3. 結果と考察

表 1 に由来別事例数を示した。食中毒事例数をみると、平成 23 年度 6 事例、平成 24 年度 11 事例、平成 25 年度 16 事例であった。腸管系感染症事例は平成 23 年度 23 事例、平成 24 年度 32 事例、平成 25 年度 19 事例でいずれの年度も腸管系感染症事例が多かった。

表 2 に発生場所別事例数を示した。食中毒事例は飲食店における事例が 33 件中 22 件と最も多かったが、学校関連でも発生が見られた。感染症事例では幼稚園・保育所、老人施設の事例

表 1 由来別事例数

	H23	H24	H25	計
食中毒	6	11	16	33
腸管系感染症	23	32	19	74
計	29	43	35	107

表2 発生場所別事例数

発生場所	H23年度			H24年度			H25年度			H23～25年度		
	食中毒	腸管系感染症	計	食中毒	腸管系感染症	計	食中毒	腸管系感染症	計	食中毒	腸管系感染症	合計
学校関連	2	6	8	0	0	0	0	2	2	2	8	10
幼稚園・保育所	0	8	8	0	18	18	1	8	9	1	34	35
老人施設	0	7	7	1	14	15	0	8	8	1	29	30
飲食関連	4	0	4	7	0	7	11	0	11	22	0	22
他県依頼等	0	2	2	3	0	3	4	1	5	7	3	10
計	6	23	29	11	32	43	16	19	35	33	74	107

表3 四半期別事例数（平成23～25年度）

	食中毒	腸管系感染症	計
第1四半期（4月～6月）	8	16	24
第2四半期（7月～9月）	5	0	5
第3四半期（10月～12月）	10	20	30
第4四半期（1月～3月）	10	38	48
計	33	74	107

が多かった。保育所関連事例が先行した後、老人施設へと流行が拡大する傾向があることが報告¹⁾されているが、秋田県も同様の傾向が窺えた。また、他県依頼事例は食中毒と感染症事例合わせて平成23年度、平成24年度、平成25年度にそれぞれ2事例、3事例、5事例あった。

表3に四半期別事例数を示した。平成23年度から平成25年度を合計した事例数である。第1四半期は腸管系感染症16事例、食中毒8事例、第2四半期では腸管系感染症事例はなく、食中毒5事例であった。第3四半期は腸管系感染症20事例、食中毒10事例であった。第4四半期は腸管系感染症38事例、食中毒10事例であった。第2四半期を除いて第1、第3、第4四半期で腸管系感染症事例が食中毒事例より多かった。

表4にウイルス検出陽性事例数及び検体数を示した。食中毒事例では33件中22件(66.7%)、

感染症事例は74件中68件(91.9%)からウイルスが検出された。検体種別などの詳細なデータは示さないが、検体数でみた陽性率は食中毒事例では、平成23年度9.4%、平成24年度34.3%、平成25年度15.1%であった。一方、腸管系感染症事例では平成23年度55.7%、平成24年度64.5%、平成25年度61.3%とどの年度も食中毒事例より高い陽性率だった。この陽性率の差は依頼検体の内容(検体種別)に影響されていると考えられる。感染症事例では症状のある患者の検体が多く搬入されるため必然的に陽性率も高くなるが、食中毒事例では患者便の他に飲食を提供した無症状の従事者や施設のふきとり、食品等の検体が搬入されるため、陽性率は低くなると推察される。

表5に検出ウイルス別事例数を示した。ウイルスが検出された事例数からNoVのみ検出された事例数は平成23年度、24年度、25年度それぞれ25件中22件(88.0%)、38件中34件(89.5%)、27件中24件(88.9%)でほぼ9割を占めていた。他にSaVのみの検出は平成23年度1事例、平成24年度4事例、平成25年度3事例の合計8事例であった。平成23年度はNoVとSaVの混合感染事例が1事例あった。RoVの検出は平成23年度に1事例あった。

検出されたNoVの遺伝子型についてはGIIが

表4 ウイルス検出陽性事例数及び検体数

		H23年度	H24年度	H25年度	合計
食中毒	陽性数/事例数	3/6	9/11	10/16	22/33 (66.7%)
	陽性数/検体数	11/117 (9.4%)	98/286 (34.3%)	53/351 (15.1%)	136/692 (19.7%)
腸管系感染症	陽性数/事例数	22/23	29/32	17/19	68/74 (91.9%)
	陽性数/検体数	98/176 (55.7%)	118/183 (64.5%)	46/75 (61.3%)	262/434 (60.4%)
陽性数/事例数		25/29 (86.2%)	38/43 (88.4%)	27/35 (77.1%)	90/107 (84.1%)

表5 検出ウイルス別事例数

		H23	H24	H25	合計
食中毒	NoV	3	8	8	19/33 (57.6%)
	SaV	0	1	2	3/33 (9.1%)
	(-)	3	2	6	11/33 (33.3%)
感染症	NoV	19	26	16	61/74 (82.4%)
	NoV+SaV	1	0	0	1/74 (1.4%)
	SaV	1	3	1	5/74 (6.8%)
	RoV	1	0	0	1/74 (1.4%)
	(-)	1	3	2	6/74 (8.1%)
合計	NoV	22	34	24	80/107 (74.8%)
	NoV+SaV	1	0	0	1/107 (0.9%)
	SaV	1	4	3	8/107 (7.5%)
	RoV	1	0	0	1/107 (0.9%)
	小計	25	38	27	80/90 (88.9%)
	(-)	4	5	8	17/107 (15.9%)

ほとんどであったことから GII の更なる型別結果を表6に、年度別、月別、集団事例と感染症発生动向調査で検出した散発事例別に示した。なお、食中毒及び感染症事例を合わせて集団事例とした。この表から平成23年度は5月の散発事例から NoV GII/13 が先行して検出され5月、6月の集団事例から同型が検出されていた。7月、8月、10月の散発事例から NoV GII/4 が検出され11月、12月、1月の集団事例から同型が

検出されていた。平成24年度は11月に集団事例から NoV GII/4v が検出され、その後、12月に散発事例で検出された。また、11月の散発事例から NoV GII/4, 6, 13 が検出され、12月、1月の集団事例から NoV GII/4, 4v, 6, 13 が検出された。他県の報告²⁻⁴⁾でも散発事例から検出される型が集団事例に先行していた。主要遺伝子型については平成23年度は NoV GII/4 が多かったが、平成24年度、平成25年度は NoV GII/4 変異株である NoV GII/4v が多かった。NoV GII/4v は、平成24年度の11月以降の集団事例及び散発事例から多く検出され、平成25年度末までその傾向が続いた。平成24年11月に山形県内の施設を原因とする依頼検査事例(由利本荘保健所)から NoV GII/4v が検出されたのをはじめ、秋田中央保健所、大仙保健所、湯沢保健所、北秋田保健所の事例からも NoV GII/4v が検出され、県内全域に NoV GII/4v が拡大したと考えられた。NoV GII/4v が多く検出される傾向は全国的にも一致していた⁵⁻⁷⁾。発生施設別 NoV 遺伝子型は老人施設において NoV GII/4, 4v が多く、幼稚園・保育園では多様であった(表7)。腸管系感染症以外のウイルス検査依頼としては表8のとおり、3年間で麻疹・風疹疑い患者47名の検査依頼があり、麻疹陽性

表6 食中毒及び感染症事例・散発事例における月別検出 NoV GII 遺伝子型

月	H23		H24		H25	
	集団	散発	集団	散発	集団	散発
4	—	GII/2,GII/12	GII/12	—	GII/4,GII/4v	—
5	GII/13	GII/12,GII/13	GII/13	GII/13	GII/4v	—
6	GII/13	—	GII/13	—	—	GII/2
7	—	GII/4	—	—	—	GII/4v
8	—	GII/4	—	—	—	—
9	—	—	GII/6	—	GII/4v	—
10	—	GII/4	—	GII/6	—	—
11	GII/4,GII/6	GII/2,GII/4,GII/6,G/14	GII/4v	GII/4,GII/6,GII/13	GII/4v	—
12	GII/4	—	GII/4v,GII/6,GII/13	GII/4,GII/4v,GII/6,GII/13	—	GII/4v,GII/2
1	GII/4	GII/4,GII/6	GII/4,GII/4v	GII/4,GII/2,GII/4v	GII/4v,GII/2	GII/4v,GII/2
2	GII/4,GII/2	GII/2	GII/4v	GII/4v,GII/2	GII/6,GII/13	GII/4v,GII/6,GII/2
3	GII/2	—	GII/4v	GII/4v,GII/2,GII/14	GII/4v,GII/6	GII/4v,GII/6,GII/13,GII/2

表7 発生施設別 NoV 遺伝子型

		GI	GII/2	GII/4	GII/4v	GII/6	GII/12	GII/13	GII/不明	計
飲食店	食中毒	1*		2	4	2		2	1	12
	腸管系感染症									0
保育園・幼稚園	食中毒					1				1
	腸管系感染症	1	1	4	6	5	2	9		28
学校	食中毒			1						1
	腸管系感染症		4	1				1		6
老人・施設	食中毒				1					1
	腸管系感染症			7	18					25
その他（不明）	食中毒			1	3			1		5
	腸管系感染症		1	1					1	3
食中毒		1	0	4	8	3	0	3	1	20
腸管系感染症		1	6	13	24	5	2	10	1	62
合計		2	6	17	32	8	2	13	2	82

*GII/13 と混合感染

表8 麻疹・風疹・インフルエンザ等検査
対応事例数（陽性数/検査人数）

	H23	H24	H25	計
麻疹	1/9	0/9	0/13	1/31
風疹	0/1	0/1	3/14	3/16
インフルエンザ	9/10	0/29	2/6	11/45
SFTS	0	0	0/1	0/1

1名、風疹陽性3名であった。インフルエンザ依頼は45名中11名の陽性であった。SFTSについては、平成25年5月にSFTS疑いの検査依頼が1件あった。この事例では検査材料（血液）から、SFTSVは検出されなかったが、患者の症状などからつつが虫病の可能性が疑われ、つつが虫病抗体検査も同時に実施した。その結果、リケッチア抗体陽性であった。国立感染症情報センターによると、風疹流行時に麻疹患者を風疹と診断した事例が複数例報告されており⁸⁾、流行疾患を疑うあまり本来の疾患を見落とす危険性には留意する必要がある。

4. まとめ

- 3年間を通じて食中毒事例より感染症事例が多かった。
- 発生施設は幼稚園・保育所、老人施設が多かった。
- 発生時期は感染症事例では冬期が多かった。
- 検出ウイルスはNoV単独が食中毒、腸管系感染症事例ともに多かった。
- NoVの遺伝子型は定点観測調査の散发例か

ら検出される型が集団事例に先行していた。

- 発生施設別 NoV 遺伝子型は老人施設では限定的であり、幼稚園・保育所では多様であった。
- その他の感染症では平成24年度はインフルエンザ、平成25年度は麻疹・風疹依頼検査が多かった。

参考文献

- 関根雅夫他：仙台市でのノロウイルス検出状況（2010年～2013年）：仙台市衛生研究所報,**42**,2012,72-79.
- 小菅裕也他：滋賀県におけるノロウイルスの検出および遺伝子解析（2012年）,滋賀県衛生科学センター所報,**48**,2013,46-49.
- 濱田結花他：2012年度の鹿児島県におけるノロウイルス検出状況について,鹿児島県環境保健センター所報,**14**,2013,56-58.
- 成相絵里他：石川県におけるノロウイルスの流行状況,石川県保健環境センター研究報告書,**50**,2013,51-53.
- 東海林彰他：ノロウイルスによる集団胃腸炎事例の遺伝子学的解析（2012/13シーズン）,青森県保健環境センター研究報告,**24**,2013,18-24.
- 鈴木理恵子他：感染性胃腸炎からの原因ウイルス検出状況（平成24年度）,神奈川県衛生研究所報告,**43**,2013,27-29.
- 水越文徳他：栃木県における2012/2013シーズンに検出されたノロウイルス遺伝子型の検出状況,栃木県保健環境センター年報,

18,2013,117-119.

- 8) 倉田貴子他：＜速報＞風疹診断後に麻疹と判明した一症例,IASR (2013),<http://www.nih.gov/niid/ja/measles-m/measles-iasrs/4002-pr4054.html>

追記

本報の集計に際して、独自に作成した検査依頼記載表（参考）を活用した。以下は活用のメリットである。

1. 保健所からの情報を簡潔正確に記載し、情報を共有することで迅速に検査準備体制をとることができた。
2. 患者の年齢，発症月日，症状を知ることによって検査対象ウイルスの絞り込みができた。
3. 検査結果が迅速に行われたか把握できた。
4. 同一事例が数保健所に波及した際，効率的な検査体制が整えられた。
5. 検査依頼書や検査成績書からは得られない経時的状況が把握できた。

(参考)

様式 1. 食中毒・感染症の依頼対応記載表

対応記入者：	
受付（対応）月日	： 年 月 日 曜日 時 分（一報）（二報）
保健所名	：
食中毒・感染症の区別	：
検査項目	：細菌： ウイルス：
施設名	：
発症月日	：
症状	：
搬入時間	： 月 日 時 分
搬入検体種類・数	：患者便： 従業員等便： 吐物： 食材： 拭き取り：
検査結果	：
検査結果報告時間	： 月 日 時 分
結果連絡先	：氏名：
	：電話：
	：FAX：
検査者氏名	：
結果連絡者氏名	：

様式 2. 麻疹・風疹・インフルエンザ等依頼対応記載表

対応記入者：		備考
受付（対応）月日	： 年 月 日 曜日 時 分（一報）（二報）	
保健所名	：	
麻疹・風疹・インフルエンザ・その他	：	
病院・施設名	：	
発症月日	：	
性別・年齢	：	
症状（現在の症状）	：	
搬入時間	： 月 日 時 分	
搬入検体種類・数	：血液： 尿： 咽頭ぬぐい液： 血清：	
検査結果	：	
検査結果報告時間	： 年 月 日 時 分	
結果連絡先	：氏名：	
	：電話：	
	：FAX：	
検査者氏名	：	
結果連絡者氏名	：	

様式 3. 性病・ツツガムシ・その他問い合わせ記載表

対応記入者：	
受付（対応）月日	： 年 月 日 曜日 時 分（一報）
保健所・医療機関・その他	：
性病・ツツガムシ・その他	：
問い合わせ内容	：
問い合わせ回答及び対応内容	：

食品中の残留農薬及び残留動物用医薬品の一斉分析法に関する研究（平成 24～26 年度）

農産物中の残留農薬一斉分析法の検討及び妥当性評価について

松淵亜希子 珍田尚俊 天明さおり*¹

より効率的で高精度な残留農薬一斉分析法を構築するため、迅速簡便な分析法である QuEChERS 法を基に、新たな一斉分析法を検討した。抽出回数を増やし、固相カラムによる精製を行った結果、GC-MS/MS で 275 項目、LC-MS/MS で 161 項目について、一律基準レベルでの測定が可能となった。

検討した分析法について、7 食品（りんご、ほんれんそう、玄米、ねぎ、ばれいしょ、キャベツ、レモン）を対象に、厚生労働省通知のガイドラインに従い妥当性評価試験を実施した（添加濃度：0.01 µg/g 及び 0.05 µg/g、分析者 3 名が 2 濃度添加試料を 1 日 2 試行、2 日間分析）。

ガイドラインの目標値を満たした農薬の割合は、GC-MS/MS 対象農薬では、各食品で約 8 割となり、概ね良好な結果であった。LC-MS/MS 対象農薬では、ねぎ以外の 6 食品で約 8 割となり、ねぎについては精製する量を半量とすることにより、6 割から 8 割へと改善することができた。

1. はじめに

食品中の残留農薬等のポジティブリスト制度が 2006 年より施行され、規制対象品目が大幅に増大し、基準が未設定の品目については一律基準（0.01 ppm）が設けられた。そのため、一律基準レベルの低濃度で、高精度かつ網羅的に検知する一斉分析法が求められるようになった。

また、食品衛生法の規格基準への適合を判断するために用いる分析法は、厚生労働省が通知したガイドライン^{1,2)}に準じ、妥当性評価試験を行うことが必須となった。

当所では、GC-MS/MS 及び LC-MS/MS を用いた各種の一斉分析法により新制度に対応してきたが、さらに作業効率と精度を向上させるため、迅速簡便法の QuEChERS 法³⁾を導入した。

QuEChERS 法は抽出と塩析を同時に行い、分散固相で精製する操作工程の少ない手法であるが、農薬と食品の種類によっては、抽出及び精製不足という問題があった。そこで、最適な抽出回数と固相カラムによる精製について検討を行った。さらに、検討した分析法について、7 食品を対象とした妥当性評価試験により妥当性を確認し、一定の知見を得たので報告する。

2. 方法

2.1 試料

ガイドラインにある例示を参考に、りんご、ほうれんそう、玄米、ねぎ、ばれいしょ、キャ

ベツ、レモンの 7 種類を試料とした。各試料の試験部位をフードプロセッサー及びホモジナイザーを用いてペースト状になるまで磨砕均一化した後、50 mL ポリプロピレン製遠心管に 10.0 g（玄米は 5.0 g）を量り、-30℃で凍結保存した。使用する際は、試験実施日の前日または当日に解凍した。

2.2 対象農薬

GC-MS/MS では 275 項目、LC-MS/MS では 161 項目を測定した（その内 32 項目は、両機器で測定）。各対象農薬を表 3、4 に示す。

2.3 標準液及び試薬等

標準液は、市販の混合標準液と個別標準品を組み合わせて調製した。

GC-MS/MS 対象農薬は、関東化学株式会社（関東化学）製の GC/MS 用農薬混合標準溶液 61、63、31、48、51 及び Pesticide-Mix 1471 各 10 µg/mL、和光純薬工業株式会社（和光純薬）製のイプロジオン代謝物、インドキサカルブ、クロロタロニル、クロロニトロフェン、スピロメシフェン、関東化学製のスルプロホスを用い、個別標準品はアセトンで 1000 µg/mL に調製した。さらに、全ての混合標準液及び個別標準液を合わせ、1 µg/mL となるようにアセトンで希釈し、GC-MS/MS 用混合標準液とした。

LC-MS/MS 対象農薬は、和光純薬製の LC/MS

*1 山本地域振興局福祉環境部

用農薬混合標準溶液 PL-7-2, PL-14-2, PL-15-1, PL-17-2, PL-8-1, PL-16-2 各 20 µg/mL, 和光純薬製のアセタミプリド, アセフェート, イソウロン, チオファネート, チオファネートメチル, メタミドホス, ジメトエート, ブプロフェジン, ジフェノコナゾール, トリアジメノール, トリアジメホン, トリシクラゾール, フェンプロパトリン, ヘキサコナゾール, シデュロン, フラメトピル代謝物, フルジオキソニル, フルアジナム, フルスルファミド, ベンジルアデニン, ベンタゾン, フィプロニル, 関東化学製のエトベンザニド, イナベンフィド, 林純薬株式会社(林純薬)製のジノテフラン, トルフェンピラド, チアゾピル, メパニピリム代謝物, Dr.Ehrenstorfer GmbH 製のオメトエート, カルベンダジムを用いた。個別標準品の 500 µg/mL 液をアセトニトリル, メタノール, N,N-ジメチルホルムアミド等で調製後, 全ての混合標準液と個別標準液と合わせ, 1 µg/mL となるようにアセトニトリルで希釈し, LC-MS/MS 用混合標準液とした。

溶媒は, 和光純薬製のアセトニトリル, アセトン, ヘキサン, トルエン(いずれも残留農薬分析用), メタノール, 水(いずれも LC/MS 用), N,N-ジメチルホルムアミド (Infinity Pure) を用いた。

試薬は, 和光純薬製の無水硫酸マグネシウム(特級, MgSO₄), 塩化ナトリウム(残留農薬分析用, NaCl), クエン酸三ナトリウム二水和物(一級, Na₃ citrate · 2H₂O), クエン酸水素二ナトリウム一・五水和物(一級, Na₂H citrate · 1.5H₂O), 酢酸アンモニウム(特級), ギ酸(LC/MS 用), 塩化カルシウム(特級, CaCl₂)を用いた。

GC-MS/MS 測定では, 疑似マトリックスとして, 和光純薬製ポリエチレングリコール 300(一級, PEG300)を 2.5%となるようにアセトンで調製したもの(2.5%PEG300 液)を用いた。

また, 内標 (IS : Internal Standard) として, 関東化学製の内部標準混合標準液(アセナフテン-d10, クリセン-d12, ペリレン-d12, フェナントレン-d10), 林純薬製 9-ブロモアントラセン, 和光純薬製リン酸トリフェニルを混合し, 各 10 µg/mL となるようにアセトンで調製したもの (IS 液) を用いた。

精製用カラムは, GL サイエンス株式会社製のオクタデシルシリル化シリカゲルカラム (C18, InertSep C18 ; 500 mg/6mL, 1000 mg/6mL), トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層カラム (SAX/PSA, InertSep SAX/PSA ; 500 mg/500 mg/6 mL), グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層カラム (GC/PSA, InertSep GC/PSA ; 300 mg/500 mg/6 mL), エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルカラム (PSA, InertSep Jemini PSA ; 500 mg) を用いた。

また, 除粒子用メンブランフィルターは ADVANTEC 社製 DISMIC (孔径 0.2 µm, 親水性 PTFE) を用いた。

2.4 器具及び装置

フードプロセッサーは日立製作所製日立クッキングカッター FV-F3, ホモジナイザーは KINEMATICA 社製 POLYTRON RT3100 を用いた。遠心分離機は日立工機製 himacCR20GIII, 久保田製作所製 KUBOTA8850 を用いた。アルミブロック恒温槽は, EYELA 製 MG-2100 を用いた。

GC-MS/MS は Thermo Fisher Scientific 社製 TRACE GC Ultra 及び同社製 TSQ Quantum, LC-MS/MS は Agilent Technologies 社製 Agilent-1100 及び AB Sciex 社製 API4000 を用いた。

2.5 測定条件

2.5.1 GC-MS/MS 測定条件

分析カラムは Agilent Technologies 社製 VF-5ms (0.25 mm i.d. × 30 m, 膜厚 0.25 µm) にプレカラム EZ-Guard (10 m) を接続して用いた。

オーブンの昇温条件は, 70°C (1 min) → 30°C/min → 160°C → 2.5°C/min → 200°C → 8°C/min → 310°C (10 min) (Total : 45 min), 注入口温度は 250 °C, トランスファーライン温度は 290°C とした。

注入量は 2 µL, 注入法はパルスドスプリッドレスとした。

キャリアーガスはヘリウムガス (コンスタントフローモード 1 mL/min) を用い, イオン源温度は 260 °C, イオン化法は EI, イオン化電圧は 70 eV, 分析モードは Timed Multiple Reaction

Monitoring (Timed MRM) とした。

各農薬のプリカーサーイオン、プロダクトイオン等の MRM 条件は、メーカー推奨値及び文献値等を参考にして、感度が最も良好であった条件を設定した (表 3)。

2.5.2 LC-MS/MS 測定条件

分析カラムは、化学物質評価研究機構製 L-column 2 (2.1 mm i.d.×150 mm, 粒子径 3 μm) を使用した。移動相は A 液 0.5 mM 酢酸アンモニウム含有 0.01% ギ酸水溶液, B 液 0.5 mM 酢酸アンモニウム含有 0.01% ギ酸メタノールを使用した。カラム温度は 40°C, 流速は 0.2 mL/min, 注入量は 5 μL とした。

イオン化法は ESI によるポジティブ (Positive) 及びネガティブモード (Negative) で行い, 分析モードは Scheduled Multiple Reaction Monitoring (Scheduled MRM) とした。

イオンスプレー電圧は 5.5 kV (Positive), -4 kV (Negative) とし, イオン源温度は 500°C (Positive), 400°C (Negative) とした。

HPLC のグラジエント条件は, Positive : 0 min (B 液 10%) → 1 min (60%) → 3 min (60%) → 5 min (75%) → 8 min (75%) → 12 min (95%) → 20 min (95%) → 20.5 min (10%) → 30 min (10%), Negative : 0 min (B 液 10%) → 1 min (70%) → 4 min (70%) → 10 min (95%) → 15 min (95%) → 15.5 min (10%) → 25 min (10%) とした。

MRM 条件は, 50~100 ng/mL の範囲で調製した各農薬の標準溶液をシリンジポンプを用いて直接 MS/MS に注入し, 自動最適化により決定した。自動最適化の結果, 感度が最も良好であった条件を設定した (表 4)。

2.6 試験溶液の調製

試験溶液の調製法を図 1 に示す。

2.6.1 GC-MS/MS 用試験溶液の調製 (GC 法)

2.6.1.1 抽出

試料 10.0 g (玄米は 5.0 g に水 10 mL を加え, 常温下で 15 分間以上膨潤させたもの) に, アセトニトリル 10 mL を加え, 1 分間, 手で振とう (振とう) した。次に, NaCl 1 g, Na₃ citrate·2H₂O 1 g, Na₂H citrate-1.5-H₂O 0.5 g, MgSO₄ 4 g を順

に加え, 1 分間激しく振とうした。振とう後, 遠心分離 (1800 ×g 以上, 5 分間) を行い, 得られたアセトニトリル層 (上層) を, メスフラスコ (容量 20 mL) へ移した。

残渣にアセトニトリルを 10 mL 加え, 1 分間激しく振とう後, 遠心分離 (1800 ×g 以上, 5 分間) を行い, 得られた上層を先の上層に合わせ, アセトニトリルで 20 mL に定容した。

2.6.1.2 C18 及び SAX/PSA 等による精製

先の抽出液 20 mL のうち, 2 mL (玄米は 4 mL) を, アセトニトリル 10 mL でコンディショニングした C18 (玄米は C18 1000 mg を使用) に注入し, アセトニトリル 10 mL で溶出した。

溶出液を約 0.5 mL 以下になるまで減圧濃縮し, アセトン:ヘキサン (3:1) 混液 (A 液) 2 mL に溶解した (ほうれんそう, レモンの場合, トルエン:アセトン:ヘキサン (1:3:1) 混液 (B 液) 2 mL に溶解)。

この 2 mL を A 液 10 mL でコンディショニングした SAX/PSA に注入し, A 液 15 mL で溶出した (ほうれんそう, レモンの場合, B 液 10 mL でコンディショニングした GC/PSA に注入し, B 液 15 mL で溶出)。

次に, 溶出液を減圧濃縮し, 残渣を窒素ガスで完全乾固させ, アセトン:ヘキサン (1:1) 混液を加え, 正確に 0.5 mL とした。さらに 2.5%PEG300 液 5 μL, IS 液 5 μL を加え, 試験溶液とし, GC-MS/MS で測定した。

2.6.2 LC-MS/MS 用試験溶液の調製 (LC 法)

2.6.2.1 抽出

GC 法に準じた。

2.6.2.2 C18-PSA による精製

抽出液 20 mL のうち, 2.5 mL (玄米は 5 mL) をガラス試験管 (1 mL 目盛り付き) に移し, それに水 500 μL を加え, アルミブロック恒温槽で 40°C に加熱しながら窒素気流下で濃縮した。約 500 μL 以下になるまで濃縮後, メタノールで 1 mL に定容した。

C18, PSA を連結し, メタノール 3 mL, 1 M 酢酸アンモニウム含有, メタノール:水 (1:1) 混液 6 mL を順次注入し, コンディショニングを行った。これに, 先の定容した溶液から 800 μL

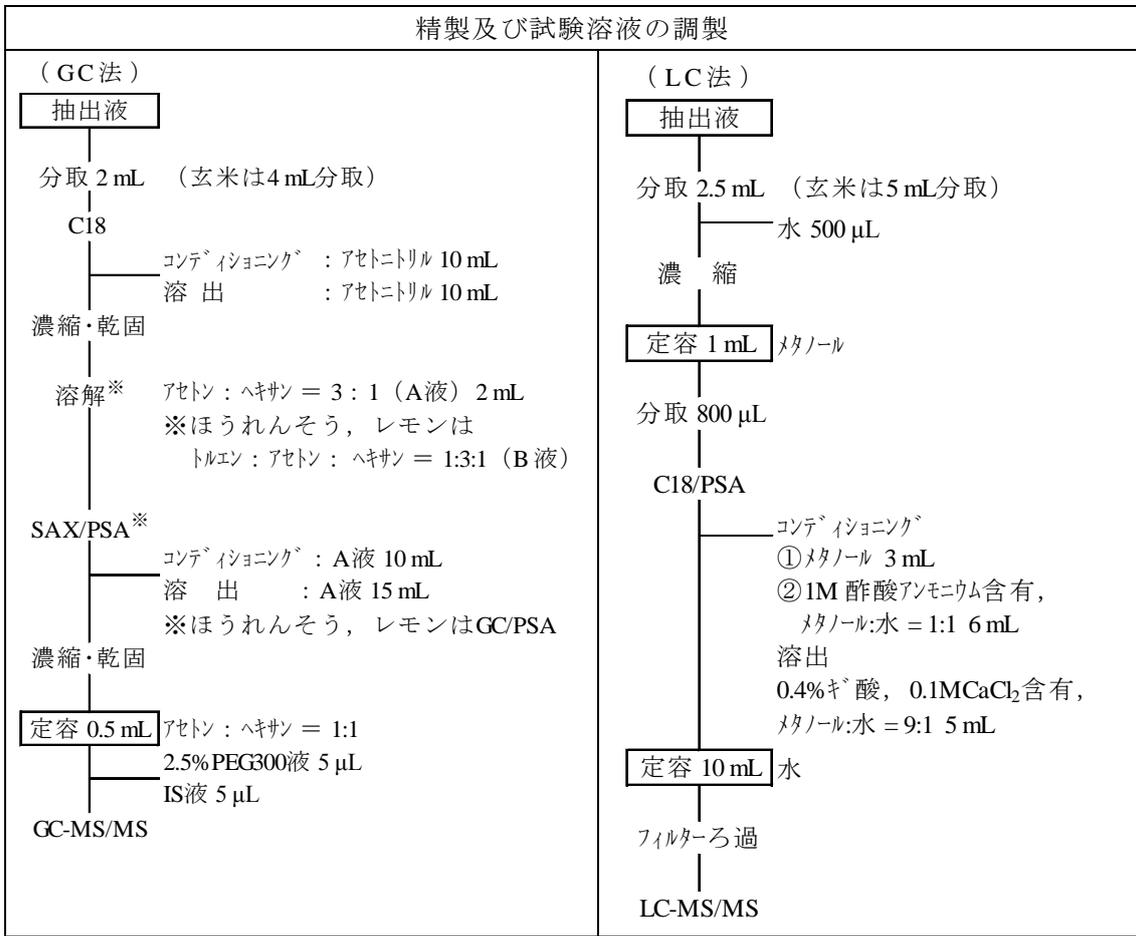
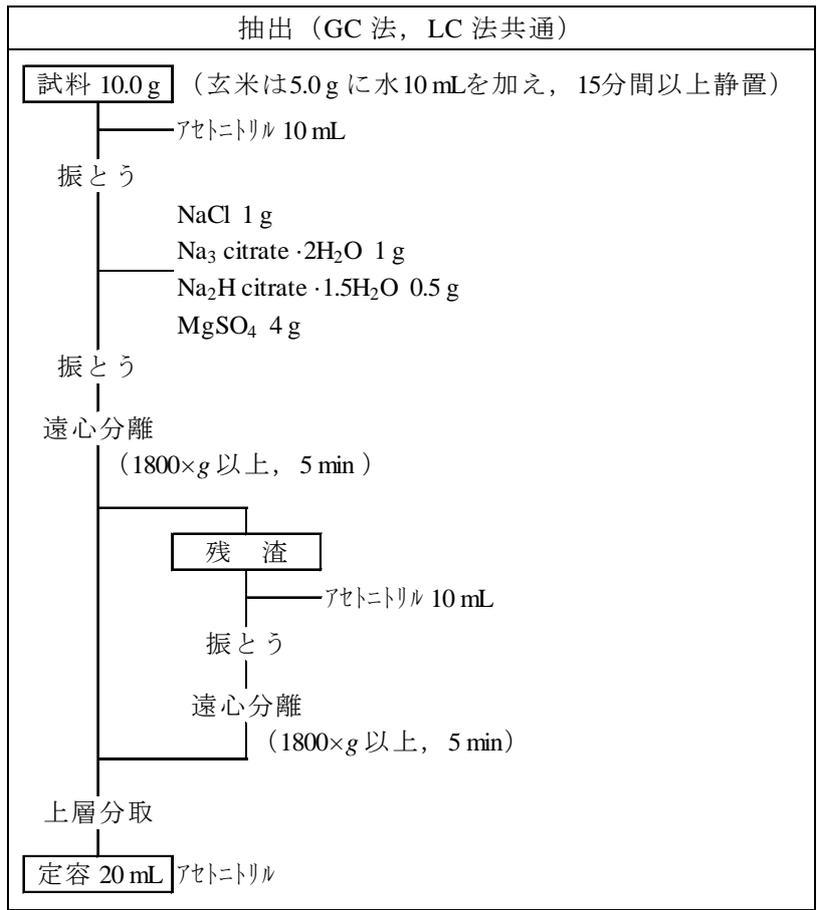


図 1 試験溶液の調製法

を注入し、0.1 M 塩化カルシウム及び 0.4%ギ酸含有、メタノール：水（9：1）混液 5 mL で溶出し、10 mL メスフラスコに溶出液を回収した。

次に、溶出液に水を加え 10 mL に定容し、0.2 μm メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とし、LC-MS/MS で測定した。

2.7 定量法

2.7.1 GC 法の定量

検量線はマトリックス添加検量線を用い、試験溶液の調製誤差や MS の応答値の変動等を補正するために内部標準法で定量した。また、注入口やカラムの活性点への農薬の吸着を抑えるため、PEG300 を加えた。

検量線の濃度範囲は、0, 4, 10, 20, 50, 100, 200 ng/mL とした。GC-MS/MS 用混合標準液（1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）をそれぞれ 2, 5, 10, 25, 50, 100 μL 採り、窒素気流下で濃縮乾固した。これに、対象農薬を添加していない各食品（ブランク試料）の精製済み抽出液を 0.5 mL 加え、さらに 2.5%PEG300 液 5 μL 、IS 液 5 μL を加えたものを検量線用標準溶液とした。

異性体混合物のダイアレート、ホスファミド、プロヒドロジャスモン、スピロキサミン、ホスチアゼート、クロルフェンビンホス、アレスリン、ジクロシメット、トリアジメノール、アラマイト、プロピコナゾール、レスメトリン、フェノトリン、シハロトリン、ペルメトリン、フルシトリネート、フェンバレレート（※）は、各異性体毎に検量線を作成して定量し、回収率を算出した。

同じく異性体混合物であるメトブレン、シプロコナゾール、プロパルギット、ビテルタノール、シフルトリン、シペルメトリン、フルバリネート、ジフェノコナゾール、イマザメタベンズメチルについては、各異性体のピークが近接しているため、1 ピークとしてまとめて定量した。

2.7.2 LC 法の定量

検量線は絶対検量線を用い、濃度範囲を 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ng/mL とした。LC-MS/MS 用混合標準液（1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）をメタノール：水（2：3）混液を用いて、各濃度になるように希釈調製した。

異性体混合物のジメトモルフ、トリアジメノール、イプロバリカルブについては、各異性体ピークが近接しているため、1 ピークとしてまとめて定量した。

フェリムゾン E, Z は各異性体が単独で含有しているが、各ピークが近接しているため、まとめて 1 ピークとして定量した。

2.8 妥当性評価試験

妥当性評価試験は、ガイドライン及び当センターの業務管理規定に準拠した。

添加濃度は 2 濃度とし、各農薬を試料中濃度が 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ 及び 0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ となるように各試料に添加し、30 分以上経過してから試料の前処理を行った。

妥当性評価試験は、分析者 3 名が 2 濃度添加試料を、1 日 2 試行、2 日間分析する枝分かれ実験計画により実施した。得られた結果は、Microsoft Excel を用いて一元配置の分散分析による解析を行い、真度、併行精度、室内精度を求めた。日間の分散の期待値が併行の分散の期待値よりも小さい場合は、日間の標準偏差を 0 として計算を行った。

選択性については、食品毎のブランク試料のピーク面積が、添加濃度 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ に対応する濃度の標準液（GC 法；20 ng/mL、LC 法；1 ng/mL）から得られるピーク面積の 1/3 未満であることを条件とした。

定量限界は $S/N \geq 10$ となる検量線（GC 法は食品毎のマトリックス添加検量線）の最小濃度とし、添加濃度 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ 以下であることを条件とした。

3. 結果及び考察

3.1 QuEChERS 法の検討

QuEChERS 法には、Anastassiades らが最初に発表した方法³⁾やそれを発展させた方法^{4,6)}があり、それぞれ特徴があるため、各法を照らし合わせて、最適な方法を検討した。

試料の粉碎は、ドライアイスや液体窒素を用いることが勧められているが、常温でペースト状になるまで磨砕均一化した。塩析・脱水には MgSO_4 、 NaCl を用い、抽出時の pH の安定化のために、クエン酸塩を用いた。

抽出回数は、食品の種類や農薬によっては、

1 回の抽出では十分回収されなかったため、2 回繰り返すことにした⁷⁾。

精製は固相カラムで行い、GC 法には C18 と SAX/PSA (ほうれんそう, レモンの場合は C18 と GC/PSA), LC 法には, C18 と PSA を用いた。

3.2 妥当性評価試験

3.2.1 結果の評価について

ガイドラインに従い, 検討した分析法の妥当性評価試験を実施し, 得られた結果について表 1 のとおり分類した。分類の食品別の結果を表 2 に, 農薬別の結果を表 3 (GC 法), 表 4 (LC 法) に示す。

分類は, A (真度, 精度とも目標値を満たす), B (高濃度で真度, 精度の目標値を満たす, B' は低濃度で満たす場合), C (真度が 50% 以上 70% 未満, 精度が目標値を満たす), D (A, B, B', C 以外), E (測定不能, GC 法で該当) とした。

GC 法で E の測定不能となった要因は①検量線の直線性が無い, ②ブランクピークが大きく選択性が低い, ③定量下限が許容範囲外であった。

また, 「2.7 定量法, 2.7.1 GC 法の定量」に示した異性体混合物 (※) の評価について, 異性体毎の評価が異なる場合には, 評価の低い方を採用した (例えば, 評価が A, B に分かれる場合は B とする)。

LC 法では, 事前に測定可能な農薬を選定し, 評価を行った。

3.2.2 GC 法の妥当性評価試験結果について

評価 A の農薬が, 各食品で約 8 割を占めた。全食品にわたり評価 A となったのは, 275 成分中 142 成分であった。

評価 B, B' の農薬は, 約 1 割前後であった。B' の場合が, りんご, 玄米, レモンで, 比較的多かった。

評価 C の農薬は, 各食品で 3~5 農薬と, 非常に少なかった。6 食品において, 蒸気圧の高いチオメトンが該当し, 濃縮操作時に揮発したと思われる^{8,9)}。

評価 D の農薬は, 各食品で 1 割未満であった。各食品に共通して評価が芳しくなかった農薬を大別すると, 蒸気圧が比較的高く濃縮操作時

に揮発しやすいもの (チオメトン, ジクロロボス, ブチレート等)^{10,11)}, 試料成分の影響を受けやすく, 標準液の添加静置時に分解が進んだと考えられるもの (クロロタロニル, ジクロフルアニド等)¹⁰⁻¹²⁾, 固相カラムに吸着しやすいもの (キノメチオネート, ジスルホトン, オリザリン等), 感度が良くないもの (ブプロフェジン, イプロジオン代謝物等) があり, もともと物性や安定性等から一斉分析法を適用するのは難しいとされているものが多く該当した。

3.2.3 LC 法の妥当性評価試験結果について

ねぎ以外の 6 食品において, 約 8 割の農薬が評価 A となった。ねぎは約 6 割にとどまった。

全食品にわたり評価 A となったのは, 161 成分中 51 成分と 3 割程度となり, ねぎの結果が全体の評価を下げる主な要因となっていた。

評価 B, B' の農薬は, 各食品で, 1 割未満であった。

評価 C の農薬は, 約 1~3 割程度で, ねぎが最も多かった。評価 D の農薬は, 約 1~3 割程度で, キャベツ, レモンに比較的多かった。

評価 C, D の農薬は, イオン化抑制及び促進が特に強く生じたと考えられる。

また, 農薬別にみると, 構造にアミノ基を持つ農薬 (ピメトロジン, チアベンダゾール等) や, 高極性の農薬 (アセフェート, ジノテフラン等) が該当した。評価の低い要因として, 抽出時に水層が酸性 (pH2~4) となり¹³⁾, 農薬の一部が解離し, 水層へ移行したことや, マトリックスの影響による有機層への分配の低下^{1,14)}が考えられた。

チオジカルブは一部の食品で, 前処理の途中で酸化分解され, メソミルに変化することが報告されており¹⁵⁾, ほうれんそう, ねぎにその事象がみられた。

ねぎについては, GC 法で共通する対象農薬の評価が良好であることから, LC 法の精製ではねぎ特有のマトリックスを十分に除去できていないと考えられた。そこで, 精製する抽出液を半量にした 20 倍希釈試験溶液で添加回収試験を行った (添加濃度: 0.01 及び 0.05 µg/g, 各 n=5)。その結果, 評価 A の農薬が約 8 割となり, 改善することができた (表 4 に追試の結果を掲載)。

4. まとめ

迅速簡便な分析法である QuEChERS 法を基に、新たな残留農薬一斉分析法を検討し、7 食品を対象とした妥当性評価試験を実施した。

LC 法のねぎを除き、概ね 8 割の農薬が目標値を満たし、本法は高精度な迅速一斉分析法として有用であることが示唆された。

LC 法のねぎについては、精製する量を半量にし、マトリックスの影響を抑えることにより、回収率を改善することができた。

今後は、さらに対象食品を拡充し、本法の妥当性を検証していく予定である。また、今回の対象食品についても、品種、熟度、生産地等が違えば全く同じマトリックスとはいえないため、継続して各農薬への影響を確認する必要がある。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知 食安発第 115001 号：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。
- 2) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知 食安発第 1124 第 1 号：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について、平成 22 年 12 月 24 日。
- 3) Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., Schenck, F. J., Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.*, **86**, 2, 2003, 412-431.
- 4) AOAC official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate
- 5) European Committee for Standardization Standard Method EN 15662 Foods of Plant Origin-determination of Pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS Following Acetonitrile Extraction/Partitioning and Clean-up by Dispersive SPE-QuEChERS method
- 6) M, Okihashi., Y, Kitagawa., K, Akutsu., H, Obana., Y, Tanaka: Rapid Method for the Determination of 180 Pesticide Residues in Foods by Gas Chromatography/Mass Spectry and Flame Photometric Detection, *J. Pestic. Sci.*, **30**, 4, 2005, 368-377.
- 7) 天明さおり, 珍田尚俊, 小林貴司: 第 36 回残留農薬分析研究会講演要旨集, 2013, 63-78.
- 8) 厚生労働省 食品に残留する農薬等の試験法 分析法検討結果の詳細 平成 15・16 年度農薬一斉分析法検討結果, 平成 17 年度農薬一斉分析法検討結果 <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/index.htm/>
- 9) GC/MS による農作物中揮発性農薬の一斉分析法の検討, 京都市衛生公害研究所年報, **73**, 2007, 133-141.
- 10) 農薬残留分析法研究班: 最新 農薬の残留分析法 改訂版, 2006.
- 11) 上路雅子, 小林裕子, 中村幸二: 2002 版残留農薬分析法, ソフトサイエンス社
- 12) 小林裕子: 分析操作における農薬の変化とその対応, 食品衛生学雑誌, **42**, 6, 2001, J331-J336.
- 13) 永井雄太郎, 窪田尚正, 前田洋子, 松井啓江, 高橋由里子: 第 30 回残留農薬分析研究会講演要旨集, 2007, 102-114.
- 14) 永井雄太郎: QuEChERS を見直してみよう, 日本農薬学会誌, **37**, 4, 2012, 362-371.
- 15) 永山敏廣, 小林麻紀, 塩田寛子, 森野雅世, 伊藤正子, 田村行弘: 農産物中の N-メチルカーバメイト系農薬分析法, 食品衛生学雑誌, **35**, 5, 1994, 470-478.

表1 各農薬の評価の分類

評価	条件
A	2濃度 (0.01 µg/g, 0.05 µg/g) とともにガイドラインの目標値を満たす 真度 (%) : 70 ≤ ~ ≤ 120 精度 (%) : 0.01 µg/g (< 25, < 30) 0.05 µg/g (< 15, < 20) (併行,室内)
B	0.05 µg/gのみガイドラインの目標値を満たす 真度 (%) : 70 ≤ ~ ≤ 120 精度 (%) : < 15, < 20 (併行,室内)
B'	0.01 µg/gのみガイドラインの目標値を満たす 真度 (%) : 70 ≤ ~ ≤ 120 精度 (%) : < 25, < 30 (併行,室内)
C	2濃度ともに以下の条件を満たす 真度 (%) : 50 ≤ ~ < 70 精度 (%) : 0.01 µg/g (< 25, < 30) 0.05 µg/g (< 15, < 20) (併行,室内)
D	A, B, B', C 以外 (2濃度またはどちらかの濃度で, 次のいずれかに1つでも該当) 真度 (%) : < 50, 120 < 精度 (%) : 0.01 µg/g (25 ≤, 30 ≤) 0.05 µg/g (15 ≤, 20 ≤) (併行,室内)
E*	測定不能 ・検量線の直線性が無い ・ブランクピークが大きく選択性が低い ・定量限界が許容範囲外

* : GC 法の対象農薬でのみ該当

表2 GC法及びLC法の妥当性評価結果 (食品別)

評価	GC-MS/MS						
	りんご	ほうれんそう	玄米	ねぎ	ばれいしょ	キャベツ	レモン
A	213* (77)**	233 (85)	211 (77)	212 (77)	219 (80)	209 (76)	226 (82)
B	15 (5)	7 (3)	22 (8)	18 (7)	21 (8)	18 (7)	6 (2)
B'	10 (4)	6 (2)	11 (4)	5 (2)	3 (1)	5 (2)	16 (6)
C	5 (2)	5 (2)	3 (1)	2 (1)	4 (1)	6 (2)	5 (2)
D	16 (6)	15 (5)	22 (8)	20 (7)	19 (7)	15 (5)	9 (3)
E	16 (6)	9 (3)	6 (2)	18 (7)	9 (3)	22 (8)	13 (5)
Total	275	275	275	275	275	275	275

評価	LC-MS/MS						
	りんご	ほうれんそう	玄米	ねぎ	ばれいしょ	キャベツ	レモン
A	142 (88)	129 (80)	145 (90)	102 (63)	133 (83)	137 (85)	121 (75)
B	8 (5)	4 (2)	1 (1)	7 (4)	4 (2)	2 (2)	0 (0)
B'	0 (0)	1 (1)	2 (1)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
C	6 (4)	16 (10)	0 (0)	40 (25)	5 (3)	10 (6)	12 (8)
D	5 (3)	11 (7)	13 (8)	12 (8)	18 (11)	11 (7)	27 (17)
Total	161	161	161	161	161	161	161

* 各評価に該当する農薬数 ** 測定対象農薬に対する割合 (%)

表3 GC法の妥当性評価試験結果(農薬別)

No.	農薬名	RT ¹⁾ (min)	モニターイオン (m/z)	りんご	ほうれんそう	玄米	ねぎ	ばれいしよ	キャベツ	レモン	各評価の分布 ²⁾					
											A	B	B'	C	D	E
1	Dichlorvos	6.7	185.0 > 93.0	D	D	D	B'	D	D	B	0	1	1	0	5	0
2	EPTC	7.5	189.1 > 128.1	D	D	D	D	D	D	E [†]	0	0	0	0	6	1
3	Mevinphos	8.2	192.0 > 164.0	B	A	B'	A	B'	A	A	4	1	2	0	0	0
4	Butylate	8.2	174.1 > 146.1	E [†]	D	D	A	D	D	B'	1	0	1	0	4	1
5	3-HydroxyCarbofuran*	8.8	180.0 > 137.0	D	A	D	E [‡]	B'	A	D	2	0	1	0	3	1
6	Chlorneb	9.2	206.0 > 191.1	B'	B'	B'	E [‡]	D	E [‡]	E [‡]	0	0	3	0	1	3
7	Isoprocarb	9.6	136.1 > 121.1	A	A	B'	A	A	A	A	6	0	1	0	0	0
8	XMC	10.1	122.1 > 107.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
9	Tecnazene	10.6	260.9 > 203.0	B'	A	B'	A	D	C	A	3	0	2	1	1	0
10	Fenobucarb	10.7	150.1 > 121.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
11	Propoxur	10.7	152.1 > 110.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
12	Propachlor	10.7	176.1 > 92.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
13	Chlorethoxyfos	10.8	262.9 > 207.0	D	B'	B'	A	D	D	A	2	0	2	0	3	0
14	Demeton-S-Methyl	11.0	141.9 > 111.9	A	C	A	A	A	A	A	6	0	0	1	0	0
15	Ethoprophos	11.1	158.0 > 96.9	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
16	Ethalfuralin	11.7	276.1 > 202.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
17	Chlorpropham	11.7	213.1 > 127.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
18	Trifluralin	11.5	306.1 > 264.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
19	Benfluralin	11.6	292.1 > 264.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
20	Diclotophos	11.8	127.0 > 109.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
21	Bendiocarb*	11.9	223.1 > 166.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
22	Cadusafos	12.1	159.1 > 96.9	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
23	Monocrotophos	12.5	127.0 > 109.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
24	Diallate 1	12.2	234.0 > 150.0													
	Diallate 2	12.7	234.0 > 150.0	B'	A	A	A	D	C	A	4	0	1	1	1	0
25	Phorate	12.2	260.0 > 75.0	C	A	A	A	C	C	A	4	0	0	3	0	0
26	α-BHC	12.5	218.9 > 183.0	C	A	A	A	C	A	A	5	0	0	2	0	0
27	β-BHC	13.8	180.9 > 144.9	A	A	A	E [‡]	A	A	A	6	0	0	0	0	1
28	γ-BHC	14.0	218.9 > 183.0	B'	A	A	A	B'	A	A	5	0	2	0	0	0
29	δ-BHC	15.5	219.0 > 183.0	D	A	A	A	A	A	A	6	0	0	0	1	0
30	Thiometon	12.7	88.0 > 60.0	C	C	C	C	C	C	A	1	0	0	6	0	0
31	Dimethoate*	13.1	229.0 > 87.0	A	E [†]	A	A	A	A	A	6	0	0	0	0	1
32	Dicloran	13.3	206.0 > 176.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
33	Carbofuran*	13.3	164.1 > 131.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
34	Simazine	13.5	201.1 > 172.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
35	Atrazine	13.5	215.1 > 200.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
36	Chlorbufam(BIPC)	13.7	223.0 > 171.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
37	Clomazone	13.7	204.1 > 107.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
38	Propazine	13.7	229.1 > 214.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
39	Dimethipin	13.8	118.0 > 58.0	A	B	B	A	A	B	A	4	3	0	0	0	0
40	Quintozene	13.7	294.8 > 237.0	D	A	B'	B'	D	D	B'	1	0	3	0	3	0
41	Dioxathion	13.8	270.0 > 197.2	E [‡]	D	D	B	E [‡]	E [‡]	B	0	2	0	0	2	3
42	Terbufos	14.0	231.0 > 175.0	B'	A	A	A	B	B	A	4	2	1	0	0	0
43	Cyanophos	14.1	243.0 > 109.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
44	Propyzamide	14.3	254.0 > 226.2	A	A	A	A	A	B	A	6	1	0	0	0	0
45	Diazinon	14.3	304.1 > 179.2	A	A	A	B	A	B	A	5	2	0	0	0	0
46	Phosphamidon 1	14.5	264.1 > 127.0													
	Phosphamidon 2	16.2	264.1 > 127.0	E	A	A	A	A	A	A	6	0	0	0	0	1
47	Pyroquilon	14.5	173.1 > 130.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
48	Pyrimethanil*	14.6	198.1 > 198.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
49	Chlorothalonil	15.1	265.9 > 133.0	D	E [‡]	D	E [‡]	D	E [‡]	E [‡]	0	0	0	0	3	4
50	Disulfoton	14.8	142.0 > 109.0	C	D	A	D	B	B'	A	2	1	1	1	2	0
51	Prohydrojasmon 1	14.9	153.0 > 97.0													
	Prohydrojasmon 2	15.6	153.0 > 97.0	E [‡]	A	D	D	B	D	E [†]	1	1	0	0	3	2
52	Isazofos	14.9	285.0 > 257.2	B	A	B	B	D	E [†]	A	2	3	0	0	1	1
53	Tefluthrin	14.9	177.0 > 127.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0

表3 続き

No.	農薬名	RT ¹⁾ (min)	モニターイオン (m/z)	りんご	ほうれんそう	玄米	ねぎ	ばれいしよ	キャベツ	レモン	各評価の分布 ²⁾					
											A	B	B'	C	D	E
54	Terbacil	15.3	161.1	> 144.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
55	Etrimfos	15.1	292.1	> 181.2	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
56	Triallate	15.2	268.0	> 184.0	B'	A	A	A	B	B'	4	1	2	0	0	0
57	Iprobenfos	15.6	204.1	> 91.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
58	Pirimicarb	15.6	238.1	> 166.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
59	Benoxacor	15.8	259.0	> 120.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
60	Formothion	16.0	170.0	> 93.0	A	A	A	A	A	B	6	1	0	0	0	0
61	Ethiofencarb	16.1	168.1	> 107.0	D	D	A	D	A	C	3	0	0	1	3	0
62	Benfuresate	16.4	256.1	> 163.1	A	A	B	A	A	A	6	1	0	0	0	0
63	Dichlofenthion(ECP)	16.3	279.0	> 223.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
64	Dimethenamid	16.4	230.1	> 154.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
65	Propanil	17.0	217.0	> 161.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
66	Acetochlor	16.6	223.1	> 132.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
67	Bromobutide	16.7	232.1	> 176.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
68	Chlorpyrifos-methyl	16.7	285.9	> 271.0	B'	A	A	A	A	A	6	0	1	0	0	0
69	Vinclozolin	16.9	285.0	> 212.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
70	Spiroxamin 1	16.9	100.1	> 72.1	A	A	A	D	A	E ^{S†#}	4	0	0	0	2	1
	Spiroxamin 2	18.4	100.1	> 72.1												
71	Parathion-methyl	17.1	263.0	> 109.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
72	Tolclophos-methyl	17.1	265.0	> 250.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
73	Alachlor	17.1	237.1	> 160.1	A	A	B	A	A	A	6	1	0	0	0	0
74	Simetryn	17.5	213.1	> 170.1	A	A	A	D	A	A	6	0	0	0	1	0
75	Heptachlor	17.3	338.8	> 267.9	D	A	B	D	D	E ^{S†}	1	1	1	0	3	1
76	Carbaryl	17.5	144.1	> 115.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
77	Metalaxyl	17.5	249.1	> 190.2	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
78	Ametryn*	17.6	227.1	> 212.1	A	A	A	D	A	A	6	0	0	0	1	0
79	Fenchlorphos	17.6	284.9	> 270.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
80	Prometryn*	18.4	241.1	> 184.1	A	A	A	D	A	A	6	0	0	0	1	0
81	Pirimiphos-methyl	18.2	305.1	> 290.2	A	A	A	A	B	D	4	1	1	0	1	0
82	1-Naphthyl acetamide	18.7	141.1	> 115.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
83	Terbutryn	18.3	241.2	> 170.1	A	A	A	E ^{S†}	A	A	6	0	0	0	0	1
84	Fenitrothion	18.5	277.0	> 260.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
85	Methiocarb	18.6	168.1	> 153.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
86	Ethofumesate	18.6	286.1	> 207.2	A	A	A	A	B	A	6	1	0	0	0	0
87	Bromacil*	19.2	205.0	> 188.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
88	Dichlofluanid	18.7	224.1	> 123.0	D	D	D	D	B	D	0	1	0	0	6	0
89	Esprocarb	18.8	222.1	> 91.1	A	A	A	A	A	A	6	0	1	0	0	0
90	Malathion	19.0	173.0	> 99.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
91	Quinoclamine	19.3	207.0	> 172.0	A	B	A	A	A	A	6	1	0	0	0	0
92	Metolachlor	19.1	238.1	> 162.2	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
93	Chlorpyrifos	19.2	313.9	> 258.0	A	A	A	A	A	B	5	1	0	0	1	0
94	Aldrin	19.3	262.9	> 193.0	B'	A	B'	A	C	B'	2	0	3	2	0	0
95	Thiobencarb	19.4	257.1	> 100.0	A	A	A	A	B	B	5	2	0	0	0	0
96	Dimethylvinphos Z	19.5	294.9	> 109.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
97	Chlorthal-dimethyl	19.6	331.9	> 301.1	A	A	A	A	A	A	6	0	1	0	0	0
98	Diethofencarb	19.6	267.2	> 225.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
99	Fenthion	19.6	278.0	> 109.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
100	Fenpropimorph*	19.5	128.1	> 70.1	A	A	A	D	A	A	6	0	0	0	1	0
101	Cyanazine	20.1	225.1	> 189.2	A	A	A	B'	A	B	5	1	1	0	0	0
102	Parathion	19.8	291.0	> 109.0	A	A	B	A	A	A	6	1	0	0	0	0
103	Isfenphos-oxon	19.9	229.0	> 201.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
104	Triadimefon*	20.0	208.1	> 127.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
105	Tetraconazole	20.2	336.0	> 218.2	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
106	Fthalide	20.5	242.9	> 179.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
107	Nitrothal-isopropyl	20.3	236.1	> 194.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
108	Bromophos-methyl	20.6	330.9	> 316.0	A	A	A	A	A	A	6	0	1	0	0	0

表3 続き

No.	農薬名	RT ¹⁾ (min)	モニターイオン (m/z)	りんご	ほうれんそう	玄米	ねぎ	ばれいしよ	キャベツ	レモン	各評価の分布 ²⁾					
											A	B	B'	C	D	E
109	Diphenamid	20.7	167.1 > 165.1	A	A	B	A	A	A	A	6	1	0	0	0	0
110	Fosthiazate 1	20.6	195.0 > 103.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
	Fosthiazate 2	20.8	195.0 > 103.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
111	Pendimethalin	21.3	252.1 > 162.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
112	Chlorfenvinphos 1	21.3	323.0 > 267.1	A	A	A	E ^{S†}	B	B	A	4	2	0	0	0	1
	Chlorfenvinphos 2	21.9	323.0 > 267.1	A	A	A	E ^{S†}	B	B	A	4	2	0	0	0	1
113	Penconazole	21.7	248.1 > 192.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
114	Dimethametryn	21.8	212.1 > 122.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
115	Chlozolinate	21.9	331.0 > 259.2	A	A	A	A	A	B	A	6	1	0	0	0	0
116	Isofenphos	21.7	255.1 > 185.1	A	A	B	A	A	A	A	6	1	0	0	0	0
117	Z-Pyriphenox	21.7	262.0 > 192.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
118	E-Pyriphenox	23.3	262.0 > 192.1	A	B	A	A	A	A	A	6	1	0	0	0	0
119	Fipronil*	22.0	419.9 > 351.1	E ^S	D	D	E ^{S†}	E ^{S†}	E ^{S†}	E ^{S†}	0	0	0	0	2	5
	Allethrin 1	21.8	123.0 > 81.0	E ^{S†}	0	0	0	0	0	7						
120	Allethrin 2,3	22.2	123.0 > 81.0	E ^{S†}	0	0	0	0	0	7						
	Allethrin 4	22.8	123.0 > 81.0	E ^{S†}	0	0	0	0	0	7						
121	Mecarbam	22.1	329.1 > 131.0	D	B	D	B	B	E ^{S†}	B	0	4	0	0	2	1
122	Diclocymet 1	22.4	277.1 > 221.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
	Diclocymet 2	23.2	277.1 > 221.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
123	Phenthoate	22.2	274.0 > 121.0	A	A	A	A	A	A	B'	6	0	1	0	0	0
124	Quinalphos	22.3	298.1 > 156.0	A	A	A	B	B	A	A	5	2	0	0	0	0
125	Captan	22.3	149.0 > 70.0	A	E [†]	D	D	D	D	D	1	0	0	0	5	1
126	Dimepiperate	22.4	145.0 > 112.1	A	A	A	B	A	A	A	6	1	0	0	0	0
127	Procymidone	22.5	283.0 > 96.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
128	Triadimenol 1*	23.0	168.1 > 70.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
	Triadimenol 2*	23.0	168.1 > 70.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
129	Methoprene 1,2	22.8	153.0 > 111.0	A	A	B'	B	A	A	A	5	1	1	0	0	0
130	Bromophos-ethyl	23.0	358.9 > 303.0	A	A	A	A	A	A	C	6	0	0	1	0	0
131	Methidathion	23.0	145.0 > 85.0	A	A	A	A	A	A	D	6	0	0	0	1	0
132	Chlorbenside	22.9	268.0 > 125.0	A	A	A	A	A	A	B'	6	0	1	0	0	0
133	Chinomethionat	23.1	206.0 > 148.0	D	D	D	D	D	D	D	0	0	0	0	7	0
134	Propaphos	23.3	304.1 > 220.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
135	Paclobutrazol	23.3	236.1 > 125.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
136	Tetrachlorvinphos*	23.4	330.9 > 109.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
137	Butachlor	23.4	237.1 > 160.1	A	A	B'	A	A	A	B'	5	0	2	0	0	0
138	Disulfotonsulfone	23.6	213.0 > 124.9	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
139	Fenothiocarb	23.7	160.1 > 72.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
140	α-Endosulfan	23.4	240.9 > 206.0	B	A	A	D	A	B	A	4	2	0	0	1	0
141	β-Endosulfan	26.0	240.9 > 206.0	B	A	B	E [†]	A	B	A	3	3	0	0	0	1
142	Butamifos	23.8	286.1 > 202.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
143	Flutriafol	23.9	219.1 > 123.0	B	A	A	A	A	A	A	6	1	0	0	0	0
144	Napropamide	24.0	271.2 > 128.0	B	A	B'	B	A	A	A	4	2	1	0	0	0
145	Fenamiphos	24.2	303.1 > 260.3	B	B'	A	B	A	A	A	4	2	1	0	0	0
146	TCMTB	24.2	180.0 > 136.0	A	D	D	A	A	A	A	5	0	0	0	2	0
147	Chlorfenson	24.2	175.0 > 111.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
148	Hexaconazole*	24.2	214.0 > 172.0	E ^S	A	B	B	A	A	A	4	2	0	0	0	1
149	Flutolanil	24.4	323.1 > 173.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
150	Prothiophos	24.3	309.0 > 239.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
151	E-Metominostrobin	24.4	191.1 > 160.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
152	Z-Metominostrobin	25.2	191.1 > 160.1	A	A	A	A	B	A	A	6	1	0	0	0	0
153	Pretilachlor	24.4	262.1 > 202.2	A	A	B	A	A	A	A	6	1	0	0	0	0
154	Tricyclazole*	24.9	189.0 > 162.0	A	C	A	B'	A	A	A	5	0	1	1	0	0
155	Isoprothiolane	24.5	290.1 > 118.0	A	A	B	A	A	A	A	6	1	0	0	0	0
156	Fludioxonil*	24.9	248.0 > 182.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
157	Profenofos	24.5	336.9 > 267.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
158	p,p'-DDE	24.7	317.9 > 246.1	A	A	A	A	A	A	C	6	0	0	1	0	0

表3 続き

No.	農薬名	RT ¹⁾ (min)	モニターイオン (m/z)	りんご	ほうれんそう	玄米	ねぎ	ばれい しよ	キャベツ	レモン	各評価の分布 ²⁾					
											A	B	B'	C	D	E
159	p,p'-DDD	26.2	235.0	> 165.1	B	A	A	A	A	A	6	1	0	0	0	0
160	o,p'-DDT	26.3	234.9	> 164.9	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
161	p,p'-DDT	27.5	235.0	> 165.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
162	Uniconazole P	24.7	234.1	> 137.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
163	Oxadiazon	24.8	175.0	> 112.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
164	DEF	24.8	168.9	> 112.9	A	A	B	A	A	B	5	2	0	0	0	0
165	Dierdrin	24.7	262.9	> 193.0	B'	B'	B	B	A	B	1	4	2	0	0	0
	Aramite 1,2	24.9	334.1	> 185.1												
166	Aramite 3	25.2	334.1	> 185.1	E ^{S†}	0	0	0	0	0	7					
	Aramite 4	25.6	334.1	> 185.1												
167	Thifluzamide	24.8	448.9	> 429.2	A	A	A	A	A	B'	6	0	1	0	0	0
168	Flamprop-methyl*	24.9	276.1	> 105.0	A	A	A	A	E [†]	A	6	0	0	0	0	1
169	Myclobutanil	25.0	179.0	> 125.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
170	Buprofezin*	25.0	305.2	> 249.3	E ^{S†}	0	0	0	0	0	7					
171	Flusilazole	25.0	233.1	> 165.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
172	Oxyfluorfen	25.0	252.0	> 146.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
173	Carboxin	25.1	235.1	> 143.0	D	D	A	D	E [†]	D	2	0	0	0	4	1
174	Bupirimate	25.1	316.2	> 273.2	E [†]	B	D	E ^{S†}	B	E [†]	0	3	0	0	1	3
175	Imibenconazole-desbenzyl	25.4	235.0	> 166.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
176	Kresoxim-methyl	25.2	206.1	> 131.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
177	Azaconazole	25.2	217.0	> 173.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
178	Imazamethabenz-methyl	25.4	245.0	> 176.0	A	A	B	A	A	A	6	1	0	0	0	0
179	Chlorfenapyr	25.4	247.0	> 227.0	E [†]	E [†]	D	E ^{S†}	B	B'	0	2	1	0	1	3
180	Cyproconazole 1,2	25.6	222.1	> 125.1	E [†]	A	A	A	A	A	6	0	0	0	0	1
181	Isoxathion	25.5	313.1	> 130.0	B	A	D	B	A	E [†]	3	2	0	0	1	1
182	Endrin	25.6	262.9	> 193.0	B'	A	A	A	B	E [†]	3	1	1	0	0	2
183	Fenoxanil	25.7	293.1	> 155.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
184	Perthane	25.6	223.2	> 167.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
185	Chlorobenzilate	26.0	253.0	> 141.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
186	Z-Pyriminobacmethyl	26.0	302.1	> 256.2	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
187	E-Pyriminobacmethyl	27.4	302.1	> 256.3	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
188	Flufenpyr-ethyl	26.1	408.1	> 345.3	B	A	B	A	B	D	3	3	0	0	1	0
189	Fensulfothion	26.1	293.0	> 141.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
190	Oxadixyl	26.4	163.0	> 132.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
191	Ethion	26.3	384.0	> 231.1	B	A	D	B	A	B	3	3	0	0	1	0
192	Fluacrypyrim	26.6	204.1	> 189.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
193	Mepronil	26.9	269.1	> 119.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
194	Sulprofos	26.8	322.0	> 156.0	A	A	A	B	A	B	5	2	0	0	0	0
195	Triazophos	26.8	257.1	> 162.2	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
196	Benalaxyl*	27.1	266.1	> 148.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
197	Chlornitrofen	27.1	316.9	> 287.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
198	Carfentrazone-ethyl*	27.1	411.0	> 340.2	B	B	D	B	D	E ^{S†}	1	3	0	0	2	1
199	Ediphenphos	27.2	310.0	> 173.0	A	A	B'	A	A	A	6	0	1	0	0	0
200	Trifloxystrobin*	27.3	222.1	> 130.0	A	A	B	D	B	B	3	3	0	0	1	0
201	Norflurazon	27.4	303.0	> 302.2	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
202	Propiconazole 1	27.3	259.0	> 173.0	A	B'	A	A	E [†]	E [†]	4	0	1	0	0	2
	Propiconazole 2	27.5	259.0	> 173.0												
203	Quinoxifen	27.5	237.0	> 208.2	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
204	Endosulfan-sulphate	27.3	271.9	> 237.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
205	Lenacil	27.8	153.1	> 136.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
206	Pyraflufen-ethyl	27.6	412.0	> 349.3	A	A	A	A	B	D	5	1	0	0	1	0
207	Hexadzinone	27.8	171.0	> 71.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
208	Thenylchlor	27.8	288.1	> 141.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
209	Tebuconazole	28.0	250.1	> 125.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
210	Diclofop-methyl	28.0	340.0	> 253.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
211	Propargite 1,2	28.0	350.2	> 173.0	E ^{S†}	E [†]	E [†]	E [†]	D	E ^{S†}	1	0	0	0	1	5

表3 続き

No.	農薬名	RT ¹⁾ (min)	モニターイオン (m/z)	りんご	ほうれんそう	玄米	ねぎ	ばれいしよ	キャベツ	レモン	各評価の分布 ²⁾					
											A	B	B'	C	D	E
212	Diflufenican	28.1	394.1 > 266.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
213	Resmethrin 1	28.0	171.1 > 128.1	E [†]	D	B	E [†]	A	E [†]	E [†]	1	1	0	0	1	4
	Resmethrin 2	28.3	171.1 > 128.1													
214	Piperonyl butoxide	28.2	176.1 > 131.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
215	Captafol	28.3	79.0 > 79.0	E ^{†#}	E [†]	D	E ^{†#}	D	E [†]	E [†]	0	0	0	0	2	5
216	Epoxiconazole*	28.4	192.0 > 138.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
217	Zoxamide	28.5	258.1 > 187.1	B	A	A	C	A	C	B'	3	1	1	2	0	0
218	Mefenpyr-diethyl*	28.5	253.0 > 189.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
219	Spiromesifen	28.5	272.2 > 254.3	D	B'	A	A	A	A	A	5	0	1	0	1	0
220	Pyributycarb	28.6	181.1 > 108.1	A	A	B	A	A	A	A	6	1	0	0	0	0
221	Pyridaphenthion	28.7	199.1 > 92.0	B	A	A	A	A	A	A	6	1	0	0	0	0
222	Iprodione	28.8	314.0 > 245.2	A	A	B	E ^{S†}	A	B	A	4	2	0	0	0	1
223	Azinphos-methyl	29.0	160.0 > 160.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
224	Phosmet	29.0	317.0 > 160.1	A	B	E [†]	B	B	B'	A	2	3	1	0	0	1
225	Bifenthrin	28.9	181.1 > 166.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
226	EPN	29.1	157.0 > 110.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
227	Bromopropylate	29.1	343.0 > 185.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
228	Piperophos	29.1	320.1 > 122.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
229	Picolinafen	29.2	376.1 > 239.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
230	Etoxazole*	29.3	300.1 > 270.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
231	Spirodiclofen	29.3	312.1 > 268.4	D	D	E ^{S†}	E ^{S†}	B	E ^{S†}	E ^{S†}	0	1	0	0	2	4
232	Methoxychlor	29.2	227.0 > 169.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
233	Fenpropathrin*	29.3	265.1 > 210.3	B	A	A	A	A	A	A	6	1	0	0	0	0
234	Fenamidone*	29.4	268.1 > 180.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
235	Tebufenpyrad	29.4	318.2 > 131.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
236	Anilofos*	29.5	226.0 > 157.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
237	Bifenox	29.7	341.0 > 310.2	A	A	B	B	D	A	A	4	2	0	0	1	0
238	Tetradifon	29.8	355.9 > 228.9	A	A	A	A	A	A	B'	6	0	1	0	0	0
239	Iprodione Metabolite	29.8	329.0 > 142.0	E ^S	D	D	B	B	E ^{S†}	D	0	2	0	0	3	2
240	Phenothrin 1	29.7	183.1 > 153.1	A	A	D	B'	E [†]	A	C	3	0	1	1	1	1
	Phenothrin 2	29.9	183.1 > 153.1													
241	Phosalone	30.0	367.0 > 182.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
242	Cyhalothrin 1	30.2	208.1 > 181.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
	Cyhalothrin 2	30.8	208.1 > 181.1													
243	Pyriproxyfen	30.3	136.1 > 96.0	A	A	A	A	A	A	B'	6	0	1	0	0	0
244	Cyhalofop-butyl	30.3	256.1 > 120.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
245	Mefenacet	30.5	192.1 > 136.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
246	Acrinathrin	30.8	289.1 > 93.0	C	A	A	A	A	A	A	6	0	0	1	0	0
247	Pyrazophos*	30.9	373.1 > 232.0	A	A	B	A	A	D	A	5	1	0	0	1	0
248	Fenarimol	30.8	251.0 > 139.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
249	Pyraclifos	31.2	360.1 > 194.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
250	Oryzalin*	31.8	317.1 > 275.1	D	D	D	A	D	E ^{S†}	D	1	0	0	0	5	1
251	Bitertanol 1,2	31.5	170.1 > 141.1	A	A	A	D	A	A	A	6	0	0	0	1	0
252	Permethrin 1	31.6	183.0 > 153.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
	Permethrin 2	31.8	183.0 > 153.1													
253	Pyridaben	31.8	364.1 > 217.2	A	A	A	A	A	A	C	6	0	0	1	0	0
254	Fluquinconazole	31.9	340.0 > 298.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
255	Cafenstrole	32.2	100.0 > 72.0	A	A	C	A	A	A	A	6	0	0	1	0	0
256	Cyfluthrin 1,2,3,4	32.3	226.0 > 206.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
257	Fenbuconazole	32.4	198.1 > 129.0	A	A	A	D	A	A	A	6	0	0	0	1	0
258	Cypermethrin 1,2,3,4	33.1	163.0 > 91.0	A	A	A	A	A	A	E [†]	6	0	0	0	0	1
259	Halfenprox	32.8	263.0 > 235.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
260	Flucythrinate 1	33.0	199.1 > 157.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
	Flucythrinate 2	33.3	199.1 > 157.1													
261	Etofenprox	33.2	163.1 > 107.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
262	Silafluofen	33.4	286.1 > 258.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0

表3 続き

No.	農薬名	RT ¹⁾ (min)	モニターイオン (m/z)	りんご	ほうれ んそう	玄米	ねぎ	ばれい しょ	キャベツ	レモン	各評価の分布 ²⁾					
											A	B	B'	C	D	E
263	Fluridone*	33.6	328.1	> 328.4	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
264	Pyrimidifen	33.7	184.0	> 169.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
265	Fenvalerate 1	34.0	225.1	> 119.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
	Fenvalerate 2	33.9	225.1	> 119.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
266	Flumioxazin	34.0	354.1	> 326.3	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
267	Fluvalinate 1,2	34.0	250.1	> 200.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
268	Difenconazole 1,2	34.6	323.0	> 265.3	A	A	A	D	A	A	6	0	0	0	1	0
269	Indoxacarb*	34.7	203.0	> 134.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
270	Deltamethrin	34.9	253.0	> 174.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
271	Flumiclorac-pentyl	35.1	423.2	> 318.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
272	Tolfenpyrad*	35.6	383.1	> 171.1	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	0
273	Imibenconazole	36.2	375.0	> 260.2	A	C	A	D	A	A	B'	4	0	1	1	1
274	Cinidon-ethyl	36.3	330.0	> 302.3	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0
275	Fluthiacet methyl	36.6	403.0	> 266.1	A	C	C	A	D	D	B'	2	0	1	2	2

1) RT : Retention time 一部の農薬については、RT 順とはなっていない。

2) 農薬の各評価 (A~E) の数

* : GC 及び LC の共通測定成分

\$: 検量線に直線性がない

† : 定量下限が許容範囲外

: 選択性が許容範囲外

表4 LC法の妥当性試験評価結果 (農薬別)

No.	農薬名	RT ¹⁾ (min)	モニターイオン (m/z)	りんご	ほうれ んそう	玄米	ねぎ	ばれい しょ	キャベツ	レモン	各評価の分布 ²⁾					ねぎ 追試 ³⁾
											A	B	B'	C	D	
Positive																
1	Methamidophos	5.5	141.9	> 93.9	A	A	A	A	D	A	6	0	0	0	1	A
2	Acephate	5.9	183.9	> 142.8	A	C	A	D	C	A	4	0	0	2	1	C
3	Omethoate	6.0	214.0	> 183.0	A	B	A	C	A	A	4	1	0	2	0	A*
4	Dinotefuran	6.1	203.1	> 129.0	A	C	A	C	C	D	2	0	0	3	2	A*
5	Pymetrozine	6.2	218.2	> 105.0	D	C	A	D	C	C	1	0	0	3	3	A*
6	Oxamyl	6.2	237.1	> 72.0	A	A	A	C	A	A	5	0	0	1	1	A*
7	Methomyl	6.5	163.1	> 106.0	A	A	D	A	A	A	5	0	0	0	2	A
8	Thiamethoxam	6.5	292.1	> 210.8	A	B	A	C	A	A	4	1	0	1	1	A*
9	Imidacloprid	7.0	256.2	> 174.9	A	A	B'	A	B'	A	4	0	2	1	0	A
10	Clothianidin	7.1	250.1	> 169.0	A	A	A	A	A	A	6	0	0	0	1	A
11	Carbendazim	7.2	192.1	> 160.1	A	C	A	C	A	A	4	0	0	2	1	A*
12	3-HydroxyCarbofuran*	7.3	238.1	> 181.0	A	A	A	C	A	A	5	0	0	1	1	A*
13	Acetamiprid	7.3	223.2	> 125.8	A	B	A	C	A	A	4	1	0	1	1	A*
14	Dimethoate*	7.5	230.2	> 198.6	B	C	A	C	A	C	2	1	0	3	1	A*
15	Chloridazon	7.7	222.0	> 104.0	B	C	A	D	A	A	3	1	0	1	2	C
16	Thiacloprid	7.7	253.1	> 125.9	A	B	A	C	A	A	4	1	0	1	1	A*
17	Triflumizole metabolite	7.7	295.2	> 175.8	A	C	A	A	A	B	4	1	0	2	0	A
18	Oxycarboxin	7.8	268.1	> 175.0	A	A	A	A	A	A	6	0	0	1	0	A
19	Thiabendazole	7.9	202.1	> 175.1	B	C	A	C	A	C	2	1	0	3	1	A*
20	Cymoxanil	8.0	199.1	> 128.0	A	A	A	C	A	C	4	0	0	3	0	C
21	Tricyclazole*	8.2	190.1	> 162.9	A	A	A	C	A	A	5	0	0	2	0	A*
22	Thifensulfuron-methyl	8.8	388.0	> 167.0	A	A	A	A	D	A	6	0	0	0	1	A
23	Carbetamide	8.9	237.1	> 192.1	A	A	A	C	A	A	6	0	0	1	0	A*
24	Azamethiphos	9.0	325.0	> 183.0	A	A	A	D	A	A	6	0	0	0	1	C
25	Thiophanate-methyl	9.1	343.1	> 150.8	C	D	A	D	A	D	2	0	0	2	3	C
26	Bendiocarb*	9.2	224.1	> 167.0	B	C	A	C	A	A	4	1	0	2	0	C
27	Imazalil	9.3	297.0	> 159.0	A	A	A	C	A	A	6	0	0	1	0	A*
28	Thidiazuron	9.3	221.0	> 102.0	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A

表4 続き

No.	農薬名	RT ¹⁾ (min)	モニターイオン (m/z)	りんご	ほうれんそう	玄米	ねぎ	ばれいしよ	キャベツ	レモン	各評価の分布 ²⁾					ねぎ 追試 ³⁾
											A	B	B'	C	D	
29	Carbofuran*	9.3	222.1 > 165.1	A	A	A	C	D	A	A	5	0	0	1	1	A*
30	Dimethirimol	9.4	210.2 > 71.1	A	A	A	C	A	A	C	5	0	0	2	0	D
31	Bromacil*	9.5	261.1 > 204.9	A	A	A	D	A	A	C	5	0	0	1	1	B'
32	Isouron	9.6	212.1 > 167.0	A	A	A	C	A	A	A	6	0	0	1	0	A*
33	Tebuthiuron	9.6	229.2 > 172.1	A	A	A	C	A	A	A	6	0	0	1	0	A*
34	Thiodicarb	9.7	355.1 > 87.9	A	D	D	D	A	A	C	3	0	0	1	3	D
35	Monolinuron	9.9	215.1 > 126.0	A	A	A	C	A	A	D	5	0	0	1	1	A*
36	Trifloxysulfuron	10.0	438.1 > 182.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
37	Furametpyr	10.2	334.2 > 157.0	A	A	A	C	A	A	A	6	0	0	1	0	C
38	Azimsulfuron	10.3	425.1 > 182.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
39	Isoxaflutole	10.3	360.0 > 250.9	A	A	A	C	A	A	A	6	0	0	1	0	A*
40	Methabenzthiazuron	10.4	222.1 > 165.1	A	A	A	C	D	A	A	5	0	0	1	1	A*
41	Thiophanate	10.5	371.2 > 151.0	C	D	A	D	A	D	A	3	0	0	1	3	C
42	Fenpropimorph*	10.6	304.2 > 147.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
43	Mepanipyrimmetabolite	10.6	244.1 > 200.2	A	A	A	C	A	A	A	6	0	0	1	0	C
44	Diuron	10.7	233.2 > 71.9	A	C	A	D	A	A	A	5	0	0	1	1	D
45	Flazasulfuron	10.7	408.2 > 182.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
46	Azoxystrobin	10.9	404.2 > 371.8	A	A	A	C	A	A	A	6	0	0	1	0	B
47	Bensulfuron-methyl	10.9	411.2 > 149.1	A	A	A	A	A	D	A	6	0	0	0	1	A
48	Fluridone*	10.9	330.0 > 309.0	A	A	A	C	A	A	A	6	0	0	1	0	B
49	Pyriftalid	11.1	319.1 > 139.0	A	A	A	C	A	A	A	6	0	0	1	0	C
50	Oxabetrinil	11.2	233.1 > 147.1	A	A	A	C	A	A	A	6	0	0	1	0	B
51	Ferimzone E,Z	11.4	255.2 > 132.0	A	A	B'	C	C	A	A	4	0	1	2	0	A*
52	Fenamidone*	11.4	312.2 > 92.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
53	Ametryn*	11.5	228.2 > 186.0	A	C	A	C	A	A	A	5	0	0	2	0	A*
54	Linuron	11.6	249.1 > 160.0	A	A	A	B	C	A	A	5	1	0	1	0	A*
55	Triflusulfuron-methyl	11.6	493.1 > 264.2	A	A	D	A	B	A	A	5	1	0	0	1	A
56	Boscalid	11.7	343.0 > 307.1	A	A	A	C	A	A	A	6	0	0	1	0	A*
57	Pyrimethanil*	11.7	200.1 > 107.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
58	Siduron	11.7	233.2 > 137.1	A	A	A	C	A	A	A	6	0	0	1	0	A*
59	Dimethomorph	11.8	388.1 > 301.0	A	A	D	A	A	A	A	6	0	0	0	1	A
60	Barbamate	12.2	257.9 > 177.9	A	A	A	C	A	A	A	6	0	0	1	0	B
61	Flamprop-methyl*	12.2	336.2 > 105.0	A	A	A	D	A	A	A	6	0	0	0	1	C
62	Methoxyfenozide	12.2	369.2 > 149.0	A	A	A	C	A	A	A	6	0	0	1	0	B
63	Triadimefon*	12.3	294.1 > 197.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
64	Cumyluron	12.5	303.1 > 185.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
65	Chloroxuron	12.5	291.1 > 72.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
66	Daimuron	12.5	269.0 > 151.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
67	Butafenacil	12.7	475.0 > 331.0	A	A	B	C	A	A	A	5	1	0	1	0	B
68	Triadimenol*	12.8	296.1 > 70.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
69	Chromafenozide	12.9	395.2 > 175.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	B
70	Fenhexamid	13.0	302.1 > 97.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
71	Flufenacet	13.0	364.2 > 152.0	A	A	A	D	A	A	A	6	0	0	0	1	C
72	Iprovalicarb	13.0	321.2 > 119.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
73	Mepanipyrim	13.0	224.1 > 106.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
74	Prometryn*	13.0	242.1 > 158.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
75	Simeconazole	13.1	294.1 > 70.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
76	Triticonazole	13.1	318.1 > 70.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
77	Cyazofamid	13.3	325.0 > 108.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
78	Epoxiconazole*	13.3	330.1 > 121.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
79	Indanofan	13.3	341.2 > 175.1	A	A	A	B	A	A	A	6	1	0	0	0	B
80	Fenoxycarb	13.5	302.2 > 116.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
81	Naproanilide	13.5	292.1 > 171.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
82	Diflubenzuron	13.6	311.1 > 158.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
83	Tebufenozide	13.7	353.2 > 133.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	B
84	Clodinafop-propargyl	13.8	350.0 > 266.1	D	A	A	A	D	A	A	5	0	0	0	2	A

表4 続き

No.	農薬名	RT ¹⁾ (min)	モニタリング (m/z)	りんご	ほうれ んそう	玄米	ねぎ	ばれい しょ	キャベツ	レモン	各評価の分布 ²⁾					ねぎ 追試 ³⁾
											A	B	B'	C	D	
85	Tetrachlorvinphos*	13.8	366.8 > 126.8	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
86	Furametpyr-Hydroxy	13.9	332.2 > 157.2	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
87	Carfentrazone-ethyl*	14.1	412.1 > 366.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
88	Anilofos*	14.2	368.1 > 199.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
89	Thiazopyr	14.2	397.1 > 377.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
90	Cyprodinil	14.3	226.3 > 93.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
91	Etobenzanid	14.3	340.0 > 149.1	A	A	A	B	A	A	A	6	1	0	0	0	A*
92	Benalaxyl*	14.5	326.1 > 148.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
93	Carpropamid	14.5	334.0 > 139.0	A	A	A	B	A	A	A	6	1	0	0	0	A*
94	Phoxim	14.5	299.1 > 129.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
95	Cyflufenamid	14.6	413.3 > 295.1	A	A	A	B	A	A	A	6	1	0	0	0	A*
96	Hexaconazole*	14.6	314.2 > 70.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
97	Mefenpyr-diethyl*	14.6	373.1 > 327.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
98	Pyraclostrobin	14.6	388.2 > 194.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
99	Triflumuron	14.6	359.1 > 156.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
100	Clofentezine	14.8	303.0 > 138.0	C	A	A	A	A	A	A	6	0	0	1	0	A
101	Difenoconazole	15.0	406.1 > 251.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
102	Indoxacarb*	15.0	528.2 > 150.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
103	Pyrazophos*	15.0	374.1 > 222.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
104	Pencycuron	15.0	329.2 > 124.9	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
105	Trifloxystrobin*	15.1	409.2 > 185.8	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
106	Novaluron	15.3	493.3 > 158.1	C	A	A	A	D	D	C	3	0	0	2	2	A
107	Cycloate	15.4	216.0 > 154.1	C	A	A	C	A	C	A	4	0	0	3	0	A*
108	Triflumizole	15.4	346.2 > 277.9	A	A	A	C	A	C	A	5	0	0	2	0	C
109	Benzofenap	15.5	431.2 > 105.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
110	Fenoxaprop-ethyl	15.6	362.1 > 288.1	A	A	A	A	B	A	A	6	1	0	0	0	A
111	Oxaziclomefone	15.7	376.1 > 190.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
112	Quizalofop-ethyl	15.7	373.1 > 299.1	B	A	A	A	B	A	A	5	2	0	0	0	A
113	Furathiocarb	15.9	383.2 > 195.1	A	B'	A	A	A	A	A	6	0	1	0	0	A
114	Tolufenpyrad*	15.9	384.0 > 196.9	A	A	A	A	A	C	A	6	0	0	1	0	A
115	Buprofezin*	16.0	306.2 > 201.1	B	A	A	A	A	A	C	5	1	0	1	0	A
116	Propaquizafop	16.0	444.1 > 99.9	A	A	A	A	D	A	A	6	0	0	0	1	A
117	Teflubenzuron	16.0	381.0 > 158.1	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
118	Cloquintocet-mexyl	16.1	336.2 > 238.0	A	A	A	A	A	C	A	6	0	0	1	0	A
119	Fluazuron	16.1	506.2 > 158.0	A	A	A	A	A	D	A	6	0	0	0	1	A
120	Fenpyroximate Z	16.2	422.2 > 366.2	A	A	D	A	A	A	A	6	0	0	0	1	A
121	Flufenoxuron	16.4	489.0 > 158.0	D	C	D	A	D	D	D	1	0	0	1	5	D
122	Hexythiazox	16.4	353.2 > 227.9	A	C	A	A	A	A	A	6	0	0	1	0	A
123	Etoxazole*	16.6	360.1 > 140.9	C	C	A	A	A	C	A	4	0	0	3	0	A
124	Fenpropathrin*	16.6	350.3 > 125.0	A	C	D	D	A	A	A	4	0	0	1	2	D
125	Chlorfluazuron	16.8	540.1 > 382.7	D	D	A	A	D	D	D	2	0	0	0	5	A
126	Fenpyroximate E	17.0	422.2 > 138.1	A	A	D	A	A	A	A	6	0	0	0	1	A
Negative																
127	GibberellinA3	5.9	345.1 > 143.0	A	A	A	A	A	A	D	6	0	0	0	1	A
128	Triasulfuron	6.5	399.9 > 138.9	A	D	D	A	D	A	A	4	0	0	0	3	A
129	Benzyladenine	6.6	224.0 > 132.9	A	A	A	C	A	B	A	5	1	0	1	0	C
130	Metsusulfuron-methyl	6.7	380.0 > 139.1	A	A	A	A	D	A	D	5	0	0	0	2	A
131	Fluroxypyr	6.7	253.0 > 194.9	A	A	A	A	B	A	A	6	1	0	0	0	B
132	Naptalam	6.8	290.0 > 246.0	A	A	A	A	A	A	D	6	0	0	0	1	A
133	Bentazone	6.9	239.0 > 131.9	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
134	Penoxsulam	6.9	481.9 > 179.0	A	A	D	A	D	A	D	4	0	0	0	3	A
135	Sulfentrazone	6.9	384.8 > 306.9	A	D	D	A	D	A	B'	3	0	1	0	3	A
136	Ethoxysulfuron	6.9	396.9 > 113.0	A	A	A	A	A	A	D	6	0	0	0	1	A
137	4-CPA	7.2	184.9 > 126.9	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
138	1-Naphthaleneacetic acid	7.2	184.9 > 127.0	A	A	A	A	A	A	D	6	0	0	0	1	A

表4 続き

No.	農薬名	RT ¹⁾ (min)	モニターイオン (m/z)	りんご	ほうれい んそう	玄米	ねぎ	ばれい しよ	キャベツ	レモン	各評価の分布 ²⁾					ねぎ 追試 ³⁾
											A	B	B'	C	D	
139	Bromoxynil	7.8	273.8 > 79.0	A	C	A	A	A	A	A	6	0	0	1	0	A
140	Forchlorfenuron	7.9	245.9 > 126.8	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
141	2,4-PA	8.2	218.9 > 161.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
142	MCPA	8.2	199.0 > 141.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
143	Ioxynil	8.4	369.7 > 126.8	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
144	Inabenfide	8.5	336.7 > 121.7	B	A	A	B	A	A	A	5	2	0	0	0	A [*]
145	Fludioxonil*	8.6	246.9 > 125.8	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
146	Imazosulfuron	8.8	411.1 > 229.9	A	A	A	C	A	A	D	5	0	0	1	1	A [*]
147	Clodinafop acid	8.9	310.0 > 238.2	A	A	A	A	D	A	A	6	0	0	0	1	A
148	Dichlorprop	9.0	232.9 > 160.9	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
149	Cyclosulfamuron	9.1	419.9 > 239.0	A	D	D	A	D	A	D	3	0	0	0	4	A
150	Pyrazosulfuron-ethyl	9.3	412.9 > 231.9	A	D	D	A	D	A	D	3	0	0	0	4	A
151	Halosulfuron-methyl	9.3	433.0 > 252.2	A	D	A	A	D	B'	D	3	0	1	0	3	A
152	Oryzalin*	9.4	345.1 > 78.1	A	A	A	B	A	A	A	6	1	0	0	0	A [*]
153	Fomesafen	9.4	437.0 > 195.1	A	D	A	A	D	A	A	5	0	0	0	2	A
154	MCPB	9.4	227.0 > 140.8	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
155	Fipronil*	9.7	435.0 > 329.8	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
156	Acifluorfen	9.7	359.9 > 316.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
157	Haloxypop	10.1	359.9 > 288.0	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
158	Flusulfamide	10.6	412.9 > 170.9	A	A	A	A	A	A	A	7	0	0	0	0	A
159	Hexaflumuron	10.9	458.9 > 438.9	A	A	A	A	A	D	A	6	0	0	0	1	A
160	Fluazinam	11.6	462.9 > 416.0	B	A	A	A	A	C	A	5	1	0	1	0	A
161	Lufenuron	11.7	509.1 > 325.9	D	D	A	C	D	D	D	1	0	0	1	5	A [*]

1) RT : Retention time

2) 農薬の各評価 (A~D) の数

3) ねぎの20倍試験溶液の測定結果の評価分類, 平均回収率と併行精度から分類をした。※は結果が改善したもの

* : GC 及び LC の共通測定成分

公共用水域水質調査

田沢湖の COD 及び全窒素濃度の変動要因に関する一考察

生魚利治

秋田県が継続して行っている調査データをもとに、田沢湖の各水質項目について比較、検討を行った。その結果、田沢湖の COD 上昇の要因には Chl-a の値に反映される植物プランクトン量が関与し、その増殖を制限する要因としては、pH のみではなくリンも関与することが推測された。また、田沢湖の T-N の経年変化が増加傾向を示す要因としては、降水中の NO₃⁻ の経年的な増加が影響を及ぼしていると推測された。

1. はじめに

秋田県の仙北市に位置する田沢湖（図 1, 2）は、1940 年に国策であった電源開発と農地開拓に伴う利水を目的として、強酸性の玉川源泉（大噴）が流入する玉川河川水を湖水による希釈効果を期待し導水したため酸性化した。1978 年に当時の玉川毒水対策技術検討委員会の知事答申



図 1 玉川上流域及び田沢湖

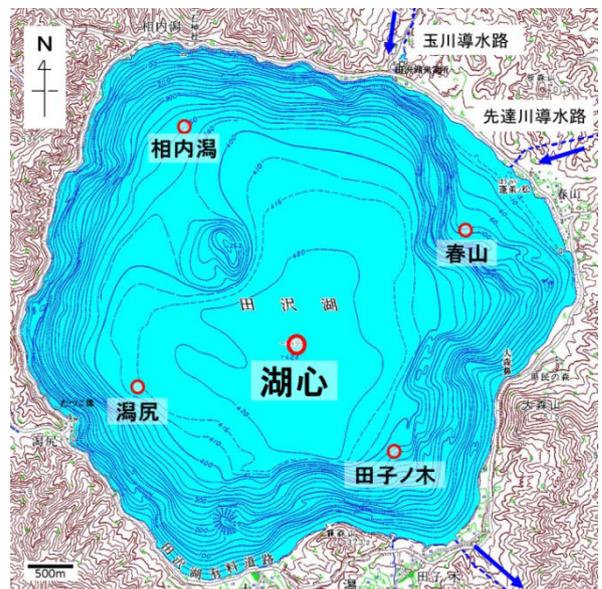


図 2 田沢湖調査地点図

において、田沢湖の pH を将来的に 6.0 に改善することが要望されている¹⁾。1989 年 10 月に、恒久的な対策として玉川上流部に玉川酸性水中和処理施設（中和処理施設）が完成し稼働して以降、田沢湖表層水の pH（図 3）は一時的に回復傾向を示した。しかし、2002 年以降は源泉水の酸度上昇に代表される水質の変化の影響²⁾を受けて、2012 年時点で pH は 5.0 に留まっている。また、pH が回復傾向を示した同時期に化学的酸素要求量（COD）（図 4）も増加傾向を示し、2000 年には 75 % 値が 1.1 mg/L と環境基準値 1.0 mg/L を超過した。このように pH の回復に伴い COD の変動が懸念³⁾されることから、pH 及び COD の変動を考慮し、その他の項目の変動との関係性を明らかにすることは、今後の水質改善施策に重要である。本報では、秋田県が実施している田沢湖の公共用水域水質調査の

データの中から、特に pH, COD, クロロフィル-a (Chl-a), 全窒素濃度 (T-N) 及び全リン濃度 (T-P) の変動と関係性に注目し報告する。

2. 方法

秋田県は、公共用水域水質測定計画に基づき、1972年から田沢湖の環境調査を実施している。年度によって地点、回数及び項目に多少の変更はあるが、湖心、相内潟、春山、潟尻、田子ノ木の5地点(図2)において4月から11月の月1回、合計で年8回の調査を実施している。この調査結果のうち、1972年から2012年の湖心表層水のpH, COD, Chl-a, T-N, T-Pの5項目の経年変化をまとめた。各項目における報告下限値未満の値は、その年の報告下限値の値としてグラフに示した。平均値については、報告下限値未満の値が存在する年度については算出しないこととした。

なお、玉川導水路のT-Nについては秋田県が行っている玉川酸性水影響調査の値を使用した。玉川ダムのT-Pは、国土交通省のダム諸量データベース⁴⁾の値を使用し、N.D及び<0.003 mg/Lの値は0 mg/Lとしてグラフに示した。また、降水中の硝酸態イオン濃度(NO_3^-)及びアンモニアイオン濃度(NH_4^+)の値は、秋田県環境白書に記載されている大館、秋田、横手の平均値を算出し使用した。

3. 結果と考察

3.1 CODの変動要因

pH(図3)は、1990年から2002年まで改善傾向にあった。特に1995年、1998年、2000年および2001年の最大値は6.0以上となり、一時的ではあるものの水質改善目標値である6.0を越えた。しかし、2003年から低下傾向を示し、現在まで年平均値が5.2付近で推移している。COD(図4)は、1976年から1989年まで、値の範囲は報告下限値未満(<0.5 mg/L)~0.8 mg/Lであった。1989年以降は、最小値はいずれの年も<0.5 mg/Lであったが、最大値では1990年から2002年の間に上昇傾向が見られ、1997年及び2000年にそれぞれ1.1 mg/L、1.2 mg/Lと環境基準値の1.0 mg/Lを超過し、1998年及び2001年にも1.0 mg/Lの値を示した。2003年以降は、<0.5~0.6 mg/Lの範囲となり1989年以前とほぼ

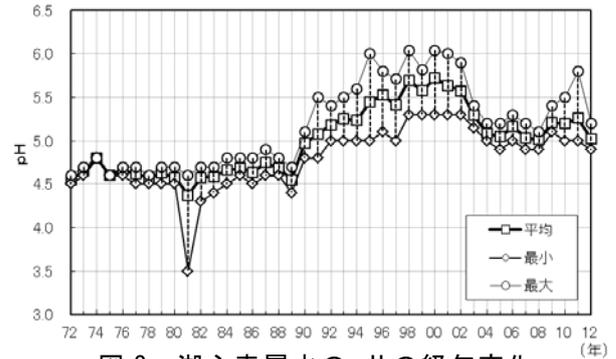


図3 湖心表層水のpHの経年変化

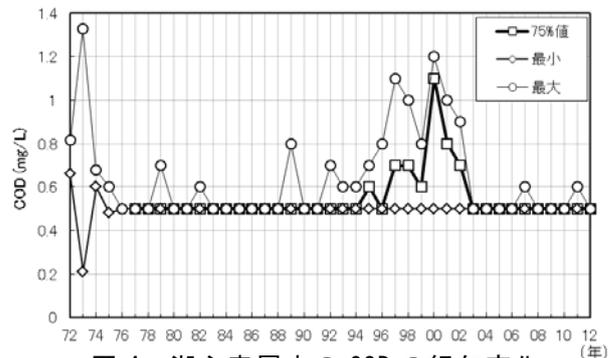


図4 湖心表層水のCODの経年変化

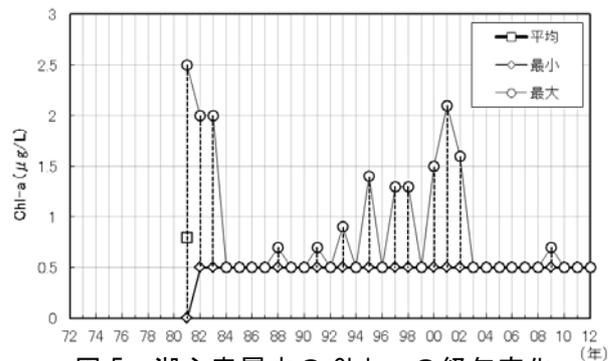


図5 湖心表層水のChl-aの経年変化

同等の値を示した。

pH及びCODの変動は、1989年10月からの中和処理施設の稼働により1990年から2002年にかけてpHが上昇するとCODも増加し、また、2002年以降に大噴の水質が変化するとpHが低下しCODも減少するように、相関性が見られる。有機物量を反映するCODの変動には植物プランクトン量の指標となるChl-aの変動も関与すると考えられることから、これらの関係性に注目した。

Chl-a(図5)は、最小値は1981年では0 µg/L、1982年以降は報告下限値未満(<0.5 µg/L)であった。1981年から1983年の最大値は2.0 µg/L以上の値を示した。1984年以降の最大値ではpH及びCODと同様の傾向が見られた。1984年か

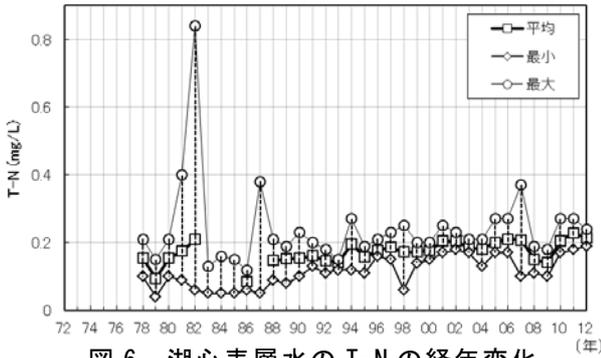


図6 湖心表層水の T-N の経年変化

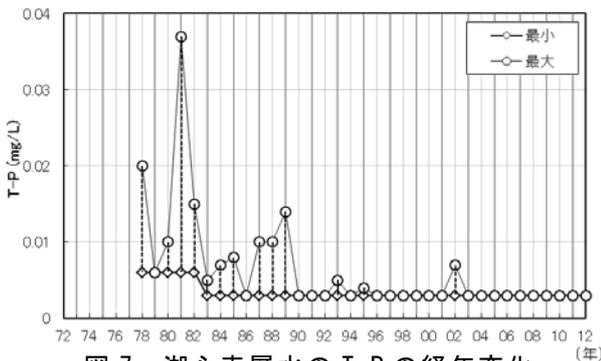


図7 湖心表層水の T-P の経年変化

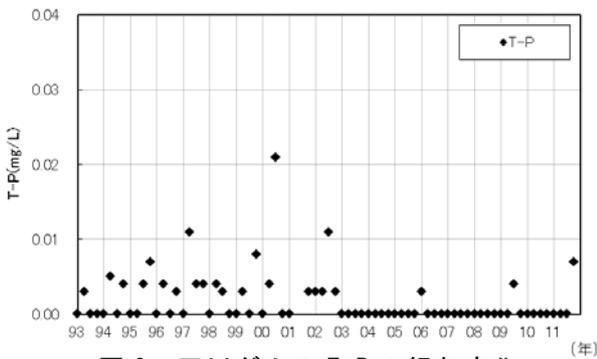


図8 玉川ダムの T-P の経年変化

(※年度により調査回数が違うために 1, 5, 7, 9 月の値のみ使用)

ら 1988 年では $<0.5 \sim 0.7 \mu\text{g/L}$ と低い値を示したが、1990 年から 2002 年の間は上昇傾向が見られ 2001 年には $2.1 \mu\text{g/L}$ を示し、2003 年以降は、再び $<0.5 \sim 0.6 \mu\text{g/L}$ と低い値を示した。このことから、pH が上昇し平均値が 5.5 付近になると田沢湖内で植物プランクトン量が増殖したため Chl-a が高くなり、COD も高くなったと考えられる。また pH の平均値が 5 付近まで低下すると植物プランクトンの増殖が抑制され、COD も低下したものと推測される。

これらのことから、COD の変動は、Chl-a に反映された植物プランクトンの増殖によるものであり、その制限要因は pH であることが推察された。しかし、1981 年から 1983 年の pH の平

均値がおよそ 4.5 であった期間に、COD には反映されなかったが Chl-a の最大値が $2.0 \mu\text{g/L}$ 以上であったことに注目すると、田沢湖の植物プランクトンの増殖には pH 以外の要因も関係することが考えられる。また、1969 年及び 1973 年に当時の秋田県水産試験場が実施した調査⁵⁾では、田沢湖表層水の平均値は、pH はそれぞれ 4.22, 4.64 と現在よりも低い、COD はそれぞれ 1.38 mg/L , 1.43 mg/L と高い値を示した。プランクトンは、1969 年に *Dinobryon sertularia*, 1973 年には *Peridinium sp.* と、いずれも植物性鞭毛虫類の優占が記録されている。

植物の増殖速度は、必要とされる栄養素の中で供給割合の最小のものにより支配されるというリービッヒの最小量の法則に従うとされている。植物プランクトン細胞の元素比をレッドフィールド比⁶⁾と呼び、海洋中の植物プランクトンの窒素とリンの元素比は $\text{N}:\text{P} = 16:1$ (重量比 $7:1$) となる。2012 年における田沢湖の T-N (図 6) 及び T-P (図 7) の平均値は、それぞれ 0.21 mg/L 、報告下限値未満 ($<0.003 \text{ mg/L}$) であるから、レッドフィールド比は重量比でリンを 1 としたときに窒素は 70 以上となり、窒素に対するリンの量は小さいため、リンが植物プランクトンの増殖を制限する要因となっていると推測される。

しかし、前述の秋田県水産試験場の調査によるリン濃度は、リン酸態リン濃度のみの値でも 1969 年及び 1973 年にそれぞれ 0.024 mg/L 及び 0.016 mg/L と、現在の T-P 濃度と比較し高かった。以上のことから、現在の田沢湖では、pH だけではなく栄養的にリンも植物プランクトンの増殖を制限する要因になっていると考え、リンに着目し考察を行った。

T-P (図 7) は、1989 年以前の最大値では、ほぼ毎年報告下限値 (1982 年以前は 0.006 mg/L 、1983 以降は 0.003 mg/L) を上回る値で検出されている。1990 年以降は、最大値もほぼ毎年 0.003 mg/L 未満であるため田沢湖内での推移は不明である。この 1990 年以降に T-P の最大値が低下した要因には、玉川中和処理施設の稼働による影響が考えられる。大噴からの湧出水には鉄が多量に含まれており、中和処理施設の稼働により水酸化鉄として流域に沈殿する。有酸素環境下では、リン酸イオンは、鉄 (III) イオンに捕

捉され不溶性凝集物として沈降堆積する⁶⁾。玉川上流域においても鉄を主成分とした沈殿物がリンを含有している⁷⁾ことが報告されていることから、1989年10月以降は中和処理施設が稼働したことによって、流域に鉄と共にリンが沈殿するようになり、田沢湖に流入するリンが減少したものと考えられる。また、大噴の鉄濃度では、1999年以前は約50 mg/Lで推移していたが、2002年頃から上昇し2009年では約160 mg/Lとおおよそ3倍の濃度になった⁸⁾。また、中和処理施設から5 km下流の五十曲(図1)地点の鉄濃度においても1999年以前は約5 mg/Lで推移していたものが、2002年以降は10~15 mg/Lに上昇し⁸⁾ 2~3倍の値となったことから、2002年頃に見られた大噴の鉄濃度の上昇は、玉川上流域における鉄とリンの沈殿する流域の範囲を以前よりも下流に拡大させたことがわかる。前述のとおり、田沢湖内のリン濃度の推移は不明であるが、玉川ダムにおけるT-P(図8)では、2003年からほぼ0.003 mg/L未満となる。これは、大噴の鉄濃度の増加による鉄の沈殿する流域の拡大が、より下流で合流する支流由来のリンを玉川ダムまでに鉄と共に沈ませたためであると考えられる。

以上のことから、2002年以降の田沢湖CODが低下した要因は、大噴の水質変化が田沢湖のpHの低下させたことに加え、玉川上流域における鉄とリンの共沈する流域が拡大したことによる田沢湖に流入するリン負荷量の減少が、植物プランクトン増殖を抑制したためであると推察される。

3.2 T-Nの増加要因に関して

リンに対する窒素の比率は70以上であり、現状の田沢湖の窒素濃度では植物プランクトン増殖の制限要因にはならないことから、CODの増加にもほとんど関与しないと考えられる。しかし、T-Nの平均値の経年変化(図6)は、1978年の平均値は0.15 mg/Lであったが2012年の平均値では0.21 mg/Lとおおよそ1.5倍になり、緩やかな増加傾向を示すことから、この要因を推定しておくことは田沢湖の水質保全を進めていく上で重要である。

田沢湖へのT-Nの負荷量割合は、玉川導水路が約70%、先達川導水路が約20%、その他中小

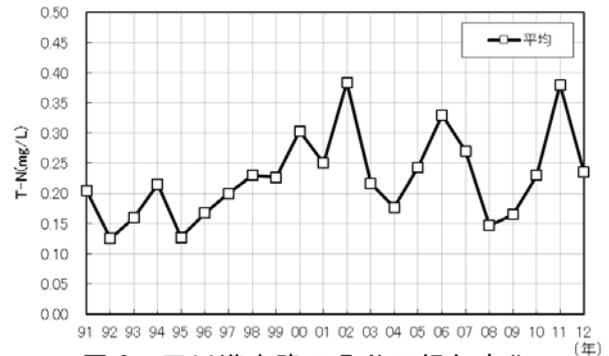


図9 玉川導水路のT-Nの経年変化

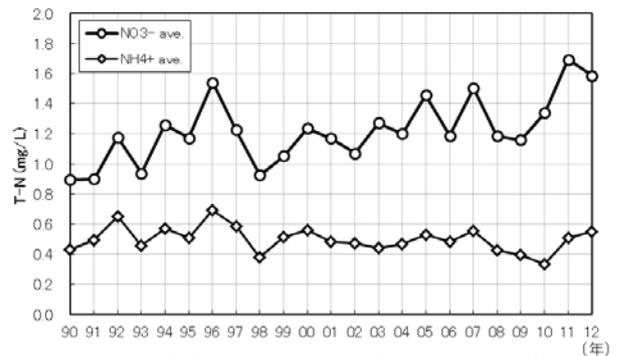


図10 降水中のNO₃⁻及びNH₄⁺の経年変化

河川が約5%、湖面への直接降水が約5%と玉川導水路からの負荷量割合が大きい⁹⁾と推定されている。玉川導水路のT-N(図9)の経年変化もまた緩やかな増加傾向を示す。田沢湖及び玉川導水路のT-Nのどちらにも2002年頃にpHの低下に見られたような大きな変動が見られないことから、大噴の水質変化が原因ではないと考えられる。また、玉川導水路の流域である玉川上流域は、奥羽山脈の山麓を流下し大噴付近の温泉施設及び玉川導水路の取水地点付近に集落が存在するのみで、大部分が山地及び森林である。このため、人為由来の窒素供給による変動は考え難いことから、玉川導水路のT-Nの増加傾向は、玉川上流域で自然由来の窒素負荷によると推測される。

近年、窒素飽和¹⁰⁾と呼ばれる、降水やガスといった大気沈着窒素の断続的な負荷によって、森林渓流水を通じた多量のNO₃⁻の流亡が日本の森林において生じ始めている¹¹⁾現状がある。秋田県内における降水中のNO₃⁻及びNH₄⁺の経年変化(図10)は、NH₄⁺では変動が見られないが、NO₃⁻は増加傾向を示し、1991年の平均値0.89 mg/Lに対し2012年の平均値は1.58 mg/Lとおおよそ1.8倍に増加した。この降水中のNO₃⁻の経年的な増加が、玉川上流域の山地及び森林

から田沢湖への窒素供給量を増加させていることが推測される。

4. おわりに

酸性化のため中和事業の行われている田沢湖は、中和に伴い pH の回復と COD の関係が注視されている。そのため、秋田県が継続して行っている調査データをもとに田沢湖の水質について考察を行った。その結果、田沢湖の COD 上昇の要因には Chl-a の値に反映される植物プランクトン量が関与し、その増殖を制限する要因としては pH のみではなくリンも関与することが推測された。また、田沢湖へのリンの負荷量は、中和処理施設と大噴の水質の変動によって左右されることがうかがえた。これを明らかにするため、今後玉川ダム底質の層別のリン含有量の調査を行う必要があると考える。また、田沢湖の窒素が増加傾向を示す要因は、降水中の NO_3^- も経年的に増加傾向にあることが、玉川上流域の山地及び森林からの窒素供給量を増加させていると推測されることから、玉川上流域において降水前後で形態毎の窒素濃度に変動があるかを調査する必要があると考える。また、より詳細なリンや窒素の動態と負荷原推定のため、上記の調査に加え玉川上流域の各地点の窒素濃度及びリン濃度に関するモニタリング調査も併せて実施する必要があると考える。

今後、これらの調査データの蓄積及び解析をすることが、田沢湖の水質改善に取り組む上で重要になると考える。

参考文献

- 1) 玉川毒水対策技術検討委員会: 玉川毒水対策について〔答申〕, 1978.
- 2) 後藤達夫: 「続報」神秘的な田沢湖の水質改善化について(4)その1, 水, 2008, 50-1, 33-37.
- 3) 秋田県: 平成 25 年度版秋田県環境白書(本編), 2013.
- 4) 国土交通省: ダム諸量データベース, 2014, <http://dam5.nilim.go.jp/dam/>
- 5) 秋田県: 田沢湖生物相調査結果, 玉川自然汚濁対策調査報告書, 1974, 135-160.
- 6) 永田俊 他: 温暖化の湖沼学, 2012.
- 7) 鈴木純恵 他: 玉川酸性水中和処理におけるシュベルトマナイト様化合物の形成によるヒ素及びクロムの取り込み, 水環境学会誌, **5**, 2013, 137-141.
- 8) 成田修司 他: 玉川源泉の成分が田沢湖の pH に及ぼす影響, 秋田県健康環境センター年報, **5**, 2009, 93-99.
- 9) 珍田尚俊 他: 田沢湖に流入する中小河川の水質及び負荷量調査結果(平成 14, 15 年度), 秋田県環境センター年報, **31**, 2003, 55-60.
- 10) John D. Aber et al.: Nitrogen Saturation in Northern Forest Ecosystems, BioScience, **39**, 1989, 378-386.
- 11) 楊宗興 他: 渓流水の NO_3^- 濃度と森林の窒素飽和, 地球環境, **9**, 2004, 29-40.

IV 発表業績

1. 学会発表

各種血清群の腸管出血性大腸菌の酵素基質培地における生育性およびコロニーの特徴的形態の検討

齊藤志保子 古川一郎*¹ 磯部順子*²
長尾清香*³ 小林直樹*³ 工藤由起子*³

第 106 回日本食品衛生学会
2013 年 11 月, 沖縄市

腸管出血性大腸菌の食品における検査法は、血清群 O26, O103, O104, O111 および O157 について個別に通知されているものの、対象食品が限定されており、統括的な検査法が必要とされている。また、上記以外の日本における重要な血清群についても食品の検査法を確立する必要がある。このことから、多血清群に有用な選択分離培地を検討するため、酵素基質培地における各種血清群の鑑別性を検討した。

腸管出血性大腸菌供試菌株は日本での重要な血清型である O157, O26, O111, O103, O121, O145, O165 の 7 種合わせて 110 株、また、他 25 種の O 血清群 44 株、計 154 株 (VT 陰性株 7 株含)。酵素基質培地は 10 種類の平板培地を使用した。TSB で前培養した菌株を酵素基質培地に画線し、37°C 24 時間培養後、生育コロニーの色・形態を観察した。

重要血清群のうち O165 については選択剤の入った 4 種類の酵素基質培地全てで不発育であったことからさらに適当な選択剤の検討が必要であると考えられた。O165 以外の重要な 6 血清群 (O157, O26, O111, O103, O121, O145) では、それらが同一または類似の色調で生育し、選択剤によって他血清群が抑制される培地、また、各血清群でコロニーの色調にある程度の特徴が見られる培地が認められた。完全な鑑別は困難であるが、色調の傾向は今後の効率的な検査法の構築に有用な情報と考えられた。

*¹: 神奈川県衛生研究所

*²: 富山県衛生研究所

*³: 国立医薬品食品衛生研究所

秋田県で分離された非定型的な単相性サル

モネラ O7:-:1,5 の解析

今野貴之

第 67 回日本細菌学会東北支部総会
2013 年 8 月, 仙台市

平成22年に秋田県内の医療機関等から収集したサルモネラ37株のうち、4株が抗血清を用いた血清型別法によりO7:-:1,5と判定され、血清型名が不明となった。今回、このO7:-:1,5の血清型を解明するため、サルモネラのH1抗原遺伝子の検出をPCRにより行った。また、pulsed field gel electrophoresis (PFGE) を行い、菌株間の関連性を調査した。

これまでの秋田県でのサルモネラの分離状況から、O7:-:1,5になりうる血清型として、CholeraesuisもしくはParatyphi C (H1:c), Infantis (H1:r), Thompson (H1:k), Bareilly (H1:y) を想定し、これらのH1抗原の遺伝子に特異的なプライマーを設計し、PCRを行った。また、PFGEは制限酵素としてNotIとXbaIを用いて行った。

O7:-:1,5の4株はいずれもH1:kに特異的なPCRに陽性を示したことから、Thompsonの単相変異株と考えられた。4株の分離された地域は3株が秋田県北部、1株が秋田県中央部であったが、いずれのPFGEパターンも同一であった。また、同期内に秋田県北部で分離されたThompsonもこれらの単相変異株と同一なPFGEパターンを示しており、O7:-:1,5株はこの地域に侵淫するThompsonから生じたと考えられた。従来の血清型別法で型別できない非定型的な単相性サルモネラの存在は、食中毒及び感染症の正確なサーベイランスに支障となることから、公衆衛生上の重要な問題である。PCRによる抗原遺伝子の検出は、従来の血清型別法で抗原を検出できないような場合でも有効であり、サルモネラの正確な血清型別に役立つと考えられた。

秋田県における荚膜型インフルエンザ菌の分離状況について

今野貴之

第 62 回感染症学会東日本地方会

2013年10月, 東京都

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) は、 $1 \times 0.3 \mu\text{m}$ ほどの多形性のグラム陰性桿菌で、菌体の表面に莢膜と呼ばれる構造を持つ菌と持たない菌が存在し、莢膜は血清学的に a~f の 6 型に分けられる。特に b 型 (Hib) は小児の細菌性髄膜炎等の侵襲性感染症の起因菌として知られている。平成 20 年 12 月からの小児向け Hib ワクチンの販売開始により、ワクチンに含まれない b 型以外による侵襲性感染症の増加が懸念されており、本菌による感染症の今後の発生动向が注目されている

平成 20 年~24 年の 5 年間に秋田県内の医療機関から分与されたインフルエンザ菌 666 株の莢膜の血清型を調査した。また、本菌は β -lactamase の産生やペニシリン結合タンパク質 (PBP3) の変異による薬剤耐性化が問題となっていることから、莢膜型インフルエンザ菌と判定された菌については、薬剤耐性に関連する遺伝子の保有状況も調査した。

その結果、43 株の莢膜型インフルエンザ菌を確認し、秋田県では b 型と同様に e 型の分離が多い実態を明らかにした。また、今回確認した莢膜型インフルエンザ菌の多くが PBP3 に変異を有し、 β -lactamase-negative ampicillin-resistant *H. influenzae* (BLNAR) に該当することが分かった。

食品検体からパンソルビン・トラップ法で抽出したノロウイルス RNA の検出系に関する検討

斎藤博之 東方美保*1 岡智一郎*2
片山和彦*2 田中智之*3 野田 衛*4

第 34 回日本食品微生物学会学術総会
2013 年 10 月, 東京都

パンソルビン・トラップ法 (パントラ法: 斎藤博之, 日本食品微生物学会雑誌, 29, 1, 32-37, 2012) は、食品検体からノロウイルス (NoV) を検出するための実践的な手法である。本法はウイルス粒子の回収に黄色ブドウ球菌 (ブ菌) を用いていることから、得られた RNA サンプルに菌由来の遺伝子が大量に混入するという性質が

ある。ブ菌の遺伝子は、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度の向上に寄与している。その一方で、大量に存在するブ菌の遺伝子が干渉して、検出された NoV 遺伝子の解析が困難となる場合も多い。さらに、RT-PCR の反応系 (酵素の種類や反応温度など) によっては著しく感度が低下することもある。本研究は、パントラ法によって抽出された NoV-RNA の検出系を最適化し、遺伝子解析も可能な手法とすることを目的としている。

ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行った場合には、NoV 特異的な増幅が認められなかった。PCR と共通のプライマーを用いた場合は、NoV 遺伝子の増幅が認められたものの、ノイズが多く塩基配列の解析は不可能であった。逆転写反応専用プライマーを用いると、35 コピー/g の汚染レベルまで増幅バンドが認められ、塩基配列を確認したところ添加したウイルスと同一の配列であった。PCR の最適化のために 32 種類の耐熱性ポリメラーゼを比較検討したところ、パントラ法抽出物存在下では、ホットスタートが必須であること、Mg 濃度の最適化も必要であることが明らかになった。6 種類の逆転写酵素の比較検討では、37°C から 42°C での cDNA 合成は非特異反応に阻害され、十分な感度が得られなかった。55°C からは非特異反応が減少し、58°C では認められなくなった。このことから NoV-RNA に特異的な逆転写反応は 58°C で最適化された。本研究による PCR と逆転写反応の比較検討により、最適化条件を確定した。ここで得られた成績は、食品のノロウイルス検査にパントラ法を導入する際に有用と考えられた。

*1: 福井県衛生環境研究センター

*2: 国立感染症研究所

*3: 堺市衛生研究所

*4: 国立医薬品食品衛生研究所

若い女性における子宮頸がん検診受診率向上を目指した取り組みに関する検討

田中貴子

第 72 回日本公衆衛生学会総会
2013 年 10 月, 三重県

秋田県の子宮頸がん検診受診率向上に資する基礎資料を得ることを目的に、若い女性の意識調査を実施し解析した。

秋田県内の20歳～30歳代（平均年齢26.0歳）の女性28名（子育てママグループ7名、会社員グループ7名、大学生グループ14名）を対象に、平成24年2月にフォーカスグループインタビュー法を用いて実施した。主な討議テーマはA.子宮頸がん検診に関する受診者及び未受診者の行動。B.子宮頸がん及び子宮頸がん検診に関する情報、啓発。C.子宮頸がん検診に関する社会環境整備等であった。

子育てママグループからは、A.結婚や妊娠を契機に受診した。B.若い人達への教育・啓発が必要。C.地元で集団検診を受けたい。子育て世代の女性が受診しやすい工夫や社会環境が必要。会社員グループからは、A.未受診の理由は、忙しい、面倒だ、検診のイメージが湧かない。C.受診しやすい職場の体制や雰囲気が必要。無料クーポン券が十分に活用されていない。大学生グループからは、A.未受診の理由は、ただ何となく。B.無料クーポン券が届いて初めて二十歳になったら検診を受けるという事を知った。C.学校帰り検診、平日の夜遅くまで受診可能な体制を希望する等の知見が得られた。

今回、異なるグループから、「身近な所で集団検診を受けたい」という同様の結果が得られたことから、より強く住民の意識を反映していることが示唆された。今後の受診率向上には、1.地域、職場、学校等における集団検診及び医療機関検診の充実を図り、若い世代の女性が受診しやすい時代に合わせた検診の社会環境を整えていく。2.無料クーポン券の継続と充実を図り、健康意識の醸成及び確実な利用を促すことが大切であると考えられた。

秋田県健康環境センター（地方衛生研究所）における保健師活動について

田中貴子

平成25年度地方衛生研究所全国協議会
北海道・東北・新潟支部総会
2013年7月、仙台市

地方衛生研究所（以下、地衛研）は、保健衛生行政の推進に必要な科学的・技術的中核機関としての業務を行っている。しかし地衛研に所属する保健師は少なくその活動はあまり知られていない。今回「平成22年度地域診断から始まる、見える保健活動検討会調査」を参考に、昭和39年～平成22年に至る保健師業務を、当センターの年報から抽出するとともに現在の保健師活動について考察した。

秋田県の成人病予防に寄与する目的で昭和39年に当センター内に成人病科が誕生し、保健師は昭和50年以降1名配置された。これまでの調査研究では、昭和期には成人病予防や循環器検診、老人保健事業等の研究を行ってきた。平成以降は若い世代の健康調査や個別健康教育手法の検討、近年はがん予防をテーマに行政ニーズを踏まえた生活習慣病予防の調査研究に取り組んできた。また結核登録者情報調査では、結核月報・年報報告を実施し、集計解析結果を会議や研修会資料として提供、保健所との連携による感染拡大防止の監視、出前講座・ホームページへの掲載による一般への普及啓発を図ってきた。その他の公衆衛生情報業務として、死亡統計を用いた秋田県の疾病状況の解析、報告書の作成配布等によりその有用性を評価された。

様々な職種で構成されている地衛研にあっても保健師の課題発掘の視点、企画立案、連携調整、実行力は業務推進の大きな力であり、保健師は主体的かつチームの一員としてその能力を十分に発揮できる可能性があると思われる。

パンソルビン・トラップ法によって得られたノロウイルス RNA の効率的な検出に関する検討

齋藤博之 東方美保^{*1} 岡智一郎^{*2}
片山和彦^{*2} 田中智之^{*3} 野田 衛^{*4}

第61回日本ウイルス学会学術集会
2013年11月、神戸市

パンソルビン・トラップ法（パントラ法：齋藤博之、日本食品微生物学会雑誌、29, 1, 32-37, 2012）は、食品検体からノロウイルス(NoV)を検出するための実践的な手法である。本法はウ

ウイルス粒子の回収に黄色ブドウ球菌を用いていることから、得られた RNA サンプルに菌由来の遺伝子が大量に混入するという性質がある。黄色ブドウ球菌の遺伝子は、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度の向上に寄与する一方、RT-PCR の反応系（酵素の種類や反応温度など）によっては妨害物質ともなり得る。本研究では、パントラ法によって抽出された NoV-RNA 検出系の最適化を試みた。

NoV-GII.4 型の cDNA のみを段階希釈したものについて、32 種類の耐熱性ポリメラーゼは、ほぼ同様の検出感度を示した。しかし、パントラ法由来共雑核酸を加えた検討では、耐熱性ポリメラーゼ製品により検出感度に大きな隔たりがあった。パントラ法抽出物存在下では、ホットスタートが必須であること、Mg 濃度の最適化も必要であることが明らかになった。6 種類の逆転写酵素の比較検討では、37°C から 42°C での cDNA 合成は非特異反応に阻害され、十分な感度が得られなかった。55°C からは非特異反応が減少し、58°C では認められなくなった。このことから NoV-RNA に特異的な逆転写反応は 58°C で最適化された。本研究による PCR と逆転写反応の比較検討により、最適化条件の決定に成功した。ここで得られた成績は、食品のノロウイルス検査にパントラ法を導入する際に有用と考えられた。

*1：福井県衛生環境研究センター

*2：国立感染症研究所

*3：堺市衛生研究所

*4：国立医薬品食品衛生研究所

食中毒事例における食品のノロウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化

斎藤博之 東方美保*1 岡智一郎*2
片山和彦*2 田中智之*3 野田 衛*4

第 106 回日本食品衛生学会学術講演会
2013 年 11 月、宜野湾市

パンソルビン・トラップ法（パントラ法）は、食品検体からノロウイルス（NoV）を検出する

ための実践的な手法である。パントラ法にはウイルス粒子の回収に黄色ブドウ球菌が用いられていることから、得られた RNA サンプルは菌由来の遺伝子を大量に含んでおり、RT-PCR に用いる試料としては特殊なものといえる。これまでに、検出された NoV 遺伝子の解析が困難であったり、RT-PCR の反応系（酵素の種類や反応温度など）によって、検出感度に大幅な差異が生じたりするなど、実際の食中毒事例に適用するためには解決すべき問題点が残っている。本研究は、パントラ法によって抽出された NoV-RNA の検出系を最適化し、実際の食中毒事例に対応できるものとするを目的としている。

ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行った場合には、NoV 特異的な増幅が認められなかった。PCR と共通のプライマーを用いた場合は、NoV 遺伝子の増幅が認められたものの、ゲルから切り出したバンドをシーケンスすると、ノイズが多くて判読不能か、黄色ブドウ球菌の配列が検出された。逆転写反応専用プライマーを用いると、35 コピー/g の汚染レベルまで増幅バンドが認められ、塩基配列を確認したところ添加したウイルスと同一の配列であった。PCR の最適化のために 32 種類の耐熱性ポリメラーゼを比較検討したところ、パントラ法抽出物存在下では、ホットスタートが必須であること、マグネシウム濃度の最適化も必要であることが明らかになった。6 種類の逆転写酵素の比較検討では、37°C から 42°C での cDNA 合成は非特異反応に阻害され、十分な感度が得られなかった。55°C からは非特異反応が減少し、58°C では認められなくなった。このことから NoV-RNA に特異的な逆転写反応は 58°C で最適化された。本研究による PCR と逆転写反応の比較検討により、パントラ法で得られた RNA サンプルに対する RT-PCR の最適化条件を確定することができた。ここで得られた成績は、食品検体のノロウイルス検査にパントラ法を導入する際に有用と考えられた。

*1：福井県衛生環境研究センター

*2：国立感染症研究所

*3：堺市衛生研究所

*4：国立医薬品食品衛生研究所

タイ王国における食品の安全キャンペーン

と、食品中のウイルス検査法としてのパンソルビン・トラップ法の導入

齋藤博之 Ratigorn Guntapong^{*1}
武田直和^{*2}

第 23 回秋田応用生命科学研究会
2013 年 11 月，秋田市

我が国の感染症対策の一環として、海外からの持ち込みを防止する一方で、流行地においてより積極的な病原体封じ込めを目指す試みが続けられている。文部科学省は、2005～2009 年にかけて新興・再興感染症研究拠点形成プログラムを実施し、8 途上国に 13 研究拠点を開設した。2010 年より、感染症研究国際ネットワーク推進プログラム (J-GRID) がスタートし、各研究拠点が運用されている。タイにはそれらの拠点の一つである日本タイ感染症共同研究センターが置かれている。2012 年にタイ政府主導で食品の安全キャンペーンが開始され、その事業の一つには食品中のウイルスを検出する方法の導入が含まれている。タイ NIH より現地拠点センターを通して依頼があったことから、秋田県健康環境センターで開発されたパンソルビン・トラップ法について技術指導を行った。今回の講演会ではその導入事例について紹介する。

パンソルビン・トラップ法の技術指導の題材として、グリーンカレー・チャーハン・アイスクリーム・カキをノロウイルスで汚染させたものを用いた。題材に供したウイルス汚染食品からは、いずれもノロウイルスが検出できた。ここで用いた食品は濁質が多く、パンソルビン・トラップ法が最も効果を発揮するケースであると考えられた。また、逆転写反応専用プライマーは、技術指導直前に設計・検証されたものであったが、問題なく用いることができた。タイにおいては、ノロウイルスよりも危険度の高い A 型肝炎ウイルスによる食品汚染対策に重点が置かれているが、ガンマグロブリン製剤を用いた汎用パンソルビン・トラップ法が有効であることから、今後も貢献できるものと考えている。

^{*1}: タイ王国 NIH

^{*2}: 大阪大学・日本タイ感染症共同研究センター

秋田県雄物川流域におけるアカツツガムシ生息域調査

佐藤寛子 柴田ちひろ 齊藤志保子
門馬直太^{*1} 東海林章^{*2} 高橋 守^{*3}
藤田博己^{*4} 角坂照貴^{*5} 高田伸弘^{*6}
高野 愛^{*7} 川端寛樹^{*7} 安藤秀二^{*7}

第 22 回秋田応用生命科学研究会
2013 年 5 月，秋田市

2008 年、秋田県において 15 年ぶりにアカツツガムシ媒介性のつつが虫病患者が発生し、大仙市角間川地区の雄物川河川敷が感染推定地とされた。2009 年の調査でアカツツガムシの生息が感染推定地の他、角間川より 7 km 下流の全国花火大会会場でも確認されたが、翌 2010 年、角間川から 20 km 上流でも患者が発生した。このことを受け、我々は調査域を雄物川支流を含む上流域の約 70 km にまで広げ、アカツツガムシ・ハザードマップ作成を試みたので、その経過等について報告する。

調査地域の最上流部にあたる湯沢市郊外では、記録上は患者発生地とされていたが、アカツツガムシの生息は確認されず、そこから約 3 km 下流に至ってから確認された。さらに下流の横手市を流れる支流との合流点に近づくにつれ、多くのアカツツガムシが確認されるようになった。一方で調査範囲の最下流部に位置する大仙市郊外北部の記録上の患者発生地でもアカツツガムシの生息確認が出来なかったが、そこから 18 km の上流地点以南では確認されるようになり、雄物川流域における最も高密度な生息域は花火大会会場周辺にあることが推察された。また、アカツツガムシの生息環境は広い河川敷の中でも水際の砂地に、特に中州での生息数が多い傾向にあったが、河川沿いの公園や釣り場といった増水時に水没する箇所にも確認された。つつが虫予防の啓発のため、今後もアカツツガムシ生息状況のモニタリングや病原体保有の有無等の調査を継続し、地元自治体および保健所への情報提供が必要と考えられる。

^{*1}: 福島県衛生研究所

^{*2}: 青森県保健環境センター

^{*3}: 松山女子校・埼玉医大

*4: 大原総合病院附属大原研究所・馬原アカリ研究所

*5: 愛知医科大学

*6: 福井大学

*7: 国立感染症研究所

IP 法に使用する抗原の最適化に向けた検討, 確実な診断へ向けて

佐藤寛子 柴田ちひろ 斎藤博之
須藤恒久*1

第 21 回ダニと疾患のインターフェース
2013 年 6 月, 稚内市

つつが虫病の抗体検査診断において, 秋田県健康環境センターでは, これまで標準 3 株を抗原として使用してきた。しかし, このうち患者の感染型が Gilliam 型あるいは Karp 型である場合, 抗体価上昇あるいは感染型の確認ができるまで 10 病日以上を要することがあった。本県では Karp 型感染例が圧倒的に多いことから, 早期の感染型究明のため, 標準 3 株および国内分離株 4 種を抗原とした IP 法を実施し, その抗体価について比較検討した。

検討した 20 例中, 抗体上昇が認められたのは 6 例であった。これらの標準株を抗原とした抗体検査では, IgM 抗体価においては 1 例が Karp 型感染と判明したが, 5 例は Gilliam 株あるいは Kato 株に対する抗体価との有意差がなく, 感染型が不明であった。同じく IgG 抗体価では 6 例中 3 例が Karp 型と判定されたが 3 例は不明であった。一方, 国内分離株を抗原とした抗体検査では, IgM 抗体価においては 6 例中 6 例全てが JP-1 型あるいは JP-2 型感染と判明したが, 両者の抗体価に有意差はなかった。この現象は IgG 抗体価でも同様で, 6 例全例が JP-1 型あるいは JP-2 型感染と判定された。

また, これら Karp 型感染 6 例の JG に対する IgM および IgG 抗体価は, Gilliam のそれよりも有意に低く, 最大で 64 倍の差が認められた。JP-1 および JP-2 に対する IgM および IgG 抗体価は, Karp のそれよりも有意に高く, 最大で 16 倍の差が認められた。Gilliam, Karp 株の抗原性は, 国内の患者由来である JG 型株, JP-1 型株および JP-2 型株と異なることが指摘され

ていたが, 実際に複数の患者血清による抗体価の比較で差異が確認された。国内の患者由来株を利用した抗体検査は, より早期の抗体検出が期待できるため, 今後のルーチン検査においては, 国内の株を使用する事が望ましいと思われる。

*1: 秋田大学

患者およびマウスの血中 *Orientia tsutsugamushi* コピー数の定量

佐藤寛子 川森文彦*1 藤田博己*2
安藤匡子*3 門馬直太*4

第 6 回日本リケッチア臨床研究会・
第 20 回リケッチア研究会合同研究発表会
2014 年 1 月, 大津市

毒性の異なる 2 種の *Orientia tsutsugamushi* (Ot) 株について濃度を変え ICR マウスおよび ICR-Nude マウス 8 匹に各々接種し, 致死毒性の確認と共に血中 Ot コピー数を経時的に定量した。さらに, 秋田県で 2011 年~2013 年に発生したつつが虫病患者のうち, 急性期の血液が全血で凍結保存されていて Ot が検出された 26 例 (DIC 併発/治療前 8 例と DIC 併発/治療後 4 例ならびに DIC 非併発/治療前 14 例) についても定量し同様の比較を行った。

強毒性の kato 型 Kakuma-2 株の接種系における ICR-マウスの Ot 検出開始は, 接種後 1 日目~2 日目で, その後コピー数は増加し, 9 日目~10 日目にマウスが衰弱不動となり殺処分とした。この時点での血中 Ot コピー数 (/ml) は $1.0 \sim 1.1 E5$ であった。

一方, 弱毒性の Shimokoshi 型 Matsui 株の接種系での Ot 検出開始は, 接種後 2 日目~5 日目であったが, その後コピー数に顕著な増加がなく, $7.1 E3/ml$ を最高値とし 11 日目以降は不検出となり, マウスは 1 ヶ月間生存した。ICR-Nude マウスも同様に Kakuma-2 株と Matsui 株を接種したところ, 両群共に死亡したが, 死亡時の Ot コピー数は, ICR マウスに比較して Kakuma-2 株が約 10 倍, Matsui 株が 100~1000 倍であった。強毒性の Kakuma-2 株は, 弱毒性の Matsui 株よりも ICR マウス体内での増殖が急激であることから, 免疫応答が間に合わず, マウスは死

に至るものと推察した。

患者血液から検出された Ot のコピー数は、DIC 非併発/治療前例（平均病日 4.8 日）と DIC 併発/治療後例（同 5.5 日）では、それぞれ、 $2.5 \times 10^3 \sim 3.1 \times 10^4/\text{ml}$ 、 $2.0 \times 10^3 \sim 2.4 \times 10^4/\text{ml}$ であり、共に平均値は $1.1 \times 10^4/\text{ml}$ であった。一方、DIC 併発/治療前例（同 4.0 日）は $3.2 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^5/\text{ml}$ 、平均値 $2.3 \times 10^5/\text{ml}$ と DIC 併発/治療後および非併発/治療前例の約 20 倍であった。血清抗体価から 26 例は全て Karp 型感染例と判断されたが、このうち DIC 併発/治療前の 5/8 例、DIC 非併発の 3/14 例が JP-1 型感染であり、同じ血清型でも臨床経過と血中 Ot 定量値に差が認められた。26 例の基礎疾患や炎症マーカーの定量値等は未検討であるが、DIC 併発、非併発例の有効治療までの日数差はわずか 1 日であった。今回の検討で、重症化防止のためには、早期の有効治療により体内での Ot 増殖を早急に抑制することの必要性が血中コピー数の定量による数値から読み取れた。

*1：静岡県環境衛生科学研究所

*2：馬原アカリ医学研究所

*3：鹿児島大学共同獣医学部

*4：福島県衛生研究所

ウシ早期初乳のウイルス不活化効果に関する検討

柴田ちひろ 加藤真姫子*1 伊藤 隆*2

第 23 回秋田応用生命科学研究会

2013 年 11 月，秋田市

ウシの分娩直後の初乳には、様々な病原体に対する抗体や不活化成分が含まれているとの報告がある。そこで、間接接触感染により感染が広がるインフルエンザウイルスおよびエンテロウイルスに対するウシ早期初乳の不活化効果について検討した。

インフルエンザウイルスに対する HI 試験の結果、AH3 型についてはワクチン株由来抗血清に匹敵するような値を示す検体もあるほど良好な結果が得られた一方で、AH1pdm09 型と B 型については一部の検体で HI 価が確認されたものの、AH3 型と比較して劣る結果であった。検討条件としてウイルスの血球凝集能を揃えてい

たが、株により凝集能には差があることから、実際に含まれていたウイルス量は各型で異なっていた可能性がある。よって HI 価の差がそのまま有効性の差であるとはいえず、手指汚染で想定される少ないウイルス量に対しては十分に不活化効果が期待できるものと考えた。エンテロウイルスに対する中和試験では、マウスを用いた動物試験、HEAJ 細胞による細胞培養試験のいずれにおいても、それぞれ死亡率、細胞変性出現率の低下が確認され、エンテロウイルスに対する不活化効果が確認された。早期初乳を添加剤とすることで手指用衛生用品にウイルス不活化効果を付加できれば、簡便な感染症予防対策として活用できるだけではなく、膨大な資源の有効活用にも繋がる。今後も他のウイルスに対する効果など検討を重ねたい。

*1：畜産試験場

*2：中央家畜保健衛生所

1,4-ジオキサン分解能を有する活性汚泥の評価方法の検討

小林貴司 岡野邦宏*1 菅原 剛
宮田直幸*1

第 48 回水環境学会

2014 年 3 月，仙台市

難分解性である 1,4-ジオキサンは一般的な処理工程では処理が難しいとされていたが、県内の廃水処理施設において特異的に効率よく分解処理されていることがわかってきた。分解処理は生物処理工程の活性汚泥によるものであり、水温や流入水の変化による影響を受けやすい。そのため、活性汚泥の状態を把握し施設運用の指標とするために、活性汚泥が有する 1,4-ジオキサン分解能を評価する手法を検討した。評価は、活性汚泥試料 500 ml に対し、1,4-ジオキサン 1 mg 相当を添加し、好気条件下で攪拌、定期的に 1,4-ジオキサン濃度を測定し、減少速度から活性汚泥が持つ 1,4-ジオキサン分解能を評価した。試験条件としては、温度や 1,4-ジオキサン添加量が減少速度に大きく寄与していた。

*1：秋田県立大学

GC-MS/MS を用いた農作物中の残留農薬一斉分析法の検討

天明さおり 珍田尚俊 小林貴司

第 36 回農薬残留分析研究会
2013 年 10 月, 秋田市

秋田県では、県内流通食品の安全・安心を確保するために、農作物を中心とした食品中の残留農薬検査を行っている。

平成 18 年 5 月のポジティブリスト制度施行以降、当センターでは検査項目を拡充し、GC/MS から GC-MS/MS に切り替え、農薬約 300 成分の一斉分析法を実施してきた。

今回、さらに効率的で高精度な一斉分析法にするため、簡易迅速法である QuEChERS 法の採用を検討した。

QuEChERS 法は 1 回の抽出操作とバッチ精製により迅速化を図っている。しかし、農薬や食品の種類によっては、抽出及び精製不足が懸念された。そこで、抽出を 2 回繰り返す、複数の固相カラム (C18, SAX/PSA, GC/PSA) を用いて精製する方法に改良した。

改良した方法について、なす、ほうれんそう、きゅうり、トマト、玄米、りんごの添加回収試験を実施した (添加濃度: 50 ng/g, 各 n=3)。その結果、各食品において、8 割以上の成分で回収率 70~120%以内、併行精度 20%以下となり、概ね良好な結果が得られた。

QuEChERS 法の改良と GC-MS/MS 導入により、1 検体あたりの分析時間を従来の約 6 割程度まで短縮し、より高精度な分析が可能となった。

発色剤無添加食肉製品から検出された亜硝酸根について

小川千春 大友久利

平成 25 年度地方衛生研究所全国協議会
北海道・東北・新潟支部衛生化学研究部会総会
2013 年 10 月, 札幌市

平成 24 年度の食品収去検査において、発色剤

の原材料表示がない加熱食肉製品から亜硝酸根が 0.004 g/kg (使用基準: 0.070 g/kg 以下) 検出される事例があった。保健所では使用した食品添加物の表示義務違反を疑い、製造所へ立入検査を行ったが、発色剤の使用は確認できなかった。そこで、発色剤を添加していない加熱食肉製品から亜硝酸根が検出された原因を究明するための検討を行った。

まず、亜硝酸根がどの製造工程で混入したかを確認するため、製造工程ごとに食肉の亜硝酸根濃度の測定を行った。その結果、亜硝酸根は原材料及び漬け込み液に漬け込んだ後の食肉からは検出されず、出来上がった製品からのみ検出された。このため、亜硝酸根の混入は、漬け込み後の乾燥・燻製の工程で生じていると考えられた。

次に、食肉製品中の亜硝酸根濃度の分布を確認するため、製品の内側と外側の部位別に測定を行った。通常、発色剤は調味液などと混合して食肉の内部に注入するため、製品の内側のほうが外側よりも亜硝酸根濃度が高くなる。しかし、亜硝酸根は、製品の内側からは検出されず、外表面からのみ検出されたため、外部から食肉表面に付着したものであることがわかった。

以上から、本事例で検出された亜硝酸根は発色剤として添加したものではなく、乾燥・燻製の工程で、燃料及び空気中の窒素の酸化により発生した窒素酸化物が食肉表面に吸着・溶解して亜硝酸根となったものと考えられた。

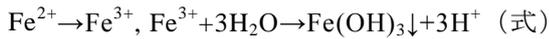
玉川酸性水に対する実証的中和の効果

成田修司 生魚利治 佐藤 健
大淵志伸 布田 潔^{*1} 宮田直幸^{*2}

第 48 回日本水環境学会
2014 年 3 月, 仙台市

秋田県仙北市に位置する玉川源泉の大噴は世界的にも珍しい硫酸-塩酸、鉄 (Fe) (II) を主成分とし、pH 約 1.2 の強酸性水 9,000 L/min を湧出している (図)。平成 3 年から現在の玉川中和処理施設が運転を開始することにより、源泉下流域及び田沢湖の pH が改善されてきたが、平成 14 年頃からの玉川源泉の酸度上昇に伴い、

pH が低下してきた。当センターではこの pH 低下が源泉由来の湯川を流下する未処理の強酸成分と源泉に含まれる鉄成分等の加水分解に伴う H⁺の発生(式)によることを報告してきた(1,2)。この pH 低下を改善するためには、上記二つの未処理酸性成分の処理が必要と考えられる。そこで以下の中和実証試験を行い、下流域にもたらされた中和効果について報告する。



中和実証試験は、平成 25 年 10 月に実施した。湯川から流入する源泉由来の未処理強酸成分(pH 約 2, 流量 20,000 L/min)を中和するために、地点①(図 1)において酸化カルシウム(CaO)を用い pH (7±1)にコントロールし、その pH 変化を図に示す。

湯川から流入する源泉由来の未処理強酸成分を中和処理することによって、すべての地点で pH が改善していた(図)。また、同試験における流域の総酸度は(表)、すべての地点で減少が観測された。特に、地点②では試験前 355 mg/L であった総酸度が試験中は 256 mg/L に減少し、地点③における試験前の濃度(262 mg/L)と近い値を示した。これらの結果は、源泉由来の鉄等の加水分解反応(式)を通常よりも上流側で促進させ、同反応域を上流にシフトさせることによって、玉川源泉下流域の pH 改善と総酸度

の低下が促進されたことを意味する。

*1: 秋田大学大学院工学資源学研究所

*2: 秋田県立大学生物資源学部

参考文献

- 1) 成田ら(2011), 第 45 回日本水環境学会年会講演集, 20.
- 2) 成田ら(2012), 第 46 回日本水環境学会年会講演集, 531.

表 中和実証試験における総酸度の減少挙動

地点	総酸度 (mg/L)				
	①	②	③	④	⑤
試験前	210	355	262	155	74.9
試験後	3.0	256	231	134	67.0

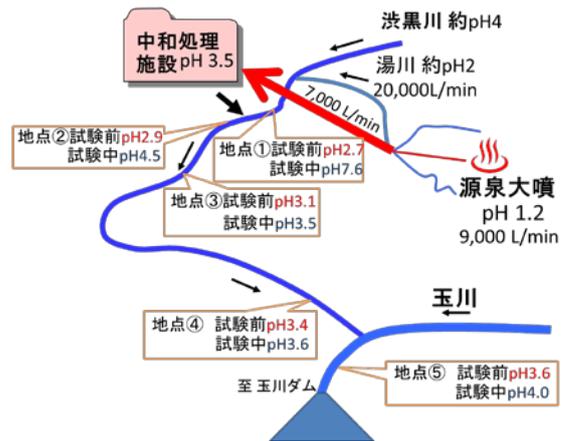


図 玉川水系の概要と中和試験による pH 改善

2. 他誌掲載論文

秋田県における莢膜型 *Haemophilus influenzae* の分離状況

今野貴之 高橋志保 熊谷優子
 樫尾拓子 和田恵理子
 八柳 潤 齊藤志保子

Infectious Agents Surveillance Report, **34**,7, 2013, 192-193.

平成 20 年～24 年の 5 年間に秋田県内の医療機関から当センターに送付された *H. influenzae* 666 株の莢膜型を調査した。

capsular export gene *bexA* (+) により莢膜型と判定されたのは計 43 株であり、内訳は b 型 19 株, e 型 16 株, f 型 7 株, 型別不能 1 株であった。型別不能であった 1 株は, *bexA* の相同性解析により b 型と考えられた。

次に, PCR により β -lactamase (*bla*) 遺伝子ならびに penicillin binding protein 3 (PBP3) をコードする遺伝子 (*ftsI*) の変異を解析し, β -lactamase 遺伝子型別 (*bla*TEM, *bla*ROB) 及び β -lactamase-non-producing ampicillin-resistance (BLNAR) group I, II, III に対応する *ftsI* の型別を実施した。健康環境センターへは薬剤耐性菌を疑う菌株が送付されてくることが多いため, 結果は必ずしも莢膜型 *H. influenzae* の耐性化率を示すものではないが, 確認された多くの莢膜型 *H. influenzae* が BLNAR であり, また小児科領域の眼脂由来の b 型 1 株からは *bla*TEM も検出された。

稀な血清型 Agbeni が同定された 3 件のサルモネラ感染事例の解析

今野貴之 高橋志保 熊谷優子
 樫尾拓子 和田恵理子
 八柳 潤 齊藤志保子

Infectious Agents Surveillance Report, **35**, 3, 2014, 80-81.

稀なサルモネラ血清型 Agbeni の感染事例を 3 件確認した

分離された 3 株は市販の抗血清を用いた血清型別で O13 群, H1 抗原が g,m, H2 抗原は検出されなかった。血清型を特定するため, O13 群の副抗原 (O22, O23) の検出と, PCR 法によるサルモネラ属菌及び亜種 I の確認と各抗原遺伝子の確認を行い, 血清型 Agbeni (1, 13, 23: g, m, [t]: -) と同定した。

また, Kirby-Bauer 法による感受性試験を行ったところ, 3 株はいずれも供試したアンピシリン, ホスホマイシン, ノルフロキサシン, ゲンタマイシン, テトラサイクリン, クロラムフェニコールの 6 剤にはすべて感受性であった。

PFGE により菌の DNA パターンを比較したところ, *NotI* ではいずれも同一, *XbaI* では 1 株がバンド 1 本異なるのみで, 事例間の関連性が疑われた。医療機関からの情報によると, 初発の患者は直近にミドリガメを飼育し始めたこととあり, 感染源としてはこのミドリガメが強く疑われた。

血清型の同定は感染症の発生動向を知る上で非常に重要である。しかしながら, サルモネラの血清型は複雑で, 複数回の培養が必要なため時間を要する。今回 PCR 法による型別を行ったところ, 従来の血清型別法と一致した結果が得られた。PCR 法は, 複数の抗原遺伝子を同時に検出できるため, 迅速に血清型を推定することが可能と思われる。また, 今回の事例のように稀な血清型が同定された場合は, 従来の血清型別法と組み合わせることでより正確な血清型の同定に役立つと考えられた。

Determination of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Serotype O165:HNM Infection in A Hemolytic Uremic Syndrome Patient with Adenovirus Serotype 41

Takayuki Konno, Jun Yatsuyanagi, Shiho Takahashi, Yuko Kumagai, Eriko Wada, Machiko Chiba, Shioko Saito

Jpn. J. Infect. Dis., **66**, 5, 2013, 394-397.

A 4-year-old girl who was positive for adenovirus according to a rapid immunochromatographic test conducted at a hospital, progressed to hemorrhagic diarrhea and hemolytic uremic syndrome (HUS). The presence of adenovirus serotype 41 (AdV-41) was confirmed by TaqMan real-time PCR and sequence analysis. However, most enteric viral infections cause mild to moderate diarrhea. In the present case, enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O165:HNM was isolated concomitantly with AdV-41. In addition, O165 antibody was specifically detected in patient sera. The EHEC isolate was positive for the virulence genes *stx1*, *stx2a*, *eae* type ϵ , *ehxA*, and *norV*. Therefore, we concluded that EHEC O165:HNM was the precise pathogen leading to HUS in this patient.

玉川酸性水中和処理におけるシュベルトマナイト様化合物の形成によるヒ素及びクロムの取り込み

佐々木純恵 成田修司 菊池由紀恵*¹
布田 潔*¹

水環境学会誌, 36, 5, 2013, 137-141.

玉川中和処理施設を含む玉川上流域の詳細な調査を行い、茶褐色の堆積物を本処理施設放流口で発見した。その堆積物が関与する源泉中のヒ素 (As) 及びクロム (Cr) の濃度低下の現象について検討した。この堆積物は、粉末 X 線回折 (XRD), 赤外線吸収スペクトル (FT-IR) 分析によりシュベルトマナイト (Sch) 様化合物であることが明らかとなった。源泉に含まれる鉄 (Fe) $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, As $2.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Cr $0.093 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ の濃度は、中和処理放流水で Fe $55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, As $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Cr $0.025 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ に減少した。また、本処理施設放流口の堆積物中には Fe 39 wt.%, As 1.7 wt.%, Cr 0.020 wt.% が含有していた。以上の結果から、中和処理過程において Sch 様化合物の形成に伴い源泉中の As 及び Cr が取り込まれ、同化合物中に蓄積していることが強く示唆された。

*¹: 秋田大学大学院工学資源学研究科

秋田県健康環境センター年報
第9号 2013

発行日 平成26年12月

発行所 秋田県健康環境センター

〒010-0874 秋田市千秋久保田町6番6号

TEL: 018-832-5005

FAX: 018-832-5938

