

第4回
秋田県健康環境センター研究発表会
要 旨 集

日 時 平成21年8月28日（金） 13：00～16：00
場 所 秋田県総合保健センター2階 第1研修室

秋 田 県 健 康 環 境 セ ン タ ー

第4回秋田県健康環境センター研究発表会プログラム

開催日時 平成21年8月28日(金) 13:00~16:00
開催場所 秋田県総合保健センター2階 第1研修室

[13:00~13:10] 開 会
所長あいさつ

研究発表

[13:10~14:10] I 新規・話題のテーマ関連(4題)

- 1 玉川温泉下流域におけるpH低下の要因について ----- 1
- 2 秋田県における新型インフルエンザ・サーベイランス対応について ----- 3
- 3 LAMP法による百日咳迅速診断の実施状況と検査結果の概要----- 5
- 4 タミフル耐性インフルエンザウイルスの検出状況と簡便な検査法の開発 ----- 7

[14:10~14:20] 休 憩

[14:20~15:05] II 重点・継続テーマ関連ー保健衛生部ー(3題)

- 5 腸管出血性大腸菌の新たな分子疫学的解析法ーMLVA法の有用性についてー ----- 9
- 6 と畜場における豚のサルモネラ保菌状況と分離菌株の血清型, 薬剤感受性 -----11
- 7 平成20年度日本脳炎感染源調査結果について -----13

[15:05~15:15] 休 憩

[15:15~16:00] II 重点・継続テーマ関連ー環境・理化学部ー(3題)

- 8 農薬残留対策総合調査について -----15
- 9 八郎湖高濃度リン湧出水の年間変動と湧出量 -----17
- 10 生態系操作の本県の湖への適用可能性 -----19

[16:00] 閉 会

玉川源泉の成分変化が田沢湖のpHに及ぼす影響（平成20～21年度）

1 玉川温泉下流域におけるpH低下の要因について

○佐々木典子 和田佳久 成田修司 八柳 潤 布田潔^{*1} 大下哲生^{*1}
佐久間昂^{*1} ^{*1}秋田大学工学資源学部

【はじめに】

玉川源泉の大噴から湧出する pH 約 1.2 の強酸性水は、長い間下流域の土壌や河川に多大な影響を与え、その酸性水が導入された田沢湖では一時期、pH が 4 台にまで低下した。この酸性水対策として、平成元年には石灰中和処理施設が運転を開始し、源泉の大部分を pH 約 3.5 まで処理した後、河川に放流することにより田沢湖の pH 改善が進んできた。しかし、平成 14 年ごろから源泉の総酸度が急激に上昇したのに伴い、下流の田沢湖において pH 低下が観測されるようになった。また、これとほぼ同時期に、中和処理施設下流域で放流水よりも低い pH が観測されるとともに、河床に赤褐色沈殿がみられるようになった。この赤褐色沈殿は、総酸度を構成する Fe^{2+} などの潜在的酸性成分の増加に伴い、流域における鉄の酸化による水酸化物の形成が目に見える形で現れたものであると推測される。しかしながら、玉川源泉下流域のような酸性環境下では、 Fe^{2+} の無機的な酸化反応は非常に遅いことが知られているが、この反応速度は鉄酸化細菌の介在により、著しく増大することが報告されている。そこで本研究では、この流域において、潜在的酸性成分である Fe^{2+} の酸化に伴う pH 低下とその反応に関与すると考えられる鉄酸化細菌の生息状況を調査するとともに、酸性水の実態を把握することを目的とした。

【調査方法】

平成 20 年 5 月に、図 2 に示す中和処理施設上流域の地点 A～C、中和処理施設下流域の地点 D～F 及び中和処理施設からの放流水（地点 G）の計 7 地点で調査を実施した。各地点で試料水を採取するとともに、pH、全 Fe（T-Fe）及び Fe^{2+} 濃度を測定し、T-Fe と Fe^{2+} との差から Fe^{3+} 濃度を算出した。採取した試料水を 9K 培地¹⁾を用いて 30℃で 20 日間培養した後、MPN 法により鉄酸化細菌数を算出した。

【結果及び考察】

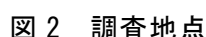
中和処理施設上流の地点 A、B、C の pH はそれぞれ 4.2、2.6、3.1 であり、地点 B の源泉の混入する湯川の酸性が強いことが確認された。一方、中和処理施設放流水が混合した地点 D、E の pH は 3.1、3.2 であり、中和処理放流水の pH 3.4 よりも低い値であった。源泉の混入する地点 B、C において、鉄の濃度とその形態について調べた結果（表 1）、T-Fe の約 1/4 が Fe^{3+} の形態で存在しており、地点 C の T-Fe 濃度は地点 B の濃度と比較して約 1/3 以下に減少していた。この地点 B、C の pH 及び ORP 値では、平衡論的には非常に遅いはずの Fe^{2+} の酸化が、鉄のほぼ全量が Fe^{2+} である源泉から、わずか数百メートル流下する間に進行していた。一方、源泉が直接導入される中和処理施設放流水（地点 G）では、T-Fe の約 90% が Fe^{2+} であったが、その下流の地点 D～F では、T-Fe 濃度の減少とともに Fe^{2+} から Fe^{3+} への酸化が進行し、 $\text{Fe}^{3+}/\text{T-Fe}$ は 0.21～0.48 に増大していた。

各調査地点における鉄酸化細菌数の結果を表 1 に示した。中和処理施設上流域の地点 A、B、C の菌数はそれぞれ 33、350、350 MPN/100mL であり、上記 B、C の低い pH において酸化が進行していた地点では特に多く生息していた。中和処理施設下流域の地点 D、E、F ではそれぞれ 23、<2、33 MPN/100mL であり、中和処理放流水である地点 G の菌数は 23 MPN/100mL であった。これらのことから、鉄酸化細菌は玉川源泉下流域のほぼ全域に生息していることが確認された。

$$\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} \quad , \quad \text{Fe}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3 \downarrow + 3\text{H}^+ \quad (\text{式 1})$$

また、地点 D～F における Fe^{2+} の変化は、鉄酸化細菌の介在による酸化の促進と、各地点における pH 及び ORP 環境下で Fe^{2+} の無機酸的酸化が緩やかに進行したためであると推測される。

玉川源泉下流域の上記調査地点において、pH の低い酸性水が湯川から流入してくること、また、それぞれの pH において Fe の形態と鉄酸化細菌の生息状況が明らかとなった。これらの結果から、玉川源泉下流域の pH 低下には、Fe²⁺と鉄酸化細菌及び湯川河川水の 3 つの要因の関与が考えられるため、今後、これらの対策に向けた検討を行う予定である。



調査地点		pH	T-Fe [mg/L]	Fe ²⁺ [mg/L]	Fe ³⁺ [mg/L]	Fe ³⁺ /T-Fe	ORP E _h [mV]	菌数 [MPN/100mL]
中和処理施設上流域	A	4.2	0.5	0.3	0.2	0.40	656	33
	B	2.6	6.8	5.2	1.6	0.24	681	350
	C	3.1	2.1	1.6	0.5	0.24	684	350
中和処理施設下流域	D	3.1	17	14	3.5	0.21	650	23
	E	3.2	11	6.4	4.1	0.39	683	<2
	F	3.5	6.0	3.1	2.9	0.48	683	33
中和処理放流水	G	3.4	82	72	10.5	0.13	614	23

- 2 -

新型インフルエンザ対策事業（平成20年度）

2 秋田県における新型インフルエンザ・サーベイランス対応について

○村山力則 佐藤美子 原田誠三郎 高階光榮

【はじめに】

サーベイランスとは、疾病の発生状況やその推移などを継続的に監視することにより、疾病対策の企画、実施、評価に必要なデータを系統的に収集、分析、解釈するものである。また、その結果を関係者に定期的、および緊急の際は迅速に還元することにより、効果的な対策に結びつけるものである。

新型インフルエンザに関して秋田県は、今年2月に公表された国の行動計画およびガイドラインに準じて、3月に「秋田県新型インフルエンザ対策行動計画」を改訂し、「秋田県新型インフルエンザ対策マニュアル」を策定中であった。このような中で今年4月には、ブタインフルエンザウイルスが患者から分離され、そのウイルスが新型インフルエンザウイルスとして世界で初めて確認された。

以後、世界中に新型インフルエンザ患者は広まり、5月8日にはアメリカから帰国した日本人が検疫で新型インフルエンザと診断され、約1か月後の6月11日には秋田県でも初の新型インフルエンザ患者が確認された。そこで今回は、7月下旬までの新型インフルエンザ発生時におけるサーベイランス対応（全数把握）と、今後秋以降のインフルエンザシーズンへ向けての新型インフルエンザサーベイランス対応について報告する。

【経過および対応】

1. 新型インフルエンザ発生前

秋田県新型インフルエンザ対策マニュアル策定の際に我々は、その中でワーキンググループのサーベイランス部門を担当し、本県の行動計画に基づいたサーベイランスマニュアルを作成した（図1）。

2. 海外発生期・県外発生期

WHO, CDC, 厚生労働省などのホームページから情報を収集し、秋田県感染症情報センターのホームページおよび感染症発生動向調査・週報などで注意喚起を行い、県内保健所の感染症担当者には患者が発生した場合のシステム入力方法を記したマニュアルを送付した。

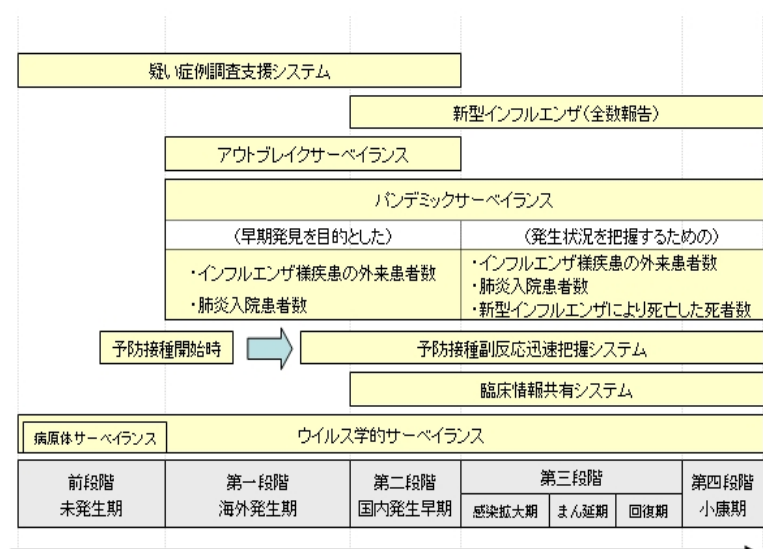


図1 新型インフルエンザ発生段階に応じた各種サーベイランス一覧

3. 県内新型インフルエンザ患者発生後

県内で発生した患者情報を、感染症発生動向調査支援システム（NESID）の「疑い症例調査支援システム」および「病原体サーベイランスシステム」に入力をおこない、国・県・保健所などの関係機関と情報共有するとともに、ホームページ等で県民・医療機関に対して情報提供・注意喚起を行った。

4. 現在および今後の対応

平成21年7月24日、厚生労働省は新型インフルエンザの全数把握を中止した。一方、医師による届出については「放置すると大規模な流行につながる可能性のある集団発生を重点的に把握する方針」が示された。これらを含めた今後の新たなサーベイランスでは、拡大感染早期探知のためのサーベイランス「(1)クラスター（集団発生）サーベイランス (2)インフルエンザ様疾患発生報告」、重症化およびウイルスの性状変化の監視のためのサーベイランス「(3)ウイルスサーベイランス (4)インフルエンザ入院サーベイランス」、および全体的な発生動向調査の把握のためのサーベイランス「(5)インフルエンザサーベイランス」とした（表1）。また入力システムとして従来から稼働しているNESIDに加え、新型インフルエンザ暫定サーベイランスシステム(i-NESID)を立ち上げ稼働した。そして8月10日には、秋田県においても厚生労働省の通達を受け新型インフルエンザの全数把握を中止し、新たなサーベイランス体制に移行することになった。

表1 新型インフルエンザにおける今後のサーベイランス体制について

サーベイランス名称	(1)クラスターサーベイランス	(2)インフルエンザ様患者発生報告	(3)ウイルスサーベイランス	(4)インフルエンザ入院サーベイランス	(5)インフルエンザサーベイランス
情報収集内容	集団において7日以内に2人以上の新型インフルエンザが発生	学校等におけるインフルエンザ様症状の患者発生による臨時休業・欠席者把握	新型インフルエンザウイルスの抗薬剤耐性・病原性	入院患者の数や臨床情報を把握し、重症者の発生動向や病原性	インフルエンザ定点医療機関におけるインフルエンザ患者数
届出機関	医師・学校・社会福祉施設等	学校等	病原体定点医療機関	全ての医療機関	インフルエンザ定点医療機関
入力機関	秋田県 (代行:健康環境センター)	健康環境センター	秋田県 (代行:健康環境センター)	秋田県 (代行:健康環境センター)	保健所
実施期間	相当程度拡大するまでの間	来春以降 小康状態になるまで (予定)	通年	通年	通年
使用システム	i-NESID	NESID	i-NESID NESID	i-NESID	NESID

【考察】

国・都道府県においてはこれまで、新型インフルエンザが発生した場合に備え、行動計画やマニュアル等を作成するとともに、サーベイランス対応についても非常事態に備え体制を構築してきた。しかし今回の新型インフルエンザ患者の発生時には、感染研のシステムの不備または認識の違いなどから関係機関の連携がうまく取れず、これまで構築してきたサーベイランス体制の一部が十分に機能しない点がみられたが、患者発生状況下で手探りをしながらサーベイランスの体制を整え対応を行った。

【まとめ】

今後は、これまで一部が十分に機能しなかった点などを踏まえ、秋以降予想される季節性インフルエンザおよび新型インフルエンザの発生対応のためにむけて関係機関が密に連絡をとりながら監視体制を強化し、県民への迅速な情報提供を行っていくことが重要であると考えられる。

3 LAMP 法による百日咳迅速診断の実施状況と検査結果の概要

○八柳 潤 齊藤志保子 今野貴之

【はじめに】

百日咳は、特有のけいれん性の咳発作を特徴とする急性気道感染症である。DPT 三種混合ワクチン接種の普及とともに百日咳の患者数は激減したが、近年、ワクチン効果が低下した青年・成人が百日咳に罹患することが明らかとなり、新たな対策の必要性が指摘されている。菌分離による病原診断が困難なため、医療機関では主に血清診断が行われているが、ワクチン接種者ではペア血清による診断が必要となり、診断に時間を要する。とりわけ、成人患者では症状が非定型であることに加えて保菌量が少ないため、診断は困難を極める。百日咳の診断に伴うこれらの問題を克服するため、近年、遺伝子診断法の一つである LAMP 法の応用が試みられてきている。LAMP 法は PCR 法と比較して特殊な機材を必要とせず、迅速、高感度であり特異性も高い。感染研の蒲地らは、百日咳の遺伝子診断に LAMP 法を応用し、カンボジアにおいてその有用性を実証した（J. Clin. Microbiol. Vol. 44, p. 1899, 2006）。当センターは地研協議会百日咳・ジフテリア・ボツリヌスレファレンスセンターを担当しており、百日咳 LAMP 法の試薬が配布されている。2008 年は、調査が始まって以来、最も大きな百日咳患者発生ピークが見られ、秋田県内でも患者発生が顕著に増加した。このことから、県内の百日咳対策に資するために、2008 年 8 月に県内の全医療機関を対象として、LAMP 法による百日咳検査を実施する体制を確立したので、検査体制と検査結果の概要などについて報告する。

【方法】

1. LAMP 法用検体採取・検査依頼方法

鼻咽頭分泌物をコレクトスワブで採取した後、その綿棒を小試験管入り滅菌カザミノ酸培地に投入し、当センターに当日中に到着可能な場合は冷蔵、翌日以降に到着する場合は冷凍して搬送した。コレクトスワブと滅菌カザミノ酸培地は当センターで用意し、LAMP 法百日咳検査依頼伝票と検体採取方法を記載した資料とともに希望のあった医療機関に送付することとした。なお、要望のあった保健所では、これらを常備した。

2. LAMP 法と検査結果の解析

LAMP 法は感染研が示したプロトコールに従い実施した。結果判明までの時間は、検体到着後約 1 時間 30 分であった。2008 年 12 月 29 日までに LAMP 法で陽性となった 11 検体、血清診断で陽性となった 13 検体、両法で陽性となった 2 検体についてワクチン接種歴、マクロライド系抗生物質投薬歴、検体採取時の病日、臨床所見などについて比較することにより、検査精度の向上に関わる要因について検討した。

3. 百日咳菌以外の呼吸器系病原微生物の関与

百日咳が否定された患者の症状に、百日咳菌以外の呼吸器系病原微生物が関与しているかどうか検討した。対象とした病原微生物は *Mycoplasma pneumoniae* (J. Clin. Microbiol. 2007 **45** p.2726), PIV type 1,2,3 (J. Clin. Microbiol. 2006 **44** p.2382), RSV type A,B (J. Clin. Virol. 2004 **31** p.123), hMPV subtype A,B (J. Clin. Virol. 2005 **33** p.299) とし、検索はリアルタイム PCR 法により実施した。

【結果・考察】

1. LAMP 法による検査体制の確立

平成 20 年 8 月 12 日付けで社団法人秋田県医師会会長，社団法人秋田県病院協会会長，各病院長，各保健所長宛て秋田県健康福祉部長発健 1515 号，「健康環境センターの行う LAMP 法による百日咳菌検査の利用について（通知）」が発出され，県内全医療機関からの LAMP 法による百日咳検査依頼に対応する体制が確立した。

2. LAMP 法による検査の結果と検査結果の解析

2008 年 8 月 22 日から 2009 年 5 月 8 日の間に 113 検体が送付され，17 検体が LAMP 法で百日咳菌陽性となり，陽性者には 10 歳と 15 歳，26 歳の患者も含まれていた。12 月 29 日までの陽性検体の解析では，LAMP 法陽性者の 53.8%，血清診断陽性者の 80.8%がワクチン既接種者であった。また，マクロライド系抗生物質の投与を受けた患者は，LAMP 法陽性者では 11 名中 1 名であったのに対して，血清診断陽性者では 13 名中 7 名であった。また，検体採取時の病日は，LAMP 法陽性者では 12.0 ± 4.4 日，血清診断陽性者では 19.5 ± 11.1 日であった。以上の結果は，LAMP 法では成人百日咳患者，及びワクチン既接種者の診断も可能であることを示していた。また，マクロライド系抗生物質の投与を受けた患者，また，発症後，日数が経過するにつれ，LAMP 法の陽性率が低下することを示唆していた。

表 百日咳陽性者の年齢，ワクチン接種歴，マクロライド投与歴と検体採取病日 (8/22-12/29)

	陽性数	患者年齢	ワクチン既接種	マクロライド 投与	検体採取（病日）
LAMP法	11	6.2（平均）	53.8%	1/11	12.0 ± 4.4 日
血清診断	13	11.0（平均）	80.8%	7/13	19.5 ± 11.1 日
両法陽性	2	4M, 10Y	両者+（100%）	なし	10日，14日

3. 百日咳菌以外の呼吸器系病原微生物の関与

供試した 71 検体中 1 検体が *M.pneumoniae* 陽性，20 検体中 1 検体が PIV，3 検体が RSV 陽性であった。*M.pneumoniae* については，血清診断でさらに 3 名が陽性と判定された。

【まとめ】

今回，検討し得た症例は必ずしも多くはなかったが，LAMP 法では成人患者，ワクチン既接種者も病原診断が可能であることが示され，また，検体はマクロライド投与前，発症後の可能な範囲で早い時期に採取することが検査精度の向上に重要であることも示唆された。加えて，百日咳の診断には *M.pneumoniae* などとの鑑別も重要であることが示され，適切な病原診断実施の重要性が改めて示された。今後，より多くの医療機関が LAMP 法による百日咳の診断を活用可能とするためにも，今回得られた知見について，検査依頼方法の詳細と併せて，県内医療機関等への一層の周知を図る必要がある。一方，ワクチン既接種者にも百日咳陽性者が認められたことは，現行の百日咳ワクチンの有効性，有効期間などについての再検討を促す重要な知見と考えられた。

感染症発生動向調査事業（平成20年度）

4 タミフル耐性インフルエンザウイルスの検出状況と簡便な検査法の開発

○斎藤博之 佐藤寛子 柴田ちひろ 安部真理子

【背景と目的】

昨年来、インフルエンザウイルスAソ連型のタミフル耐性の問題が浮上してきた。2007/2008年シーズンにおける我が国のタミフル耐性ウイルスの発生頻度が2.6%（1734株中45株）であったのに対し、2008/2009年シーズンでは99.6%（1239株中1234株）が耐性株であったことが国立感染症研究所の全国調査で判明している。こうした調査の一環として、各都道府県で検出されたAソ連型ウイルスのタミフル耐性の有無を調査するように1月末日付けで通知があり、当センターは鑑別のための分析を行った。また、これを機に簡便な手順で耐性を鑑別できる方法の開発を行ったので報告する。

【方法】

11月から3月までに県内の医療機関から回収された咽頭拭い液等73検体についてRT-PCR法、または、MDCK細胞による培養によってインフルエンザウイルスの検出を試みた。この内、Aソ連型について、タミフル耐性を引き起こす遺伝子変異（ウイルスの構成蛋白の1つであるノイラミニダーゼの275番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに変異）を確認するために、該当部分の塩基配列を決定した。このアミノ酸配列の変異を塩基配列の変異に置き換えると、823番塩基がタミフル有効型では“C”，耐性型では“T”となる。また、将来的に同種の調査を簡便に行うことができるように、遺伝子上の1塩基の違いを鑑別できる方法としてEnhanced LCR法の開発を行った。検査試薬として、鑑別対象となる塩基の両側の配列にそれぞれ結合するようにデザインされた、50bpのDNA断片（プローブ）を合成した。本法はウイルスの遺伝子とこれらのプローブを混合し、DNA Ligase（DNA結合酵素）を作用させることで長さが2倍の結合プローブが生じることを基本原理とする。このDNA結合反応は、合成DNAの末端塩基が実際のウイルス遺伝子の鑑別対象塩基と同一であった場合にのみ起こる。検査精度を高めるため、末端が“C”のプローブを用いた検出系（タミフル有効型にのみ反応）と“T”のプローブを用いた検出系（タミフル耐性型にのみ反応）の2種類を調製し、ウイルス遺伝子がどちらに反応するかを検討した。

【結果】

上記の73検体を検査したところ、40検体からインフルエンザウイルスAソ連型、17検体から同A香港型、8検体から同B型を検出した。Aソ連型のノイラミニダーゼ遺伝子について塩基配列を確認したところ、40検体全てにおいて823番目の塩基が“T”となっており、タミフル耐性型であると判定された。また、このような1塩基を対象とした鑑別作業を簡便に行うために開発したEnhanced LCR法の結果は図2のとおりである。こ

こでは、塩基配列を直接決定することによりタミフル有効と判定された2株（2007年の分離株）と耐性と判定された10株について示した。それぞれ、対応する検出系でのみ結合プロー

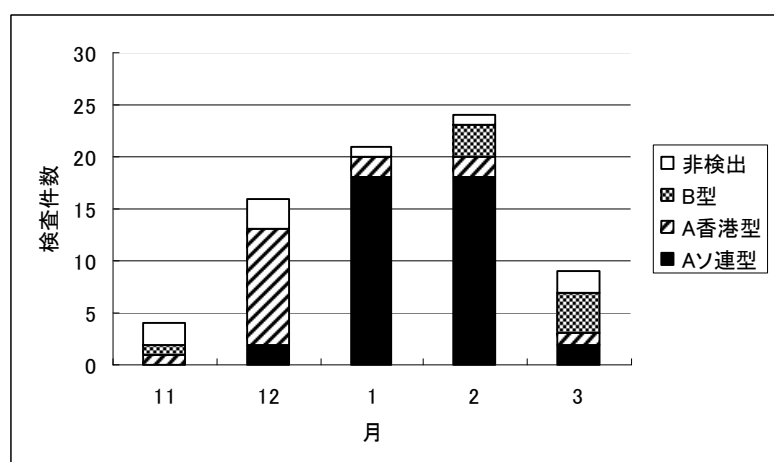


図1 2008/2009年シーズンのインフルエンザウイルス検出状況

ブのバンドが見て取れる。同様にして他の A ソ連型インフルエンザウイルスについても鑑別を行ったところ、今シーズンのものは全てタミフル耐性型検出系でのみ結合プローブが観察され、塩基配列を直接決定した結果と一致した。

【考察】

今シーズン中に検出されたインフルエンザウイルス A ソ連型が全てタミフル耐性型であったことは今後の新型インフルエンザへの対応を考えた場合に重要な意味を持つと考えられる。現在流行している新型インフルエンザはタミフル有効型であることがわかっているが、デンマーク、香港に加えて我が国でも大阪、山口、徳島で耐性ウイルスが見つっている。さらに、インフルエンザウイルスの特徴の1つとして他のウイルスと容易に交雑体（遺伝子が混ざったもの）をつくるため、A ソ連型との同時流行の途中で耐性を獲得する可能性がある。そのような局面では、検出されたウイルスが耐性であるかどうかを鑑別する必要があるが、1塩基の違いを調べるのに配列を直接決定する方法は手間と費用がかかりすぎるのが実情である。そこで、簡便な手法として Enhanced LCR法を用いることで円滑な検査体制を整えることができる。また、本法はインフルエンザに限らずどのような病原体に対してもデザインできるため、1塩基の違いが問題となるようなケースに幅広く用いることができると考えられた。

【まとめ】

1. 今シーズンに本県で検出されたインフルエンザウイルス A ソ連型は、全てタミフル耐性であった。
2. 新規開発の Enhanced LCR法により、簡便にタミフル耐性を鑑別できるようになった。
3. Enhanced LCR法は、1塩基の違いが問題となるようなケースならば、他の病原体にも適用できる。

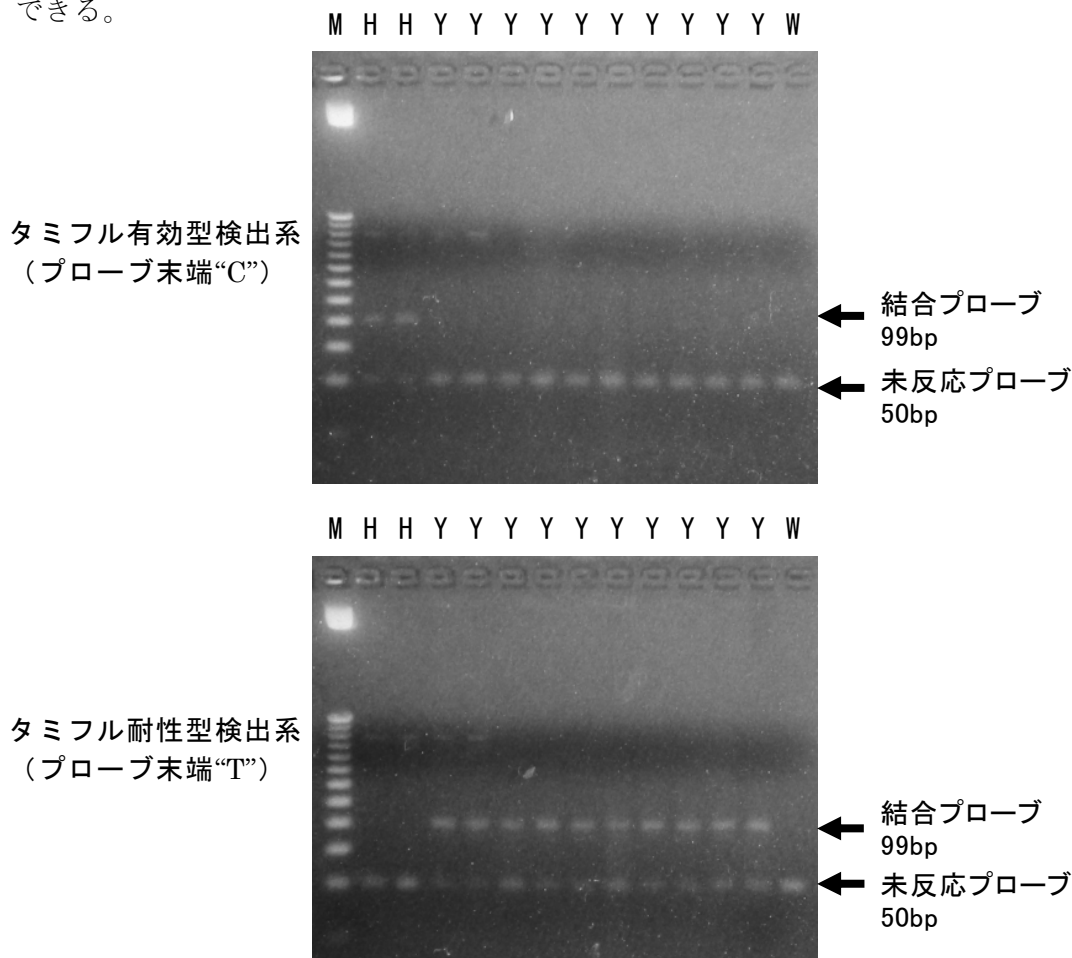


図 2 Enhanced LCR 法によるタミフル耐性の鑑別 (5%アガロースゲル電気泳動)

M: 25bp marker, H: タミフル有効株, Y: タミフル耐性株, W: 蒸留水

MLVA法を用いた腸管出血性大腸菌の迅速な分子疫学的解析に関する調査研究
(平成19～20年度)

5 腸管出血性大腸菌の新たな分子疫学的解析法
ーMLVA法の有用性についてー

○今野貴之 八柳 潤 齊藤志保子

【はじめに】

腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *E. coli*:EHEC)における感染症対策には、その重篤性や感染源・感染経路解明の困難さから迅速な分離・同定とともに迅速な分子疫学的解析が求められている。現在、細菌の分子疫学的解析法として汎用されているパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE法)は、迅速性や画像の比較解析の精度管理に難点があり、他県にわたる広域的な集団感染の際には、迅速な対応や情報の共有化に支障を来すことも考えられた。そこで、当センターでは平成19年度から平成20年度にかけて、EHECの迅速な分子疫学的解析法としてMulti-Locus Variable Number Tandem-Repeat Analysis(MLVA法)に関する調査研究を実施した。本研究では散发感染事例や集団感染事例、食中毒事例といった様々な事例に由来した分離株を用いて、MLVA法による分子疫学的解析を行った。平成19年夏季に集中的に報告された散发感染事例の中には、同一の菌型による感染が疑われる事例があり、広域的集団感染の可能性が示唆された。また、集団感染によって同一の菌型が多数分離されている中において、全く異なる菌型を確認し、散发事例であることが示唆された。これらの事例の検討から、迅速かつ詳細な感染の流行形態の把握に、MLVA法が有用であることを確認したので、その概要を報告する。

【対象と方法】

1. 供試菌株

散发感染事例の検討のため、平成19年7月から9月上旬までに秋田県内で個別の事例から分離された18株を供試した。また、集団感染事例の検討として、平成18年5月に発生した「ふれあい動物イベント」に起因した集団感染事例由来株9株と平成20年6月に発生した集団食中毒事例に関連した26株を供試した。供試菌株はすべてPCR法等によりEHEC O157:H7 VT-1, 2(+)であることを確認した。

2. PFGE法

PFGE法は、細菌の染色体DNAの制限酵素処理断片をアガロースのゲル中で断片(バンド)の大きさによって分け、多型性解析する手法である。今回は、制限酵素処理に*Xba*Iを使用し、画像解析ソフトFingerprinting II(Bio-Rad)を用いて、DNAパターンを分類した。

3. MLVA法

MLVA法は、細菌の染色体DNAもしくはプラスミドDNA上に存在し、高率に変化するDNAの繰り返し配列の数を比較することで細菌を識別する手法である。今回は、Noller *et al.* (2003, 2006) および Lindstedt *et al.* (2003)の方法を一部改変して行った。繰り返し配列は、O157:H7の染色体上に存在する7箇所(VNTR3, VNTR9, VNTR10, VNTR17, VNTR19, VNTR25, VNTR34)とプラスミド上に存在する1箇所(VNTR36)を対象として、DNA配列を解析した。DNA配列から各部分の繰り返し数を算定し、Locus1からLocus8までVNTR9-VNTR10-VNTR17-VNTR25-VNTR3-VNTR34-VNTR19-VNTR36の順に表記し、分離株のMLVA Profileとした。

【結果と考察】

1. 平成18年集団感染事例由来株の分子疫学的解析

MLVA法による解析を行う上での検討課題の一つとして、集団感染事例を裏付けできるかという点があげられる。表1に示したEC10759-EC10998は、平成18年4月29日から5月8日にかけて開催された「ふれあい動物イベント」に起因した集団感染の患者由来の分離株とイベントに出展され

表1 平成18年集団感染事例

分離株	分離日	PFGE Pattern	MLVA Profile	備考
EC10759	5月10日	18A	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10764	5月11日	18A'	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10767	5月12日	18A	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10768	5月12日	18A	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10769	5月12日	18A	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10880	5月23日	18A'	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10881	5月23日	18A'	16-26-7-4-15-11-12-12	
EC10852	6月2日	18A	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10998	7月20日	18A'	16-25-7-4-15-11-12-12	ヤギ由来

ていたヤギに由来する分離株である。これらの分離株は PFGE 法ではいずれも同一もしくはバンド 1 本のみ異なる DNA パターンを示し（パターン 18A, 18A' ），集団感染であったことが裏付けられていたことから、これらの分離株を用いて MLVA 法の検討を行った。MLVA 法では、EC10881 を除く 8 株の MLVA Profile が「16-25-7-4-15-11-12-12」，EC10881 は Locus2 が +1 異なったがそれ以外は一致していた。これらの結果から、MLVA 法によっても集団感染の推定が可能であると考えられた。

2. 平成 19 年散発感染事例由来株の分子疫学的解析

表 2 に示した EC11999-EC12142 は、平成 19 年 7 月から 9 月上旬の間に発生した散発感染事例から分離された株で、PFGE 法によって大きく分けて 3 つの流行株があることが示されたが、互いによく似た DNA パターンを示す事例も存在し、分類が困難な事例が見受けられた。これらの事例の流行形態を的確に把握し、適切な対策に資する情報を提供するには、より迅速かつ詳細な解析が可能で手法が求められたことから、MLVA 法の検討を行った。その結果、7 月下旬に秋田市、大館、由利本荘、湯沢と比較的広範囲にわたって同じ系統の菌（タイプ 19a）による事例が発生していたことを確認し、広域的な集団感染の可能性を示した。8 月から 9 月上旬に大仙を中心に相次いだ感染事例は、PFGE 法で同一の DNA パターンを示していたが、これらの MLVA Profile は非常に近いもののわずかな変化がみられた（タイプ 19c, 19g, 19h, 19f）。これは、この地域に侵淫している特定の菌型が存在し、継続的に感染を引き起こしていったのではないと思われるが、同一の菌の繰り返し数がどの程度の頻度で変化するかは今後の検討課題である。また、秋田市で発生した事例の EC12010, EC12021, EC12087 や由利本荘で発生した事例の EC12018, 湯沢で発生した事例の EC12056 には互いにそれ以外同一の MLVA Profile を示す菌株がなかったことから、散発的な感染と考えられた。これらの結果から、MLVA 法によってより詳細な流行形態の把握が可能と考えられ、広域的な集団感染の早期探知にも有効と考えられた。

3. 平成 20 年集団食中毒事例由来株の分子疫学的解析

MLVA 法による解析が、実際の検査に対応できるかを検討するため、表 3 に示した平成 20 年 6 月に秋田市内で発生した集団食中毒事例に関連して分離された株 EC12721-EC12766 を用いて、MLVA 法による解析を行った。検食から分離された EC12738 の MLVA Profile（タイプ 20a1）とは 17 株が完全に一致した。それ以外では、Locus1 が +1, Locus2 が -1 ~ +3, Locus8 が +1 異なるサブタイプがみられた（タイプ 20a2 ~ 20a7）。また EC12756 は全く異なる MLVA Profile を示し（タイプ 20b），食中毒とは関係のない散発事例であったと考えられた。以上の結果から、食中毒のような集団感染発生時にも MLVA 法による対応が可能であるが、一部の Locus におけるわずかな変化はサブタイプとして考慮が必要であることが確認された。また、EC12756 のように発生時期等から集団感染との関連が疑われ、分離株の関連性を迅速に調査する必要がある際にも MLVA 法が極めて有用であることが確認された。この検討により、MLVA 法によって、リアルタイムに菌株の情報を得ることで、即座に保健所の担当者の聞き取り等の調査による患者情報と照合することが可能となり、適切な行政対応の支援が可能となると考えられた。

【まとめ】

今回の検討により、散発事例・集団事例の流行形態の把握がこれまでよりもさらに迅速かつ詳細に行えるようになった。また、MLVA 法により得られたデータはデジタル化されているため比較解析や精度管理も容易であった。今後、PFGE 法と合わせて、より適切な科学的根拠を感染症対策に提供できるようにしていきたい。

表 2 平成 19 年散発感染事例

分離株	分離日	管轄保健所	PFGE Pattern	MLVA Profile	タイプ
EC12010	7月24日	秋田市	19A	11-35-8-6-10-12-15-7	19i
EC12000	7月20日	秋田市	19A	11-48-8-6-10-12-14-7	19a
EC12013	7月25日	大館	19A	11-48-8-6-10-12-14-7	19a
EC12017	7月25日	由利本荘	19A	11-48-8-6-10-12-14-7	19d
EC12018	7月25日	由利本荘	19A	11-21-8-6-13-12-14-7	19a
EC12022	7月26日	秋田市	19A	11-48-8-6-10-12-14-7	19a
EC12027	7月27日	湯沢	19A	11-48-8-6-10-12-14-7	19a
EC12035	8月01日	由利本荘	19A	11-48-8-6-10-12-14-7	19a
EC11999	7月20日	秋田市	19AB	11-48-8-6-10-12-14-7	19b
EC12021	7月26日	秋田市	19B	16-21-8-6-14-11-12-12	19e
EC12087	8月21日	秋田市	19B	16-20-8-6-15-11-12-12	19j
EC12056	8月09日	湯沢	19BC	16-25-7-6-12-12-14-10	19j
EC12032	7月31日	大仙	19C	14-28-8-9-11-13-14-4	19c
EC12076	8月17日	大仙	19C	14-27-8-9-11-13-14-4	19g
EC12090	8月22日	秋田市	19C	14-28-8-9-11-13-14-4	19h
EC12097	8月24日	大仙	19C	14-29-8-9-11-13-14-4	19h
EC12130	9月06日	大仙	19C	13-28-8-9-11-13-14-4	19f
EC12142	9月11日	大仙	19C	13-28-8-9-11-13-14-4	19f

表 3 平成 20 年集団食中毒事例

分離株	分離日	MLVA Profile	タイプ	備考
EC12738	6月27日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	検査
EC12728	6月26日	12-39-8-6-10-12-14-7	20a2	従業員
EC12721	6月26日	11-38-8-6-10-12-14-7	20a3	
EC12724	6月26日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12725	6月26日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12736	6月27日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12737	6月27日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12731	6月27日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12732	6月27日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12739	6月28日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12740	6月28日	11-40-8-6-10-12-14-7	20a4	
EC12741	6月28日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12742	6月28日	11-41-8-6-10-12-14-7	20a5	
EC12749	6月30日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12751	7月2日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12752	7月2日	11-42-8-6-10-12-14-7	20a6	
EC12755	7月3日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12756	7月3日	8-39-11-3-13-10-15-5	20b	
EC12758	7月4日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12759	7月4日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12761	7月7日	11-40-8-6-10-12-14-7	20a4	
EC12762	7月7日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12763	7月7日	11-39-8-6-10-12-14-8	20a7	
EC12764	7月7日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12765	7月7日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12766	7月7日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	

と畜場における高度衛生管理（HACCP）確立のための厚生労働科学研究
（平成19～21年度）

6 と畜場における豚のサルモネラ保菌状況と分離菌株の血清型、薬剤感受性

○齊藤志保子 今野貴之 八柳 潤 重茂克彦^{*1} 品川邦汎^{*1} 厚生労働
科学研究「と畜場における高度衛生管理確立のための研究班」 ^{*1}岩手大学

【はじめに】

と畜場における高度衛生管理（HACCP）確立のための基礎資料とするため、豚が保有する重要な危害であるサルモネラを対象にと畜場搬入豚の盲腸便の保菌状況調査及びと体汚染実態調査を実施した。秋田県健康環境センターは食肉衛生検査所13機関で分離されたサルモネラ菌株について血清型別、薬剤感受性試験を実施した。

【検査方法】

1. 調査期間：平成19年10月～平成20年11月
2. 検査材料

供試株：食肉衛生検査所で豚盲腸便（1130農場，3484頭）及び外皮ふき取り（67農場，305頭），枝肉ふき取り（272農場，738頭）検体から分離し，TSI培地，LIM培地で性状確認し，さらにサルモネラ型別用免疫血清0多価，01多価の凝集が確認された株を検査に供した。血清型別検査に2254株，そのうち629株を薬剤感受性試験に供した。

供試株分離機関：北海道早来食肉衛生検査所，岩手県食肉衛生検査所，宮城県食肉衛生検査所，秋田県食肉衛生検査所，群馬県食肉衛生検査所，新潟県長岡食肉衛生検査センター，静岡県西部食肉衛生検査所，三重県松坂食肉衛生検査所，兵庫県西播磨食肉衛生検査所，鳥取県食肉衛生検査所，愛媛県食肉検査センター，鹿児島県末吉食肉衛生検査所，沖縄県中央食肉衛生検査所の計13機関。

3. 方法

3.1 血清型別

型別にはデンカ生研のサルモネラ免疫血清「生研」を用いた。

3.2 薬剤感受性試験

アンピシリン（ABPC），セフトジジム（CAZ），セファロチン（CET），セフェピム（CFPM），セフォキシチン（CFX），セフォタキシム（CTX），ホスホマイシン（FOM），イムペネム（IPM），カナマイシン（KM），ノルフロキサシン（NFLX），テトラサイクリン（TC），ゲンタマイシン（GM）の12種類のセンシディスクを用いてKB法で実施した。S. Typhimuriumについては多剤耐性で問題となっているDT104（ファージ型definitive type 104）であるかどうかをPCR法で確認した。

【結果及び考察】

1. 盲腸便

1.1 豚盲腸便からのサルモネラ分離状況

豚盲腸便からのサルモネラ分離状況は，検査頭数3484頭中413頭（11.9%）からサルモネラが検出され，陽性の豚が認められた農場は1130農場中238農場（21.1%）であった。月別の分離状況は平成20年8月が最も陽性率が高かったが，顕著な季節的変動は認められなかった。機関別の分離状況は農場陽性率で6.3～64.7%，頭数陽性率で2.1～38.1%と食肉衛生検査所により異なり，地域差が認められた。

1.2 豚盲腸便由来株の血清型

盲腸便由来株は34種類の血清型に型別された。分離血清型はS. Typhimuriumが最も多く，次いでS. Derby，S. Infantis，S. Agonaが多かった。

2. ふき取り

2.1 外皮（体表）のふき取り

外皮のふき取りは肛門周囲、腹部の2カ所について実施したところ、肛門周囲の検査頭数陽性率が13.8%、腹部が17.7%と盲腸便の陽性率(11.9%)よりやや高かった。また、外皮ふき取り由来株と盲腸便由来株の血清型の一致性をみると、同じ個体の検査で外皮及び盲腸便の両者が分離陽性であった検体において血清型が一致したものは、肛門周囲ふき取りで15/17(88.2%)、腹部ふき取りで17/20(85.0%)と一致率が高かった。同じ個体は検査していないがサルモネラが陽性であった農場の検体においての外皮ふき取りから分離された株も肛門周囲ふき取り14/15(93.3%)、腹部ふき取り13/19(68.4%)が当該農場の豚盲腸便由来株の血清型と一致した。これらのことから、繋留時の接触などにより豚糞便中のサルモネラの外皮への汚染が広がっているものと考えられた。

2.2 枝肉のふき取り

枝肉ふき取りは骨盤腔、胸骨割面の2カ所について実施したところ、骨盤腔の検査頭数陽性率が2.7%、胸骨割面が4.5%であった。外皮ふき取りに比較すると陽性率は低率であった。また枝肉ふき取り由来株と他検体由来株の血清型の一致性は、同じ個体の検査で枝肉ふき取り及び盲腸便の両者が分離陽性であった検体で盲腸便由来株と血清型が一致したものは骨盤腔ふき取り7/12(58%)、胸骨割面ふき取り2/8(25%)と不一致がかなり認められた。また同じ個体の検査で枝肉ふき取り及び外皮ふき取りの両者が分離陽性であった検体では、9/14(75%)とやや高率に一致した。これらのことから、枝肉について、同じ個体における盲腸便や外皮からの二次汚染は外皮を介しての汚染の危害度がやや高い可能性が考えられた。さらに、他の個体からの器具などを介した汚染の広がりの可能性も示唆された。

2.3 分離サルモネラ菌株の血清型

ふき取りからは14種分離され、そのうち12種類は盲腸便から検出されている型であった。*S. Typhimurium*が最も多く、*S. Derby*、*S. Agona*、*S. Infantis*などが主要な型であった。

3. ヒト由来株との比較

本調査で豚から分離された血清型のうち7種類、*S. Typhimurium*、*S. Infantis*、*S. Agona*及び04:i:-、*S. Schwarzengrund*、*S. Saintpaul*、*S. Newport*は平成19～20年のヒト由来株の集計の上位15サルモネラ血清型（国立感染症研究所感染症情報センター 病原検出情報）に該当する型であった。*S. Derby*は平成19～20年の上位15には含まれていなかったが、平成17年の集計ではヒト由来株の上位であった。これらのことから、豚のサルモネラ汚染が、ヒトの健康被害の一因となっている可能性が示唆された。

4. 薬剤感受性試験

分離株の12薬剤に対する薬剤感受性は、*S. Typhimurium*の84.3%、*S. Choleraesuis*（Kunzendorf生物型も含む）の95.0%は供試薬剤のいずれかに耐性を示した。一方、*S. Agona*の82.9%、*S. Derby*の76.5%は感受性株であり、血清型により耐性株の割合が異なっていた。*S. Infantis*は27.3%が耐性株であり、その全てが複数の薬剤に耐性を示した。また、多剤耐性の*S. Typhimurium* DT104の増加が近年大きな問題となっているが、今回の調査では*S. Typhimurium*分離株の45.6%がDT104であることが確認され、食肉衛生検査所によりDT104の占める割合は異なっていた。

【まとめ】

本調査では、調査を実施した機関において対象とした農場の汚染状況に差はあるものの全国的にサルモネラ汚染農場が存在することが明らかとなった。外皮ふき取りからの分離率は盲腸便よりやや高率であり、枝肉の汚染危害因子として重要と考えられた。枝肉ふき取りも低率ではあるが汚染が認められ、同じ個体の盲腸便や外皮から分離されている血清型以外の型の汚染も確認されたことから、処理工程における器具を介した汚染の可能性も考えられた。分離株の血清型は多岐に渡り、ヒト由来主要菌型と同じ型も認められた。また、血清型によって高度な薬剤耐性を保有していた。

これらの結果から、保菌豚からの解体処理時における汚染の防止が重要と考えられることから、よりいっそう高度な衛生管理のためのHACCPの確立に向けて研究班活動を継続している。

感染症流行予測調査事業

7 平成20年度日本脳炎感染源調査結果について

○柴田ちひろ 佐藤寛子 斎藤博之 安部真理子

【はじめに】

日本脳炎はフラビウイルス科に属する日本脳炎ウイルス（JEV）に感染することで起こり、現在感染症法において4類感染症に指定されている。JEVに感染しても大部分は不顕性感染のまま終わるが、一旦発症すると死亡例や、回復後も重篤な後遺症を残すことの多い疾患である。今なお有効な治療法が確立されていないため、ワクチンによる感染予防が非常に重要となるが、その副作用の問題から現在ワクチン接種の積極的勧奨は休止されている。

通常JEVは、増殖動物であるブタと、媒介動物であるコガタアカイエカの間でウイルスの伝播が行われているが、JEVを保有した蚊に吸血されることでヒトへの感染が起こる。そこでJEVの蔓延状況やヒトへの感染の危険性を把握することを目的に、毎年厚生労働省が主体となり日本脳炎感染源調査としてブタのJEV感染状況を調査している。秋田県では平成17年度に1頭の抗体保有例が確認されていたが、平成20年度は23頭の抗体保有例が確認されたことから、その詳細について報告する。

【対象と方法】

1. 調査期間：平成20年7月下旬～9月下旬（計7回）
2. 対象と検査項目

秋田市内にある食肉処理場に集荷されたおよそ6ヶ月齢のブタ（1回につき10頭ずつ、計70頭）から血液を採取し、血液中の抗JEV抗体の検出を行った。

3. 検査方法

3.1. HI試験：抗JEV抗体の検出

前処理（インヒビター処理、非働化、血球吸収処理）をした血清50μlを0.4%卵白アルブミン加ホウ酸緩衝液（EA・BS）で2段階希釈する（25μl/well）。あらかじめ4HA単位に調整した市販抗原25μlを加え、振とう混和後4℃で一晩静置した後、0.33%ガチョウ血球50μlを加え、37℃で1時間反応させ判定する。凝集抑制がみられた最終希釈倍率をHI抗体価とする。HI価10倍以上であった検体は引き続き2-ME処理を行う。

3.2. 2-メルカプトエタノール（2-ME）処理：感染時期特定のためIgM抗体とIgG抗体を鑑別

血清をPBSで2倍希釈し、0.2Mの2-MEを等量混合する。37℃で1時間反応させた後、20倍量の冷アセトンで2回抽出する。沈殿物を乾燥後、使用した血清の10倍量のBSを加え、4℃にて一晩かけて溶解させたものを10倍希釈の2-ME処理検体として再度HI試験を行う。処理前に対して処理後のHI抗体価が1/8以上低下したとき2-ME陽性（IgM抗体検出）と判定する。

【結果と考察】

抗JEV抗体検出数を図1に示す。被検ブタ70頭中23頭から抗JEV抗体が検出された（抗体保有率32.9%）。秋田県で抗体保有例が確認されたのは平成17年度に1頭確認されて以来3年ぶりであった。抗体の保有が確認されたブタの飼育地に地域的な偏りは認められず、県内全域にわたっていた。抗体に着目すると、7月下旬から8月中旬にかけての抗体保有例は全てIgM陽性であったが、9月上旬から下旬にかけては大部分

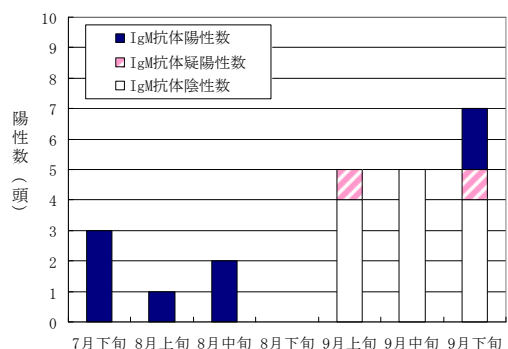


図1 抗JEV抗体検出数

HI抗体保有率

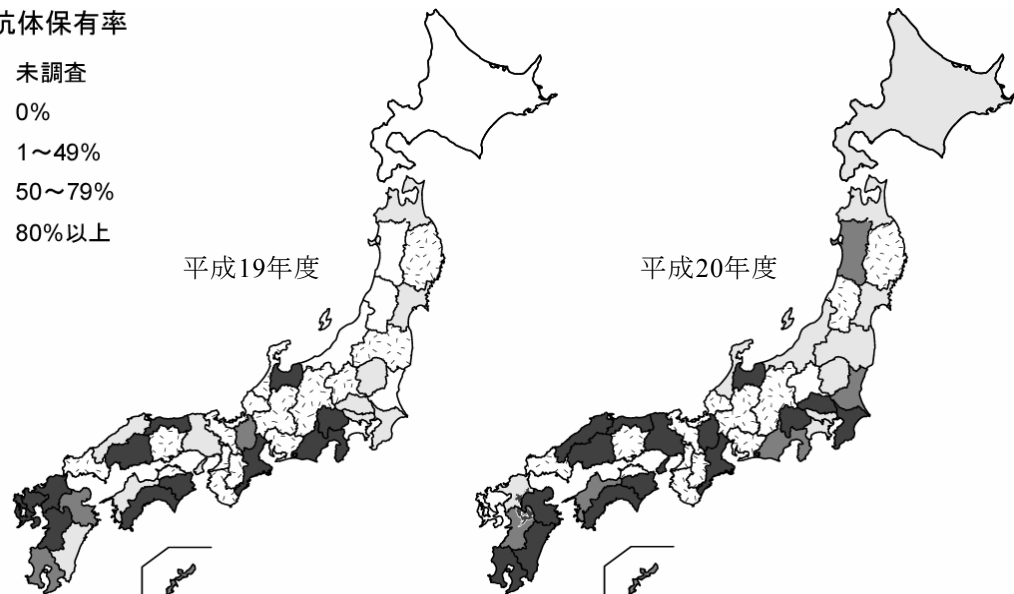
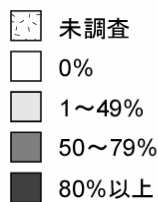


図2 平成19年度および平成20年度日本脳炎感染源調査全国結果
(国立感染症情報センター「流行予測調査資料」より抜粋)

がIgM陰性（IgG抗体のみ）であった。ブタの抗JEV-IgM抗体の持続期間はおよそ16～28日であることから、JEVを保有した蚊の活動のピークは7月上旬から7月下旬にあったものと考えた。

次に平成19年度と20年度の全国の調査結果を図2に示す。例年西日本において高い抗体保有率を示しているが、平成20年度は秋田県も含め、全国的に19年度と比較して抗体保有率の上昇が確認された。東日本においても高い抗体保有率を示す結果となったことから、例年以上に国内でJEVが蔓延していた可能性が示唆された。なお、平成20年度に本調査に参加した35都道府県のうち、HI抗体保有率が50%以上となった県は24県あり、このうち茨城県で2例、愛知県で1例の日本脳炎患者が確認された。

これまで秋田県内では日本脳炎に罹患する危険性はそれほど高くはないと考えられていた。しかし今回の調査結果から、平成20年度は県内でも広くJEVが蔓延していた可能性が示され、感染の危険性は充分にあったことが示唆された。このことから感染予防対策が重要となるが、平成17年度にワクチンの副作用によるADEM（急性散在性脳脊髄炎）の問題が起きて以降、ワクチン接種の積極的勧奨は現在もなお差し控えられている。平成20年度日本脳炎感受性調査結果によると、平成17年度以降にワクチン初回接種年齢となった現在の6歳未満の乳幼児における日本脳炎中和抗体保有率は20%にも達していない。このことから早期のワクチン接種再開が強く望まれている。副作用の問題については、その大きな要因と考えられたマウスの使用による製造法が見直され、新しく細胞培養法により製造された新ワクチンが6月から発売されている。これにより副作用の危険性は著しく低下するものと期待される。

今後も、調査を継続して県内のJEV動向を把握していくとともに、調査結果をもとに関係機関と連携し、ワクチン接種等感染予防についての積極的な啓発活動が必要であると考えた。

【まとめ】

日本脳炎感染源調査事業として、県内で飼育されたブタの抗JEV抗体保有状況について調査した。70頭中23頭から抗JEV抗体が検出されたため、県内でも日本脳炎に罹患する危険性があることが確認された。今後も、ワクチン接種等感染予防について積極的な啓発活動を行っていく必要があると考えた。

農薬残留対策総合調査（平成20年度）

農薬残留対策総合調査について

○玉田将文 小林貴司

【はじめに】

農薬残留対策総合調査とは、農地で使用された農薬が公共用水域に至るまでの濃度変化と環境中での残留性を把握するために、平成13年から環境省と地方自治体により実施されている調査である。ここで得られた農薬の残留性についての情報は、毒性試験結果とあわせて、農薬の登録を認めるか否かの判断基準として使用される。農業の盛んな秋田県では、水田を中心に毎年多くの農薬が使用されており、平成19年度には6320トンもの農薬が販売された。しかし、これら農薬の環境中での挙動と残留性に関する情報は少なく、農薬登録の適正な判断基準を得るための詳細な調査が必要とされている。そこで当センターでは、水田で使用された農薬の挙動と流出量については「水田農薬精密モニタリング調査」を、農薬の汽水域での残留性については「汽水域におけるモニタリング調査」を実施したので、その結果を報告する。

【調査方法】

1) 水田農薬精密モニタリング調査

この調査の目的は、水田に散布された農薬の挙動と流出実態を精密に把握することである。そのため、調査地点を秋田市内の1枚の水田に絞り、県内の水田で最も多く使用されているプレチラクロールとペントキサゾンを対象として、農薬散布量と排水の作業日程を明確に把握できる体制をとった。この水田では、5月7日の代掻き後、水が溜められ、5月12日に除草剤（プレチラクロール120 g含む）を散布、5月19日に排水された。排水終了後、再度、水が溜められ同日中に除草剤（ペントキサゾン97.5 g含む）を散布、7月28日と9月4日に排水された。この期間、計12回の試料採取を行い、水田内の水と土壌について、プレチラクロールとペントキサゾンの濃度変化を調べた。また、計3日の排水日には、これら農薬の濃度と排水量を測定し、水田からの農薬流出量を求めた。水試料は褐色ガラス瓶に直接採取し、土壌試料は水田内の複数箇所よりステンレス容器に採取・混合した後、500 mLガラス瓶に採取した。

2) 汽水域におけるモニタリング調査

この調査の目的は、県内に散布された農薬が河川を経て汽水域に到達した時点での濃度の把握である。調査地点（図1）は雄物川河口付近（No.1）、追分沿岸（No.2）、船越水道付近（No.3）の3地点とした。試料採取は、4月から10月（9月を除く）に毎月1回行った。水試料は1L褐色ガラス瓶に直接採取し、底質試料はエクマンバージ型採泥器を用いて、500 mLガラス瓶に採取した。調査対象農薬は、PR TR秋田県データと県内販売量から主要な農薬を13種類、そしてそれらのオキシソ体を選出した（表1）。



図1 調査地点(汽水域)

表1 調査対象農薬

農薬名	用途
トリクロルホン	殺虫剤
トリフルラリン	除草剤
ダイアジノン	殺虫剤
エチルチオメトン	殺虫剤
クロロタロニル	殺菌剤
フェントロチオン	殺虫剤
エスプロカルブ	除草剤
プロベナゾール	殺菌剤
フェンチオン	殺虫剤
ジクロシメット	殺菌剤
プレチラクロール	除草剤
ペントキサゾン	除草剤
シハロホップブチル	除草剤
[オキシソ体]	
ダイアジノンオキシソ	
フェントロチオンオキシソ	
フェンチオンオキシソ	
フェンチオンオキシソスルホキシド	
フェンチオンオキシソスルホン	
フェンチオンスルホキシド	
フェンチオンスルホン	

以上、2つの調査で採取した水試料、土壌試料および底質試料は前処理（図2）を行い、GC/MSによる測定を行った。

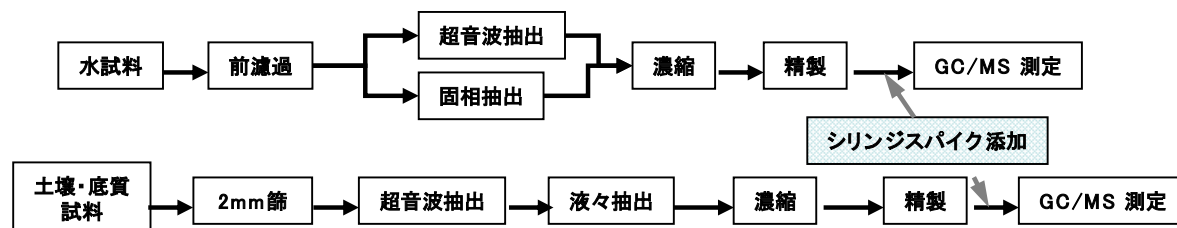


図2 試料前処理フロー

【結果と考察】

表2に水田水試料と土壌試料中のプレチラクロールとペントキサゾンの濃度を示した。水田水試料のプレチラクロールの濃度は、散布翌日に398 $\mu\text{g/L}$ となり、散布7日後にかけて急激に低下し、70日後の7月28日には検出下限値以下まで低下した。土壌試料のプレチラクロールの濃度は散布3日後に0.204 mg/kg-dry となり、7月28日には定量下限値に近い値まで徐々に低下した。水田水試料のペントキサゾンの濃度は、散布翌日に27.6 $\mu\text{g/L}$ となり、7月28日には0.6 $\mu\text{g/L}$ まで急激に低下した。土壌試料のペントキサゾンの濃度は5月22日に0.097 mg/kg-dry となり、7月28日には0.01 mg/kg-dry まで徐々に低下した。

表3に水田排水試料中のプレチラクロールとペントキサゾンの濃度および排水量を示した。この結果から、これらの農薬の水田系外への流出量を算出すると、プレチラクロールは25 mg 、ペントキサゾンは220 mg となり、流出率はともに1%以下であった。

汽水域のモニタリング結果では、全ての地点において水・底質試料ともに、調査対象農薬は全く検出されなかった。このことから、調査対象農薬は河川を経由し、汽水域へ到達するまでに希釈又は分解したと推察される。

【まとめ】

県内の水田と汽水域でモニタリング調査を実施し、農薬の水田での挙動と流出、汽水域での残留性に関する情報を得た。県内の水田で多く使用されているプレチラクロールとペントキサゾンの水田系外への流出率は、ともに1%以下であり、これらの農薬は系外へ排出される前に、水田内で分解したと考えられる。汽水域のモニタリング結果では、県内で主に使用されている農薬は、全く検出されなかったことから、河川を経由し汽水域へ到達するまでに、希釈又は分解したと推察される。以上のことから、秋田県内の水田で使用されている農薬の環境への影響は、ほとんど無いと考えられる。

表2 水田水試料と土壌試料中の農薬濃度*

試料採取日	水田水試料 ($\mu\text{g/L}$)		水田土壌試料 (mg/kg-dry)	
	プレチラクロール	ペントキサゾン	プレチラクロール	ペントキサゾン
5月7日	代掻き, 水田に水を溜める			
5月12日	< 0.02	< 0.1	< 0.0003	0.004
"	プレチラクロールを散布			
5月13日	398	< 0.1	0.114	0.003
5月14日	125	< 0.1	0.125	0.002
5月15日	108	< 0.1	0.204	0.003
5月19日	3.11	< 0.1	0.117	0.002
"	排水後, ペントキサゾンを散布			
5月20日	6.34	27.6	0.097	0.075
5月22日	5.04	10.3	0.129	0.097
5月26日	3.28	5.4	0.090	0.071
6月2日	0.91	2.1	0.037	0.048
6月9日	0.28	0.7	0.010	0.025
7月28日	< 0.02	0.6	0.001	0.010

*農薬濃度は、3回測定の実測値である。

表3 水田排水試料中の農薬濃度と排水量

試料採取日	水田排水試料 ($\mu\text{g/L}$)		排水量 (L)
	プレチラクロール	ペントキサゾン	
5月19日	14.1	< 0.1	1,752
7月28日	0.06	3.3	66,000
9月4日	< 0.02	< 0.1	158
9月4日 *	< 0.02	< 0.1	100

*暗渠排水

9 八郎湖高濃度リン湧出水の年間変動と湧出量

○成田修司 和田佳久

【はじめに】

秋田県の男鹿半島の付け根に位置した八郎潟は、1977 年の干拓事業終了後、大潟村干拓地水田への淡水供給及び供水調節機能を目的とした八郎湖として残存している。八郎湖は 2006 年度に全国のワースト 3 に位置づけられるほど水質が悪化したため、2007 年 12 月、指定湖沼に指定され、その対策の推進が図られた。この八郎湖の正面堤防沿いにある自然放任地（方上地区）には、高濃度のリンが湧出する地帯（以下、リン湧出地帯）が存在し¹⁾、その源となる地下に埋蔵するリンの濃度は $\text{PO}_4\text{-P}$ で 30 mg l^{-1} 以上であることが確認されている。片野(秋田県立大教授)らによると、リン湧出地帯における湧出リンの八郎湖への負荷は、同湖へ流入するリン全量(T-P)の約 25%，年間 30 t を占めると推計されており¹⁾、実効ある水質浄化対策を検討していく上で、このリン負荷低減は重要な要素であると考えられる。本研究では、リン湧出地帯(図 1)についての年間を通じた現地調査を初めて実施し、湧出するリンの年間変動とその湧出量の実態を明らかにしたので報告する。

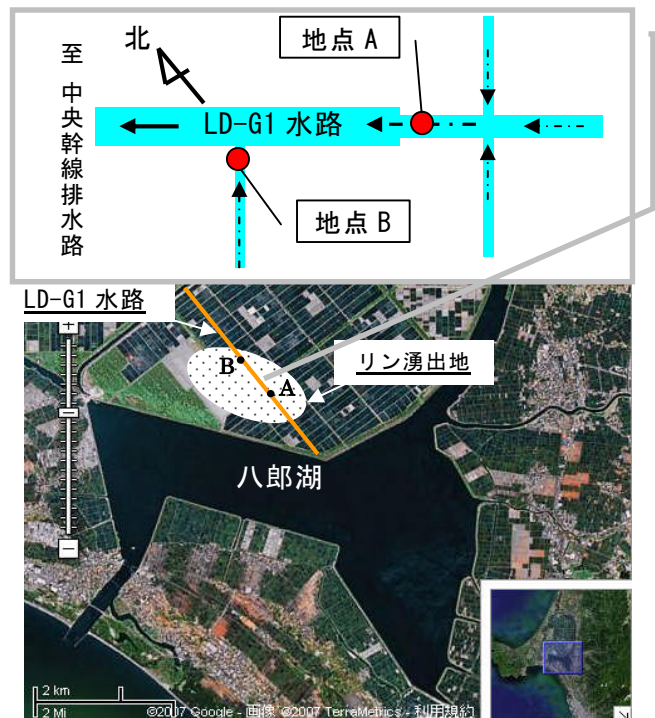


図 1 方上地区のリン湧出地帯における調査地点 A 及び B

【調査方法】

リン湧出水は、湧出源から流れやすい地層間を水脈とし、地表面に染み出すと考えられている。この湧出水は数多くある小さな水路の底や側面からも染み出しており、それらは合流を繰り返しながら、図 1 に示した農業用水路(LD-G1) に流入する。そのため、調査地点は LD-G1 水路の南東から流入する 3 つの小水路の合流点である地点 A と、 30 mg l^{-1} 以上の濃度のリン地下水が確認されている正面堤防沿いの地点から LD-G1 水路に南西から流入する地点 B を選んだ。調査は 5～3 月まで月 1 回行い、それぞれの地点において、流量($\text{m}^3\text{sec}^{-1}$)、pH、EC(mS m^{-1})、全リン[T-P](mg l^{-1})を測定した。

【結果と考察】

地点 A の流量と T-P の年間変動を図 2 に示す。LD-G1 水路の地点 A における 5 月の流量は約 $0.3 \text{ m}^3\text{sec}^{-1}$ であったが、6～8 月にかけて約 $0.15 \text{ m}^3\text{sec}^{-1}$ まで急激に減少した。また、9 月以降は、流量がさらに低下し、安定的に $0.05 \text{ m}^3\text{sec}^{-1}$ 前後であった。一方、5～8 月の T-P は約 0.5 mg l^{-1} と相対的に低濃度で観測されたが、9 月以降は急激に上昇し、 $1.0\sim 2.5 \text{ mg l}^{-1}$ と高濃度で推移していた。これらの流量と T-P の変化は大潟村農地の灌漑期と非灌漑期の状況を顕著に反映した結果であると考えられる。図 3 に示した調査地点 B の流量と T-P の年間変動の結果をみると、

地点 B の流量と T-P の変化は年間を通して、それぞれ約 $0.1 \sim 0.5 \text{ m}^3 \text{ sec}^{-1}$ 、 $0.4 \sim 1.3 \text{ mg l}^{-1}$ の間で上下変動を繰り返していた。これらの結果は、地点 A の灌漑期及び非灌漑期を反映した結果とは異なった挙動を示していたが、T-P 濃度については流量の増減と逆の関係となることから、地点 A と同様の動きといえる。地点 B における上記 2 つの挙動は、地点 A のように大潟村の利水管理に基づいた大きな水の動きに伴うものだけではなく、降雨等の気象の影響を受けた比較的狭い範囲の変化をより強く反映した現象であると考えられる。また、表 1 の流量と T-P の積から算出した地点 A 及び B でのリンの流出量(t/年)は、それぞれ、2.7 t 及び 5.4 t となり、地点 B は地点 A の 2 倍であった。この結果は、地点 B への流入水が約 30 mg l^{-1} の高濃度の地下水が観測されている方上地区方向からの流入であることから理解できる。

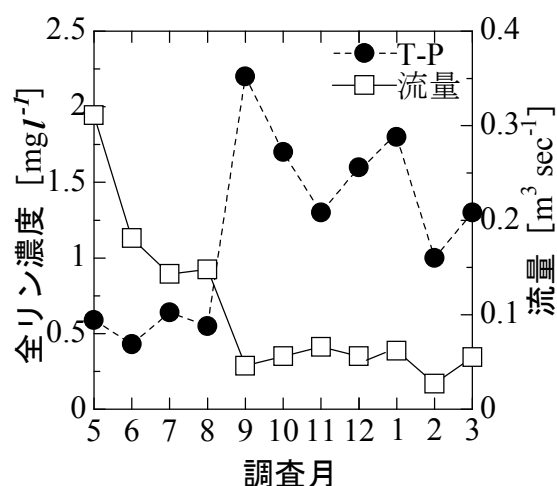


図 2 調査地点 A における流量と T-P の年間変動

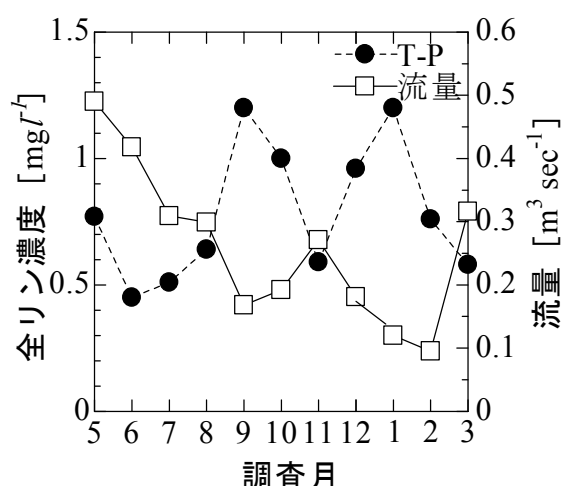


図 3 調査地点 B における流量と T-P の年間変動

【まとめ】

地点 A 及び B で観測された現象は、一定の量と濃度で湧出しているリンが農地の水利用や気象の変化をより強く受けることにより、もたらされた変化であることが示唆され、地点 A は農地の利水管理の影響を地点 B は局所的な気象等の影響を強く受けやすい地点であることが考えられる。また、流量と T-P の積から算出した地点 A 及び B での年間のリンの流出量は、それぞれ、2.7 t 及び 5.4 t であった。これらリンの和は 8.1 t となることから、わずか 2 地点で、片野らの推計値(約 30 t)の 1/4 以上を占めることが明らかとなった。

表 1 調査地点 A 及び B における各月ごとの流量と全リンの測定値

地点	調査項目	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月	3 月
A	流 量 ($\text{m}^3 \text{ sec}^{-1}$)	0.31	0.18	0.14	0.15	0.05	0.06	0.07	0.06	0.06	0.03	0.06
	全リン (mg l^{-1})	0.59	0.43	0.64	0.55	2.20	1.70	1.30	1.60	1.80	1.00	1.30
B	流 量 ($\text{m}^3 \text{ sec}^{-1}$)	0.49	0.42	0.31	0.30	0.17	0.19	0.27	0.18	0.12	0.10	0.32
	全リン (mg l^{-1})	0.77	0.45	0.51	0.64	1.20	1.00	0.59	0.96	1.20	0.76	0.58

1)片野ら，秋田県環境技術センター年報，18，104-109，1990.

10 生態系操作の秋田県の湖への応用可能性について

○佐藤信也

【はじめに】

八郎湖や十和田湖では、水質汚濁指標の一つである COD（化学的酸素要求量）が環境基準を超えており、有機物による水質汚濁について調査や対策が講じられてきた。これらの有機汚濁物質は、湖の外からの流入と、湖の中で生産されるものがあり、後者は主に藻類（植物プランクトン）の増殖によるもので内部生産といわれる。この濃度は、図 1 に模式的に示したように時間的に変化する。藻類は、藻類→ミジンコ（動物プランクトン）→魚類という捕食関係（図 2）の中にあることから、魚類の数が増加するとミジンコを媒介として、藻類の増減に影響し、湖水中の汚濁物質の濃度にも影響するものと考えられている。「生態系操作」（バイオ マニピュレーション）は、このようなしくみを利用して、生態系のバランスを人為的に整え、その結果として水質改善を行おうとするものである。その効果としては、藻類の減少（内部生産の減少）による有機汚濁物質濃度の低減だけでなく、透明度の向上やアオコ（藻類の仲間である藍藻類）の抑制も期待される。生態系操作は、1980 年代に欧米を中心に応用されるようになり、日本でも、2000～2003 年に長野県の白樺湖で花里らが行った試験において透明度の改善が報告され、近年では諏訪湖においてもアオコ対策の一つとして検討されるなど、新たな技術として報告されるようになってきた。そこで、県内の湖における生態系操作による水質改善の可能性について検討した。

【3 種系の生態系方程式の解析】

生態系における各個体群の増減を定量的に検討するため、魚類、ミジンコ、藻類の 3 種により構成される系において、それぞれの種の特性和餌-捕食関係を次のように仮定した。藻類は光や栄養素を利用して固有の速度（内的自然増加速度）で増殖するが、栄養素には限り（環境収容力）がある。ミジンコは藻類を捕食して増殖し、魚類はミジンコを捕食して増殖する。そこで、個体群の増加速度は自らの群の生体重量に比例するモデルを基本とし、加えて、死亡率（寿命）、捕食される速度や餌を栄養に転換する速度など各個体群の特性（表 1 及び表 2）も考慮して、各個体群の生体重量の増加速度を(1)式のような方程式で表した。式 (1) において、魚類については捕食の要素、ミジンコについては捕食の要素と捕食される要素、藻類については、捕食される要素と環境収容力の制約による増加速度の頭打ちも考慮した。ここに、 t は時刻である。

式 (1) において、 F , G , A の初期値を与えて方程式を解くと、図 3 のように変化する解（動態）が得られ、時間が経過するにつれて、一般には変化の幅が段々小さくなり、次第に一定の値（平

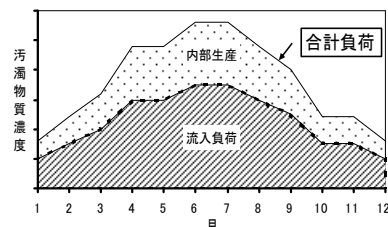


図 1 有機物質濃度の内訳

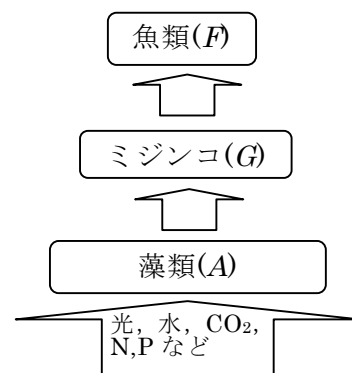


図 2 水中生物の捕食関係

$$\left. \begin{aligned} \frac{dF}{dt} &= \{-d_F + e_F \cdot f_F \cdot G(t)\} F(t) \\ \frac{dG}{dt} &= \{-d_G + e_G \cdot f_G \cdot A(t) - f_F \cdot F(t)\} G(t) \\ \frac{dA}{dt} &= \left\{ -d_A + r \left(1 - \frac{A(t)}{k} \right) - f_G \cdot G(t) \right\} A(t) \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

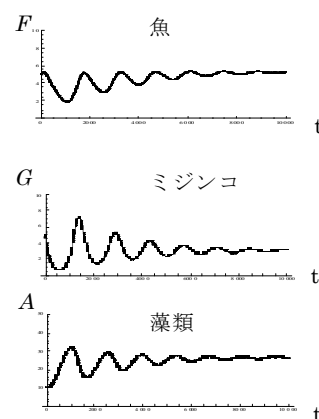


図 3 FGA 3 種系の動態

平衡状態)に落ち着くものと考えられる。このような動態は、初期値を変えることによって無数のケースがあり、時間的にも変化し個々のケースを解析するのは困難なので、この系の全体的な傾向を把握するため、長時間が経過して平衡状態となったときの生体重量 F_{∞} , G_{∞} , A_{∞} の性質を解析することにした。

式 (1) の左辺をゼロとおくと、平衡状態の値は、次のように求められた。

$$F_{\infty} = \frac{1}{f_F} \left[e_G f_G k \left\{ 1 - \frac{1}{r} \left(\frac{f_G d_F}{e_F f_F} + d_A \right) \right\} - d_G \right], \quad G_{\infty} = \frac{d_F}{e_F f_F}, \quad A_{\infty} = k \left\{ 1 - \frac{1}{r} \left(\frac{f_G d_F}{e_F f_F} + d_A \right) \right\} \quad (2)$$

式(2)の右辺を構成している特性値の多くは、個体群によって異なる値を取るものの大きな違いはないと考えられるが、環境収容力を表す k の値は環境の違いによって大幅に変化するものと考えられるので、他の特性値は一定とみなし k だけを変化させたときの、 F_{∞} , G_{∞} , A_{∞} の値の変動範囲を図 3 の AGF 座標にプロットしたのが、図の線分 RS である。この状態では、ミジンコの量は一定で、藻類が一定の量を超えると魚類も同様に増えるようになる。2 種又は 1 種のみ生息する場合を解析すると、式は省略するが、藻類のみ存在する場合の平衡状態は線分 OQ、藻類とミジンコが共存する場合の平衡状態は線分 PR となる。このような解析を定量的に行うには、各特性値の値を決定する作業が必要となる。

【本県の湖への応用可能性】

十和田湖、八郎湖、田沢湖の生態系の状態把握は、今後の課題でもあるが、現時点で大まかに推測した状態を図 4 に重ねてプロットした。湖により状態は異なるものの、いずれの湖についても、有機物質濃度の低減と透明度の向上が求められており、そのためには、魚類・ミジンコ・藻類が安定して共存できる状態（線分 RS）であって、かつ、できるだけ藻類が少ない状態（R に近い状態）が望ましい。表 1 及び表 2 の特性値のうち人為的に操作可能な要素としては、漁獲・稚魚放流数の調整・魚食魚の放流などによる魚類の死亡率や量 (d_F , F) の制御、ミジンコの養殖放流によるミジンコ死亡率や量 (d_G , G) の制御、窒素・リン・光の調整などの環境改善による環境収容力 (k) の制御、水草など藻類忌避物質の利用による藻類の死亡率 (d_A) 制御などが考えられる。八郎湖において当センターが研究しているリンの回収や、秋田地域振興局の未利用魚回収事業も、その一例であるといえ、生態系操作は、県内の湖において既に利用され始めており、今後さらに活用される余地があると考えられる。生態系操作を実施するには、生態系の保護のためにも、先に示した手法などを応用して生態系や水質への影響を予測・評価し、これに基づいて計画的に実施することが望ましい。これには、水質汚濁負荷の把握と解析が必要となり、季節変動の考慮や多種の個体群の考慮など複雑な要素もあるので、水産、生物、環境の関係分野の連携がより一層重要になると考えられる。

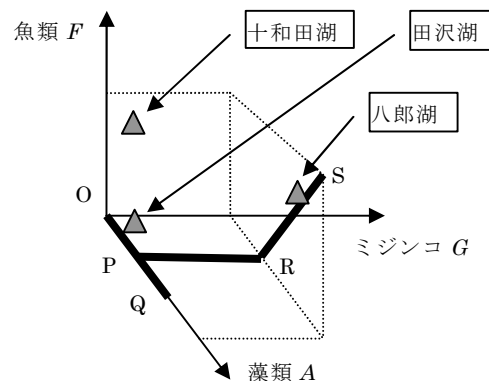


図 4 FGA 3 種系の平衡状態と県内の湖の状態推定

表 1 各個体群の量と特性値の定義

生物種	生体重量	死亡率	内的自然 増加速度	環境 収容力
魚類	$F(t)$	d_F		
ミジンコ	$G(t)$	d_G		
藻類	$A(t)$	d_A	r	k

表 2 捕食関係の特性値の定義

捕食関係	捕食 速度	栄養転換 速度
魚類←ミジンコ	f_F	e_F
ミジンコ←藻類	f_G	e_G



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

電 話 018(832)5005(代表)
FAX 018(832)5938
E-mail b10266@pref.akita.lg.jp

【企画管理室】総務企画班	TEL(832)5005(代)		
【保健衛生部】健康科学班	TEL(832)5026	感染症情報センター	TEL(832)5047
微生物班	TEL(832)5034	細菌検査	TEL(832)5034
		ウイルス検査	TEL(832)5069
		母子検査	TEL(832)5029
【環境・理化学部】理化学班	TEL(832)5021	環境調査班	TEL(832)5005(代)

ホームページアドレス <http://www.pref.akita.lg.jp/rcphe/>