

第6回

秋田県健康環境センター調査研究発表会

要旨集

日時 平成23年6月14日(火) 13:30~16:20
会場 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6回秋田県健康環境センター調査研究発表会プログラム

開催日時 平成23年6月14日(火) 13:30~16:20
開催場所 秋田県総合保健センター2階 第1研修室

【13:30~13:40】 開 会
所長あいさつ

研究発表

【13:40~15:10】 保健衛生部 (6題)

- 1 結核サーベイランス情報を用いた秋田県の結核登録の現状 ----- 1
- 2 平成23年2月に発生した *Shigella boydii* 4 感染事例について ----- 3
- 3 秋田県における食品の食中毒菌汚染実態調査結果について ----- 5
- 4 秋田県における非定型的下痢原性大腸菌の分離状況と ----- 7
astA 保有大腸菌 (EAST1EC) の病原因子プロファイル
- 5 食品検体のノロウイルス検査を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発 ----- 9
- 6 雄物川流域におけるツツガムシ生息調査と地元自治体との協力による -----11
感染予防対策について

【15:10~15:20】 休 憩

【15:20~16:20】 理化学部 (2題), 環境保全部 (2題)

- 7 GC/MS/MS を用いた残留農薬一斉分析について -----13
- 8 八郎湖の残留性有機汚染物質について -----15
- 9 玉川源泉下流域及び田沢湖における pH 低下要因の解明 -----17
- 10 玉川酸性水中和処理による副次的水質改善効果 -----19

【16:20】 閉 会

結核登録者情報調査事業（昭和56年～）

1 結核サーベイランス情報を用いた秋田県の結核登録の現状

○田中貴子 村山力則 高山憲男 成田千秋*¹

*¹秋田県健康推進課

【はじめに】

秋田県では平成22年1月に、公益財団法人結核予防会結核研究所による「自治体における結核対策レビュー（外部評価）」を受けた。このことをきっかけに、今後の結核対策に活かすべく本県の結核登録の現状を把握し結核情報について検討したので報告する。

【方法】

厚生労働省の結核サーベイランス事業における、秋田県の昭和40年から平成21年までの結核情報を用いて疫学状況の分析を行った。昭和40～61年は結核登録者に関する定期報告結果、昭和62～平成7年は結核・感染症サーベイランス年報集計結果、平成8～18年は結核発生動向調査年報集計結果、平成19～21年は結核登録者情報調査年報集計結果を用いた。検討は1.結核の蔓延状況 2.高齢者結核と潜在性結核感染症 3.患者発見 4.治療及び治療成績 5.集団感染の状況について行った。

【結果】

1. 結核の蔓延状況 ①秋田県の新登録結核患者数（罹患率：人口10万対）は、昭和40年では2642人（206.4、全国307.0）であったが、その後減少し、平成21年は125人（11.4、全国19.0）となった。全国と比較すると、平成2年を除き本県は全国の罹患率を下回っていた。②喀痰塗抹陽性肺結核（喀痰等を介して他人に感染させる可能性のある結核）の患者数（罹患率）について平成10～21年の状況をみると、平成10年の92人（7.7、全国10.6）から平成21年は56人（5.1、全国7.6）と減少しているものの、増減を繰り返し経過している（図1）。

2. 高齢者結核と潜在性結核感染症 ①平成21年の新登録結核患者のうち70歳以上の割合は68.0%（全国50.2%）、喀痰塗抹陽性肺結核では78.5%（全国53.9%）と、本県では全体の7～8割を高齢者が占めていた。罹患率では70歳代が19.0（全国40.5）、80歳代が53.8（全国86.8）、90歳代が75.8（全国95.7）と、年齢が上がるにつれて高くなったがいずれも全国より低率であった（図2）。②潜在性結核感染症（結核感染を受けて発病の危険性が大きくなっている状態）は、平成19年以降は各年約30人の届出があった。そのうち20～40歳の若い年代は平成19年で21人（77.8%）、平成20年で12人（37.5%）、平成21年で19人（65.5%）であった。

3. 患者発見 ①平成21年の新登録患者のうち43.2%が有症状により「医療機関を受診」して結核と診断されていた。また、他疾患で入院中の発見29.6%、他疾患で通院中の発見10.4%を含めると、医療機関で83.2%が発見されていた。②平成21年の肺結核患者の発見時の職業は、高齢者が多いこともあり80.0%は無職・その他であった。医師の発病は1人であったが喀痰塗抹陽性肺結核ではなかった。ディンジャーグループ（発病した場合には、周囲の多くの人を感染させるおそれが高い）と言われる職業の平成19～21年の発生状況は、接客業3人、看護師・保健師3人、医師3人、その他医療職3人、教員・保育士1人であった。

4. 治療及び治療成績 ①平成21年の治療内容では、125人のうちPZAを含む標準の4剤処方50人（40.0%）であり全国の60.1%より低かった。②平成21年の新登録患者の治療歴では、再治療患者は12人（9.6%）であった。その12人の前回治療開始年は10年以上前が5人、次いで1年前が3人であった。③前年（平成20年）の新登録肺結核患者97人についてコホート法による1年後の治療成績を観察した。治療成功率は45.3%（全国50.5%）、死亡は20.6%（全国14.1%）、治療失敗は1.0%（全国0.8%）、脱落中断は7.2%（全国7.9%）、転出は0%（全国2.6%）、12か月を超える治療は13.4%（全国10.2%）、判定不能は12.4%（全国14.0%）であった。

5. 集団感染の状況 本県の集団感染事例は平成10～21年に6事例発生しており、家族内、施設及び事業所等の事例であった。一方最近では、集団感染には至らないが接触度合いの高い家族

内での感染が多く、特に高齢の夫婦間の感染や高齢者から乳幼児への感染が見られている。また、患者から医療従事者、介護職員への感染事例も散見されている。

【考察】

1. 結核の蔓延状況 本県の新登録結核罹患率は全国を大きく下回り低蔓延（人口 10 万対 10 以下）に近づいている。しかし、喀痰塗抹陽性肺結核は全国では年々減少しているが、本県では全体的に減少しているものの増減を繰り返し推移しており、予断を許さない状況である。

2. 高齢者結核と潜在性結核感染症 本県における結核患者はますます高齢化しており、70 歳代、80 歳代、90 歳代と年齢が上がるにつれて罹患率が高くなっている。高齢者結核患者の特徴は、結核特有の呼吸器症状がない場合も多く、診断の遅れや治療開始後の早期死亡も少なからず見られている。また、合併症や認知症、介護上の問題から、結核専門病院外や介護施設等での対処の必要性も出てくることから、これらの関係機関における結核への理解を深め対応力を強化していくことが求められる。次に、潜在性結核感染症は、接触者健診及び採用時の健康診断などで発見されることが多い。結核の発病は感染者の 1~2 割と言われ、必ず発病するとは限らない。しかし、若い年代での潜在性結核感染症の場合は最近の新しい結核感染と推測されること、また感染後 1~2 年の発病リスクが最も高いこと等を考慮すると、潜在性結核感染症についてはこれからも注意深く見守る必要がある。

3. 患者発見 患者の約 8 割が医療機関で発見されているが、中には他疾患を治療し最後に結核と診断される事例、いくつかの病院を経て発見される事例も少なくない。また、結核への関心が薄れつつある中で、無症状で経過し知らないうちに他へ感染させている可能性もあることから、医療や介護の現場でも「結核はまだ多い」ことを念頭に置き、早めに対応することが重要である。さらに地域では住民への注意喚起を行い、担当者は機会を逃さずに結核予防の普及啓発に取り組んでいくことが大切である。

4. 治療及び治療成績 平成 21 年の再治療者 12 人のうち、1 年前の治療者からの再発が 3 人であったが「患者の確実な治療が、結核の最大の予防策」と言われるように、保健所や病院等が連携を取りながら服薬の完遂を目指して、より一層の治療支援体制の充実を図っていくことが重要である。

5. 集団感染の状況 平成 19 年 1 月に発生した事例では、いったん終息したかに思われたが、平成 22 年 4 月になってなお 70 歳代の家族がガフキー 3 号という状態で発病し、最終的には感染者数 41 人に拡大した。この事例からも、結核は軽視できない決して侮れない感染症であると思われる。

【まとめ】「結核は低蔓延に近づくほど問題が複雑化する」と言われる中で、関係者には結核対策におけるそれぞれの役割が求められる。当センターでは日ごろより保健所と連携を取り監視を強化し、結核情報の集約及び発信の中核として、今後もより有益で精度の高い結核情報を作成し、結核対策の推進に役立つような情報提供を心がけていきたい。

本報告の一部は、秋田県公衆衛生学雑誌第 8 巻第 1 号（p9-21）の内容を引用している。

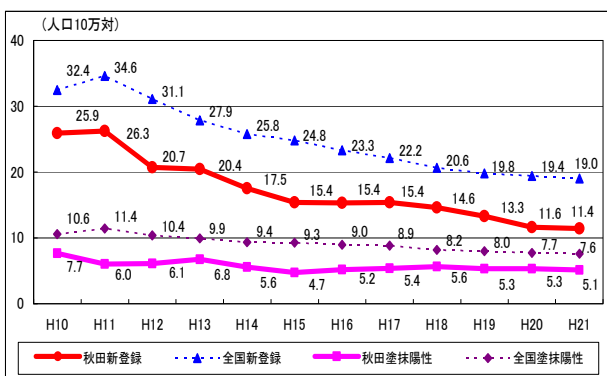


図1 新登録罹患率及び喀痰塗抹陽性肺結核罹患率の推移 (秋田県と全国、平成10~21年)

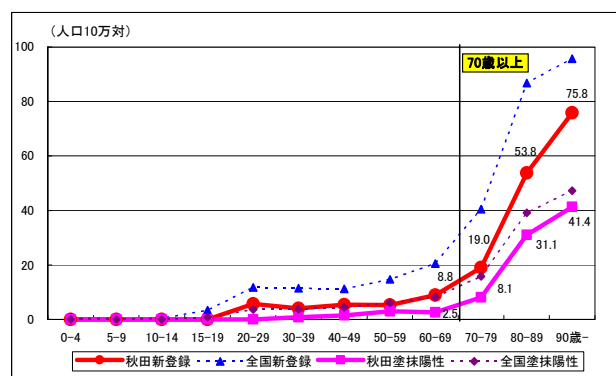


図2 年齢階級別新登録罹患率及び喀痰塗抹陽性肺結核罹患率 (秋田県と全国、平成21年)

感染症法に基づく感染症対策事業

2 平成23年2月に発生した*Shigella boydii* 4 感染事例について

○八柳 潤 今野貴之 高橋志保 熊谷優子 和田恵理子 千葉真知子 齊藤志保子

【背景と目的】細菌性赤痢（以下赤痢）は感染症法に基づく三類感染症に分類され、患者および無症状病原体保有者が届出対象（疑似症患者は対象外）である。終戦後には10万人を超えていた我が国の赤痢患者数は1960年代半ば頃から減少し、近年は毎年数100名で推移している。赤痢の病原体は*S. dysenteriae*, *S. boydii*, *S. flexneri*, *S. sonnei*の4菌種である。赤痢の推定感染地は国外が過半数を占めており、検出される赤痢菌は*S. sonnei*が最も多く、*S. flexneri*がそれに続き、*S. dysenteriae*と*S. boydii*は稀である。赤痢菌は感染症の病原体だけではなく、1999年の改正食品衛生法施行規則により食中毒の病因物質にも指定された。実際、2001年に韓国産カキを原因とする広域*S. sonnei*食中毒が発生している。

近年の患者減少により、赤痢は「過去の伝染病」と捉えられがちであるが、赤痢菌は腸管出血性大腸菌と同様に、微量の菌により感染が成立するため感染が拡大しやすく、特に小児や高齢者では重症化しやすいことから、現在においても深刻な感染症であることには変わりはない。

2011年2月、由利本荘保健所管内でインドネシア帰りの下痢患者から国内では稀な赤痢菌である*S. boydii* 4が分離された。本発表では赤痢対策のための啓発に資することを目的として、国内と秋田県における赤痢発生状況を概説すると共に、由利本荘保健所管内で発生した*S. boydii* 4感染事例の概要と細菌学的特徴、当センターで実施した遺伝子診断法を併用する赤痢菌の迅速同定検査の概要を報告する。

【方法】

1. 国内と秋田県における赤痢発生状況

赤痢患者発生状況は、感染症サーベイランス患者情報から集計した。

2. 患者家族の行政検査

由利本荘保健所が採取した患者の父、母、妹、患者本人の糞便を赤痢検査に供した。赤痢菌の分離培養にはSSとDHL培地を使用し、赤痢菌の病原性を司る組織侵入性遺伝子（InvE）を標的としたPCRにより赤痢菌が疑われる株を特定した。赤痢菌と大腸菌の鑑別はキシロースからの酸産生、グルコースからのガス産生、酢酸塩利用、運動性を指標として実施した。

3. 分離された赤痢菌の薬剤感受性

赤痢の治療に推奨されているシプロフロキサシン(CPFX)、ノルフロキサシン (NLFX)、ホスホマイシン (FOM)に加えて、近年耐性赤痢菌が報告されているテトラサイクリン (TC)、アンピシリン (ABPC)、ナリジクス酸 (NA) など、計11薬剤に対する感受性を検討した。

【結果と考察】

1. 国内と秋田県における赤痢発生状況

表1に、感染症法が施行された1999年(4月)から2011年4月20日現在の国内と秋田県における赤痢患者報告数を示す。全国では毎年180から844名の患者が発生している。秋田県ではこの間に23名の患者発生報告があり、原因菌は*S. flexneri*が最も多く(16/23事例)、*S. sonnei*がそれに次いだ(4/23事例)。*S. boydii*による事例は今回を含めて2事例発生している。国外感染事例は5事例(インドネシア2, インド2, 中国1)のみであり、15事例が国内感染事例であった(3事例は不明)。また、8例が血便などを伴う重篤な症例であった。以上のように、秋田県では全国の傾

表1 1999年4月から2011年4月20日現在の赤痢発生報告

年	1999	2000	2001	2002	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
全 国	620	843	844	699	594	553	373	452	320	180	235	63
秋田県	5	5	0	3	1	3	0	4	1	0	0	1

(1999年は4月-12月、2000年から2010年は1月-12月、2011年は1月-4月20日の患者数)

向とは異なり、赤痢は国外感染事例よりも国内感染事例が多く、原因菌も国内で最も多いとされる*S.sonnei*ではなく*S.flexneri*が最も多いという特徴が認められた。これらの特徴が何に起因するのかは不明であるが、秋田県に特徴的な感染源や感染経路等が関与する可能性も推察され、興味をもたれる。

2. *S.boydii* 4感染事例の概要

患者は、家族と共に冬休みの間インドネシアに滞在した。滞在中に母、妹、患者本人（1月8日から）が有症状となった。1月14日に帰国した後、患者は17日から登校した。本人は水様下痢から軟便となったが、症状が軽かった妹と共に1月28日に由利本荘市内の開業医を受診した。担当医は患者の糞便検体の外注検査を依頼し、その5日後の2月2日に赤痢菌分離陽性の結果に基づいて赤痢患者発生届けがなされた。なお、その検査で妹は陰性であった。

3. 当センターで実施した家族検査の概要

2月3日に由利本荘保健所が採取した患者の父、母、妹、そして患者本人の糞便を、常法に従い、SS培地とDHL培地で分離培養した。翌2月4日、平板上に発育した菌苔からDNAを抽出し、赤痢菌の病原性を担う*invE*遺伝子をPCRにより検索したところ、患者本人のみ陽性となったことから、次に平板上の個々のコロニーを対象として*invE*遺伝子保有株を検索した。その結果、同日午後に*invE*遺伝子保有株を特定し、当該コロニーが*S.boydii* 4に血清型別されることを確認した。赤痢菌の抗原は大腸菌と交叉反応する場合があることから、この菌が赤痢菌であるかどうかを確認するため、当該分離株を赤痢菌と大腸菌の鑑別のためのキシロースからの酸産生、グルコースからのガス産生、酢酸塩利用、運動性試験用培地に接種し、確認培養した結果、翌2月5日に当該菌が*S.boydii* 4であることが確定した。

4. 分離された赤痢菌の薬剤感受性

患者から分離された*S.boydii* 4は、赤痢の治療に推奨されているCPFX, NLFX, FOM全てに感受性であった。また、ABPCとセファロチンに耐性を示したが、セフトジジムには感受性であったことから、狭域βラクタマーゼのみを産生しているものと考えられた。

赤痢菌は腸管出血性大腸菌と同様に、微量の菌により感染が成立するため、感染が拡大しやすく、健康被害が生じやすい。赤痢の感染予防策としては、十分な加熱調理や石鹼による手洗いの励行が基本であり、二次感染を防ぐためには、患者や無症状病原体保有者を早期に探知して治療することが重要である。このため、赤痢菌を迅速に検査することが感染拡大防止上非常に重要である。今回、*S.boydii* 4患者家族の検査に遺伝子診断法の併用することにより、当センターでは2日で完了することができた。

秋田県においては、赤痢の発生頻度が低下し、全く発生をみない年もあるが、赤痢は未だに駆逐されてはいない深刻な感染症である。このように、発生頻度が低下した感染症の検査技術の維持は、困難となりつつある。このような感染症の対策に資するためには、遺伝子診断法などの最新技術を導入・応用することにより行政検査の迅速性と正確性を向上させるための研究を継続して実施することが重要である。

【まとめ】

発生頻度は低下したものの、赤痢は現在でも深刻な感染症である。秋田県では1999年以降、23事例の赤痢が発生し、重篤例も散見される。国内の一般的傾向とは異なり、秋田県では国外事例よりも国内感染事例が多く発生し、国内で最も多い*S.sonnei*ではなく、*S.flexneri*が原因菌として最も多いという特徴が認められたことから、秋田県における赤痢の感染疫学を検討することが今後の課題と考えられる。本年の2月2日に、国内でも稀な*S.boydii* 4感染事例が発生した。本事例はインドネシアにおける国外感染事例であった。患者家族の行政検査に遺伝子診断法を併用することにより、医療機関の外注検査では5日を要した検査を2日で完了することができた。赤痢など、重大な感染症の対策に資するためには、遺伝子診断法などの最新技術を導入・応用し、行政検査の迅速性と正確性の向上を図るための基礎的研究を継続して実施することが重要であると共に、秋田県における稀な赤痢菌による感染事例の探知に遅滞等をきたさないよう、医療機関との密接な連携を保つことが重要と考えられる。

食品の食中毒菌汚染実態調査（平成20～22年度）

3 秋田県における食品の食中毒菌汚染実態調査結果について

○高橋志保 今野貴之 熊谷優子 八柳 潤 和田恵理子 千葉真知子
齊藤志保子

【はじめに】

細菌性食中毒事例は、平成10年をピークに減少傾向にあるものの、ここ数年間の患者数は毎年1万人前後報告されており、食中毒菌は依然として健康被害をもたらしている。これまでの食中毒の発生状況等を踏まえ、厚生労働省では汚染食品の排除等、食中毒発生の未然防止対策を図るため、流通食品の汚染実態を把握することを目的として、平成10年度から食品の食中毒菌汚染実態調査を行っている。秋田県ではこの調査に平成20年度から参加しているほか、秋田県食品衛生監視指導計画に基づいた食品等の収去検査も実施している。

今回、秋田県における食中毒菌汚染実態調査、および近年の食品収去検査から、健康被害発生の要因と推察される結果が得られたので報告する。

【対象と方法】

・食中毒菌汚染実態調査

秋田市内に流通している野菜類（もやし、そばの芽、カイワレ、ブロッコリースプラウトなどの水耕栽培されたもの、カット野菜、白菜や大根等の漬物用野菜）、ミンチ肉、牛レバー、牛結着肉、食肉加工品（ローストビーフ、牛たたき、蒸し鶏など）、生食用食肉（馬刺し）、漬物など、平成20年度は79検体、平成21年度と平成22年度は100検体ずつ、計279検体を対象として検査を実施した。

検査項目は、大腸菌、腸管出血性大腸菌O157及びO26、サルモネラ属菌、カンピロバクター・ジェジュニ／コリである。ただしカンピロバクターについては、鶏肉及び牛レバーのみを対象とした。

検査法は、食中毒菌汚染実態調査実施要領に定められた方法に従って行った。

・食品収去検査

秋田県の食品等の検査計画に基づき、大館、大仙保健所管内で収去された鶏肉（食鳥肉）を対象とし、サルモネラ属菌、カンピロバクターについて検査を実施した。検査法は、秋田県検査実施標準作業書に従った。

【結果】

1. 細菌性食中毒事例の発生状況について

食中毒統計によると、細菌性食中毒事例発生件数は、平成10年には2,600件を超えていたが、ここ数年は1,000件を下回り、平成22年は580件であった。10年余りで5分の1程度にまで減少しているが、カンピロバクターによる食中毒事例数は横ばい状態が続いており、近年は全体の6割前後を占めている。また、発生件数も平成15年以降1位となっている。

サルモネラ属菌による食中毒事例は、ピーク時よりは減少しているものの、現在に至ってもなお、年間100件近く発生しており、事件あたりの患者発生数も比較的多いことから、患者数は常に上位である。

2. 食品の食中毒菌汚染実態調査結果について

平成20～22年度における秋田県の調査結果を表1に示す。大腸菌はすべての検体種から検出されたが、その検出率は検体種により大きく異なり、野菜類では15.8%、調理済みの食肉加工品を除く生の食肉類は80～100%であった。腸管出血性大腸菌O157及びO26は、いずれの検体からも検出されなかった。サルモネラ属菌は鶏ミンチ肉からのみの検出であったが、検出率は59.6%と非常に高率であった。陽性となった34検体すべてから、血清型O7群が分離され、そのうちの1検体からは同時にO4群も分離された。カンピロバクターは、鶏ミンチ肉から 40.4%、牛レバ

ー（加熱調理用）から5.0%検出された。本調査は、全国19自治体で実施されており、国内における汚染実態が明らかになっているが、調査結果は秋田県と同様の傾向を示しており、鶏ミンチ肉からのサルモネラ属菌とカンピロバクターの検出率は高く、生食用として販売されている鶏たたきからも両菌が検出されている。

3. 県内における食品収去検査結果について

平成17～22年度の陽性検体数は、大館保健所管内では全70検体中、サルモネラ属菌が1検体、カンピロバクターが2検体、大仙保健所管内では全31検体中、サルモネラ属菌が4検体、カンピロバクターが2検体であった。検出されたサルモネラ属菌の血清型は、3/5株がO7群であった。

【考察】

食中毒菌汚染実態調査では、大腸菌はあらゆる食材から検出されており、調理の前後において、しっかりと衛生管理を行うことが重要である。食肉類は全般的に汚染の度合いが高く、鶏ミンチ肉からは高率にサルモネラ属菌やカンピロバクターが検出され、また、収去検査の鶏肉からも両菌が検出されている。このように汚染された鶏肉が、依然として両菌による食中毒事例を発生させる原因のひとつと考えられる。さらに、サルモネラ属菌に着目すると、汚染実態調査と収去検査で高率に検出されたO7群が、県内の散発下痢症患者からも高率に検出されており、食品汚染と健康被害発生の関連が伺われる。

鶏肉を原因とした健康被害発生の要因として、鶏肉の調理の際、手指や調理器具の洗浄不足などによる他の食材への二次汚染や、食の嗜好の変化により、鶏わさや鶏たたきなど、内部まで火を通さずに食品を喫食する機会が増えていることなどが考えられる。

鶏は、飼育段階ですでに保菌している場合が多く、その後の加工処理、流通、消費といった全ての過程において汚染が拡大する可能性がある。汚染を低減させるためには、関係各所との連携を図ることも重要である。

【まとめ】

本調査から、県内で流通している鶏肉がサルモネラ属菌とカンピロバクターに高度に汚染されている実態が改めて浮き彫りとなった。このデータを、食品関連事業者だけでなく、一般消費者への衛生指導の一環として活用してもらい、取り扱いや調理における衛生管理の必要性、食肉の生食による細菌感染の危険性を周知することで、食品衛生に関する知識と理解を深めてもらう必要がある。それが結果として、秋田県における食中毒予防対策につながるものと考えられる。

表1 秋田県の食中毒菌汚染実態調査結果（平成20～22年度）

検体種類	検体数	大腸菌		サルモネラ属菌		腸管出血性大腸菌 (O157、O26)		カンピロバクター・ ジェジュニ/コリ	
		陽性数	%	陽性数	%	陽性数	%	陽性数	%
野菜類	95	15	15.8	0	0	0	0	—	—
ミンチ肉	牛	6	100	0	0	0	0	—	—
	豚	5	100	0	0	0	0	—	—
	鶏	57	100	34	59.6	0	0	23	40.4
牛レバー(加熱調理用)	20	17	85.0	0	0	0	0	1	5.0
牛結着肉	25	20	80.0	0	0	0	0	—	—
食肉加工品	38	4	10.5	0	0	0	0	—	—
生食用食肉(馬刺し)	3	3	100	0	0	0	0	—	—
漬物	30	1	3.3	0	0	0	0	—	—
計	279	128		34		0		24	

(—は検査対象外)

食中毒対応のための非定型的下痢原性大腸菌侵淫実態の解明（平成21～22年度）

4 秋田県における非定型的下痢原性大腸菌の分離状況と *astA* 保有大腸菌（EAST1EC）の病原因子プロファイル

○今野貴之 八柳 潤 齊藤志保子

【はじめに】

ヒトに下痢を惹起させる大腸菌は下痢原性大腸菌と総称され、病原性の違いにより腸管出血性大腸菌（EHEC）、腸管病原性大腸菌（EPEC）、腸管侵入性大腸菌（EIEC）、毒素原性大腸菌（ETEC）、腸管集合性大腸菌（EAggEC）の5つに大別される。しかしながら、最近の研究により大腸菌の新たな病原因子となりうる種々の遺伝子が報告され、必ずしも上記の5つにあてはまらない病原型の大腸菌の存在が示唆されている。これらの大腸菌によって食中毒等が発生した場合には、原因不明となり適切な衛生改善指導や医療機関における治療法の選択等に支障をきたす可能性があり、問題となっている。今回、*astA* 保有大腸菌（EAST1EC）、分散接着性大腸菌（DAEC）および細胞剥脱性大腸菌（CDEC）といった非定型的下痢原性大腸菌について紹介するとともに、県内における分離状況を報告する。

また、特に EAST1EC はこれまでに数例の集団下痢症事例の報告があるにも関わらず、分離される菌株によって病原性が異なり、その下痢原性に関しては賛否両論がある。今回、我々は EAST1EC の病原性には *astA* 以外の病原因子も関わっていることを予想し、県内で分離された EAST1EC に関して、DAEC や CDEC の病原因子も含め、これまでに下痢原性大腸菌で報告されている様々な病原因子の保有状況を調査したので、その概要を報告する。

【対象と方法】

1. 非定型的下痢原性大腸菌の同定

EAST1EC は通常の下痢原性大腸菌の持つ主要な病原因子を持たず、EAST1 遺伝子（*astA*）を持つ大腸菌として定義される。そのため、EAST1EC の同定には、PCR 法により *astA* の検出を行うと同時に、各下痢原性大腸菌の主要な病原因子、すなわち腸管出血性大腸菌の VT、腸管病原性大腸菌の *eaeA*、腸管侵入性大腸菌の *invE*、毒素原性大腸菌の ST 遺伝子および LT 遺伝子、腸管集合性大腸菌の *aggR* を標的にした PCR を行い、各病原因子の保有の有無を確認した。DAEC および CDEC については、病原性の指標となる溶血性ととも、病原因子と推定されている *daa*、*aid*、*cdtB* および *hlyA* について PCR による検出を行った。

2. EAST1EC の病原因子プロファイリング

表 1 に示した 12 種類の病原因子について PCR により検出を行った。

【結果と考察】

1. 非定型的下痢原性大腸菌の分離状況

EAST1EC に関しては、平成 19 年から平成 21 年までに県内の医療機関等から送付された下痢原性大腸菌疑い株 2,168 株を対象に調査し、平成 19 年に 833 株中 7 株、平成 20 年に 725 株中 15 株、平成 21 年に 610 株中 13 株を同定した。

DAEC および CDEC については、平成 22 年に同様に得られた下痢原性大腸菌疑い株 769 株のうち、各下痢原性大腸菌の主要な病原因子を保有せず、溶血性の確認された 55 株を対象に共通の病原因子である *hlyA* の検出を行い、28 株についてその保有を確認した。しかしながら、その 28 株については特徴的な病原因子である *daa*、*aid* および *cdtB* が検出されず、DAEC および CDEC に該当する菌株は確認されなかった。

2. EAST1EC の病原因子保有状況

EAST1EC として同定された 35 株について、表 1 に示した 12 種類の病原因子の保有状況を調査し、その結果を表 2 にまとめた。

35 株中 23 株で付着性に関わる病原因子を検出した。そのうち、最も高率に確認された *lpfA* は、特に家畜との関連が指摘されている因子であり、EAST1EC が家畜由来の食品等による食中毒を起こしうることを示唆された。また、複数の菌株で確認された *iha*, *pilS*, *pic* は EHEC や EAggEC において細胞付着性への関与が指摘されており、EAST1EC の付着因子として注目される。1 株で検出された *aah* は特定の DAEC において付着性を発揮するために必須の因子であることから、EAST1EC と DAEC には何らかの関係

がある可能性がある。また、*hlyA* は腸管外感染を起こす大腸菌にみられる病原因子の一つであるが、DAEC や CDEC では下痢との関係が指摘され、腸粘膜細胞の機能変化を引き起こす作用があることが示されている。そのため、*hlyA* は EAST1EC の毒性を強める可能性がある。さらに、多くの株がヒトの体内での増殖に必要な *irp2* を持ち、*iha*, *pilS*, *pic* および *hlyA* を保有する株は共通してこの因子を持ち合わせていた。特定の病原因子のセットを持つ菌株のみがヒトへの病原性を持つと推定すると、*astA* に加えて、*irp2* および *iha*, *pilS*, *pic*, *hlyA* といった病原因子は EAST1EC 分離株の病原性に関与した可能性がある。

最後に、全国の食中毒統計によると、未だ 1 割程度が原因不明となっている。また、散発の下痢症患者では原因菌が特定できないことも少なくない。本研究が、それらの解決の一助となれば幸いである。

【まとめ】

本調査研究により、非定型の下痢原性大腸菌の一つである EAST1EC の秋田県での分離が確認された。また、EAST1EC の病原因子プロファイリングは、今後の病原性解明や食中毒等の発生時の病原性の指標としての活用が期待される。

表 1 対象病原因子と特徴

関連する病原型	病原因子	関連する病原性
EHEC	<i>iha</i>	IrgA homologue adhesin
	<i>lpfA</i>	Long polar fimbriae
EPEC	<i>ldaG</i>	LDA afimbrial adhesin
EAggEC	<i>pilS</i>	TypeIV pilus major subunit
	<i>pet</i>	Plasmid encoding toxin
DAEC	<i>pic/shET1</i>	Mucinase/Shigella enterotoxin I
	<i>irp2</i>	Siderophore
	<i>daa</i>	F1845 fimbriae
CDEC	<i>aah</i>	AIDA adhesin
	<i>aid</i>	AIDA adhesin
DAEC/CDEC	<i>cdtB</i>	Cytolethal distending toxin
	<i>hlyA</i>	α -hemolysin

表 2 EAST1EC の病原因子プロファイル

年	菌株No.	血清型	病原因子												
			<i>iha</i>	<i>lpfA</i>	<i>ldaG</i>	<i>pilS</i>	<i>pic</i>	<i>pet</i>	<i>irp2</i>	<i>daa</i>	<i>aah</i>	<i>aid</i>	<i>cdtB</i>	<i>hlyA</i>	
2007	EC11592	1	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
	EC11628	UT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	EC11651	125	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
	EC11805	125	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	EC11935	115	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
	EC11969	18	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	EC12331	6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
	2008	EC12397	8	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		EC12434	18	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		EC12491	153	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC12535		20	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
EC12580		8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
EC12584		153	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EC12596		151	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
EC12685		74	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
EC12713		166	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EC12790		UT	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EC12817	125	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
EC12908	8	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
EC12939	6	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-		
EC13008	UT	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
EC13109	1	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
2009	EC13115	27	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	EC13273	UT	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	EC13290	8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	EC13334	1	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	
	EC13353	UT	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
	EC13395	167	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	EC13404	166	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	EC13475	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	EC13509	153	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	EC13539	UT	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
EC13574	6	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+		
EC13584	UT	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
EC13612	6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

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）

5 食品検体のノロウイルス検査を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発

○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

*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

【背景と目的】

平成22年の食中毒統計によると、全国で1年間に1,254例の食中毒事例が発生し、その内3割に相当する399例がノロウイルス（NoV）によって引き起こされている（原因物質の第1位）。同様に患者数においても、全食中毒被害者25,972名の過半数に相当する13,904名がNoVの感染によるものである。このように、ウイルス性食中毒の大部分を占める原因物質がNoVであることが判明しているにもかかわらずカキ以外の一般的な食品からウイルスを検出できた例はほとんど報告されていない。そのため、具体的な汚染ルートの解明が困難で予防対策においても決め手を欠いているのが実状である。NoVは未だ実験室内で培養する技術が確立していないため、それを検出するためには検体に含まれるウイルスの遺伝子をPCR法により直接増幅する必要がある。患者検便の検査においては十分な成績が得られている一方で、食品検体の場合は検便と比べてウイルス量が希薄であるため、多くの夾雑物を除去しながらPCR法に用いる段階まで精製・濃縮して遺伝子を抽出することは非常に困難である。現行では、一応のプロトコルとしてポリエチレングリコール沈澱法（PEG沈澱法）が用いられているが、本来は水検体の濃縮に使われる手法であって、炭水化物・脂質・蛋白質等からなる食品残渣を含む検体に対しては多大な手間を要する割に有効性は低い。本研究では、固形・液状・練り物・油物等、どのような食品であってもNoV検査を可能とすることを目指し、抗体によるウイルス粒子の特異的捕獲を基本原理とするパンソルビン・トラップ法（パントラ法）の開発を進めている。

【方法】

添加回収試験に用いるモデル食品として、市販されているポテトサラダと焼ソバを、NoV-GII/4型を含む糞便で汚染させたものを用いた。汚染食品10gを50mlの洗浄液（0.1M Tris・HCl-0.5M NaCl-0.1%Tween20, pH8.4）に懸濁させた後、3,000rpm 30分の遠心で固形物を除去した（このとき、上清が濁っていても問題は無い）。食品の遠心上清にNoV-GII/4型に対するウサギ抗血清を加えてNoV粒子と抗体の複合体を形成させ、そこにパンソルビン（黄色ブドウ球菌をホルマリン固定し、熱処理したもの）を加えた。黄色ブドウ球菌表面に存在するプロテインAは抗体成分であるIgGと強固に結合する性質があるため、この段階で菌の表面に抗体を介して大量のNoVが吸着した構造が出来上がることになる。NoVを吸着した菌体を3,000rpm 20分の遠心で回収し、少量の緩衝液で再懸濁したものをフェノール/クロロホルム混液で溶媒抽出した。水層に含まれるRNAを市販精製キットである「QIAamp Viral RNA Mini Kit」を用いて精製し、60μlのRNA抽出液を得た。抽出したRNAから、逆転写反応によってcDNAを合成し、リアルタイムPCR法によってNoVのコピー数を測定した。

次に、ゴボウサラダ、れんこんのきんぴら、マカロニサラダ、鶏五目煮、ナポリタン、ポテトサラダ、まぐろ刺身、きのこの白和えについて、パントラ法（上記）と現行手法であるPEG沈澱法による添加回収試験を行い、回収率を比較した。PEG沈澱法は3,000rpm 30分の遠心で固形物を除去した上清にポリエチレングリコール6000を10%、NaClを1Mになるように添加し、4℃で1晩静置した後、10,000rpm 20分の遠心でウイルス粒子を凝集塊として回収する方法である。

また、実際の事例において食品検体を扱う場合は、通常リアルタイムPCR法より感度の高いnested PCR法（二重PCR法：定性試験となる）が用いられることを想定し、段階希釈により汚染レベルの異なるモデル食品を作成し、検出限界について評価を行った。

【結果】

1. 食品検体からの回収率

食品 1 g 当たり 8.17×10^4 コピーの NoV-GII/4 型を含む汚染モデル食品を用いた NoV の回収率は、3 回の繰り返し実験の結果、ポテトサラダで $78.3 \pm 10.8\%$ 、焼きソバで $81.5 \pm 10.2\%$ であった。抗体を添加しなかった場合は、それぞれ $0.33 \pm 0.08\%$ と $1.15 \pm 0.25\%$ であり、抗原抗体反応によるウイルス粒子の捕獲が理論どおりに成立していることがわかる。

2. PEG 沈澱法との比較

PEG 沈澱法で得られた回収率を 1 とした場合、パントラ法による回収率はゴボウサラダ 1,000 倍、れんこんのきんぴら 840 倍、マカロニサラダ 240 倍、鶏五目煮 39 倍、ナポリタン 17 倍、ポテトサラダ 15 倍、まぐろ刺身 3.4 倍、きのこの白和え 2.0 倍であった。試験工程に要した時間は、PEG 沈澱法では 1 晩の凝集反応も含めると 2 日に及んだのに対し、パントラ法では 4 時間であった。また、PEG 沈澱法は 10,000 rpm の遠心条件を確保するために専用チューブを用いる高速冷却遠心機が必要であったが、パントラ法は 3,000 rpm の遠心で済むため一般的な検査室に通常設置されている遠心機で行えた。

3. 検出限界に関する評価

段階希釈によって汚染レベルの異なるモデル食品を作成し、高感度な nested PCR 法を用いた場合、ポテトサラダと焼きソバのいずれも食品 1 g 当たり 10 コピーの汚染まで検出できた。

【考察】

新規開発のパントラ法を用いることで、どのような食品であっても共通の工程でノロウイルス検査を進めることが可能となった。本法の直接的な効用としては食中毒事例発生時の原因究明に役立つということになるが、次のような波及効果が期待できるためウイルス性食中毒の予防対策に幅広く寄与するものと考えられる。

1. 本法が全国的に普及し、食品から NoV を検出した事例が蓄積されることで詳細なリスクプロファイル（汚染しやすい食材や調理工程の明確化）を作成することができ、それを食品業界に提供することで、具体的な食中毒防止対策になる。
2. 現行では汚染した食品が流通していた場合であっても、疫学調査の結果のみでは回収命令を出すことは難しい（カイワレダイコン事例に関する判例による）が、本法によって NoV を検出できれば被害の拡大を防ぐことができる。
3. 本法が民間検査会社でも使用できるようになれば、食品業界における自主検査も可能になるため、食中毒防止に向けた取り組みを促すことにつながる。

本研究の今後の展開として、抗体とパンソルビンの安定供給を実現すること、及び NoV-GII/4 型以外の食中毒原因ウイルス（NoV の他の型、サポウイルス、A 型肝炎ウイルス、アデノウイルス 41 型等）へ対応させることを予定している。最終的には厚労省通知法として公式に行政レベルで活用されることになる。

【まとめ】

1. NoV で汚染されたポテトサラダと焼きソバからの本法による回収率は約 80% であった。
2. 現行の PEG 沈澱法と比べて 2~1,000 倍（食品の種類による）の回収率が得られた。
3. 食品 1 g 当たり NoV 10 コピーの汚染レベルまで検出できた。
4. 本法の開発によって、食中毒事例発生時の原因究明が容易となる他、様々な波及効果によって食中毒の予防につながるものと考えられた。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
6 雄物川流域におけるツツガムシ生息調査と地元自治体との協力による感染予防対策について

○佐藤寛子 藤谷陽子 斎藤博之 安部真理子 千葉真知子 寺邑能実*¹ 高橋守*²
藤田博己*² 角坂照貴*² 高田伸弘*² 川端寛樹*² 安藤秀二*² 高野愛*²
*¹花園病院 恙虫病研究所 *²厚生労働科学研究班

【背景と目的】

夏季に発生する古典型ツツガムシ病は強毒力とされる血清型Katoの*Orientia tsutsugamushi* (Ot) によるものである。アカツツガムシが媒介する本病は、近年、全国的に患者発生がなく、Kato型Ot分離報告もなかったため、アカツツガムシは絶滅したとも言われていた。ところが2008年8月、秋田県では15年ぶりに古典型ツツガムシ病と確認された患者が発生した。このことを受け翌2009年～2010年、感染推定地点である大仙市雄物川河川流域におけるツツガムシ生息状況の確認とツツガムシ病の啓発を目的に地元自治体との協力により調査を実施したので報告する。さらに、自治体からの相談を受け薬剤によるツツガムシ防除試験（予備調査）を実施したので、その経過を報告する。

【方法】

1. 調査時期と地点

平成21年：計4回（4月～8月），平成22年：計7回（8月～11月）

調査地点：大仙市大曲角間川（河川敷：感染推定地点），雄物川河川敷緑地運動公園
大曲橋上流部河川敷，姫神橋上流部河川敷

2. 調査方法

シャーマントラップを用いた野鼠生け捕りと黒布見取り法によるツツガムシ幼虫の直接採取を実施した。

3. Otの検索

1) 野鼠血清抗体価の測定

須藤の方法（臨床とウイルス. 11; 25-28. 1983）による間接免疫ペルオキシダーゼ法に準じてOt 6抗原（Gilliam, Karp, Kato, Irie/Kawasaki, Hirano/Kuroki, Shimokoshi）に対する抗体価を測定し、抗体価10倍以上を示した場合を陽性と判定した。

2) 野鼠脾臓からのOtのDNA検出と分離

野鼠脾臓は磨砕した後、SPG（sucrose phosphate-glutamic acid）液で10%乳剤とし、この試料についてICRマウス（8週齢）へ接種した。発症が認められたマウス脾臓は乳剤とし、これをL929細胞に接種、2代まで継代培養を行いOtの分離を試みた。さらに、野鼠とマウス脾臓乳剤はPCRを行った。PCRはQIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN社）を用いてDNA抽出を行い、これを鋳型としてOtの56 kDa外膜蛋白遺伝子を標的にしたFuruyaらの方法（J.Clin.Microbiol. 29; 2628-2630. 1991）に準じた。

4. 薬剤によるツツガムシ防除試験

防除試験はツツガムシが多く生息することを確認した大曲橋上流部河川敷において実施した。使用薬剤は大仙市指定薬剤サフロチンVP乳剤[®]（プロペタンホス）に加え、シャットアウトSE[®]（エトフェンプロックス・カルバリル），消石灰の3種をそれぞれ9 m²に散布，1～2週間後に効果の判定を黒布見取り法により試みた。

【結果】

1. 野鼠の捕獲およびツツガムシ採取の結果

2009年～2010年の野鼠捕獲総数は56匹であり，種別ではアカネズミ41匹とハタネズミ15匹で

あった。野鼠に咬着していたツツガムシは3属6種であった。その内訳はフトゲツツガムシ224, アカツツガムシ899, アラトツツガムシ43, ヒゲツツガムシ45, タミヤツツガムシ110, サダスクガーレップツツガムシ2であった。なお、アカツツガムシは患者感染推定地と河川敷運動公園, 大曲橋上流部（キャンプ場）における7月～10月の調査で捕獲野鼠と地表に認められた。

2. Otの検索結果

捕獲した野鼠の中でOtに対する抗体が陽性であったのは、2009年7月～8月に捕獲した10匹で、そのうち7月の2匹と8月上旬の3匹のアカネズミがGilliam型に対する抗体価が他型より有意に高く、8月上旬に捕獲した2匹のハタネズミがKato型に対する抗体価が有意に高かった。また、PCRおよび培養により4株のOt（Gilliam：2, Kato：1, Karp：1）が検出, 分離された。さらに、Kato型とGilliam型に重複感染していた野鼠が1個体確認された。

3. 薬剤散布によるツツガムシ防除試験

事前調査により、各調査地点の薬剤散布前のツツガムシ生息数は9 m²あたり50個体前後と想定されたが、散布後1週間には0となった。しかし、調査期間中、台風による増水等があったことから正確な結果判定とはならなかった。

4. 啓発活動

著名観光スポットでもある河川敷運動公園とその近辺でKarp型, Gilliam型, Kato型の各Otを保有するツツガムシの生息が確認されたことから、秋田県内はもちろんであるが、ツツガムシに馴染みのない秋田県外の観光客が発症した場合に備え、全国の医療機関への警告が必要と考えた。そのため、秋田県感染症対策委員の須藤恒久秋田大学名誉教授を通じ、日本医師会、秋田県・市医師会報へ夏季のツツガムシ病に関する情報を掲載した。また、地元自治体へはツツガムシ防除についてアドバイスすると共に調査結果を逐一報告した。さらに、同市観光課と商工会議所の協力により観光パンフレット内に「虫刺されに注意」と題したツツガムシ病啓発文が掲載された。

【考察】

今回の調査により患者の感染推定地点とその周辺地域で多くのアカツツガムシの生息を確認し、捕獲した野鼠からアカツツガムシが特異的に保有するKato型を分離したことから、同地域には現在もOtを保有するアカツツガムシが生息していることが裏付けられた。また、感染推定地点より下流に位置する河川敷運動公園では毎年8月に全国から観光客が集まる大きなイベントが開催されているが、我々はその会場でも多数のアカツツガムシの生息を確認した。昭和51年以降の記録によれば、これまでイベントへの参加が感染要因とされているツツガムシ病患者が秋田県内では19人（主催者側スタッフ4人, 立ち入り業者1人, 観客14人）届出されている。その届出は平成3年を最後に途絶えていたが、平成20年の患者発生と今回の調査結果から再びイベント会場への立ち入りを原因とする患者が発生する可能性が懸念される。これを受け、地元自治体からツツガムシ病の啓発に加え、薬剤防除等について当センターに相談が持ちかけられた。そのため、我々は地元自治体指定の薬剤の防除効果を確認する簡易試験を実施したが、自然環境における実験は単年度で結果を明らかにすることは困難であった。安心できるイベント開催の為にも、今後、専門機関等における人体や自然環境に影響が少ない薬剤の開発や散布方法の検討が期待される。しかし、現在のところツツガムシ病患者の発生を防止するためにはツツガムシ病の啓発をすることが最も高い方法であると考えられる。

【まとめ】

今後も雄物川流域の調査を継続し、アカツツガムシの生息状況を把握すると共に、秋田県内はもちろん、全国的な夏季のツツガムシ病の周知と医療機関へ向けての情報提供が重要であると考えられる。さらに、地域社会へ情報をフィードバックすると共に当センターと関係機関が連携し、夏季のツツガムシ病の啓発と感染予防対策を継続することが重要と思われる。

健康危機管理に対応した食品中の化学物質検査体制の基盤強化に関する研究
(平成21~23年度)

7 GC/MS/MSを用いた残留農薬一斉分析について

○天明さおり 珍田尚俊*¹ 松田恵理子

*¹仙北地域振興局福祉環境部

【背景と目的】

平成 15 年の食品衛生法の改正により食品中に残留する農薬等についてポジティブリスト制度が導入され、規制対象となる農薬が大幅に増加した。これにより、多くの農薬を迅速かつ高精度で分析する手法が求められるようになった。当センターでは GC/MS 及び LC/MS/MS を用いて残留農薬行政検査を行っており、このうちの GC/MS では現在約 300 項目を測定している。多項目を分析するにあたり、測定時間の長さや解析時の夾雑成分の影響などいくつかの問題となる点がある。そこで、それらの解決を図り、更には分析項目の拡大に対応するため GC/MS/MS を新たに導入した。GC/MS/MS は GC/MS と比較して選択性に優れ、高感度である。

ここでは GC/MS/MS の装置特性を把握したのち、検量線に関する基礎的な検討を行ったので、その概要について報告する。

【方法】

1. 試薬および装置

試薬：農薬混合標準液 22, 31, 34, 48, 51(関東化学)、個別標準品 13 種(関東化学他)
ポリエチレングリコール 300(関東化学) (以下 PEG と表記する)
検討対象項目は 313 項目(異性体を含む)とした。

装置：TSQ Quantum XLS (Thermo Fisher Scientific 社)

2. 実験方法

1) 測定条件の決定及び GC/MS との比較

はじめに GC 条件、MS 条件及び解析条件を決定した。その条件を用いて測定を行いピーク検出状況や測定効率等 GC/MS との違いを比較した。

2) GC/MS/MS に適した検量線作成方法の検討

GC 測定においてはマトリックス効果への対策が定量に影響を及ぼす。したがって下記の異なる 4 法で調製した検量線 (濃度は 0, 10, 20, 50, 100, 200 ng/mL) を測定し、直線性、感度、ピーク形状を比較した。試料マトリックス(前処理後の作物の抽出液)、PEG はいずれもマトリックス効果を補正する目的で用いた。また、各検量線の 100 ng/mL を 3 回繰り返し測定したのち RSD (%) を算出し、厚生労働省通知の『妥当性評価ガイドライン』を適用して評価を行った。

A 法：絶対検量線...標準溶液をアセトンで調製した検量線

B 法：マトリックス検量線...標準溶液を試料マトリックス(今回はトマト)で調製した検量線

C 法：PEG 検量線...A に PEG を 500 µg/mL となるように添加した検量線

D 法：PEG+マトリックス検量線...B に PEG を 500 µg/mL となるように添加した検量線

【結果】

1. 測定条件の決定及び GC/MS との比較結果

GC 条件は低沸点農薬の分離、MS 条件は高い感度が得られるモニターイオンの選定、解析条件はテーリングや異性体の扱い等に注目して検討を行い、対象とした 313 項目について各条件を設定できた。決定した測定条件を表 1 に示す。

GC/MS との大きな違いは、感度と選択性が向上したことにより 313 項目を半分ずつ 2 回に分けて測定していたのが 1 回で測定できるようになった点である。これにより、測定時間が短縮

された。また、測定に伴い装置内には食品中の夾雑成分による汚れが蓄積される。測定回数が半減したことにより、この汚れの軽減も期待できる。解析時においては、選択性が向上したことで夾雑成分による妨害の影響を受けにくくなり、解析時間の短縮や対象農薬ピークとの誤判別防止に有効であった。

表1 GC/MS/MS測定条件

カラム	VF-5ms (30 m×0.25 mm, DF=0.25 μm)
カラム温度	70°C(3min)-30°C/min-160°C(0min)-2.5°C/min -200°C(0min)-8°C/min-310°C(10min)
キャリアガス	He
注入法	パルススプリットス(注入時圧:200kPa)
注入口温度	250°C
注入量	1 μL
インターフェイス温度	290°C
検出器温度	260°C
検出方法	SRM

2. 検量線作成方法の検討結果

A～D法で調製した検量線のクロマトグラムおよび検量線の比較結果を表2に示す。A法は測定対象の大半の項目で検量線が二次曲線となり、ピーク形状や感度も他の3法より不良であった。B～D法では、感度はC法が他の2法よりも少し高い傾向を示した。3法とも大半の項目で検量線は直線となりピーク形状もシャープであったものの、C、D法がB法よりも多くの項目かつ広い検量線濃度域で良好な結果であった。これはC、D法に添加したPEGに起因すると考えられる。PEGの添加によりピーク形状の改善、感度及び検量線の直線性の向上等の効果が得られる。今回 Triadimenol-1.2, Tricyclazol, Uniconazole-P, Oryzalin, Bitertanol-1.2等の項目は顕著にそれらの効果を受けた。一方で Iprodione, Acrinathrin はPEGを添加しない場合よりも感度が低下し、Fluvalinate-1.2, Deltamethrin はピークが2つに割れるなどマイナスの効果を受けた項目もあった。

また、100 ng/mLでの繰り返し精度の評価においてRSD (%) が15%以内となったのは、313項目中A法が287項目、B法が293項目、C法が294項目、D法が296項目であり、A～D法に大きな差はみられなかった。以上の結果より、実試料のマトリックス状態に即し、なおかつPEGの添加がもたらす利点を活かしたD法がGC/MS/MSに適した検量線作成方法であると判断した。

表2 検量線作成方法の結果比較

	A法	B法	C法	D法
	絶対検量線	マトリックス検量線	PEG検量線	PEG+マトリックス検量線
試験溶液	アセトン	試料マトリックス(トマト)	アセトン	試料マトリックス(トマト)
PEG添加	なし	なし	あり	あり
ピーク形状・直線性	△	○	◎	◎
感度	最も低い	D法とほぼ同等	最も高い	B法とほぼ同等
100ng/mL(N=3) RSD(%)15%以内	287/313項目	293/313項目	294/313項目	296/313項目

【まとめ】

今回の検討を通してGC/MS/MSによる測定が分析精度や迅速性の向上に大きな役割を果たすことが確認できた。また、検量線の作成方法は標準溶液を試料マトリックスで調製したものにPEGを添加する方法が最も有効であった。今後は、一律基準レベルの低濃度においても同様に繰り返し精度の評価を行う必要がある。更に、他の作物でも実試料データを蓄積していく予定である。

【参考文献】

佐々野僚一他: GC/MSを用いた食品中残留農薬分析における検量線に関する検討, 農薬残留分析研究会講演要旨集, 31, 2008, 217-222.

環境省化学物質環境実態調査（平成14～21年度）

8 八郎湖の残留性有機汚染物質について

○玉田将文 小林貴司

【はじめに】

秋田県では、環境省委託事業である化学物質環境実態調査¹⁾に参加しており、平成元年から八郎湖の残留性有機汚染物質（POPs）について調査を実施している。本調査の目的は、POPs条約の対象・候補物質および化審法の特定・監視化学物質の環境残留状況と経年変化の把握である。本発表では、各都道府県と八郎湖における平成14～21年度調査について、POPs濃度の比較と八郎湖での残留状況を報告する。

【調査方法】

八郎湖にて水・底質試料を採取した。調査対象物質の測定は環境省委託機関で実施された。

【結果と考察】

八郎湖における平成14～21年度調査対象物質の水・底質試料中検出率は、44.4%（60/135）および77.2%（98/127）であり、PCB, HCB, DDT, HCH, Chlordane, PFOS, PFOA, PBDEs等が検出されている。このうちPCBはヒト発癌性・難分解性・生物蓄積性を有する非意図的生成物質、PFOSは難分解性・生物蓄積性により平成21年に新規物質として、共にPOPs条約に採択されているため、今後も継続して調査が実施される物質である。

PCB（ポリ塩化ビフェニル）：水・底質試料共に全調査地点で検出され、濃度範囲は12～11,000 pg/Lおよび17～5,600,000 pg/g-dryであった（図1および図2）。また八郎湖の水・底質試料濃度は、94～440 pg/Lおよび69～4,600 pg/g-dryの範囲であり、全調査年度で全国平均値を下回った。水・底質試料共に、都市部河口・港湾域試料濃度が比較的高い値を示している。

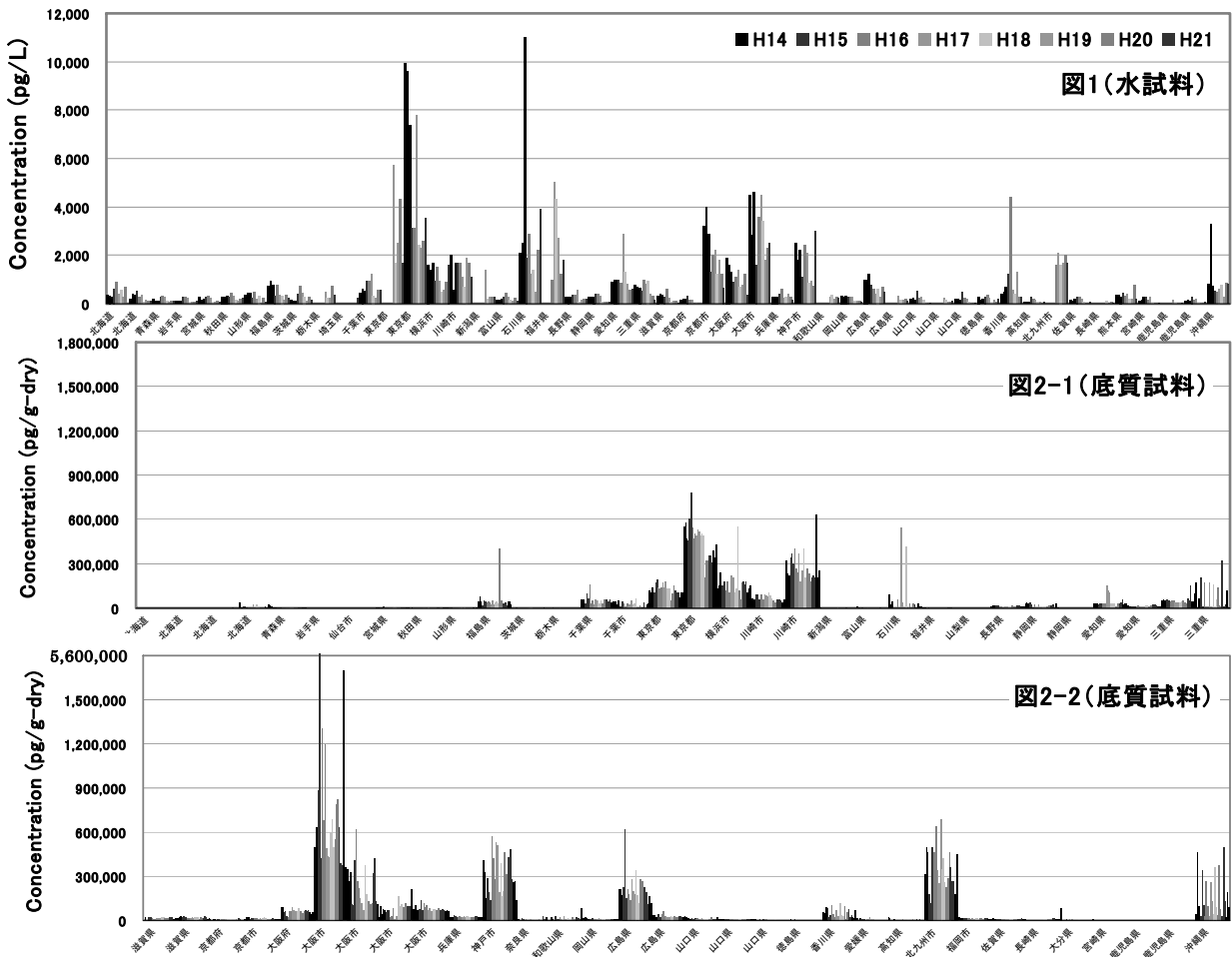


図1および図2 平成14～21年度調査における各都道府県の水・底質試料中PCB濃度

PFOS（ペルフルオロオクタンスルホン酸）：水・底質試料共に全調査地点で検出され、濃度範囲は26～24,000 pg/Lおよびnd～1,900 pg/g-dryであった（図3および図4）。八郎湖の水・底質試料濃度は、500～790 pg/Lおよびnd～99 pg/Lの範囲であり、全国平均値と同程度であった。

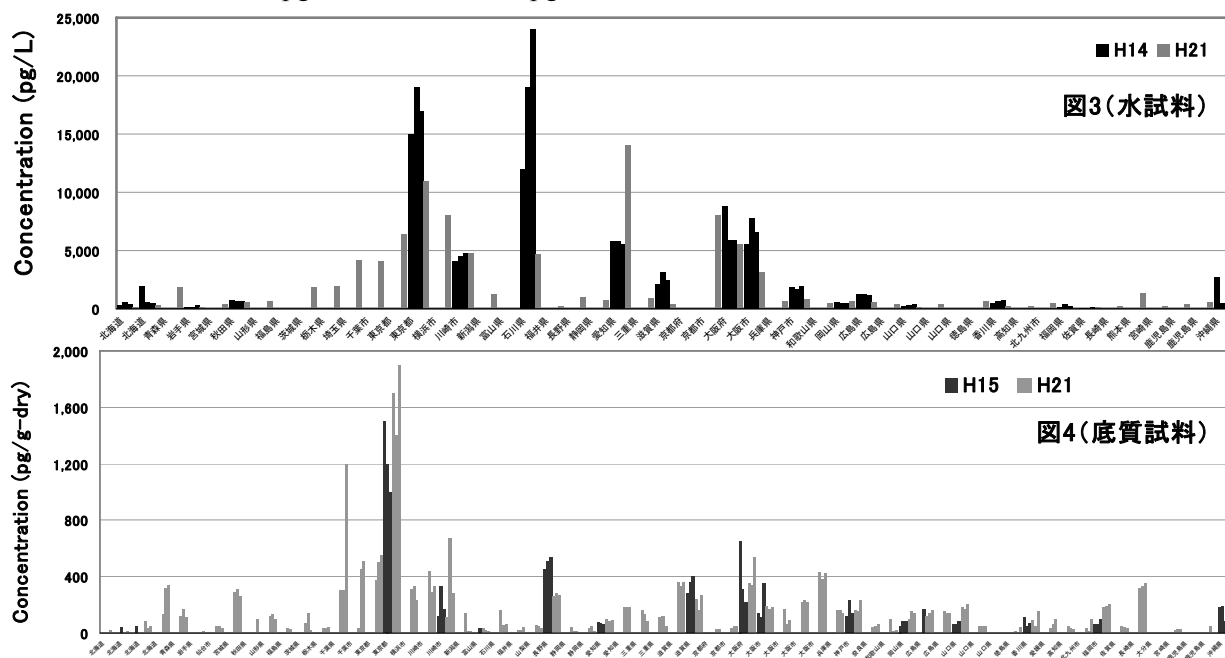


図3および図4. 平成14～21年度調査における各都道府県の水・底質試料中PFOS濃度

PFOSリスク評価：

PFOSは環境残留性および生物濃縮性が高く、環境水中や野生生物体内に広範囲に存在していることが報告されている²⁾。また八郎湖では年間約344tの漁獲量があり、魚類摂取によるヒトへのPFOS暴露の可能性が高いことから、ヒト健康リスク評価を行った。

まず水試料中PFOS濃度および魚類への生物濃縮係数（BCF, BMF）から、魚類中濃度を推定し、平均摂取量に乗じてPFOSの推定ヒト暴露量（EHE_{PFOS}）を算出した。また、動物実験の結果から、無毒性量（NOAEL）を不確実係数積（UFs）で除し、耐容一日摂取量（TDI）を算出した。これらの値を用いて、以下の式（1）からハザード比（HQ）を求め、結果を表1に示した。

$$HQ = EHE_{PFOS} / TDI \quad \dots \dots (1)$$

表1. ヒト健康リスク評価結果

対象	暴露集団	推定ヒト暴露量 (EHE _{PFOS}) [mg/kg/day]	耐容一日摂取量 (TDI) [mg/kg/day]	ハザード比 (HQ)
ヒト健康	平均暴露集団	0.29×10 ⁻⁵	0.77×10 ⁻⁴	0.038
	高暴露集団	0.80×10 ⁻⁵		0.10

平均暴露集団および高暴露集団の推定ヒト暴露量は、耐容一日摂取量より小さく、ハザード比は1以下であった。よって、八郎湖水試料中PFOS濃度から推定した、魚類摂取によるヒト健康リスク評価は「懸念なし」と推計された。

【引用文献】

- 1) 環境省環境保健部環境安全課（2009）化学物質環境実態調査年次報告書「化学物質と環境」
<http://www.env.go.jp/chemi/kurohon/index.html>
- 2) United Nations Environment Programme（2006）Risk profile on perfluorooctane sulfonate.

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） 9 玉川源泉下流域及び田沢湖におけるpH低下要因の解明

○成田修司 八柳 潤 佐々木典子*¹ 和田佳久*² 布田 潔*³
*¹温暖化対策課 *²八郎湖環境対策室 *³秋田大学大学院工学資源学研究所

【背景と目的】

秋田県仙北市にある玉川源泉の大噴は、pH1.1～1.2の強酸性水を湧出している。その強酸性水は、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pHが4.2程度まで低下した¹⁻²⁾。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¹⁻²⁾。しかし、平成14年ごろから源泉の総酸度（PP酸度）が急激に上昇し、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¹⁻²⁾。本研究では、中和放流水のpHを約3.5に維持してきたにもかかわらず、田沢湖のpHが低下する現象の機構を明らかにすることを目的に調査を行った。

【調査方法】

源泉及び流域のpH・酸度に関わる成分の実態を調べるため、平成20年5月に図1に示す中和処理施設周辺の地点A：渋黒川（湯川合流前）、B：湯川末端、C：中和希釈水、D：源泉（中和処理導入口）、E：渋黒川（湯川合流後、中和放流水合流前）、F：中和放流口、G：渋黒川（中和放流水合流後）の計7地点で調査を実施した。各地点で試料水を採取し、pH、Fe、Al濃度等の項目について分析を行った。これと併せて、秋田県で行っている玉川酸性水調査で蓄積された、玉川源泉から田沢湖に至る流域の水質データをまとめ、流域のpH低下について考察した。

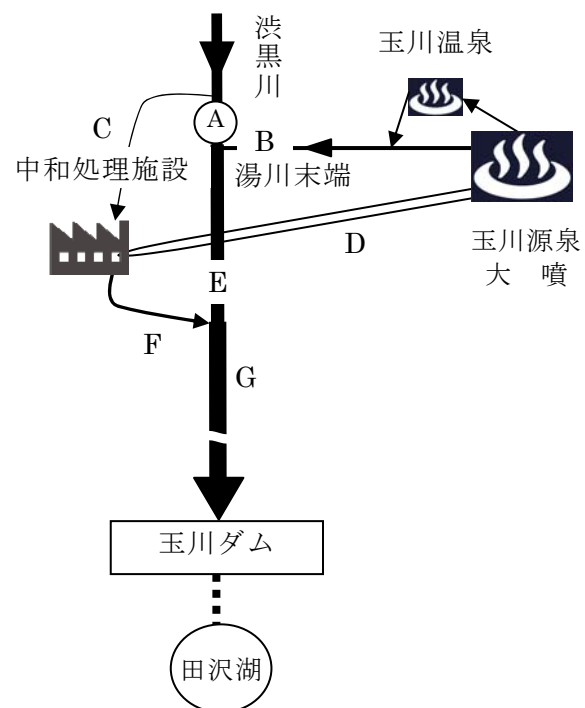


図1 玉川源泉の分流・合流実態の概要と調査地点

【結果と考察】

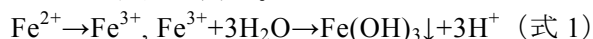
玉川源泉の総酸度は強酸成分と弱酸成分により構成されているが、上記の総酸度の上昇に伴い、弱酸成分に含まれる Fe^{2+} 及び Al^{3+} （以降、潜在的酸性成分と記述）の濃度は、それぞれ、それ以前の濃度レベルのおおよそ3倍、2.5倍に増加していた。一方、中和処理施設下流域で中和放流水（約pH3.5）よりも低いpHが観測されるとともに、河床に赤褐色沈殿がみられるようになった。この赤褐色沈殿は、 Fe^{2+} などの潜在的酸性成分の増加に伴い、流域における $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ が進行し、 H^+ の放出を伴いながら $Fe(OH)_3$ の形成が目に見える形で現れたものと考えられ（式1）³⁾、この反応



図2 鉄酸化細菌の電子顕微鏡写真

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/nougaku0107.htm> (アクセス日 2011/5/12)³⁾

への鉄酸化細菌（図 2）の関与について、水環境学会誌（Vol.32, 2009）で報告した⁴⁾。中和処理施設及び湯川の水質は源泉が導入または流入するため、源泉の成分変化を直接的に反映し、上記の pH 低下に影響を与える可能性が高い。



強酸成分については、中和処理施設で石灰石により中和処理されているが、潜在的酸性成分については同施設で処理されず、 Fe^{2+} 等のイオンの形態で放流されていると考えられる。また、湯川の酸性水は、同施設を経由しないため、上記両成分は未処理のまま流下している。それらの地点 G における負荷割合を図 3 の円グラフにまとめた結果、全体の約 4 割を湯川の強酸成分が占め、また約 5 割が湯川及び中和放流水中の Al^{3+} と Fe^{2+} からなる潜在的酸性成分であった。 Al^{3+} は pH5～中性付近において、式 2 の反応の進行が知られている。つまり、理論的には田沢湖（pH 約 5.2）付近において下記反応が進行し、 H^+ を放出することによって同湖を含む下流域の pH を低下させると考えられる³⁾。



以上の結果から、玉川源泉下流域における pH 低下は、上記未処理酸性成分を図 1 の上流域において対策することにより、潜在的酸性成分がもたらす pH 低下を現在よりも上流にシフトさせることが可能となり、その結果として田沢湖及び下流域の pH が改善されることが考えられる。

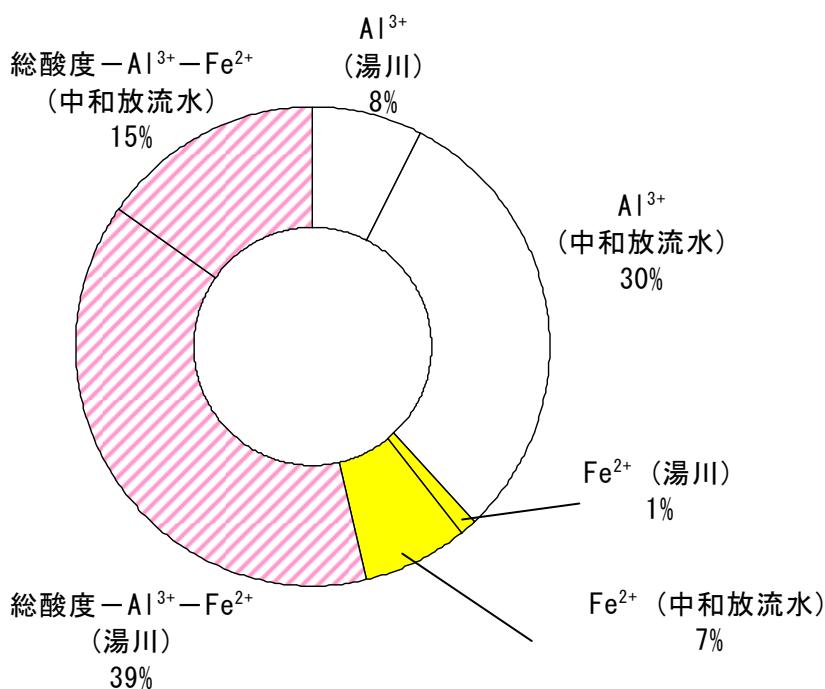


図 3 地点 G における湯川及び中和放流水の酸性成分の負荷割合
(平成 21 年 7 月の調査データから算出)

【参考文献】

- 1) 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, **50**, 1, 2008, 33-37.
- 2) 秋田県: 平成 21 年度版環境白書 (本編), 2009, 59.
- 3) 秋田県健康環境センター年報 第 5 号, 平成 21 年度, 93-99.
- 4) 「岡山大学農学部総合農業科学科農芸化学コース, 微生物機能学」ホームページ, <http://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/nougaku0107.htm> (アクセス日 2011/5/12)
- 5) 大原典子, 和田佳久, 成田修司, 八柳 潤, 布田 潔: 玉川温泉下流域における鉄酸化細菌の生息分布, 水環境学会誌, **32**, 1, 2009, 29-32.

玉川源泉の酸度上昇にも対応した実証的中和処理技術の開発とその対策がもたらす水質改善効果に関する研究（平成22～24年度）

10 玉川酸性水中和処理による副次的水質改善効果

○佐々木純恵 成田修司 高橋英之 佐久間昂*¹ 布田 潔*¹

*¹秋田大学大学院工学資源学研究所

【はじめに】

秋田県仙北市に位置する玉川源泉の大噴は pH 約 1.2 の強酸性泉として知られている。この大噴から湧出する酸性水 9000 L/min のうち 7000 L/min は玉川中和処理施設に導入され、石灰石との接触により pH 約 3.5 まで中和された後、玉川支流の渋黒川に放流されるが、一部は湯川を経由し、渋黒川に流入している（図 1）。佐藤ら（秋田大学）は渋黒川を流下する間に源泉に含まれるヒ素（As）（1.5～2.8 mg/L）が河川水中で減少していることを報告した¹⁾。この減少は流下に伴い、鉄（Fe）を主成分とするオキシ酸化鉄硫酸塩鉱物のシュベルトマナイト（Schwertmannite）様化合物（以下 Sch と記述）が形成され、As を吸着しているためと考えられている¹⁾。また、当センターと布田ら（秋田大学）との共同研究で Sch が中和処理施設放流口に堆積していることを明らかにした²⁾。その Sch は重金属等を吸着していると予想されることから、本研究では誘導結合プラズマ発光分析（Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry : ICP-AES）法を用いて Sch を構成する Fe 等の干渉を回避させながら、重金属類の定量に関する検討を行った。さらに中和処理水、源泉大噴、湯川末端および渋黒川上流（湯川合流前）の比較結果から、中和処理による水質改善効果を検証した。

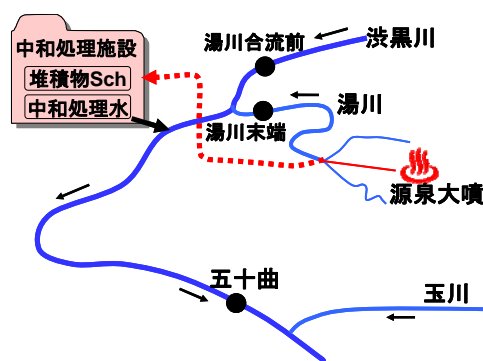


図1 玉川水系と中和処理施設の位置関係

【方法】

1. 試料の前処理

中和処理施設（図 3：地点 D）放流口に堆積した Sch は「環境省 底質調査方法（平成 12 年 3 月） 5.1.1(4) a) 湿式分解法」に従い、2.00 g 秤量し、100 mL の試料溶液とした。また、地点 D の中和処理水は 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過後、「JIS K 0102 (2008) 5.1」により、処理を行い、試料溶液とした。

2. 分析方法

重金属の定量は次の 2 つのステップで行った。はじめに ICP-AES 装置

（ThermoFisher Scientific 社製 iCAP 6300 Duo）を用いた 1 点検量法による 65 元素の半定量分析を行い、干渉物質および目的元素のおおよその濃度を測定した。次にその結果をふまえ、Sch 中の Cd, Cr, Pb について Fe の干渉を避けるため、標準添加法により定量分析を行った。標準添加法は試料マトリックス濃度が高い場合でも目的元素の定量が可能な方法として知られている³⁾。ここでは表 1 に示すように試料溶液に Cd, Cr, Pb 混合標準液を添加し、作成した検量線（図 2）の傾きと切片から目的元素の濃度を算出した。

表1 標準液の添加量

No.	1	2	3	4
Cd,Cr,Pb(μg/mL)	0	0.25	0.5	0.75
Cd,Cr,Pb混合標準液(5μg/mL)(mL)	0	0.5	1.0	1.5
試料溶液 (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0

0.1 mol/L HNO₃で10 mLにメスアップ

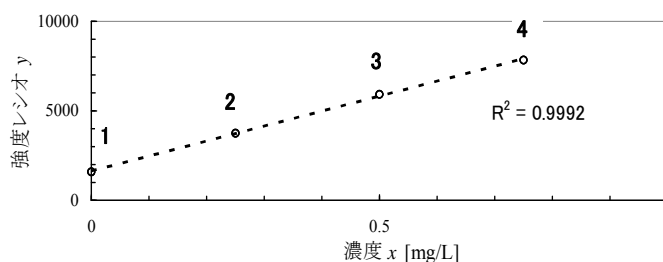
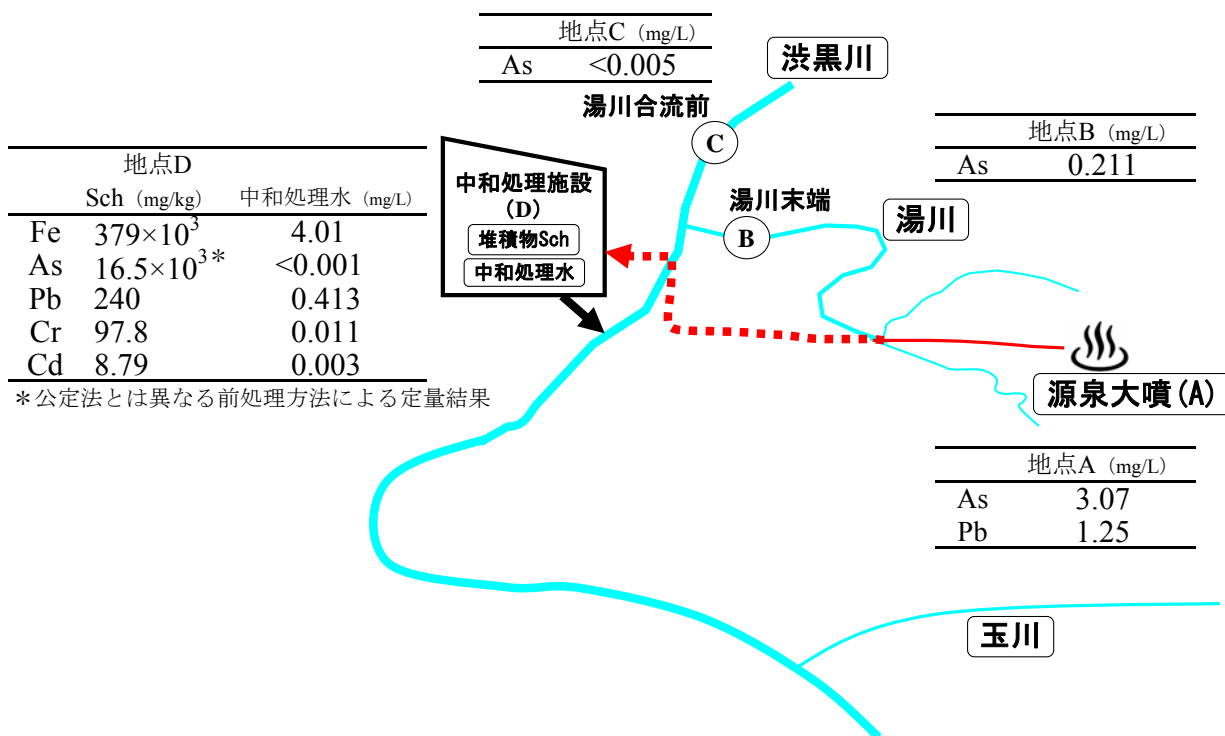


図2 標準添加法より作成した検量線

上記以外の Fe および中和処理水の定量には絶対検量線法を用いた。また、As は原子吸光分析法により水素化物発生装置 (Varian 社製 SpectrAA280FS) を使用し、定量分析を行った。また、Sch 中の重金属含有量は以下の式から算出した。

$$\text{重金属含有量 (mg/kg)} = \text{試料濃度 (mg/L)} \times 0.1 \text{ (L)} / 0.002 \text{ (kg)}$$



* 公定法とは異なる前処理方法による定量結果

図3 Sch, 中和処理水中の重金属定量結果及び地点A, B, CにおけるAs等の濃度

(地点A, B, Cについては平成22年度玉川酸性水影響調査(河川)の水質分析結果の平均値を引用)

【結果と考察】

地点 D の Sch, 中和処理水の重金属定量結果及び地点 A, B, C における As 等の濃度を図 3 に示す。Sch 中には As が 16.5×10^3 mg/kg, Pb が 240 mg/kg, Cr が 97.8 mg/kg, Cd が 8.79 mg/kg の濃度で含有していた。また、中和処理水の重金属濃度は As が <0.001 mg/L, Pb が 0.413 mg/L, Cr が 0.011 mg/L, Cd が 0.003 mg/L であった。地点 A (源泉大噴) では As が 3.07 mg/L, Pb が 1.25 mg/L 含まれていたことから、中和処理後におけるこれら重金属の濃度の減少が明らかとなった。この濃度減少は中和処理によって pH が約 3.5 で処理されることにより、Sch が生成し上記金属を吸着することによってもたらされたものであると考えられる。また、渋黒川の地点 C では As 濃度が <0.005 mg/L であること、中和処理施設では源泉の大部分の As が処理され、<0.001 mg/L となって放流されていることから湯川を経由した As (地点 B : 0.211 mg/L) が流下していることが明らかとなった。以上に示した重金属の挙動は中和処理施設において酸性を弱めるために行っている中和処理の副次的な効果であり、下流域の重金属の濃度低下に大きく貢献していることが明らかとなった。

【参考文献】

- 1) 佐藤比奈子ら: 秋田県八幡平西部の温泉水と渋黒川水系河川水の化学組成, NMCC 共同利用研究成果報文集, 13, 2005, 133.
- 2) 佐久間昂: 平成 22 年度秋田大学大学院工学資源学研究科修士論文.
- 3) ThermoFisher Scientific 元素分析セミナー資料: 2011.

memo

秋 田 県 健 康 環 境 セ ン タ ー

Akita Research Center for Public Health and Environment

〒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

URL <http://www.pref.akita.lg.jp/rcphe/>