

研究成果報告書 (1)

研究課題名	食品中のノロウイルス検出法に関する研究
担 当	保健科学部 上席専門研究員 佐藤直人
1 目的	<p>ノロウイルス (NoV) は、食中毒患者数の 50%以上の原因を占めることから、公衆衛生上特に重要な病因物質である。NoV に汚染された食品を特定することは感染経路の究明や再発防止を図る上で重要であるが、食品に含まれる NoV 量は極めて微量であるため、通常実施している方法では NoV が検出されない事例が多い。このため、より高感度な食品からの NoV 検出法の開発が望まれている。そこで、本研究では NoV 検出感度の向上を目的として、感染症流行予測調査事業ポリオ感染源調査において示されている「陰電荷膜吸着誘出法」(以下、「陰電荷法」)と、当所で行なっている通常の検査法(以下、「通知法」)について、NoV 検出感度を比較した。</p>
2 材料および方法	<p>【添加用 NoV】 2015 年に県内で発生した感染性胃腸炎集団事例において、近年の流行の主流である「GII.4_2012 株」が検出された糞便を選定した。糞便は、滅菌 PBS(-)で 10%乳剤とし、12000 rpm で 20 分間遠心した後、その上清を滅菌 PBS(-)で適宜希釈し、添加用 NoV とした。</p> <p>【試験用試料】 滅菌 PBS(-)およびカキ中腸腺濃縮試料(中腸腺に滅菌 PBS(-)を加えストマッカーで粉碎し、10,000rpm 20 分間遠心後の得られた上清)を以下の試験に供した。</p> <p>【陰電荷膜吸着誘出法】 国立感染症研究所監修ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル中の「環境水(下水、河川)からのポリオウイルス検出法」に示される方法に準じて実施した。試験用試料に 2.5M MgCl₂ を最終濃度 0.05M になるよう加えた後、0.5N HCl で pH3.5 に調整し、陰電荷フィルターでろ過した後フィルターを細切し、3%Beef extract に誘出した。</p> <p>【通知法】 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「ノロウイルスの検出法について」(平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号)に示される 2 法(超遠心法およびポリエチレングリコール法)に準じて実施した。なお、本法は当所で通常実施している方法である。</p> <p>【検出感度の検討】 試験用試料に添加用 NoV を加え、上記 3 法により試料を濃縮後、High Pure Viral RNA Kit (Roche)により RNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems)により逆転写反応を行い、cDNA を作成した。作成した cDNA を用い、上記の通知法に準じてリアルタイム PCR 法により定量試験を行い、得られた定量値から回収率を算出した。</p>
3 結果	<p>(1) 滅菌 PBS(-)における回収率：陰電荷法の回収率が 8.1%と最も高く、次いで超遠心法 1.1%、ポリエチレングリコール法が 0.4%であった。</p> <p>(2) カキ中腸腺濃縮試料における回収率：超遠心法の回収率が 6.1%と最も高く、次いでポリエチレングリコール法 3.4%、陰電荷法が 0.1%であった。</p>
4 まとめ	<p>今回、検出感度を検証した結果、陰電荷法は、滅菌 PBS(-)では通知法より回収率が優れていたことから、液体検体において陰電荷法の有用性が示唆された。一方、カキ中腸腺濃縮試料では、陰電荷法は通知法の回収率を下回る結果となった。その要因として、カキ由来の夾雑物によるウイルスの吸着阻害、あるいは誘出抑制が影響している可能性が推察された。陰電荷法は滅菌 PBS(-)での成績が優秀であり、有用性が期待されることから、今後、フィルターからの回収方法についてさらに検討を加え、検出率の向上を目指していく。</p>

研究成果報告書 (2)

研究課題名	食品中の放射性物質測定に関する研究
担 当	衛生科学部 主任専門研究員 佐々木 陽

1. 緒言

東日本大震災で生じた福島原発事故による放射能汚染と言う問題は、5年過ぎた今日に至っても完全に解決できないでいる。このことは東北地方の山間地域の除染がほとんど行われずにいること、福島原発の廃炉作業による放射性物質の飛散が続いていることとあわせて、現在も放射能汚染地域および濃度が必ずしも減少していないことを意味する。その結果として、岩手県南地域の野生山菜、野生茸、野生鳥獣から未だに高い濃度の放射性物質が検出され、出荷規制されている。岩手県では震災以降、食品衛生監視指導計画において、年間200件の食品を対象に放射性物質の検査を行っている。また先の計画によらない野生山菜、野生茸については、出荷制限指示の対象となる市町村を除いた地域から66件(平成27年度)の依頼がなされており、ゲルマニウム半導体検出装置で計測を行っている。一方、各市町村も独自にシンチレーション式放射能測定器を導入し、自主的に地域の農作物等のモニタリング検査を行っている。このことは出荷制限地域の解除作業とも関連しているが、最終的には食品衛生法で指定しているゲルマニウム半導体検出装置で確認する必要がある。また、市町村が保有するシンチレーション式放射能測定器はメーカーが様々であり、測定条件が異なっていることから、モニタリングデータとしての互換性が問題となっている。さらに、ゲルマニウム半導体検出装置で測定した値との整合性についてもほとんど検証されていない。そこで本研究ではゲルマニウム半導体検出装置とシンチレーション式放射能測定器で得られる測定結果を比較検討し、二つの測定方法、値の関係性について検証を行うことを目的に、福島市内の土壌及び玄米を模擬の放射性物質試料とした実験を行ったのでその一部を紹介する。

2. 実験方法

2-1 実験試料

実験に用いた模擬の放射性物資試料は次の様に作成した。福島市内の果樹農家の畑から採取した土壌と、会津産の玄米を適宜混合し、1Lマリネ用試料として約40Bq/Kg、U8容器仕様の試料として約150Bq/Kgの放射性物資試料になるように調整を行った。

2-2 実験装置

測定に用いたゲルマニウム半導体検出器は ORTEC 社製 GEM30-70-XLB-C (ハイブリットタイプ) であり、シンチレーション式放射能測定器は CAPINTEC 社製の CAPTUS-3000B 型である。

2-3 測定方法

1) 2L マリネリに調整した試料はゲルマニウム半導体検出器で測定し、このデータを元に1L、0.5Lマリネリ用の試料を作った。なおU8容器で調整した試料はそのまま両装置で測定できるので同じ試料を用いた。

2) 測定時間はゲルマニウム半導体検出器では3600秒、シンチレーション式放射能測定器ではバックグラウンドと合わせて900秒から10800秒まで条件を変えて計測を行った。

3. 実験結果

3-1 1L マリネリ用の試料

1Lマリネリ用の試料は前もってゲルマニウム半導体検出器で測定し2015年11月、12月の平均で41.5Bq/Kgであることを確認している。この試料をシンチレーション式放射能測定器用の

1LLマリネリで計測した結果を図1に示す。測定時間 (MT)、バックグラウンド (BG) の時間を変え、一日の気温と湿度の変化に対する放射性Csの測定値の経時変化を計測した。

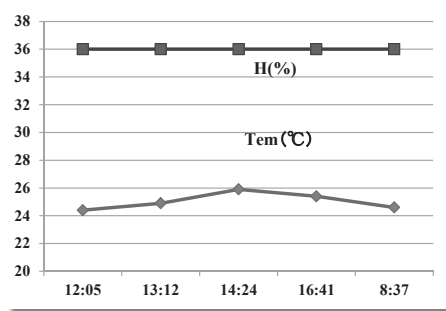
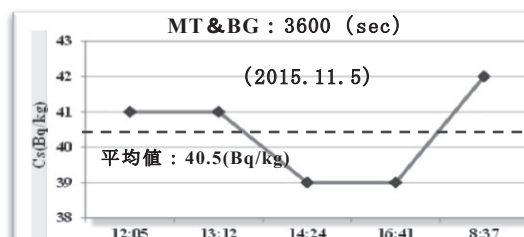


図1 シンチレーション式放射能測定器による経時変化と温湿度変化 (1Lマリネリ)

BG および MT が 3600 秒の条件で測定した結果、平均値は 40.5 (Bq/kg) であった。また BG が 3600 秒以上であれば測定時間によらず平均的な値が得られた。

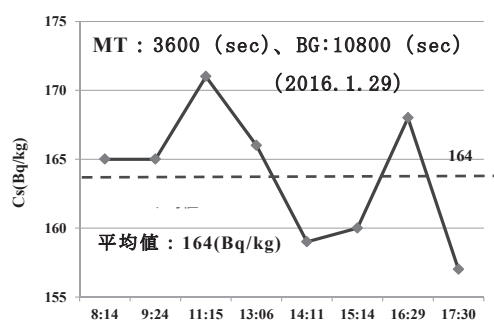
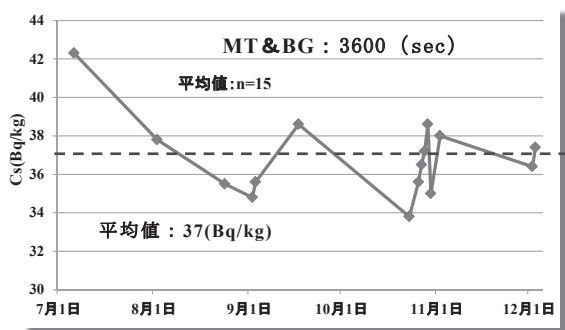


図2 シンチレーション式放射能測定器による経時変化 (0.5Lマリネリ)

図3 シンチレーション式放射能測定器による経時変化 (U8容器1)

0.5Lマリネリの場合の7月から12月までの経時変化をみると12月に向かって下がる傾向が見られた。測定装置周辺の温湿度の影響があったものと考えられる (図2)。U8容器による測定は試料が少なく済むという利点がある反面、データーのばらつきや定量下限値が高いなどの欠点がある。そのために実験ではBGを長くとり経時変化をみた (図3)。その結果、測定時間による差はあるものの、平均的な値が得られた。この傾向は、さらに長いBGをとった場合にもあてはまり、U8容器を用いるときの条件として非常に重要なファクターと言える。

測定時間を長くとったほうが値は安定して得られる (図4)。

4. 結論

- 1) ゲルマニウム半導体検出器で測定した値よりシンチレーション式放射能測定器からの値の方が高い値を取る傾向にある。
- 2) BGを十分にながくとり、温湿度変化の少ない環境で1時間以上の計測を行うことでゲルマニウム半導体検出器で測定した値に近い値が得られる。

MT: 1800, 3600 (sec), BG: 32400 (sec)

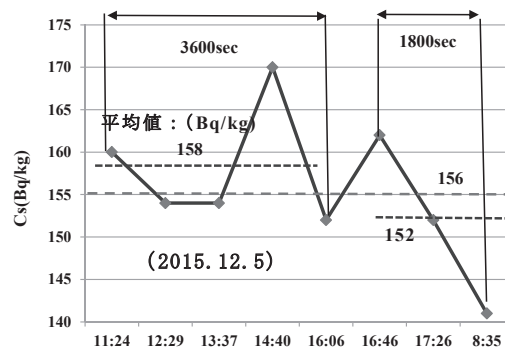


図4 シンチレーション式放射能測定器による経時変化 (U8容器2)

研究成果報告書 (3)

研究課題名	マダニ媒介性感染症に関する基礎研究
担 当	衛生科学部 菅原隆志、梶田弘子（現：食肉衛生検査所）

1 目的

マダニ媒介性感染症は、体内にウイルス、細菌であるリケッチア、ボレリアなどの病原体を保有するマダニの刺咬によって媒介される感染症で、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）、日本紅斑熱、ライム病や回帰熱などがあり、いずれも感染症法で定められた全数把握の4類感染症であり、本県における浸潤状況の把握が急がれる感染症の一つである。そこで、岩手県におけるマダニ媒介性感染症のリスクを把握するため、昨年度に引き続き、マダニの生息調査を実施した。

2 方法

調査は平成27年8～10月にかけて実施した。県内数カ所において旗振り法により採集したマダニについて、実体顕微鏡で種の同定を行った。

3 結果

生息調査における同定は、今年度は成ダニについて行ったが、2属2種のマダニが確認された。これは、昨年によく確認されたオオトゲチマダニ、ヤマトマダニで昨年度の傾向と類似していた。また、五葉山周辺では、幼・若ダニも多数付着しており生息の多さをうかがわせた。

今年度は、遺伝子検査を実施しなかったが、2013年に国立感染症研究所が実施した重症熱性血小板減少症候群（SFTS）ウイルス国内分布調査において、岩手県内に同ウイルス遺伝子保有マダニの生息が確認されていること、また、一昨年度の調査において、ライム病群ボレリアの *B.japonica* 遺伝子が検出されたこと、さらに回帰熱ボレリアの *B.miyamotoi* 遺伝子が検出されたこと等から今後も十分な注意が必要である。



オオトゲチマダニ

表 生息調査結果

チマダニ属 (<i>Haemaphysalis</i> 属)		検体数		
		26年度	27年度	
			オス	メス
オオトゲチマダニ	<i>H. megaspinosa</i>	44	25	27
ヒゲナガチマダニ	<i>H. kitaokai</i>	26		
フタトゲチマダニ	<i>H. longicornis</i>	7		
キチマダニ	<i>H. flava</i>	6		
ヤマトマダニ	<i>H. japonica</i>	4		
イスカチマダニ	<i>H. concinna</i>			
マダニ属 (<i>Ixodes</i> 属)				
ヤマトマダニ	<i>I. ovantus</i>	110	1	3
ヒトツゲマダニ	<i>I. monospinosa</i>	7		
シュルツエマダニ	<i>I. persulcatus</i>	4		
タネガタマダニ	<i>I. nipponensis</i>			
カモシカマダニ	<i>I. acutitarsus</i>			



ヤマトマダニ

研究成果報告書 (4)

研究課題名	薬剤耐性菌に関する研究—県内の ESBL 産生菌の遺伝子型による分布状況について—
担 当	保健科学部 上席専門研究員 岩淵香織
1 目的	<p>近年、人に副作用が少なく繁用されているβ-ラクタム系抗菌剤を分解する、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (extended-spectrum β-lactamase : ESBL) 産生菌と呼ばれる薬剤耐性菌が増加している¹⁾。ESBL 産生遺伝子はほとんどプラスミド上に存在するため、菌種を超えて、全てのグラム陰性菌に伝播する可能性がある。ESBL は耐性遺伝子により分類され、その型により地域分布、薬剤耐性に特徴があることや、年代とともに変化していることが知られている²⁾。これまで県内では、この耐性遺伝子の型別試験はあまり行われておらず、本県における分布状況はほとんど把握されていなかったことから、昨年度調査したところ、世界的に拡散していると報告されている³⁾ CTX-M-15 産生の <i>Escherichia coli</i> O25:H4 遺伝子型 ST131 型が疑われる株が、3 株検出された。そこで、今年度は、引き続き県内の主要な医療機関で検出された ESBL 産生菌の遺伝子型別を行いデータの集積を図る共に、real-time PCR 法による ST131 の確認を行い、県内での分布状況を把握する。</p>
2 方法	<p>(1) 材料</p> <p>県内 2 カ所の医療機関で、平成 23 年 10 月から平成 27 年 4 月にかけて検出され、当センターに提供された 62 菌株の ESBL 産生菌株を対象とした。菌種は、<i>E. coli</i> が 56 株 (90.3%)、<i>Klebsiella pneumoniae</i> が 2 株 (3.2%)、<i>Proteus mirabilis</i> が 4 株 (6.5%) で、これらを検出した材料は、尿検体 24 検体 (38.7%)、呼吸器検体 19 検体 (30.6%)、動脈血及び静脈血各 1 検体 (1.6%)、その他 17 検体 (27.4%) であった。</p> <p>(2) 血清型別</p> <p>大腸菌の血清型別は、市販抗血清 (デンカ生研) を用い、O 血清群別はスライド凝集反応法で行った。また、H 血清群別は、クレーギー管を通し運動性を増強した菌について、試験管法で行った。</p> <p>(3) ESBL 遺伝子の検出及び CTX-M-1group 遺伝子型別</p> <p>TEM 型、SHV 型および CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-9 group の ESBL 遺伝子について、PCR 法による検出を行った。^{4) 5)}</p> <p>CTX-M-1group 遺伝子が検出された <i>E. coli</i> のうち、血清型が O25:H4 の 11 株は、ST131 型であることが疑われることから、昨年度未実施だった CTX-M-1group 遺伝子が検出された 3 株を含めた 14 株について、PCR 産物のダイレクトシーケンスにより CTX 遺伝子型を決定した。</p> <p>(4) real-timePCR 法による <i>E. coli</i> の遺伝子型 ST131 型の検出</p> <p>2 対のプライマー ST131TF/ST131TR 及び ST131AF/ST131AR で増幅後、melt curve を解析し、T_m 値が 83°C 及び 81°C であることを確認する⁶⁾ 方法で実施した。</p>
3 結果	<p>(1) 血清型別</p> <p>大腸菌 56 株の O 群型別では、多い順に、O25 が 30 株、O1 が 4 株、O15 が 3 株、O86a 及び O125 が各 2 株、O6、O8、O18 が各 1 株、OUT (型別不能) が 12 株であった (表 1)。</p> <p>(2) ESBL 遺伝子の検出及び CTX-M-1group の遺伝子型別</p> <p>提供された 62 株から、CTX-M-1 group が 18 株、CTX-M-2 group が 6 株、CTX-M-9 group が 30 株、SHV が 2 株、TEM が 10 株検出された。また、今回対象とした ESBL 遺伝子型が検出されなかった株は 7 株あった (表 2)。</p>

CTX-M-1group 遺伝子が検出された *E. coli* O25:H4 の 11 株は、全て CTX-M-15 と型別された。また、昨年度の 3 株は、CTX-M-1、CTX-M-15、CTX-M-55 と型別された。

(3) real-timePCR 法による *E. coli* ST131 型の検出

CTX-M-15 と型別された *E. coli* O25:H4 の 11 株及び昨年度の 1 株の melt curve の Tm 値は、文献の温度と一致しなかった。

4 今後の研究方向等

岩手県における ESBL 産生菌の遺伝子型について調査した結果、以下の情報を得た。今後も引き続き、県内における ESBL の解析を行い、県内動向を監視する必要がある。家畜が CTX-M 型 ESBL 産生菌を保有することが報告されており、食品を介しての薬剤耐性遺伝子の拡散も推定されることから、生産サイドと連携し、県内の状況の把握に努めたい。

- ESBL 産生菌が検出された材料は、尿検体が 24 検体 (38.7%) と最も多く、泌尿器領域からの分離頻度が高い。また、動脈血及び静脈血各 1 検体 (1.6%) 分離されていた。
- ESBL と判定された 62 株のうち、*E. coli* が 56 株 (90.3%) と最も多くを占めていた。また、血清型は多岐に渡っていた。
- ESBL 遺伝子型では、CTX-M-9 group が 62 株中 30 株 (48.4%) と最も多く、次いで CTX-M-1 group が 18 株 (29.0%) であった。
- 世界的に増加が問題となっている、CTX-M-15 産生の O25:H4 ST131 が疑われる *E. coli* が計 11 件検出された。これらについて、real-timePCR 法による ST131 の確認はできなかった。ST 型別のため、MLST (Multilocus sequence typing) で解析する必要がある。

表1 ESBL産生大腸菌の血清型別及び耐性遺伝子の検出結果

serotype	No. of isolates	ESBL type					
		CTX-M-1 group	CTX-M-2 group	CTX-M-9 group	SHV	TEM	ND [※]
O25:H4	28	11	1	15		3	2
O25:H-	2			1		1	1
O1:H6	3			3			
O1:H-	1			1			
O6:UT	1		1				
O8:UT	1	1				1	
O18:UT	1						1
O86a:H11	1			1			
O86a:H18	1			1			
O15:H-	3	3				3	
O125:H9	1						1
O125:H-	1	1					
OUT:H4	6	2		4		2	
OUT:H6	2			2			
OUT:H18	1			1			
OUT:H-	3			1	1		1
Total	56	18	2	30	1	10	6

※ND:検出せず

表2 ESBL産生菌の耐性遺伝子の検出結果

	No. of isolates	ESBL type					
		CTX-M-1 group	CTX-M-2 group	CTX-M-9 group	SHV	TEM	ND [※]
<i>E. coli</i>	56	18	2	30	1	10	6
<i>K. pneumoniae</i>	2				1		1
<i>P. mirabilis</i>	4		4				
Total	62	18	6	30	2	10	7

※ND:検出せず

文献

- 1) 中村竜也: ESBL 産生菌: 臨床と微生物 42:541-552 2015
- 2) Pitout JD, *et al.*: Lancet Infect Dis., 8, 159-166, 2008
- 3) Hawkey PM, Jones AM: The changing epidemiology of resistance. J Antimicrob Chemother 64:i3-i10 2009.
- 4) Shibata, N., *et al.*: Antimicrob. Agents Chemother., 50(2), 791-795, 2006
- 5) Yagi, T., *et al.*: FEMS Microb. Lett., 184, 53-56, 2000.
- 6) Dhanji H, Domith M, *et al.*: real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* and its CTX-M-15-like extended-spectrum beta-lactamases. int J Antimicrob Agents 2010, 36(4):355-358

研究成果報告書 (5)

研究課題名	岩手県における小児呼吸器ウイルスの疫学に関する研究
担 当	保健科学部 上席専門研究員 高橋 雅輝
1 目的	<p>感染症発生動向調査事業の充実のため、小児の呼吸器ウイルスの種類、型及び検出時期等、包括的なウイルスサーベイランスを行うとともに、ウイルスの分子疫学解析により患者の疫学的背景との関連を解明する。</p>
2 材料及び方法	<p>平成 25 年 4 月から平成 26 年 12 月までの間に、(社福) 岩手愛児会もりおかこども病院を受診した肺炎、気管支炎等の下気道炎患者の咽頭ぬぐい液等 216 検体を収集した。なお、インフルエンザ及び明らかな細菌性疾患は除外した。検体採取には UTMTM(COPAN DIAGNOSTICS INC)を用いた。ウイルス検出には培養細胞による分離培養法及び核酸増幅法を用いた。ウイルス同定はダイレクトシーケンス及びBLAST 相同性解析により行った。また、検出されたパラインフルエンザ 3 型 (PIV-3) について分子系統解析を行った。</p>
3 結果及び考察	<p>(1) 216 症例の多くは入院例で、月齢別症例数は 0~11 か月が 52 症例、12~71 か月が 141 症例、72~179 か月が 23 症例 (平均 31.0±32.5、中央値 17.5)、男女比は 120 : 96 であった。</p> <p>(2) 216 検体のうち 169 検体から 196 株のウイルスが検出された (表)。検出された 196 株のウイルスのうち、ライノウイルス (HRV)、パラインフルエンザウイルス (PIV)、RS ウイルス (RSV) 及びヒトメタニューモウイルス (MPV) が 86.7%を占めた。HRV、PIV 及び MPV は主に咽頭炎などの上気道炎を引き起こすウイルスとして知られているが、今回の調査により下気道炎の原因ウイルスとしても注目する必要があることが判明した。また、この HRV、PIV、RSV 及び MPV の年度別検出率をみると、平成 25 年度は PIV 及び RSV が高く、平成 26 年度は MPV が高かった。HRV は検出率に差はなかった (図 1)。一般に、いくつかのウイルスには流行する時期が異なる (季節性がある) ことは知られているが、岩手県における年 (度) 別発生状況は明らかでないことから、今後も調査を継続する必要がある。</p> <p>(3) PIV は 4 つの血清型が知られているが、今回の調査では 1 型が 4 株、2 型が 4 株、3 型が 38 株、4 型が 4 株検出された。検出数が多かった PIV-3 のうち、100%相同な株を除外した 23 株の HN 遺伝子 1352 塩基について近隣結合法による系統解析を行ったところ、20 株 (平成 25 年度の 19 株、平成 26 年度 1 株) が lineage 1 に分類された (図 2)。一方、lineage 2 は少なく、lineage 3 は認められなかった。このことから平成 25 年度は PIV-3 lineage 1 による地域流行があったものと推察された。</p>
4 今後の研究方向等	<p>(1) 平成 27 年度においても下気道炎検体からのウイルス検出を継続し、季節性などの動向を明らかにする。</p> <p>(2) 近隣結合法のほか、Bayesian MCMC 法を用いた分子疫学解析を行い、PIV-3 及び RSV 感染症の発生動向とウイルス遺伝子変異との関連を考察する。</p>

表. 年度別ウイルス検出数

検出ウイルス	平成 25 年度	平成 26 年度	合計
ライノウイルス	36	15	51
パラインフルエンザウイルス 1 型	3	1	4
パラインフルエンザウイルス 2 型	2	2	4
パラインフルエンザウイルス 3 型	29	9	38
パラインフルエンザウイルス 4 型	4		4
RS ウイルス	25	9	34
ヒトメタニューモウイルス	15	20	35
アデノウイルス 1 型	3	2	5
アデノウイルス 2 型	8		8
アデノウイルス 3 型		1	1
A 群コクサッキーウイルス 2 型	2		2
A 群コクサッキーウイルス 4 型		1	1
B 群コクサッキーウイルス 2 型	1	2	3
B 群コクサッキーウイルス 3 型	1		1
エンテロウイルス 68 型	3		3
コロナウイルス (OC43)	1		1
ヒトヘルペスウイルス 6 型	1		1
不検出	30	17	47

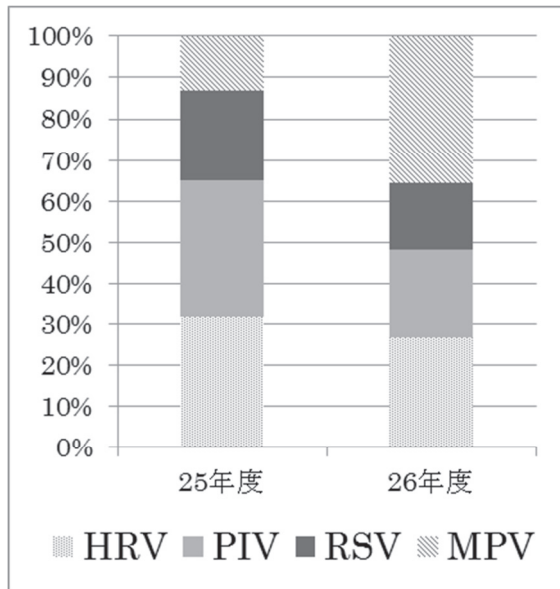


図 1. 年度別検出率

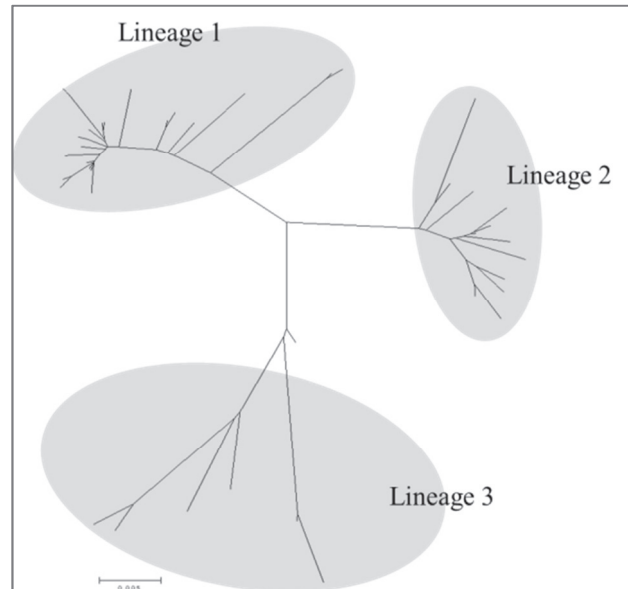


図 2. 近隣結合法による無根系統樹

研究成果報告書 (6)

研究課題名	ウイルス媒介性節足動物（ヒトスジシマカ）の生息に関する研究
担当	地球科学部 専門研究員 小泉 英誉
<p>1 目的</p> <p>ヒトスジシマカは、ジカ熱やデング熱等のウイルス疾患を媒介する感染症対策上重要な節足動物である。近年、その生息北限が北上しており、気温の上昇が影響しているといわれている。岩手県内における同蚊の生息分布状況を明らかにするとともに、生息北限地域における生息条件を検討することにより地球温暖化適応策や感染症予防対策に資することを目的とする。</p> <p>2 方法</p> <p>(1) 蚊類の生息状況調査</p> <p>蚊類の生息状況調査は平成27年6～10月、岩手県盛岡市、宮古市、釜石市、遠野市、紫波町、山田町、大槌町の4市3町の計40地点で行った。</p> <p>調査対象は主に寺院の花生けや手水鉢、屋外に放置された古タイヤなどの人工容器の貯留水とし、生息している蚊の幼虫及び蛹を太口ピペットで採取した。1調査地点につき1～10人工容器を調査した。採取した蚊の幼虫等を室温で飼育し、羽化させた成虫を、実体顕微鏡下で形態学的に同定した。</p> <p>(2) ヒトスジシマカの生息条件の解析</p> <p>「東北地方1kmメッシュ気温データ表示・検索システム」により、岩手県全域に当たる3次メッシュごとに1978～2014年の37年間の日平均気温を選び出し、年ごとメッシュごとの①「年平均気温」および②「1月平均気温」を算出した。ヒトスジシマカの生息地点にもっともよく一致する年平均気温を10.0～11.2℃まで0.2℃間隔で検討した結果、生息地点の年平均気温が10.8℃以上であったことから、③「日平均気温10.8℃を超える年間日数」および④「10.8℃を閾値とする有効積算温度」を算出した。統計モデリングは、一般化線形混合モデル(リンク関数はlogit、ランダム効果は調査対象メッシュ(n=235))を用いた。応答変数は年ごとメッシュごとのヒトスジシマカの検出割合(検出地点数/調査地点数)、説明変数は①～④の5年移動平均値および3次メッシュ人口密度、3次メッシュ全産業事業所数を用いた。パラメータ選択は、AICを評価基準とした。GISアプリケーションはGisway light ver. 2.2.4、統計計算アプリケーションはR ver. 3.1.2 パッケージglmMLを用いた。</p> <p>3 結果</p> <p>(1) 蚊類の生息状況調査</p> <p>成虫の羽化が確認された40地点184人工容器について、計1005頭を同定した。今回採集された蚊の種類はヤマトヤブカ、ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、オオクロヤブカ、キンパラナガハシカ、トウゴウヤブカ及びイエカ類であった。このうちヤブカ類では、ヤマトヤブカは調査した40地点すべての地点で確認され、捕集数も最も多く、調査地域全域において優先種であった。ヒトスジシマカは、生息北限地域である盛岡市では、仙北町、下ノ橋付近、天昌寺町の5地点で採集された。</p> <p>この結果今回の調査でヒトスジシマカの生息が確認された北限地域は盛岡市天昌寺町(39°42'42" N, 141°07'16" E)であり、平成25年から引き続き定着が確認された。</p> <p>(2) ヒトスジシマカの生息条件の解析</p> <p>一般化線形混合モデルによる解析の結果、メッシュごとのヒトスジシマカの検出割合は、「1月平均気温」、「10.8℃を閾値とする有効積算温度」および「人口密度」が大きく関連し、パラメータごとの標準化偏回帰係数をみると、「10.8℃を閾値とする有効積算温度」が1.446とヒトスジシマカの生息にもっとも大きく影響を与えることが示唆された。当該モデルにより、県内の任意の3次メッシュにおけるヒトスジシマカの生息確率を算出す</p>	

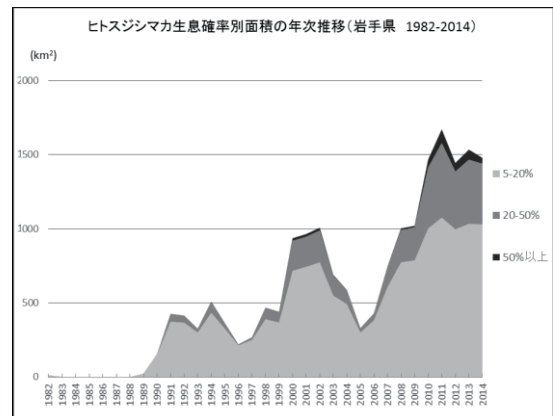
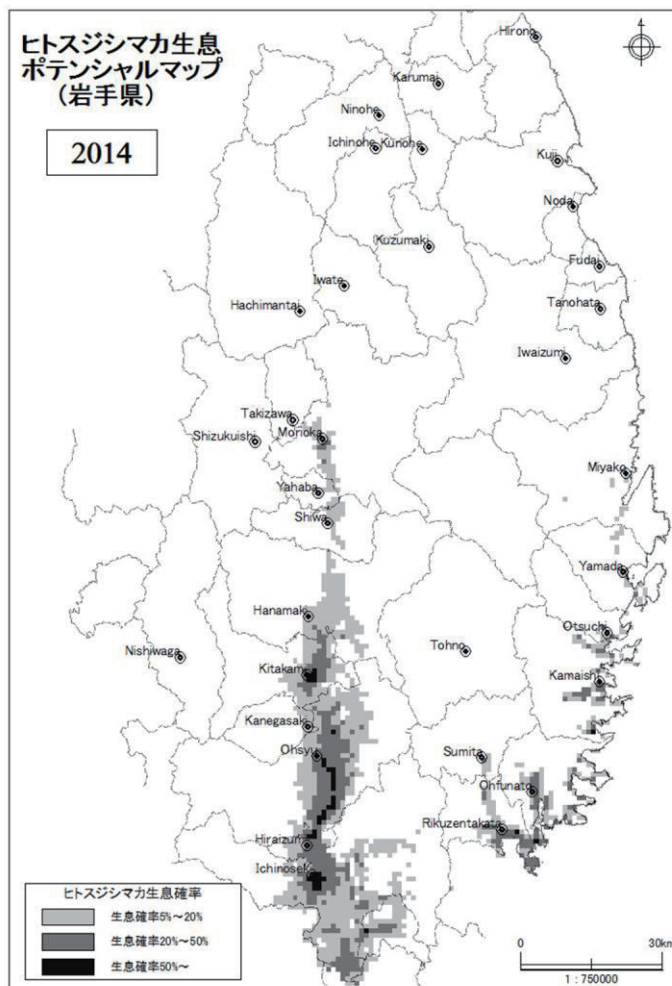
ることができる。すなわち、 q_i をメッシュごとのヒトスジシマカ生息確率としたとき以下の式で算出される。

$$\text{logit}(q_i) = -19.71 + [1 \text{ 月平均気温}]_i \times 0.779 + [10.8^\circ\text{C} \text{ を閾値とする有効積算温度}]_i \times 0.0117 \\ + [\text{人口密度}]_i \times 0.000329$$

岩手県内のすべての3次メッシュについて、1982～2014年における年ごとメッシュごとのヒトスジシマカの生息確率を算出した。メッシュごとのヒトスジシマカ生息確率を5%未満、5～20%、20～50%、50%以上の4段階に分類し、3次メッシュ面積=1km²と近似してヒトスジシマカ生息確率別面積を年次ごとに算出すると、ヒトスジシマカ生息確率50%以上の地域は1989年頃から増加し始め、約10年周期で増減しながらも増加傾向にあり、2011年には県土の10.8%に当たる1672km²に達した。

4 今後の研究方向等

ヒトスジシマカの生息調査及び生息条件の解析は、生息北限地域におけるヒトスジシマカの分布の変化や、生息条件を明らかにするうえで重要である。また、地球温暖化に伴う適応策を検討し、感染症予防に関する知見を得るため、今後とも調査を継続することが必要である。



研究成果報告書 (7)

研究課題名	WE T手法を用いた水環境調査のケーススタディ
担当	環境科学部 上席専門研究員 懸田 節
1 目的 <p>環境中には多種多様な化学物質が存在し、ヒトや野生生物は常に複数の化学物質に曝露されている実態を踏まえ、近年、複数の化学物質による影響を総合的に評価する手法として生物応答（バイオアッセイ）が用いられるようになってきている。特に事業所排水の管理を目的としたWE T手法（生物応答を利用した水環境管理手法）については、我国においても導入が検討されている。</p> <p>本研究は、国立環境研究所 I 型共同研究であり、国立環境研究所、埼玉県環境科学国際センター、さいたま市健康科学研究センター、千葉県環境研究センター、横浜市環境科学研究所、川崎市環境総合研究所、名古屋市環境科学調査センター、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターと共同で行う。</p> <p>本研究により、国立環境研究所と地方環境研究所との技術の共有を図るとともに、WE T手法及びT R E / T I E（毒性削減評価／毒性同定評価）手法について知見の集積を目指す。</p>	
2 方法 <p>(1) 事業所排水や環境水を採取し、複数の研究機関においてWE T試験（①胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法、②ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法、③淡水藻類を用いる生長阻害試験法の3種）を実施する。</p> <p>(2) 影響が確認された地点について、必要に応じ水質化学分析を追加実施するなど、重点的に検討を行う。</p> <p>(3) (1) 及び (2) により得られた結果についてワークショップによる検討を行う。</p>	
3 結果 <p>(1) 共同研究の参加機関の採取した環境水 1 件、廃棄物最終処分場放流水及び放流先河川水各 1 件、計 3 件について、試験担当機関において試験を実施した。</p> <p>(2) 年度末に実施したワークショップにおいて、試験結果の報告及び検討を行った。</p> <p>① 魚類試験について、試験担当機関の結果にばらつきが見られたが、各機関の試験開始時期（試料の保存方法・時間）、試料の希釈率などの試験条件の差が影響していると推定された。</p> <p>②（河川水など）影響の少ない試料では試験結果の比較が非常に難しいとの意見が出された。</p> <p>③ 次年度の共同研究ワークショップにおいて、試験担当機関間のデータ比較ができるよう試験条件を統一することや、データの処理方法について検討していくこととした。</p>	
4 今後の研究方向等 <p>次年度は地方衛生研究所が主体となる II 型共同研究に移行し、引き続き各地方で生物へ影響がありそうな水について、検査機関間のデータ比較ができるような方法で、調査を実施する方針である。</p> <p>当センターでも引き続き参加し、WE T手法に関する技術および知見の共有化・WE T手法を用いた調査事例の集積に努める。</p>	

研究成果報告書 (8)

研究課題名	微小粒子状物質の発生源解明に関する研究
担 当	地球科学部 小泉英誉、佐々木和明、佐藤卓

1 目的

微小粒子状物質 (PM_{2.5}) は、大気中に浮遊している 2.5 μm 以下の微小粒子であり、健康への影響が心配されている。県内における PM_{2.5} の濃度は、年平均値で全国平均以下の水準であるものの、年に数日程度、日平均値の環境基準超過が生じている。

本研究では、平成 26 年 7 月下旬から 8 月上旬にかけて県内で観測された高濃度事象 (図 1) について、高濃度要因の解明を目的とし、成分分析及び気象解析等を行った。

2 方法

PM_{2.5} の試料捕集は、宮古市横町において平成 26 年 7 月 24 日から 8 月 4 日までの期間について実施した。試料捕集及び成分分析 (分析項目: 元素状炭素 (EC)、有機炭素 (OC)、イオン 8 成分、無機 13 成分及びレボグルコサン^{※1}) は、「大気中微小粒子状物質成分測定マニュアル (環境省)」に基づいて実施した。試料採取は PM_{2.5} 用ローボリウムサンプラー (Thermo Fisher Scientific 製 Model 2025) 2 台を使用した。捕集フィルターは、PTFE 製円形フィルター及び石英製円形フィルターを使用した。採取済みのフィルターは 1 週間毎に回収し、分析までデシケーター中で保管した。

3 結果

(1) 成分分析の結果

宮古市横町で捕集された PM_{2.5} の主成分は OC であった。また、バイオマス燃焼の指標として知られるレボグルコサンが検出された (図 2)。特に 7 月 29 日は、レボグルコサンの濃度が 7 月 25 日と比べて 90 倍以上と顕著に増加していた。このことから、当該期間における PM_{2.5} の濃度上昇には、バイオマスの燃焼物が寄与しているものと考えられた。

(2) 全国における観測結果

7 月 29 日は東北地方全体が高濃度となっていた。また、PM_{2.5} の成分は、山形県村山市、群馬県前橋市、埼玉県加須市でも OC 及び LV が高濃度となっていた^{※2}。この期間に国内で大規模な火災等は発生していないことから、発生源は国外、いわゆる「越境汚染」であることが考えられた。

(3) 気象解析等の結果

宮古市上空の気流について、7 月 29 日から遡って後方流跡線解析^{※3, 4}にて検討したところ、ロシア連邦シベリア地方上空から空気塊が流れ込んでいたものと推定された (図 3)。また、シベリア地方上空では高濃度のエアロゾルが地球観測衛星によって観測されていた^{※5}。当時、シベリア地方では大規模な森林火災が発生しており、森林火災によって生じた PM_{2.5} の一部が本県まで輸送されたものと推察された。

4 まとめ

平成 26 年 7 月下旬から 8 月上旬にかけて観測された高濃度事象は、シベリア地域の大規模森林火災によって発生した PM_{2.5} の一部が気流によって輸送され、県内全域で PM_{2.5} の濃度が上昇したものと考えられた。

※1 レボグルコサン: セルロースの熱分解により生成する物質。バイオマス燃焼の良い指標であることが知られている。

※2 本研究は国立環境研究所と地方環境研究所による II 型共同研究の一部として実施した。

※3 後方流跡線解析: 風向や風速等の気象データを用いて空気がどこから流れてきたのか時間を遡って解析する方法。

※4 <http://www.ready.noaa.gov/HYSPLIT.php>

※5 <https://earthdata.nasa.gov/labs/worldview/>

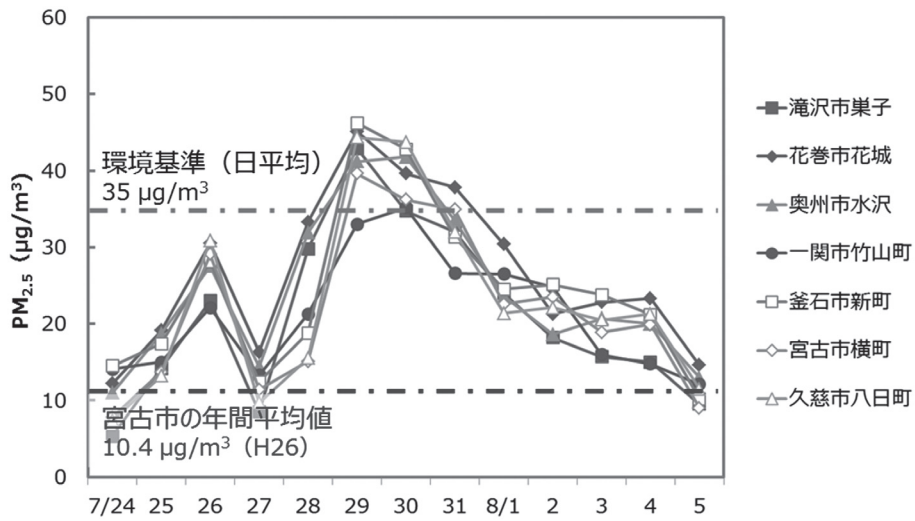


図1 平成26年夏季の高濃度事象の状況

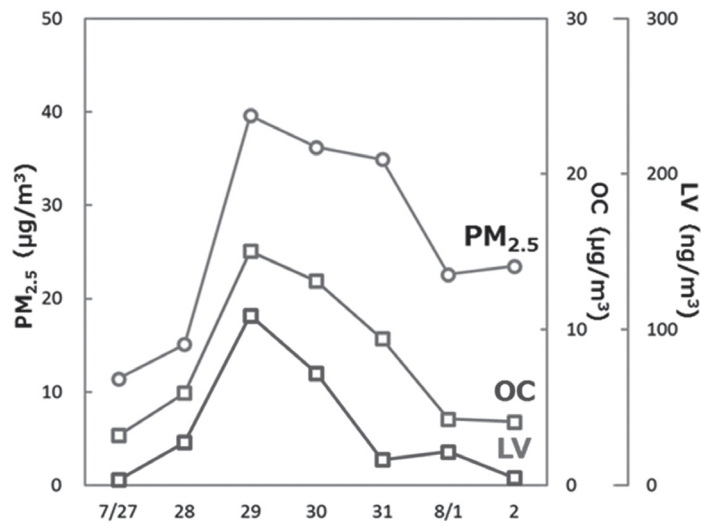


図2 宮古市横町で捕集されたPM_{2.5}のOCとLVの定量結果

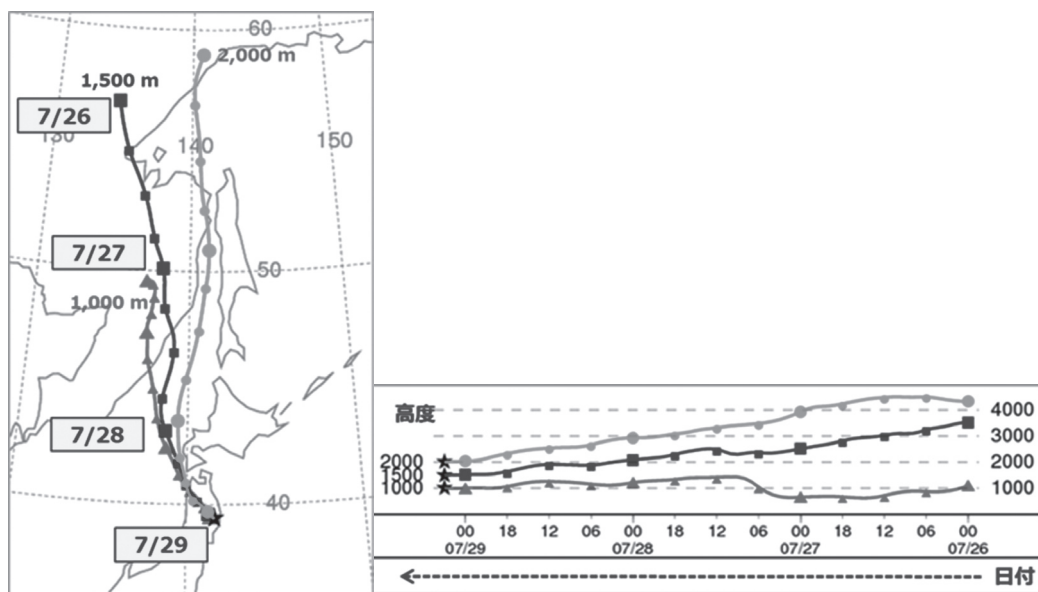


図3 後方流跡線解析の結果

研究成果報告書 (9)

研究課題名	酸性雨による環境影響の総合的評価 (広域連携事業)
担当	地球科学部 主査専門研究員 多田敬子
1 目的	<p>酸性雨に影響をおよぼす乾性沈着物調査(ガス状酸性化成分)を行い、既存の酸性雨や酸性雪データと併せて解析を行うことにより、本県の降水の酸性化現象による環境影響の総合的評価に資することを目的とする。</p> <p>また、全国環境研協議会によって実施する第5次酸性雨全国調査及び全国環境研北海道・東北支部酸性雨専門部会による調査・研究に参加することにより、本県のみならず、北海道・東北ブロックさらに全国的観点からも酸性雨を取り巻く評価を行うことを目的とする。</p>
2 方法及び結果	<p>八幡平(網張温泉スキー場)及び盛岡(環境保健研究センター)の2地点で、パッシブ法による乾性沈着成分(ガス及び粒子状物質)濃度の把握を行った。毎月1回の頻度で、NO₂及びNO_xは比色分析法にて、NH₃及びO₃はイオンクロマト分析法にて分析を行った。</p> <p>平成27年度における濃度の季節変動(図1~3)及び長期的な濃度変動(図4~6)を示す。</p> <p>測定地点別では、O₃において、標高の高い八幡平が盛岡より高濃度となっているが、それ以外の分析項目では盛岡の方が高濃度であった。季節変動は、いずれの測定地点も同じ傾向にあった。</p> <p>分析項目別でみると、O₃は全体的に春季に最大となり、夏季には低い傾向がみられた。また、O₃は、昨年度までは、冬季から上昇する傾向にあったが、平成27年度は2月から3月にかけて低濃度で推移した。O₃以外の分析項目では、全体的に秋季から冬季にかけて上昇する傾向にあった。</p> <p>また、経年濃度変化をみると、平成27年度はいずれの測定地点も、O₃は減少したが、それ以外の分析項目は例年と同じレベル濃度であった。</p>
3 今後の研究方向等	<p>大気汚染状況の長期的な推移をみるため、乾性沈着成分のモニターは今後とも継続する必要がある、全国環境研協議会が主催する酸性雨全国調査に引き続き参加する。</p> <p>なお、本調査は平成28年度より第6次調査に移行となる。その調査概要は、湿性沈着評価と乾性沈着評価(フィルターパック法)を継続ベースとするが、フィルターパック法にて、新たにインパクト使用による粒径別粒子成分の捕集による沈着量評価を追加していることから、本県においてもフィルターパック法の試行を開始する。</p>

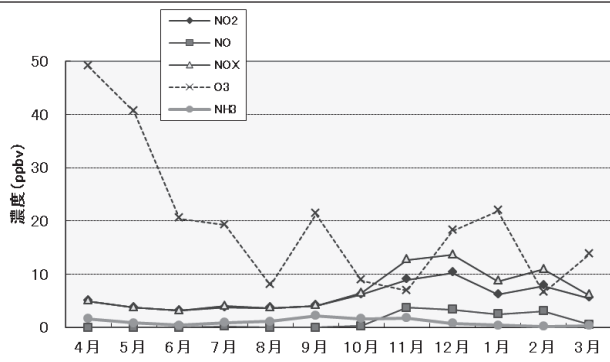


図1 平成27年度季節変動（盛岡）

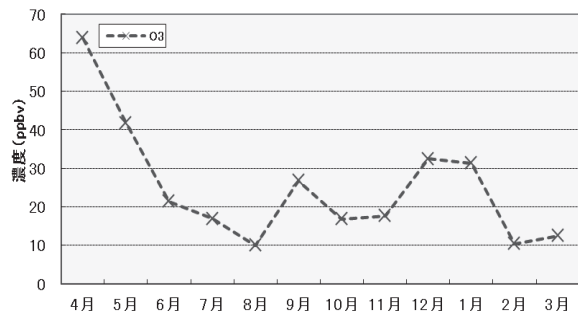


図2 平成27年度季節変動（八幡平O3）

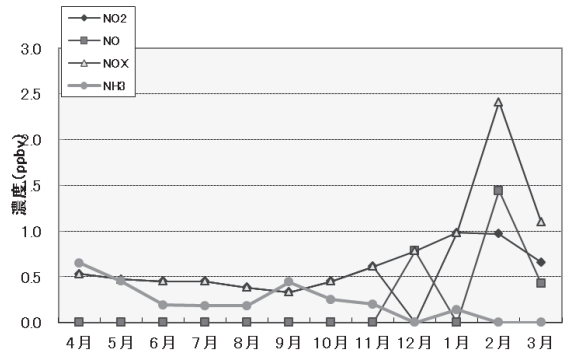


図3 平成27年度季節変動（八幡平O3以外）

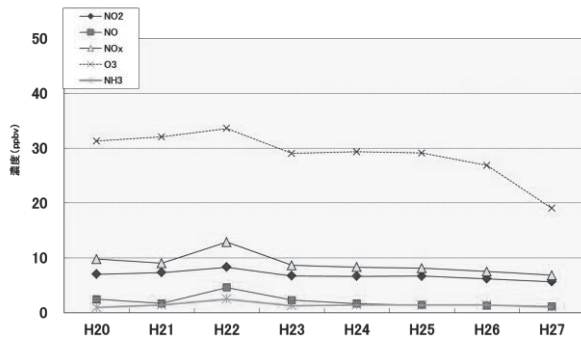


図4 経年変動（盛岡）

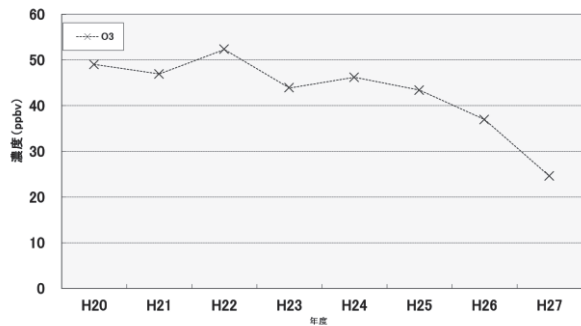


図5 経年変動（八幡平O3）

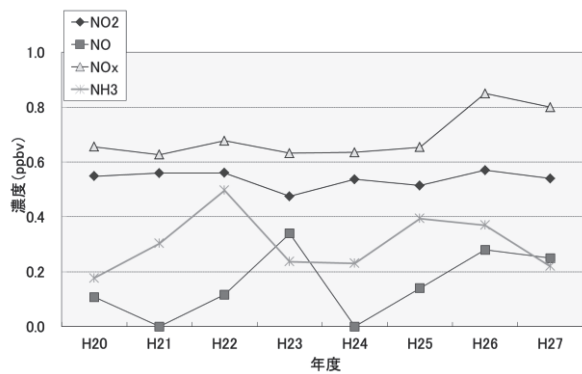


図6 経年変動（八幡平O3以外）

研究成果報告書(10)

研究課題名	食品中有害化学物質検査の精度管理体制の強化及び検証		
担 当	衛生科学部 菅原 隆志、中南 真理子、及川 和志、昆野 智恵子、沼野 聡		
1 目的	<p>精度管理等を目的とした食品 GLP (Good Laboratory Practice=業務管理基準) は、当所でも平成 13 年度より導入し、12 年目を迎えている。一定の成果を上げ、信頼性を高めてきたところであるが、管理体制を含め、更なるボトムアップが必要となっている。そこで、今年度は、内部点検実施要領に定める内部点検調査を実施し、食品検査の信頼性確保を充実させるとともに技術レベルのボトムアップを目的とする。</p>		
2 方法	<p>今年度は、内部点検を通じて技術レベルのボトムアップを図ることが目的なので、通常の内部点検に加え、表 1 に示す機器類の内部点検を重点的に行った。機器類の内部点検は、定期点検結果の記録、使用に当たっての最適化の確認状況及び定量範囲の確認状況等を行った。その他、内部点検は、「岩手県環境保健研究センター内部点検実施要領」に示す内部点検台帳に従い、試験検査施設の管理、機械器具の管理、試薬等の管理、有害物質等の管理、その他試験データに関する管理等を実施した。</p>		
	表1 内部点検調査計画		
	調査 No.	点検機器名	使用項目
	1	高速液体クロマトグラフ(HPLC)	添加物医薬品
	2	LC-MS/MS(1)	動物用医薬品
	3	LC-MS/MS(2)	農薬
	4	GC-MS/MS	農薬
	5	精密天秤	検査全般
			平成28年 2月
3 結果	<p>1) 内部点検の結果、精密天秤において、標準作業書に示す定期点検は実施されていたが、日常点検の記録が整備されていなかった。この改善指示により、日常点検記録簿の整備がなされ、使用前に基準分銅を用いて正確度及びその直線性の点検を行うことから、検査の信頼性確保の充実及び異常時確認に一定の基準が作成され改善がなされた。</p> <p>2) その他の機器の定期点検記録状況</p> <p>ア) 高速液体クロマトグラフは、FLDのフローセルに不具合(感度低下)が発生していたが、交換等行い整備が図られたことを内部点検で確認した。機器整備の技術レベルのボトムアップにつながったものと思う。</p> <p>イ) LC-MS/MS(1)(API4000)は、装置が起動しない不具合があったが、ターボポンプコントローラーの故障であることをつきとめ交換したことを内部点検で確認した。故障個所の特定につながる機器の状態データの収集等技術レベルのボトムアップにつながったものと思う。</p> <p>ウ) LC-MS/MS(2)(TQ-5500)は、正常な状態で使用されていることを内部点検で確認した。日常のメンテナンスで正常な状態を維持する等技術レベルのボトムアップにつながったものと思う。</p> <p>エ) GC-MS/MSは、装置の状態チェックからMS部分にリークがあることをつきとめ、Oリング等の交換につなげたことを内部点検で確認した。データに影響する小さな不具合を見つけ、適切なメンテナンスを実施したこと等技術レベルのボトムアップにつながったものと思う。</p>		
4 今後の方針	<p>今後は、さらに技術的分野に踏み込んだ内部点検、精度を維持するだけでない内部精度管理、新たな検査の標準作業書の作成等を継続的に行い、食品検査の信頼性確保を充実させることで、分析の技術レベルのボトムアップを図る必要がある。</p>		

研究成果報告書（11）

研究課題名	食品機能性成分カロテノイド（ルテイン等）の一斉分析法の開発～LC-MS(/MS)によるカロテノイド分析の検討～
担 当	衛生科学部 主査専門研究員 及川和志

1 目的

昨年度の研究において、雑穀のキビ（黍）をモデルとしたカロテノイド成分（ルテイン）の超臨界二酸化炭素抽出（ScCO₂-SFE）について検討し、ダイオードアレイ検出器（DAD）を備えた液体クロマトグラフ（LC）による定量結果について報告した。

一方、液体クロマトグラフ-質量分析計（LC-MS）の活用については、ルテインなどカロテノイド類に対する分析パラメータが明らかではなく、定量法としての適性は不明であった。

そこで、カロテノイド（ルテイン、ゼアキササンチン、フコキササンチン）の定量に必要な分析パラメータの確立を目的に、電子スプレーイオン化（ESI）および大気圧下化学イオン化（APCI）イオン源を用いたタンデム四重極型質量分析計（LC-MS/MS）を用いて検討する。

2 方法

(1) 標準溶液および LC-MS/MS

標準溶液は、Carote Nature 社より購入のルテイン（Mw:568.89）とゼアキササンチン（Mw:568.89）、Fluka 社より購入のフコキササンチン（Mw:658.91）を Acetone に一旦溶解した後、既報のモル分子吸光係数により濃度を補正し、LC の溶離液に転溶して用いた。

LC-MS/MS システムは、Agilent-1100 型（DAD 検出器を接続）LC に接続したタンデム型質量分析計（AB Sciex, API4000）を使用した。

(2) LC-MS/MS パラメータの検討

分離カラムとして C18 (Inertsil-ODS3, φ 2.1×100mm, 3 μm) および C30 (Develosil XG-30M, φ 2.0×150mm, 3 μm) カラムを使用し、DAD でのスペクトル取得に影響せずに MS でのイオン化を両立できる溶媒を検討。次いで、標準溶液の FIA 分析によってイオン源の最適化とターゲットイオンを選択し、カロテノイド類のイオン化における ESI と APCI の適性を比較した後に、シングル MS (Q3-SIM) およびタンデム MS (MRM) モードでの成分定量について検討した。

3 結果

(1) カロテノイド分析に適する LC-MS/MS パラメータ

LC-MS の溶離液は、溶離液 A : MeCN/MeOH/Water (50/45/5)、溶離液 B : MeCN/Isopropanol (50/50) を基本組成とし、APCI によるイオン化を前提として溶離液へのイオン化促進剤（酸、塩）の添加は行わない事とした。分析カラムは C30 カラムを選択し、ルテインとゼアキササンチンの分離に適した溶媒組成として溶離液 A : B (75:25) の混液を採用した。

APCI による LC-MS(/MS)分析では、定量イオンとしてルテインでは [M+H-18]⁺にあたる 551.5 (*m/z*)、ゼアキササンチンでは [M+H]⁺にあたる 569.5 (*m/z*) を選択し、LC-DAD での定量に用いた検液を測定することにより、LC-MS でも同等の定量値が得られることを確認した。

4 まとめ

カロテノイドの分析において、DAD と MS を組み合わせた検出系は光学スペクトルと質量スペクトルといった異なる検出原理による同時の定性および定量分析を可能とする。超臨界二酸化炭素抽出（ScCO₂-SFE）と LC-MS/MS によるカロテノイド分析手法は、迅速性に優れ、測定法の堅牢性が確保された成分検査手法として、今後の応用が期待できる。

研究成果報告書（12）

研究課題名	機器分析法を用いた貝毒検査に関する研究
担 当	衛生科学部 沼野 聡、中南 真理子、菅原 隆志

1 目的

ホタテやかき等の二枚貝は、海水中の有毒プランクトンを捕食し毒化することから、水産関係者は定期的にプランクトンや養殖貝に蓄積された貝毒の自主検査を行っている。この検査には「マウス毒性試験」が採用されてきたが、検査に時間がかかり食中毒など緊急性を要する検査に適していないことや、動物愛護の観点等から分析機器を使った新しい検査法の開発が求められてきた。こうした中、我が国においても、下痢性貝毒に関し機器分析法を導入することとする通知「麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取扱いについて」（H27.3.6 付食安発 0306 第 1 号）が発出された。

しかし、検体の前処理や測定条件に検討の余地が示唆されたことから、本研究では検体の前処理方法を中心に検討することで、LC-MS/MS を用いた貝毒検査法の改善・確立をし、自然毒に対する危機管理体制の強化を図ることを目的とするものである。

2 方法

(1) 試料：ホタテ可食部（むき身全体、中腸腺）

(2) 対象成分：OA、DTX1、DTX2

(3) 標準品：OA 群（OA、DTX1）は水産庁貝毒安全対策事業配付標準品、DTX2 は、National Research Council Canada 製標準品を使用した。

(4) 試料調製法

LC-MS/MS 等による機器分析法において、前処理なしで試料抽出液を希釈し測定したのでは、装置を汚染する可能性が高いことから、前年度は固相カートリッジカラム Oasis HLB（Waters 製 60mg、3mL）による精製法を検討し、添加回収試験では良好な結果を得た。そこで今年度は更なる回収率の向上を目指し、リン脂質や夾雑物の除去を目的に、HLB に加えて、カートリッジカラム Bond Elut SAX（Agilent 製 500mg、6mL）もしくは Phree（Phenomenex 製 1mL）を通すことで、更なる精製効果の検討を行った（図 1）。

(5) マトリックスの除去効果 確認試験

HLB のみ、HLB+ SAX（溶出条件：1%ギ酸）、HLB+ Phree（溶出条件：70%、80%、90% メタノール）のマトリックス除去効果の差を GC-MS を用いて確認した。

(6) 添加回収試験

試料に混合標準溶液を 50ng/g 添加して試験を行った。

3 結果

(1) マトリックスの除去効果 確認試験

除去効果が一番大きかったのは Phree を 70%メタノールで溶出したもの、次に 80%メタノール溶出と SAX 処理、90%メタノール溶出であった。HLB のみ通過では除去効果が小さかった（図 2：むき身全体、図 3：中腸腺）。

(2) 添加回収試験結果

oasis HLB のみの処理で 70～120%、Phree(70%メタノール溶出)もしくは SAX 処理を加えたもので 50～150%の回収率が得られた（図 4）。HLB 処理のみと、SAX 処理を加えた検体

では直近のスタンダード(5ppb 想定)で定量値に大きな変動が見られた。Phree 処理を加えて行った検体は変動が小さい傾向にあった。

4 まとめ

検体測定の前近のスタンダードが変動することから、貝類のマトリックスが予想以上に測定へ影響することを確認した。処理の回数が増えるという手間があるものの、前処理のカートリッジカラムをフローに組み込み、マトリックスやリン脂質を除去することは下痢性貝毒の機器分析において有用である。

5 今後の展望

平成 26 年度～27 年度では下痢性貝毒に的を絞って、検査法の検討を行ってきた。そこで得られたデータや技能を基にし、下痢性貝毒以外の魚介毒についても検討を重ねることで、LC-MS/MS を用いた検査法を確立し、自然毒に対する危機管理体制の一層の強化を図っていく。

平成27年度 検討フロー



図1 試料調整法

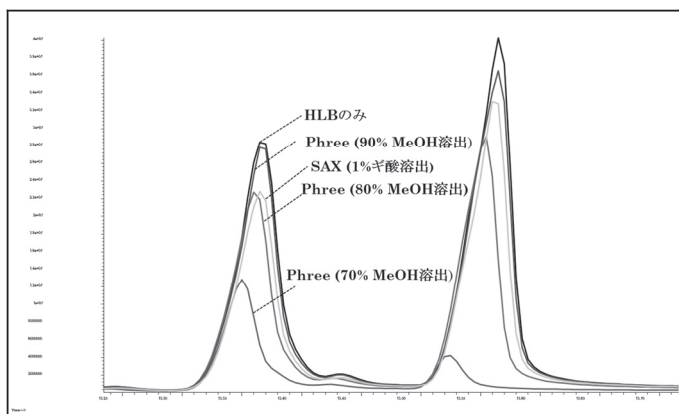


図2 マトリックス除去効果 (マススキャン むき身全体)

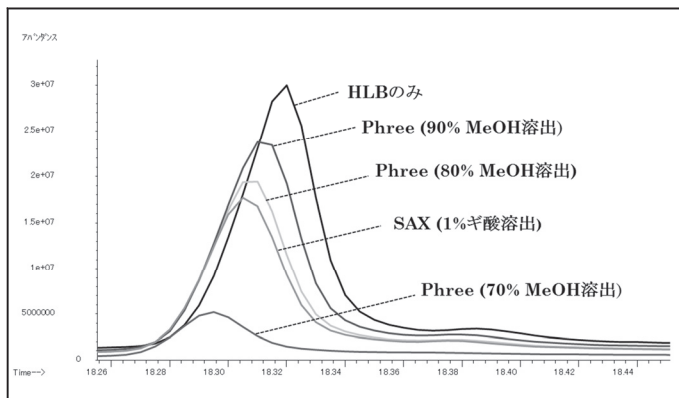


図3 マトリックス除去効果 (マススキャン 中腸腺)

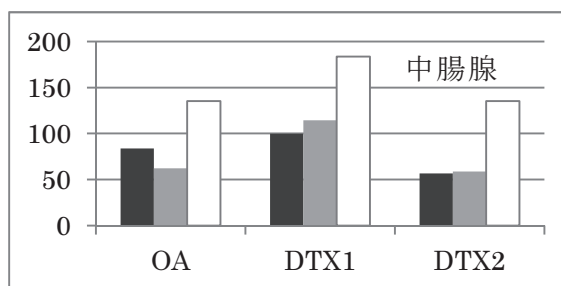
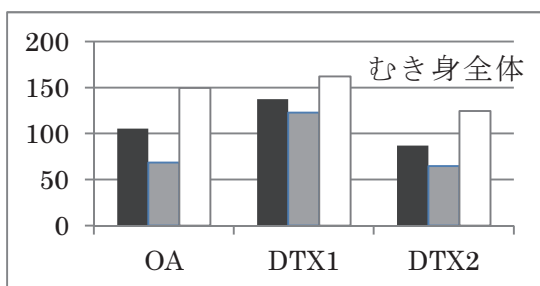


図4 添加回収試験結果 (■ HLBのみ, ■ Phree-70% MeOH溶出処理, □ SAX処理)

研究成果報告書 (13)

研究課題名	腸管出血性大腸菌 (EHEC) の検査法に関する研究
担当	検査部 山中 拓哉、熊谷 学、太田 美香子、嶋 弘一
1 目的	<p>腸管出血性大腸菌感染症は小児や高齢者を中心に重篤な合併症を起こすことがあるため迅速な確定診断が必要とされる。現在、腸管出血性大腸菌の主要な血清型である O157、O26 については選択分離培地等が示された検査法が確立されているが、それ以外の血清型に関しては分離の決め手となる生化学的性状が不明な場合が多く、有効な選択分離培地が確定していない。この点については、菌分離、迅速性、コスト、操作性に大きな影響を及ぼすことから、検査に際しての問題点となっている。このため、本研究では県内で分離された腸管出血性大腸菌のうち O157、O26 以外の血清型の菌株を対象として、種々の培地におけるコロニーの所見や生化学的性状等のデータを詳細に解析しこれを記録・集積する。これを基に当所における腸管出血性大腸菌全般の検査マニュアルの構築の一助とすることを目的とする。</p>
2 方法	<p>(1) 2015 年度に検査依頼を受け分離した腸管出血性大腸菌のうち、O157、O26 以外の血清型の菌株について、生化学的性状試験（糖の分解、リジン脱炭酸試験、インドール産生試験等）、運動性の有無、EHT 培地での溶血の有無、多種の選択分離培地上のコロニーの所見、血清型別試験（O 抗原・H 抗原）、VT 型別試験等の解析を行った。</p> <p>(2) 当所にて保存している腸管出血性大腸菌のうち、有効な選択分離培地が確立していない血清型に属する菌株集団についても（1）と同様の解析を行った。</p>
3 結果	<p>(1) 2015 年度に依頼を受け分離した腸管出血性大腸菌のうち O157、O26 以外の血清型の菌株について性状を詳細に解析し、データを集積した。</p> <p>(2) 2002～2014 年に県内で分離され当センターに保存されている腸管出血性大腸菌のうち O157、O26 以外の血清型の菌株について性状を詳細に解析し、データを集積した。</p> <p>(3) 上記（1）と（2）により、本研究の対象となっている腸管出血性大腸菌 156 菌株の解析を全て終了した。解析を実施した菌株の血清型別内訳を表 1 に示す。本研究により集積されたデータについて、分析・考察を行い、画像データを含むすべてのデータを参照できる性状表を作成した。本性状表はこれらの感染症発生時の細菌検査において参照され、検査の迅速化・効率化に寄与することが期待される。</p> <p>(4) 本研究により調査対象となった腸管出血性大腸菌の各血清型について、選択分離培地および確認培地における性状が明らかになり、検査において有用なことが示唆される培地が明らかになった。このうち主要なものを表 2 に示す。</p>
4 今後の研究方向	<p>(1) 便検体を用いた解析を行い、本研究結果の検体検査における実効性を検証する必要がある。</p> <p>(2) 他地域のデータとの比較により、本結果の地域特異性について検証していく必要がある。</p>

表1 本研究で解析を行った腸管出血性大腸菌の血清型別菌株数

血清型	菌株数	血清型	菌株数
0111	59	074	1
0103	30	0115	1
0121	25	0165	1
0145	10	0169	1
063	4	091	1
01	1	OUT*	22

*市販の診断用免疫血清で型別不能なもの

表2 本研究によって有効であることが示唆された選択分離培地ならびに確認培地

血清型	培地名
0111	CT-ソルボース・マッコンキー培地 (CT-SBMAC) クロモアガー-STECC 培地 クロモアガー-0157TAM 培地 CLIG 培地 (β -グルクロニダーゼ陰性)
0103	CT-ソルボース・マッコンキー培地 (CT-SBMAC) クロモアガー-STECC 培地
0121	CT-ラフィーノース・マッコンキー培地 (CT-RFMAC) クロモアガー-STECC 培地 TSI 培地 (一部の菌株で乳糖・白糖非分解)
0145	CT-ラフィーノース・マッコンキー培地 (CT-RFMAC) CT-ソルボース・マッコンキー培地 (CT-SBMAC) クロモアガー-STECC 培地

研究成果報告書 (14)

研究課題名	有機フッ素化合物に係る日中韓汚染状況比較及び生体影響解明等に関する研究
担当	環境科学部 主査専門研究員 岩淵 勝己、環境科学部長 千崎 則正

1 目的

有機フッ素化合物 (PFCs) は、生物への濃縮性が大きく環境試料に比べて数千倍も濃縮される汚染物質であることから、水生生物の中で上位に位置し、日韓で捕獲できる同種の生物であるメダカ等を対象に、PFCs による環境汚染実態と PFCs のメダカ体内への蓄積特性を明らかにすることを目的とした。

2 方法

○サンプル

今年度調査対象としたのは、岩手、茨城、石川、兵庫、福岡の計 5ヶ所で、環境水と底質 (各地点 1 検体)、メダカ (各地点 20~30 検体) を採取した (Fig.1)。メダカは 1 検体ずつ分析し、底質は 1 検体あたり 3 回の繰り返し分析を行った。

○PFCs 測定

分析対象 PFCs を PFCA の C5 ~ C14、PFSA の C4、C6、C7、C8、C10 とした。

【環境水】固相カートリッジ(Oasis WAX)をコンセントレーター (Waters Sep-Pak Concentrator Plus) にセットし、毎分 10 mL の流量で通過させて濃縮し、LC-MS/MS を用いて測定した。

【底質・メダカ】炭酸ナトリウム水溶液に懸濁させたサンプルを t-butyl methyl ether で抽出し、固相カートリッジ (Oasis WAX) で濃縮・精製し、LC-MS/MS を用いて測定した。

3 結果・考察

【環境水】検出された PFCs は、例年どおり C5A~C9A が多く、C12A より長鎖の化合物はほとんど検出されなかった。茨城、石川、兵庫が高濃度で、C8A と C8S は兵庫が最も高濃度で検出された。PFSAs では、全地点で C8S が最も高濃度で検出された。

【底質】底質では、C8A より長鎖の検出が顕著で、C9A~C11A が多く、C5A~C7A の検出は少なかった。PFSAs では、C8S だけが検出された。茨城では、環境水からは高濃度で検出されたが、底質からの検出は少なかった。一方、岩手と福岡は、環境水ではあまり高濃度ではなかったものの、底質からの検出は多かった。採取したサンプルの性状が、岩手と福岡では泥質で、他の 3 地点では砂質であったことが影響していると考えられた。

【メダカ】メダカでは、昨年度と同様 C11A~C13A が高濃度で検出された。PFSAs では、各地点とも C8S が多く検出され、岩手以外では C10S も検出された。検出量は兵庫で顕著に多かった。特に C11A~C14A は、他の地点の数倍であり、また C8S については、これだけで他の地点のトータル量を上回るほどの検出量であった。



Fig.1 サンプル採取地点(2015)

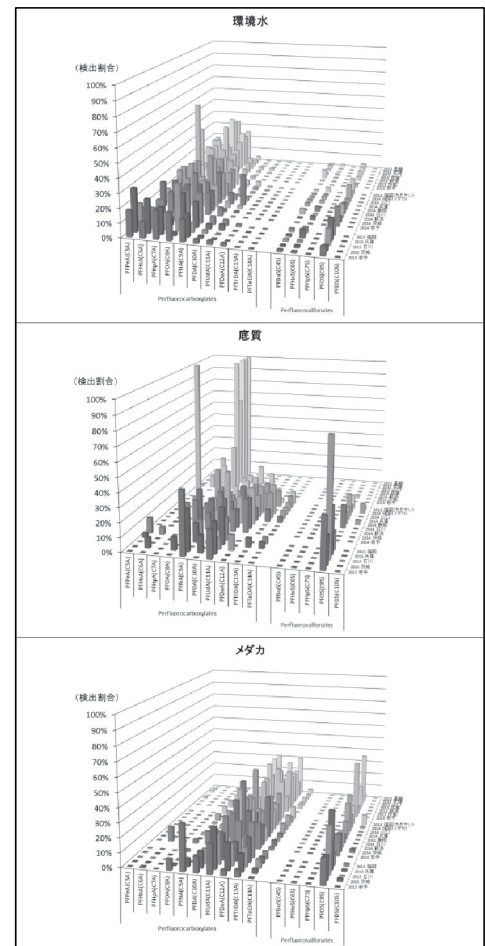


Fig.2 環境水,底質,メダカからの検出傾向

【環境水・底質・メダカからの PFCs 検出傾向】

平成 25 年度から今年度までのサンプルについて、検出された各 PFC の割合を確認したところ、環境水では C5A～C9A と C8S が、底質では C8A～C12A と C8S が、メダカでは C9A～C13A と C8S が毎年ほぼ同様に検出されていた (Fig.2)。このことから、環境水、底質、メダカから検出される PFCs は、都市や地域に関係なくほぼ一定になっている傾向があり、サンプルの種類によって PFCs 検出傾向は異なっていることが明らかとなった。

【環境水と底質】 底質からの検出率が 60%以上 (3 箇所以上で検出) であった C8A～C11A、C8S で比較した。底質そのものの PFCs 濃度で比較すると環境水中 PFCs 濃度と相関は見られなかったが、強熱減量 (有機物) あたりの濃度で比較すると、C9A、C11A と C8S で相関が認められた。

(C9A : $r=0.83$ C11A : $r=0.99$ C8S : $r=0.94$)

【底質とメダカ】 底質からの検出率が 60%以上 (3 箇所以上で検出) であった C8A～C11A、C8S で比較した。底質そのものの PFCs 濃度で比較するとメダカ中 PFCs 濃度と相関は見られなかったが、強熱減量 (有機物) あたりの濃度で比較すると、C9A、C11A と C8S で相関が認められた。

(C9A : $r=0.89$ C11A : $r=0.97$ C8S : $r=0.85$)

【環境水とメダカ】 メダカからの検出率が 70%以上であった C9A～C12A、C8S で比較した。昨年度までは C8S に関して相関性が認められていたが、今年度は C9A、C10A、C11A についても相関が認められた。(C9A : $r=0.87$ C10A : $r=0.89$ C11A : $r=0.96$ C8S : $r=0.96$) なお、2013～2015 年の C9A～C12A、C8S のデータで相関を確認したところ、C9A、C10A、C8S では相関が認められ、C11A では弱い相関が認められた。(C9A : $r=0.89$ C10A : $r=0.76$ C11A : $r=0.59$ C8S : $r=0.87$)

【環境水からメダカへの濃縮係数】 メダカへの濃縮係数 (BCF : メダカ中濃度/環境水中濃度) は、メダカからの検出率が 70%以上であった C9A～C12A、C8S で算出した。C9A で BCF 約 460、C12A で BCF 約 89,000 であった (Fig.3)。昨年までと同様に、PFCAs の炭素数に応じて指数的に増加する傾向が認められたが、C8S はその傾向とは異なっていた。そこで、メダカへの蓄積がオクタノール/水分配係数 ($\log K_{ow}$) に関連しているものと考え、散布図を作成したところ、推定値と実測値が非常に良く一致する結果となった (Fig.4)。

【まとめ】 本研究により、環境水と底質への蓄積は、強熱減量 (有機物) に大変良好に相関していることが明らかとなった。同様に、底質の有機物への蓄積とメダカへの蓄積の間でも良好に相関していることが認められたことから、底質の有機物への PFCs 蓄積量を測定することでメダカへの蓄積を推定できることが示唆された。なお、環境水・底質・メダカから検出される PFCs は、ほぼ一定の傾向があることも明らかとなった。環境水からメダカへの BCF は PFCAs では炭素数に応じて増加していたが、PFOS だけ傾向が異なっており、 $\log K_{ow}$ を考慮すると PFOS も含めて相関していることも明らかとなった。PFOS や PFOA は、条約や業界の自主規制により製造・使用が禁止されてきているにもかかわらず、本研究により環境中には多種の PFCs が未だに存在している実態が明らかとなった。このことから、今後も継続して研究を行っていくことが非常に重要である。

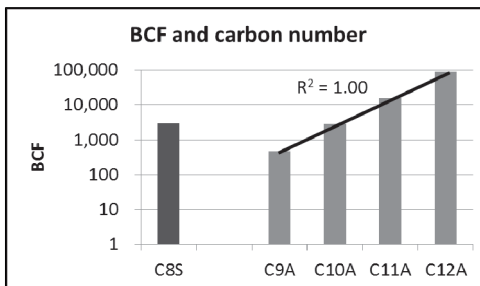


Fig.3 環境水からメダカへの BCF と炭素数

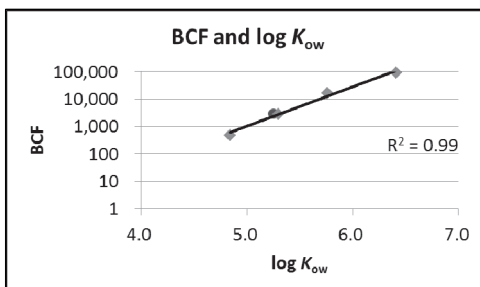


Fig.4 環境水からメダカへの BCF と $\log K_{ow}$

研究課題名	PPCPs (Pharmaceutical and Personal Care Products) 等化学物質実態調査 (LC-MS/MSによる水環境中のトリエタノールアミン実態調査)
担当	環境科学部 主査専門研究員 葉澤やよい 主任専門研究員 安部隆司

1 目的

PPCPs について、新規に導入された ICP-MS や GC/MS/MS、LC/MS/MS などの分析機器を活用し、本県の河川等における濃度を測定し、その汚染状況を把握しようとするものであり、今年度は環境省化学物質環境実態調査で本県が分析法を開発したトリエタノールアミンによる県内河川等の汚染状況を報告する。

2 分析法の概要

水質試料 50ml (海水試料は 10ml) にサロゲート物質を添加した後、固相抽出カラムに通水し、メタノールで溶出する。溶出液を濃縮後、LC/MS/MS-SRM(ESI+)で分析する。

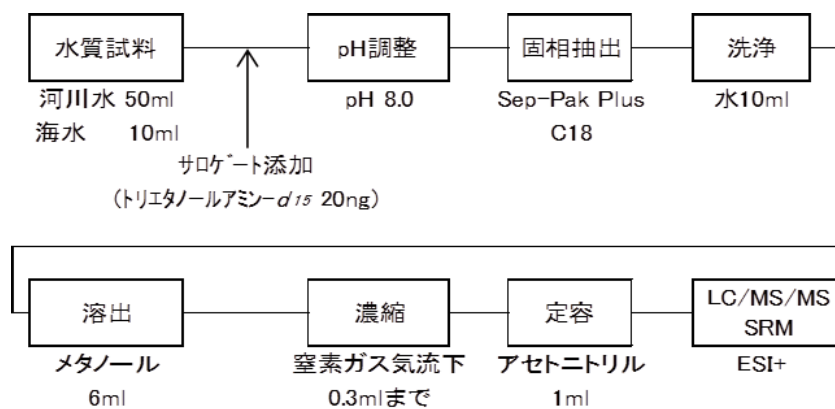
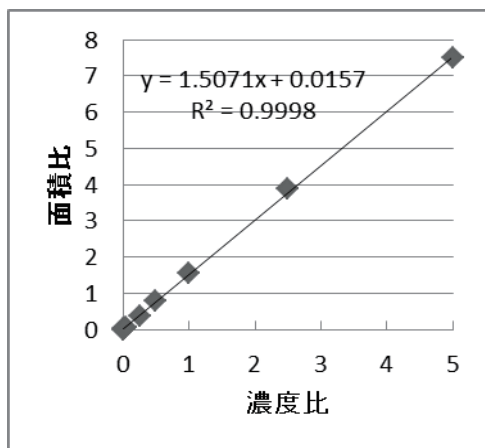


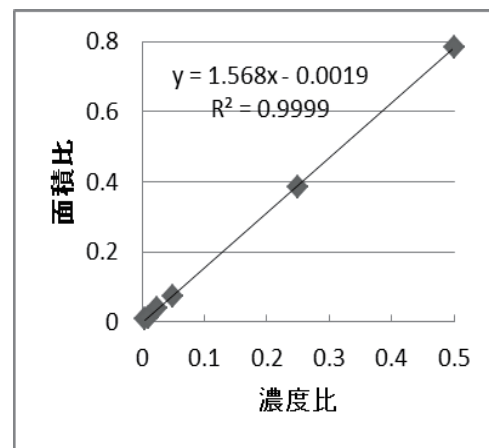
図1 分析法のフローチャート

3 結果



濃度 (ng/mL) (20) (50) (100)

図2 検量線：トリエタノールアミン
サロゲート物質 20 ng/mL
対象物質濃度範囲 0.1~100 ng/mL



濃度 (ng/mL) (1) (5) (10)

図3 検量線：トリエタノールアミン
サロゲート物質 20 ng/mL
対象物質濃度範囲 0.1~10 ng/mL

表1 装置検出下限値 (IDL) の算出結果

物質名	IDL (ng/ml)	試料水	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 ($\mu\text{g/L}$)
トリエタノールアミン	0.018	河川水	50	1.0	0.00036
		海水	10	1.0	0.0018

表2 測定方法の検出下限 (MDL) 及び定量下限(MQL)の算出結果

物質名	試料水	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	MDL ($\mu\text{g/L}$)	MQL ($\mu\text{g/L}$)
トリエタノールアミン	河川水	50	1.0	0.0041	0.011
	海水	10	1.0	0.011	0.029

表3 添加回収試験結果

試料名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	試験数	検出 濃度*1 ($\mu\text{g/L}$)	回収 率*1 (%)	変動 係数 (%)	サロゲート回 収率 (%)
河川水	50	無添加	2	0.00897	—	—	75
	50	5.0	6	0.103	94	2.6	75
海水 (広田湾)	10	無添加	2	0.0399	—	—	78
	10	5.0	6	0.496	91	2.3	78

*1: 検出濃度及び回収率はサロゲート補正後の値

表4 環境試料の分析結果

試料	地点	TEA濃度($\mu\text{g/L}$)	地点	TEA濃度($\mu\text{g/L}$)
河川水	馬淵川 (府金橋)	0.084	米内川	ND
	夏井川 (旧夏井橋)	0.032	中津川 (毘沙門橋)	ND
	夏井川 (洋々橋)	0.12	豊沢川 (桜橋)	0.039
	久慈川 (湊橋)	0.12	飯豊川 (頭首工)	0.077
	閉伊川 (宮古橋)	0.035	和賀川 (広表橋)	0.040
	津軽石川 (稲荷橋)	0.017	甲子川 (矢の浦橋)	0.16
	盛川 (佐野橋)	0.075	甲子川 (大渡橋)	0.028
	気仙川 (姉齒橋)	0.012	ND : 河川 0.0041 $\mu\text{g/L}$ 未満	
海水	久慈湾	0.65	広田湾	0.016
	釜石湾	0.038	綾里湾	ND
	大船渡湾	0.13	ND : 海水 0.011 $\mu\text{g/L}$ 未満	

4 まとめ

環境水中に含まれるトリエタノールアミンのLC/MS/MSによる分析法を開発した。本法のIDLは、0.018 ng/mLであり、試料換算濃度値は河川水で0.00036 $\mu\text{g/L}$ 、海水で0.0018 $\mu\text{g/L}$ であった。本法のMDLは河川水で0.0041 $\mu\text{g/L}$ 、海水で0.011 $\mu\text{g/L}$ であり、MQLは、河川水で0.011 $\mu\text{g/L}$ 、海水で0.029 $\mu\text{g/L}$ であった。河川水及び海水を用いた添加回収試験 (添加量 5.0ng) の回収率は、河川水で96% (サロゲート回収率75%)、海水で91% (サロゲート回収率78%)であった。本分析法により、環境試料の測定を行ったところ、トリエタノールアミンが岩手県内河川水から0.039 $\mu\text{g/L}$ ~0.16 $\mu\text{g/L}$ 、岩手県内海水から0.038 $\mu\text{g/L}$ ~0.65 $\mu\text{g/L}$ の濃度で検出された。以上の結果から、本法により環境水中に含まれる0.01 $\mu\text{g/L}$ オーダーのトリエタノールアミンの定量が可能と判断される。

研究成果報告書 (16)

研究課題名	LC/MS/MS による DNA アダクトームの解析
担当	環境科学部 主査専門研究員 岩淵 勝己
<p>1 目的</p> <p>本研究は、昨年度までに 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 及び 6-O-Ethyl-2'-deoxyguanosine (6-OEdG) について LC/MS/MS により高感度で分析でき、かつ両物質を同時に分析できる条件について検討し、0.01ppb まで定量が十分可能であることを確認した。そこで今回は、昨年度までに検討した同時分析の条件を用い、定量性、検出・定量下限、及び保存性について検討した。</p> <p>2 方法</p> <p>8-OHdG 及び 6-OEdG の標準品を用い、以下の検討を行った。</p> <p>なお、分析条件は、昨年度の検討したものを利用した。</p> <p>(1) 定量性の検討</p> <p>昨年度の検討から両物質とも 0.01ppb までは定量が可能であることを確認していたため、さらに低濃度まで定量が可能か検討した。両物質とも検量線の範囲は 0.001ppb ~ 10ppb とし、各濃度段階のスタンダードは以下のとおり調製した。なお、濃度段階は、0.001ppb、0.005ppb、0.01ppb、0.05ppb、0.1ppb、0.5ppb、1ppb、5ppb、10ppb の 9 段階とした。</p> <p>【8-OHdG】</p> <p>標準品 1.0mg を精秤し、純水 50mL に溶解して 20ppm の溶液を調製した。これを純水で希釈して 200ppb とした後、ここから 1mL を分取し、9mL のアセトニトリルで希釈して 20ppb の 90% アセトニトリル溶液 (①) を調製した。</p> <p>【6-OEdG】</p> <p>標準品 1.0mg を精秤し、90%アセトニトリル 50mL に溶解して 20ppm の溶液を調製した。これを 90%アセトニトリルで希釈し、20ppb の溶液 (②) を調製した。</p> <p>【混合スタンダード】</p> <p>①と②を等量ずつ混合し、10ppb の混合スタンダードを調製した。これを原液として 90%アセトニトリルで希釈し、各濃度段階の混合スタンダードを調製した。</p> <p>(2) 装置検出下限 (IDL) 及び装置定量下限 (IQL) の検討</p> <p>(1) で検討した範囲で、S/N 比が 10 程度の濃度を選択し、それを 7 回繰り返して LC/MS/MS に導入し、一連の分析値の標準偏差から IDL 及び IQL を算出した。昨年度までの検討から、0.01ppb は概ね S/N ≥ 10 となることを把握していたため、検量線の最低濃度から 3 段階の濃度 (0.001ppb、0.005ppb、0.01ppb) について 7 回繰り返し測定を行った。</p> <p>なお、IDL 及び IQL の算出に当たっては、次の式を用いた。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="width: 45%;"> $IDL = t(n - 1, 0.05) \times \sigma_{n-1,I} \times 2$ $IQL = 10 \times \sigma_{n-1,I}$ </div> <div style="width: 50%;"> <p>ここで、</p> <p>$t(n-1,0.05)$: 危険率 5%、自由度 n-1 の t 値 (片側)</p> <p>$\sigma_{n-1,I}$: IDL 算出のための測定値の標本標準偏差</p> <p>なお、n=7 (自由度 6) の t 値は、1.9432 である。</p> </div> </div>	

(3) 保存性の検討

作成した検量線用の標準を、24時間（1日間）、2日間、5日間、7日間、14日間冷蔵保存して、8-OHdG及び6-OEdGの安定性を検討した。

3 結果

(1) 定量性の検討

混合スタンダードを用いて、2種同時分析により定量性を確認した。

【8-OHdG】

検量線の範囲が0.001ppb～10ppbと10,000倍の差があるため、高濃度用と低濃度用の2種の検量線を作成し、定量性を検討した。作成した検量線は、Fig.1のとおり。

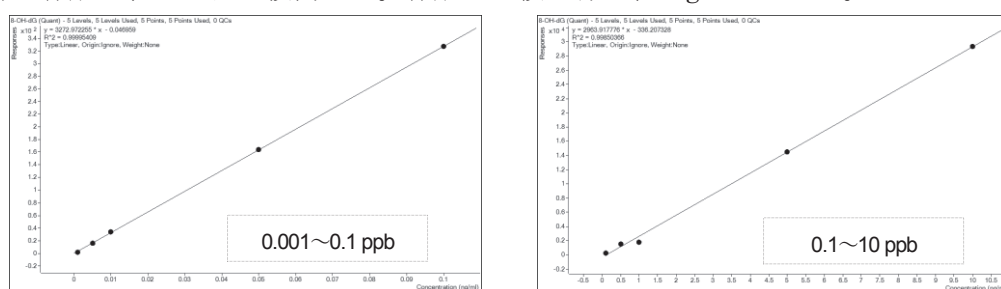


Fig.1 8-OHdGの検量線（0.001～0.1ppb及び0.1～10ppb）

両検量線とも $R^2 \geq 0.999$ と高い直線性を示し、十分な定量性を確認した。

【6-OEdG】

こちらについても高濃度用と低濃度用の2種の検量線を作成、検討した。作成した検量線は、Fig.2のとおり。

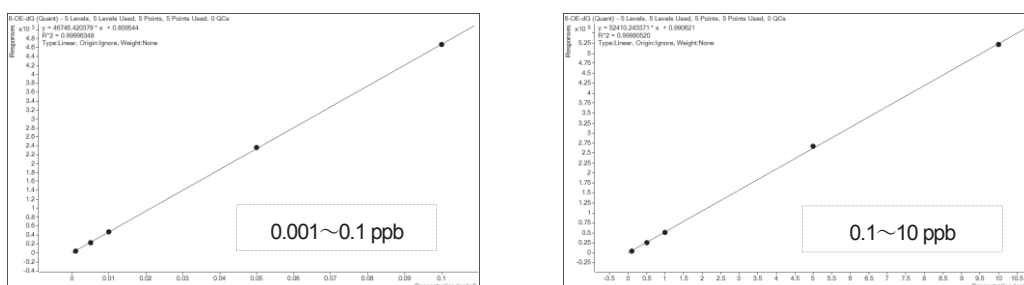


Fig.2 6-OEdGの検量線（0.001～0.1ppb及び0.1～10ppb）

両検量線とも $R^2 \geq 0.999$ と高い直線性を示し、十分な定量性を確認した。

(2) 装置検出下限（IDL）及び装置定量下限（IQL）の検討

検量線最低濃度から3段階の濃度の測定を行い、S/N比が10程度の濃度は8-OHdGでは0.01ppb、6-OEdGでは0.001ppbであることを確認し、その測定値及び標準偏差からIDL、IQLを求めた。結果はTable 1のとおりである。なお、代表的なクロマトグラムをFig.3及びFig.4に示す。

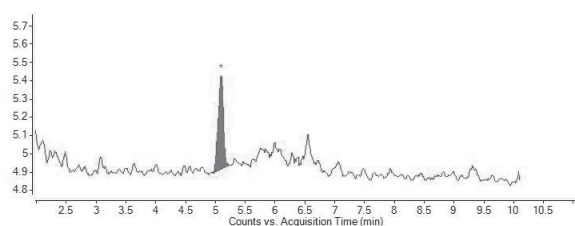


Fig.3 8-OHdGのクロマトグラム(0.01ppb)

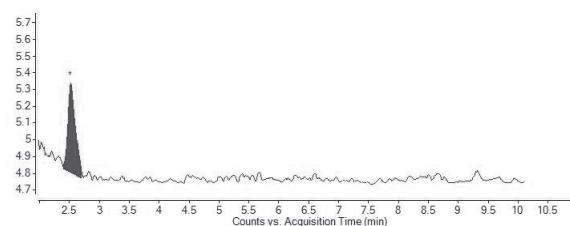


Fig.4 6-OEdGのクロマトグラム(0.001ppb)

Table 1 8-OHdG 及び 6-OEdG の IDL、IQL

	8-OHdG	6-OEdG
concentration (µg/L)	0.01	0.001
volume of injection (µL)	2	2
measured value 1	0.0106	0.00111
measured value 2	0.0106	0.00102
measured value 3	0.0089	0.00118
measured value 4	0.0101	0.00094
measured value 5	0.0106	0.00112
measured value 6	0.0102	0.00111
measured value 7	0.0108	0.00105
mean	0.0103	0.00107
SD	0.000663	0.0000776
CV (%)	6.5	7.2
S/N	9.3	10.8
IDL (µg/L)	0.00258	0.000301
IQL (µg/L)	0.00663	0.000776

IDL、IQL とも非常に良好であり、低濃度まで分析できることが確認された。また、変動係数 (CV) も小さく、機器分析における感度変動も少ないことが確認された。

(3) 保存性の検討

検量線用の標準品は、調整後数時間（少なくとも分析を実施している間）は (1) の結果のとおり非常に良好な定量性を示した。しかし、冷蔵保存では 24 時間後以降は全く定量性を示さなかった。そこで、検量線用の標準品を再調製し、同様の試験を冷凍保存でも行ってみたが、冷蔵保存と同様に安定した定量性は示さなかった。

4 考察

8-OHdG 及び 6-OEdG ともに、定量性、装置検出下限、装置定量下限は非常に良好であった。今回の検討では装置への導入量が 2µL としたため、導入量を増やすことで更なる高感度化が期待できる。しかし、実サンプルを分析する際には導入量の増加でマトリクス量も増加するため、前処理と実試料における検出下限・定量下限の検討を十分に行う必要がある。保存性については、調製直後はきわめて良好な定量性を示したものの、24 時間の経過で定量性は認められなくなった。調製後に一定時間経過すると化学的な作用を受け分解等の変質を起し、定量できなくなったものと考えられた。今後、試料調製において使用する有機溶媒の変更、分解を防止するための方策（例えばアスコルビン酸等の酸化防止剤を一定濃度で添加してみるなど）などを検討していく必要がある。保存安定性を確保することは、今後実サンプルを分析するうえで非常に重要である。それから、6-OEdG のリテンションタイムが 2.5～3.0 分と若干早めであったことから、グラジエントの条件及びカラムを検討することで改善の可能性がある。8-OHdG との分離を保ちつつ、実サンプルを分析するときに発生し得る妨害ピークとの分離も念頭において、分離条件を更に検討していく必要がある。

■参考文献

- 1) Kato K et al. : Mutat Res. 2011, 721(1):21-26
Application of the DNA adductome approach to assess the DNA-damaging capability of in vitro micronucleus test-positive compounds
- 2) 松田知成ら：実験医学 2009, 27(15):183-190
アダクトミクス -DNA 及びタンパク質付加体の網羅的解析

研究課題名	希少植物の種の保存および地域資源としての活用に関する研究
担当	地球科学部 上席専門研究員 小山田智彰

1 目的

岩手県において絶滅の危険性が高まっている植物を対象に「種の保存」を進める増殖技術の開発を検討する。特に本県の歴史や、文化・産業に深いかかわりを持つ植物を対象にする。本研究で開発した技術は、国内の絶滅危惧植物の種の保存および本県の環境保全政策に役立てるのはもちろん、地域の産業振興や農業振興などの高度な要求に応えられるように取り組む。

- 【研究分類1】試験対象種の現状調査
- 【研究分類2】増殖に関する研究
- 【研究分類3】地域資源の活用に関する研究

2 方法

- 【研究分類1】自生地確認、周辺環境の状況、保護の取り組み、先進地の活動状況について調査をおこなう。
- 【研究分類2】絶滅の危険度が高い種については種の維持を進めるための科学的な手法開発を進める。
- 【研究分類3】地域資源の活用として新品種の作出に関する研究を進める。

3 結果

- ①東日本大震災発生後の希少植物の現状と、津波やその後の台風によって自生地が破壊されて絶滅寸前となったエゾオグルマの緊急移植の成果を自然環境復元学会第16回全国大会で発表した【研究分類1】
- ②絶滅危惧種トケンランの現状調査を実施して報文を投稿した【研究分類1】
- ③絶滅危惧種コマクサの大量増殖法を開発し、薬用植物研究に原著論文を投稿した【研究分類2】
- ④本研究で開発したアツモリソウ国際登録種4種と、地下茎で増殖するクマガイソウの交配試験を行った結果、「岩手」が交配に使用できることが明らかになった。得られた種子を発芽させて地下茎からの増殖を確認して報文を投稿した【研究分類3】

4 今後の研究方向等

- ①震災復興に関連した希少野生植物の調査と絶滅回避の取り組みを継続して行う。
- ②生育数が極めて少ない種から特に絶滅の危険性が高い種については、自生地保全の取り組みと同時に種の保存を目的とした苗生産技術の開発を進める。
- ③地域資源の活用に関する研究については、これまでに開発した新品種の特性調査を行う。

表1 主な発表業績

No.	学会・主催団体	掲載書誌名刊号頁	発表・掲載年月日	カテゴリー	タイトル名	発表者名	審査
1	東京山草会	やまぐさ66, 10-12, 36-38	2015. 12. 20	報文	クマガイソウを交配親に用いたアツモリソウの育種(第2報)	小山田智彰・鞍懸重和・佐藤卓・一戸康晃	無
2	東京山草会	やまぐさ66, 13-14, 39-44	2015. 12. 20	報文	岩手県におけるトケンランの現状	小山田智彰・鞍懸重和・一戸康晃・片山千賀志	無
3	園芸植物育種研究所	蔬菜の新品種 第19巻(誠文堂新光社)	2015. 11. 24原稿提出	専門書	南部一郎(ナンブイチロウ)	小山田智彰	無
4	自然環境復元学会	第14回自然環境復元学会研究発表会要旨	2016. 2. 12	発表	東日本大震災後の岩手県沿岸部の希少植物の現状とエゾオグルマの保護	小山田智彰・佐藤卓・山内貴義・鞍懸重和・川目智之	無
5	薬用植物栽培研究会	薬用植物研究	2016. 2. 18 投稿完了	論文	絶滅危惧植物コマクサの組織培養による大量増殖	小山田智彰・山内貴義・鞍懸重和・川目智之	有

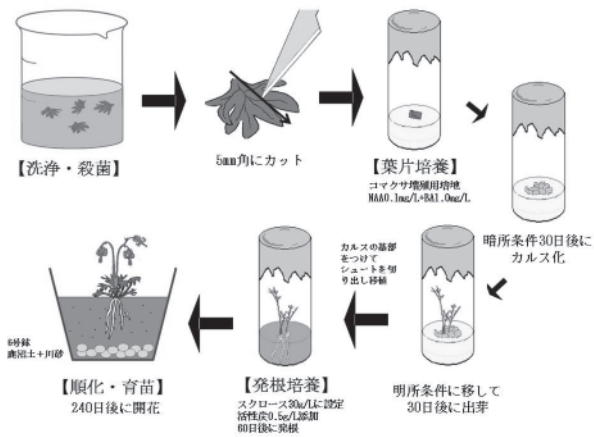


図1 開発したコマクサ大量増殖法の工程

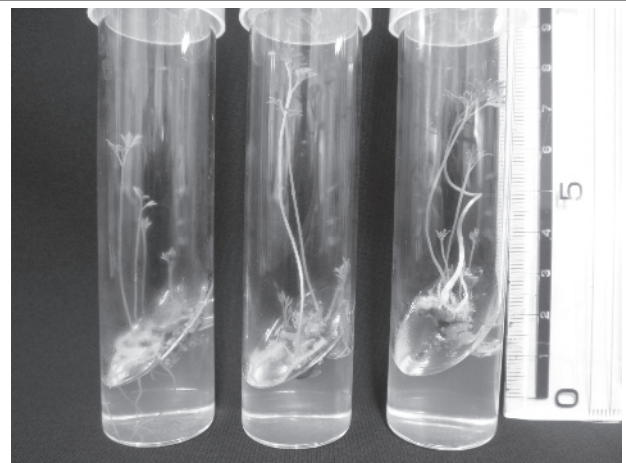


図2 葉片培養由来カルスからの出芽 (明培養 30 日)

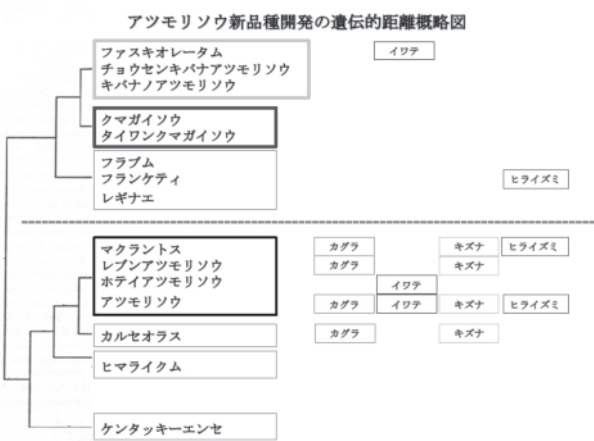


図3 国際登録4種の遺伝的位置関係



図4 クマガイソウとの交配が可能な“岩手”

表2 種の保存に関する技術開発供試植物一覧

No	植物名	試験の理由	実施内容
1	アツモリソウ	種の保存法指定種の野生絶滅回避	苗生産法開発/新品種開発中
2	ハヤチネウスユキソウ	早池峰山固有種の野生絶滅回避	苗生産法開発
3	ハマナゲシコ	東日本大震災の影響による野生絶滅回避	苗生産法開発
4	ムラサキ	野生絶滅回避と南部むらさき染技術保護	発芽法開発
5	ユリ	園芸採種による減少	「種子カット法」開発・原著論文掲載
6	コマクサ	岩手山噴火時の野生絶滅回避	大量増殖法開発・原著論文投稿
7	セッコク	前レッドデータ絶滅種の野生絶滅回避	苗生産法開発試験中
8	サルメンネビネ・エビネ	園芸採種による激減	苗生産法開発試験中
9	サギソウ	自生地1か所のみ野生絶滅回避	苗生産法開発試験中
10	ノビネチドリ	園芸採取による激減	苗生産法開発試験中
11	シラネアオイ	ニホンジカの生息地拡大による食害対策	苗生産法開発試験中
12	ミヤマウズラ	ニホンジカ生息地内に自生するランの増殖	苗生産法開発試験中
13	エゾオグルマ	東日本大震災の影響による野生絶滅回避	絶滅回避の緊急移植成功・学会口頭発表
14	ユキワリコザクラ	自生地少なく、野生絶滅回避	試験準備
15	リシリシノブ	ニホンジカの生息地拡大による食害対策	試験準備
16	トチナイソウ	早池峰山自生の希少種の野生絶滅回避	試験準備

研究成果報告書 (18)

研究課題名	イヌワシ個体群の生態的特性および遺伝的構造に関する研究		
担当	地球科学部	主査専門研究員	前田 琢
1 目的			
<p>本研究では、イヌワシの個体群としての特性把握を目的として、個体の移動追跡調査や、羽根、卵殻、ペレット等のサンプルによる遺伝子解析を通して、移動分散や遺伝的多様性に関する知見の収集を行なう。また、森林の等高線方向列状間伐施業地におけるイヌワシの利用状況を解明し、希少種保全のための森林管理手法への寄与を目指す。さらに、各つがいの繁殖状況の把握や、繁殖支援事業の効果測定についても継続的に調査を行ない、保全に貢献するデータの拡充を図る。</p> <p>27年度に調査研究を行なった主な内容は次の通りである： (1) 県内各営巣地における2015年の繁殖状況調査、(2) 羽根等を利用した遺伝子解析、(3) 営巣場所の改良や給餌による繁殖支援効果の検証、(4) 映像を用いた個体識別による移動解明。</p>			
2 方法			
<p>(1) 県内で確認されている全ての営巣地で、繁殖期全般にわたってつがいの行動、巣の状態、ひなの生育状態等を現地調査した。また、県内の観察者からネットワークを通じてイヌワシの観察情報を収集し、生息・繁殖状況の詳細をまとめた。</p> <p>(2) 野外においてイヌワシの羽根、ペレット、卵殻、糞などを採取し、これらの試料よりDNAを抽出し、27マーカーを用いたマイクロサテライトの解析およびミトコンドリアコントロール領域、擬コントロール領域についての解析を行なった。</p> <p>(3) より良い繁殖のために営巣地の改良作業を実施するとともに、これまでに改良した営巣地を含め、その後の利用状況をモニタリングした。また繁殖率の向上を目的として3つがいを対象に給餌を行ない、効果の検討を行なった。</p> <p>(4) 県内各地で撮影されたイヌワシの映像を収集し、個体の特徴を比較することにより同一個体を識別し、個体の移動の状況を明らかにした。</p>			
3 結果			
<p>(1) 2015年にひなの巣立ちを確認したのは4つがいで、消失つがいを含めない繁殖成功率は14%であった。繁殖が不成功となった時期は、育雛期5例、抱卵期6例、造巣期5例、造巣前12例(推定含む)であり、産卵まで至ったつがいは例年よりやや多い15つがいであった。10年以上成功のなかったつがいで巣立ちも、2例確認された。</p> <p>(2) 繁殖後の営巣地周辺において、羽根や卵殻片など新たに25点の遺伝子試料を収集した。これまでに集めた試料のうち、野生個体65試料、飼育個体24試料をもとに、京都大学と共同で遺伝子解析を進め、新規開発したマーカーを含む27マーカーで型判定を行なった。その結果、mtDNAのコントロール領域では、ニホンイヌワシでは未報告であったH1や、新規発見されたJ1、J2を含む8ハプロタイプが明らかになった。mtDNAの擬コントロール領域では、従来のa-dタイプに加え、新たにfタイプが見つかった。両者を組み合わせたハプロタイプ多様度から、イヌワシは個体数の少なさにかかわらず、遺伝的多様性が高い可能性が示された。</p>			

(3) 2015 年は、過去に改良作業を実施した 4 箇所の営巣地でイヌワシの繁殖利用がみられ、そのうち人工巣台と防雪屋根を設置した営巣地では巣立ち成功が確認された。また、給餌対象とした 3 つがいのうち 2 つがいで餌の利用が見られ、利用率は 100% および 25% であった。しかし、両つがいとも繁殖は抱卵期中止となった。

(4) 映像による個体識別で、久慈市に生息するつがいと岩泉町に生息するつがいが、それぞれ 14 キロ、47 キロ離れた餌場を利用していたことが明らかになった。また、釜石市から宮古市まで 40 キロ移動した個体も確認された。

4 今後の研究方向等

- (1) 未確認のつがい、営巣地が示唆される地域について探索調査を進める。
- (2) 個体の映像データベースを拡充し、同一個体の識別事例を増やす。
- (3) 岩手県外も含めて DNA サンプルを収集し、岩手県の個体群の遺伝的特性を解明する。
- (4) つがいによる繁殖成績の違いについて、餌場の分布などの地理的要因を GIS 用いて解析する。

研究成果報告書(19)

研究課題名	ヘア・トラップ法によるツキノワグマの生息動向と個体数推定法の開発
担当	地球科学部 主査専門研究員 山内 貴義
1 目的	<p>ヘア・トラップ調査のモデル地域を設定し、個体群のトレンドを把握する。そして継続したヘア・トラップ調査の結果を組み入れる統計シミュレーションモデルを試行し、岩手版の生息動向と個体数推定法を確立することを本研究課題の目的とした。本年度はヘア・トラップ調査を実施し、これまでの調査結果の比較を行うこととした。</p>
2 方法	<p>北奥羽地域(岩手大学御明神演習林)に17基のヘア・トラップを5月下旬に設置した。トラップは有刺鉄線を2本張る構造にした(図)。また急峻な地形のためヘア・トラップが設置出来ない1カ所についてはヘア・トラッパーを設置した(図)。トラップ設置後2~3週間ごとに5回の体毛回収を行った。体毛は野外で茶封筒に回収した。研究室で直ぐに30℃の恒温機で乾燥させ、分析まで-20℃で保存した。体毛は実態顕微鏡を用いて毛根の有無を確認し、毛根部分のみを1サンプルあたり30本までマイクロチューブに回収した。1トラップのサンプルで30本に満たない場合は、直ぐそばの有刺鉄線の棘から採取されたサンプルを混合して1サンプルとした。抽出はDNA Extractor FM kitを用いた。抽出したDNAは分光光度計で濃度を測定した後、マイクロサテライト部位を増幅するMultiplex PCRと、アメロゲニン部位を増幅するPCRをそれぞれ行った。マーカーセットはG10C・G10L・G10Bと、MUUT2・UarMU23・UarMU05を用い、それぞれMultiplex PCRを実践した。フラグメント解析はABI社製Genetic Analyzer 3130xlを用い、対立遺伝子の判定はGeneScan 600 LIZ Size Standardに基づいてGeneMapper v4.0によって行った。ミスマッチの照合や再分析の方法はUno et al. 2012の方法に準じた。</p>
3 結果	<p>遺伝子解析に用いたセッションごとのサンプル数と分析成功率、各セッションの確認頭数を表に記した。遺伝子解析成功率はどのセッションにおいても高い値を維持した。最終的な演習林での確認頭数は24頭であった。演習林では過去9年間のヘア・トラップ調査が実施されているが、その結果と比較すると若干高い値になった。空間明示型標識再捕獲モデルによって個体数密度を推定した結果、0.35頭/km²であった。2013年度が0.29頭/km²であり、2014年度が0.33頭/km²であり、若干上昇傾向であった。</p>
4 今後の研究方向等	<p>上記の調査を来年度も継続して実行する。2015年に行われた国際野生動物管理学会(International Wildlife Management Congress)に同研究をポスター発表した。これまでのデータでharvest-based modelの作成に成功したことから、今後は新たなヘア・トラップ調査結果をモデルに組み込んで個体群動態のシミュレーションを進める。</p>

表1 各セッションのサンプル数と遺伝子解析成功率, 遺伝子解析による個体識別後の確認頭数

セッション	サンプル数	分析成功率	確認頭数
第1セッション	34	88.2	10
第2セッション	50	98.0	15
第3セッション	35	91.4	12
第4セッション	27	88.9	10

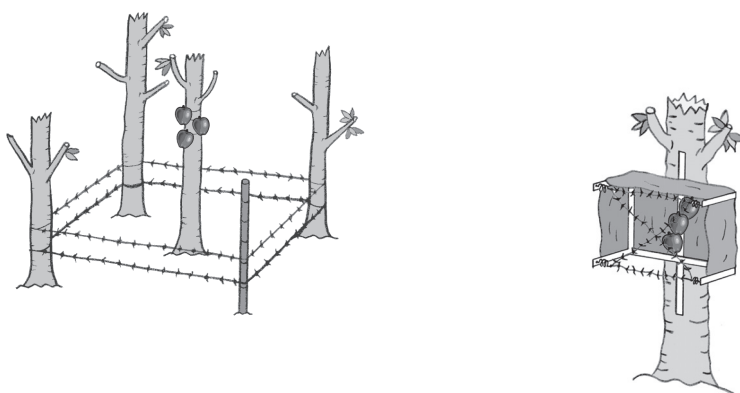


図1 ヘア・トラップ装置の模式図

研究成果報告書(20)

研究課題名	ニホンジカの個体数推定と将来予測に関する基礎的研究
担 当	地球科学部 主査専門研究員 山内 貴義

1 目的

岩手県では様々なモニタリング調査を実施して保護管理計画を運用してきた。しかし急激な分布の拡大、里周辺に生息する個体の増加など、従来までの個体数推定法では正確な生息状況ならびに将来予測が不可能になっている。そこで本研究では個々の事業で蓄積されたデータを用いて、ヘリコプター調査に代わる五葉山地域の個体数推定法を確立することとした。今年度は各データセットのまとめとシミュレーション方法の検討を実施した。

2 方法

捕獲個体調査のために有害・狩猟捕獲で回収されたニホンジカの下顎と腎臓を用いて年齢査定と栄養状態調査を実施した。下顎を煮沸して第一切歯を抜き取り、クリーニングして0歳、1歳、2歳以上の区分に分けた。腎臓はライニー係数を測定した。また2002年からの捕獲個体調査票を元に雌雄及び年齢ごとの妊娠率を算定した。

3 結果・考察

妊娠率の推移結果とライニー係数による栄養状態の結果をそれぞれ図1と図2に示した。サンプル数が10以下のデータはバラつきが大きくなるため削除した。五葉山地域もそれ以外の地域でも妊娠率の上昇が見られ、特に1歳の上昇が顕著であった。過去のデータはサンプル数が少なく比較が難しいが、全体的に2010年ごろと比較するとメスもオスも上昇傾向であった。オスはここ3年では下がってきている。2013年からシカの捕獲が急増したが、生息密度が減少した原因で個体の栄養状態は良好な状態に向かっている可能性が考えられた。

4 今後の研究方向等

上記の調査を来年度も継続して実行する。岩手県独自のシミュレーションとして、妊娠率や栄養状態を加味したモデルが作成可能か検討してみる。

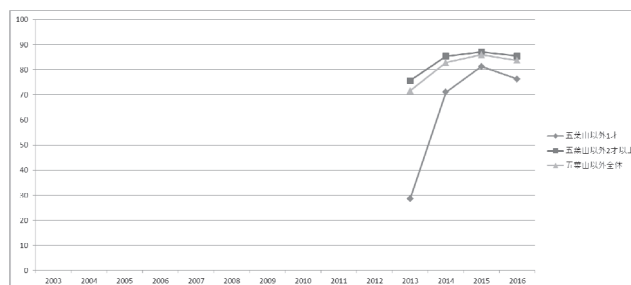
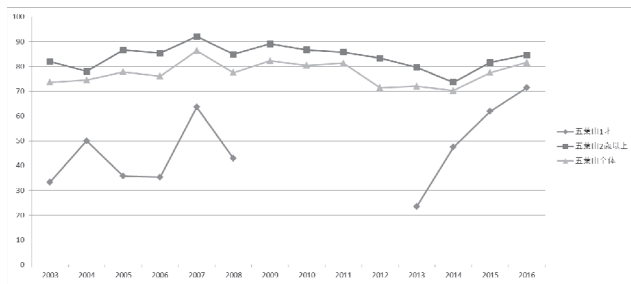


図1 妊娠率の移動平均

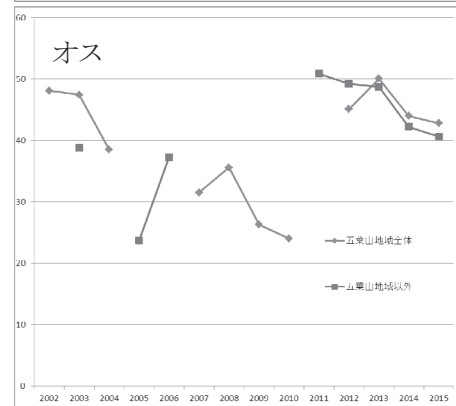
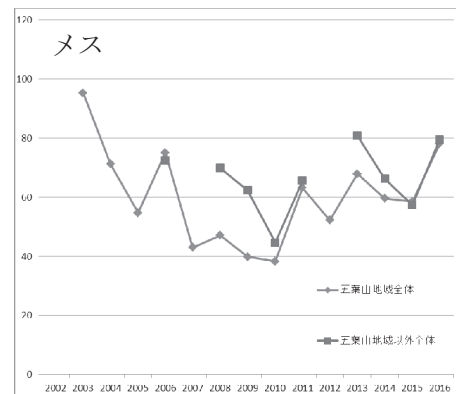


図2 ライニー係数(腎脂肪指数の推移)