

研究成果報告書(1)

研究課題名	ノロウイルス検出感度向上に関する研究
担 当	保健科学部 主査専門研究員 佐藤 直人
1 目的	<p>ノロウイルス (NoV) は、食中毒患者数の 50%以上を占めることから公衆衛生上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、食品中に含まれる NoV 量は低レベルの場合が多く、食品から 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 検出の感度向上を目的として、昨年度に引き続き磁気ビーズを用いた NoV RNA の濃縮工程について検討した。</p>
2 方法	<p>NoV RNA : 2014 年に県内で発生した NoV による感染性胃腸炎の集団発生事例の患者の糞便から RNA を抽出し、TE Buffer (pH8.0)で段階希釈し、RNA 濃度を調整した。</p> <p>NoV RNA 捕集用プローブ : NoV GI および GII 用プローブは、通知法(厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：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、2007)に基づき設計した。各プローブは TE Buffer (pH8.0)で希釈し、濃度を調整した。</p> <p>磁気ビーズ : 市販の磁気ビーズを用い、メーカーの推奨するプロトコールに従い洗浄バッファで洗浄した後、試験に供した。</p> <p>反応条件の検討 : 磁気ビーズにプローブを加え、おだやかに攪拌しながらインキュベートし、プローブを磁気ビーズ上に固定した。プローブを固定した磁気ビーズに、今回メーカー推奨バッファの一部を改変したバッファ (885 mM NaCl、20 mM EDTA、0.01% v/v Tween 20、25% v/v ホルムアミド NoV RNA を添加) を加え、15 分間、室温でインキュベートした後、PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)(TaKaRa)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> <p>カキからの検出 : NoV GII 陽性を示したカキの RNA 抽出液を用いて、上記の方法による検出を試み回収率を算出した。</p>
3 結果	<p>(1) 反応条件の検討結果 : 今回改変したバッファを用いて NoV GI および GII それぞれの添加回収試験を実施したところ、GI は 9~32%、GII は 10~28%であった。なお、本結果は昨年度とほぼ同等であった。</p> <p>(2) カキからの検出 : カキの RNA 抽出液における回収率は 6~30%と、(1) の添加回収試験と概ね同等の成績が得られた。</p>
4 まとめ	<p>今回、ホルムアミドを加えた反応バッファによる方法を検証した結果、検出感度を向上させることは出来なかったが、当該磁気ビーズとプローブを組み合わせることで NoV RNA の特異的な検出が可能となった。このことは、複数の NoV が混合している検体において、遺伝子型特異的なプローブを利用することで特定の遺伝子型の検出に応用可能であることが示唆された。</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

岩手県は、食品衛生監視指導計画において、放射性物質検査を重点項目とし、年間約 200 件の流通品を収去検査している。一方、収去計画によらないその他の食品については、各部局に係る当該検査機関が、別途に検査体制をとっているが、時節による食品である春先の野生山菜や夏から秋にかけてのキノコについては、岩手県庁総務部に設置された放射線影響対策本部が各市町村に対し、検体採取の依頼をし、環境保健研究センターがそれらの測定を行っている。すなわち、出荷制限指示の対象となる市町村を除いた地域での野生山菜、野生キノコの放射性物質（セシウム 134、セシウム 137）を約 120 件ほどを依頼されている。一方、各市町村においてもシンチレーション式放射能測定器を自前で設置し自主的にスクリーニングテストを行っているケースも少なくない。しかしながら、装置の機種は違うとしても、測定時間などの測定条件がまちまちであるため、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測定した値との整合性を検証しないまま使用しているのがほとんどである。そこで本報では、福島市内の土壌及び野生動物の肉を試料とし、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それぞれを測定した結果から、二つの測定方法の関係性について、検討した。

2. 実験方法

2-1 実験試料

測定の前準備実験で使った土壌は福島市内の果樹農家の畑から採取したもので、三箇所からサンプリングした。野生動物の肉については、昨年度捕獲した試料の中から、100Bq/Kg以上の値が出たクマ（奥州市）とシカ（一関市）の腰肉を用いた。

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) 土壌：福島は土壌は果樹園の下草を含んだ表土を粉砕などの手を加えず、そのまま使用した。
- 2) 野生動物の肉：奥州市で捕獲された推定 4 歳の雄のクマ、および一関市で捕獲された推定 0 歳の雌のシカ、それぞれの肉を手動でミンチにしたものを測定に供与した。
- 3) 測定方法：いずれの試料においても U8 の容器を使用し、その重量と高さを基礎データとして入力し計測を行った。ゲルマニウム半導体検出器では 3600 秒間でベクレルを測定し、シンチレーション式放射能測定器では測定時間をかえて測定した。また一部は試料の量を変えて計測を行った。

3. 実験結果

3-1 土壌の測定

福島は果樹園の三箇所から採取された土壌をU8容器100ml（高さ：60cm）に充填し、ゲルマニウム半導体検出器で放射能を測定した。その結果を表 1 に示す。このU8をそのまま使い、NaIシンチレーション式放射能測定器でも測定を行った。その結果を表 2 に示す。なお、バックグラウンドは3600秒で計測した。ゲルマニウム半導体検出器で測定した土壌の平均値が T-Csで8890Bq/Kgであったのに対し、シンチレーション式放射能測定器での平均値は9650

Bq/Kgであった。測定時間を900から5400秒と長くすることによって、T-Csは9581から9761 Bq/Kgと上がって行った。それに合わせCs137とCs134との比率もCs137の率が高くなった。シンチレーション式放射能測定器ではU8に充填する試料の体積が決まっているために、U8内の試料の高さも60mmでなければならない。それをあえて47、40mmと高さを変えて測定した結果、その値に変化はあまり見られない一方で、ゲルマニウム半導体検出器で測定した値と大きな開きが生じた。

3-2 野生動物の肉の測定

クマ、シカ肉をゲルマニウム半導体検出器およびシンチレーション式放射能測定器で測定した結果のうちクマのデータを表3に示す。バックグラウンドを1時間、2時間と長くすることでゲルマで測定したデータとの差である Δ Csの値が小さくなっていることが分かる。また測定時間が長くなることで、その値は小さくなった。このことから、バックグラウンドは長くとり、なおかつ測定時間を十分にとることによってシンチレーション式放射能測定器を用いても、ゲルマニウム半導体検出器で測定した値に近似することが分かった。

4 結果

シンチレーション式放射能測定器で測定した値とゲルマニウム半導体検出器で測定した値の相違について、比重の重い土壌を試料として検討を行った結果、前者の方が高い値を示す傾向があった。また測定時間を長くすることで検出限界値は下がるが、測定値はわずかに上がった。食品の対象物としたクマ、シカ肉の測定でも、同様の傾向が見られたことから、ある程度の比重をもった食品に関してはシンチレーション式放射能測定器を用いても十分に安全基準をクリアできるかどうかの判定が可能であることが分かった。

表1 ゲルマニウム半導体検出器による土壌の測定

試料番号	Cs137	Cs134	T-Cs
①	6550	2350	8900
②	6540	2350	8890
③	6540	2340	8880

測定時間 MT(秒) : 3600、容器 : U8

表2 シンチレーション式放射能測定器による土壌の測定値(Bq/kg)

測定時間(秒)	Cs137	Cs134	T-Cs
900	6916	2665	9581
1800	7081	2601	9682
3600	7326	2635	9961
5400	7169	2592	9761

バックグラウンド (BG) 時間 : 3600 秒、
容器 : U8

表3 シンチレーション式放射能測定器によるクマ肉の測定値(Bq/kg)

BG(sec)	MT(sec)	Cs137	Cs134	T-Cs	Δ Cs
3600	1800	141	46	187	26
3600	3600	131	59	190	29
3600	5400	131	46	177	16

BG(sec)	MT(sec)	Cs137	Cs134	T-Cs	Δ Cs
7200	3600	131	47	179	18
7200	5400	124	50	174	13
7200	7200	128	50	177	16

* Δ Cs: {T-Cs}-161 (Bq/kg)

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 上席専門研究員 梶田 弘子
<p>1 目的</p> <p>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、マダニの生息調査と日本紅斑熱、ライム病及び回帰熱病原体の遺伝子保有調査を実施した。また、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たことから県内11地点の植生上及び野生動物付着のマダニについてSFTSウイルス遺伝子保有調査を実施した。</p> <p>2 方法</p> <p>(1) 調査は平成26年6～11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植生上及びニホンジカに刺咬したマダニについて実体顕微鏡で種を同定後、核酸抽出（QIAamp DNA Micro kit、DNeasy Blood and Tissue kit 及び Isogen II）を行った。日本紅斑熱リケッチア、ライム病及び回帰熱ボレリア遺伝子の検出はリアルタイムPCR法で行い、SFTSについては、厚生労働科学研究事業により地方衛生研究所に配布されたウイルス検出用マニュアル及び試薬を使用し、リアルタイムRT-PCR法により実施した。</p> <p>(2) リアルタイムPCR法で標的遺伝子の増幅が確認された検体は紅斑熱群リケッチア遺伝子（R1-R2）、Rj遺伝子（R5-R10）、ボレリア遺伝子（flaB）を標的としたconventional PCR法を行い、陽性検体について遺伝子塩基配列の解析を行った。</p> <p>3 結果</p> <p>(1) 生息調査の結果、2属11種のマダニが確認された（表1）。ライム病及び回帰熱を媒介するシュルツェマダニや国立感染症研究所が実施したSFTSウイルス国内分布調査においてウイルス遺伝子が検出されたフタトゲチマダニ、キチマダニ、オオトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニの生息が本県においても確認された。</p> <p>(2) 日本紅斑熱リケッチア、ライム病及び回帰熱ボレリア遺伝子を保有するマダニは確認されなかったが、ヤマトマダニからヒトに対し非病原性のライム病群ボレリア <i>Borrelia japonica</i> 遺伝子が39.6%検出された（表2）。</p> <p>(3) SFTSは、リアルタイムRT-PCR法により10コピー数からウイルス遺伝子が検出可能であった。植生マダニ8種92検体（11地点-図1）とニホンジカ刺咬マダニ2種10検体について遺伝子検査を実施したが、すべて陰性であった（表3）。</p> <p>4 まとめ</p> <p>26年度の調査では、SFTS、日本紅斑熱、ライム病及び回帰熱の病原体遺伝子を保有するマダニは検出されなかった。感染研が実施したSFTSウイルス分布調査結果と異なった要因として、チマダニ属に限定せずマダニ属についても調査対象としたこと、また、各調査地点における検体数も少なかったことが挙げられる。</p> <p>しかし、県内にマダニ媒介性感染症のベクターとなりうるマダニ種の生息が確認されていることから、今後も本調査を継続し、本県におけるマダニ媒介性感染症の感染リスクの把握と情報提供に努めたい。</p>	

表 1 生息調査結果及び遺伝子検査検体数

チマダニ属 (<i>Haemaphysalis</i> 属)		遺伝子検査 検体数
オオトゲチマダニ	<i>H. megaspinosa</i>	44
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
ヤマトチマダニ	<i>H. japonica</i>	4
イスカチマダニ	<i>H. concinna</i>	
マダニ属 (<i>Ixodes</i> 属)		遺伝子検査 検体数
ヤマトマダニ	<i>I. ovatus</i>	110
ヒトツゲマダニ	<i>I. monospinosa</i>	7
シュルツェマダニ	<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>	

表 2 日本紅斑熱リケッチア、ライム病群及び回帰熱群ボレリア遺伝子検査結果

種類	日本紅斑熱		ライム病群		回帰熱群	
	検出数/検体数	陽性率	検出数/検体数	陽性率	検出数/検体数	陽性率
オオトゲチマダニ	0/6	0	0/6	0	未実施	
ヒゲナガチマダニ	0/6	0	0/6	0	未実施	
フタトゲチマダニ	0/5	0	0/5	0	未実施	
キチマダニ	0/1	0	0/1	0	未実施	
ヤマトマダニ	0/6	0	36/91 <i>B.japonica</i>	39.6	0/85	0
シュルツェマダニ	未実施		0/3	0	0/3	0
ヒトツゲマダニ	未実施		0/4	0	0/4	0
合計	0/24	0	36/116	31.0	0/92	0



▲ マダニ採集場所

図 1 SFTS 遺伝子検査を実施したマダニの採集場所

表 3 SFTS 遺伝子検査結果

マダニ種		陽性数/検体数
植生	オオトゲチマダニ	0/38
	ヒゲナガチマダニ	0/20
	キチマダニ	0/5
	ヤマトチマダニ	0/4
	フタトゲチマダニ	0/3
	ヤマトマダニ	0/19
	ヒトツゲマダニ	0/3
	シュルツェマダニ	0/1
ニホンジカ 刺咬	オオトゲチマダニ	0/7
	ヒゲナガチマダニ	0/3
計		0/102

研究成果報告書(4)

研究課題名	薬剤耐性菌に関する研究
担 当	保健科学部 上席専門研究員 岩淵香織
1 目的 <p>感染症治療の目的で高頻度で使用される抗菌薬に、ペニシリン系やセフェム系などのβ-ラクタム系抗菌剤がある。これらは、人への副作用が少ない薬剤の一つであるため、繁用されている。一方で、これらの薬剤の使用機会や使用量の増加に伴い、抗菌薬に対する耐性化、すなわち「薬剤耐性菌」の発生が問題となっている。</p> <p>近年 ESBL (extended-spectrum β-lactamase) 産生菌 (以下 ESBL) と呼ばれる、遺伝子の変化により広範囲のβ-ラクタム系抗菌剤に耐性を持った薬剤耐性菌が増加している。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¹⁾が、これまで県内では、この耐性遺伝子の型別試験は行われておらず、本県における ESBL の分布状況は把握されていない。そこで、ESBL の分布状況を把握するため、県内の主要な医療機関で検出された ESBL の遺伝子型別を行うものである。</p>	
2 方法 <p>(1) 材料</p> <p>県内3カ所の医療機関で、平成25年9月から平成27年3月にかけて検出され、当センターに提供されたβ-ラクタマーゼ産生菌計75菌株のうち、68菌株のESBL産生菌株を対象とした。菌種は、<i>Escherichia coli</i>が63株(92.6%)、<i>Klebsiella pneumoniae</i>が4株(5.9%)、<i>Enterobacter cloacae</i>が1株(1.5%)で、これらを検出した材料は、尿検体52検体(76.5%)、呼吸器検体4検体(5.9%)、動脈血3検体(4.4%)、その他9検体(13.2%)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)を用いた。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</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。^{2) 3)}</p> <p>(4) シークエンス</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5株は、世界的に増加が問題となっているB2-O25b:H4-ST131-CTX-M-15であることが疑われることから、その中の実施可能な3株について、(3)で得られたPCR産物のダイレクトシークエンスにより遺伝子配列の解析を行った。</p>	
3 結果 <p>(1) 血清型別</p> <p>大腸菌63株のO群型別では、多い順に、O25が36株、O1が9株、O15が3株、O86aが2株で、OUT(型別不能)が13株であった(表1)。</p> <p>(2) ESBL 遺伝子の検出</p> <p>提供されたESBL68株では、CTX-M-1 groupが19株、CTX-M-9 groupが44株、SHVが3株、TEMが15株検出され、CTX-M-2 groupは検出されなかった。また、ESBL遺伝子が検出されない菌株が7株あった(表2)。</p> <p>(3) シークエンス</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3株は、すべてCTX-M-15であった。</p>	

4 今後の研究方向等

今回、岩手県における ESBL の解析を行った結果、下記のとおり得た。今後も引き続き、本県における ESBL の解析を行い、県内動向を監視する必要がある。

- ESBL が検出された材料は、尿検体が 52 検体 (76.5%) と最も多く、泌尿器領域からの分離頻度が高い。また、動脈血からも 3 検体 (4.4%) が検出された。
- ESBL と判定された 68 株のうち、*E. coli* が 63 株 (92.6%) と最も多かった。
- ESBL 遺伝子型では、CTX-M-9 group が 68 株中 44 株 (64.7%) と最も多かった。
- 世界的に増加が問題となっている B2-O25b:H4-ST131-CTX-M-15 が疑われる *E. coli* が 3 件検出された。これらについては、ST131 について確認するため、さらに MLST (Multilocus sequence typing) で解析する必要がある。

表1

serotype	No.of isolates	ESBL type				
		CTX-M-1 group	CTX-M-9 group	SHV	TEM	ND [※]
O25:H4	29	5	23		5	1
O25:H-	3		2			1
O25:HUT	4	1	3		1	
O1:H6	3	1	2		1	
O1:H-	1					1
O1:HUT	5	2	3		1	
O86a:H18	2	1	2			
O15:H6	1					1
O15:H18	1					1
O15:H-	1		1			
OUT:H4	6	3	3		2	
OUT:H6	1	1			1	
OUT:H18	1		1			
OUT:H19	1	1				
OUT:H-	1	1				
OUT:HUT	3		2		1	1
Total	63	16	42		12	6

※ND:検出せず

表2

	No.of isolates	ESBL type				
		CTX-M-1 group	CTX-M-9 group	SHV	TEM	ND [※]
<i>E.coli</i>	63	16	42		12	6
<i>K.pneumoniae</i>	4	2	2	3	3	1
<i>E.cloacae</i>	1	1				
Total	68	19	44	3	15	7

※ND:検出せず

- 文献 1) Pitout JD., *et al.*: Lancet Infect Dis., 8, 159-166, 2008
 2) Shibata, N., *et al.*: Antimicrob. Agents Chemother., 50(2), 791-795, 2006
 3) Yagi, T., *et al.*: FEMS Microb. Lett., 184, 53-56, 2000.

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 主査専門研究員 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

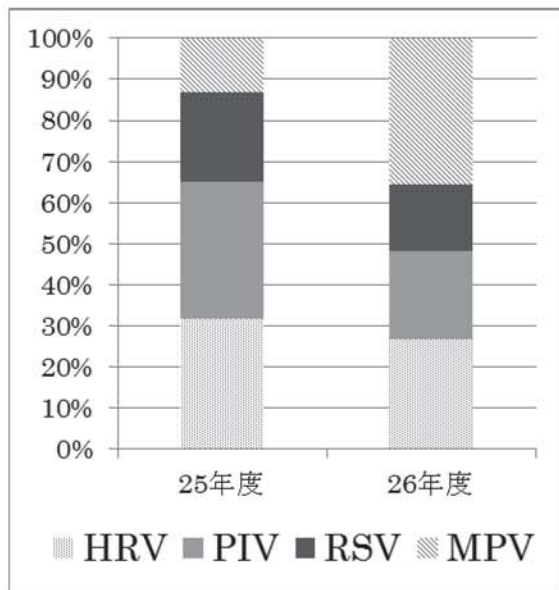


図 1. 年度別検出率

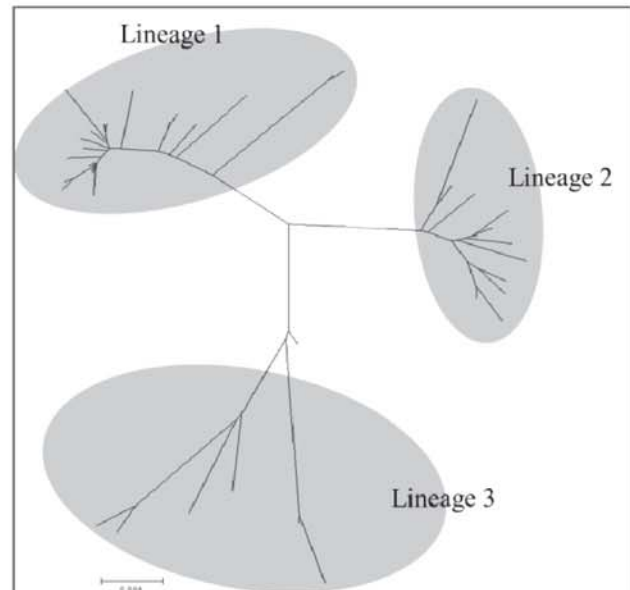


図 2. 近隣結合法による無根系統樹

研究成果報告書(6)

研究課題名	ウイルス媒介性節足動物の生息に関する研究
担当	地球科学部 主査専門研究員 西井 和弘
1 目的	<p>ヒトスジシマカは、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、年平均気温等の生息条件を検討することにより地球温暖化防止対策に資することを目的とする。</p>
2 方法	<p>生息北限における蚊類の生息状況調査は平成 26 年 6～10 月、岩手県盛岡市、宮古市、二戸市、花巻市、遠野市、山田町、大槌町、一戸町、雫石町の 5 市 4 町の計 54 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に生息する主にヤブカの幼虫及び蛹で、太口ピペットで採取した。1 調査地点につき 1～8 人工容器を調査した。採取した蚊の幼虫を室温で飼育し、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>
3 結果	<p>成虫の羽化が確認された 54 地点 216 人工容器について、計 1157 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、ヤマトヤブカは全採集地点 54 か所のうち 46 か所で確認され、捕集数も最も多く、調査地域全域において優先種で在来種であった。次いで多く採取されたのはヒトスジシマカで、盛岡市仙北町、大慈寺町、下ノ橋付近、天昌寺町、花巻市東和町の 8 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、平成 25 年度の北限であった盛岡市天昌寺町 (39° 42' 42" N, 141° 07' 16" E) であり、定着が確認された。平成 22 年にヒトスジシマカの北限として確認された玉山区及び下ノ橋の北に位置する名須川町においては、平成 26 年には同蚊の生息は確認できなかった。</p> <p>東北地方の主要幹線道路が貫通し県庁所在地でもある盛岡市では、生息地からのヒトスジシマカの移入も頻繁で、気温の温暖化や、ヒトスジシマカの生態的適応や社会・経済的環境の変化に伴い分布の北上・南下を繰り返しつつ、徐々に北上を続けていると考えられる。ヒトスジシマカの分布は気温の上昇に併せ、岩手県内を北上と南下を繰り返しながら北上しつつある。このように、今後とも生息状況を確認することは、地球温暖化の観点からも重要である。</p>
4 今後の研究方向等	<p>今年度の調査ではヒトスジシマカの生息北限は盛岡市天昌寺町であったが、局所的な定着か判断するために、次年度も同地点周辺で再度生息を確認する必要がある。さらに、同蚊の県内の生息分布を明らかにするため、沿岸部等より多くの地点で調査を行うことが必要である。今後、地球温暖化などによる気温の上昇に伴い、同蚊の分布域がさらに拡大することが予想され、継続して監視していくことが必要である。</p>

研究成果報告書(7)

研究課題名	WET 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 田老 真帆																								
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。このような実態を踏まえ、近年、複数の化学物質に曝露された際の影響を評価する手法としてバイオアッセイが用いられるようになってきており、特に事業所排水の管理を目的とした手法として、米国や欧州などで導入されている WET の導入が我国においても検討されている。</p> <p>本研究は、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、滋賀県琵琶湖環境科学研究センター、川崎市環境総合研究所、名古屋市環境科学調査センターと共同で行い、それぞれの地方の事業所排水や環境水を数箇所です複数回サンプリングし、WET と同様な手法を用いて評価することで汚染の現状と特徴を把握することを試みる。何らかの影響が確認された場合にはその原因物質を特定し、排出削減方法などを提案し、地域の水環境の向上に貢献する。</p> <p>本共同研究を今後の WET の規制化に向けたケーススタディと位置づけ、国立環境研究所と地方環境研究所との技術の共有や試験手法及び TRE/TIE 手法の更なるブラッシュアップに向けた知見の集積を目指す。</p>																									
2 方法																									
<p>(1) WET 手法を用いた水環境調査のケーススタディのワークショップに参加すること、ならびに WET 導入機関への視察を実施し、TRE/TIE 手法の導入に向けた知見の集積をする。</p> <p>(2) 環境に即したケーススタディによる WET 手法を用いた調査事例の集積をめざし、関東地方を主とした河川・事業所排水（川崎市鶴見川水系、横浜市鶴見川水系 2 箇所、千葉県一宮川水系 2 箇所、名古屋市事業所排水）の生物試験を実施する。事例の集積・検証を行い、現行のガイドラインの問題点などを洗い出す。</p>																									
3 結果																									
<p>(1) 川崎市環境総合研究所および株式会社環境管理センターでは次の概要で WET 試験が実施されていた。</p> <p>川崎市環境総合研究所</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2" style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法</td> </tr> <tr> <td style="width: 20%;">生物種</td> <td>ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)</td> </tr> <tr> <td>飼育水</td> <td>水道水を活性炭ろ過したもの、pH6.5-8.5、溶存酸素 80%以上</td> </tr> <tr> <td>飼育条件</td> <td>水温 26±1℃、照明明期 12-16h、暗期 8-12h</td> </tr> <tr> <td>餌</td> <td>アルテミア（ブラインシュリンプ、ビタミンブラインシュリンプ）</td> </tr> <tr> <td>採卵</td> <td>一週間おきに選抜したメス 3 匹、オス 4 匹で水層に収容して産卵させる</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法</td> </tr> <tr> <td>生物種</td> <td>ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)</td> </tr> <tr> <td>飼育水</td> <td>水道水を活性炭ろ過したもの、硬度 60-100mg CaCO₃/L に調整</td> </tr> <tr> <td>飼育条件</td> <td>水温 25±1℃、照明明期 16h、暗期 8h</td> </tr> <tr> <td>餌</td> <td>YCT およびクロレラ水</td> </tr> <tr> <td>供試個体の準備</td> <td>マスカルチャーでは生後 1 週間以上飼育し継代 シングルカルチャーでは飼育開始から 7 日間の産仔数を記録し継代</td> </tr> </table>		胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法		生物種	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)	飼育水	水道水を活性炭ろ過したもの、pH6.5-8.5、溶存酸素 80%以上	飼育条件	水温 26±1℃、照明明期 12-16h、暗期 8-12h	餌	アルテミア（ブラインシュリンプ、ビタミンブラインシュリンプ）	採卵	一週間おきに選抜したメス 3 匹、オス 4 匹で水層に収容して産卵させる	ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法		生物種	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)	飼育水	水道水を活性炭ろ過したもの、硬度 60-100mg CaCO ₃ /L に調整	飼育条件	水温 25±1℃、照明明期 16h、暗期 8h	餌	YCT およびクロレラ水	供試個体の準備	マスカルチャーでは生後 1 週間以上飼育し継代 シングルカルチャーでは飼育開始から 7 日間の産仔数を記録し継代
胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法																									
生物種	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)																								
飼育水	水道水を活性炭ろ過したもの、pH6.5-8.5、溶存酸素 80%以上																								
飼育条件	水温 26±1℃、照明明期 12-16h、暗期 8-12h																								
餌	アルテミア（ブラインシュリンプ、ビタミンブラインシュリンプ）																								
採卵	一週間おきに選抜したメス 3 匹、オス 4 匹で水層に収容して産卵させる																								
ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法																									
生物種	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)																								
飼育水	水道水を活性炭ろ過したもの、硬度 60-100mg CaCO ₃ /L に調整																								
飼育条件	水温 25±1℃、照明明期 16h、暗期 8h																								
餌	YCT およびクロレラ水																								
供試個体の準備	マスカルチャーでは生後 1 週間以上飼育し継代 シングルカルチャーでは飼育開始から 7 日間の産仔数を記録し継代																								

株式会社環境管理センター

胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法

生物種	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)
飼育水	水道水を活性炭ろ過したもの、pH6.5-8.5、溶存酸素80%以上
飼育条件	水温 26±1°C、照明明期 12-16 h、暗期 8-12 h
餌	アルテミア (ブラインシュリンプ、ビタミンブラインシュリンプ)
採卵	メス：オス=3：10 になるようにして産卵させる

ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法

生物種	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)
飼育水	水道水を活性炭ろ過したものをミネラルウォーターにて硬度 60-100 mg CaCO ₃ /L に調整
飼育条件	水温 25±1°C、照明明期 16 h、暗期 8 h
餌	YCT およびクロレラ水
供試個体の準備	マスカルチャーでは生後 1 週間以上飼育し継代 シングルカルチャーでは飼育開始から 7 日間の産仔数を記録し継代

淡水藻類を用いる生長阻害試験法

生物種	ムレミカツキモ (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)
培地	継代培養は C 培地、試験用培地は OECD 培地
前培養	培養温度 23±2°C、照度約 60-120 μmol/m ² /s 連続光下で振とう培養
試験条件	培養温度 21~24±2°C、試験容器内の液面付近の光強度として 60-120 μmol/m ² /s 初期生物量 5×10 ³ cells/mL で 72 時間振とう培養 (100 r p m)

- (1) 今年度実施した生物試験の結果、河川水 5 箇所については、ニセネコゼミジンコ、ゼブラフィッシュ、藻類ともに影響がみられなかった。事業所排水 (名古屋市 A、B) については、A の排水についてのみ、ミジンコ、藻類について影響があった。一方、ゼブラフィッシュについては影響があるものの有意差は検出されなかった。ゼブラフィッシュについては試験実施機関による差が大きく、藻類については小さい傾向がみられた。

4 今後の研究方向等

来年度も国立環境研究所との I 型共同研究に参加し、WET 手法に関する技術および知見の共有化・WET 手法を用いた調査事例の集積につとめる。また今後も引き続き各地方で影響の出そうな環境水や排水について試験を行い、影響が確認された地点について重点的に検討を行っていく方針である。

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 技師 菊池 一馬																																																																																																																	
1 目的																																																																																																																		
<p>微小粒子状物質 (PM_{2.5}) は大気環境分野における最先端のテーマであり、岩手県においても一部地点で環境基準を超過しており、原因の究明と着実な削減対策が緊急の課題となっていることから、PM_{2.5} 成分分析や常時監視データの解析などにより、PM_{2.5} の排出状況を把握し、PM_{2.5} の削減対策や環境基準の達成に資することを目的とした。</p>																																																																																																																		
2 方法																																																																																																																		
<p>県内 2 地点の PM_{2.5} 成分分析や、県内 15 地点の大気常時監視の調査結果を取りまとめ、解析を行った。</p>																																																																																																																		
(1) 地点																																																																																																																		
表1 主な常時監視項目と県内の測定地点																																																																																																																		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">測定地域</th> <th style="width: 10%;">測定局</th> <th style="width: 10%;">NOx</th> <th style="width: 10%;">SO₂</th> <th style="width: 10%;">O_x</th> <th style="width: 10%;">SPM</th> <th style="width: 10%;">PM_{2.5}</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">盛岡</td> <td>津志田局</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>○</td> </tr> <tr> <td>上田局</td> <td>○</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>○</td> <td>○</td> </tr> <tr> <td>滝沢</td> <td>巢子局</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>-</td> <td>○</td> <td>○</td> </tr> <tr> <td>紫波</td> <td>日詰局</td> <td>○</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>花巻</td> <td>花城局</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>-</td> <td>○</td> <td>○</td> </tr> <tr> <td>北上</td> <td>芳町局</td> <td>○</td> <td>-</td> <td>○</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">奥州</td> <td>水沢局</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>○</td> </tr> <tr> <td>江刺局</td> <td>○</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">一関</td> <td>竹山局</td> <td>-</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>○</td> </tr> <tr> <td>三反田局</td> <td>○</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>○</td> <td>◎</td> </tr> <tr> <td>大船渡</td> <td>猪川局</td> <td>○</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>金石</td> <td>新町局</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>-</td> <td>○</td> <td>○</td> </tr> <tr> <td>宮古</td> <td>横町局</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>◎</td> </tr> <tr> <td>久慈</td> <td>八日町局</td> <td>○</td> <td>○</td> <td>-</td> <td>○</td> <td>○</td> </tr> <tr> <td>二戸</td> <td>荷渡局</td> <td>○</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>							測定地域	測定局	NOx	SO ₂	O _x	SPM	PM _{2.5}	盛岡	津志田局	○	○	○	○	○	上田局	○	-	-	○	○	滝沢	巢子局	○	○	-	○	○	紫波	日詰局	○	-	-	-	-	花巻	花城局	○	○	-	○	○	北上	芳町局	○	-	○	-	-	奥州	水沢局	○	○	○	○	○	江刺局	○	-	-	-	-	一関	竹山局	-	○	○	○	○	三反田局	○	-	-	○	◎	大船渡	猪川局	○	-	-	-	金石	新町局	○	○	-	○	○	宮古	横町局	○	○	○	○	◎	久慈	八日町局	○	○	-	○	○	二戸	荷渡局	○	-	-	-	-
測定地域	測定局	NOx	SO ₂	O _x	SPM	PM _{2.5}																																																																																																												
盛岡	津志田局	○	○	○	○	○																																																																																																												
	上田局	○	-	-	○	○																																																																																																												
滝沢	巢子局	○	○	-	○	○																																																																																																												
紫波	日詰局	○	-	-	-	-																																																																																																												
花巻	花城局	○	○	-	○	○																																																																																																												
北上	芳町局	○	-	○	-	-																																																																																																												
奥州	水沢局	○	○	○	○	○																																																																																																												
	江刺局	○	-	-	-	-																																																																																																												
一関	竹山局	-	○	○	○	○																																																																																																												
	三反田局	○	-	-	○	◎																																																																																																												
	大船渡	猪川局	○	-	-	-																																																																																																												
金石	新町局	○	○	-	○	○																																																																																																												
宮古	横町局	○	○	○	○	◎																																																																																																												
久慈	八日町局	○	○	-	○	○																																																																																																												
二戸	荷渡局	○	-	-	-	-																																																																																																												
<p>調査地点を表 1 に示す。</p>																																																																																																																		
(2) PM _{2.5} 成分分析項目																																																																																																																		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 質量濃度 ・ イオン成分 (NO₃⁻, SO₄²⁻, Cl⁻, Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Ca²⁺, Mg²⁺) ・ 無機元素成分 (Na, Al, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, As, Sb, Pb) ・ 炭素成分 (有機炭素, 元素状炭素) 																																																																																																																		
※PM _{2.5} の◎は常時監視と成分分析の両方を行った地点。																																																																																																																		
3 結果・考察																																																																																																																		
(1) 自動測定機による PM _{2.5} 質量濃度の相関																																																																																																																		
<p>平成 25 年度の県内 10 地点における PM_{2.5} 濃度の日平均値の年間推移を図 1 に示す。10 地点全てが通年ほぼ同じ傾向で濃度推移しており、近い地点である盛岡市内の 2 地点の相関係数は 0.962 と非常に高く (図 2)、遠い地点である一関と久慈の相関係数は 0.767 と (図 3)、遠い地点どうしても相関が見られた。</p>																																																																																																																		
(2) PM _{2.5} 成分の相関																																																																																																																		
<p>県内 2 地点における PM_{2.5} 成分分析結果から、平成 25 年夏季と秋季の成分濃度の期間平均を図 4 に示す。主要な成分である硫酸イオンに注目すると、相関係数は 0.860 (図 5) と、高い相関が見られた。また、その他の成分についても多くの成分・期間で相関が見られた。</p>																																																																																																																		
(3) 沿道としての特徴																																																																																																																		
<p>自動車由来の PM_{2.5} の指標として知られる元素状炭素 (図 6) やアンチモン (図 7) の濃度に注目すると、ほとんどの期間において一関が宮古の値を上回っており、自動車由来の地域汚染が考えられた。</p>																																																																																																																		
(4) 野焼きの影響																																																																																																																		
<p>植物の燃焼により発生することが知られるカリウムイオン (図 8)、硝酸イオン (図 9) や有機炭素 (図 10) に注目すると、平成 25 年度秋季の一関において、これらの成分が同じ比率で高濃度になっており、野焼き等の影響と推定された。</p>																																																																																																																		
(5) PM _{2.5} の発生源に関する考察																																																																																																																		
<p>(1) 及び (2) から、PM_{2.5} の濃度変動の主な原因は、県全土に及ぶ広域汚染であることが推定された。また、(3) 及び (4) から、一部の地域において特定の成分が、自動車や野焼き等の地域汚染により上乘せされていることが推定された。</p>																																																																																																																		

4 今後の研究の方針

PM_{2.5}の発生源を特定するためには、より多くの地点における同時サンプリングや、東北～日本レベルの広域的な解析が必要である。全国の地方環境研究所との共同研究に参加しているので、有効に活用したい。

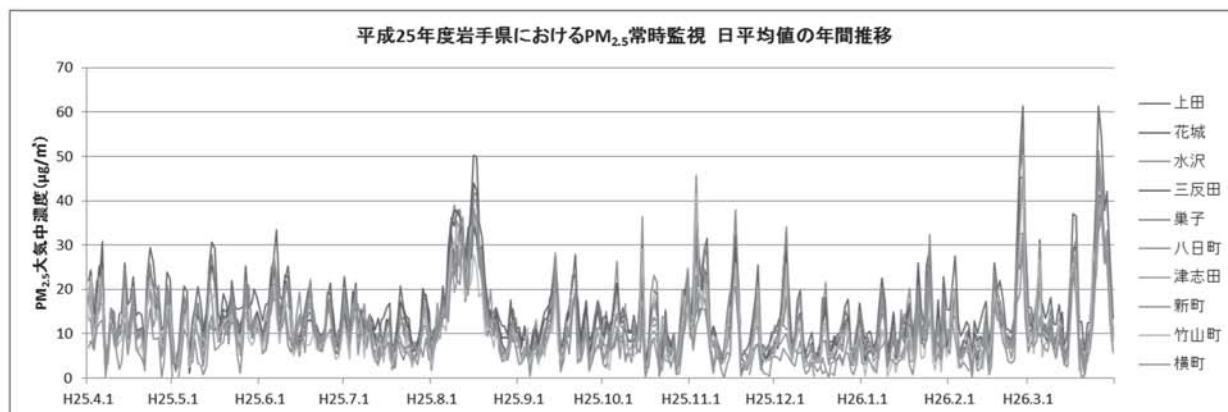


図1 平成25年度の県内10地点におけるPM_{2.5}濃度の日平均値の年間推移

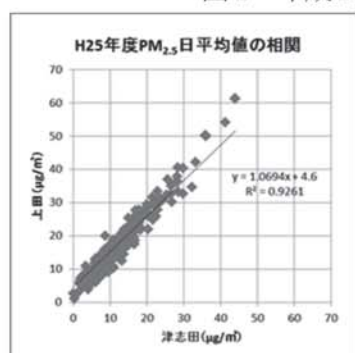


図2 近い地点の相関

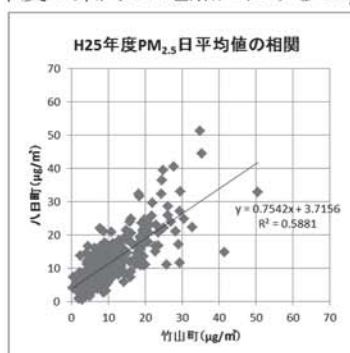


図3 遠い地点の相関

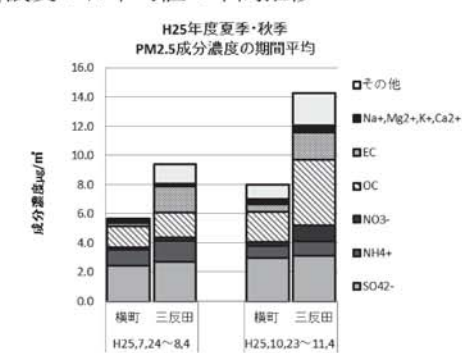


図4 H25(夏・秋)成分濃度の平均

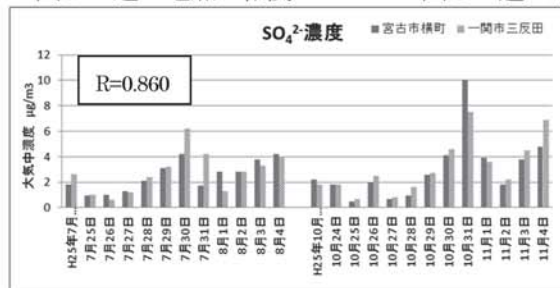


図5 H25(夏・秋)硫酸イオン濃度

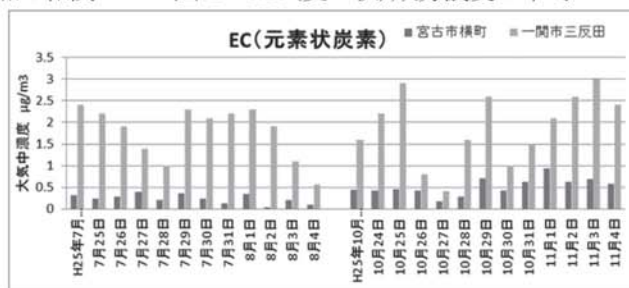


図6 H25(夏・秋)元素状炭素濃度

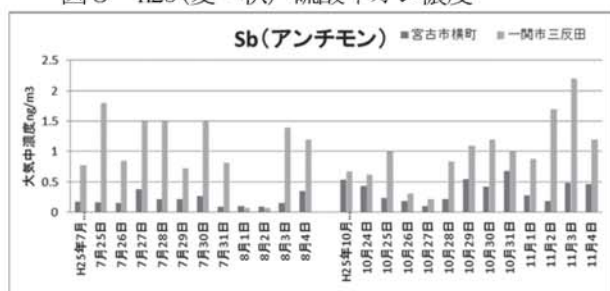


図7 H25(夏・秋)アンチモン濃度

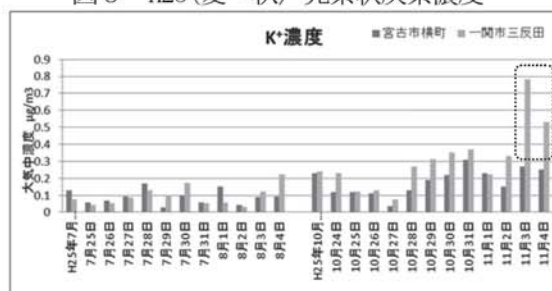


図8 H25(夏・秋)カリウムイオン濃度

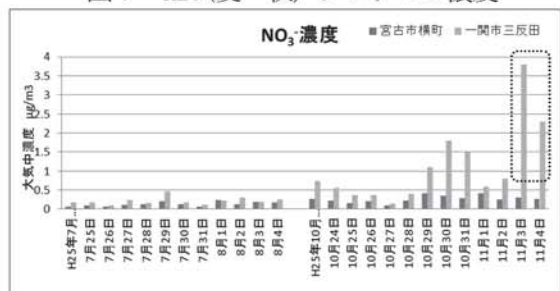


図9 H25(夏・秋)硝酸イオン濃度

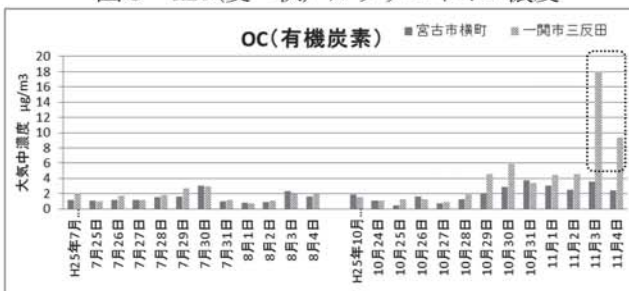


図10 H25(夏・秋)有機炭素濃度

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 西井 和弘
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ヶ所でパッシブ法（0法）により毎月1回4成分（NO₂、NO_x、NH₃、O₃）の分析を行った。</p> <p>平成26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、他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がみられた。</p> <p>分析項目別では、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。また秋季にも小さなピークがみられた。他の分析項目では、全体的に夏季に低く、冬季にかけて最大となる傾向にあった。</p> <p>また、経年濃度変化をみると、平成26年度は、盛岡では全ての項目で例年と同じレベル濃度もしくは減少傾向であったが、八幡平では窒素酸化物がやや増加傾向を示した。</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性があり、全国環境研協議会が主催する本調査に引き続き参加する。</p>

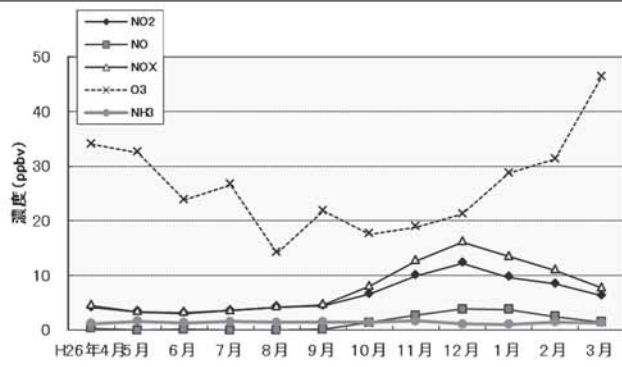


図1 平成26年度季節変動（盛岡）

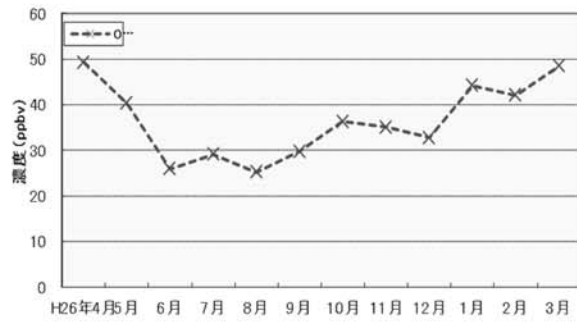


図2 平成26年度季節変動（八幡平O₃）

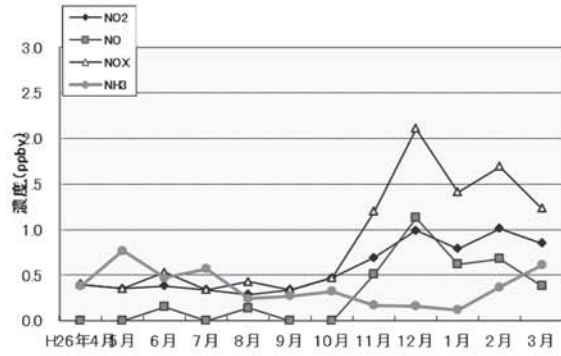


図3 平成26年度季節変動（八幡平O₃以外）

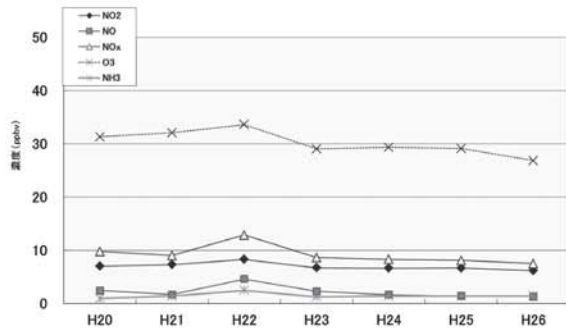


図4 経年変動（盛岡）

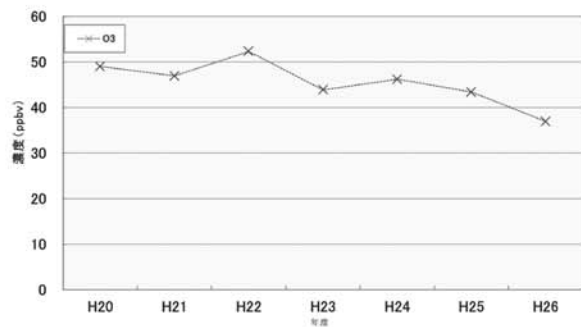


図5 経年変動（八幡平O₃）

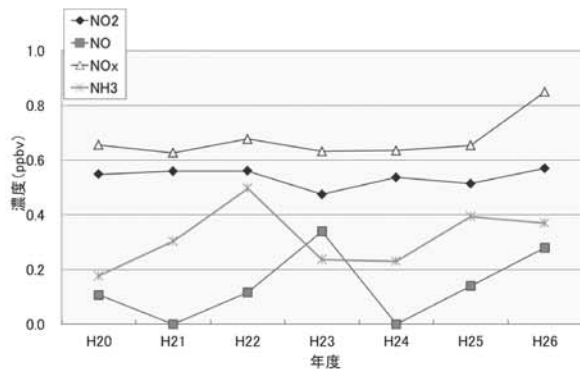


図6 経年変動（八幡平O₃以外）

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、梶田 弘子、中南 真理子、及川 和志、長澤 敦																						
<p>1 目的</p> <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、精度管理実施要領に定める内部精度管理を実施し、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>																							
<p>2 方法</p> <p>表 1 に示す項目成分を調整し、各分析担当者に配布した。分析担当者は、通常使用する分析機器を用いて、定性試験を実施し、配布された成分の定性根拠を 3 根拠以上データを添えて報告させることとした。</p>																							
		<p>表 1 内部精度管理計画</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">調査No.</th> <th style="width: 20%;">項目</th> <th style="width: 50%;">標準物質名</th> <th style="width: 20%;">濃度(ppm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">着色料</td> <td style="text-align: center;">赤色2号</td> <td style="text-align: center;">10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">保存料</td> <td style="text-align: center;">ソルビン酸</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">動物用医薬品</td> <td style="text-align: center;">スルファジミジン</td> <td style="text-align: center;">0.5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">農薬</td> <td style="text-align: center;">クロルピリホス</td> <td style="text-align: center;">0.5</td> </tr> </tbody> </table>		調査No.	項目	標準物質名	濃度(ppm)	1	着色料	赤色2号	10	2	保存料	ソルビン酸	5	3	動物用医薬品	スルファジミジン	0.5	4	農薬	クロルピリホス	0.5
調査No.	項目	標準物質名	濃度(ppm)																				
1	着色料	赤色2号	10																				
2	保存料	ソルビン酸	5																				
3	動物用医薬品	スルファジミジン	0.5																				
4	農薬	クロルピリホス	0.5																				
<p>3 結果</p> <p>1) 着色料の定性試験は、赤色 2 号で実施したが、HPLC-UV 装置で定性を行った。通常定量は、530nm の吸収ピークから定量を行っているが、分析者の定性根拠報告は、①定量条件での標準物質とのリテンションタイムの一致、②定量条件での標準物質の UV 吸収スペクトルの一致、③カラムを「C18」から「C8」に変更した場合の標準物質とのリテンションタイムの一致 (UV 吸収スペクトルも確認) であった。</p> <p>2) 保存料の定性試験は、ソルビン酸で実施したが、HPLC-UV 装置で定性を行った。通常定量は、230nm の吸収ピークから定量を行っているが、分析者の定性根拠報告は着色料と同様に、①定量条件での標準物質とのリテンションタイムの一致、②定量条件での標準物質の UV 吸収スペクトルの一致、③カラムを「C18」から「C8」に変更した場合の標準物質とのリテンションタイムの一致 (UV 吸収スペクトルも確認) であった。</p> <p>3) 動物用医薬品の定性試験は、スルファジミジンで実施したが、LC-MS/MS 装置で定性を行った。通常定量は、Q1_279.1→Q3_185.7 のトランジションで定量を行っているが、分析者の定性根拠報告は、①定量条件での標準物質とのリテンションタイムの一致、②標準物質とのプロダクトイオン Scan の MS スペクトルの一致、③標準物質との UV 吸収スペクトルの一致であった。</p> <p>4) 農薬の定性試験は、クロルピリホスで実施したが、GC-MS/MS 装置で定性を行った。通常定量は、Q1_314→Q3_258 のトランジションで定量を行っているが、分析者の定性根拠報告は、①定量条件での標準物質とのリテンションタイムの一致、②標準物質とのプロダクトイオン Scan の MS スペクトルの一致、③昇温条件を変えた時の標準物質とのリテンションタイムの一致であった。</p> <p>5) 以上の結果から、検査項目の定性能力の向上に資する試みを実施したが、通常の検査業務では実施しない操作を行うことにより、食品検査の信頼性確保の充実及び技術レベルのボトムアップにつながったものと考えている。今後の内部精度管理計画に反映させたい。</p>																							
<p>4 今後の方針</p> <p>今後は、食品検査業務要領に規定する内部点検を内部点検台帳の見直しを行いながら実施し、特に機器等のメンテナンスに係る技術レベルのボトムアップにつながるよう検討したい。</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の一斉分析法の開発 ～超臨界二酸化炭素による雑穀色素の抽出条件～
担 当	衛生科学部 主任専門研究員 及川 和志
<p>1 目的</p> <p>超臨界二酸化炭素 (ScCO₂) を用いる超臨界抽出 (SFE) は試料内部への ScCO₂ の浸透性が高く、低極性成分の溶解性に優れるため、食品成分の選択的な抽出や除去手法として期待され、当センターにおいては食品中残留農薬の検査前処理法としての活用に実績がある。</p> <p>一方、機能性表示食品制度の施行 (平成 27 年 4 月 1 日) に伴い、健康食品はもとより、農水産物についても機能性成分に関する表示を図りたいとする機運が産業サイドでは高まっているが、表示の適否を適切に判断する為には、表示の根拠となる分析法と同等、もしくは、それを上回る正確性、迅速性を併せ持った堅牢な分析法が必要になると考えられる。</p> <p>現在、本県を主産地とする雑穀の機能性研究および産地振興の一環として、そのカロテノイド (キサントフィル) の同定が進められているが、定量値については妥当性が十分に確認されているとは言えず、より適切な分析法の確立による定量値の検証が望まれている。</p> <p>そこで、本研究では、雑穀に含まれるカロテノイド色素を主な対象とする定量分析法を確立するため、雑穀からの色素抽出における ScCO₂-SFE パラメータについて検討を行った。</p> <p>2 方法</p> <p>(1) 試料</p> <p>岩手県内産キビ精白粒 (100g 包装品) の計 10 パックを平成 26 年 2 月に購入し、ミルサー (LM-PLUS, 岩谷産業) で全量を粉砕の後、100 メッシュ篩を通して試料とした。</p> <p>(2) 超臨界二酸化炭素による色素抽出</p> <p>高圧ポンプ加圧式のバッチ抽出システム (SFX220 型, ISCO) を用い、抽出槽温度 40～100℃、リストラクター (RCT) 温度 50～100℃ (抽出槽の+10℃設定)、抽出圧力 13.8～44.8MPa、静的保持 1～15min、動的抽出容量 9～45ml の範囲で検討した。抽出時は、専用カートリッジに試料 3g と脱水用助剤 1.5g を積層、装置に充填の上、抽出槽から CO₂ と共に RCT 末端に排出される抽出物をアセトンに捕集し、粗色素抽出液を得た。</p> <p>(3) 有機溶媒による色素抽出</p> <p>ScCO₂-SFE による色素抽出と比較するため、同一の試料に対してエタノールおよびアセトンを溶媒とする有機溶媒抽出を行った。抽出は、試料 3g に対して溶媒 20ml (EtOH, Acetone) を加えた後、15 分の振盪 (150 往復/min) を行い、2,000G 遠心上清を分取し、これを計 3 回実施して (溶媒として計 60ml) 有機溶媒抽出による粗抽出液を得た。</p> <p>(4) 抽出色素の定性および定量</p> <p>粗色素抽出液は、その一定量を EtOH に転溶の後、分光光度計 (V-630, 日本分光) によって分光スペクトルおよび最大吸収波長における吸光度を測定し、主成分と推定されたルテインの分子吸光係数 $\epsilon = 145\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ を基にして総カロテノイド濃度を算出。ダイオードアレイ検出器を備えた HPLC 装置 (LC1200, Agilent) と分析カラム (Develosil XG-C30M, 内径 2.0×150mm, 粒子径 3μm, 野村化学) により、ルテイン、ゼアキサントフェンの標準品 (Carote Nature 社) を対照として成分量を定量し、試料重量あたりの成分抽出量を求めた。</p> <p>3 結果</p> <p>(1) 色素抽出液の分光スペクトル</p>	

粗精製の色素抽出液は、ScCO₂-SFE、有機溶媒による抽出に関わらず、最大吸収波長は445.5nmで一致しており、350~550nm帯の分光スペクトルはルテインの標準品に近似していた(図1)。ただし、スペクトルはルテイン標品と一部一致しておらず、主成分のルテインの他に、ゼアキサンチンなど、他のカロテノイドの混在が考えられた。

(2) 色素抽出に適した ScCO₂-SFE パラメータ

キビからのカロテノイド色素の抽出には、温度70℃、圧力41.4MPa、静的保持5min、対試料抽出容量10倍、補助溶媒(エントレーナ)としてアルコール(EtOH, MeOH)を試料重量の1/3(ml)程度加える条件が好適である。

(3) 有機溶媒による抽出との比較

有機溶媒(EtOH, Acetone)による振盪抽出と比較すると、ScCO₂-SFEによる抽出ではEtOH抽出の1.6倍の粗色素抽出量が得られた(図2, 表1)。

(4) HPLCによる成分の定量

試料あたりでのカロテノイド成分の含有量(n=7平均値)は、ルテインが6.59mg/kg、ゼアキサンチンが1.72mg/kgであった(表1)。

4 まとめ

以上の結果により、キビの脂溶性色素成分を定性する場合は前処理として有機溶媒を用いた振盪抽出が多用されているが、定量目的の場合は有機溶媒による抽出では不十分となり、残渣にはカロテノイド色素が残留する懸念がある。

補助溶媒としてアルコールを添加したScCO₂-SFEは、有機溶媒を上回る抽出効果と迅速性に優れた方法であり、キビを試料としたカロテノイドの定量には有用である。

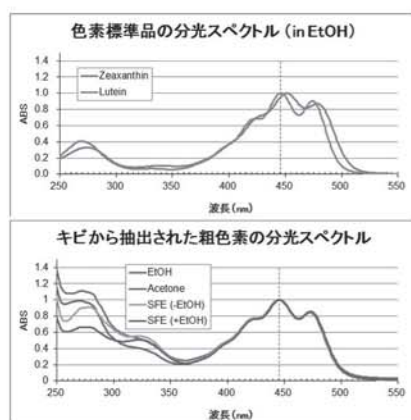


図1 粗色素抽出液の分光スペクトル

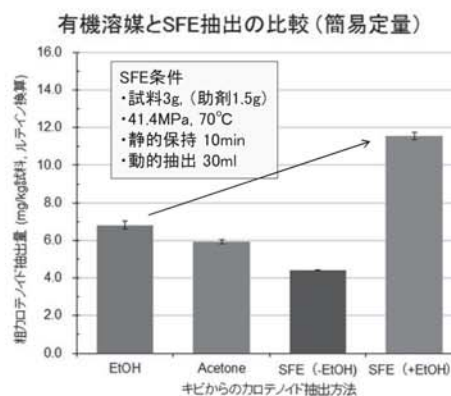


図2 有機溶媒抽出と Sc-CO₂抽出の比較(ルテイン換算)

表1 HPLCによる成分の個別定量値

HPLCによる成分の個別定量			
		EtOH抽出	SFE抽出 (+EtOH) (n=7)
ルテイン	Mean	3.95	6.59*
	±SD	0.09	0.16
	RSD%	2.38	2.42
ゼアキサンチン	Mean	1.19	1.72*
	±SD	0.03	0.05
	RSD%	2.17	2.89
ルテイン+ゼアキサンチン	Mean	5.14	8.31*
	±SD	0.12	0.20
	RSD%	2.30	2.45
	Ratio	1	1.62

*P < 0.05 (Student's t-Test)

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 — 下痢性貝毒試験法改正に向けての対応 —
担 当	衛生科学部 上席専門研究員 梶田 弘子
<p>1 目的</p> <p>我が国において下痢性貝毒の試験法としてマウス試験法 (MBA) が採用されているが、MBA は下痢原性を持つオカダ酸群 (OA、DTX 群) と下痢原性を持たない脂溶性貝毒 (PTX 群、YTX 群) を区別できず、マウスに対して致死毒性のある成分を一括して検出するため、下痢性貝毒としての毒性を過大評価する可能性がある。また、MBA は測定精度が低くばらつきが大きいため、国際的動向として機器分析法の導入が進み、我が国においても平成 26 年度内に基準改正及び試験法通知が予定されており、二枚貝の下痢性貝毒としてオカダ酸群にコーデックス基準 (0.16μg OA 当量/g) が導入される。これを受けて、当センターでは、機器分析法への速やかな移行に向けて準備を進めている。本研究は、オカダ酸群に加え、EU などでは基準値が設定されている PTX 群、YTX を含めた LC-MS/MS 一斉分析法を確立し、食中毒など緊急時に迅速対応できる体制を構築することを目的に検討するものである。</p> <p>2 方法</p> <p>(1) 試料：ホタテ可食部 (中腸線、むき身)</p> <p>(2) 標準品：OA 群 (OA、DTX1、DTX3)、PTX 群 (PTX1、PTX2、PTX6) 及び YTX は、水産庁貝毒安全対策事業配付標準品を使用した。</p> <p>(3) 試料調製法</p> <p>これまで報告されている LC-MS/MS 等による機器分析法は、試料抽出液を希釈し測定するため装置を汚染する可能性が高いことから、固相カートリッジカラム Oasis HLB (Waters 製 60mg、3cc) による精製法を検討した。試料 2g に 9 倍量の 90%メタノール溶液を加え、振とう抽出した。エステル体の DTX3 は、HLB カラムに負荷した場合、メタノール溶液では脱離せず、他成分との同時処理が困難であったことから、アルカリ加水分解により変換物として測定した。PTX 群は、アルカリ加水分解により消失することから、OA 群、YTX とは別フローで精製した (図 1)。むき身最終試料について、リン脂質除去を目的に MonoSpinTiO (ジーエルサイエンス製) と除粒子フィルター (Dismic、サイズ 0.2μm) で処理し比較したところ、MonoSpinTiO で処理した検体の回収率のほうが若干良好であった (図 2)。</p> <p>(4) 添加回収試験</p> <p>試料に混合標準溶液を 100ng/g (YTX ; 500ng/g) 添加し、試行数 5 回で試験を行った。検量線は 0.1~20ng/mL (YTX ; 10~200ng/mL) の範囲で、絶対検量線法により定量した。</p> <p>(5) 規制値超過検体および市販品の分析</p> <p>生産者による自主検査で 0.05~0.1MU/g となり出荷が規制された県内 A 海域のホタテ (中腸線、むき身) 及び市販ホタテ 2 検体 (むき身) について各成分を定量した。</p> <p>3 結果</p> <p>(1) 添加回収試験結果</p> <p>除粒子フィルターによる試験結果を表 1 に示した。中腸線において、PTX1 及び YTX の回収率が 70%未満であったが、その他の成分は 70~120% (RSD1.7~16.0%) の範囲内と良好な結果が得られた。</p> <p>(2) 規制値超過検体及び市販品の分析結果</p> <p>OA は全検体から検出されず、DTX1 が規制値超過の中腸線、むき身から各々 0.95、0.19μg</p>	

OA 当量/g と基準値を超える量検出され、市販品からは低濃度検出された(表 2)。PTX 群は、全検体から検出され、組成比で見ると脂溶性貝毒の含有量が多かった。

4 まとめ

基準改正及び試験法通知が予定されている下痢性貝毒 OA 群と脂溶性貝毒 PTX 群・YTX について LC-MS/MS による一斉分析法を確立した。本法は、OA 群については妥当性評価ガイドラインの目標値を満たし、また、他の貝毒成分についても概ね満足するものであった。貝毒の毒性は、毒群毎に差があり、その組成比は海域や二枚貝の種類によって異なることから、貝毒組成を把握できる本法は有用と考える。

下痢性貝毒試料調製法(オカダ酸群、YTX、PTX群)

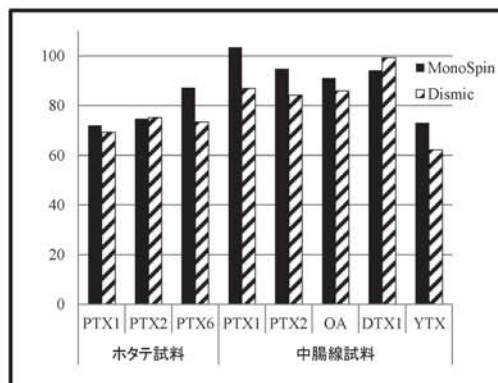
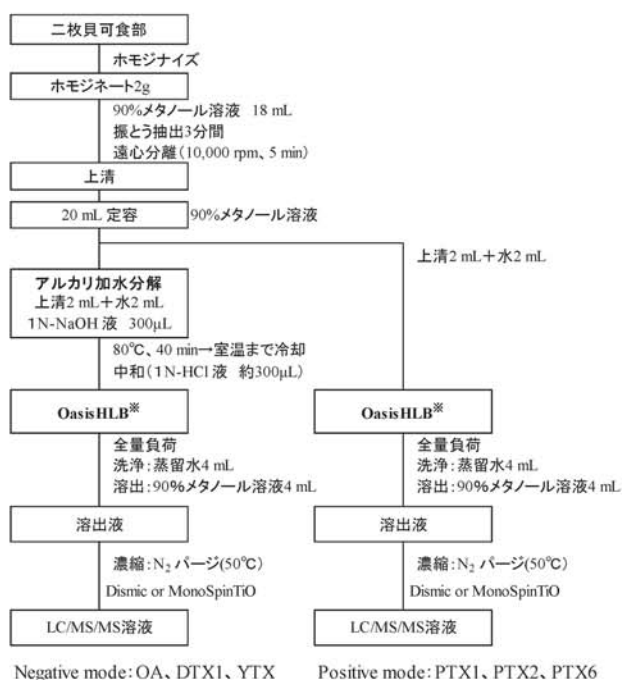


図 1 試料調整法

図 2 MonoSpinTiO と除粒子フィルターの比較

表 1 添加回収試験結果

ホタテ検体	回収率 ± 併行精度(%)					
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
中腸線	117.6 ± 5.8	81.1 ± 2.1	86.9 ± 2.4	84.2 ± 2.4	103.3 ± 6.1※	68.3 ± 4.8
むき身	106.9 ± 16.0	87.5 ± 2.0	69.2 ± 11.7	75.2 ± 4.2	73.3 ± 9.9	91.3 ± 5.9

※:参考値(供試料に当該成分が含まれていたため標準添加法により定量)

表 2 規制値超過検体及び市販品の各成分量

検体	OA群 (μg OA当量/g)		PTX群 (μg/g)			YTX (μg/g)
	OA	DTX1	PTX1	PTX2	PTX6	YTX
規制値超過検体(中腸線)	—	0.95	0.34	0.02	3.0	1.1
規制値超過検体(むき身)	—	0.19	0.09	—	0.60	—
市販品①	—	0.02	0.04	—	0.31	0.35
市販品②	—	0.01	0.01	—	0.19	—

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
<p>1 目的</p> <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> <p>2 方法</p> <p>(1) 平成 26 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、選択分離培地の無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。特に本年度は血清型 O103 に着目し、当センターに保存されている同血清型の腸管出血性大腸菌 30 菌株について解析を行った。</p> <p>3 結果</p> <p>(1) 平成 26 年度に依頼を受け分離した菌株のうち研究対象となるもの（O157、O26 以外の血清型）について調査を実施し、データを集積した。</p> <p>(2) 2003～2014 年に県内で分離され当センターに保存されている 30 株の O103 菌株についてその性状を詳細に解析した。O103 菌株の H 血清型別を実施したところ、30 株中 15 株が O103:H2、8 株が O103:H11、5 株が O103:HUT（型別不能）と 3 グループに分類された。残り 2 株については、生化学的性状は上記 O103:HUT と類似していたが、運動性が無かったことから H 抗原（鞭毛）が無いと判断し O103:H- とした。この分類は既出の報告 [1] におけるものと一致した。別表に示す通り、各グループは互いに異なった生化学的性状を示したが、ソルボース非分解性については全てのグループのほぼ全ての菌株で一致し、典型的な大腸菌との鑑別が可能になったことから、O103 の検査には選択分離培地としてセフィキシム・亜テルル酸カリウム添加ソルボースマッコンキー培地（CT-SBMAC）が有効であることが分かった。また、市販の酵素基質培地であるクロモアガー-STEC 培地（Oxoid 社）も有効であることが分かった。その結果、解析した O103 菌株のほとんどについて分離培地として CT-SBMAC 培地ならびにクロモアガー-STEC 培地が有効であることが明らかになり、検査の際にはこれら 2 種の培地を中心に用いるとよいことが示された。以上より、腸管出血性大腸菌 O103 についての有効な検査法の確立に成功した。</p>	

4 今後の研究方向等

- ・ 依頼菌株、保存菌株の解析ならびにデータの集積を継続して実施する。
- ・ 0103、0121 以外の血清型の腸管出血性大腸菌についての検査方法を取りまとめる。
- ・ 当所における腸管出血性大腸菌の検査マニュアルの作成をめざす

表 腸管出血性大腸菌0103のグループ別性状例

培地名	0103:H2	0103:H11	0103:HUT
CT-SMAC	赤	赤	赤
CT-RMAC	赤	無色	無色
CT-RFMAC	赤	赤	無色
CT-SBMAC	無色	無色	無色
クロモアガー-0157TAM	灰青（周辺部藤色）	灰青	藤色
クロモアガー-STEC	藤色	藤色	藤色
CT-RX-026	淡緑	深緑	深緑
トリコロール	青緑	青緑	赤紫
TSI 斜面	黄	黄	黄
高層	黄	黄	黄
ガス	+	+	+
CLIG 斜面	赤	赤	赤
高層	黄	黄	黄
β -グルクロニダーゼ（MUG）	-	+	-
LIM リジン脱炭酸	+	+	+
SIM 運動性	+	+	+
硫化水素	-	-	-
インドール	+	+	+
EHT 溶血	+	+	+

*網掛けは一般的な大腸菌と異なる性状

参考文献

- 〔1〕 Iguchi, A. *et al.* (2012). *Journal of Clinical Microbiology*. 50(9), 2894-2900.

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 岩渕 勝己、国際研究推進専門員 齋藤 憲光

1 目的

PFOS/PFOA 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 生物体内濃度・構成比の地域的特性、及び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

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。加えて5ヶ所（新潟、静岡、兵庫、山口、福岡）で、護岸土壌を各1検体採取した。また、福岡ではカダヤシも併せて採取した（Fig.1）。メダカは1検体ずつ分析し、底質と護岸土壌は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 PFCAs 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・護岸土壌・メダカ・カダヤシ】炭酸緩衝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。



Fig.1 サンプル採取地点

3 結果・考察

【環境水】全国的には、検出された PFCs は昨年と同様の傾向であり、PFDA(C10)以上の長鎖の化合物はほとんど検出されてこなかったが、石川だけ PFDA(C10)と PFUdA(C11)が高濃度で検出された。昨年と異なり、太平洋側と日本海側・西日本の地点の比較から、PFCs 構成比パターンの差は見られなかった。

【底質】底質では、PFOA(C8)より長鎖の PFCAs 及び PFOS(C8)が主に検出された。環境水で高濃度だった地点で検出量が多かったが、茨城では底質の蓄積量は少なかった。一方、静岡は、環境水ではあまり高濃度ではなかったもの、底質への蓄積量は石川、兵庫、福岡（メダカ）に次いで多かった。PFSA としては、PFOS (C8)が多く検出され、静岡と福岡では、環境水からは検出されなかった PFDA (C10) も検出された。

【護岸土壌】検出された PFCs は、底質と同様、PFOA(C8)より長鎖の PFCAs、及び PFOS(C8)であった。護岸土壌は、底質の濃度よりも高濃度であった。

【メダカ・カダヤシ】PFCs は、昨年と同様 PFUdA(C11)～PFTrDA(C13)が高濃度で検出された。蓄積量は石川が突出しており、特に PFUdA(C11)～PFTrDA(C13)は、他の地点の数倍であった。昨年同様、性差に特徴的な傾向は見られなかった。メダカへの蓄積トータル量が多い4地点（茨城、石川、兵庫、福岡（メダカ））では、PFDA(C10)～PFTrDA(C13)だけで85%以上を占めており、特に石川では95%以上を占めていた。また、PFCs 構成比に地域的な偏りの傾向は見られなかった。カダヤシは、メダカと同様の蓄積傾向があり、PFUdA(C11)～PFTrDA(C13)が高濃度で検出された。

【環境水と底質】昨年の底質では未検出が多く、相関性について検討できなかったが、今年度は、PFNA(C9)とPFOS(C8)で有意な相関性が見られた（Fig.2）

【環境水とメダカ】 昨年同様、PFOS(C8)に関して相関性が認められた (Fig.3)。

【底質とメダカ】 昨年の底質では未検出が多く、相関性について検討できなかったが、今年度は環境水同様PFOS(C8)に関して相関性が認められた (Fig.4)。

【環境水からメダカ・カダヤシへの濃縮係数】 メダカの濃縮係数は、昨年と同様に最大約 124,000 倍 (PFTrDA(C13)) と高値であり、カダヤシの濃縮係数は、最大約 42,000 倍 (PFTrDA(C13)) であった。

メダカ及びカダヤシの濃縮係数は、PFCs 炭素数 (PFOA(C8) ~PFTrDA(C13)) に応じて指数的に増加する傾向が認められた (Fig.5)。

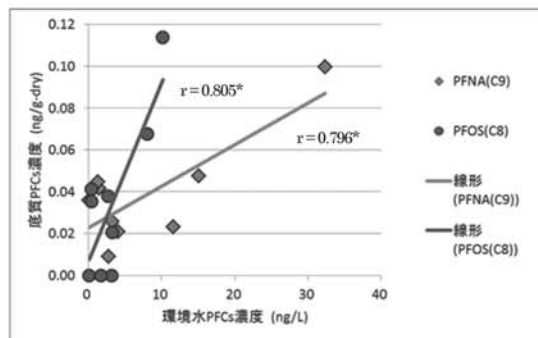


Fig.2 環境水と底質の PFCs 濃度の相関

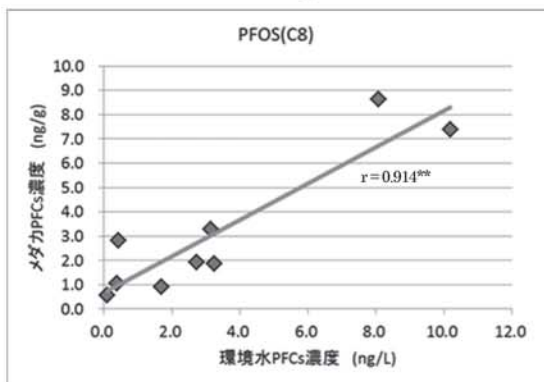


Fig.3 環境水とメダカの PFOS 濃度の相関

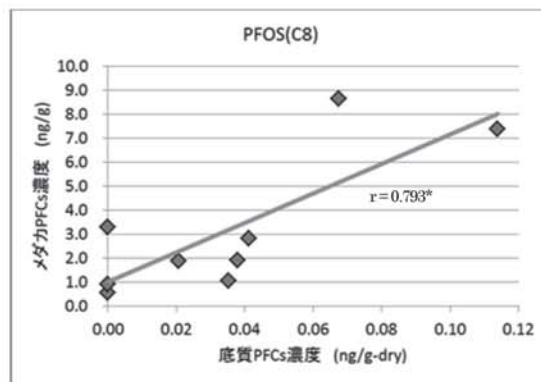


Fig.4 底質とメダカの PFOS 濃度の相関

【MS のピーク形状】 底質は一本のシャープなピークであるのに対し、環境水はシャープなピークの前に同じ質量のピークが存在し、環境水と底質では MS のピーク形状が異なる傾向が読み取れた (PFNA(C9)、PFDA(C10)) (Fig.6)。これは分枝異性体の影響と考えられ、環境水中からは分枝異性体が検出されるが、底質では未検出レベルになることを示す。

【まとめ】 環境水と底質の間でPFOSだけでなくPFNAについても相関が見られること、底質とメダカの間でもPFOSについても相関が認められることが今回の研究で明らかとなった。環境水と底質のピーク形状を比較すると、同じ

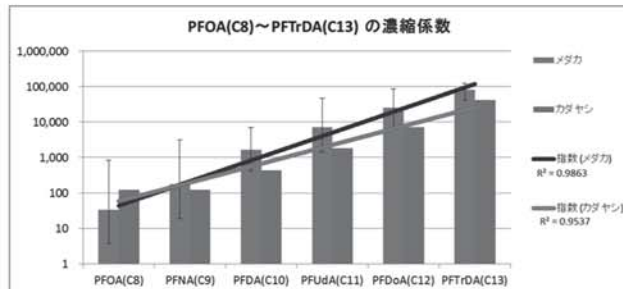


Fig.5 環境水からメダカ・カダヤシへの濃縮係数

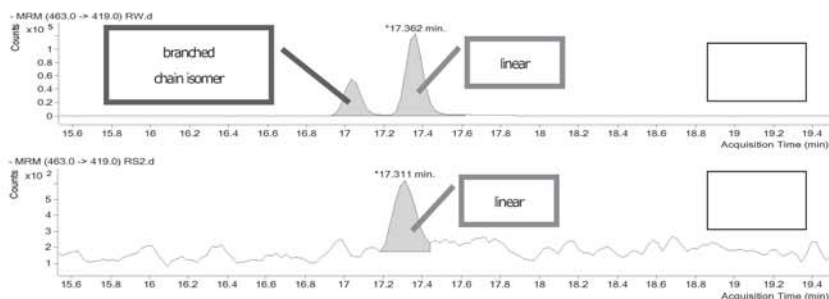


Fig.6 MS ピーク形状 (PFNA(C9)、茨城)

パターンを示しておらず、環境水から底質への蓄積は、単純に分枝異性体を含むすべてのPFCsが蓄積するのではないことは明らかである。また、メダカとカダヤシは、濃縮係数の傾向から、類似した生体蓄積作用があるものと考えられた。

研究成果報告書(15)

研究課題名	PPCPs (Pharmaceutical and Personal Care Products) 等化学物質県内環境実態調査 (ICP-MS による銀及びその化合物の分析法開発)
担当	環境科学部 上席専門研究員 吉田 敏裕、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 ICP-MS による銀及びその化合物の分析法を開発したので概要を報告する。

2 分析法の概要

水質試料に硝酸を加えて加熱処理をした後、pH を調整してキレート樹脂固相抽出により脱塩及び濃縮を行う。捕集した銀は硝酸で溶出し、インジウムを内標準として ICP-MS により定量する

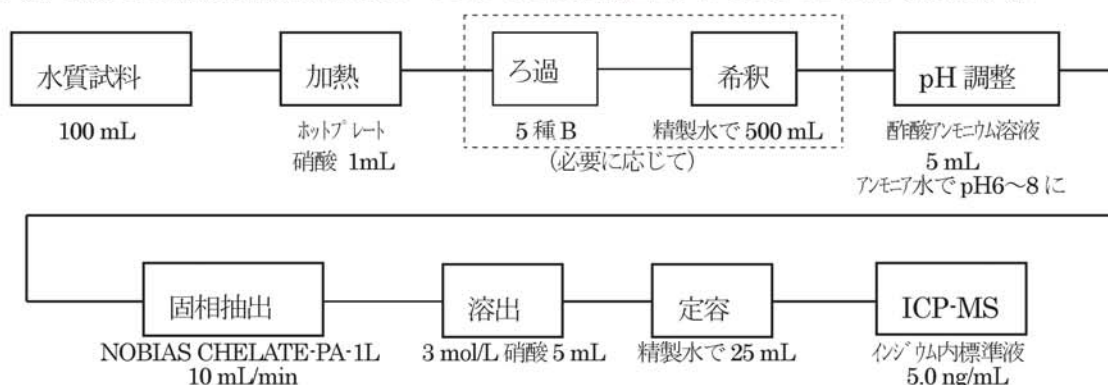


図1 分析法のフローチャート

3 結果

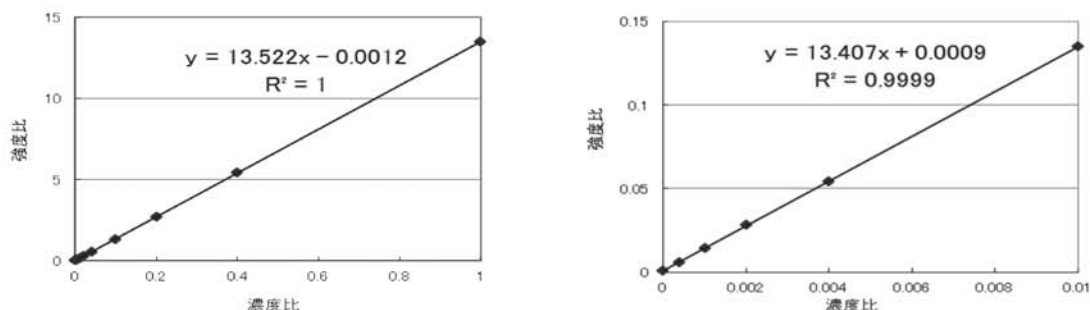


図2 検量線

Ag 濃度範囲 : 0.002~5 ng/mL (左図)、0.002~0.05 ng/mL (右図)

表1 環境試料の分析結果

試料	地点	Ag 濃度 (ng/mL)
河川水※	久慈川 (鶯の巣橋)	0.0012
	和賀川 (広表橋)	0.0035
	千厩川 (松形橋)	0.0026
海水	大船渡湾	0.013

※ : 川、湖、汽水域での銀濃度は、非汚染地域で~10 ng/L、都市部および工業地域で~100 ng/L との報告がある。

4 まとめ

本法における、銀およびその化合物の MDL は 0.00055 $\mu\text{g/L}$ 、MQL は、0.0014 $\mu\text{g/L}$ であった。

環境試料を用いた添加回収試験の回収率は、河川水 73%、海水 76%であったことから、添加回収率の改善が今後の課題である。

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 岩瀬 勝己

1 目的

化学物質に暴露されたDNAは、付加体を形成することが知られている。DNA付加体(DNAアダクト)は、DNA複製の過程でほとんどが修復されるが、修復されなかった場合、DNAの変異が起こる可能性がある。培養細胞に曝露した化学物質の毒性を評価する際、その化学物質により誘発されたDNA付加体の濃度を高感度で測定することは、非常に重要である。そこで本研究では、昨年度検討した8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)に続き、6-O-Ethyl-2'-deoxyguanosine(6-OEdG)についても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た。

2 方法

8-OHdG及び6-OEdGの標準品を用い、同時に測定できる分析条件の検討を行った。

3 結果

分離条件(移動相組成、カラム等)、検出条件(MS)を検討し、表1のとおり分析条件を確定することができた。

表1 LC/MS/MSの分析条件

HPLC			MS																										
Instrument	Agilent1200 series Binary Pump (G4220A) Well Autosampler (G4226A) Column Oven (G1316C)		Instrument	Agilent 6490																									
Column	ZORBAX RX-Sil (2.0x 100mm, 1.8µm)		Mass range	30 ~ 500 (m/z)																									
Mobile phase	A: 50mM HCOONH ₄ (0.1% HCOOH) B: CH ₃ CN		Polarity	Positive																									
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>min</th> <th>B%</th> <th>Flow ml/min</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.00</td><td>95.00</td><td>0.2</td></tr> <tr><td>10.00</td><td>5.00</td><td>0.2</td></tr> <tr><td>10.10</td><td>5.00</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>13.00</td><td>5.00</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>13.10</td><td>95.00</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>18.00</td><td>95.00</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>18.10</td><td>95.00</td><td>0.2</td></tr> </tbody> </table>		min	B%	Flow ml/min	0.00	95.00	0.2	10.00	5.00	0.2	10.10	5.00	0.4	13.00	5.00	0.4	13.10	95.00	0.4	18.00	95.00	0.4	18.10	95.00	0.2	Ionization	ESI(Jet Stream)	
min	B%	Flow ml/min																											
0.00	95.00	0.2																											
10.00	5.00	0.2																											
10.10	5.00	0.4																											
13.00	5.00	0.4																											
13.10	95.00	0.4																											
18.00	95.00	0.4																											
18.10	95.00	0.2																											
Oven temp.	40°C		Nebulizer	N ₂ (50 psi)																									
Injection vol.	10µl		Drying gas	N ₂ (12L/min)																									
Sample	STD mixture 8OHdG, 6OEdG 0.01, 0.5, 0.1, 1, 10ppb(each) Sample Table 2		Drygas temp.	280 °C																									
			Sheath temp.	300 °C																									
			Sheath flow	N ₂ (10L/min)																									
			Fragmentor	380V																									
			MRM	8OHdG Precursor m/z 284.1 Product m/z 168 (Quant) 9eV m/z 140 (Qual) 33eV m/z 125 (Qual) 37eV m/z 112 (Qual) 41eV 6OEdG Precursor m/z 296.1 Product m/z 180 (Quant) 9eV m/z 152 (Qual) 29eV m/z 135 (Qual) 49eV m/z 110 (Qual) 53eV																									

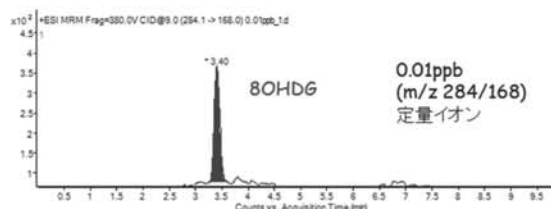


図1 8-OHdGのクロマトグラム

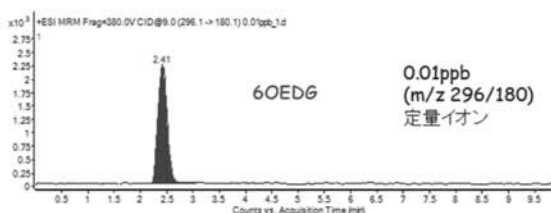


図2 6-OEdGのクロマトグラム

本分析条件により8-OHdG及び6-OEdGの標準品で分析を行ったところ、0.01ppbまでは定量が十分可能であることが確認できた(図1及び図2)。

今後は、本条件で8-OHdG及び6-OEdGの定量性を検討すること、また、可能であれば培養細胞などから抽出したDNAについて本条件を適用して測定を行い、実サンプルでの適用可能性を検討することとしたい。

研究成果報告書(17)

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 主査専門研究員 小山田 智彰						
1 目的	<p>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。</p> <p>【研究分類1】<u>試験対象種の現状調査</u></p> <p>【研究分類2】<u>増殖に関する研究</u></p> <p>【研究分類3】<u>地域資源の活用に関する研究</u></p>						
2 方法	<p>【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。</p> <p>【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。</p> <p>【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。</p>						
3 結果	<p>①東日本大震災の復興工事に伴う希少植物の現地調査と保全に取り組んだ。特に津波およびその後の台風によって絶滅寸前となったエゾオグルマの移植実施による保全に取り組むとともに、沿岸広域振興局や沿岸地域市町村の依頼に応じた助言・指導を行った【研究分類1】</p> <p>②開発に成功した「ユリ科植物の発芽期間短縮法」の発表（原著論文）を行った【研究分類2】</p> <p>③コマクサ組織培養法の開発に取り組む、花茎から増殖することに成功した。現在は、発根培養試験に取り組んでいる。【研究分類2】</p> <p>④国際登録したアツモリソウ新品種を交配親に用いることで地下茎で増殖する日本クマガイソウおよび台湾クマガイソウとの交配に成功した。現在は、得られた種子を発芽させ苗生産に着手している【研究分類3】</p>						
4 今後の研究方向等	<p>①震災復興に関連する希少野生植物の保全、絶滅回避を目的にした移植などを継続する。</p> <p>②種や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。</p> <p>③地域資源の活用に関する研究においては、これまでに開発した苗生産技術を活用して新しい品種の開発を検討する。</p>						
【主な発表業績】							
No.	学会・主催団体	掲載書誌名刊号頁	発表年月日	カテゴリー	発表タイトル名	発表者名	審査
1	北海道山草趣味の会	趣味の山草48, 2-6	2014.5.17	報文	2013年に国際登録したアツモリソウ交配種	小山田智彰・鞍懸重和	無
2	薬用植物栽培研究会	薬用植物研究36 (1) 36-45	2014.6.20	原著論文	エリの新発芽法「種子カット法」の開発	小山田智彰・山内貴義・鞍懸重和	有
3	東京山草会	やまくさ65, 12-13, 32-35	2014.12.14	報文	クマガイソウを交配親に用いたアツモリソウの青種	小山田智彰・鞍懸重和・佐藤卓	無
4	東京山草会	やまくさ65, 14-15, 36-40	2014.12.14	報文	簡易培養法によるヤマシキクサの発芽試験	小山田智彰・鞍懸重和・川目智之	無

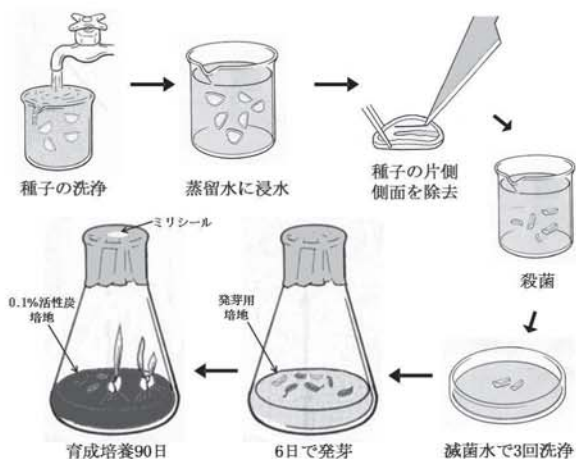


図1 開発した種子カット法の工程



図2 温度処理法と種子カット法の発芽比較 (ヤマユリ)

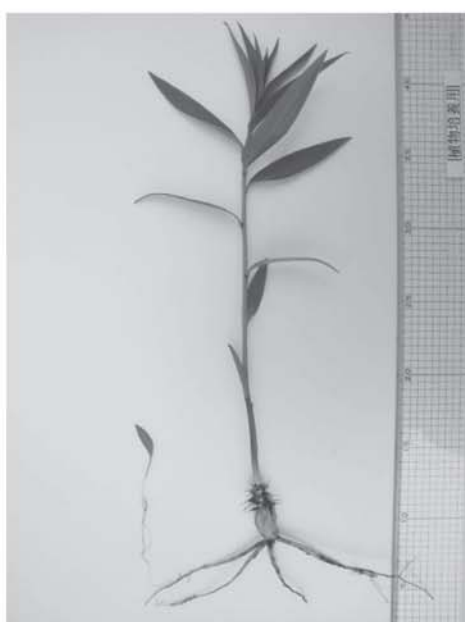


図3 試験開始から17か月経過した実生発芽の苗 (左) と種子カット法の苗 (右) の生育比較 (ヤマユリ)

表1 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/共同研究
3	ハマナデシコ	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・原著論文発表
6	コマクサ	岩手山噴火時の野生絶滅回避	苗生産法開発試験中/共同研究
7	エゾクロユリ	自生地1か所のみ野生絶滅回避	苗生産法開発試験中
8	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
9	サルメンネビネ	園芸採種による激減	苗生産法開発試験中
10	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
11	キキョウ	園芸採種による激減	苗生産法開発試験中
12	エビネ	園芸採取による激減	苗生産法開発試験中
13	ノビネチドリ	園芸採取による激減	苗生産法開発試験中
14	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
15	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
16	エゾオグルマ	東日本大震災の影響による野生絶滅回避	移植実施・生存調査中
17	ユキワリコザクラ	自生地少なく、野生絶滅回避	試験準備
18	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
19	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
<p>1 目的</p> <p>本研究では、イヌワシの個体群としての特性の把握を主目的とし、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を収集する。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明らかにし、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、県全域における繁殖状況の把握や、繁殖支援事業の効果測定についても継続し、保全に貢献するデータの拡充を図る。</p> <p>26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2014年の繁殖状況調査、②羽根等を利用した遺伝子解析、③営巣場所の改良と効果のモニタリング、④繁殖支援のための給餌と効果の検証、⑤映像を用いた個体識別による移動解明。</p> <p>2 方法</p> <p>① 県内の全営巣地で、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、マイクロサテライト12マーカーおよびミトコンドリアD-loopとCOIについて解析を行なった。</p> <p>③ 繁殖後の営巣場所を踏査して巣の状態を点検し、より良い繁殖のための改良・整備作業の内容について検討した。また、過去にこうした改良作業を実施した営巣地において、その後の利用状況をモニタリングした。</p> <p>④ 繁殖率の向上を目的として、2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>⑤ 様々な地域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、同一個体と判断できた記録から、個体の移動の状況を明らかにした。</p> <p>3 結果</p> <p>① 2014年にひなの巣立ちを確認したのは2つがい、繁殖成功率は6.3%で、過去最低の成績となった。繁殖が不成功となった時期は、育雛期3例、抱卵期8例、造巣期8例、造巣前11例（推定含む）であり、産卵まで至ったつがいは例年とほぼ同じ13つがいであった。2～3月の記録的な大雪や暴風雨による失敗が目立ったほか、餌不足で成長不良となった雛も観察された。</p> <p>② 繁殖後の営巣地周辺において、未孵化卵を含む29点の遺伝子試料を収集した。これまでに集めた155試料をもとに、DNAの抽出とマイクロサテライトの解析を京都大学と共同で進めた結果、近親交配の可能性や、遺伝的な分断化が起きていないことなどが示唆された。</p> <p>③ 2013年に出入り支障木の除去を行なった営巣地では、4年ぶりに抱卵が確認された。この他、過去に改良作業を実施した5箇所の営巣地でイヌワシの繁殖利用がみられた。しかし、気象の影響による繁殖失敗が多くなり、巣立ち成功に至った事例はなかった。</p> <p>④ 給餌対象とした2つがいとともに餌の利用が見られ、利用率は70%および83%と昨年度より増加した。しかし、両つがいとも大雪や暴風雨により抱卵期や育雛期に繁殖が中止となった。</p>	

⑤ 映像によって同一個体であると確認できた事例が 15 例得られ、成鳥では十数キロから 20 キロ、若鳥では 70 キロにおよぶ移動の実態が明らかになった。従来考えられていた行動圏の範囲を越えた広域的な移動を捉えることが可能になった。

4 今後の研究方向等

- (1) 各営巣地の繁殖状況の把握、失敗原因の解明を進めるとともに、未確認のつがいがいる可能性の高い地域についても探索調査を行なう。
- (2) より多くの個体の撮影を進め、同一個体の移動事例を増やす。
- (3) イヌワシに特化した新たな遺伝子マーカーを開発し、個体識別や近親度の解明を推進する。

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
<p>1 目的</p> <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、昨年度との比較を行うこととした。また同時に実施している県事業のヘア・トラップ調査との比較検討も行った。</p> <p>2 方法</p> <p>北奥羽地域(岩手大学御明神演習林)に15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1)。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2)。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> <p>3 結果</p> <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1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25頭であった。演習林では過去8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、0.33頭/km²であった。昨年が0.29頭/km²であったことから、若干の上昇があった。</p> <p>4 今後の研究方向等</p> <p>上記の調査を来年度も継続して実行する。そしてヘア・トラップ調査の結果を説明変数として組み込むharvest-based modelの作成に着手する。</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	29	68.97	7
第2セッション	32	96.88	8
第3セッション	49	73.47	13
第4セッション	52	82.69	12
第5セッション	25	68.00	7

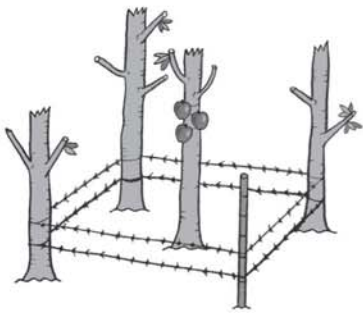


図1 ヘア・トラップ装置の模式図

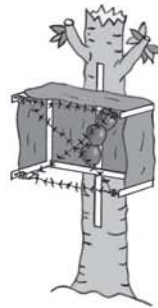


図2 ヘア・トラッパー装置の模式図

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

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。過去の妊娠率は使用した個体数が少ないために移動平均の推移を採用した。2歳以上の妊娠率は近年下がってきているが、1歳の妊娠率が急上昇している。通常1歳の妊娠率は低いはずであるが、栄養状態が良いために急激に上昇している可能性が考えられる。ライニー係数を見ると2010年以降、雌雄とも上昇している。

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。今年度は環境省によるシカ個体数推定業務が実施された。これには糞塊密度調査と目撃効率がシミュレーションのパラメータとして使用されているが、この手法を参考としてharvest-based modelを作成してみる。そして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。

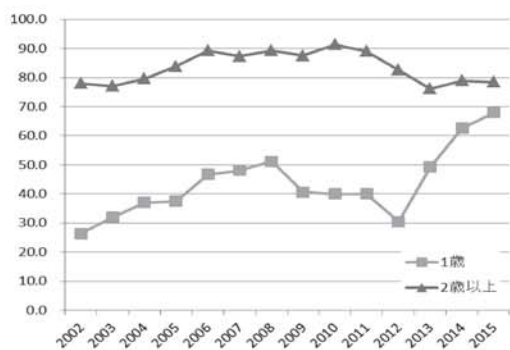


図1 妊娠率の移動平均

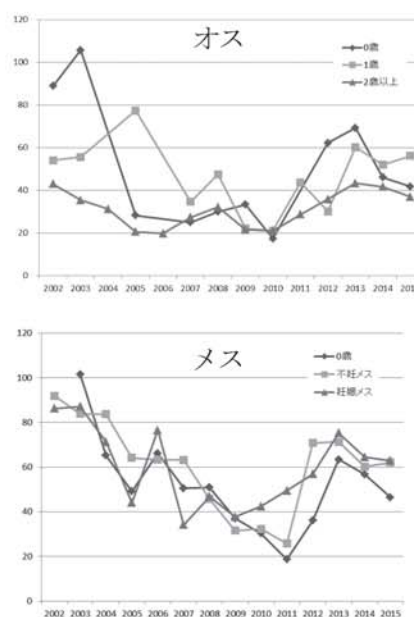


図2 ライナー係数 (腎脂肪指数)の推移