

諫早湾干拓調整池における イケチョウガイの地蒔き飼育の可能性に関する研究

陣野宏宙、船越章裕、玉屋千晶、富永勇太、山内康生

Study on the Possibility of *Hyriopsis schlegeli* Ground Aquaculture in Isahaya Bay Regulating Reservoir

Hirooki JINNO, Akihiro FUNAGOSHI, Chiaki TAMAYA,
Yuta TOMINAGA and Yasuo YAMAUCHI

Key words: Isahaya Bay, regulating reservoir, *Hyriopsis schlegeli*

キーワード: 諫早湾、調整池、イケチョウガイ

はじめに

諫早湾干拓調整池(以下「調整池」という。)は、国営諫早湾干拓事業によって1997年4月に潮受け堤防が締切られ誕生した。調整池の水質には水質保全目標値(COD:5 mg/L以下、T-N:1 mg/L以下、T-P:0.1 mg/L以下)が設定されているが、現在のところ目標を超過した状態が続いている¹⁾。

長崎県環境保健研究センターでは濾過摂食性である二枚貝類の水質浄化能力に着目し、二枚貝を用いた調整池の水質改善手法の開発に取り組んできた²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。特に琵琶湖・淀川固有種の淡水二枚貝で、淡水真珠の

母貝として利用されているイケチョウガイ(*Hyriopsis schlegeli*)は大型化することから大きな水質浄化効果が期待され、調整池においても垂下式飼育方法によって良好に成長することが確認されている²⁾。

しかしながら垂下式飼育は水面付近に籠をつるさなければならず、設置コストや維持管理の問題から大量に飼育することは困難である。

したがって、本研究では調整池内での大量飼育につなげていくために、イケチョウガイを調整池において地蒔き飼育し、その生育状況等について調査を行い、地蒔き飼育の可能性について検証した。

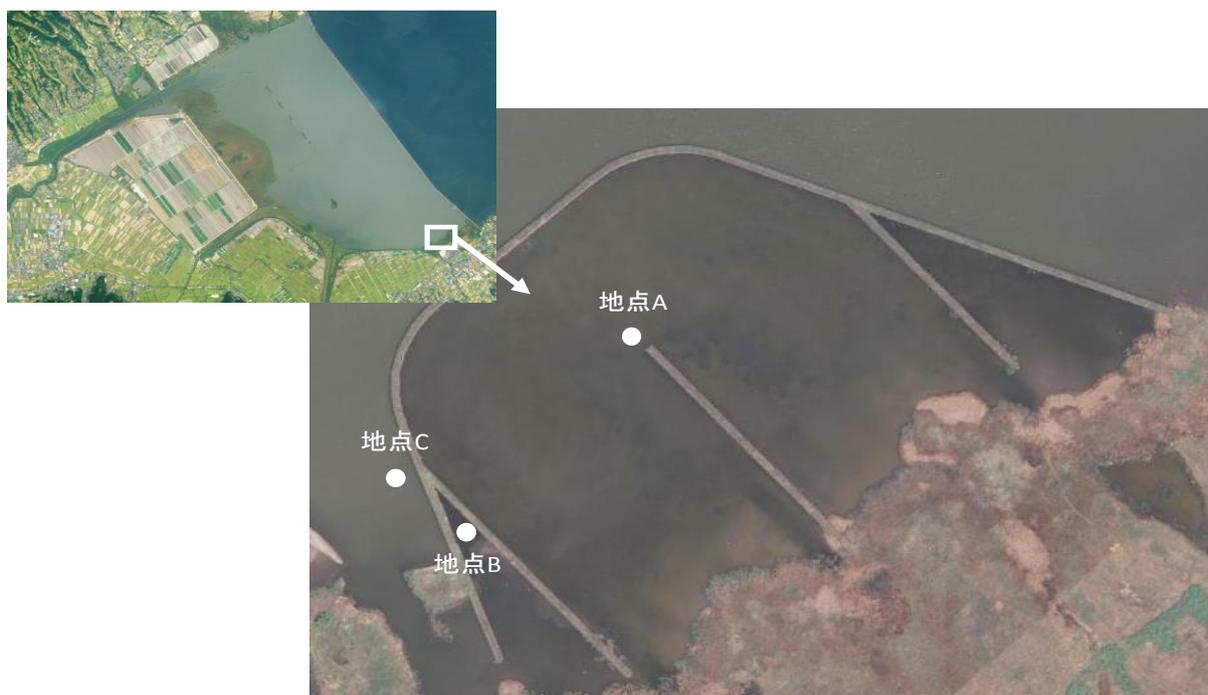


図1 飼育試験実施場所位置図

調査内容

1 調査地点

調査は調整池のヨシ進出促進工(以下「ヨシ進出工」という。)内に地点Aと地点Bの2地点、ヨシ進出工外に地点Cの1地点、合計3地点を設けた(図1)。ヨシ進出工は、ヨシの進出促進を目的として設置された木柵工で、その内側は海砂で覆砂され、水深約30~50 cmの浅場となっている。

なお、各地点の概要を表1に、底質の状態を図2に示す。

2 調査項目および方法

(1) 飼育環境調査

1) 水質調査

地蒔き飼育地点表層の水質を隔月で調査した。

- ・調査地点: 地点A、B、C
- ・調査回数: 5回(6、8、10、12、2月)
- ・調査項目: 水温、水深、pH、SS、DO、Cl、COD、D-COD、NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N、D-T-N、TN、PO₄-P、D-T-P、T-P、クロロフィルa

2) 連続モニタリング調査

水質調査の補足データとして、地点Aに多項目水質計(東亜 DKK 社製 WQC-24)を設置して水質の長期変動を観察した。

- ・調査期間: 2015年5月18日~12月1日
- ・調査項目: 水温、DO

3) 底質調査

地蒔き地点の底質環境について調査を行った。

- ・調査地点: 地点A、B、C
- ・調査回数: 2回(8月、12月)
- ・調査項目: 強熱減量、COD、硫化物

(2) 成長および生残調査

毎月1回生残個体数を確認し、殻長をノギスで測定した。飼育個体、方法、調査期間等については以下のとおり。

1) 飼育個体

地蒔き飼育には、過去の垂下式飼育試験²⁾で飼育し、調整池の環境によくなじんだ年齢10歳程度、殻長18 cm前後のイケチョウガイ(以下「成貝」とする。)と、今回新たに滋賀県の淡水真珠養殖業者から購入した年齢2歳程度、殻長10 cm前後のイケチョウガイ(以下「2年貝」とする。)の2種類のイケチョウガイを用いた(図3)。

2) 飼育方法および飼育個体数

メッシュコンテナ(524×365×309 mm)に調査地点の底質を約15 cm厚となるように入れて、それぞれの調査地点に深さ5 cm程度までコンテナを埋め込んでイケチョウガイの地蒔き飼育場とした。なお2年貝については調査開始後、魚類等による捕食が確認されたため、コンテナ上部を15 mmメッシュの網で覆った(図4)。

成貝については1コンテナあたり5個体入れ、1地点につきコンテナ2つ設置し計10個体とした。2年貝は1コンテナに10個体入れ、各地点10個体とした。

表1 調査地点の概要

	地点A	地点B	地点C
場所	ヨシ進出工内	ヨシ進出工内	ヨシ進出工外
底質	砂泥	砂泥 (浮泥の堆積あり)	細砂
水深	約40 cm	約30 cm	約50 cm



図2 調査地点の底質

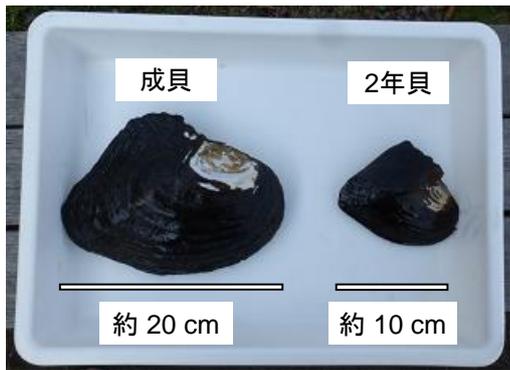


図3 飼育に用いたイケチョウガイ



図4 飼育コンテナ

3) 調査期間

(成貝)

成貝については地点 A、B、C にそれぞれ 2015 年 5 月 1 日、18 日、29 日に飼育場を設置し、地蒔き飼育を開始した。

(2 年貝)

2 年貝については全地点で 2015 年 6 月 23 日に飼育場を設置し地蒔き飼育を開始したが、全ての地点で魚類等による捕食により貝の消失が確認された。そこで各地点 10 個体になるよう新たに 2 年貝を追加し、地点 B につい

ては 7 月 17 日、地点 A および地点 C については 7 月 28 日に調査を再スタートした。なお進出工外地点 (地点 C) では波浪により底質への貝の定着が困難であったため途中で調査を中止し、地点 A 及び地点 B のみ飼育調査を実施した。

調査は当初、飼育開始から 12 月まで実施する予定であったが、2016 年 1 月 25 日に諫早市に隣接する大村市で観測史上最低気温である -6.2 °C が確認された⁷⁾ため、低温耐性を確認する意味で 2 月 1 日も調査を実施した。

表2 水質調査結果

調査項目	単位	調査地点	6月2日	8月11日	10月6日	12月1日	2月1日
			曇り	晴れ	快晴	晴れ	曇り
水温	°C	地点A	24.9	31.5	20.3	15.2	9.4
		地点B	25.2	31.6	20.9	15.3	10.1
		地点C	24.3	31.9	20.0	15.3	9.9
水深	m	地点A	0.42	0.30	0.34	0.28	0.36
		地点B	0.40	0.25	0.36	0.28	0.36
		地点C	0.45	0.41	0.51	0.49	0.52
pH		地点A	8.9	9.30	8.9	8.6	8.7
		地点B	7.7	7.31	8.3	8.3	8.0
		地点C	8.1	8.56	8.3	8.7	7.7
SS	mg/L	地点A	59	49	89	21	60
		地点B	66	42	31	25	43
		地点C	78	43	37	50	38
DO	mg/L	地点A	8.5	10	10	12	12
		地点B	7.5	4.8	10	11	10
		地点C	8.4	9.7	10	13	11
Cl	mg/L	地点A	210	130	87	200	290
		地点B	240	56	88	190	300
		地点C	230	220	150	280	330
COD	mg/L	地点A	19	28	20	13	10
		地点B	16	16	12	18	8.9
		地点C	8.0	8.3	4.3	6.5	5.2
D-COD	mg/L	地点A	12	17	7.7	9.3	6.1
		地点B	10	11	8.0	7.8	5.8
		地点C	4.9	4.8	3.5	3.3	3.8
NH ₄ -N	mg/L	地点A	0.01	0.06	0.01	0.01	<0.01
		地点B	<0.01	0.05	0.01	0.02	0.01
		地点C	<0.01	0.05	0.02	0.01	0.11
NO ₂ -N	mg/L	地点A	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
		地点B	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
		地点C	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
NO ₃ -N	mg/L	地点A	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
		地点B	<0.02	<0.02	<0.02	0.07	0.17
		地点C	0.68	0.26	1.0	0.55	1.6
D-T-N	mg/L	地点A	0.74	1.0	0.36	0.50	0.29
		地点B	0.60	0.59	0.38	0.48	0.51
		地点C	0.93	0.49	1.1	0.76	1.7
T-N	mg/L	地点A	1.4	2.5	1.4	1.0	1.2
		地点B	1.4	1.1	0.99	0.80	1.0
		地点C	1.4	1.0	1.4	1.2	2.0
PO ₄ -P	mg/L	地点A	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003
		地点B	0.042	0.46	0.013	0.024	0.016
		地点C	0.098	0.11	0.078	0.032	0.081
D-T-P	mg/L	地点A	0.029	0.043	0.015	0.016	0.019
		地点B	0.088	0.49	0.031	0.044	0.037
		地点C	0.13	0.14	0.094	0.044	0.10
T-P	mg/L	地点A	0.16	0.22	0.21	0.094	0.15
		地点B	0.30	0.75	0.14	0.11	0.13
		地点C	0.28	0.27	0.13	0.15	0.17
Chl.a	µg/L	地点A	62	120	47	31	66
		地点B	62	35	41	16	39
		地点C	51	48	12	44	7.8

結果と考察

1 飼育環境調査結果

(水質調査)

水質調査の結果を表 2 に示す。その中で COD、T-N、T-P、クロロフィル a および塩化物イオン濃度についての隔月の変化を図 5 に示す。

水質保全目標値が設定されている COD、T-N、T-P について調査月によっては目標値を下回る地点もあったが、年平均で見ると全地点で水質保全目標値を上回っていた。なかでも COD については、ヨシ進出工内地点である地点 A および地点 B において 15 mg/L を超える月もあり、調整池(8.0~11 mg/L) ¹⁾ と比べても高い値となっている。ヨシ進出工内は木柵工によって調整池と隔てられており、水の交換が少ないことから有機物が滞留しやすくなっていると考えられる。

イケチョウガイの餌である植物プランクトンの指標となるクロロフィル a は 8 月の地点 A において 120 µg/L と高い値となっており、植物プランクトンが増殖していることが確認された。年平均値は地点 A、B、C でそれぞれ 65、38、32 µg/L であった。これは、イケチョウガイの養殖漁場である滋賀県西の湖における調査結果(28.8~30.8 µg/L) ²⁾ と同等以上の値であり、今回の地蒔き飼育地点においてもイケチョウガイの餌が十分に存在することがわかった。

塩化物イオン濃度の年平均値は 170~240 mg/L であり、調整池における年平均値(280~420 mg/L) ¹⁾ と比べて低い値であった。地点別にみると、地点 A および B が地点 C よりも低い傾向にあった。過去のイケチョウガイの垂下式飼育調査においては塩化物イオン濃度が 250~540 mg/L であった地点においても 90 % 以上の生残率を示している ²⁾。今回の地蒔き飼育地点は過去の垂下式飼育地点よりも塩化物イオン濃度が低く、淡水二枚貝であるイケチョウガイの成育にはより適した場所であると考えられる。(連続モニタリング調査)

水温、DO の連続モニタリング調査結果を図 6 に示す。途中、電池交換や電極点検などのメンテナンス期間や機器の故障期間については欠測となっている。

飼育場の水温は 8.3~36.9 °C で、DO は 0.07~21 mg/L で推移した。夏場になると昼間の水温が上昇し、植物プランクトンによる光合成によって一時的に DO が 15 mg/L を超えた状態になるが、夜になると徐々に DO が低下していき、3 mg/L を下回った貧酸素状態となる。貧酸素状態は時間の経過とともに解消され、長くて 9 時間程度しか続かないことが観察された。

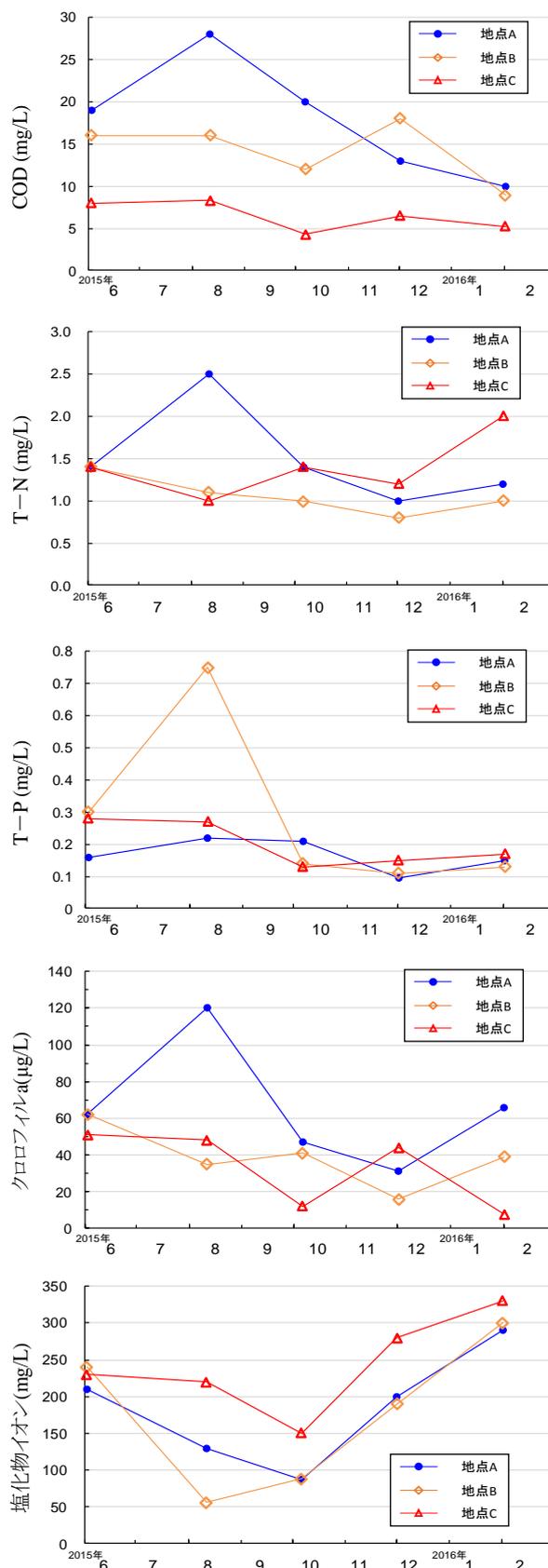


図 5 水質調査結果

(底質調査)

底質調査結果を表3に示す。有機物の指標である強熱減量は2.4~3.7%であった。8月、12月ともに地点Bが3地点の中で最も高く、地点Cが最も低い値をとった。またCODについては1.4~6.6 mgO/gであり、強熱減量と同様に8月、12月ともに地点Bが最も高く、地点Cが最も低い結果となった。地点Bは図1のとおりヨシ進出工内の1部分をさらに木柵工で仕切った地点であり、水の交換がおこりにくく底質が悪化しやすい地点だと考えられる。また、強熱減量、CODともに地点AおよびBで8月よりも12

月が高い値をとる傾向にあった。地点AおよびBでは7月中旬から10月下旬にかけてヒシ等の水草の繁茂が確認されており、冬にかけて枯れた水草の影響で底質の有機物量が上昇したと思われる。硫化物は8月に0.090~0.15 mgS/g、12月に0.059~0.075 mgS/gであった。

平成9~26年度に実施した調整池の底質調査において、強熱減量は平均8%、CODは平均14 mgO/g、硫化物は平均0.18 mgS/gであり、今回の地蒔き飼育地点は調整池内の底質よりも全項目で低い結果となった。

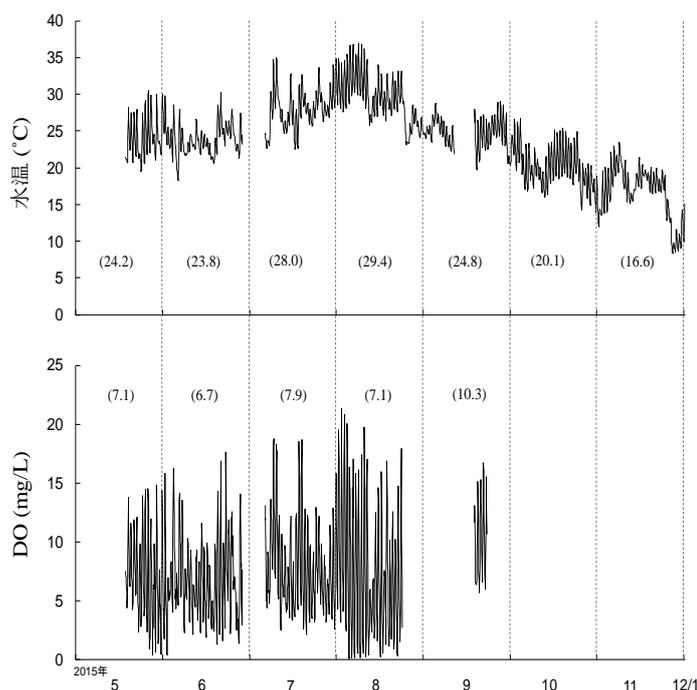


図6 連続モニタリング調査結果。図中の括弧内の数値はその月の平均を表す。

2 成長および生残調査結果

イケチョウガイの生残率を図7に示す。成貝は8月の調査で地点Bにおいて2個体の死亡が確認され、最終的な生残率は80%であった。地点AおよびCにおいては、生残率はともに100%であった。2年貝については7月の調査開始から約2ヶ月後の9月の調査で地点A、地点Bともに2個体の死亡が確認され、最終的な生残率は両地点ともに80%であった。過去の調整池における2年貝の垂下式飼育試験においては調整池10地点の平均生残率が69%⁸⁾であり、今回の地蒔き飼育での生残率は垂下式飼育と比べて高い結果となった。

イケチョウガイの殻長の推移を図8に示す。成貝については調査期間を通して殻長の成長が見られなかった。

これらの貝の年齢は10歳程度であり、既に殻長が上限に達しているものと考えられる。2年貝については9月から12月にかけて大きな成長を示し、最終的には地点Aで平均0.80 cm、地点Bで平均0.79 cmの殻長の増加があった。既往の調査²⁹⁾から殻長は5月~10月に最大の成長を示すことがわかっているが、今回の調査では7月~9月にかけて殻長の成長が小さかった。過去の垂下式飼育においても飼育開始から約2ヶ月は殻長の増加がみられず、飼育地点の環境に慣れるまでに2ヶ月程度の時間が必要なものと考えられる。なお、殻長の成長量を調査日数で割った日成長率についてみると、地点Aで0.039%、地点Bで0.038%であり、調整池での垂下式飼育における10地点平均の日成長率0.037%⁸⁾と同程度の日成長率を示した。

表3 底質調査結果

8月			
	強熱減量(%)	COD(mgO/g)	硫化物(mgS/g)
地点A	2.6	1.7	0.090
地点B	3.3	5.3	0.15
地点C	2.4	1.5	0.095
12月			
	強熱減量(%)	COD(mgO/g)	硫化物(mgS/g)
地点A	3.0	3.0	0.059
地点B	3.7	6.6	0.068
地点C	2.5	1.4	0.075

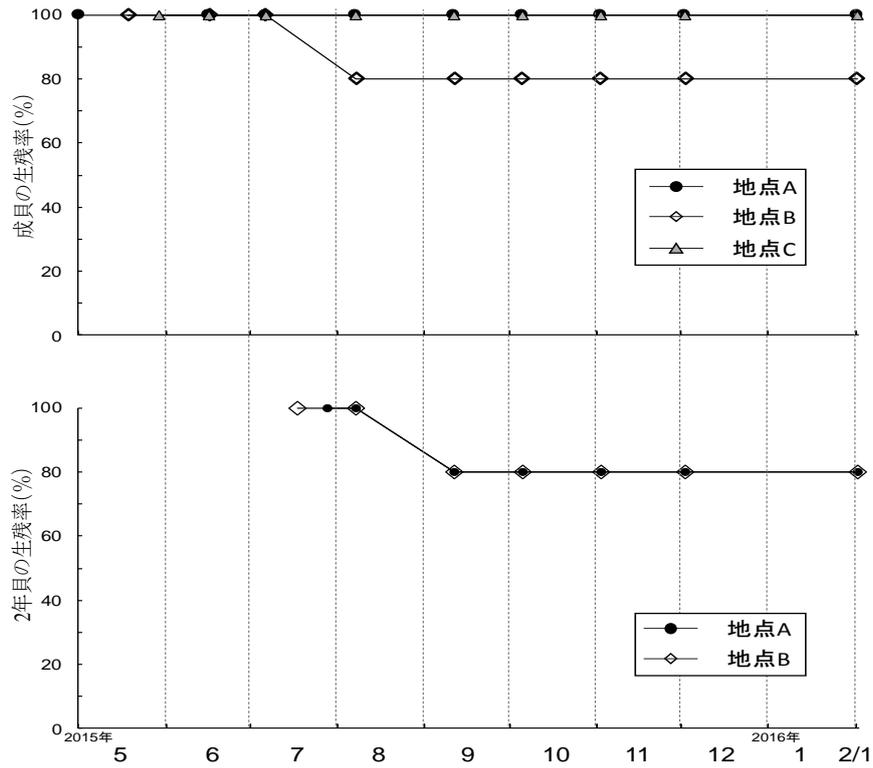


図7 イケチョウガイの生残率の推移

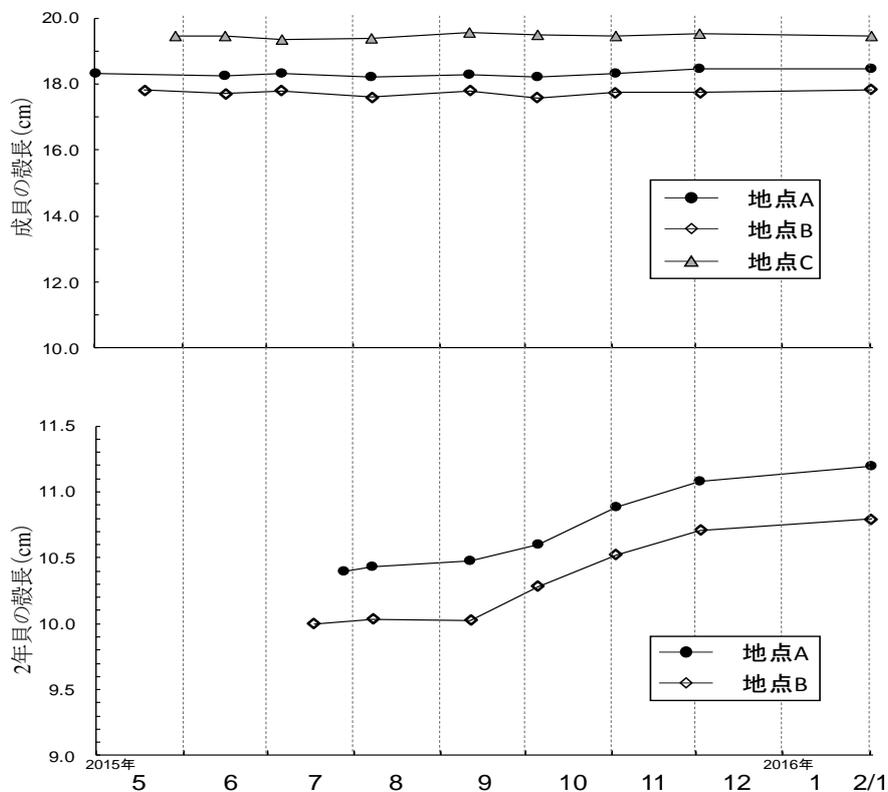


図8 イケチョウガイの殻長の推移

ま と め

調整池での大量飼育につなげていくため、イケチョウガイの地蒔き飼育の可能性について調査を行った。地蒔き飼育場の水環境については、餌となる植物プランクトンが滋賀県のイケチョウガイ養殖漁場と同等以上存在していることがわかった。また、地蒔き飼育での生残率は成貝で平均93%、2年貝で平均80%であり、両者ともに調整池における垂下式飼育での平均生残率の69%⁸⁾と比べても高い結果であった。イケチョウガイの成長についても、殻長18cm程度の成貝については殻長の増加は見られなかったが、殻長10cm程度の2年貝については9月以降に殻長の増加が観察され、日成長率は垂下式飼育におけるもの⁸⁾と同程度であった。当初懸念していた高水温(30℃以上)となる夏季においても80%以上の生残率であり、また順調に生育していたことから、ヨシ進出工内でのイケチョウガイの地蒔き飼育はほぼ可能との見通しが得られた。しかしながら、調査開始当初に魚類等による2年貝の捕食が確認されたことから、調整池での地蒔き飼育にあたっては、貝の殻長がある程度の大きさになるまでは捕食防止対策が必要であると考えられる。

参 考 文 献

- 1) 陣野 宏宙ほか: 諫早湾干拓調整池水質等調査結果(2014年度), 長崎県環境保健研究センター所報, 60, 85-92, (2014)
- 2) 石崎 修造ほか: イケチョウガイによる諫早湾干拓調整池の水質浄化に関する研究, 長崎県環境保健研究

センター所報, 53, 47-52, (2007)

- 3) 荒木 孝保ほか: 諫早湾干拓調整池におけるヤマトシジミ垂下式養殖の検討, 長崎県環境保健研究センター所報, 56, 64-67, (2010)
- 4) 荒木 孝保ほか: 諫早湾干拓調整池及び中央遊水池における二枚貝(ヤマトシジミ及びイケチョウガイ)の生息適応性に関する研究, 長崎県環境保健研究センター所報, 57, 54-64, (2011)
- 5) 粕谷 智之ほか: 諫早湾干拓調整池及び中央遊水池における二枚貝(ヤマトシジミおよびイケチョウガイ)の生残、成長及び再生産に関する研究, 長崎県環境保健研究センター所報, 58, 45-51, (2012)
- 6) 大前 信輔ほか: 真珠漁場モニタリング調査, 滋賀県水産試験場報告, (2009)
- 7) 気象庁ホームページ 気象統計情報
<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>
- 8) 平成18年度国営干拓環境対策調査 水生生物を活用した水質保全対策検討委託事業報告書(イケチョウガイによる諫早湾干拓調整池の水質浄化に関する研究)
- 9) 水本 三朗ほか: イケチョウガイの増殖に関する研究-VII(イケチョウガイの成長について), 滋賀県水産試験場研究報告, 10, 19-31, (1959)

諫早湾干拓調整池内干陸地におけるヨシ生育状況調査(2015年度)

玉屋 千晶、船越 章裕、富永 勇太、陣野 宏宙、山村 真理子、山内 康生

Water Quality of Regulating Reservoir Originated
from Isahaya Bay Land Reclamation (2015)Chiaki TAMAYA, Akihiro FUNAGOSHI, Y. Yuta TOMINAGA, Hirooki JINNO,
Mariko YAMAMURA and Yasuo YAMAUCHI

Keyword: Isahaya Bay, regulating reservoir, land reclamation

キーワード: 諫早湾、調整池、干拓

はじめに

諫早湾干拓調整池内の干陸地は、堤防締め切り後、降雨により徐々に土壌塩分が低下し、自然遷移を経て広大なヨシ群落が形成された。自然干陸地では、調整池とヨシ群落を生息の基盤とする生物種により豊かな生態系が形成されている。中でも環境省のレッドデータにおいて絶滅危惧 IB 類に指定されているチュウヒの繁殖が確認されている南限であり、面的なまとまりや調整池を含めた空間の広さという点で類が少ないこと、などから希少な環境であると考えられる。

調整池水質について、COD 5 mg/L 以下、T-N 1 mg/L 以下、T-P 0.1 mg/L 以下の水質保全目標が設定されている。国や長崎県では、水質の改善に向け各種取組を実施しているところであるが、目標に対して現在の水質(2014年度)は、COD 7.9 mg/L、T-N 1.3 mg/L、T-P 0.192 mg/L であり、水質保全目標の達成に向けたさらなる取組が課題となっている。

水辺に生育するヨシは、窒素やリンを吸収することや根圏における脱窒効果等により、水質浄化に役立つと言われている。調整池(自然干陸地等)に自生し、栄養塩を吸収するヨシの適正管理を通じて水質浄化を図るため、自然干陸地に自生するヨシの生育調査を行った。

方法

(1) 調査地点の設定

調査を実施するにあたり、以下の点を踏まえて調査地を設定を行った。

- ① 調整池及びその周辺では、環境省や長崎県のレッドデータブック等で希少な種として指定された種が数多く確認されている。確認された種のほ

とんどが自然干陸地の広い範囲を利用しており、特に中央干陸地では、猛禽類であるチュウヒが繁殖し、ツル類は渡り・越冬期のねぐらとして利用しており、他の種に比べると中央干陸地への依存性が高い。したがってこれらに配慮し、チュウヒの営巣地から半径 500m の範囲、ツル類のねぐらから半径 250m の範囲では調査を行わないこととした。

- ② チュウヒやツル類への配慮の他、植生図¹⁾、現地調査による植生状況を考慮し、図 1 に示す場所を調査地とした。地点①は、干陸地水際であり、ヨシのみが生育する場所、地点②、地点④はヨシが優占する場所、地点③はヨシ以外の雑草が多く見られる場所である。内部堤防内側にある遊水池にも調査地を1カ所設定した。地点①では刈取りを実施しない対照区のみを、残る4カ所は、刈取り区と非刈取り区である対照区を設定した。

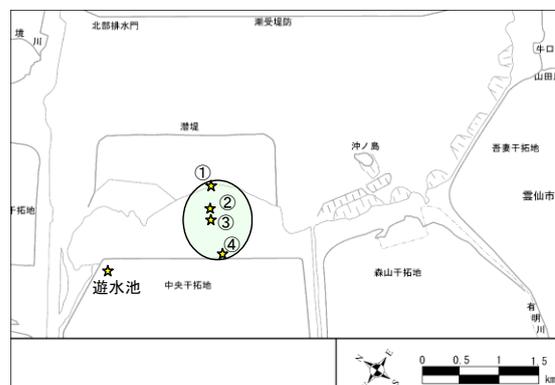


図 1 調査地点

(2) 生育調査

各地点において9月に予備調査を1回、本調査を10～1月に概ね1ヶ月おきに4回実施した。結果を図2～6に示す。測定項目は、草丈、莖径、密度とした。また、刈取り区においては、刈取り時に生重量を測定した。

(3) 土壌調査

刈取り区、非刈取り区内において、3箇所から土壌を採取し、土壌分析を実施した。測定項目は、含水率、T-N(全窒素)、T-P(全リン)とした。

(4) 植物体成分含有量調査

刈取り区、非刈取り区内のヨシを採取し、成分含有量を分析した。測定項目は、含水率、T-N、T-Pとした。

(5) 枯死したヨシからの栄養塩類等溶出試験

調査地点①～④及び遊水池で11月に採取した枯れヨシをmilli-Q水で洗い、汚れを落とし、常温で乾燥後、40gずつ計り取り、調整池水10Lを入れたボトル(容量20L)に投入し、水温20℃に保ちながらインキュベートし、試験開始時と60日後の水質を比較した。測定項目は、NO₂-N、NO₃-N、NH₄-N、PO₄-P、DOC、DOとした。

結果と考察

1 生育調査結果

図2～図6に調査結果を示す。ヨシの生育状況について、水際に近い地点①、②において、他の植物の植生はあまり見られず、概ねヨシ群落を形成していた。地点③、④ではヨシ以外の植物が共生し、特に地点③ではセイタカアワダチソウやチクゴスズメノヒエなどヨシ以外の植物が多く見られた。10月に調査したヨシの生育調査結果では、干陸地

に生育しているヨシは概ね2m前後であり、水際である地点①で生育密度が最も高くなった。調整池は汽水性を持つため、琵琶湖のように真水で生育するヨシと比べると、成長は大きくない。

1月の調査では立ち枯れした状態であり、最も風の影響を受ける水際のヨシは倒れ、波浪により水際の土壌も侵食され、ヨシの根茎が露出したり、ちぎれたりしていた。

2 土壌調査結果

ヨシが生育している現地土壌について、成分分析を10月に実施した。結果を表1に示す。内陸部ほど土壌中の含水率が低く、乾燥していた。地点①では、強熱減量や窒素が他地点より2倍程高く、有機物が豊富な土壌であることがうかがわれた。

表1 土壌成分分析結果

	①	②	③	④	遊水池
含水率(%)	70	52	46	55	57
強熱減量(%)	18	9.7	8.7	10	7.2
T-N(mg/g)	41	27	20	20	26
T-P(mg/g)	10	9.8	11	7.4	7.9

※各地点(地点①以外)の分析結果は刈取り区と非刈取り区の2区画の平均値で示した。

3 植物体成分含有量調査結果

10月、1月に実施した植物体内成分含有量分析の結果を表2に、T-N、T-Pの持ち出し量を表3に示した。なお、水際のヨシは刈取りが困難なため地点①の栄養塩の持ち出し量は算出していない。各地点ともヨシ体内の窒素・リンは10月が高く、1月の枯れた状態になると窒素は2～4割減少、リンは、1～4割減少した。刈取りによる栄養塩(窒素・リン)の持ち出し量は、10月に実施すると持ち出し量は多い。

表2 植物体内成分含有量分析結果

	①		②		③		④		遊水池	
	10月	1月								
含水率(%)	55	17	52	17	53	16	51	19	48	29
強熱減量(%)	96	95	95	95	92	92	95	95	94	94
T-N(mg/g)	41	37	27	21	20	16	20	12	26	22
T-P(mg/g)	3.2	2.1	2.0	1.7	2.5	1.4	2.1	1.9	1.9	2.9

※10月の各地点(地点①以外)の分析結果は2区画の平均値で示した。

※※1月は非刈取り区の値

表3 10月刈取り時のT-N、T-P持ち出し量

持ち出し量	②	③	④	遊水池
生重量(kg/m ²)	1.4	0.4	2.0	1.4
T-N(g/m ²)	38	8.0	40	36
T-P(g/m ²)	2.8	1.0	4.2	2.7

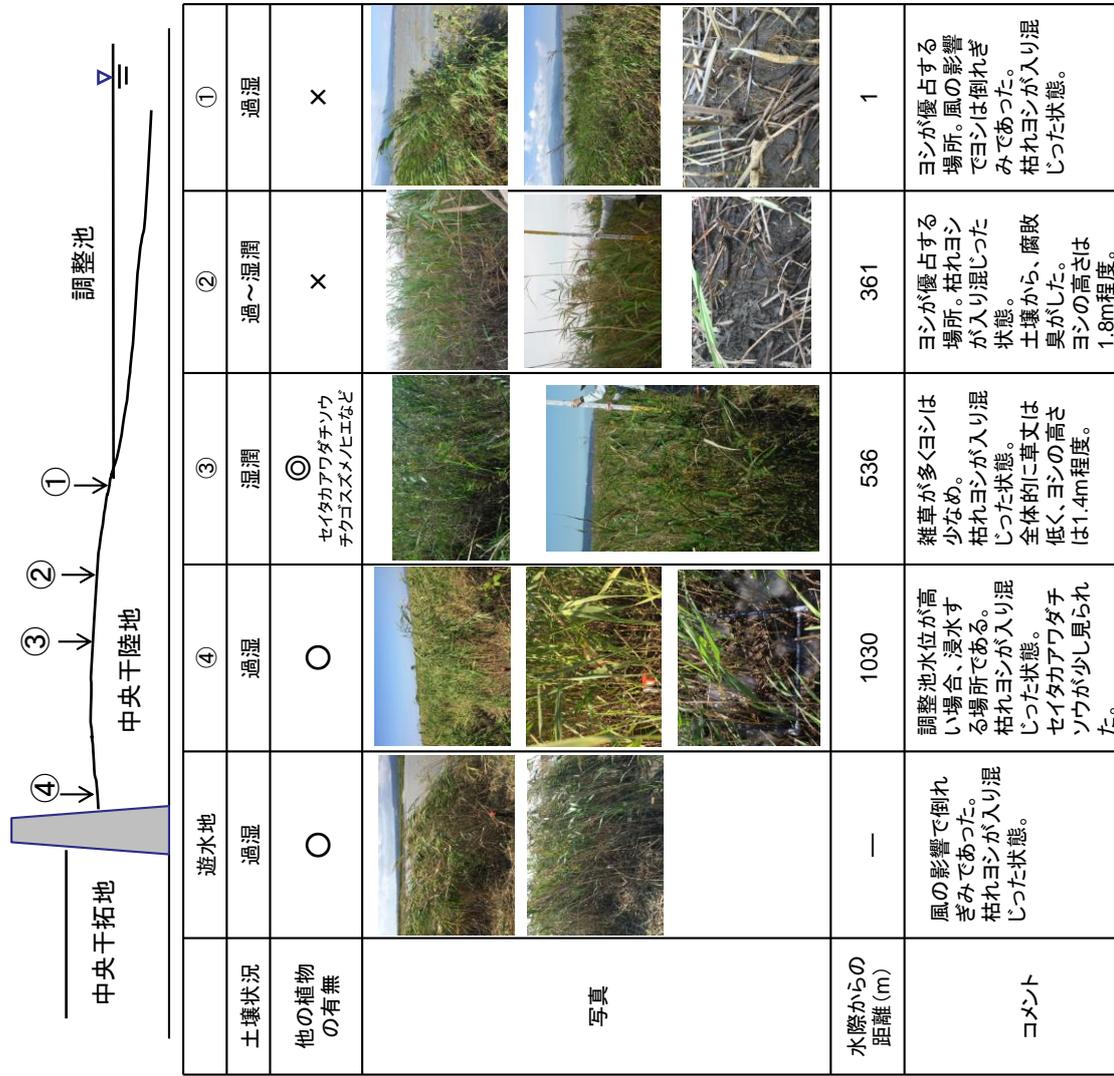
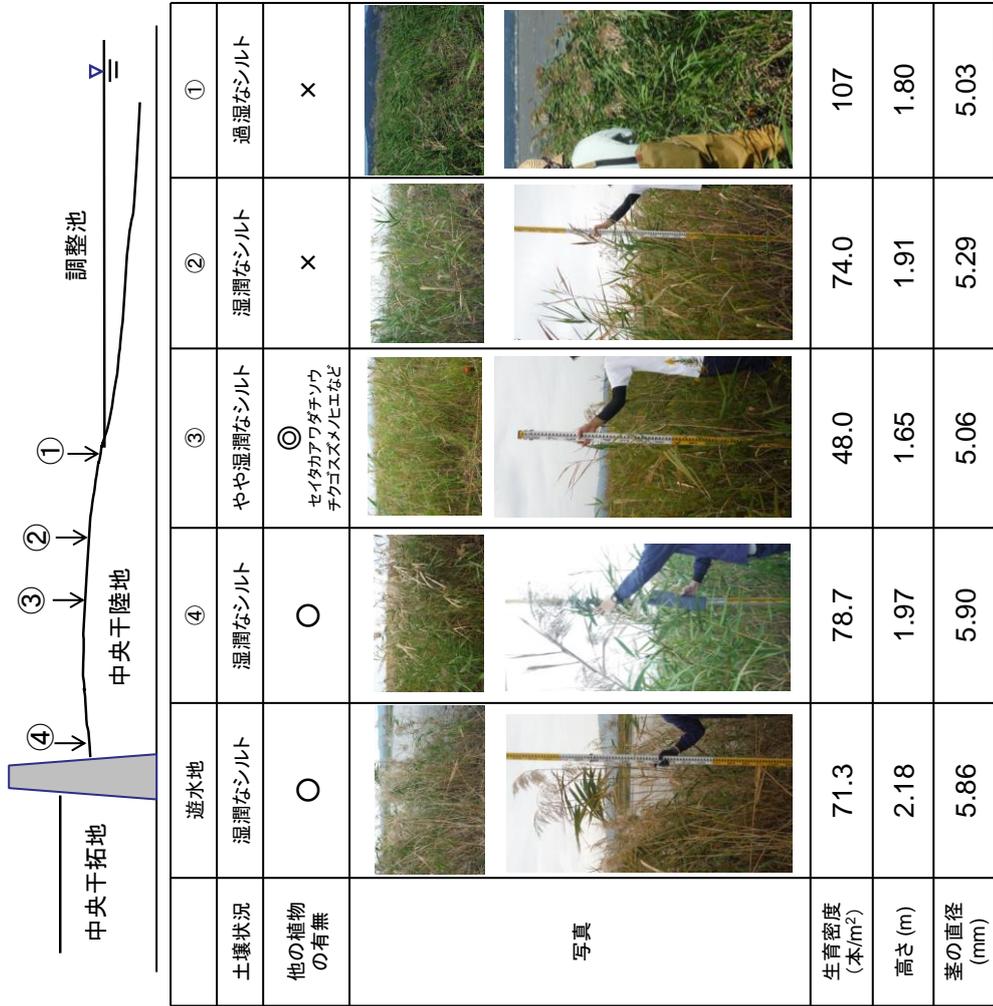


図 2 予備調査結果

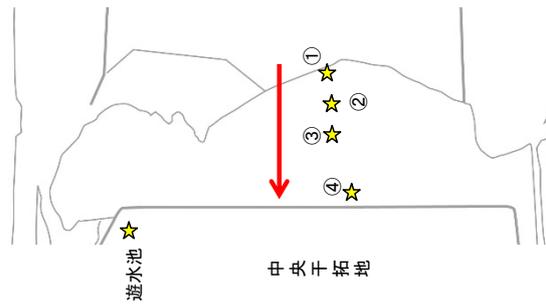


※なお、各地点の生育密度、茎の直径、高さは2区画の平均値で示した。

図3 10月調査結果(刈取り前)

本調査1(10月)

刈取り前



コメント

全ての調査地でヨシの穂がつきだした。全体的に枯れ始めてきていた。

①は、他の調査地に比べ青いヨシが多かった。また前回に比べ、草丈の高いヨシは、風の影響で倒れていた。

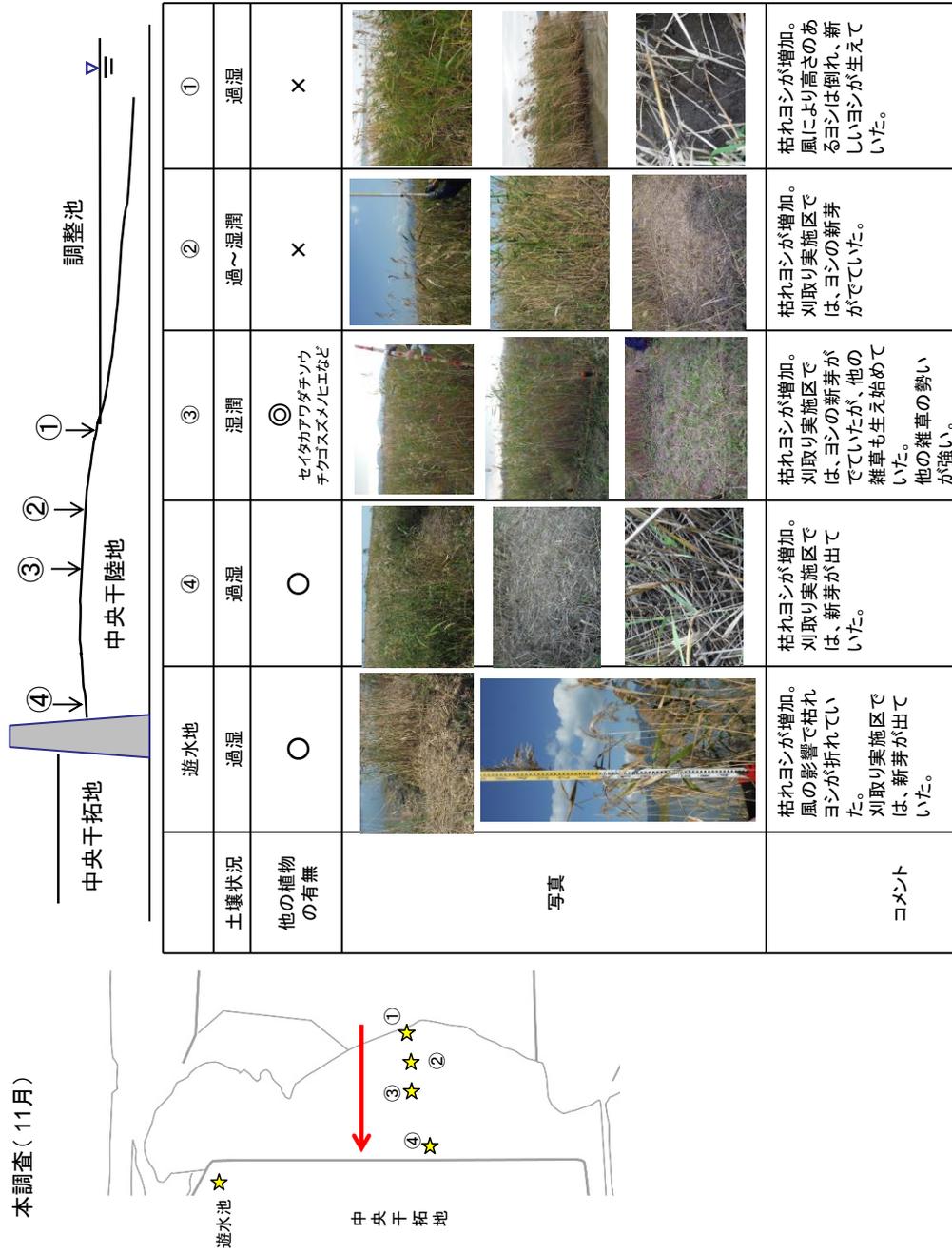


図4 11月調査結果

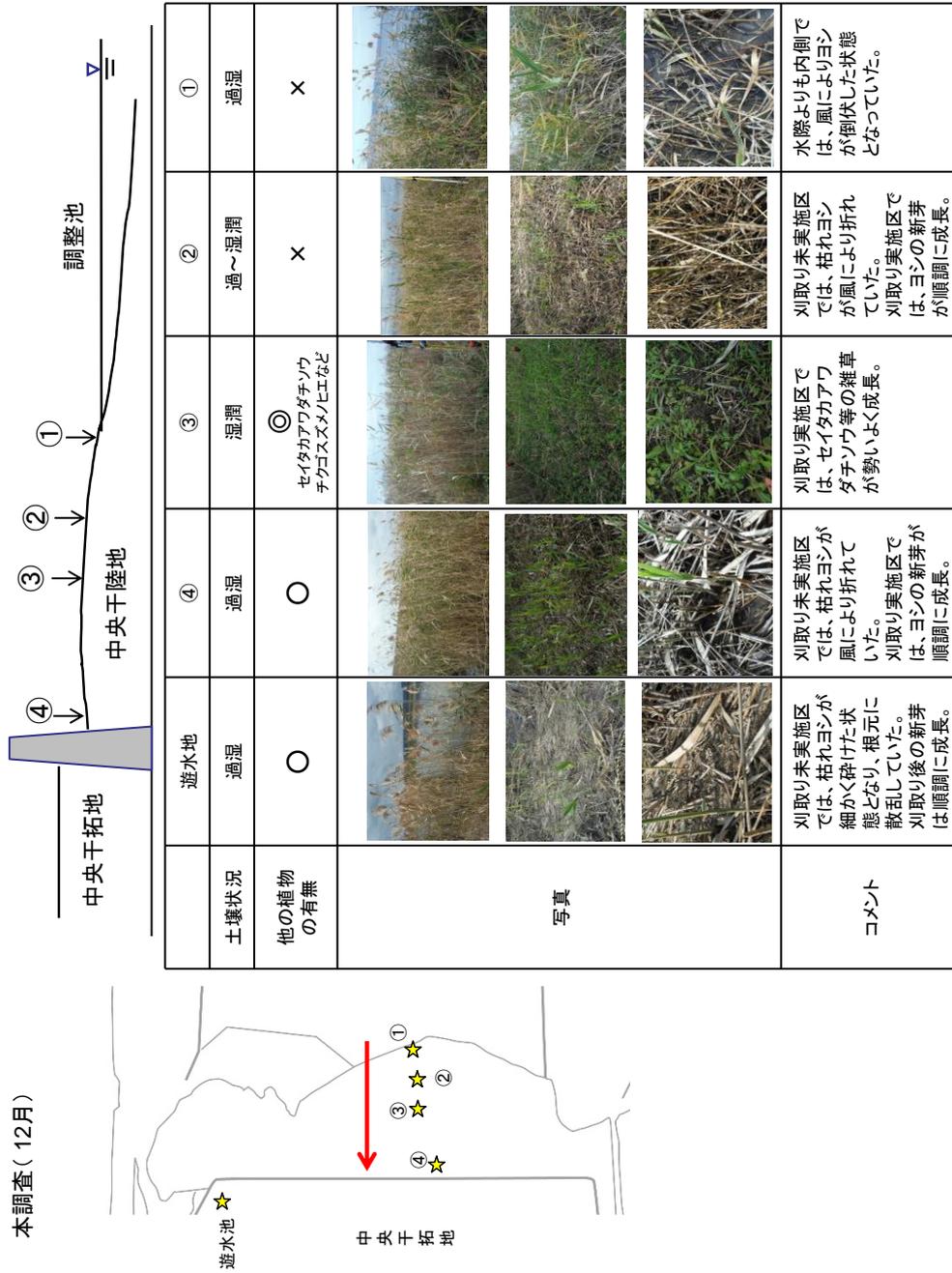


図 5 12月調査結果

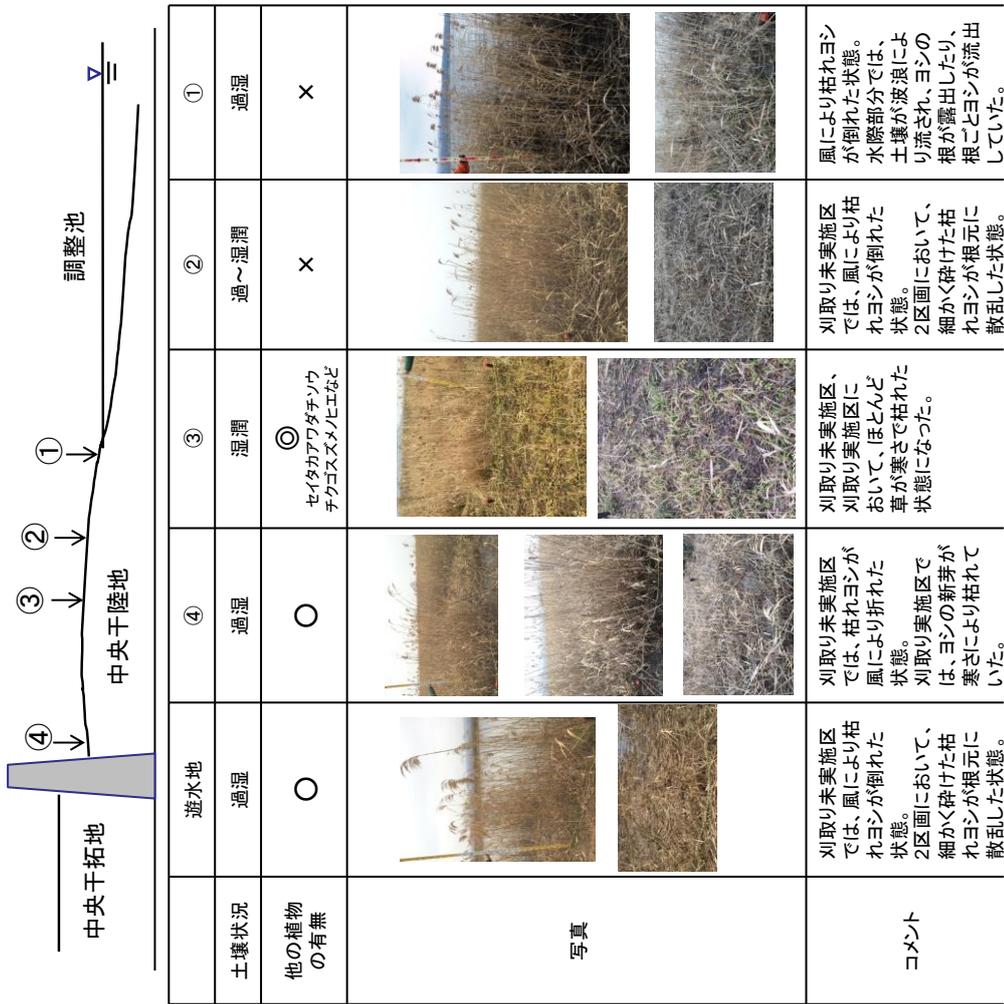


図6 1月調査結果

ヨシに詳しい淡海環境保全財団の専門員に調整池内の干陸地に自生するヨシを見てもらったところ、次のような意見をいただいた。

「諫早湾干拓調整池内に自生するヨシは、細く、根元が黒っぽい、固くもろいといった汽水域に自生するヨシの特徴がみられる。また、ヨシの見た目が黒っぽく汚れた状態であるが、これは土壌中の栄養塩濃度が十分であることを示している。」

干陸地は、粘土質の土壌であるため、ヤナギやハンノキといった他の水辺の植物が生育しづらい環境となっている。また調整池は水位変動が生じるために遷移の進行が遅くヨシ原が維持されていると考えられる。また調整池では、汽水域のヨシの特徴がみられることから、土壌中の塩分が比較的高く他の植物が自生するには厳しい環境となっており、このことがヨシ原を維持するのに適した環境となっていると考えられる。

4 枯死したヨシからの栄養塩類等溶出試験結果

表4に結果を示す。試験開始から60日後の濃度変化をみると、調整池水の場合、溶存態であるNO₃-N、NH₄-N、PO₄-P、の濃度が上昇したが、これは調整池のSS中の有機物が微生物に分解されたためであると考えられる。DOC濃度は低下したが、これは水中の微生物による分解のため減少したものと考えられる。調整池水にヨシを浸けた場合、PO₄-P、DOC濃度

の上昇が顕著であった。

PO₄-P濃度について、試験開始時と60日後の差は、対照区で0.08 mg/L増、試験区では0.26 mg/L(各地点平均)増であった。両者の差から、ヨシからのPO₄-P溶出量は、0.18 mg/Lであることがわかった。また、DOC溶出量を算出したところ、DOC溶出量は7.8 mg/Lとなった。

したがって、本試験条件におけるヨシ1 gからのPO₄-P、DOCの溶出量は、PO₄-P 溶出量:0.005 mg、DOC溶出量:0.20 mgと算出できた。

中央干陸地におけるヨシの賦存量は1,244トン²⁾であり、水際 2 mにおけるヨシの賦存量はその面積割合から6.75トン繁茂していると算出され、ヨシの枯死による溶出量は、PO₄-P 溶出量:33.8 kg/年、DOC溶出量:1,350 kg/年になると推定される。

ヨシからの溶脱試験結果では、枯死したヨシが調整池の水に浸かると、無機態リンや溶存態有機炭素濃度が上昇することを明らかにした。刈取により枯死したヨシを取り除くことで、ヨシが吸収した栄養塩が調整池内に還元することを防ぐほか、ヨシ原が有機汚濁負荷源になるのを防げると考えられる。

表 4 枯死したヨシからの栄養塩類等溶出試験結果

(mg/L)	調整池水 10 L		調整池水 10 L + ヨシ 40 g									
			採取地点：①		採取地点：②		採取地点：③		採取地点：④		採取地点：遊水地	
	11月	1月	11月	1月	11月	1月	11月	1月	11月	1月	11月	1月
NO ₂ -N	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
NO ₃ -N	<0.02	0.18	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
NH ₄ -N	<0.02	0.03	<0.02	0.09	<0.02	<0.02	<0.02	0.03	<0.02	0.02	<0.02	0.22
PO ₄ -P	0.03	0.11	0.03	0.28	0.03	0.18	0.03	0.23	0.03	0.60	0.03	0.18
DOC	2.5	1.7	2.5	9.4	2.4	6.3	2.5	13	2.6	9.4	2.4	9.4
DO	8.8	8.4	8.7	4.0	8.8	5.5	8.7	5.8	8.7	4.4	8.8	5.1

ま と め

本研究では、調整池への流入負荷削減を目的として秋田県が開発したもみ殻炭を用いたリンの吸着除去効果の検証を行ったところ以下の結果が得られた。

ヨシが生育する土壤環境をみると、水際の地点①が強熱減量や窒素が高く、有機物が豊富な土壤であり、併せて植物体内の窒素やリンの含有量も地点①で最も高い値を示したことから、水際のヨシは窒素、リンをたくさん吸収していたことがわかった。

また、水際のヨシについては、枯れると調整池への負荷源になるものと考えられ、溶脱試験結果から、水際 2 m のヨシの枯死による溶出量は、リン酸態リン 33.8 kg/年、溶存態有機物量(DOC)は 1,350 kg/年と推定された。

ヨシ刈り取りによる栄養塩の持ち出しについては、水際のヨシは刈り取りが困難なことから水際でない場所が現実的である。また、本調査結果から、他植物の共生が目立った地点③は栄養塩の持ち出し量は低かったため、それ以外の地点②、地点④、遊水池において、ヨシの刈り取り回収は適するものと考えられた。

なお、本研究は、九州農政局「平成 27 年度国営干拓環境対策調査水質負荷削減調査検討委託事業」として実施した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、もみ殻炭の提供及び有用な情報を提示いただいた秋田県健康環境センター成田修司主任研究員に厚く御礼申し上げます。また、本研究の趣旨をご理解いただき、研究遂行のご協力をいただいた九州農政局、秋田県の関係各位に深く感謝する。

参 考 文 献

- 1) 平成23年度水質検討委員会資料, 九州農政局, 平成20年3月
- 2) 平成19年度 諫早湾干拓地における循環型次世代農業実証試験による環境と観光への波及効果測定及び基盤整備検討調査報告書, 九州農政局, 平成20年3月
- 3) 戸塚績編著, 小川和雄他, みどりによる環境改善, 第7章, 朝倉書店, 2013.
- 4) 諫早湾干拓の自然干陸地に自生するヨシの生育

特性および無機成分量, 長崎県農林技術開発センター, 2012

- 5) 山本聡子, ミズバショウに対するヨシの刈り取りの効果ーいもり池における実験の報告ー, 新潟応用地質研究会誌, 第 58 号, pp.31-38, 2002.

エアレーション技術(散気)による環境改善効果の検証(2015年度)

田中 良徳、粕谷 智之、山内 康生、山口 仁士

Inspection of the environmental restoration effect by the aeration (2015)

Yoshinori TANAKA, Tomoyuki KASUYA, Yasuo YAMAUCHI, Hitoshi YAMAGUCHI

Key words: Omura Bay, oxygen-deficient water mass, aeration

キーワード: 大村湾、貧酸素水塊、エアレーション

はじめに

大村湾では毎年夏季に底層水の酸素濃度が低くなる貧酸素水塊が発生し、海底付近に生息する魚類の減少、底質からの栄養塩の溶出等による水質の悪化及び有害プランクトンの発生のおそれなど大村湾の水環境に悪影響を与えている。また、湾内に発生した無酸素水塊が沿岸に押し寄せると「青潮」を引き起こし沿岸の漁場に大きな被害をもたらすことが危惧されている。¹⁾

本県では、貧酸素環境の修復を目的として2014年度に貧酸素水塊が発生する時期に海底から空気を送り込むことの効果(散気効果)について現場実験を行い、その結果、上昇流により底層の水塊が成層を乱しながら表層まで達していること、加えて、上昇流の影響範囲周辺では下降流が二次的に発生していることを確認し、下降流が底層のDO濃度を上昇させることが示唆された。²⁾

本年度は、引き続き海底から空気を送り込み、上昇流による影響範囲やその効果を把握し、貧酸素環境改善手法としての実用化への事業展開を図ることを目的に行った。

調査方法

1 散気施設の概要

散気施設は2014年度に実施したもの²⁾と同様とし、散気地点では図2のように散気管を波状に設置し、直径4mm程度の散気孔を19個開けて散気管の先端を密栓したうえで散気を行った。散気孔はSt16を始点としそれぞれの散気孔の間隔を20mになるように配置した。

湾内の成層が強くなる前における散気の影響の把握と散気を一旦停止し成層が再び形成されたときにおける影響の把握の2つを目的に、2015年7月14日から8月10日を第1散気期とし、2015年9月9

日から10月30日までを第2散気期として実施した。

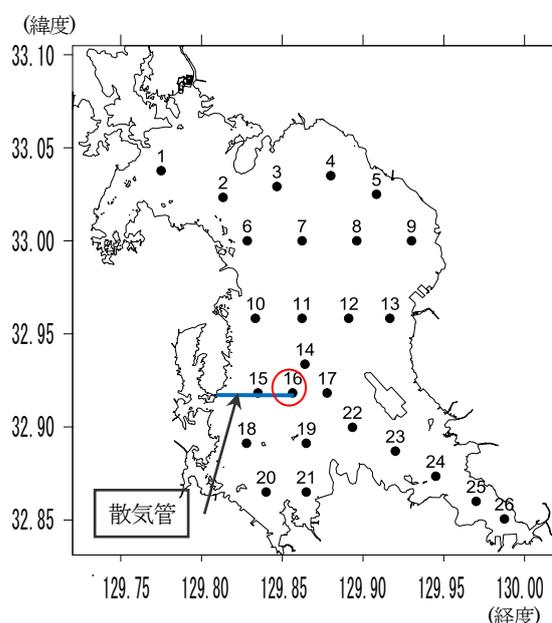


図1 散気管配置図(○は散気地点を示す。)及び全湾観測地点

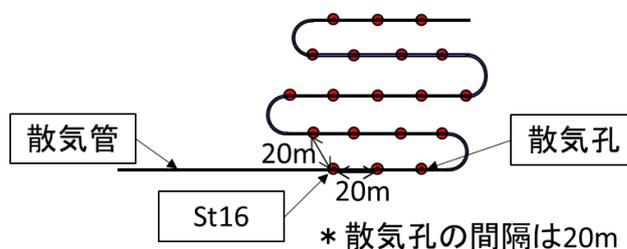


図2 散気地点における散気孔配置平面図

調査内容

1 全湾観測調査

散気実施前後の湾内の水質状況を把握するため、図1に示した大村湾内26地点において多項目水質計（JFE アドバンテック製 AAQ-RINKO (AAQ171)）を用いて水温、溶存酸素（DO）、塩分、密度を測定した。

2 集中観測調査

散気開始前後の水質の変化を詳細に確認するため、散気地点 St16 の東西及び南北に集中観測地点を9か所設け（図3）、多項目水質計を用いて水温、DO、塩分、密度を測定した。

また、集中観測地点には水温、DO及び塩分の連続観測用係留系を設置し観測を行った。

係留系においては、集中観測地点の水深3m、7m、11m、15m、19mに耐圧防水温度計測データロガー（Onset Computer Cooperation 社製 TidbiT v2）を設置した。また、散気地点P及び周辺地点N2の水深12m、14m、16m、18mに溶存酸素計（JFEアドバンテック製 ADOW-CMP）を設置し、水深3m及び19mに塩分計を設置した。データの取得は水温、DO、塩分ともに30分毎とした。

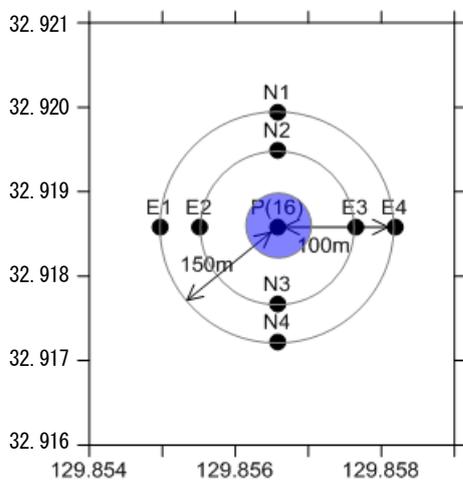


図3 散気地点周辺での集中観測地点

3 プランクトン調査

散気開始前後における湾内のプランクトン組成の変化を確認するため、図1に示す散気地点 St16 の南北4地点(St4、St 11、St 16、St 21)で散気開始前及び散気期間中のプランクトン調査を行った。検体は表層と多項目水質計で調査地点の深度毎のクロロフィル蛍光度を測定し極大値を示した深度（中層）の海水をバンドーン採水器で採取したものをを用いた。

調査日：2015年7月4日、7月10日、

7月24日、8月5日、9月16日

結果及び考察

陸上に設置したコンプレッサーによる散気は2015年7月14日に開始した。当初の計画では、散気地点への送気は2台のコンプレッサーを同時運転させ実施する予定であったが、散気開始の翌日（7/15）にコンプレッサーの1台に不具合が発生したため、期間中の散気は1台で実施した。コンプレッサーは9時間の連続運転後3時間停止するようタイマーで管理を行った。

観測期間中の湾内は、第1散気期では散気開始前は中西部で弱い貧酸素水塊が形成されていたが、散気開始直後に台風11号(7/16)及び台風12号(7/26)に伴う強風により一時的に成層が弱くなった。散気期間の後半の8月上旬になると水温、密度の成層が強くなり、湾中央部から南部にかけて貧酸素水塊が形成された。（図4）

第2散気期では、散気開始前の9月上旬に湾中央部から北東部及び湾奥部に貧酸素水塊が形成されていたが、散気開始直前から散気開始直後の強い北風により湾内の水が混合され表層と底層の水温差が小さくなるとともに貧酸素水塊が縮小した。（図5）

散気地点周辺で実施した集中観測結果では、第1散気期中の7月24日の観測において、散気地点で水温、密度、DOの等値線が上方に盛り上がる傾向がわずかに見られたことから、表層と底層の水温差が小さい時期においては散気地点直上で発生した上昇流により、底層にあった低温の海水が表層へ持ちあげられることが示唆された。また、上昇流の影響範囲は鉛直断面図より散気地点から100m程度と推測され、2014年度と同様の結果であった。²⁾（図6）

第2散気期の散気開始前の9月4日の集中観測結果では、表層と底層の水温差は1~1.5℃程度で、塩分、密度の成層が水深5m付近に見られた。（図7）

集中観測地点付近の水温、DOの連続観測結果では、第1散気期の散気開始直前から散気地点周辺の表層と底層の水温差が小さくなり（図8）、散気開始直後の底層では散気地点Pと散気地点から100m離れた周辺地点N2の水温に差が見られたが、両者のDO飽和度に大きな差は見られなかった。散気開始直前の強い南風及び散気開始直後の強い北風により湾内の水が混合された影響が散気の影響よりも大きく働いたため、散気開始直後は散気の影響が明瞭に

見られなかったものと推測される。湾内の風が弱まり表層と底層の水温差が小さい時期が続いた7月下旬になると、海底上2m(水深18m)において散気地点のDO飽和度が低下したのに対して周辺地点ではDO飽和度が10~30%相対的に上昇したが、海底上4m(水深16m)よりも浅い水深では散気地点と周辺地点のDOに大きな差は見られなかった。26年度の試験では、散気により散気地点直上で発生した上昇流により、底層にあった水塊を上方へ持ち上げる現象が見られ、その影響は表層まで達したが、本年度散気地点及び散気地点周辺のDOが変化する水深の幅が小さくなった原因の一つとして散気地点への送気量が2014年度の半分の量であったことが推測される。

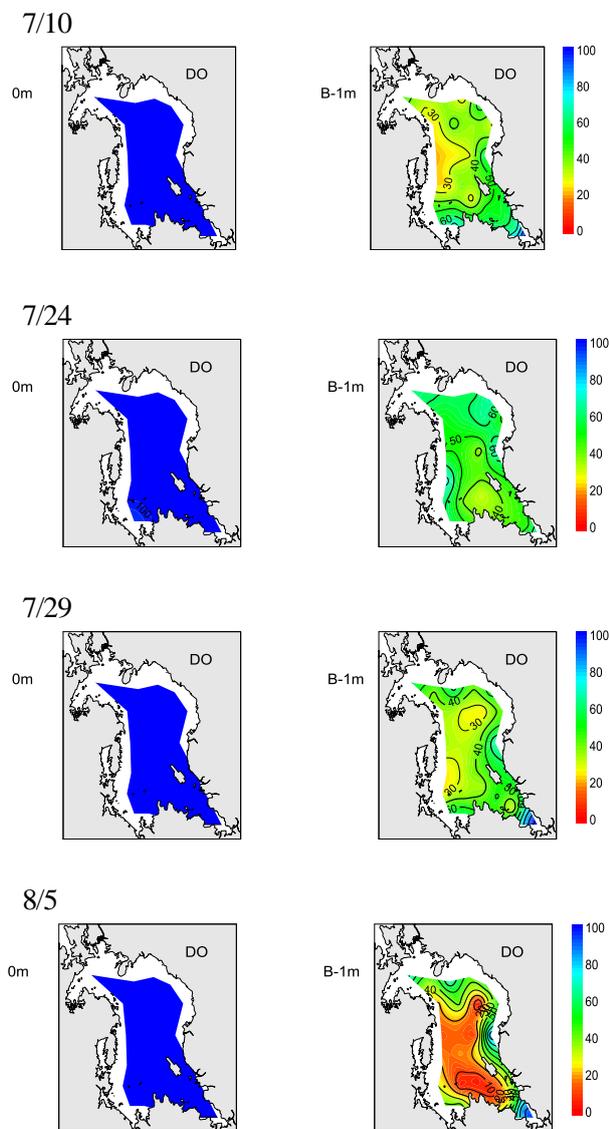


図4 全湾観測 DO (第1散気期)

第2散気期では、散気開始前の表層と底層の水温の差は散気地点P、周辺地点N2ともに0.5℃程度(図9)と第1散気期よりも小さく、散気開始後も表層と底層の水温差はほとんど見られなかった。散気開始後に散気地点Pと周辺地点N2のDO飽和度の差がほとんど見られなかったことから、湾口部から外部の海水が湾内に入り込み、貧酸素水塊が中央部から湾奥部に移動、縮小する時期(鉛直対流期)になると散気の影響を検出することは難しいと思われる。

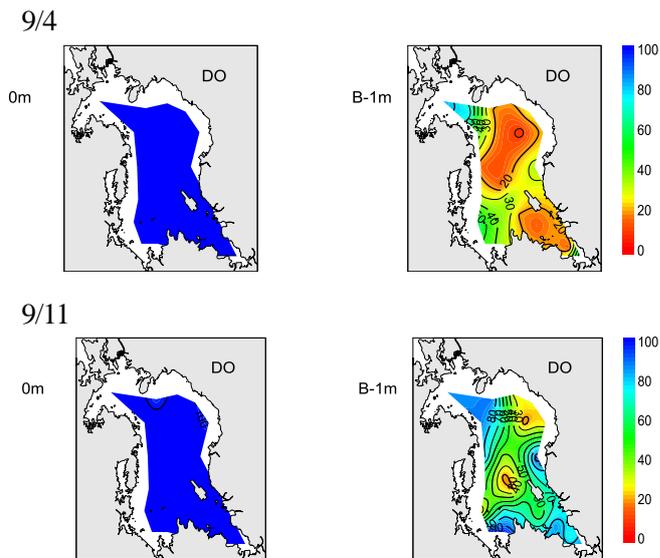


図5 全湾観測 DO (第2散気期)

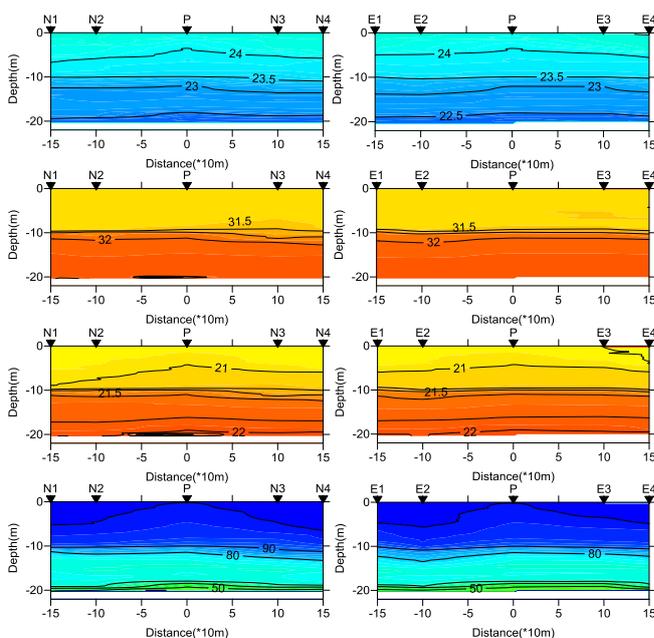


図6 集中観測地点の水温、塩分、密度、DO飽和度の鉛直断面図(7/24、左:南北方向、右:東西方向)

散気開始前後に実施したプランクトン調査では、散気開始後に有害赤潮の原因となる渦鞭毛藻類等は増加しておらず、(図 10) 散気地点と他の調査地点を比較しても地点間の出現種の変化は顕著に見られなかった。

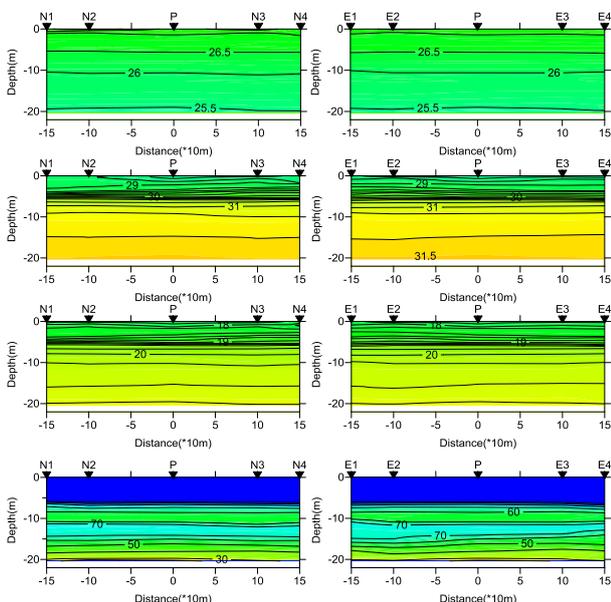


図7 集中観測地点の水温、塩分、密度、DO 飽和度の鉛直断面図 (9/4、左：南北方向、右：東西方向)

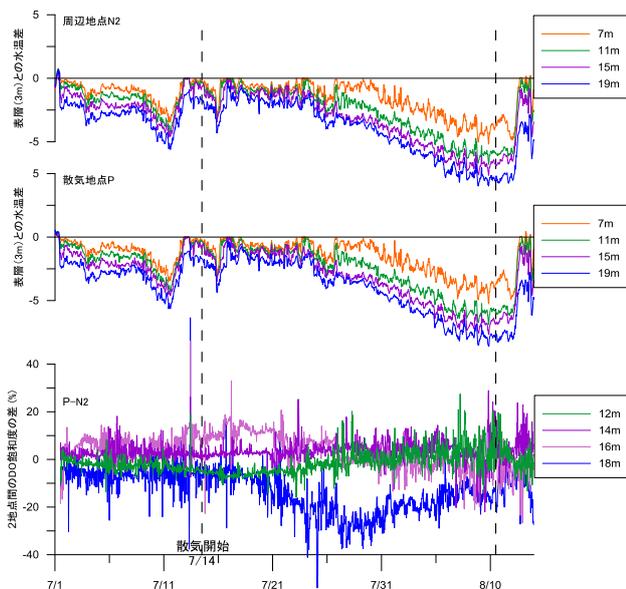


図8 第1散気期における表層3mとの水温差(上段：周辺地点N2、中段：散気地点P)と散気地点と周辺地点のDO飽和度の差(下段)

長崎県水産試験場が掲載している赤潮情報 (<http://www.marinelabo.naga-saki.nagasaki.jp/index.html>) によると、散気実施中に大村湾中央部で赤潮は発生していないことから、散気の実施によって渦鞭毛藻類等の有害プランクトンは増加しないと思われる。

以上のことから今回の散気試験の結果を下記のとおりまとめる。

- 1) 本年度の試験において、散気地点への送気量が2014年度の半分であったため、それによって発生する上昇流も弱かったものと推測される。
- 2) 貧酸素水塊の形成前(7月下旬)には、散気地点周辺の底層で散気に伴う上昇流の影響を受けたと考えられる散気地点と100m離れた周辺地点のDOの変化が認められた。

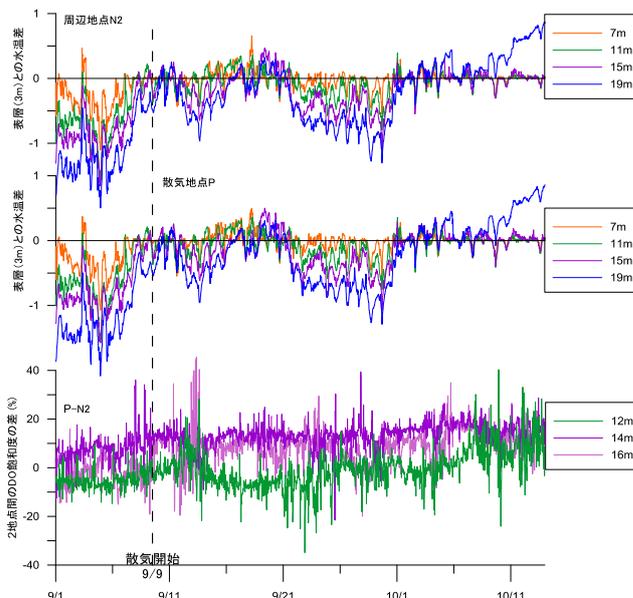


図9 第2散気期における表層3mとの水温差(上段：周辺地点N2、中段：散気地点P)と散気地点と周辺地点のDO飽和度の差(下段)

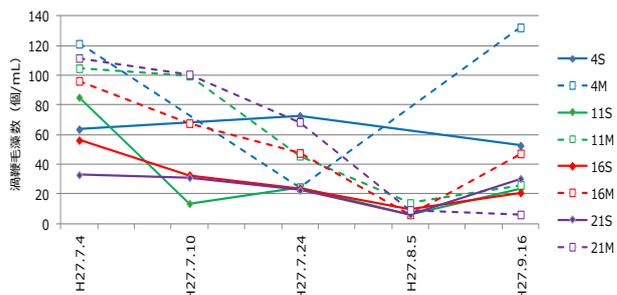


図10 プランクトン調査地点毎の渦鞭毛藻類細胞数

- 3) 水温、塩分の成層が強くなると散気の影響は明瞭でなかった。
- 4) 貧酸素水塊が縮小する時期（鉛直対流期）においては、水温・塩分等の上下差が小さく、散気の影響を検出することが難しい。
- 5) 散気によって有害プランクトンの増加などのプランクトン組成の変化は見られない。

参 考 文 献

- 1) 長崎県: 第 2 期大村湾環境保全・活性化行動計画 (2009 年 3 月)
- 2) 田中良徳 他: エアレーション技術(散気)による環境改善効果の検証(2014 年度), 長崎県環境保健研究センター所報 **60**, 100~104, (2014)

バイオメタノールを活用したバイオディーゼル燃料製造の検討 (その2)

富永 勇太、船越 章裕、古賀 康裕、山内 康生

Examination of promotion the Biodiesel fuel using Biomethanol (2)

Yuta Tominaga, Akihiro Funagoshi, Yasuhiro Koga, Yasuo Yamauchi

Key words: biodiesel fuel, biomethanol, glycerin

キーワード：バイオディーゼル燃料、バイオメタノール、グリセリン

はじめに

バイオディーゼル燃料 (Biodiesel Fuel、以下「BDF」という) とは、菜種油等の植物油、廃食用油を原料として製造されたディーゼル燃料である。植物由来の燃料は、植物の成長過程で光合成により大気中の二酸化炭素を吸収するため、燃焼しても二酸化炭素濃度は増えず (カーボンニュートラル)、化石燃料である軽油等のディーゼル燃料を代替できるのが特徴である。

近年、二酸化炭素排出量の削減を目的として、BDF が注目を集めている。欧米では植物油の新油から製造されているが、我が国では地球温暖化対策だけでなく、循環型社会の形成の観点からも、植物油等の廃食用油を原料として製造し、ディーゼル車などに使用する様々な取り組みが全国各地で行われている。本県においても、2005年度から障がい者授産施設で製造に取り組み始めており、2015年度現在では把握できているところだけでも、14カ所で製造が行われている。

しかし、現在廃食用油から BDF を製造する際に使用するメタノールは一般的に工業用メタノール、つまり化石燃料由来のものであり、これによって製造された BDF は厳密にはカーボンニュートラルとはいえない。これは本県でも同様である。よりカーボンニュートラルな BDF を製造するには、化石燃料由来のメタノールの代わりに、生物体由来のバイオメタノールを使用する必要がある。

県内においては近年、木屑等を無酸素状態で加熱した際に生じる可燃性ガスからメタノールを製造するバイオメタノール製造装置の開発が県内企業において進んでおり、実用化されてい

る。しかし、工業用メタノールの純度が 99.9% であるのに対し、このバイオメタノールの純度は 95% 程度 (残り 5% はほとんど水分) であり、従来の BDF 製造方法では、品質の良い BDF を製造することは難しいと考えられる。

2014 年度にバイオメタノールを用いた BDF 製造試験を実施し、バイオメタノール量と触媒 (KOH) 量を従来の製造時より増やすことで、良好な品質の BDF を製造できることを見出した。今回はその結果を用いて、県内の BDF 製造者にバイオメタノールを使用してもらい、実際の製造スケールでの BDF 製造試験を実施した。また、BDF 製造の際に副生するグリセリンについても、現在産業廃棄物として処理していることから、有効活用の手法を検討した。

材料及び方法

製造試験は、県内の BDF 製造者のうち 1 バッチ 100 L 規模の製造装置を有する 3 者に協力していただき実施した。

バイオメタノールは県内で唯一製造を行っている企業のものを用いた。触媒である水酸化カリウム (KOH) には、協力いただいた BDF 製造者で使用しているものを用いた。原料である廃食用油についても、各 BDF 製造者で回収しているものを使用した。

製造した BDF の品質については、動粘度により簡易的に判断できることがこれまでの分析結果より分かっている²⁾ため、製造後は動粘度を測定した。製造試験がすべて終了した後、ガス

クロマトグラフィーにより、BDFの主成分である脂肪酸メチルエステル（FAME）含有量を測定し、品質を評価した。

分析方法

動粘度の測定は、日本工業規格 JIS K2283「原油及び石油製品—密度試験方法」に基づいて、キャノンフェンスケ粘度計（粘度計番号 75）を用いて測定した。試料を恒温槽で 40℃に保持し、一定量の試料が粘度計の毛細管を流出する時間を測定し、これに粘度計定数を乗じて求めた。

FAME 含有量の測定は、欧州規格 EN14103「Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents」に基づき、ガスクロマトグラフ（株式会社島津製作所、GC-2010Plus、FID）を用いて行った。試料に内部標準物質（I.S.）としてヘプタデカン酸メチルのヘプタン溶液（10 mg/mL）を添加して分析を行った。図 1 に FAME 分析で得られるクロマトグラムの一例を示す。FAME は、炭素数 14 から 24 までの FAME 成分の面積値の合計より求めた。分析条件は次のとおり。

- カラム：BD-EN14103（内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm、Agilent 社製）
- カラム温度：150℃（1 min）→5℃/min→240℃（6 min）
- 注入口温度：250℃、検出器温度：250℃
- キャリアガス：ヘリウム
- 注入量：1 μL

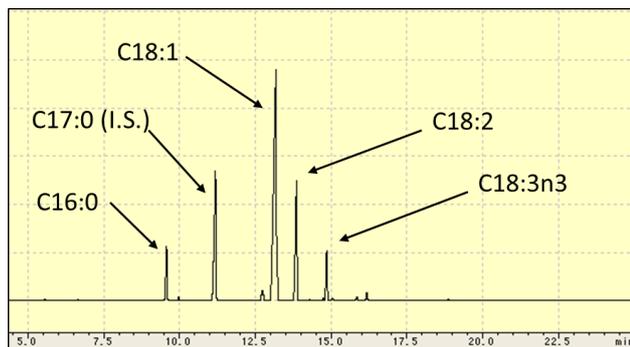


図 1 FAME 分析クロマトグラムの一例

結果及び考察

1 バイオメタノールを用いた BDF 製造試験
 県内 BDF 製造者 3 者に協力いただき、バイオメタノールを用いた BDF 製造試験を実施した。

2014 年度製造試験の結果より、廃食用油量 100 L に対し、バイオメタノール量を 25 L、KOH 量を 1.5 kg を基本として、製造を行った。製造工程については製造者ごとに異なる部分はあるが、大まかなフローは図 2 のとおりである。

以下の表 1 に、製造者ごとの製造試験における製造条件と品質分析結果を示す。A 社、B 社、C 社とも第 1 回目の製造試験は同一の条件で行った。反応工程を 2 段階とし、1 回目の反応でメタノール：KOH=20 L：1.2 kg を投入し、副生したグリセリンを排出したのち、2 回目の反応でメタノール：KOH=5 L：0.3 kg を投入した。A 社では、問題なく BDF を製造でき、その品質も FAME 含有量が 92%と良好であった。一方で B 社と C 社においては、2 回目の反応後にグリセリンが分離せず、その後の洗浄工程で乳化してしまい、BDF が得られなかった。B 社分については、一部分離した BDF を実験室で精製し、参考値として FAME 含有量が 93%であることを確認した。B 社、C 社では原料の廃食用油の酸化度が比較的 low、1 回目の反応工程でほぼ反応が進み切ってしまったため、2 回目の反応工程でグリセリンが分離しなかったのではないかと考えられる。

第 1 回目の製造試験の結果を踏まえ、B 社と C 社において、第 2 回・第 3 回の製造試験を実施した。2 段階反応で BDF がうまく製造できなかったため、反応工程は 1 段階とした。B 社では、第 2 回より第 3 回での反応剤の量を減らしており、いずれも FAME 含有量 90%を超えているものの、反応剤が減ることで BDF の品質も若干落ちることが示唆された。また、B 社の第 3 回目と C 社の第 3 回目を比較すると、製造条件は同じであるが、精製した BDF の品質は C 社

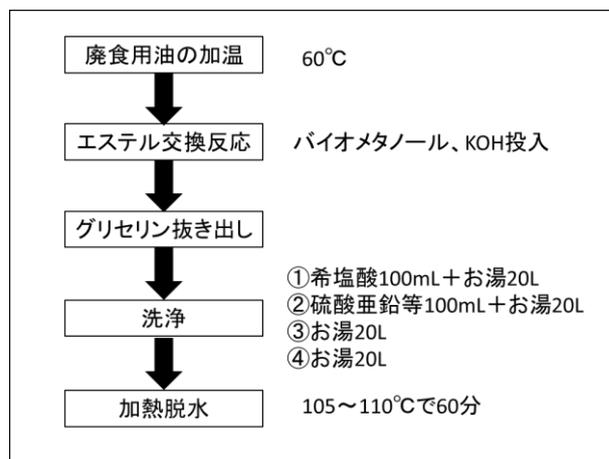


図 2 BDF 製造工程フロー

表1 BDF 製造者ごとの製造条件と品質分析結果

製造条件 (廃食用油量はすべて 100 L)				品質分析結果	
製造者	メタノール量 (L)	KOH 量 (kg)	その他 条件	動粘度 (mm ² /s)	FAME 含有量 (%)
A 社 第 1 回	25	1.5	酸化度 2.5 2 段階反応	4.6	92
B 社 第 1 回	25	1.5	酸化度 2.0 2 段階反応	4.5 (参考)	93 (参考)
B 社 第 2 回	25	1.5	酸化度 2.0 1 段階反応	4.5	92
B 社 第 3 回	20	1.2	酸化度 2.0 1 段階反応	4.7	90
C 社 第 1 回	25	1.5	酸化度 0 2 段階反応	-	-
C 社 第 2 回	20	1.2	酸化度 0 1 段階反応	4.6	93
C 社 第 3 回	20	1.2	酸化度 0 1 段階反応	4.7	92

のほうが良い結果を示した。廃食用油の酸化度が B 社より C 社が低かったため、同じ量の反応剤を加えたときに、より反応が進みやすかったものと考えられる。

今回の BDF 製造試験では、廃食用油 100 L に対して少なくともバイオメタノールを 20 L、KOH を 1.2 kg 加えることで、良好な品質の BDF を製造できたが、より詳細な製造条件の検討には、廃食用油の酸化度を考慮し、加える反応剤の量を変えなければならないことが示唆された。

2 副生グリセリンの利活用検討

(1) 堆肥への混合

BDF 製造時に副生するグリセリンについては、産業廃棄物として処理されているため、利活用手法として堆肥への混合を検討した。

発酵途中の堆肥 10 m³ に、グリセリン 500 L (割合として 5%) 及び 1000 L (割合として 10%) の 2 パターンで混合し、定期的に切返しを行いながら 2 ヶ月間発酵させた。得られた堆肥の窒素全量、りん酸全量について、肥料分析により測定を行った。5% 混合堆肥の窒素全量は 0.79

wt%、りん酸全量は 0.83 wt% であった。また、10% 混合堆肥の窒素全量は 0.84 wt%、りん酸全量は 0.94 wt% であった。今後、加里全量などにより詳細な成分分析を実施する予定である。

(2) グリセリンの発熱量、灰分測定

副生グリセリンをボイラー燃料として使用することを想定し、発熱量と灰分の測定を行った。測定の結果、発熱量は 25780 J/g で、灯油の半分程度であった。また、灰分は 6.1% であった。

3 今後の予定

県内の BDF 製造者にバイオメタノールをさらに使用してもらうため、今回協力いただいた 3 者のほかに 2 者程度バイオメタノールを使用して BDF 製造を行ってもらい、品質確認分析を実施する。

副生グリセリンの利活用については、堆肥への混合割合を 15% として実施し、混合できるグリセリン量の上限を調査する。また、ボイラー燃料などの使用事例についても調査を行う。

謝 辞

バイオメタノールを用いた BDF 製造試験において、協力していただいた（有）アグリサポートの菖蒲氏、エコパーク論所原の本多氏、ウエルカム社瑞穂の稲田氏に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 池上詢：バイオディーゼルハンドブック～地球温暖化の防止と循環型社会の形成に向けて～,日報出版株式会社,(2008)
- 2) 長崎県バイオディーゼル燃料普及促進研究会：長崎県におけるバイオディーゼル燃料の普及促進に向けた手引き,(2012)

バイオディーゼル燃料の品質確認分析結果(2015 年度)

船越 章裕、富永 勇太、山内 康生

Survey Report for the Quality Check of Biodiesel fuel (2015)

Akihiro FUNAGOSHI Yuta TOMINAGA, Yasuo YAMAUCHI

Key words: biodiesel fuel, quality, fatty acid methyl esters

キーワード: バイオディーゼル燃料、品質、脂肪酸メチルエステル

はじめに

廃食用油を原料とするバイオディーゼル燃料(以下、「BDF」という。)の製造は、県内全域で民間企業や団体に積極的に取り組まれており、自家消費や契約販売により、ディーゼルエンジンを有する自動車や重機、農業用機械の燃料として利用、また一部の自治体の公用車で利用されている。

長崎県環境保健研究センターでは、2012 年 3 月に「長崎県におけるバイオディーゼル燃料の普及促進に向けた手引き」¹⁾を発行し、2012 年度には「BDF 地域活用推進事業」²⁾により BDF の普及促進に取り組んできたが、県内で排出される廃食用油のリサイクルはまだ不十分である。

そこで、長崎県では「BDF 利活用推進事業(2015 ~ 2017 年度予定)」を実施し、廃食用油を BDF に再生利用し、利用者へ流れる仕組みづくりを検討している。当センターでは、本事業の一環として、県内で製造された BDF の継続的な活用を促すため、品質確認分析を実施し、製造所に対しての現地指導を行った。

事業内容

1 品質確認分析の実施

概要は以下に示すとおりである。

(1) 対象

県内で発生する廃食用油を主に原料として、BDF を製造している県内の企業、法人、団体、自治体とした。

(2) 回数及び試料数

年 2 回(8 月、1 月)とし、1 対象あたり、原則 1 回につき 2 試料までとした。

分析した試料の数は、第 1 回目は 8 製造所 15 試料、第 2 回目は 6 製造所 12 試料であった。

(3) 試料の受入れ

対象者に案内を送付し、分析を希望する者から試料提供を受け、分析後、結果は通知した。

(4) 分析項目

全国バイオディーゼル燃料利用推進協議会が作成したガイドライン³⁾において、最低限遵守すべき規格項目とされている、動粘度、水分、メタノール、トリグリセリド、遊離グリセリンの 5 項目(協議会モニタリング規格、表 1)と、BDF の主成分である脂肪酸メチルエステル(Fatty Acid Methyl Esters, FAME)を分析した。

これら以外に、当センターで分析可能な項目(密度、酸価、ヨウ素価など)についても分析した。

表 1 協議会モニタリング規格について

項目	設定された理由など
動粘度 (3.5 ~ 5.0mm ² /s)	(意義) 動粘度が高いと、メチルエステル交換反応が不十分である可能性。 (車両への影響) 未反応の原料油脂の残留が、エンジン始動性の悪化、エンジントラブルの原因となる。 (対策) メタノールと十分に反応させる。
水分 (500ppm以下)	(意義) 水分の混入は、BDFの腐食性や加水分解を促す。 (車両への影響) 金属腐食 (対策) 減圧加熱による脱水を十分行う。
メタノール (0.20質量%以下)	(意義) メタノールは金属に対して攻撃性を持つ。 (車両への影響) 金属腐食 (対策) 減圧加熱による脱メタノールを十分行う。
トリグリセリド (0.20質量%以下)	(意義) 原料油脂そのもので、不純物程度の濃度でも噴射ノズル先端や燃焼室内にカーボンデポジットを形成しやすい。 (車両への影響) 出力低下 (対策) 十分にメタノールと反応させる。
遊離グリセリン (0.02質量%以下)	(意義) フィルターの目詰まりや噴射ポンプ内のタイミング制御弁などに付着する。 (車両への影響) 誤作動、エンジンストール (対策) エステルとの分離を十分に行う。

(5) 分析方法

動粘度

JIS K2283「原油及び石油製品-動粘度試験方法及び粘度指数算出方法」に基づいて、キャノン-フェンスケ粘度計(粘度計番号 75)を用いて測定した。試料は恒温槽で 40 に保持し、一定量の試料が粘度計の毛細管を流出する時間を測定し、これに粘度計定数を乗じて動粘度を求めた。

水分

JIS K2275「原油及び石油製品-水分試験方法」に基づいて、カールフィッシャー水分計(京都電子工業株式会社、MKC-501)を用いて、カールフィッシャー式電量滴定法により測定した。

メタノール

EN14110「Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of methanol content」に基づいて、ガスクロマトグラフ(株式会社島津製作所、GC-2010Plus、FID)を用いて行なった。内部標準物質として2-プロパノールを添加した試料を 80 の恒温槽にて保持し、気相部分を、60 で保温したガスタイトシリンジを用いたマニュアル注入により分析した。分析条件は次のとおり。

カラム:BD-EN14110(内径 0.32 mm、長さ 3 0 m、膜厚 1.80 μm、Agilent 社製)
 カラム温度:50 (1 min)→10 /min→130 (0.5 min)
 注入口温度:150 、検出器温度:250
 キャリアガス:ヘリウム
 注入量:500 L(ヘッドスペースガス)

グリセリド類、遊離グリセリン、全グリセリン

EN14105「Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents」に基づいて、ガスクロマトグラフ(株式会社島津製作所、GC-2010Plus、FID)を用いて行なった。試料に 2 種類の内部標準物質、1,2,4-butanetriol、1,2,3-tricaproylglycerol を添加し、N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide(MSTFA)を用いて誘導体化して分析を行った。

全グリセリンは、モノ、ジ、トリグリセリド、遊離グリセリンの結果をグリセリン量に換算して計算した。分析条件は次のとおり。

カラム:BD-ASTMD6584(内径 0.32 mm、長さ 15 m、膜厚 0.10 μm、Agilent 社製)

カラム温度:50 (1 min) 15 /min 180 (0 min)
 7 /min 230 (0 min) 10 /min 370 (10 min)

注入口温度:50 (初期)、検出器温度:380

キャリアガス:ヘリウム、注入量:1 μL

FAME、リノレン酸メチルエステル

EN14103「Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents」に基づいて、ガスクロマトグラフ(株式会社島津製作所、GC-2010Plus、FID)を用いて行なった。試料に内部標準物質としてヘプタデカン酸メチルのヘプタン溶液(10 mg/mL)を添加して分析を行った。FAME は、炭素数 14 から 24 までの FAME 成分の面積値の合計より求めた。リノレン酸メチルは、これら合計値に対する割合より算出した。分析条件は次のとおり。

カラム:BD-EN14103(内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm、Agilent 社製)
 カラム温度:150 (1 min) 5 /min 240 (6 min)
 注入口温度:250 、検出器温度:250
 キャリアガス:ヘリウム、注入量:1 μL

密度

JIS K2249「原油及び石油製品-密度試験方法」に基づいて、浮ひょうを用いて測定した。15 での密度は、測定時の温度での値から JIS K2249 の付表 表 IB(燃料油の温度に対する密度換算表)を用いて換算した。

酸価

JIS K0070「化学製品の酸価、けん化価、エステル価、よう素価、水酸基価及び不けん化物の試験方法」に基づき、中和滴定法で行った。試料 20 g を、2-プロパノールとジエチルエーテルを 1:1 で混合させた溶剤 100 mL に溶解させ、フェノールフタレイン溶液を数滴加えて、0.1 mol/L 水酸化カリウムエタノール溶液で滴定した。

ヨウ素価

JIS K0070「化学製品の酸価、けん化価、エステル価、よう素価、水酸基価及び不けん化物の試験方法」に基づき、ウィイス-シクロヘキサン法で行った。試料 0.3 g をシクロヘキサンで溶解後、ウィイス液 25 mL を 30 分間作用させ、ヨウ化カリウム溶液(100 g/L)20 mL と水 100 mL を加えて、0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定した。

(6) 分析結果及び現地指導

分析結果の評価にあたり、JIS K2390⁴⁾を参考規格とした。協議会モニタリング規格の5項目とFAMEの結果は表2に、その他の項目については表3に、参考規格を満たした試料数を表4に示した。

第1回目の分析では、ジグリセリドやトリグリセリドなどの廃食用油の由来となる成分や反応後の副産物の成分である全グリセリンが参考規格を満たさない検体が多く、水分も全ての検体で参考規格を満たしていなかったが、第2回目の分析では、トリグリセリドと全グリセリンが全ての検体で参考規格を満たし、ジグリセリドは80%以上、水分も60%以上の検体が参考規格を満たしており、品質が改善されていた。

また、第1回目の分析では、動粘度、ヨウ素価がそれぞれ1検体ずつ参考規格を満たしていなかったが、第2回目の分析では、全ての検体で参考規格を満たしていた。

依然として、BDFの主成分であるFAMEの参考規格は満たすことができていないものの、各検体の平均値は第1回目の89.8%から第2回目の91.5%とやや品質が改善されていた。

なお、第1回目の分析結果を受けて、主にトリグリセリドが参考規格外だった製造所には、反応工程の改善策について、現地指導を行ったところ、第2回目の分析結果では、参考規格外の項目が少なくなり、全体的に品質向上したと思われる。

表2 協議会モニタリング項目とFAMEの分析結果

項目	分析結果		参考規格 (JIS K2390)
	第1回	第2回	
FAME量 (質量%)	平均	89.8	91.5
	最大	91.7	93.1
	最小	86.5	89.8
動粘度(40) (mm ² /s)	平均	4.712	4.638
	最大	5.175	4.804
	最小	4.605	4.503
水分 (mg/kg)	平均	878	498
	最大	1208	807
	最小	657	211
メタノール (質量%)	平均	0.01以下	0.01以下
	最大	0.06	0.01以下
	最小	0.01以下	0.01以下
トリグリセリド (質量%)	平均	0.94	0.03
	最大	6.28	0.05
	最小	0.03	0.01
遊離グリセリン (質量%)	平均	0.01以下	0.01以下
	最大	0.01以下	0.01以下
	最小	0.01以下	0.01以下
試料数	15	12	-

表3 その他の項目の分析結果

項目	分析結果		参考規格 (JIS K2390)
	第1回	第2回	
密度 (mm ² /s)	平均	0.8845	0.8841
	最大	0.8875	0.8865
	最小	0.8834	0.8827
酸価 (mgKOH/g)	平均	0.24	0.19
	最大	0.50	0.27
	最小	0.16	0.14
ヨウ素価	平均	109	111
	最大	122	117
	最小	101	104
リノレン酸 メチルエステル (質量%)	平均	6.4	6.4
	最大	7.4	7.6
	最小	5.4	4.9
モノグリセリド (質量%)	平均	0.58	0.45
	最大	0.75	0.75
	最小	0.46	0.25
ジグリセリド (質量%)	平均	0.34	0.15
	最大	1.40	0.27
	最小	0.11	0.06
全グリセリン (質量%)	平均	0.29	0.15
	最大	1.03	0.25
	最小	0.15	0.08
試料数	15	12	-

表4 参考規格を満たした試料数

項目	第1回		第2回	
	参考規格を 満たした試料数	割合 (%)	参考規格を 満たした試料数	割合 (%)
FAME量	0/15	0	0/12	0
動粘度(40)	14/15	93	12/12	100
水分	0/15	0	8/12	67
メタノール	15/15	100	12/12	100
トリグリセリド	7/15	47	12/12	100
遊離グリセリン	15/15	100	12/12	100
密度	15/15	100	12/12	100
酸価	15/15	100	12/12	100
ヨウ素価	14/15	93	12/12	100
リノレン酸メチルエステル	15/15	100	12/12	100
モノグリセリド	15/15	100	12/12	100
ジグリセリド	4/15	27	10/12	83
全グリセリン	8/15	53	12/12	100

まとめ

BDFの品質確認分析では、反応工程の改善を指導したことにより分析結果で改善が見られた。

今後、BDFの利活用推進のため、良質なBDFが製造するためのサポートを行っていく予定である。

参考文献

- 1) 長崎県バイオディーゼル燃料普及促進研究会:長崎県におけるバイオディーゼル燃料の普及促進に

向けた手引き,(2012年3月)

- 2) 東川圭吾,他:バイオディーゼル燃料地域活用推進事業(2012年度),長崎県環境保健研究センター所報,58,102~105,(2012)
- 3) 全国バイオディーゼル燃料利用推進協議会:バイオディーゼル燃料の製造・利用に係るガイドライン(平成25年3月15日修正),(2012)
- 4) 日本工業標準調査会:自動車燃料-混合用脂肪酸メチルエステル(FAME) JIS K2390,(2008)

残留農薬の検査結果 (2015 年度)

吉村 裕紀、中村 心一、山之内 公子

Survey of Pesticide Residues in Agricultural Products (2015)

Hiroki YOSHIMURA, Shinichi NAKAMURA and Kimiko YAMANOUCHI

Key words: Pesticide residues, Simultaneous determination, Agricultural products

キーワード: 残留農薬、一斉分析、農産物

はじめに

長崎県食品衛生監視指導計画に基づき、県内で流通する農産物中の残留農薬検査を実施した。

調査方法

1 試料及び試薬

表 1 に示す 75 試料について検査を行った。

農薬標準溶液は、関東化学製農薬混合標準溶液 48、53、54、58、61、63 及び 70 を使用した。試薬に関しては、超純水及びメタノールは関東化学製の LC/MS 用、試料の前処理に用いたアセトニトリル、アセトン、ヘキサン及びトルエンは関東化学製の残留農薬試験・PCB 試験用(5000 倍濃縮)、その他の試薬は残留農薬分析用又は特級を用いた。検体の前処理における精製には、スペルコ製 ENVI-Carb/LCNH2 (500 mg/500 mg、6 mL)を用いた。ただし、とうもろこしにおいてはこれに加えて、アジレント製 Bond Elut Mega BE-C18(1000 mg、6 mL)を用いた。

2 検査対象農薬

検査対象農薬は、表 2 に示す 200 農薬とした。なお、表中の番号 1 から 170 はガスクロマトグラフタンデム質量分析法(GC/MS/MS)対象、171 から 200 は液体クロマトグラフタンデム質量分析法(LC/MS/MS)対象農薬とした。

3 装置及び測定条件

(1) GC/MS/MS

パリアン・テクノロジー・ジャパン・リミテッド(現ブルカーダルトニクス)製 CP-3800/1200MS を使用した。

(2) LC/MS/MS

LC 部は島津製作所製 LC-10ADvp システム、MS/MS 部はエービーサイエックス製 API2000 を使用した。

4 分析方法

分析方法は、厚生労働省通知¹⁾「GC/MS による農薬等の一斉分析法(農産物)」及び「LC/MS による農薬等の一斉分析法 I (農産物)」に準じて行った。

検査結果

2015 年度における残留農薬検査の結果(表 3)、全 75 検体のうち 20 検体から報告下限値(0.01 ppm)以上の農薬が検出されたが、いずれも残留基準値以下であった。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について(一部改正)”平成 17 年 11 月 29 日、食安発第 1129002 号

表 1 検査対象農産物

区分	農作物名	検体数	区分	農作物名	検体数
県内産	あまなつ	1	県外産	うめ	1
	うめ	1		さつまいも	1
	かき	2		トマト	2
	かぼちゃ	2	輸入品	オレンジ	3
	きゅうり	9		かぼちゃ	2
	さつまいも	3		グレープフルーツ	1
	さといも	1		バナナ	6
	じゃがいも	9	輸入加工品	いんげん	3
	スイートスプリング	1		えだまめ	3
	だいだい	1		さといも	1
	トマト	1		とうもろこし	2
	なす	1		ブロッコリー	2
	にがうり	1		ほうれんそう	1
	にんじん	1			
	はるか	1			
	まくわうり	1			
	みかん	10			
レモン	1				

表 2 検査対象農薬

No.	農薬名	No.	農薬名	No.	農薬名	No.	農薬名
1	EPN	51	シマジン	101	ピンクロゾリン	151	ベンコナゾール
2	XMC	52	ジメタメリン	102	フェナミホス	152	ベンディメタリン
3	アクリナトリン	53	ジメチルピンホス	103	フェナリモル	153	ベンフルラリン
4	アゾコナゾール	54	ジメトエート	104	フェニトロチオン	154	ベンフレセート
5	アジンホスメチル	55	シメトリン	105	フェノキサニル	155	ホサロン
6	アトラジン	56	ジメピペレート	106	フェノチオカルブ	156	ホスファミドン
7	アニコホス	57	シラフルオフェン	107	フェノトリン	157	ホスメット
8	アメトリン	58	スピロキサミン	108	フェンアミドン	158	ホレート
9	イソキサチオン	59	ターバシル	109	フェンシルホチオン	159	マラチオン
10	イソフェンホス	60	ダイアジノン	110	フェントエート	160	マイクロタニル
11	イソフェンホスオキソソ	61	チオベンカルブ	111	フェンハレレート	161	メタラキシル
12	イソプロカルブ	62	チフルザミド	112	フェンブコナゾール	162	メチオカルブ
13	イソプロチオラン	63	テトラクロルピンホス	113	フェンプロパトリン	163	メチダチオン
14	イプロベンホス	64	テニルクロール	114	フェンプロビモルフ	164	メキシクロール
15	ウニコナゾール P	65	テブコナゾール	115	フサライド	165	メトブレン
16	エスプロカルブ	66	テブフェンピラド	116	ブタミホス	166	メトラクロール
17	エタルフルラリン	67	テフルトリン	117	ブピリメート	167	メフェナセツ
18	エチオン	68	デメトン-S-メチル	118	ブプロフェジン	168	メフェンビルジエチル
19	エディフェンホス	69	テルタメリン	119	フラムプロップメチル	169	モノクロトホス
20	エトキサゾール	70	テルブトリン	120	フルアクリピリム	170	レナシル
21	エトフェンプロックス	71	トリアジメノール	121	フルキンコナゾール	171	アゾキシストロビン
22	エトメセート	72	トリアジメホソ	122	フルジオキソニル	172	アラマイト
23	エトプロホス	73	トリアレート	123	フルシトリネート	173	イプロハリカルブ
24	エトリムホス	74	トリシクラゾール	124	フルシラゾール	174	イマザリル
25	オキサジアゾン	75	トリフルラリン	125	フルトラニル	175	エホキシコナゾール
26	オキサジキシル	76	トリフロキシストロビン	126	フルトリアホール	176	オキサジクロメホソ
27	オキシフルオルフェン	77	トルフェンピラド	127	フルバリネート	177	オキシカルボキシソ
28	カルフェントラゾンエチル	78	ナプロパミド	128	フルミオキサジン	178	カルボフラン
29	キナルホス	79	ニトロタルイソプロピル	129	プレチラクロール	179	クロチアエジン
30	キノキシフェン	80	ノルフルラソソ	130	プロシミドン	180	クロマフェノジド
31	キノクラミン	81	バクプロトラゾール	131	プロチオホス	181	クロロクソロン
32	キノメチオナート	82	バラチオン	132	プロバクロー	182	シウロン
33	キントゼソ	83	バラチオンメチル	133	プロバジン	183	シフルフェナミド
34	クレソキシムメチル	84	ハルフェンプロックス	134	プロバニル	184	シメコナゾール
35	クロマソソ	85	ピコリナフェン	135	プロバルギツ	185	ジメモルフ
36	クロルピリホス	86	ピテルタノール	136	プロビコナゾール	186	チアクロプロリド
37	クロルフェンピンホス	87	ピフェノックス	137	プロビザミド	187	チアヘンタゾール
38	クロルブファム	88	ピフェントリン	138	プロヒドロジヤモソ	188	テブフェノジド
39	クロロベンジレート	89	ピペロホス	139	プロフェノホス	189	トリデモルフ
40	シアノホス	90	ピラクロホス	140	プロホキスル	190	ピラクロストロビン
41	ジエトフェンカルブ	91	ピラゾホス	141	プロマシル	191	フェソメディファム
42	ジクロシメツ	92	ピリダフェンチオン	142	プロメトリン	192	フラチオカルブ
43	ジクロフェンチオン	93	ピリダヘン	143	プロモブチド	193	フラメビル
44	ジクロホップメチル	94	ピリフェノックス	144	プロモプロピレート	194	フルリドン
45	ジクロラン	95	ピリプチカルブ	145	プロモホスメチル	195	ヘキシチアゾクス
46	シハロホップブチル	96	ピリプロキシフェン	146	ヘキサコナゾール	196	ホスカリド
47	ジフェナミド	97	ピリミノバツクメチル	147	ヘキサジノン	197	メソニル
48	ジフェノコナゾール	98	ピリミホスメチル	148	ヘナラキシル	198	メタヘンズチアズロン
49	ジフルフェニカン	99	ピリメタニル	149	ヘノキサニル	199	メトキシフェノジド
50	シプロコナゾール	100	ピロキロン	150	ヘルメトリン	200	メバニピリム

表 3 残留農薬検査結果

農産物名	検出数/検体数	区分	検出農薬	検出値	分析値	基準値
				ppm	ppm	ppm
いんげん	1/3	輸入加工品	メソミル	0.19	0	1
うめ	1/2	県外産	クレソキシムメチル	0.14	0	5
			チアクロプリド	0.01	0	5
えだまめ	2/3	輸入加工品	アゾキシストロピン	0.01	0	5
			チアベンダゾール	0.01	0	2
オレンジ	3/3	輸入加工品	メタラキシル	0.01	0.0	0.2
			イマザリル	0.56	0.6	5.0
		輸入品	チアベンダゾール	1.12	1	10
			クロルピリホス	0.07	0	1
		輸入品	イマザリル	5.00	5.0	5.0
			チアベンダゾール	4.12	4	10
		輸入品	イマザリル	2.00	2.0	5.0
			チアベンダゾール	1.26	1	10
かき	1/2	県内産	シラフルオフェン	0.19	0	2
きゅうり	2/9	県内産	プロシミドン	0.02	0	5
		県内産	クロチアニジン	0.01	0	2
グレープフルーツ	1/1	輸入品	クロルピリホス	0.01	0	1
			ピリプロキシフェン	0.02	0.0	0.5
			アゾキシストロピン	0.04	0	10
			イマザリル	0.07	0.1	5.0
			エポキシコナゾール	0.01	0.01	0.01
			チアベンダゾール	1.50	2	10
じゃがいも	1/9	県内産	クロチアニジン	0.01	0.0	0.3
スイートスプリング	1/1	県内産	クロルピリホス	0.01	0	1
			シラフルオフェン	0.03	0	3
			トルフェンピラド	0.01	0	3
			ボスカリド	0.02	0	5
トマト	1/3	県外産	ボスカリド	0.02	0	5
なす	1/1	県内産	アゾキシストロピン	0.32	0	3
			クロチアニジン	0.19	0	1
バナナ	4/6	輸入品	クロルピリホス	0.04	0	3
		輸入品	クロルピリホス	0.02	0	3
		輸入品	クロルピリホス	0.02	0	3
		輸入品	クロルピリホス	0.02	0	3
はるか	1/1	県内産	フェントエート	0.02	0	5
			メチダチオン	0.03	0	5

食品添加物、器具・容器包装等の理化学検査結果(2015年度)

坂本 真樹子、吉村 裕紀、池田 由紀、山之内 公子

Survey Report Food Additives and Apparatuses/Containers and Packages (2015)

Makiko SAKAMOTO, Hiroki YOSHIMURA, Yuki IKEDA and Kimiko YAMANOUCHI

Key words: food additive, prepared meat, acid value, peroxide value, fried noodles, lead, ceramic ware

キーワード: 食品添加物、食肉製品、酸価、過酸化物价、即席めん、鉛、陶磁器

はじめに

2015年度食品・添加物の一斉収去検査において、加熱食肉製品の規格基準試験(亜硝酸根)、即席めん類の規格基準試験(酸価、過酸化物价)および陶磁器製食器の溶出試験(鉛)を行ったので報告する。

調査方法

1 加熱食肉製品の規格基準試験(亜硝酸根)

県内に流通する加熱食品製品のうち、県内産を中心に包装後加熱食肉製品 11 検体および加熱後包装食肉製品 21 検体の計 32 検体を試料とした。

検査は、食品中の亜硝酸ナトリウムについて、亜硝酸イオンとジアゾ化反応によって発色する赤紫色を分光光度計(日本分光株式会社 V-530)を用いて、分光光度法により亜硝酸根として定量した¹⁻³⁾。

2 即席めん類(揚げ麺)の規格基準試験(酸価、過酸化物价)

県内に流通する揚げ麺のうち、県内産を中心に 24 検体を試料とした。

検査は、試料より石油エーテルで抽出した油脂を用いて行った。抽出した油脂を 0.1mol/L 水酸化カリウム溶液で滴定して酸価を、同様に 0.01mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定して過酸化物价を求めた¹⁻³⁾。

3 陶磁器製食器の溶出試験(鉛)

県内に流通する陶磁器製食器のうち、県内産 16 検体を試料とした。

検査は、陶磁器に含まれる鉛(Pb)を4%酢酸溶液で溶出した後、原子吸光分析装置(島津製作所株式会社 AA-6200)を用いて、原子吸光光度法により測定した¹⁻³⁾。

規格基準

1 加熱食肉製品(亜硝酸根)

亜硝酸根としての最大残存量は 0.070 g/kg である。なお、定量下限は 0.0002 g/kg である。

2 揚げ麺(酸価、過酸化物价)

即席めん類の成分規格基準は、含有油脂の酸価が 3 以下、または過酸化物价が 30 以下である。

3 陶磁器製食器(鉛)

陶磁器の深さや容量、用途により異なる(表1)。なお、定量下限は 0.5 µg/mL である。

表1 陶磁器の鉛溶出規格

陶磁器の区分		溶出規格
深さ 2.5 cm 以上	容量 1.1 L 未満	2 µg/mL
	容量 1.1 L 以上 3 L 未満	1 µg/mL
	容量 3 L 以上	0.5 µg/mL
	加熱調理用器具	0.5 µg/mL
深さ 2.5 cm 未満		8 µg/cm ²

検査結果

1 加熱食肉製品の規格基準試験(亜硝酸根)

検査した試料の加熱食肉製品 4 検体から表示のない発色剤(亜硝酸根)が検出された。

2 揚げ麺の規格基準試験(酸価、過酸化物价)

検査した試料は全て規格基準に適合していた。

3 陶磁器製食器の溶出試験(鉛)

検査した試料は全て定量下限未満であり、規格基準に適合していた。

参考文献

- 1) 食品衛生法(昭和22年法律第233号)
- 2) 日本食品衛生協会編: 食品衛生検査指針(理化学編)2015
- 3) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解 2015

畜水産食品中の合成抗菌剤等の検査結果(2015年度)

辻村 和也、浦山 みどり、中村 まき子、田栗 利紹、山之内 公子

Survey Report of Synthetic Antimicrobials in Stock Farm and Marine Products (2015)

Kazunari TSUJIMURA, Midori URAYAMA, Makiko NAKAMURA, Toshitsugu TAGURI
and Kimiko YAMANOUCI

Key words: stock farm and marine products, veterinary products, synthetic antimicrobials, pesticide, liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC-MS/MS), gas chromatography-tandem mass spectrometry(GC-MS/MS)

キーワード: 畜水産食品、動物用医薬品、合成抗菌剤、農薬、高速液体クロマトグラフ - タンデム質量分析装置(LC-MS/MS)、ガスクロマトグラフ - タンデム質量分析装置(GC-MS/MS)

はじめに

2015年度厚生労働省畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査の一環として、県内産の畜水産食品(養殖魚介類、乳、食肉)中の、抗生物質、合成抗菌剤、内寄生虫用剤、農薬の検査を行ったので報告する。

調査方法

1 試料及び試薬

検査に供した試料は、表1に示す。

標準品に関しては、Dr.Ehrenstorfer社製及び和光純薬工業(株)のものを使用した。

試薬に関しては、アセトニトリル及びメタノールは関東化学(株)製のLC/MS用を、抽出に用いたアセトニトリル及びヘキサンは関東化学(株)製の残留農薬用(5000倍濃縮)を使用した。その他は、残留農薬用及び特級品以上のものを使用した。

2 検査項目及び残留基準

検査項目及び残留基準は、表2に示す。

3 検査方法

(1) 抗生物質

1959年12月厚生省告示第370号「食品、添加物等の規格基準」及び1951年12月厚生省令第52号「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」に準じた。

(2) 合成抗菌剤及び内寄生虫用剤

厚生労働省通知試験法 HPLC による動物用医薬

品等の一斉試験法(畜水産物)及び文献4)を参考に、分析法を検討し、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(2007年11月15日付け食安発第1115001号)及び「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(2010年12月24日付け食安発1224第1号)に従い、試験法の妥当性を評価し、標準操作手順書を作成し、その方法を適用した。

(3) 農薬

1987年8月27日付け衛乳第42号厚生省生活衛生局肉肉衛生課長通知「牛肉中の有機塩素化合物の分析法」に準じ、改良を加えた。

4 分析装置

(1) 高速液体クロマトグラフ - タンデム質量分析装置(LC-MS/MS)

アジレントテクノロジー株式会社製 1290Infinity LC/6460を使用した。

(2) ガスクロマトグラフ - タンデム質量分析装置(GC-MS/MS)

パリアン・テクノロジー・ジャパン・リミテッド(現ブルカーダルトニクス)製 CP-3800/300MSを使用した。

検査結果及び考察

養殖魚介類29検体、乳10検体、食肉15検体の検査を行った。結果、抗生物質、合成抗菌剤、内寄生虫

用剤、農薬について基準値を超える検体は無かった。

参 考 文 献

- 1) 衛乳第 42 号厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知「牛肉中の有機塩素化合物の分析法」(1987 年 8 月 27 日)
- 2) 西川徹、他：LC/MS/MS を用いた動物用医薬品の一斉分析法の検討，長崎県衛生公害研究所報，**51**, 18-22, (2005)
- 3) 厚生労働省ホームページ：畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査
- 4) 吉田絵美子、他：加工食品動物用医薬品迅速一斉試験法の検討，食品衛生学会誌，February，59-65, (2011)
- 5) 食安発第 1115001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(2007 年 11 月 15 日)
- 6) 食安発 1224 第 1 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(2010 年 12 月 24 日)

表1 試 料

搬入機関	養 殖 魚 介 類					乳	食 肉		
	ぶり (はまち)	まだい	ひらめ	トラフグ	車エビ		牛肉	豚肉	鶏肉
西彼保健所	1	1				1		3	
県央保健所						8		2	
県南保健所	3	3		1	1				
県北保健所	1	2	1	5	1				
五島保健所		3				1			
上五島保健所	2	1							
対馬保健所	2	1							
諫早食肉衛生検査所							5		
川棚食肉衛生検査所								5	
合 計	9	11	1	6	2	10	5	5	

表2 検査項目及び残留基準 (単位: ppm)

検査項目	養殖魚介類					乳	食肉(脂肪中濃度)		
	ぶり (はまち)	まだい	ひらめ	トラフグ	車比		牛肉	豚肉	鶏肉
(抗生物質)									
テトラサイクリン類	0.2 ^{*1}	0.1 ^{*2}							
スピラマイシン類 ^{*3}	0.2	0.2		0.2		0.2			
ペンシムヘニシリン (合成抗菌剤)						0.004			
スルファメラジン	0.01	0.01							
スルファジミジン	0.01	0.01				0.025			
スルファモノメキシン	0.1	0.1							
スルファジメキシン	0.1	0.1							
スルファキノキサリン	0.01	0.01							
オキソリン酸	0.06	0.06			0.03				
チアソフェニコール (内寄生虫用剤)	0.02	0.02							
チアベンダゾール類 ^{*4} (農薬)						0.10			
DDT ^{*5}							5	5	2
ディルドリン ^{*6}							0.2	0.2	0.2
ヘプタクロル ^{*7}							0.2	0.2	0.2

*1: 魚介類におけるオキシテトラサイクリンのみの値を記載。

検査においてテトラサイクリン、クロルテトラサイクリンに、一律基準(0.01 ppm)を適用した。

*2: オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリンの和

*3: スピラマイシン、ネオスピラマイシンの和

*4: チアベンダゾール、5-ヒドロキシチアベンダゾールの和

*5: 総DDT (o,p'-DDT、o,p'-DDD、o,p'-DDE、p,p'-DDT、p,p'-DDD、p,p'-DDE)

*6: アルドリンを含む

*7: ヘプタクロルイソキサトを含む

*8: 残留基準の設定されていないものは、一律基準を記載

家庭用品中のホルムアルデヒドの検査結果(2015年度)

山之内 公子

Survey Report of Formaldehyde in Domestic Articles (2015)

Kimiko YAMANOUCHI

Key words: formaldehyde, domestic article

キーワード: ホルムアルデヒド、家庭用品

はじめに

例年、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」に基づき県内の各地域において販売されている衣料品等の検査を行なっている。平成 27年度は西彼地区において販売されている衣料品等に含まれるホルムアルデヒドの検査を実施したので報告する。

調査方法

1 検体及び試薬

24 月以内の乳幼児用の衣料品 15 検体及びそれ以外のもの4検体の計 19 検体の検査を行なった(表1)。

ホルムアルデヒド標準品は関東化学株式会社製、アセチルアセトン(2,4-ペンタンジオン)は和光純薬株式会社製のものを使用した。

吸光度計は日本分光株式会社製 V-530 を用いた。

表1 検体一覧

	検体数
24 月以内のもの	15 検体
帽子	2
外衣	2
よだれかけ	4
シーツ	1
まくら	1
くつ下	4
寝衣	1
24 月を超えるもの	4 検体
下着	2
くつ下	1
寝衣	1
合計	19 検体

2 分析方法

試験は、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」に規定する方法に準じて行なった。

身体と接触する部分を細かく切り、24 月以内のものは 2.5 g、それ以外のは 1 g を正確に量りとり、精製水 100 mL を正確に加えて 40 °C で 1 時間抽出を行なった。これをガラスろ過器 G2 によりろ過し、試験溶液とした。

試験溶液 5 mL を正確にとり、アセチルアセトン試薬を 5 mL 加え、40 °C で 30 分加温後、30 分室温にて放置し、波長 412~415nm で吸光度を測定した(A)。同様に試験溶液にアセチルアセトンの代わりに精製水 5 mL を加えた対象サンプルを用意し、吸光度を測定した(Ao)。

検査結果

表1に示した検体について検査したところ、全ての検体は基準値以下であり、ホルムアルデヒドは検出されなかった。

(参考)

家庭用品中のホルムアルデヒド基準値

(1) 繊維製品のうち、おしめ、おしめカバー、よだれ掛け、下着、寝衣、手袋、くつした、中衣、外衣、帽子、寝具であって、出生後 24 月以内の乳幼児用のもの

A - Ao の値が 0.05 以下

又は下式により計算する試料 1 g についてのホルムアルデヒド溶出量が 16 µg 以下でなければならない。

(2) 繊維製品のうち、下着、寝衣、手袋及びくつした(出生後 24 月以内の乳幼児用のものを除く。)、たび並びにかつら、つけまつげ、つけひげ又はくつしたために使用される接着剤

下式により計算する試料 1 g についてのホルムアルデヒド溶出量は 75 µg 以下でなければならない。

ホルムアルデヒド溶出量(µg)

$$= C (\mu\text{g/ml}) \times (A - A_o) / A_s \times 100 \times 1 / \text{試料採取量(g)}$$

C: ホルムアルデヒド標準液の濃度

A_s: ホルムアルデヒド標準液の吸光度

健康食品中の強壯用医薬品の検査結果(2015 年度)

坂本 真樹子、山之内 公子

Survey Report of Drugs Using for Tonic in Health Foods (2015)

Makiko SAKAMOTO and Kimiko YAMANOUCHI

Key words: slimming drug, tonic drug, health foods

キーワード: 強壯用医薬品、健康食品

はじめに

近年、強壯効果を標榜している健康食品に無承認無許可医薬品が含まれている事例が相次いで報告されている¹⁾。このため、これら無承認無許可医薬品による健康被害を未然に防ぐため、2003 年より県内で販売されている「いわゆる健康食品」(以下、健康食品)の医薬品成分検査を実施している。2015 年度の健康食品の検査結果について報告する。

調査方法

1 検体

2015 年度は、長崎県内で店舗販売されている強壯用健康食品 8 種類を検体とした。

2 検査対象物質

強壯用医薬品であるシルデナフィル、ホンデナフィル、タダラフィル、バルデナフィルの 4 種類を検査対象物質とした。

3 試薬

各標準品は 10 mg をメタノールに溶解して 20 mL とし、標準原液とした。さらに各標準原液をアセトニトリル-メタノール(1:1)で希釈して、混合標準溶液を調製した。

前処理及び標準溶液調製に用いたアセトニトリルは関東化学(株)製の残留農薬試験・PCB 試験用を、移動相には LC/MS 用を用いた。その他のメタノールは関東化学(株)製の LC/MS 用、超純水及びギ酸は和光純薬工業(株)製の LC/MS 用を用いた。

4 分析装置及び条件

(1) 高速液体クロマトグラフ

高速液体クロマトグラフにはアジレントテクノロジー(株)製 1290 Infinity LC を使用し、分析カラムは東ソー(株)製 TSK-gel Super ODS (2.0 mm i.d. × 100 mm、粒子径 2

μm)を用いた。カラム温度は 40 とし、移動相には 0.1%ギ酸溶液(A 液)及びアセトニトリル(B 液)を表 1 に示すグラジエント溶離条件で用いた。

また、流速は 0.2 mL/min、試料注入量は 1 μL とした。

表 1 グラジエント溶離条件

Time, min	A 液 %	B 液 %
0-3	90	10
3-10 (Linear)	30	70
10-15	30	70
15-20 (Stepwise)	90	10

(2) 質量分析装置

アジレントテクノロジー(株)製 Agilent 6460 を使用した。イオン化はエレクトロスプレー (ESI) によるポジティブイオン化法により行った。イオンスプレー電圧は 4 kv、イオン源温度は 350 に設定した。

検査対象物質は表 2 に示す条件で MRM モードによる同時分析を行った。

5 分析方法

(1) 分析試料の前処理

錠剤は乳鉢で粉末にし、カプセル剤はミル及び乳鉢で粉碎した。粉末 200 mg を採取し、アセトニトリル-メタノール(1:1) 10 mL を加えて 1 分間攪拌した後、10 分間超音波抽出した。これを 3000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清 5 mL を分取し、アセトニトリル-メタノール(1:1)で 10 mL にメスアップした。さらに 20 倍希釈したものを 0.2 μm のフィルターパイアルでろ過して試験溶液とした。

液剤は、その 5 mL を分取し、アセトニトリル-メタノール(1:1) 15 mL を加えて 1 分間攪拌した後、10 分間超音波抽出した。これを 3000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清 1 mL を分取し、アセトニトリル-メタノール

(1:1)で 20 mL にメスアップした。この溶液を 0.2 μm のフィルターバイアルでろ過し、試験溶液とした。

検査結果

今回調査した健康食品からは検査対象医薬品は検出されなかった(表 3)。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局監視指導課・麻薬対策課報道発表資料:平成 23 年度無承認無許可医薬品等買上調査の結果について, 2012 年 6 月 22 日

表 2 各医薬品の ESI-MS/MS パラメーター

医薬品及び医薬品類似物質	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Declustering Potential (V)	Collision Energy (V)
バルデナフィル	489.2	151.1	210	55
ホンデナフィル	467.3	111.1	170	33
シルデナフィル	475.2	58.1	170	45
タダラフィル	390.2	268.1	130	9

表 3 健康食品検査結果(2015)

検査項目	検出数/検体数	備考
シルデナフィル	0/8	錠剤 カプセル剤 液剤 3 検体 3 検体 2 検体
バルデナフィル	0/8	
ホンデナフィル	0/8	
タダラフィル	0/8	

食品中のアレルギー物質検査結果(2015年度)

池田 由紀、辻村 和也、山之内 公子

Survey Report of Allergic Substance in Food (2015)

Yuki IKEDA, Kazunari TSUJIMURA and Kimiko YAMANOUCI

Key words: allergic substance, shrimp, Crab, ELISA method, PCR method

キーワード: アレルギー物質(特定原材料)、えび・かに、酵素免疫測定法、ポリメラーゼ連鎖反応

はじめに

アレルギー物質を含有する食品は、食物アレルギーによる健康被害を防止する目的で、2001年4月に特定原材料の表示が義務づけられ、2002年4月から本格的に施行された。特定原材料の検査法については、2002年11月の厚生労働省通知により、定量検査法(ELISA法)および確認検査法(PCR法・ウエスタンブロット法)が定められた¹⁾。

当センターでは、2007年度から本格的に特定原材料の検査を開始しており、2007~2014年度の検査結果については既に報告している。2015年度は、「えび・かに」の検査を行ったので報告する。

調査方法

1 試料

県内に流通する加工食品のうち、「えび・かに」の使用、または混入が疑われるもので、使用原材料表示に「えび・かに」が記載されていないもの36検体とした(西彼保健所・県央保健所・県南保健所・県北保健所・五島保健所・上五島保健所・壱岐保健所・対馬保健所収去分)。

2 試薬

1) 定量検査法(ELISA法)

日水製薬社製FAテストEIA-甲殻類「ニッスイ」(以下、N社キット)およびマルハニチロ社製甲殻類キット「マルハニチロ」(以下、M社キット)を使用した。

2) 確認検査法(PCR法)

DNA抽出には、シリカゲル膜タイプキット法を用い、QIAGEN社製DNeasy Plant mini kitを使用した。

植物DNA検出用プライマー対、えび検出用プライマー対、かに検出用プライマー対及び甲殻類検出用

コントロールプラスミドは(株)ファスマック社製、PCR緩衝液、dNTP、MgCl₂、TaqポリメラーゼはApplied Biosystems社製を使用した。電気泳動用時に使用する100bp DNA Ladder、Loading bufferは東洋紡績(株)製、エチジウムブロマイドはInvitrogen社製、アガロースはタカラバイオ(株)製、TE緩衝液、TAE緩衝液は(株)日本ジーン製を使用した。

3 機器

フードカッター:Retsch社製GM200, 恒温振とう機:東京理科学器機(株)製MMS-3011, 冷却遠心機:クボタ商事(株)製3740, マイクロプレートリーダー: BIO-RAD社製Benchmark Plus, 分光光度計:GEヘルスケアジャパン(株)製GeneQuant1300, サーマルサイクラー:Applied Biosystems社製2720, 電気泳動装置:(株)アドバンス製Mupid-2 plus, トランスイルミネーター:VILBER LOURMAT社製ECX 15M, ゲル撮影装置:アムズシステムサイエンス製Limited STAGE

4 検査方法

ELISA法、PCR法ともに2014年3月26日消食表第36号消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査法について」の一部改正について²⁾に準じて検査を行った。

規格基準

特定原材料等由来のタンパク質含量が、10 µg/g未満でなければならない。

検査結果

ELISA法による定量検査の結果、2検体で「えび・

かに」の混入が疑われた(表 1)。2 検体について PCR 法による確認検査を行った結果、2 検体ともえび由来の DNA が検出された。

今回の検査で2検体のえび表示違反(疑)製品が市場に出回っていることが明らかとなった。今後も表示違反食品の排除および表示適正化を行う目的で、県内に流通する食品中のアレルギー物質(特定原材料)の検査が必要と考えられる。

参 考 文 献

- 1)厚生労働省通知食案基発第 0513003 号:アレルギー物質を含む食品の検査法について, 2002 年 11 月 6 日
- 2)消費者庁次長通知消食表第 36 号:「アレルギー物質を含む食品の検査法について」の一部改正について, 2014 年 3 月 26 日

表1. えび・かに由来タンパク質が検出された検体の検査結果

検体	えび・かに表示	定量検査 (ELISA法)		確認検査 (PCR法)	
		N社キット	M社キット	えび	かに
あげだし(魚肉ねり製品)	なし	陰性	12 µg/g	陽性	陰性
いか天(魚肉ねり製品)	なし	陰性	11 µg/g	陽性	陰性

危険ドラッグの検査結果(2015年度)

辻村 和也、山之内 公子

Survey Report of Illegal Drugs (2015)

Kazunari TSUJIMURA and Kimiko YAMANOUCHI

Key words: illegal drug, LC-MS, GC-MS

キーワード:危険ドラッグ、指定薬物

はじめに

近年、危険ドラッグの乱用による事件事故が大きな社会問題となっている。危険ドラッグ中の成分は主に指定薬物として規制される成分であり、その危険性は麻薬や覚醒剤をしのぐものもある。現在 2,000 成分を超える化学物質が指定薬物とされている。国は、包括指定制度導入、認定手続きの簡素化、単純所持禁止等の対応を行い、規制の強化及び迅速化に取り組んでいる。

長崎県でも 2014 年度より危険ドラッグの買上検査を開始した。本年度は、指定薬物成分の混入の可能性がある電子タバコ製品について検査を実施した。その結果について報告する。

調査方法

1 検体

県内雑貨量販店より、指定薬物成分の混入の可能性がある物品として電子タバコキッド 10 製品を試買した。

2 前処理

電子タバコキッド 25 mg をマイクロチューブに量り取り、メタノール 1 mL を加え、ボルテックス攪拌 30 秒及び 10 分間超音波照射による抽出後、遠心式フィルターユニット(メルクミリア)でろ過した。ろ液をメタノールで 10 倍に希釈し、試験溶液とした。必要に応じ、適宜メタノールで希釈した。

3 分析装置

(1) ガスクロマトグラフ - 質量分析装置(GC-MS)

アジレントテクノロジー株式会社製 7890A/5975C GC/MSD を使用した。

(2) 高速液体クロマトグラフ - 四重極飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF/MS-DAD)

ウォーターズ株式会社製 Waters ACQUITY UPLC

I-CLASS / Xevo G2-XS QToF を使用した。

4 分析条件

指定薬物の GC/MS 及び LC/MS 分析条件は、「指定薬物の分析法について」(2007 年 5 月 21 日付け薬食監麻発第 0521002 号監視指導・麻薬対策課通知)に準じて行った。GC-MS 条件(表1)及び LC-MS 条件(表 2)に示す。

5 スクリーニング検査

GC/MS スキャン分析で取得したデータを対象に、AMDIS プログラム(NIST)を用い、Deconvolution 処理を行った。処理されたピークについて、当センターで作成した「指定薬物 GC/MS ライブラリー」、国衛研「違法ドラッグ閲覧データシステム」、「SWGDRUG Mass Spectral Library」及び「Cayman Spectral Library」を用い、各検体に含まれる指定薬物及び類似体のスクリーニングを行った。

LC-QTOF/MS スキャン分析では、取得したデータを対象に当センターで作成した「指定薬物の精密質量数データベース」による検索を行った。

検査結果

2015 年度危険ドラッグの検査において、医薬品医療機器等法第 2 条第 14 項に規定する指定薬物を含有する製品は確認されなかった。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知:指定薬物の分析法について。2007年5月21日, 薬食監麻発 0521002号(2007)
- 2) 野澤真里奈他; 違法ドラッグ試買検査の実施について (2011), 京都府保環研年報, 57, 56~63 (2012)
- 3) 高橋市長、他; 千葉県における違法ドラッグ試験検査について(平成 21 年度), 千葉県衛生研究所年報, 58, 51~54 (2009)

- 4) 武田章弘、他; 平成 23・24 年度の違法ドラッグ買上調査について。大阪府立公衛研所報, 51, 23~27 (2013)

表 1 GC-MS 分析条件

<p>【条件1】 カラム: HP-1MS (30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 mm, Agilent 製) キャリアーガス: He, 0.7 mL/min (リテンションタイムロッキング: MDPPP: 27.8 min) 注入口温度: 200、スプリットレス 検出器温度: 280 イオン化法: EI カラム温度: 80 (1 min)-5 /min-190 (15 min)-10 /min -310 (10 min) スキャン: m/z: 40-550</p>	<p>【条件2】(合成カンナビノイド用) カラム: HP-1MS (30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 mm, Agilent 製) キャリアーガス: He, 1.1 mL/min (リテンションタイムロッキング: MDPPP: 4.96 min) 注入口温度: 250、スプリットレス 検出器温度: 280 イオン化法: EI カラム温度: 200 (1 min)-5 /min-310 (7 min) スキャン: m/z: 40-550</p>
--	---

表 2 LC-MS 分析条件

<p>【条件1】 カラム: Atlantis T3 (2.1×150 mm, 5 μm, Waters 製) 移動相 A: 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH3.0) 移動相 B: アセトニトリル グラジエント条件: A(%) / B(%) = 90/10(0 min)-80/20(50 min) -30/70(60 min, 15 min Fold) 流速: 0.3 mL カラム温度: 約 40 イオン化法: ESI DAD スキャン範囲: 210-450 nm MS スキャン: m/z 40-550</p>	<p>【条件2】 カラム: XBridge (2.1×150 mm, 3.5 μm, Waters 製) 移動相 A: 0.1%ギ酸 移動相 B: 0.1%ギ酸アセトニトリル/メタノール (60/40) グラジエント条件: A(%) / B(%) = 50/50(0 min)-10/90(30 min, 5 min Fold) 流速: 0.3 mL カラム温度: 約 40 イオン化法: ESI DAD スキャン範囲: 210-450 nm MS スキャン: m/z 40-550</p>
---	---

感染症サーベイランスにおけるウイルス感染症 (2015)

松本 文昭、三浦 佳奈、吉川 亮、田栗 利紹

Annual Surveillance Report of Viral Infectious Diseases (2015)

Fumiaki MATSUMOTO, Kana MIURA, Akira YOSHIKAWA and Toshitsugu TAGURI

Key word : Surveillance, SFTS, Japanese spotted fever, Adenovirus

キーワード : サーベイランス、重症熱性血小板減少症候群、日本紅斑熱、アデノウイルス

はじめに

感染症サーベイランス(発生動向調査)は、1999年4月1日施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」、いわゆる「感染症法」に基づき、県内の患者発生状況、病原体の検索等感染症に関する情報をITの活用により早期かつ的確に把握し、その情報を速やかに地域に還元(情報提供・公開)することにより、医療機関における適切な初期診断を推進することを旨とする。さらに、予防接種、集団生活の管理、衛生教育など、適切な予防措置を講じ、多様な感染症の発生及びまん延の未然防止、有効かつ確かな感染症対策の確立に役立てることを目的としている。¹⁻³⁾

当センターにおいても、「長崎県感染症発生動向調査実施要綱」等に基づき、県内の医療機関からウイルス性の感染症が疑われた患者の検体が適宜採取、搬入されている。

そこで、今年度搬入された検体について、ウイルス分離及びウイルス遺伝子の検索等を試みたので、その概要について報告する。

調査方法

1 検査材料

政令市(長崎市、佐世保市)及び県立保健所管轄の10地域において、長崎県感染症発生動向調査事業実施要綱に基づき選定された基幹定点医療機関及び病原体定点医療機関または協力医療機関等から採取された検体(咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい

液、糞便(直腸ぬぐい液)、髄液、血液、血清、尿、その他)について、医療機関の最寄りの管轄保健所を通じて搬入された検体を検査材料とした。検査のために搬入された検査材料の内訳は、患者201名より採取された咽頭ぬぐい液47件、鼻腔ぬぐい液64件、糞便51件、髄液9件、血液15件、血清82件、尿5件、その他14件で総数287件であった。

2 検査方法

基本的に、検体の前処理、細胞培養、ウイルス分離・同定・検出等については、既報¹⁻³⁾及び病原体検出マニュアル⁴⁾に準じて実施した。

重症熱性血小板減少症候群(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome : SFTS)については、2013年3月13日付SFTSウイルス検査マニュアル⁷⁾に準じて遺伝子検出を行い、SFTSウイルス陽性と判定された場合には、確定診断のため感染研へ検体を送付した。リケッチア感染症については、病原体検出マニュアルに準じた遺伝子検査を当センターで実施し、抗体検査については、感染研へ検査を依頼した。

エンテロウイルスの感染を疑う疾患については、Nixら⁸⁾⁻⁹⁾の方法によるエンテロウイルス属(Enteroviruses : EVs)を網羅的に検出するPCR(Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer : CODEHOP VP1 RT-snPCR)を実施した後、増幅が認められたものについて、増幅産物の塩基配列を決定し、病原体検出マニュアルに基づき型別同定等を行なった。

表 1 . 疾病別の被検者数及び検体件数内訳

疾病名	検査材料（内訳）									
	被検者数 （人）	検体数 （件）	咽頭 ぬぐい液	鼻腔 ぬぐい液	糞便	髄液	血液	血清	尿	その他
インフルエンザ様疾患	75	76	12	64						
麻しん	5	17	4				4	5	4	
風しん	2	4	1				1	2		
デング熱	2	3						3		
日本脳炎	1	2				1		1		
SFTS	6	6						6		
リケッチア感染症	34	75					6	57		12
無菌性髄膜炎（急性脳炎等含む）	11	34	7		8	8	4	6	1	
手足口病	20	20	14		5			1		
ヘルパンギーナ	3	3	3							
発疹症	3	6	3		3					
感染性胃腸炎	35	36	1		35					
流行性角結膜炎	2	2								2
その他	2	2	2							
計	201	286	47	64	51	9	15	81	5	14

デング熱については、デングウイルス感染症診断マニュアル¹⁰⁾に準じて遺伝子検出を行い、感染研より配布された NSI 抗原検出キットを用いて抗原検査を実施した。流行性角結膜炎については、咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査、診断マニュアル¹¹⁾に準じて遺伝子検出を行った。感染性胃腸炎については、ノロウイルス検出マニュアル、ロタウイルスの検出法¹²⁾に準じて遺伝子検出を行った。

調査結果及び考察

表 1 に疾病別の被検者数及び検体件数の内訳を示す。

1 インフルエンザ様疾患

検査した患者 201 名のうちで、最多疾病はインフルエンザ様疾患の 75 名（76 検体）であった。PCR により陽性と判定した結果の内訳は、A/H1pdm09 型が 39 検体（51%）と半数以上を占め、B 型が 24 検体（31%）、A/香港型（H3N2）が 3 検体（4%）、A/H1pdm09 型と B 型の混合が 1 検体（1%）と続き、残る 10 件（13%）からはインフルエンザウイルスの遺伝子は検出されなかった。全国的に A/香港型が流行の主流となった 2014 年とは異なり、2015 年は A/H1pdm09 型が主要な流行型であった。

年度当初（2014/2015 シーズン後半）は、A/H1pdm09 型と B 型が混在して検出されたが、2015/2016 シーズンに入ってから、A/H1pdm09 型が大勢を占めた。長崎県における今シーズンのインフルエンザの流行は、全国的な傾向と同じく、2015 年第 52 週（12/21~27）から急激に報告数が増加し、2016 年第 1 週（1/4~10）には国の流行入りの目安となる定点あたり 1.00 人を超えた。これ以降も報告数は増加し続け、第 6 週（2/8~14）にはピーク（定点あたり報告数 47.6 人、患者報告数 3,235 人）を迎えた。流行の始まりとその推移は全国と同様の経過をたどった（図 1）。

2 麻しん

麻しんを疑う検体が 5 名分 17 検体（咽頭ぬぐい液、血液、血清、尿）搬入され、ウイルス遺伝子の検出を試みたが、いずれの検体からも麻しんウイルスの遺伝子は検出されなかった。

2013 年 4 月に一部改正された「麻しんに関する特定感染症予防指針」の中で、2015 年度までの麻しん排除を目標に掲げ、取り組みが進められてきたところであるが、2015 年 3 月 27 日に、日本を含む 3 カ国が新たに麻しんの排除状態にあることが認定された。今後も排除状態を維持するため、予

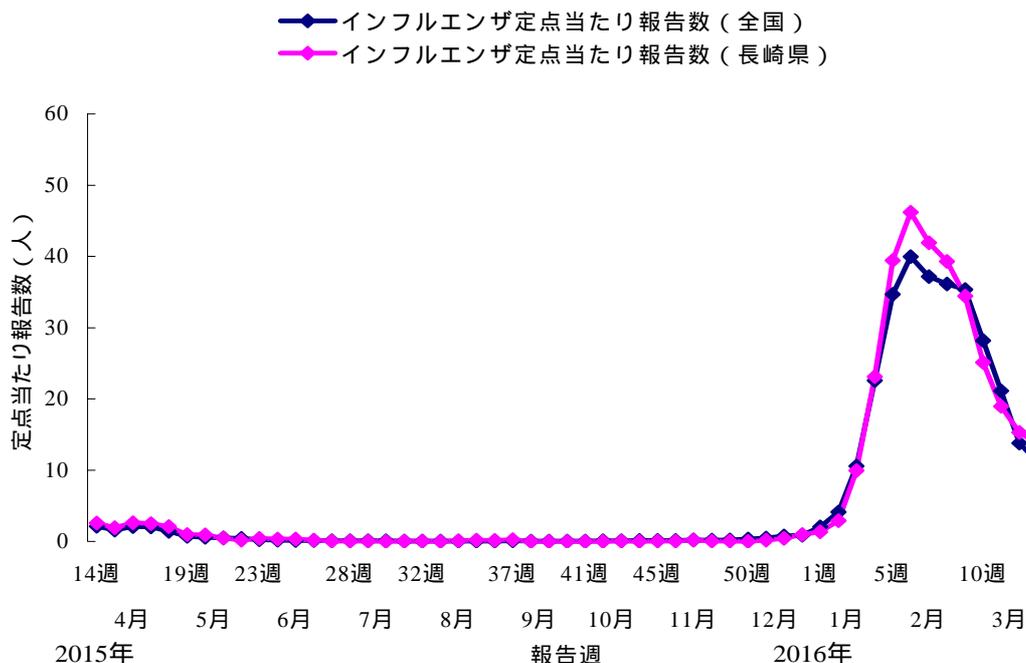


図 1 . インフルエンザの定点当たり報告数の推移 (2015 年度)

防指針に基づき、原則として麻しん疑い全例に遺伝子検査が求められていることから、精度の高い検査体制の維持が求められている。

3 風しん

風しんを疑う検体が 2 名分 4 検体 (咽頭ぬぐい液、血清) 搬入され、風しんウイルス遺伝子の検出を試みた。いずれの検体からも風しんウイルスの遺伝子は検出されなかった。

2014 年 4 月 1 日付で「風しんに関する特定感染症予防指針」が策定され、2020 年度までに風しんを国内から排除することが目標として掲げられた。これを受け、本県においても 2015 年 2 月 16 日に新たに「長崎県麻しん風しん検査診断実施要領」が定められ、原則として麻しんまたは風しんと診断された全症例に対して遺伝子検査を実施することとしている。麻しんと同様に精度の高い検査体制の維持が求められている。

4 デング熱

デング熱を疑う検体が 2 名分 3 検体 (血清) 搬入され、デングウイルスの遺伝子検出を試みた。その結果、1 名分 1 検体からデングウイルス 2 型の遺伝子を検出した。デングウイルス NS1 抗原はいずれの検体からも検出されなかった。患者は 10 代の外国人男性で、観光で来日した際、飛行機内で発熱し解熱剤服用するも症状治まらないため病院を受診

した。病院における検査では NS1 抗原、IgM 抗体ともに陰性であったが、当センターへデングウイルス遺伝子検査の行政依頼があった。

デング熱、デング出血熱は、有効な抗ウイルス薬はなく対症療法が基本となる。予防のためのワクチンは未だ実用化されていないため、ウイルスを媒介するヒトスジシマカとの接触を避け、刺されないようにすることが重要である。

5 日本脳炎

日本脳炎を疑う検体が、1 名分 2 検体 (血清、髄液) 搬入され、日本脳炎ウイルスの遺伝子検出を試みた。その結果、いずれの検体からも日本脳炎ウイルスの遺伝子は検出されなかった。

本県においては、2011 年に 2 例、2013 年に 1 例の発生報告があっている。患者発生数は少ないものの発症した場合の症状が重篤であるため、ウイルスを媒介する蚊が活発になる夏季は蚊に刺されないよう注意することが必要である。

6 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)

SFTS を疑われた患者 6 名分 6 検体 (血清) が搬入された。SFTS ウイルス検出マニュアルに準じて検査を実施した結果、患者 2 名の検体から SFTS ウイルスの遺伝子が検出された。

1 例目の患者は、70 歳代の女性で、ダニの刺し口があり、頭痛、発熱、下痢、関節痛、筋肉痛、

頸部リンパ節腫脹、肝機能障害、腎機能障害および中枢神経症状を呈していた。第 7 病日に採取された血清 1 検体が搬入され、SFTS ウイルス遺伝子が検出された。感染研における確認検査でも SFTS ウイルスの遺伝子が検出された。続く 2 例目の患者は、80 歳代の男性で、ダニの刺し口は無かったものの、38 度以上の発熱があり医療機関を受診した。血液検査の結果白血球および血小板の減少が確認されたため、当センターへ行政検査依頼があった。第 4 病日に採取された血清 1 検体が搬入され、SFTS ウイルス遺伝子が検出された。感染研における確認検査でも SFTS ウイルスの遺伝子が検出された。

現段階では本疾患に対する確立された治療法はなく、対症療法のみであることから、野外の藪や草むらに生息するマダニ類に咬まれないよう感染予防を心がけることが重要である。

7 リケッチア感染症

つつが虫病及び日本紅斑熱を疑う検体が 34 名分 75 検体（血液、急性期及び回復期のペア血清、その他（痂皮、生検材料等））搬入され、それらに対して、抗体価測定または遺伝子検査或いはその両方を実施した。なお、疑い患者のうち 18 名は、抗体検査及び遺伝子検査両方の依頼であった。抗体価測定については、間接蛍光抗体法により日本紅斑熱（*Rickettsia japonica* 以下、*R.j.*）及び、つつが虫病（*Orientia tsutsugamushi* 以下、*O.t.*）に対する抗体価測定を実施した。25 名分 49 検体について検査を行った結果、8 名から *R.j.* に対する抗体を、1 名から *O.t.* に対する抗体を検出した。16 名は、*R.j.* *O.t.* ともに陰性であった。

急性期検体を対象とした遺伝子検査について、27 名分 41 検体の急性期血清（血清 15 検体は抗体検査と併せて実施）急性期血液または刺し口の痂皮等を用いて実施したところ、痂皮提供者 10 名中 6 名の検体から *R.j.* の遺伝子を検出した。急性期血清、血液検体からは、*R.j.* *O.t.* 遺伝子ともに検出されなかった。

最終的に検査結果が陽性となった内訳は、依頼された 34 名のうち 12 名であり、そのうち 3 名は、抗体検査・遺伝子検査ともに陽性であった。

急性期検体を用いた遺伝子検査においては、刺し口の痂皮>紅斑部生検>急性期血液(抗生物質投与前)の順に検出率が高いとされている¹³⁾。ペア血清

による抗体価測定は、最も確実な検査法であるが、発症から結果判明までに 1 ヶ月ほど時間がかかる。それに対して、遺伝子検査は、抗体価測定より迅速な結果提供が可能となるため、適切な検体の採取に関する情報を臨床の現場に周知することで、より効率的な検査対応が可能となる。

8 無菌性髄膜炎（急性脳炎等を含む）

無菌性髄膜炎や急性脳炎等と診断された患者検体が、11 名分 34 検体（糞便、咽頭ぬぐい液、髄液、血清、尿）搬入された。

搬入された検体に対し、CODEHOP VP1 RT- sn PCR による EVs の遺伝子検索を実施した。その結果、6 名の検体から EVs の遺伝子を検出し、解析の結果 3 名はエコーウイルス 18 型、残る 3 名はコクサッキーウイルス B5 型と同定された。

無菌性髄膜炎の原因の多くを占めるのは EVs であるとされている。2015 年は全国的にエコーウイルス 18 型が多く検出されており、本県においても同様の傾向を示した。しかし、年度末あたりからコクサッキーウイルス B5 型による新生児症例が増加しており、今後の動向に注意する必要がある。そのほか、2015 年 8 月以降、小児を中心にポリオ様麻痺に類似した原因不明の急性弛緩性麻痺（Acute Flaccid Paralysis : AFP）の症例が国内で相次いで発生し、その一部からエンテロウイルス D68 型（EV-D68）が検出されたことを受け、厚生労働省より AFP を認める症例の実態把握に関する協力依頼があった。長崎県内においても AFP 疑い症例の検体が搬入されたが、EV-D68 を含む EVs の遺伝子は検出されなかった。EV-D68 は呼吸器症状を呈した患者からの検出が多く報告されているため、ウイルス性呼吸器疾患疑いの検体搬入時には、積極的な検索を心掛けていきたい。

9 手足口病

手足口病を疑う検体 20 名分 20 検体（咽頭ぬぐい液、糞便、血清）が搬入された。それらに対して、CODEHOP VP1 RT-sn PCR による EVs 遺伝子検索を実施した。その結果、15 名の検体から EVs の遺伝子を検出し、それらを解析したところ 12 名がコクサッキーウイルス A16 型、3 名がコクサッキーウイルス A6 型と同定された。

2015 年の手足口病の流行では、過去 5 年間で 3 番目に多い患者数が報告された。手足口病は、夏

場に流行する感染症というイメージがあるが、2015年は、3月頃から患者数が増加し始め、5月から8月にかけて、明確なピークを示さないものの一定数の患者が継続して発生する形で流行した。手足口病は、基本的に予後良好な疾患であるが、原因ウイルスにはEV71など中枢神経症状を起こしやすいものが含まれるため、継続した病原体サーベイランスと必要に応じた注意喚起が重要である。

10 ヘルパンギーナ

ヘルパンギーナを疑う検体3名分3検体（咽頭ぬぐい液）が搬入され、いずれの検体についてもCODEHOP VP1 RT-sn PCRを用いたEVsの遺伝子検索を実施した。その結果、2検体からEVsの遺伝子が検出され、増幅産物の塩基配列からコクサッキーウイルスA6型と同定された。

ヘルパンギーナは、発熱と水疱性発疹を主徴とする疾患で、基本的に予後良好であるが、場合によっては髄膜炎や脳炎などの重篤な合併症を併発することがあるので、手足口病同様、流行時には適宜注意喚起を行うなどの対応が必要である。

11 発疹症

発疹症と診断された患者検体が3名分6検体搬入され、それらに対しCODEHOP VP1 RT-sn PCRを用いたEVsの遺伝子検索を実施した。その結果、すべての検体からEVsの遺伝子が検出され、増幅産物の塩基配列からエコーウイルス18型と同定された。同時期に搬入された無菌性髄膜炎からも同型のウイルスが検出されているため、地域において一定の流行があったものと推察された。

12 流行性角結膜炎

流行性角結膜炎を疑う検体2名分2検体（結膜ぬぐい液）が搬入され、それらに対し検出マニュアルに準じて遺伝子検索を実施したところ、アデノウイルスの遺伝子を検出した。遺伝子型別のため、ペントン（P）、ヘキソン（H）、ファイバー（F）の3つの領域の遺伝子を解析した結果、今回検出したアデノウイルスは、2015年の国内流行の主流であるアデノウイルス54型と同定された。流行性角結膜炎は、ここ数年県内では大きな流行は見られなかったが、2015年は比較的多くの患者発生が報告された。アデノウイルスは呼吸器症状から消化器症状まで多彩な臨床症状を示すため、眼疾患以外

の症例からも、積極的な検索を行う必要がある。

13 感染性胃腸炎（ロタウイルス）

感染性胃腸炎を疑う検体が、35名分36検体（糞便）搬入された。遺伝子検索を実施したところ、27検体からウイルスの遺伝子を検出し、その内訳は、20検体からノロウイルス、5検体からロタウイルス、2検体からEVsの遺伝子が検出された。得られた増幅産物を用いて各ウイルスについて遺伝子型別を行ったところ、ノロウイルスはGI.3が2検体、GII.3が14検体、GII.4が4検体であった。EVsは、エコーウイルス3型が1検体、コクサッキーウイルスA10型が1検体であった。ロタウイルスは、マニュアルに基づきVP7領域の塩基配列に基づく遺伝子型別を行った。その結果、検出されたA群ロタウイルスは、遺伝子型G9P[8]が3検体、G2P[4]が2検体であった。

感染性胃腸炎の病原体には、多くのウイルスが含まれるため、今後とも県内の発生動向を注視していく必要がある。

謝 辞

感染症発生動向調査にご協力頂いた各定点医療機関及び協力医療機関の諸先生、検体の収集及び搬入にご協力頂きました長崎市、佐世保市、県立各保健所の関係諸氏に深謝する。

参 考 文 献

- 1) 山口 顕徳 他：感染症サーベイランスにおけるウイルス分離（2010年度）長崎県環境保健研究センター所報 56、99-104 (2010)
- 2) 山口 顕徳 他：感染症サーベイランスにおけるウイルス分離（2011年度）長崎県環境保健研究センター所報 57、104-110 (2011)
- 3) 北川 由美香 他：感染症サーベイランスにおけるウイルス分離（2012年度）長崎県環境保健研究センター所報 58、119-125 (2012)
- 4) 病原体検出マニュアル（国立感染症研究所）
- 5) 麻しん診断マニュアル第3版 平成27年3月（国立感染症研究所）
- 6) 風しん診断マニュアル第3版 平成27年3月（国立感染症研究所）
- 7) SFTSウイルス検出マニュアル 平成25年3月13日（厚生労働科学研究 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「現在、国内で分離・

同定できないウイルス性出血熱等の診断等の対応方法に関する研究」班)

- 8) Nix WA, Oberste MP, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2698-704.
- 9) CDC Enterovirus Laboratories Procedure EV010-10, VP1RT-snPCR for Clinical Specimens 2005 (CDC, USA)
- 10) デングウイルス感染症診断マニュアル(国立感染症研究所)
- 11) 咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査, 診断マニュアル(国立感染症研究所)
- 12) ロタウイルスの検出法(国立感染症研究所)
- 13) 衛生微生物技術協議会第 35 回研究会
レファレンスセンター等報告
(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/reference/4820-reference-report35.html>)

長崎県における三類感染症の発生状況の概要(2015年度)

浦山 みどり、中村 まき子、田栗 利紹

Occurrence of Category III Infectious Diseases in Nagasaki Prefecture (2015)

Midori URAYAMA, Makiko NAKAMURA, Toshitsugu TAGURI

Key words: EHEC, PFGE, MLVA

キーワード: 腸管出血性大腸菌、パルスフィールドゲル電気泳動法、MLVA 法

はじめに

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(以下、感染症法)」により三類感染症に分類される、コレラ、細菌性赤痢、腸管出血性大腸菌感染症(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)、腸チフスおよびパラチフスについては、感染源の究明と感染拡大防止のため、長崎県感染症発生動向調査事業に基づき、菌の検索および疫学調査を実施している。今回、2015年度に長崎県内で発生した三類感染症の発生状況および同定された菌株に対する遺伝子解析結果をまとめたので報告する。

調査方法

1 調査対象

2015年度に長崎市保健所、佐世保市保健所および各県立保健所(西彼、県央、県南、県北、五島、上五島、壱岐、対馬)より発生した三類感染症は、EHECが55件であり、細菌性赤痢、コレラ、腸チフスおよびパラチフスの発生はなかった。

2 検査・解析方法

各県立保健所において、感染症法に基づき医師より届出があると、感染症サーベイランスシステム(NESID)に報告すると共に、2009年1月に作成された三類感染症発生時対応マニュアルに沿って積極的疫学調査を実施する。長崎市保健所および佐世保市保健所においては各保健所に従い、疫学調査を実施する。県立保健所管内で発生したEHECの場合、積極的疫学調査によって各県立保健所から採取された検体もしくは分離菌株について、当センターあるいは県央保健所にて血清型別、ペロ毒素検査(Polymerase Chain Reaction, PCR法もしくはReversed Passive Latex Agglutination, RPLA法)や血清型別試験を実施し、

菌を同定した。その後、分子疫学解析のため国立感染症研究所(以下、感染研)に送付し、解析結果の還元を受けた。感染研は、2014年4月1日受付より、EHEC O157、O26、O111の菌株に関して、反復配列多型解析法(Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis, MLVA)¹⁾による解析が開始された。その他の血清型の菌株に関しては、パルスフィールドゲル電気泳動(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)法が行われている。

結果及び考察

2015年度に長崎県で報告されたEHECは55例であり、その菌型の内訳は、O157が16例、O26が10例、O111が16例、O103が10例、O121、O5およびO55が各1例であった(表1)。また、集団感染の発生はなかった。

Tenoverら²⁾の基準ではPFGE法で1~3箇所のバンドの違いまで「極めて関連あり」、6箇所違いまで「関連の可能性あり」と評価される。また、MLVA法ではリピート数が完全に一致すると「密接に関連する」と解釈され、相違する部位数が1部位であると「関連の可能性有り」となり、PFGEで言う1~3バンド違いに近い考え方になる³⁾。

2015年度に発生したEHEC事例の中で、管轄保健所外で発生したEHEC事例と関連の可能性があった事例は6/25事例であった。同一保健所管轄内で時期を跨いで発生して、関連の可能性があったEHEC事例は4/24事例であり、2013年度に発生した事例が1事例、2014年度に発生した事例が2事例、同じ2015年度に発生した事例が1事例であった。また、長崎市で発生した事例No.22の菌株は、全国10箇所の地衛研等で広域に検出された。何れも共通の感染源は見

出されなかった。

今後も集団感染事例や広域散発事例の関連性を探知するためにも、PFGE 法や MLVA 法を用いて疫学解析を継続していく必要があると考える。

謝 辞

本調査を遂行するにあたり、情報を提供いただいた長崎市、長崎県立各保健所および長崎市保健環境試験所の担当者、並びに長崎県医療政策課感染症対策班の担当者に深謝する。

参 考 文 献

- 1) Izumiya H, *et al.*, Microbiol Immunol 54: 569-577, 2010
- 2) Tenover FC, *et al.*, J Clin Microbiol 33: 2233-2239, 1995
- 3) Ishihara T, *et al.*, IASR Vol.35:129-130, 2014

表1 長崎県において分離された腸管出血性大腸菌株 (2015 年度)

事例 No.	管轄HC	発生時期	血清型	毒素型	菌株数	コメント
1	県央	2015年8月	O157:H7	VT1VT2	1	2015年6月鹿児島県分離株で関連の可能性有り
2		2015年10月	O157:H-	VT1VT2	1	2015年10月長崎市分離株と密接に関係
3	県南	2015年6月	O157:H7	VT1VT2	1	
4		2015年8月	O157:H7	VT1VT2	2	2015年7月佐賀県分離株と密接に関連
5		2015年10月	O55:H12	VT1	1	
6	県北	2015年5月	O26:H11	VT1	2	
7		2015年7月	O103:H11	VT1	3	
8		2015年8月	O103:H2	VT1	4	
9	五島	2015年8月	O157:H7	VT2	2	2014年10月、11月五島HC分離株と密接に関係
10	壱岐	2015年5月	O157:H7	VT2	1	
11		2015年6月	O157:H7	VT1VT2	1	
12		2015年6月	O26:H11	VT1	4	2015年6月福岡市分離株と関連の可能性有り
13		2015年4月	O111:H-	VT1	3	
14		2015年6月	O103:H11	VT1	1	
15		2015年7月	O111:H-	VT1	6	
16		2015年8月	O111:H-	VT1	1	2013年11月壱岐HC、2014年11月壱岐HC分離株と密接に関係
17		2015年8月	O103:H2	VT1	2	
18		2015年9月	O5:H-	VT1	1	
19		2015年9月	O121:H19	VT2	1	
20		2016年3月	O111:H-	VT1	6	2015年7月壱岐HCと密接に関係
21	長崎市	2016年5月	O26:H11	VT1	4	
22		2016年8月	O157:H7	VT1VT2	1	2015年7月長野県、8月香川県、岐阜県、京都市、大阪市、大分県、神奈川県、9月石川県、大阪府、10月大阪府と密接に関係 2015年8月埼玉県と関連の可能性有り
23		2016年10月	O157:H7 (H-)	VT1VT2	4	2015年10月長崎県分離株と密接に関係
24		2016年10月	O157:H7	VT1VT2	1	
25	福岡県	2015年6月	O157:H-	VT1VT2	1	

長崎県における日本脳炎の疫学調査(2015年度)

- 豚の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況調査 -

吉川 亮、三浦 佳奈、松本 文昭、田栗 利紹

Epidemiological Study of Japanese Encephalitis in Nagasaki Prefecture (2015)

— Surveillance of swine infected by Japanese Encephalitis Virus —

Akira YOSHIKAWA, Kana MIURA, Fumiaki MATSUMOTO and Toshitsugu TAGURI

Key words : Japanese Encephalitis, Arbovirus, Swine Infection, HI Antibody Positive Rate

キーワード : 日本脳炎、アルボウイルス、豚感染、HI抗体陽性率

はじめに

日本脳炎ウイルス(以下、JEV)は、Flavivirus 属に属し、コガタアカイエカが媒介するアルボウイルスである。その生態環は、蚊→豚(時にトリ)→蚊の感染サイクルを形成しており、ヒトは JEV 感染の終末宿主である。従って、ウイルス増幅動物としての豚の感染状況が、ヒトへの感染を大きく左右するものと考えられる。

現在、日本脳炎の流行地は、東アジア、東南アジア、南アジアからオーストラリアにまで拡大し、年間数百万人の日本脳炎患者が発生している。発症すると定型的な脳炎を呈し、1~2日で40℃以上の高熱となる。頭痛、嘔吐、頸部硬直などの髄膜刺激症状が現れ、次いで意識障害、筋硬直、けいれん等の脳炎症状が出現する。

近年、本邦での日本脳炎確認患者は、1965年以前と比べ激減しているが、その患者発生の強力な抑制因子としては、ヒトに対するワクチン接種による免疫賦与、コガタアカイエカの減少、豚飼育環境の変化の3点がその大きな役割を担っていると考えられる。¹⁾

本県では、厚生労働省の定めた感染症流行予測調査実施要領に基づいて、豚の感染源調査を毎年実施するとともに、昨年度より日本脳炎の発生予防とまん延防止を図ることを目的とした「感染症流行予測調査事業(日本脳炎感染源調査)における注意喚起等実施要領(別紙)」に基づき、豚血清からのJEV遺伝子の検出ならびに豚血清中の抗JEV-IgM抗体の測定を行っている。本年度の概要について報告する。

調査方法

1 感染源調査

(1) 調査時期及び回数

7月初旬~9月中旬に計8回実施した。

(2) 調査対象及び検体

調査対象は、諫早市内で飼育された生後約6ヶ月の肥育豚から佐世保市と畜場において放血液を採取した80頭とし、検体は調査対象の血清とした。

(3) 調査事項

感染症流行予測調査事業検査術式に従い、JEV赤血球凝集抑制(HI)抗体の測定及び2-ME(2-Mercaptoethanol)感受性抗体の測定を行った。

2 JEV 遺伝子検索

採血後の豚血清よりQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNA抽出し、E領域(JEV-JaGAR 01;978~2,477)に設定したプライマーセット及びSuperScript One Step RT-PCRシステム(Invitrogen)を用いて1次増幅反応を行った後、その産物の一部を用いて2次増幅反応を行った。遺伝子増幅反応(PCR)条件及びプライマーを図1に示す。増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行って確認し、1次増幅産物は381bp(JEV-JaGAR 01;2,097~2,477)、2次増幅産物は326bp(JEV-JaGAR 01;2,124~2,449)の位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

3 JEV の分離

ウイルス遺伝子の存在が確認された血清について、Vero 9013細胞に接種してJEVの分離を行った。

すなわち、24 ウェルマルチプレートに単層を形成させた Vero 9013 細胞を滅菌リン酸緩衝食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した後、各ウェルに維持培養液 (2% 非動化牛胎児血清加 Eagle MEM) 900 μ L を加え、被検血清 100 μ L ずつ 2 ウェルにそれぞれ接種してウイルス分離を行った。炭酸ガス培養機 (37°C、5% CO₂、95% Air) 内で 7 日間培養して細胞変性効果 (CPE) の有無を判定し、明瞭な CPE が観察されなかった場合は、感染細胞の遠心上清を再度 Vero 9013 細胞に接種して盲継代を 1~2 回行った。

4 JEV の確認

明瞭な CPE が観察された場合は、感染細胞の培養上清から抽出した RNA を鋳型にして NS3 領域に

設定されたプライマーセット²⁾を用いた PCR により JEV 遺伝子を確認した。PCR 反応条件を図 2 に示す。増幅産物は、アガロースゲル電気泳動を行って確認し、162 bp (JEV-JaGAr 01; 5,739~5,900) の位置にバンドが確認されたものを陽性とした。

5 抗 JEV-IgM 抗体測定

HI 抗体測定を行った同一客体の血清を用いて抗 JEV-IgM capture ELISA により豚血清中の抗 JEV-IgM 抗体を測定した。ELISA の条件等は表 2 に示す。

抗 JEV-IgM 抗体陽性は、P/N ratio 2.00 (陰性対照血清の吸光度測定値に対して豚血清の吸光度測定値が 2 倍以上) とした。

1 次増幅反応 (One step RT-PCR)					
< primer set > JE8K-S : 5' ATGGAACCCCCCTTC 3' (JEV-JaGAr 01; 2,097-2,111)					
JEER : 5' AGCAGGCACATTGGTTCGCTA 3' (JEV-JaGAr 01; 2,458-2,477)					
< 組成 >			< 反応条件 >		
	volume	final conc.	temp.	time	cycles
2× Reaction Mix	12.5 μ L		53°C	15 min.	1
primer (JE8K-S: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	94°C	2 min.	1
primer (JEER: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	94°C	15 sec.	} 40
SS /Platinum Taq Mix	0.5 μ L		53°C	30 sec.	
DW (DNase/RNase free)	10.1 μ L		68°C	1 min.	
extract RNA	1.5 μ L		68°C	5 min.	1
total	25 μ L		4°C	∞	1
2 次増幅反応 (2nd PCR)					
< primer set > JE8K inner-S : 5' ATCGTGGTTGGGAGGGGAGA 3' (JEV-JaGAr 01; 2,124-2,143)					
JEER inner-C : 5' AGCACACCTCCTGTGGCTAA 3' (JEV-JaGAr 01; 2,430-2,449)					
< 組成 >			< 反応条件 >		
	volume	final conc.	temp.	time	cycles
10× EX Taq Buffer	2.5 μ L		94°C	5 min.	1
dNTP mixture (25 mM each)	2.0 μ L	0.2 mM each	94°C	15 sec.	} 25
primer (JE8K inner-S: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	53°C	30 sec.	
primer (JEER inner-C: 25 μ M)	0.2 μ L	0.2 μ M	72°C	1 min.	
TaKaRa EX Taq HS	0.125 μ L	0.025 U/ μ L	72°C	5 min.	1
DW (DNase/RNase free)	18.475 μ L		4°C	∞	1
1 st PCR products	1.5 μ L				
total	25 μ L				

図 1 JEV 遺伝子の検索

< primer set > JE-NS3-1S : 5' AGAGCGGGGAAAAAGGTCAT 3' (JEV-JaGAr 01; 5,739-5,758)
 JE-NS3-4R : 5' TTTCACGCTCTTTCTACAGT 3' (JEV-JaGAr 01; 5,891-5,900)

< 組成 >

	volume	final conc.	< 反応条件 >		
			temp.	time	cycles
2× Reaction Mix	12.5 μL		50°C	30 min.	1
primer (NS3-1S : 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM	94°C	2 min.	1
primer (NS3-4R: 25 μM)	0.2 μL	0.2 μM	94°C	15 sec.	} 40
SS /Platinum Taq Mix	0.5 μL		53°C	30 sec.	
DW (DNase/RNase free)	10.1 μL		68°C	1 min.	
extract RNA	5 μL		68°C	5 min.	1
total	25 μL		4°C	∞	1

図2 JEV の PCR による確認

< anti JEV-IgM capture ELISA >

- 1) Dilute positive control sera, negative control sera and samples to 1:100 in PBS-T (PBS with tween 20) with 10% Block Ace (DS Pharma Biomedical).
- 2) Dilute anti Pig-IgM (BETHYL) to 1:100 in Carbonate-Bicarbonate Buffer (SIGMA).
- 3) Add 100 μL of diluted anti Pig-IgM to each well.
- 4) Incubate overnight at 4 °C.
- 5) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 6) Add 100 μL of Block Ace to each well.
- 7) Incubate at 37 °C for 1 hr.
- 8) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 9) Add 100 μL of diluted positive control sera, negative control sera and samples to each well.
- 10) Incubate at 37 °C for 1 hr.
- 11) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 12) Add 100 μL of JEV (JaGAr 01 strain) inactivated antigen to each well.
- 13) Incubate at 37 °C for 1 hr.
- 14) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 15) Add 100 μL of 6B6C-1 MAAb (HRPO-conjugated anti-flavivirus IgG) to each well.
- 16) Incubate at 37 °C for 1 hr.
- 17) Wash wells 3 times with PBS-T.
- 18) Add 100 μL of OPD (SIGMA) in Phosphate-Citrate Buffer (SIGMA)
- 19) Incubate at RT (room temperature) for 20 min under dark condition.
- 20) Add 100 μL of stop solution (1N H₂SO₄) to each well
- 21) Read OD 425nm and calculate Positive/Negative (P/N) Ratio.

$$P/N \text{ Ratio} = (\text{OD}_{425} \text{ of sample serum}) / (\text{OD}_{425} \text{ of negative control sera})$$
 P/N Ratio 2.00 is determined to positive

図3 抗 JEV-IgM 抗体測定条件

表1 2015年度豚 HI 抗体陽性率及び 2-ME 感受性抗体陽性率体調査結果

採血 月日	採血 頭数	HI 抗体価 (倍)								HI抗体 陽性率 (%)	2-ME 抗体 陽性率 (%)
		<10	10	20	40	80	160	320	640		
7/7	10		10							100	-
7/14	10		10							100	-
7/31	10			9	1					100	0
8/4	10		1	5			2	1	1	100	50
8/18	10					2	5	1	2	100	10
8/25	10						5	1	4	100	10
9/1	10			1	1	1	2	5		100	0
9/15	10					2	6	2		100	0

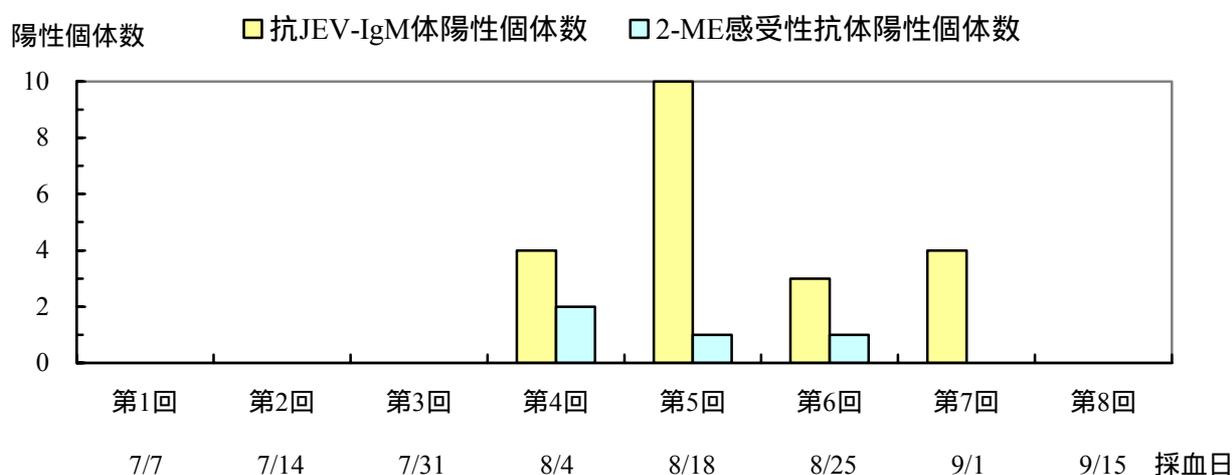


図4 豚の抗 JEV-IgM 抗体及び 2-ME 感受性抗体陽性個体数の推移

調査結果及び考察

1 感染源調査結果

2015年度豚 HI 抗体陽性率及び 2-ME 感受性抗体陽性率体調査結果を表1に示す。

2015年度は、7月7日に採血した豚10頭すべてが HI 抗体陽性となった(陽性率100%)。8月4日に採血した豚10頭において、HI 抗体価40倍以上となった4頭のうち2頭(陽性率50%)から初感染の指標となる 2-ME 感受性抗体が検出された以後もすべての個体において JEV の感染が確認された。

保毒蚊が生後4~6ヶ月の免疫のない豚を吸血することで豚は JEV に感染し、2~3日の潜伏期を経て約3日間持続するウイルス血症を起こす。このウイルス血症時に吸血した蚊がウイルスに感染し、10~13日の潜伏期を経てウイルスを媒介するようになる³⁾ことから、2015年度の本県では JEV を保有した蚊

が6月には活動を既に開始し、9月以降も豚を吸血してウイルスを媒介しながら感染を拡大していた可能性が推察される。

2 JEV 遺伝子検索及び分離結果

豚血清中の JEV 遺伝子検索を行ったところ、2015年7月7日から9月15日までに採血した計80頭すべて血清から JEV 遺伝子が確認されなかった。併せて、これら計80頭の血清を用いてウイルス分離を実施したところ、血清を接種した Vero9013 細胞に CPE が確認されず、ウイルス分離はできなかった。

3 抗 JEV-IgM 抗体測定結果

豚の抗 JEV-IgM 抗体及び 2-ME 感受性抗体陽性個体数の推移を図4に示す。2015年8月4日に採血した4頭から初感染の指標である抗 JEV-IgM 抗体陽性の個体を確認した。また、この2015年8月4日に採血された同一検体を用いて行った HI 検査で

は、2-ME感受性抗体陽性個体は2個体のみ確認されたことから、その地域における初感染を把握するうえで、既存のHI検査よりもIgM capture ELISAによるIgM抗体検出がより有用である。

まとめ

- 1) 2015年度は7月7日に採血した10頭からHI抗体が、8月4日に採血した2頭から初感染の指標となる2-ME感受性抗体が最初に確認された。
- 2) 2015年度は調査を行った計80頭からJEV遺伝子が確認されなかった。また、JEVも分離されなかった。
- 3) 8月4日に採血した豚血清から抗JEV-IgM抗体陽性個体が4頭確認されたため、別紙の要領に基づき医療政策課から県民に向けた注意喚起が行われた。
- 4) 日本脳炎確認患者は、1965年以前と比べ激減しているものの、2010年度1名、2011年度2名の患者報告に続き、2013度は1名の患者発生(死亡例)が確認された。さらに豚では依然JEVに対する抗体保有が確認されたことから、現在も生活環境中にJEVは確実に維持されており、新たな患者発生を防止するためにも県民に対する日本脳炎の注意喚起は今後も必要である。

謝辞

感染症(日本脳炎)流行予測調査事業にご協力いただいた長崎県中央農業協同組合、佐世保食肉センター株式会社及び佐世保市食肉衛生検査所の関係各位に感謝する。

参考文献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課,感染症流行予測調査事業検査術式,2004
- 2) Tanaka M: Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. J Virol Methods, 41(3), 311-322 (1993)
- 3) 厚生省保健医療局結核感染症課,改定・感染症マニュアル,1999

(別紙) 感染症流行予測調査事業(日本脳炎感染源調査)における注意喚起等実施要領

第1 目的

国が実施する感染症流行予測調査において、長崎県が受託して実施している日本脳炎感染源調査(ブタ感受性調査)の結果を適切に公表し、県民へ周知することで、日本脳炎の発生予防とまん延防止を図る。

第2 注意喚起の実施

注意喚起は、日本脳炎感染源調査において次に掲げる項目のいずれかを満たした場合、速やかに実施する。

- 1) 調査客体(ブタ)のHI 抗体保有率が50%を超え、かつ2-ME感受性抗体を検出
- 2) PCR によるブタ血清からの日本脳炎ウイルス遺伝子の確認
- 3) IgM 捕捉ELISA による陽性個体(ブタ)の確認

第3 実施方法

1. 環境保健研究センターは検査結果が判明し次第、医療政策課へ検査結果及び基準を満たした旨を報告する。
2. 報告を受けた医療政策課は、保健所、一般社団法人長崎県医師会及び報道機関等に対して情報提供を行う。
3. 環境保健研究センターは感染症発生動向調査速報において、関係機関等への注意喚起に努める。
4. 情報提供を受けた保健所は、必要に応じて地域住民、関係機関等へ周知する。

附則 この要領は平成25年7月30日から施行する。

食中毒における病因物質の概要 (2015 年度)

三浦 佳奈、中村 まき子、松本 文昭、浦山 みどり、田栗 利紹

Prevalence and Etiological Agents of Food Poisoning in Nagasaki (2015)

Kana MIURA, Makiko NAKAMURA, Fumiaki MATSUMOTO, Midori URAYAMA and Toshitugu TAGURI

key words: Food poisoning, *Campylobacter jejuni*, Norovirus

キーワード: 食中毒, カンピロバクター・ジェジュニ, ノロウイルス

はじめに

1997年5月30日の食品衛生法施行規則の改正でノロウイルス(2003年8月29日同規則改正で小型球形ウイルスから名称変更)及びその他のウイルスと腸管出血性大腸菌(VT産生)が、1999年12月28日には同規則改正によりコレラ菌、赤痢菌、チフス菌、パラチフスA菌が、2012年12月28日にはクドア、ザルコシステイス、アニサキス及びその他の寄生虫が食中毒事件票に病因物質として追加された。これらの施行規則の改正により、ウイルス性食中毒が位置づけられるとともに、コレラ菌等の4菌種についても飲食に起因する健康被害発生時は、他の食中毒病因物質と同じ措置がとられるようになった。

本報告では、2015年度に発生した本県食中毒事例で検出された病因物質について報告する。

調査方法

長崎県生活衛生課が取りまとめた2015年の食中毒発生状況一覧表(長崎市及び佐世保市の発生届出分含む)をもとに、主要病因物質(細菌、ウイルス、自然毒及び化学物質等)ごとに事件数及び患者数を集計した。

各々の食中毒事例について、患者からの聞き取り情報、喫食状況及び細菌検査情報を県内の所轄保健所から収集した。

結果及び考察

長崎県内では10事例の食中毒の発生があった。発生事例の内訳を病因物質区分ごとに示した(表1)。

(1) 細菌性食中毒

今年度発生した細菌性食中毒は全てカンピロバクター属によるもので、4事例、総計64名の患者が発生した。長崎市保健所管内、佐世保市保健所管内でそれぞれ1事

例発生し、検査は各市で実施された。県立保健所管内で発生した2事例については、本センターで検査を実施した。1事例(患者数:23名)において、有症者を含む18名の糞便検体が搬入され、有症者12名からカンピロバクター・ジェジュニが検出された。もう1事例(患者数:9名)では、有症者を含む10名の糞便検体が搬入され、有症者5名からカンピロバクター・ジェジュニが検出された。両事例は、飲食店での喫食が原因であった。

(2) ウイルス性食中毒

ノロウイルスによる食中毒は、5事例、総計128名の患者が発生した。1事例は、佐世保市保健所管内の事業場給食施設で60名の患者が発生し、佐世保市による検査の結果、ノロウイルスGが検出された。県立保健所管内で発生した4事例では、当センターで検査を実施した。そのうち病院給食施設で発生した1事例は患者便および吐物、調理従事者便からノロウイルスGが検出された。残る3事例はいずれも飲食店での喫食が原因と考えられ、搬入された検体からノロウイルスGが検出された。

(3) 寄生虫性食中毒

今年度は寄生虫による食中毒はみられなかった。

(4) 自然毒食中毒

自然毒による食中毒は、キンシバイ(巻貝)の自家調理によるテトロドトキシン中毒が1事例発生した。

謝辞

本調査を遂行するにあたり、種々の情報を提供していただいた長崎県生活衛生課、長崎市保健環境試験所、長崎市、佐世保市及び長崎県立各保健所の関係各位に感謝する。

表 1 長崎県内の食中毒発生状況および病因物質 (Apr.2015 ~ Mar.2016)

事例 No.	発生年月日	発生場所	取扱保健所	摂取者数	患者数	死者数	原因施設	摂食場所	原因食品	検出病因物質	検出数 / 検体数	検体(由来)	備考
1	2015/4/25	長崎市	長崎市	19	15	0	飲食店	飲食店	不明	カンピロバクター・シエジエニ			検査は長崎市保健環境試験所
2	2015/4/29	諫早市	県央	44	23	0	飲食店	飲食店	不明	カンピロバクター・シエジエニ	12/14 0/4	(有症者糞便) (従事者糞便)	
3	2015/6/5	大村市	県央	201	22	0	病院給食施設	病院給食施設	不明	ノロウイルス (G)	10/12 1/15 1/1 0/12	(有症者糞便) (従事者糞便) (患者吐物) (食品)	
4	2015/8/30	諫早市	県央	45	9	0	飲食店	飲食店	不明	カンピロバクター・シエジエニ	5/7 0/3 0/10	(有症者糞便) (従事者糞便) (拭き取り)	
5	2015/10/22	佐世保市	佐世保市	115	17	0	不明	旅館、飲食店	不明	カンピロバクター・シエジエニ			検査は佐世保市保健所
6	2015/11/6	松浦市	県北	1	1	0	家庭	家庭	キンシバイ(巻貝)	テトロドトキシン			検査は当センター生活化学科で実施
7	2015/11/30	西海市	西彼	112	26	0	飲食店	飲食店	不明	ノロウイルス (G)	9/11 1/2 1/4	(有症者糞便) (無症者糞便) (従事者糞便)	
8	2015/12/18	佐世保市	佐世保市	284	60	0	事業場給食施設	事業場給食施設	不明	ノロウイルス (G)			検査は佐世保市保健所
9	2015/12/23	五島市	五島	20	8	0	飲食店	飲食店	不明	ノロウイルス (G)	6/6 1/6	(有症者糞便) (従事者糞便)	
10	2016/1/25	壱岐市	壱岐	97	12	0	飲食店	飲食店	不明	ノロウイルス (G)	7/8 3/6 1/1	(有症者糞便) (従事者糞便) (患者吐物)	

本表は、県民生活部生活衛生課の食中毒発生状況一覧表(長崎市、佐世保市、佐世保市発生含む)から作成した。
 病因物質の検出数は、長崎市及び佐世保市を除いた県立保健所・環境保健研究センター対応事例のみとした。
 ()内は病因物質の詳細情報
 ・Norovirus (Genogroup)

長崎県におけるノロウイルスの検出状況(2015)

三浦 佳奈、松本 文昭、吉川 亮、田栗 利紹

Detection and Molecular Characterisation of Norovirus causing Food-borne Diseases or Infectious Gastroenteritis in Nagasaki (2015)

Kana MIURA, Fumiaki MATSUMOTO, Akira YOSHIKAWA and Toshitsugu TAGURI

key words: Food poisoning, Norovirus

キーワード: 食中毒, ノロウイルス

はじめに

ノロウイルスは食品衛生法上では、1997 年にはじめて食中毒の原因物質として追加された。本ウイルスは、感染性胃腸炎による集団発生原因の主要ウイルスの 1 つであり、小児から成人に至る幅広い年齢層にわたって、さまざまな規模の急性胃腸炎を引き起こす。感染様式も様々で、食品を介して食中毒と特定される事例もあれば、ヒト-ヒト感染や無症状保菌者を介する感染事例もあり、社会的にも重要なウイルスの一つである。ノロウイルスはGIからGVまでの遺伝子グループに分類されており、その中で主に人に感染するのはGIとGIIである。さらにGIには9種類、GIIには22種類の遺伝子型が存在する。

2015 年は、全国的にノロウイルスの主要流行株に大きな動きがあった。2014 年 12 月まで主要流行株を占めていた GII.4 が減少に転じ、新たに新規遺伝子型である GII.P17-GII.17 が検出されはじめた。

今回、長崎県内で発生したノロウイルスを原因とする食中毒事例等について塩基配列を解析したので報告する。

調査方法

①材料

2011 年 4 月～2016 年 3 月上旬までに長崎県で発生した食中毒事例、有症苦情事例等の健康被害事例により採取された便、嘔吐物、食品計 241 検体を検査した。各事例において検出された主な遺伝子型の配列を整理し、解析を行った。

②方法

検査方法及び患者材料等は、「ノロウイルスの検査法」²⁾に準じて行った。検体を PBS(-)で約 10 % 懸濁液とし、

10,000 rpm で 15 分間遠心分離した上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてウイルス RNA の抽出を行った。抽出した RNA は DNase 処理をした後、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit を用いてノロウイルス遺伝子の N/S 領域を増幅した。PCR 増幅用のプライマーとして、ノロウイルス GI には COG1F/G1SKR をノロウイルス GII には COG2F/G2SKR を用いた。食品に関しては超遠心法を用いて濃縮し RNA 抽出後、DNase 処理、OneStep RT-PCR を行った。PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動により増幅バンドが確認されたものについてダイレクトシーケンスを行い、Norovirus genotyping tool を用いて遺伝子型別した。

GII.17 と同定された検体に関してはより詳細に解析するために、抽出 RNA を SuperScriptTMIII RT (Thermo Fisher) を用いて cDNA を合成し、Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa) を用いてノロウイルス遺伝子の RdRp, N/S 領域を増幅した。PCR 増幅用のプライマーとして、Yuri22F/G2SKR を用いた。PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動により増幅バンドが確認されたものについてダイレクトシーケンスを行い、Norovirus genotyping tool を用いて遺伝子型別したのち系統樹解析を実施した。

結果及び考察

2015 年 4 月～2016 年 3 月上旬までに長崎県で発生した食中毒事例、有症苦情事例等の健康被害事例の検査により検出したノロウイルスの塩基配列を解析した結果を表 1 に示す。検体数 144 検体に対して陽性検体数 54 検体であり、そのうち GI.3 が 12 検体、GII.3 が 16 検体、GII.17 が 25 検体、1 検体に関しては遺伝子型別困難であった。

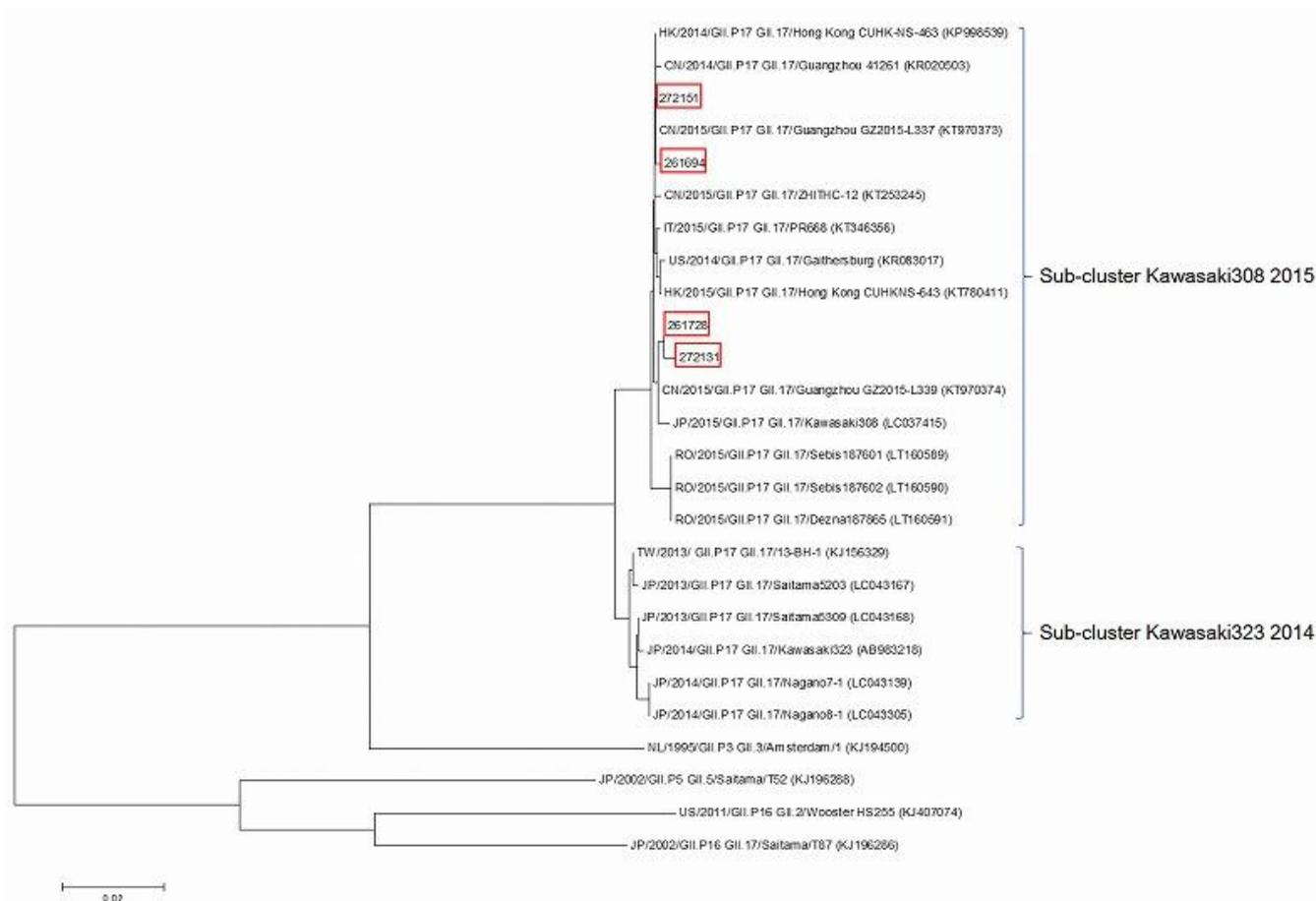


図1 ノロウイルス GII.P17-GII.17 系統樹解析

また、過去5年間に於いて検出されたノロウイルスの遺伝子型を表2に示す。長崎県において2014年まではGII.4が検出されていたが、2014年末から2015年にかけてGII.17が検出しはじめている。

今回GII.17が検出された検体に関して、ダイレクトシーケンシングを行い塩基配列を解析し、遺伝子型を決定したところ、GII.P17-GII.17に分類された。また、事例ごとに1検体選出し、系統樹を作成したものを図1に示す³⁾。川崎市にて2014年に検出されたGII.P17-GII.17、2015年に検出されたGII.P17-GII.17とサブクラスタを形成しており、今回長崎県にて検出された検体は2015年のサブクラスタに分類された。

今後、本ウイルスが国内において主要な流行株となる可能性があるため、来シーズン以降におけるGII.17変異株の動向には十分注意が必要である。

また、ノロウイルスの遺伝子解析を継続していくことで、シーズンごとの流行の傾向等を監視し、感染症や食中毒等の感染拡大を防止することが重要であると考えられる。

謝辞

本調査を遂行するにあたり、種々の情報を提供していただいた長崎県生活衛生課、長崎市保健環境試験所、長崎市、佐世保市及び長崎県立各保健所の関係各位に感謝する。

参考文献

- 1) Matsushima, *et al.*, Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region 2015
- 2) ノロウイルスの検出法について(食品衛生法の一部改正)、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知食安監発第1105001号、(2003)
- 3) S Dinu, *et al.*, Molecular identification of emergent GII.P17-GII.17 norovirus genotype, Romania, 2015

表 1. 2015 年 ノロウイルスの検出状況

	依頼件数	検体数	陽性検体数	geno-group
西彼地区	5	33	21	GII.3 , G II.17
県央地区	4	69	12	G I.3
県南地区				
県北地区	3	15	3	G II.3
五島地区	1	12	7	G II.17
上五島地区				
壱岐地区	1	15	11	G II.17
対馬地区				
合 計	14	144	54	

表 2. 過去 5 年間に於いて検出されたノロウイルスの遺伝子型

	GI			GII								
	GI.3	GI.6	型不明	GII.2	GII.3	GII.4	GII.5	GII.6	GII.8	GII.13	GII.17	型不明
2011			1		6							22
2012			1			30						23
2013				7	14			1				
2014	1	1	1		1	25	1	8	3	4	25	2
2015	12				30	11					25	1

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究(長崎県の調査)

浦山 みどり、田栗 利紹

Standardization of Environmental Monitoring Techniques for *Legionella* spp. and Sanitation Management in Bath Water

Midori URAYAMA, Toshitsugu TAGURI

Key words: *Legionella* spp., LC EMA-qPCR¹⁾, PALSAR

キーワード: レジオネラ属菌, LC EMA-qPCR 法, PALSAR 法

はじめに

レジオネラ属菌の検査は一般的に平板培養法が用いられているが、結果が判明するまでに7~10日を要するため、レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法の開発が進められている。

今回、厚生労働科学研究のレジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究(H25-健危-一般-009)の研究協力として、2015年度は平板培養法、LC EMA-qPCR(Liquid culture ethidium monoazide quantitative polymerase chain reaction)法およびPALSAR法について、浴槽水等の実試料を用いて、平板培養法に対する感度、特異度などの評価を行ったので報告する。

調査方法

1 調査対象

2015年度に浴用施設から59検体の試料を採取し、検査法の検討に用いた(表1)。検体の内訳は、浴槽水が48検体、シャワー水が2検体、その他が9検体であった。浴槽水の泉質は、温泉が21検体、白湯が27検体であった。

2 検査・解析方法

ATP値について、検水をろ過濃縮法で100倍に濃縮した濃縮液に、ルシパックワイドの専用綿棒を浸して約100 μ Lを吸い取り、携帯用簡易測定器を用いて検水10mLあたりのRLU値を測定した。

平板培養法の前処理は、熱処理(50、20分間)をした後、酸処理(0.2M HCL・KCL buffer, pH2.2を等量添加、室温5分間)をしたものが25検体、

その他は酸処理のみ実施した。

LC EMA-qPCR法は、Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR(7730、タカラバイオ)、*Legionella* LC Medium base(9016、タカラバイオ)、Lysis Buffer for *Legionella*(9181、タカラバイオ)、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit(CY240、タカラバイオ)を用い、添付の取扱説明書に従い実施した。ATP値が5,000 RLU/10 mL以上の検体は、1,000倍濃縮液及び100倍濃縮液の両方について検査を実施し、定量値の高い値を採用した。リアルタイムPCRの結果は、添付の取扱説明書に記載された方法で、コピー数からCFUに換算した。

PALSAR法は、100倍濃縮液1mLを遠心後、上清を除き、添付の取扱説明書に従い実施した。

結果及び考察

1 平板培養法による結果

59検体について検査した結果、27検体から10 CFU/100 mL以上のレジオネラ属菌が検出された(表2)。菌数別に見ると、10~99 CFU/100 mLが17検体、100~999 CFU/100 mLは0検体、1,000 CFU/100 mL以上が10検体であった。最も多かった検体では22,800 CFU/100 mLのレジオネラ属菌が検出された。血清型別に見ると、*L. pneumophila* 血清群(SG)5が4検体、*L. pneumophila* SG1が3検体、*L. pneumophila* SG6が1検体であり、その他の検体は型別不能であった(表3)。

2 LC EMA-qPCR法による結果

(1) 平板培養法との比較

平板培養法による 10 CFU/100 mL 以上の検体を検出するカットオフ値として 1 CFU/100 mL 相当を用いて解析を行った²⁾。LC EMA-qPCR 法を使用した 59 検体について、平板培養法の結果と比較した(表 4)。平板培養法では 27/59 検体の検体から 10 CFU/100 mL 以上のレジオネラ属菌が検出された。LC EMA-qPCR 法では 43/59 検体の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。LC EMA-qPCR 法の平板培養法に対する感度は 100% (27/27 検体)、特異度は 50% (16/32 検体)であった。LC EMA-qPCR 法と平板培養法との菌数(定量値)の相関は、 $R^2 = 0.7788$ であった(図 1)

(2) LC EMA-qPCR 法における偽陰性検体

平板培養法で陽性となり、LC EMA-qPCR 法で陰性となった検体は 0 検体であった。

(3) LC EMA-qPCR 法における偽陽性検体

平板培養法で陰性となり、LC EMA-qPCR 法で陽性となった検体は 16/32 検体であった。これらの LC EMA-qPCR 法の定量値は、1~9 CFU/100 mL 相当が 4 検体、10~99 CFU/100 mL 相当が 7 検体、100 CFU/100 mL 相当以上は 1 検体であった。検出限界以下(5 CFU/100 mL)ではあるが、レジオネラ属菌を検出した検体は 5 検体であった。

3 PALSAR 法による結果

(1) 平板培養法との比較

PALSAR 法を実施した 30/59 検体について、平板培養法の結果と比較した(表 5)。平板培養法では 9/30 検体の検体から 10 CFU/100 mL のレジオネラ属菌が検出された。PALSAR 法では 12/30 検体の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。PALSAR 法の平板培養法に対する感度は 33.3% (3/9 検体)、特異度は 57.1% (12/21 検体)であった。

(2) PALSAR 法における偽陰性検体

平板培養法の結果が陽性となったが、PALSAR 法で陰性となった 6 検体すべてが平板培養法での菌数が 10~99 CFU/100 mL であった。

考 察

平板培養法と 2 種類の迅速検査キット(LC EMA-qPCR 法、PALSAR 法)をについて、比較および評価を行った。

LC EMA-qPCR 法について、平板培養法による 10 CFU/100 mL 以上の検体を検出するカットオフ値を 1

CFU/100 mL 相当として解析を行った結果、平板培養法に対する感度は 100%、特異度は 50%、菌数(定量値)の比較は $R^2 = 0.7788$ と、特異度は低かったが高い相関を示し、全体として平板培養法の菌数を反映していた。

LC EMA-qPCR 法で偽陽性となった 16/32 検体について、5 検体は検出限界以下(5 CFU/100 mL)ではあるが、レジオネラ属菌が検出された。このことから、その他の検体についても、検出限界以下の低濃度のレジオネラ属菌が存在していた可能性や、viable but non-culturable 状態のレジオネラ属菌が存在していた可能性が考えられる。

PALSAR 法の平板培養法に対する感度は 33.3%、特異度は 57.1% であり、LC EMA-qPCR 法と比較し、特異度は同等であったが、感度が低かった。PALSAR 法で偽陰性となった 6 検体は、平板培養法での菌数はすべて 50 CFU/100 mL 未満であった。PALSAR 法は RNA を標的とする迅速検査法であり、RNA は DNA と比較し分解されやすい性質であるため、濃縮検体の保存状況が影響していた可能性が考えられる。また、PALSAR 法の検水量は 100 mL/reaction であるため、平板培養法の 500 mL/reaction に比べ、感度が低くなっている可能性も考えられる。

今回の結果から、LC EMA-qPCR 法(カットオフ値 1 CFU/100 mL 相当)は、平板培養法と高い相関を示す迅速検査法であることが示された。一方で PALSAR 法は平板培養法に対する感度が低かった。濃縮検体の保存が RNA の検出に影響するかどうか、また、1 反応あたりの検水量を多くするかによって、感度が向上するか検討する必要があると考えられた。

謝 辞

本調査を遂行するにあたり、情報を提供いただいた研究代表者である倉文明先生(国立感染症研究所 ウイルス第二部/細菌第一部 主任研究員)をはじめ、富山県衛生研究所、研究分担者、研究協力者の関係各位に感謝する。

参 考 文 献

1) 金谷潤一 他、Liquid Culture EMA qPCR におけるレジオネラ生菌迅速検査法の改良と評価、レジオネラ検査の標準化及び消毒等にかかる公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究、厚生労働科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業 平成

26年度 総括・分担研究報告書、63-76

2) 金谷潤一 他、レジオネラ属菌迅速検査法の評価、
レジオネラ検査の標準化及び消毒等にかかる公衆浴

場等における衛生管理手法に関する研究、厚生労働
科学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研
究事業 平成27年度 総括・分担研究報告書、61-69

表1. 検体内訳

	検体数	
浴槽水	温泉	21
	白湯	27
シャワー水	2	
その他	9	
計	59	

表2. 平板培養法による検出率

菌数 (CFU/100 mL)	検出検体数	(%)
10未満	32	54.2
10-99	17	28.8
100-999	0	0.0
1000以上	10	17.0
計	59	100

表3. 分離菌の血清群

菌種	検体数
<i>L.pneumophila</i>	
SG5	4
SG1	2
SG6	1
UT	20

表4. 平板培養法とLC EMA-qPCR法との比較

	平板培養法		計
	10	< 10	
LC EMA-qPCR	27	16	43
(カットオフ値1 CFU/100 mL相当)	0	16	16
計	27	32	59

感度 100%、特異度 50%

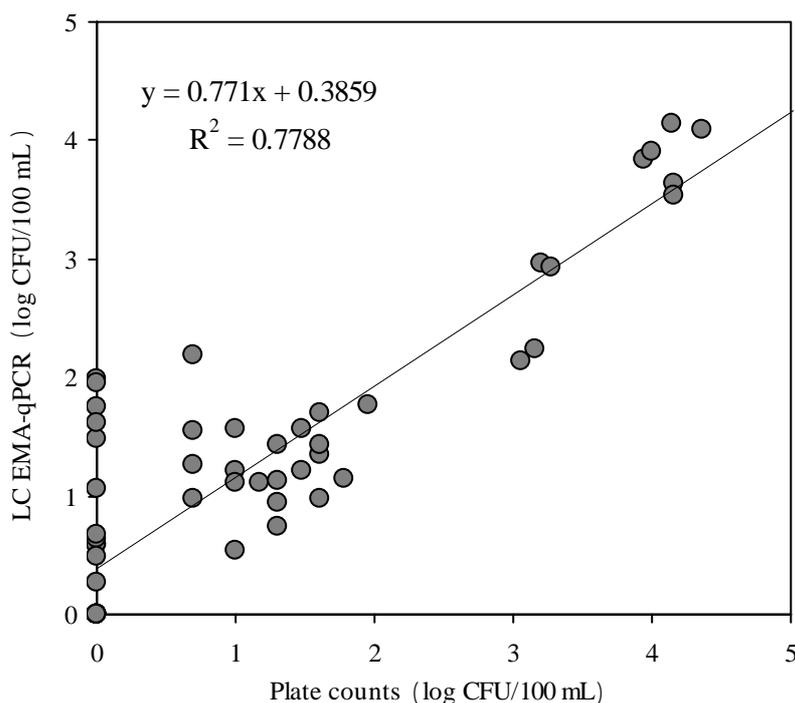


図1 平板培養法とLC EMA-qPCR法との相関

表5. 平板培養法とPALSAR法との比較

		平板培養法		計
		10	< 10	
PALSAR法	陽性	3	9	12
	陰性	6	12	18
計		9	21	30

感度 33.3%、特異度 57.1%

中国福建省農村部に暮らす人々の生活環境および健康状態

蔡 国喜

Lifestyle Changes and Its Impact on Health among People in Rural Fujian, China

Guoxi CAI

Key words: Health transition, Chronic diseases, Psychological stress, Biomarkers, China

キーワード: 健康転換、慢性疾患、心理ストレス、バイオマーカー、中国

はじめに

1980年代後半に改革開放政策が導入されて以降、中国の急速な市場経済化は人びとの生活環境に大きな変化をもたらし、彼らの持続的な健康は脅かされている。たとえば、食生活が欧米化し身体活動量が低下することによる肥満・慢性疾患の増加や、社会格差の拡大・人びとの関係性の希薄化がもたらす心理的健康影響などが挙げられる¹⁾。

しかしながら、その評価は都市部に偏り、農村部における状況は明らかではない。そこで、福建省農村部コミュニティにおいて長崎大学国際保健教室及び東京大学大学院医学系研究科人類生態学教室と共同で研究を開始した。当該研究チームは、海南省農村部コミュニティにおいて、経済発展に伴う生活様式の変化と疾病構造の変化(生活習慣病の増加や心理的ストレスの増大)に関する調査・研究を行ってきた。

調査方法

2015年5月2日より福建省S県において予備調査を行った。予備調査では現地の生活の様子に関する聞き取りを行なったほか、健康調査を行うにあたって必要となる設備や医療スタッフの準備・状況確認を実施した。

2015年7月末からの本調査では、7つのコミュニティに暮らす797名を対象として生活環境や心理ストレスに関する質問紙調査、採血、身体計測(身長・体重・腹囲・臀囲)、血圧測定を実施した。質問紙調査には家族構成、出稼ぎの経験、家族との離別の経験、ソーシャルキャピタル、食生活、飲酒、喫煙、ストレス尺度等に関する質問が含まれている²⁾。

結果

2015年8月に、S県の地方衛生局、郷衛生院などの協力の下で本調査を実施した。調査参加者790名のうち男性の割合は39.1%で、平均年齢は59.5歳(男

性が61.9歳、女性が58.0歳)であった。また38.1%が教育を受けておらず、39.4%が小学校卒業、22.5%が中学校卒業以上の学歴であった。婚姻状況については78.9%が婚姻状態にあった。

過体重(BMI \geq 25)は男性で23.0%、女性で31.7%であった。高血圧は36.7%の男性、48.4%の女性で見られた。福建省農村部でも肥満や高血圧をはじめとした慢性疾患が拡大していることが明らかになった。

Table 1. Convenience sampling in 7 communities in S county, Fujian province, China

	n	Registered pop.*	De jure pop.*	Adults (>20 years)	Participation rate (%)
Community 1	102	740	200	144	70.8
Community 2	107	648	220	158	67.6
Community 3	100	500	200	144	69.4
Community 4	91	570	200	144	63.2
Community 5	113	800	300	216	52.3
Community 6	93	600	200	144	64.6
Community 7	191	1220	600	432	44.2
Total	797	5,078	1,920	1,382	61.7

*These numbers were presented by each village doctors.

De jure: the number of population currently living in the community.

Table 2. Socio-demographic aspects of the participants in S county of Fujian province, China (n=790)

	n (%) / Mean [SD]
Age	59.5 [13.1]
Sex	Male 309 (39.1) Female 481 (60.9)
Years of education	Illiterature 299 (37.9) 6 or less years 313 (39.6) 7 or more years 178 (22.5)
Marital status	Has not married 34 (4.3) Has a partner 623 (78.9) Divorced or widowed 133 (16.8)
Household size	4.8 [2.4]
K6 stress scale score	No stress 409 (51.8) Mild stress 129 (16.3) Severe stress 252 (31.9)
Loneliness (1-5)(n=765)	3.8 [1.2]
Life satisfaction (1-10)(n=768)	4.7 [1.6]
Social network in the community (3-15)(n=765)	10.8 [2.0]
Self-efficacy (0-40)(n=571)	24.7 [6.5]

考察

本研究は中国農村部で肥満や高血圧をはじめと

した慢性疾患が拡大していることが明らかになった上に、こうした慢性疾患や精神ストレスを説明する要因を探求する狙いである。具体的には、将来の慢性疾患のリスクを示すバイオマーカーである C-reactive protein と、慢性的な心理ストレスのバイオマーカーである Epstein-Barr virus 抗体価を測定し、対象者の社会属性、生活環境、家族やコミュニティとの繋がり等のファクターとの関連を検証する。

日本の農村部、特に交通の便がよくない離島や農村部地域でも過疎化、高齢化の進行に伴う成人病・孤独感の深刻化は大きな公衆衛生問題になりつつある。今回の調査で得られた中国の農村部の現場検証、現状解析や研究方法は、日本の農村部とともに離島を抱える長崎県においても、これからの公衆衛生対策や福祉保健対策を講じる手段として活用されることが期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、協力をしていただいた福建医科大学公衆衛生院張院長をはじめとする共同研究関係各位に感謝する。

参 考 文 献

1. Inoue Y, Yazawa A, Li D, Du J, Jin Y, Chen Y, Watanabe C and Umezaki M., Epstein-Barr virus titer and its association with the domain scores from the World Health Organization's Quality of Life Questionnaire: Findings from rural Hainan province, China. *American Journal of Human Biology* 26, 51-55, 2014.
2. Yazawa A, Inoue Y, Li D, Du J, Jin Y, Chen Y, Nishitani M, Watanabe C and Umezaki M., Impact of Lifestyle Changes on Stress in a Modernizing Rural Population in Hainan Island, China. *American Journal of Human Biology* 26, 36-42, 2014.

アレルギー様食中毒を惹起するヒスチジン脱炭酸酵素 における遺伝子解析

蔡 国喜、田栗 利紹、本多 隆

A comparative Study on Histidine Decarboxylase by using Molecular Cloning Analysis

Guoxi CAI, Toshitsugu TAGURI and Takashi HONDA

Key words: Histamine (Scombroid) fish poisoning, Histidine decarboxylase (HDC), Histamine forming bacteria

キーワード: アレルギー様食中毒、ヒスチジン脱炭酸酵素、ヒスタミン産生菌

BACKGROUND

Histamine fish poisoning is a food-borne chemical intoxication caused by the ingestion of histidine-rich scombroid fish such as tuna, bonito, and mackerel where histamine-producing bacteria (HPB) produce a large amount of histamine by the enzymatic activity¹⁾. It is an illness accompanied by a variety of symptoms, such as rash, nausea, diarrhea, flushing, sweating, and headache. Histamine is very stable even though it is heated. Hence, it is hard to prevent of histamine fish poisoning.

HPB have an enzyme named histidine decarboxylase (HDC) which can convert histidine to histamine^{2, 3)}. There are few reports on HDC of HPB isolated from the food responsible for histamine poisoning. Therefore, here we isolated HPBs from the fried kamaboko which is a cause of histamine poisoning incident at a nursery school in Nagasaki in Sep. 2008. And, we cloned *hdc* genes from the isolated HPB.

MATERIALS AND METHODS

1. Bacteria strains:

Morganella morganii JCM 1672 (standard strain); *M. morganii* EC-102 (isolated strain); *Raoultella planticola* ATCC 43176 (standard strain);

R. planticola EC-103 (isolated strain).

2. Total DNA isolation:

The histamine producing bacteria (2.0×10^9 cells) was used for total DNA isolation by DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's protocol.

3 PCR amplification of *hdc* genes:

The primers shown in table 1 were designed based on

the *hdc* genes from *M. morganii* and *R. planticola* (GenBank and NCBI accession number: AB259290.1, M62746.1). Veriti thermal cycler and AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) were used for amplification and the reaction was performed with 1 cycle of 10 min at 95°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, 2 min at 72°C, and 1 cycle of 7 min at 72°C. The PCR products separated by agarose gel electrophoresis were extracted from the gel using QIAEX II Gel Extraction kit (QIAGEN) and cloned into pGEM T-Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA).

DNA sequencing was carried out by the dideoxy chain termination method using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) with 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

RESULTS AND DISCUSSION

1. The *hdc* gene of *M. morganii* isolated strains

The *hdc* genes contained 1,137 bp ORF encoded 378 amino acid residues.

The DNA sequence had 34 base substitutions compared with standard strains, which caused 5 amino acid substitutions.

2. The *hdc* gene of *R. planticola* isolated strains

The *hdc* genes contained 1,137 bp ORF encoded 378 amino acid residues.

The DNA sequence had 4 base substitutions compared with standard strains, without amino acid substitution.

3. Comparison of HDC amino acid sequences of

M. morganii and *R. planticola*

Amino acid sequences have high identity more than

85% between both strains.

Both of them conserved the substrate binding site (His120), coenzyme binding site (Lys233) and active site (Ser323).

Further study is needed concerning below: the expression of recombinant HDC proteins in *E. coli* is needed for screening of HDC inhibitor.

Acknowledgements

This work cannot be conducted without the support from the department of marine biochemistry, Graduate school of Fisheries and Environmental Sciences, Nagasaki University.

参 考 文 献

- 1) Hajime Takahashi, Mami Ogai, Satoko Miya, Takashi Kuda, and Bon Kimura., Effects of environmental factors on histamine production in the psychrophilic histamine-producing bacterium *Photobacterium iliopiscarium*. Food Control Vol.52 2015.
- 2) Taylor, S. L., J. E. Stratton, and J. A. Nordlee, Histamine poisoning (scombroid fish poisoning): an allergy-like intoxication. Clin. Toxicol. 62:225-240, 1989.
- 3) Lehane L and Olley J. Histamine fish poisoning revisited. Int. J. Food Microbiol. 58:1-37, 2000.

上五島におけるインフルエンザウイルス AH3 の分子疫学解析

松本 文昭

Molecular Epidemiology of Influenza virus AH3 in Kamigoto Island

Fumiaki MATSUMOTO

Key word : Influenza virus, Molecular Epidemiology

キーワード: インフルエンザウイルス、分子疫学

はじめに

インフルエンザは、一般に冬季に流行する感染症であり、重症肺炎を含む急性呼吸器感染症の原因となることもある。

毎年、複数の季節性インフルエンザウイルス(AH1型、AH3型あるいはB型)が流行しているが、その中でもAH3型は、過去50年間ほとんどのシーズンで主要な流行型となっている¹⁾。

本県の五島列島を構成する上五島町は、人口約2.2万人を抱える離島であり、本土から約50km離れているため、本土地区等との人的交流によってインフルエンザの流行が起こると推察されている。そこで、上五島における唯一の病院である上五島病院を受診したインフルエンザ患者より採取された検体を用いて、2014/2015シーズンの主流行型であるインフルエンザウイルスAH3型のHemagglutinin 1 (HA1)遺伝子の塩基配列と詳細な患者情報を基盤とした分子疫学解析を行った。

尚、本研究は「成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究(厚生労働科学研究費補助金 研究代表者 大石和徳)」の研究協力として、国立感染症研究所等と共同で実施した。

調査方法

1 検査材料

2014/15シーズンに上五島病院を受診し、臨床所見および迅速診断キットの判定が陽性となった患者を対象とした。文書にて研究内容を説明し、同意の得られた対象患者のうち、同シーズンの主流行型であるAH3型が検出され、同一地域・同一集団での初発例、流行ピーク時、流行終息時の症例および孤発症例である237例を本研究の対象とした。

2 検査方法

対象患者の臨床検体から、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてウイルスRNAの抽出を行い、SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo) によりcDNAを合成した後、Ex Taq HS (TaKaRa) を用いてPCRを行った。PCRは、既報に従いHA1遺伝子領域(363bp)を対象としたプライマーを用いて増幅反応を行った²⁾。得られた増幅産物はBigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kitを用いて、ダイレクトシーケンシングを行い塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列のうち100%配列が一致し、かつ、各地域・集団での初発例および最終発症例ではない症例を除外した。その結果、臨床株64株に参照株としてワクチン株4株(2004/05、2007/08、2009/10、2014/15シーズン)を加えた、計68株を用いて、国立感染症研究所において、時系列分子系統樹解析が行われた。時系列分子系統樹解析には、Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC)法を用いた。本系統樹の作成においては、事前にmodel testを行い、最適化した条件下で系統樹が作成された。

結果及び考察

分子系統解析の結果、上五島では2014/15シーズンに2系統(Linage 1あるいは2)のAH3が流行していたことが明らかとなった(図1)。さらに、今回解析に供したAH3型のHA1遺伝子の解析領域における進化速度は、 1.04×10^{-2} substitution/site/yearであり、これは他の呼吸器ウイルス(RSウイルス)の主要抗原の進化速度と比較しても非常に速いことが示唆され^{3), 4), 5)}、インフルエンザウイルスAH3のHA1領域は、極めて速

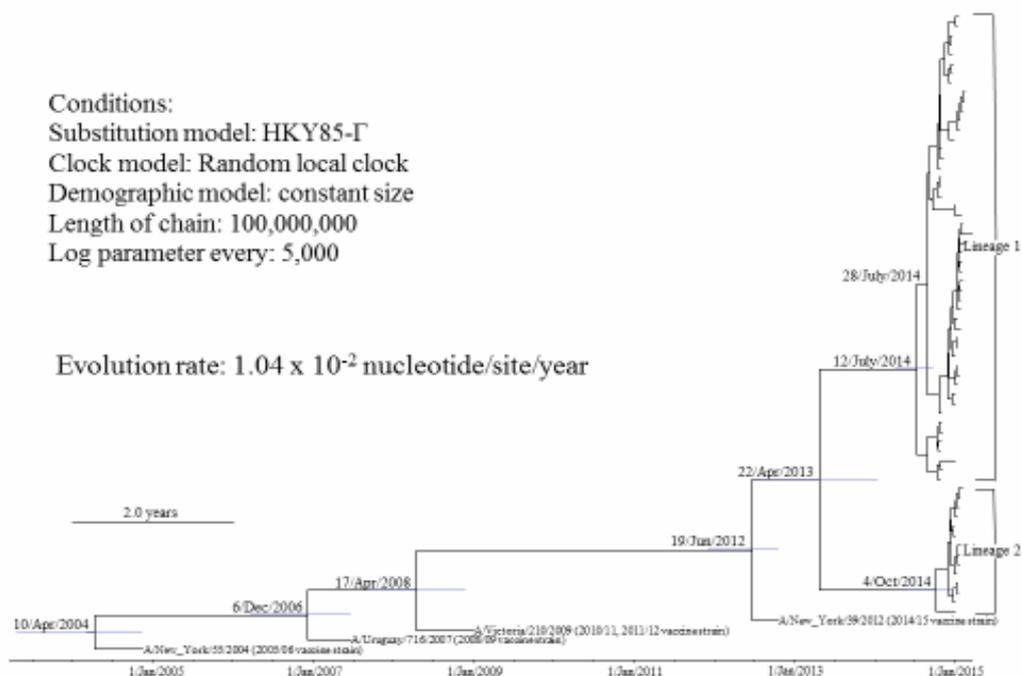


図 1. インフルエンザウイルス AH3 HA1 遺伝子時系列系統樹解析(MCMC 法)

い速度で進化していることが明らかになった。

各系統の患者在住地域、時系列的な患者発生データ、MCMC 法による系統解析および検出された AH3 の塩基配列を詳細に解析した結果、島内での時系列的な伝播が以下のように推定された(図 2)。まず、10 月下旬に青方地区から Lineage 1 由来株の流行が始まり、島南部にまで伝播し、その流行はいったん 11 月上旬には終息した。しかし、その後 12 月中旬から、10 月の流行原因となった株とは遺伝学的に異なる Lineage 1 由来の AH3 型が島中央部を中心に流行した。さらに、12 月下旬以降は上述した 2 つの株と遺伝学的に異なる Lineage 2 由来株が流行していた。以上のことから、調査期間中に上五島地域においては、2 系統の遺伝学的に多様な AH3 型が流行していたことが示唆された。

謝 辞

本解析を遂行するにあたり、厚生労働科学研究事業の研究代表者である大石 和徳先生(国立感染症研究所 感染症疫学センター長)をはじめ、技術的な指導、助言をいただいた研究分担者の木村 博一先生(同研究所 感染症疫学センター 第 6 室長)及び同事業の研究分担者、研究協力者に深謝する。

参 考 文 献

- 1) Wright PE, et al. Orthomyxoviruses; in Knipe DM, et al (eds): Fields Virology, ed 5, revised. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp 1691-740.
- 2) Saitoh M, et al. Molecular evolution of HA1 in influenza A (H3N2) viruses isolated in Japan from 1989 to 2006. *Intervirology*. 2008, **51**, 377-84.
- 3) Hirano E, et al. Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect Genet Evol*. 2014, **28**, 183-91.
- 4) Nagasawa K, et al. Molecular evolution of the hypervariable region of the attachment glycoprotein gene in human respiratory syncytial virus subgroup B genotypes BA9 and BA10. *Infect Genet Evol*. 2015, **36**, 217-23.
- 5) Kimura H, et al. Molecular evolution of hemagglutinin (H) gene in measles virus. *Sci Rep*. 2015, **5**, 11648.

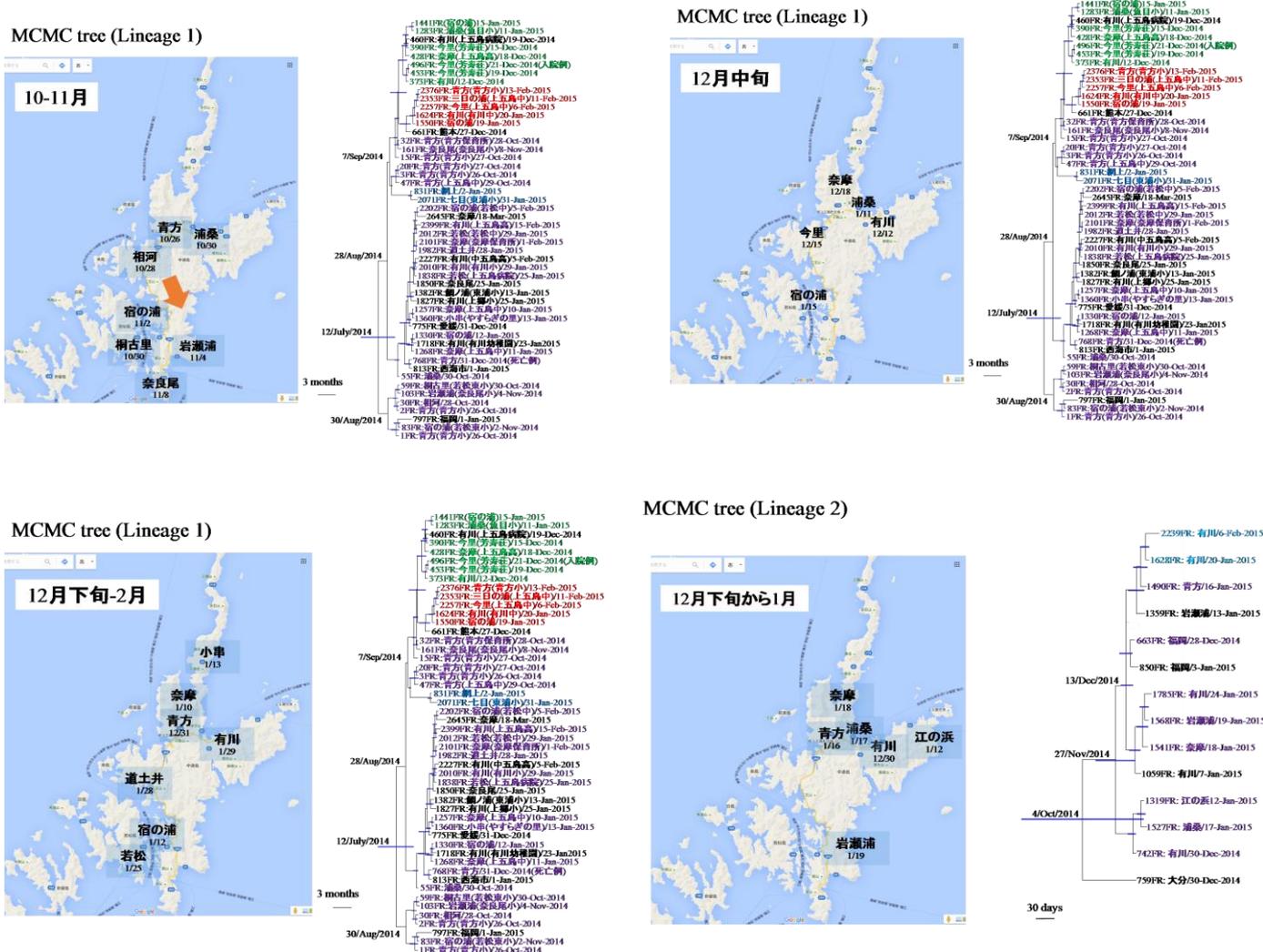


図 2. インフルエンザウイルス AH3 lineage1, 2 の上五島内における伝播の流れ

III 論文投稿・学会発表

III 論文投稿・学会発表

■ 論文 1

Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 32(6):977-83, 2015

A rapid method for tetrodotoxin (TTX) determination by LC-MS/MS from small volumes of human serum, and confirmation of pufferfish poisoning by TTX monitoring.

Kazunari Tsujimura & Kimiko Yamanouchi

Research Department, Division of Food and Drug Hygiene, Nagasaki Prefectural Institute for Environmental Research and Public Health, Omura, Nagasaki, Japan

A simple and rapid detection method for tetrodotoxin (TTX), a powerful sodium channel blocker, in small volumes of the serum of patients with pufferfish poisoning, was developed using an ultrafiltration spin column. The separation and identification of TTX was performed by liquid chromatography (LC) with a multi-mode ODS column and tandem mass spectrometry. TTX and an internal standard (voglibose) were monitored and quantitated using ion transitions: the respective precursor-to-product ion combinations, m/z 320/162 for TTX and 268/92 in MRM mode. The recoveries of TTX and voglibose were 91.0-110.8% and 104.7-107.4%, respectively, and with high accuracy (intra-run, 4.35-5.29%; inter-run, 2.95-5.79%) and linearity (0.5-200 ng/ml serum: $r = 0.9994$). The lower limit of quantification was 0.5 ng/ml serum. In patients, maximum serum TTX concentrations were 30.2 ng/ml serum for patient 1 on day 0 and 56.1 ng/ml serum for patient 2 on day 1. These results are important for the treatment of patients and for the identification of poisoning as well as for the determination of the cause of the food poisoning.

■ 論文 2

J Clin Microbiol. 53(8):2427-32, 2015.

***Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping.**

Iguchi A¹, Iyoda S², Seto K³, Morita-Ishihara T², Scheutz F⁴, Ohnishi M²; Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan.

¹Department of Animal and Grassland Sciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan iguchi@med.miyazaki-u.ac.jp.

²Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

³Division of Bacteriology, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka, Japan.

⁴Department of Microbiology Infection Control, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Escherichia* and *Klebsiella*, Statens Serum Institut,

Copenhagen, Denmark.

Members of Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan include the following ; Takenuma H, Fukuda O, Kitahashi T, Yokoyama E, Hirai S, Semba K, Nagata A, Ishiguro F, Etoh Y, Sera N, Kikuchi R, Makiko N, Yutaka S, Kawanishi S, Takeda Y, Yamada H, Imai K, Masuda K, Nagase T, Ogawa K, Ikeda T, Morimoto Y, Shimizu S, Kitagawa E, Kawakami K, Fukuda C, Iwashita Y, Arizuka M, Uchida J, Kuroki T, Homma S, Kubomura A, Sato H, Kojima Y, Harada S, Nagai Y, Hatakeyama T, Kawano K, Yoshino S, Kurogi M, Kasahara H, Sekiguchi M, Nishimura H, Tanabe S, Kawase M, Kikuyo O, Hiroshi N, Mari S, Nakajima H, Kawai H, Ohata R, Nakane K, Nakamura H, Nishikawa Y, Taguchi M, Yoshitake S, Kurazono T, Ishikawa K, Umehara S, Kono T, Kawakami Y, Ishida H, Kimata K, Isobe J, Okayama A, Saeki Y, Nakaoka K, Tominaga K, Yabata J, Kameyama M, Ogawa A, Matsumoto Y.

The O serogrouping of pathogenic *Escherichia coli* is a standard method for subtyping strains for epidemiological studies and enhancing phylogenetic studies. In particular, the identification of strains of the same O serogroup is essential in outbreak investigations and surveillance. In a previous study, we analyzed the O-antigen biosynthesis gene cluster in all known *E. coli* O serogroups (A. Iguchi *et al.*, DNA Res, 22:101-107, 2015, <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/dsu043>). Based on those results, we have arranged 162 PCR primer pairs for the identification or classification of O serogroups. Of these, 147 pairs were used to identify 147 individual O serogroups with unique O-antigen biosynthesis genes, and the other 15 pairs were used to identify 15 groups of strains (Gp1 to Gp15). Each of these groups consisted of strains with identical or very similar O-antigen biosynthesis genes, and the groups represented a total of 35 individual O serogroups. We then used the 162 primer pairs to create 20 multiplex PCR sets. Each set contained six to nine primer pairs that amplify products of markedly different sizes. This genetic methodology (*E. coli* O-genotyping PCR) allowed for comprehensive, rapid, and low-cost typing. Validation of the PCR system using O-serogroup references and wild strains showed that the correct O serogroups were specifically and accurately identified for 100% (182/182) and 90.8% (522/575) of references and wild strains, respectively. The PCR-based system reported here might be a promising tool for the subtyping of *E. coli* strains for epidemiological studies as well as for the surveillance of pathogenic *E. coli* during outbreaks.

■ 論文 3

Journal of Diabetes Research. Volume 2015, Article ID 675201, 2015.

Polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* Improve Glucose Metabolism in Diabetic Rats

Wenting Lin,¹ Wenxiang Wang,^{2,3,*} Guoxi Cai,^{4,5} and Aoyagi Kiyoshi⁶

¹Department of Nutrition and Health Care, School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350108, China

²Department of Health Inspection and Quarantine, School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350108, China

³Fujian Province Key Laboratory of Environment and Health, School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350108, China

⁴Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852-8523, Japan

⁵Nagasaki Prefectural Institute of Environmental Research and Public Health, Nagasaki 2-1306-11, Japan

⁶*Department of Public Health, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki 852-8523, Japan*

This study investigated the effects of polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* (PEP) on glucose metabolism in a rat model of diabetes mellitus (DM). PEP (0, 150, 300, and 600 mg/kg) was administered intragastrically to rats for four weeks. After treatment, fasting blood glucose (FBG) and insulin (INS) levels were measured, and the insulin sensitivity index (ISI) was calculated. The morphopathological changes in the pancreas were observed. Serum samples were collected to measure the oxidant-antioxidant status. The mRNA expression levels of glucokinase (GCK) and insulin receptor (InsR) in liver tissue and glucose transporter type 4 (GLUT-4) and adiponectin (APN) in adipose tissue were determined. Compared with the model group, the FBG and INS levels were lower, the ISI was higher, and the number of islet β -cells was significantly increased in all the PEP groups. In the medium- and high-dose PEP groups, MDA levels decreased, and the enzymatic activities of SOD and GSH-Px increased. The mRNA expression of InsR and GCK increased in all the PEP groups; APN mRNA expression increased in the high-dose PEP group, and GLUT-4 mRNA expression increased in adipose tissue. These findings suggest that PEP is a potential therapeutic agent that can be utilized to treat DM.

■ 論文 4

Infection, Genetics and Evolution. **35**:82–88, 2015.

Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation

Junji Seto ^a, Takayuki Wada^b, Tomotada Iwamoto ^c, Aki Tamaru ^d, Shinji Maeda ^e,
Kaori Yamamoto ^{f,g}, Atsushi Hase ^f, Koichi Murakami ^h, Eriko Maeda ^h, Akira Oishi ^h, Yuji Migita ⁱ, Taro Yamamoto ^{b,g}, Tadayuki Ahiko ^a

a Department of Microbiology, Yamagata Prefectural Institute of Public Health, 1-6-6 Toka-machi, Yamagata-shi, Yamagata 990-0031, Japan

b Department of International Health, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki 852-8523, Japan

c Department of Microbiology, Kobe Institute of Health, 4-6 Minatojima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe 650-0046, Japan

d Department of Microbiology, Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

e School of Pharmacy, Hokkaido Pharmaceutical University, 7-15-4-1 Maeda, Teine-ku, Sapporo, Hokkaido 006-8590, Japan

f Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

g Department of International Health, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki 852-8523, Japan

h Department of Health Science, Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan

i Department of Microbiology, Nagasaki Prefectural Institute for Environmental Research and Public

Health, 2-1306-11 Ikeda, Ohmura, Nagasaki 856-0026, Japan

Intra-species phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* has been regarded as a clue to estimate its potential risk to develop drug-resistance and various epidemiological tendencies. Genotypic characterization of variable number of tandem repeats (VNTR), a standard tool to ascertain transmission routes, has been improving as a public health effort, but determining phylogenetic information from those efforts alone is difficult. We present a platform based on maximum a posteriori (MAP) estimation to estimate phylogenetic information for *M. tuberculosis* clinical isolates from individual profiles of VNTR types.

This study used 1245 *M. tuberculosis* clinical isolates obtained throughout Japan for construction of an MAP estimation formula. Two MAP estimation formulae, classification of Beijing family and other lineages, and classification of five Beijing sublineages (ST11/26, STK, ST3, and ST25/19 belonging to the ancient Beijing subfamily and modern Beijing subfamily), were created based on 24 loci VNTR (24Beijing-VNTR) profiles and phylogenetic information of the isolates. Recursive estimation based on the formulae showed high concordance with their authentic phylogeny by multi-locus sequence typing (MLST) of the isolates. The formulae might further support phylogenetic estimation of the Beijing lineage *M. tuberculosis* from the VNTR genotype with various geographic backgrounds. These results suggest that MAP estimation can function as a reliable probabilistic process to append phylogenetic information to VNTR genotypes of *M. tuberculosis* independently, which might improve the usage of genotyping data for control, understanding, prevention, and treatment of TB.

■ 論文 5

全国環境研会誌 vol.40 No.4(2015) 179-185

もみ殻炭のリン除去効果の検証

船越章裕¹, 玉屋千晶¹, 成田修司², 山内康生¹

1 長崎県環境保健研究センター 2 秋田県健康環境センター

圃場からの排水中のリンの除去を目的に、干拓地排水(遊水池)においてリン吸着に効果のあるカルシウム含有もみ殻炭(秋田県特許)を利用し、当該もみ殻炭のリン除去効果についてフィールドでの検証を行った。試験は上向流式レーンで実施した。その結果、もみ殻炭 1g 当たりのリン除去効果は約 1 カ月で小さくなるが、もみ殻炭を 1 カ月ごとに攪拌することで 4 カ月間は持続すること、また攪拌時にもみ殻炭が湿潤状態を脱するほどリン除去効果が回復しやすいことが確認された。

■ 論文 6

Journal of Infectious Diseases. **212** (6): 889-98, 2015.

Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan

T. Yoshikawa¹, M. Shimojima¹, S. Fukushi¹, H. Tani¹, A. Fukuma¹, S. Taniguchi¹, H. Singh¹, Y. Suda¹, K.

Shirabe², S. Toda², Y. Shimazu³, T. Nomachi⁴, M. Gokuden⁵, T. Morimitsu⁶, K. Ando⁷, A. Yoshikawa⁸, M. Kan⁹, M. Uramoto¹⁰, H. Osako¹¹, K. Kida¹², H. Takimoto¹³, H. Kitamoto¹⁴, F. Terasoma¹⁵, A. Honda¹⁶, K. Maeda¹⁷, T. Takahashi¹⁸, T. Yamagishi¹⁹, K. Oishi¹⁹, S. Morikawa²⁰ and M. Saijo¹

¹ *Special Pathogens Laboratory, Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases.*

² *Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment.*

³ *Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Public Health and Environment Center.*

⁴ *Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment.*

⁵ *Kagoshima Prefectural Institute for Environmental Research and Public Health.*

⁶ *The Public Institute of Kochi Prefecture.*

⁷ *Saga Prefectural Institute of Public Health and Pharmaceutical Research.*

⁸ *Nagasaki Prefectural Institute for Environmental Research and Public Health, Omura-shi.*

⁹ *Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Matsuyama-shi.*

¹⁰ *Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Centre.*

¹¹ *Kumamoto Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Uto-shi.*

¹² *Okayama Prefectural Institute for Public Health and Environmental Science.*

¹³ *Shimane Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Matsue-shi.*

¹⁴ *Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, Hyogo-ku Kobe-shi.*

¹⁵ *Wakayama Prefectural Research Center of Environment and Public Health.*

¹⁶ *Oita Prefectural Institute of Health and Environment.*

¹⁷ *Laboratory of Veterinary Microbiology, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University.*

¹⁸ *Department of Hematology, Yamaguchi Grand Medical Center, Hofu-shi.*

¹⁹ *Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases.*

²⁰ *Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.*

BACKGROUND: Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) is a tick-borne acute infectious disease caused by the SFTS virus (SFTSV). SFTS has been reported in China, South Korea, and Japan as a novel Bunyavirus. Although several molecular epidemiology and phylogenetic studies have been performed, the information obtained was limited, because the analyses included no or only a small number of SFTSV strains from Japan.

METHODS: The nucleotide sequences of 75 SFTSV samples in Japan were newly determined directly from the patients' serum samples. In addition, the sequences of 7 strains isolated in vitro were determined and compared with those in the patients' serum samples. More than 90 strains that were identified in China, 1 strain in South Korea, and 50 strains in Japan were phylogenetically analyzed.

RESULTS: The viruses were clustered into 2 clades, which were consistent with the geographic distribution. Three strains identified in Japan were clustered in the Chinese clade, and 4 strains identified in China and 26 in South Korea were clustered in the Japanese clade.

CONCLUSIONS: Two clades of SFTSV may have evolved separately over time. On rare occasions, the viruses were transmitted overseas to the region in which viruses of the other clade were prevalent.

KEYWORDS: Bunyavirus; SFTS; SFTS virus; severe fever with thrombocytopenia syndrome; tick-borne virus infection

■ 論文 7

ICES (International Council for the Exploration of the Sea) CM 2015/R:04

Scientific knowledge of physical causes and ecological consequences of hypoxia in an enclosed bay as a basis for regional management planning

Hideaki Nakata¹, Hirokazu Suzaki², Sangdeok Chung³ and Hitoshi Yamaguchi⁴

1: Faculty of Fisheries, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

2: Faculty of Engineering, Kyushu University, Japan

3: National Fisheries Research & Development Institute, Korea

4: Nagasaki Prefectural Institute for Environmental Research and Public Health, Japan

Physical mechanisms of bottom hypoxia formation and movement in Omura Bay, an enclosed bay in the western Japan, were investigated using existing field data and a numerical simulation. It was revealed that density-driven water inflow from outer to inner bay could play a crucial role in the hypoxia formation in the bay, and also in the inshore movement of hypoxia during the transitional period from summer to autumn, occasionally causing serious damage to fisheries resources in the shallow water. Long-term increase in the volume of hypoxic water and subsequent contraction of potential habitat volume could be responsible for simplified fish community structure as seen in the fisheries landings. Practical field experiments aiming at restoring hypoxic environment by aeration from the sea bottom in combination with bio-remediation in the shallow water has been started in cooperation with local government of Nagasaki Prefecture as a part of the 5-year Action Plan for Environmental Conservation and Regional Promotion of Omura Bay.

■ 論文 8

Tropical Medicine and Health. **44**: 8-17, 2016.

Molecular and serological epidemiology of Japanese encephalitis virus (JEV) in a remote island of western Japan: an implication of JEV migration over the East China Sea

A. Yoshikawa^{1,2,3}, T. Nabeshima², S. Inoue², M. Agoh² and K. Morita²

¹Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki, Japan.

²Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki, Japan.

³Department of Public Health, Nagasaki Prefectural Institute for Environmental Research and Public Health, Nagasaki, Japan.

Background: Japanese encephalitis (JE) is a mosquito-borne infectious disease caused by Japanese encephalitis virus (JEV). About 1–10 cases with severe central nervous system symptoms have been constantly reported every year in Japan. To clarify the mechanism of maintenance of JEV, the present study surveyed pigs for serological evidence of JEV infection and isolated JEV strains from pigs and

mosquitoes in Isahaya City (Isahaya) and Goto City (Goto) in the islets of Goto in Nagasaki Prefecture from 2008 to 2014.

Results: The serological survey of pigs showed the increase of IgM sero-positivity against JEV in July or August, and it was maintained until October or November in both Isahaya and Goto every year. There were 47 JEV strains isolated in Nagasaki from 2001 to 2014 including the isolates in this study, and they belonged to genotype 1. Thirty four of the isolated strains were from pigs in Isahaya and were classified under six subclusters (1-A-1, 1-A-2, 1-A-3, 1-A-4, 1-A-5, and 1-A-9). Thirteen strains were isolated from pigs and mosquitoes in Goto and were classified into three subclusters (1-A-5 (2008); 1-A-1 (2009); and 1-A-2). In the subcluster 1-A-2, three different monophyletic subgroups, 1-A-2-2 (2010), 1-A-2-3 (2011), and 1-A-2-1 (2013, 2014), appeared in Goto.

Conclusions: These data strongly suggested that JEV appearance in Goto seems to depend on the frequent introduction of JEV from outside of the island and this pattern is different from what has been observed in subtropical islands in the East China Sea such as Okinawa and Taiwan, where the same populations of JEV (1-A-7 (1998–2008) in Okinawa; genotype 3 (until 2012) in Taiwan) have been maintained for a long period.

Keywords: Japanese encephalitis virus, Remote island, Goto, Isahaya, Nagasaki, Maximum-likelihood phylogenetic tree, Subcluster

■ 論文 9

PLOS Neglected Tropical Diseases. 10(4):e0004595. 2016.

Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Antigen Detection using Monoclonal Antibodies to the Nucleocapsid Protein

A. Fukuma¹, S. Fukushi¹, T. Yoshikawa¹, H. Tani¹, S. Taniguchi¹, T. Kurosu¹, K. Egawa¹, Y. Suda¹, H. Singh¹, T. Nomachi², M. Gokuden³, K. Ando⁴, K. Kida⁵, M. Kan⁶, N. Kato⁷, A. Yoshikawa⁸, H. Kitamoto⁹, Y. Sato¹⁰, T. Suzuki¹⁰, H. Hasegawa¹⁰, S. Morikawa¹¹, M. Shimojima¹, and M. Saijo¹

¹ Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan,

² Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment, Miyazaki, Japan,

³ Kagoshima Prefectural Institute for Environmental Research and Public Health, Kagoshima, Japan,

⁴ Saga Prefectural Institute of Public Health and Pharmaceutical Research, Saga, Japan,

⁵ Okayama Prefectural Institute for Public Health and Environmental Science, Okayama, Japan,

⁶ Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Ehime, Japan,

⁷ Health and Sanitation Office, Tottori Prefecture Institute of Public Health and Environmental Science, Tottori, Japan,

⁸ Nagasaki Prefectural Institute for Environmental Research and Public Health, Nagasaki, Japan,

⁹ Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, Hyogo-ku Kobe-shi, Japan,

¹⁰ Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan,

¹¹ Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

Background Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) is a tick-borne infectious disease with a high case fatality rate, and is caused by the SFTS virus (SFTSV). SFTS is endemic to China, South Korea, and Japan. The viral RNA level in sera of patients with SFTS is known to be strongly associated

with outcomes. Virological SFTS diagnosis with high sensitivity and specificity are required in disease endemic areas.

Methodology/Principal Findings We generated novel monoclonal antibodies (MAbs) against the SFTSV nucleocapsid (N) protein and developed a sandwich antigen (Ag)-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of N protein of SFTSV using MAb and polyclonal antibody as capture and detection antibodies, respectively. The Ag-capture system was capable of detecting at least 350–1220 TCID₅₀/100 µl/well from the culture supernatants of various SFTSV strains. The efficacy of the Ag-capture ELISA in SFTS diagnosis was evaluated using serum samples collected from patients suspected of having SFTS in Japan. All 24 serum samples (100%) containing high copy numbers of viral RNA (>10⁵ copies/ml) showed a positive reaction in the Ag-capture ELISA, whereas 12 out of 15 serum samples (80%) containing low copy numbers of viral RNA (<10⁵ copies/ml) showed a negative reaction in the Ag-capture ELISA. Among these Ag-capture ELISA-negative 12 samples, 9 (75%) were positive for IgG antibodies against SFTSV.

Conclusions The newly developed Ag-capture ELISA is useful for SFTS diagnosis in acute phase patients with high levels of viremia.

■ 学会発表 1

日本防菌防黴学会 第42回年次大会 2015年9月1日～2日 大阪府豊中市千里ライフサイエンスセンター

LC EMA-qPCR 法 (レジオネラ生菌迅速検査法) に与える夾雑菌の影響

浦山みどり¹、田栗利紹¹、石本陽介¹、金谷潤一²、倉文明³

¹長崎県環境保健研セ・保健科、²富山衛研・細菌部、³国立感染研・細菌第一部

【目的】レジオネラ属菌の検査は一般的に平板培養法が用いられているが、結果が判明するまでに7～10日を要するため、レジオネラ属菌の遺伝子を検出する迅速検査法の開発が進められている。我々はLiquid culture ethidium monoazide quantitative polymerase chain reaction (以下LC EMA-qPCR) によるレジオネラ生菌迅速検査法を開発し¹⁾、その有用性を検討している。その中で、汚染ろ材を用いた実験モデルを独自に作製し、循環式浴槽でのレジオネラ自然汚染を再現した浸漬式実験において、レジオネラ属菌の定量値に、発生する夾雑菌が与える影響を検討したので報告する。

【方法】浸漬式実験モデルは観賞用水槽を用いて作製した。即ち、水と汚染ろ材を一定温度(40～42℃)で攪拌して、レジオネラ属菌発生に適する環境を作り出した。水槽の水は、水道水を使用し、ろ材は入浴施設から入手した汚染ろ材(多孔質ろ材と砂の混合物、客数500人/日規模の入浴施設で約6年間使用したろ材)を用い、水きりネットで包装したものを水槽に浸漬させた。採水は実験開始から経時的に10日間行い、100倍濃縮した検体についてATP量を測定した。前処理は熱処理(50℃、20分間)をした後、酸処理(0.2M HCl・KCl buffer, pH2.2を等量添加、室温5分間)を行った。平板培養法は新版レジオネラ防止指針に基づき実施し、LC EMA-qPCR法は、1,000倍濃縮液及び100倍濃縮液の両方について、レジオネラ生菌遺伝子迅速検査システム(タカラバイオ)に従い実施した。

【結果】今回行った一連の実験でレジオネラ属菌が検出された検体において、1,000倍濃縮液と100倍濃縮液で実施した場合の平板培養法とLC EMA-qPCR法の菌数(定量値)をそれぞれ比較すると、1,000倍濃縮液は $R^2=0.916$ 、100倍濃縮液は $R^2=0.9926$ とどちらも高い相関が示されたが、100倍濃縮液の方が1,000倍濃縮液より高い相関が認められた。そこで1,000倍濃縮液と100倍濃縮液の定量値の差が10 CFU/100ml以上ある検体のATP量をみると、すべての検体において4,000 RLU/10ml以上であった。今回の実験で得られたレジオネラ属菌の定量において、平板培養法とLC EMA-qPCR法の高い相関が示された。また、LC EMA-qPCR法を実施するにあたり、ある一定以上のATP量になると、定量値に影響があると考えられ、本実験では、それが4,000 RLU/10ml以上であった。したがって、LC EMA-qPCR法では1,000倍濃縮液よりも100倍濃縮液の方が夾雑菌の影響を受けにくいと推察された。本研究は、厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)により実施された。

【文献】

1) 倉文明ら: 公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究、厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業) 平成24年度 総括・分担研究報告書P.71(2013)

■ 学会発表 2

日本防菌防黴学会 第42回年次大会 2015年9月1日～2日 大阪府豊中市千里ライフサイエンスセンター

アレルギー様食中毒の原因微生物と特定しうるヒスタミン産生菌の分離株に対するカテキン類の抗菌活性

田栗 利紹¹、石原 雅行^{1*}、蔡 国喜¹、吉田 朝美²、長富 潔²、本多 隆¹

¹長崎環境研セ、²長崎大院水環 (*現所属 長崎諫早食肉検)

【目的】Histamine Producing Bacteria (以下 HPB) は食中毒の原因微生物に指定されていないため、行政としての事件の調査はヒスタミン定量で終息することが多く、HPB の分離はもちろん、その Histidine decarboxylase (以下 HDC) について遺伝学的変異を解析した例は少ない。また、HPB に対する抗菌作用や HDC 発現抑制作用は特定の食品添加物や製油について知られるのみである。我々は食中毒事件で高濃度ヒスタミンが検出された食品原料から HPB クローンを徹底的に分離し、それらの HDC 遺伝子の塩基配列に基づいて、いくつかの細菌株を同定した。さらにヒスタミン産生阻害や抗酸化活性が知られる(+) Catechin (以下 C) とその類縁物質に着目し、分離株に対する抗菌活性を調査した。

【方法】1000 mg/L のヒスタミンが検出されたことによりアレルギー様食中毒と特定された事件の魚肉練り製品原料から Takahashi ら¹⁾の方法に準拠して HPB を検出した。即ち、検体を histidine broth に加えて増菌し、Niven の培地に塗抹した後、紫から青色調のコロニーを呈して HDC 遺伝子を保持する株を HPB 株とした。全ての株を同定するとともに、Kanki ら²⁾に準じて HDC 遺伝子の塩基配列決定を行い演繹アミノ酸配列の異なる菌株を分離菌とした。抗菌活性実験には、C、(-) Epigallocatechin gallate (以下 EGCG)、Gallic acid (以下 GA) および Green tea extract (以下 GTE) を用いた。上記により分離した *Morganella morganii*、および *Raoultella planticola* に加えて、これらと性質の異なる HPB として知られる *Photobacterium damsela*、および *Photobacterium phosphoreum* に対する抗菌活性を Minimum inhibitory concentration (以下 MIC) 法により評価した。

【結果】魚肉練り製品の原料から 110 株の HDC 遺伝子陽性クローンを検出した。検出菌における HDC 遺伝子の部分塩基配列を決定 (504bp) し演繹アミノ酸配列を比較解析した結果、2 株の *M.morganii* と 1 株の *R.planticola* を同定した。*M.morganii* の分離株に対して最も強い抗菌活性を示した EGCG の MIC は 100 mg/L であった。*M.morganii* は *R.planticola* よりもカテキン類に対する感受性が高く、その強度は EGCG > GTE > C の順であった。GA は全体的に比較的高い感受性を示したが、中温菌に対して高濃度での活性が消失した。各化合物は *M.morganii* や *R.planticola* よりも *P.damsela* と *P.phosphoreum* に感受性が高い傾向を示した。カテキン類に対して、*M.morganii* では分離株は標準株よりもやや抵抗性を示したが、*R.planticola* には分離株と標準株との間に差を認めなかった。

今後、分離株のヒスタミン産生能の比較、遺伝子組換えによる HDC タンパク質の発現・精製、および組換え HDC に対するカテキン類の阻害作用を明らかにすることにより、アレルギー様食中毒予防に寄与したい。

【文献】

- 1) Takahashi ら: Applied and environmental microbiology, pp. 2568-79 (2003)
- 2) Kanki ら: Applied and environmental microbiology, pp. 1467-73 (2007)

■ 学会発表 3

平成 27 年度全国環境研協議会廃棄物資源循環学会年会併設研究発表会 2015 年 9 月 3 日 九州大学

バイオメタノールを活用した BDF 製造技術の検討

富永勇太

【はじめに】バイオディーゼル燃料(以下、BDF という。)とは、菜種油等の植物油、廃食用油を原料として製造されたディーゼル燃料である。廃食用油から BDF を製造する方法としては、アルカリ触媒下でメタノールを作用させるエステル交換反応が主流である。このとき、原料としてメタノールが必要となるが、一般的に使用されているのは工

業用メタノール、つまり化石燃料由来のものであり、これを使用して製造された BDF は、メタノール分だけ新たに二酸化炭素を排出するため、厳密にはカーボンニュートラルとは言えない。長崎県内においては近年、民間企業によりバイオメタノール製造装置の開発が行われ、実用化がされている。ここで製造されるバイオメタノールを使用することで、より二酸化炭素排出量の少ない BDF の製造が実現できるが、工業用メタノールの純度が 99.9%であるのに対し、このバイオメタノールの純度は 95%程度(残り 5%はほとんど水分)であり、従来の BDF 製造方法では、品質の良い BDF を製造するのは難しいと考えられる。そこで今回、より二酸化炭素排出量の少ない BDF の製造技術を確立させることを目的として、バイオメタノールを活用した BDF 製造試験を実施したので、結果について報告する。

【方法】BDF 製造試験に必要なバイオメタノールは、長崎県内で唯一製造を行っている民間企業のものを使用した。また、エステル交換反応に必要となるアルカリ触媒については、試薬特級の水酸化カリウム(KOH)を用いた。BDF の製造は、ピーカーレベルで廃食用油を 200mL として、バイオメタノール量と KOH 量を変えることにより実施し、良好な品質の BDF が製造できる条件について検討した。製造した BDF の品質については、BDF の主成分である脂肪酸メチルエステル(FAME)の含有量を測定し、90%を超えるものを良好な品質の BDF として評価した。FAME 含有量の分析方法は欧州規格 EN14103 に従い、ガスクロマトグラフにより分析した。

【結果】通常の工業用メタノールで BDF を製造するときと同様の条件(廃食用油量 200mL に対しメタノール量 40mL、KOH 量 2.0g)でバイオメタノールを用いて BDF 製造試験を行ったところ、工業用メタノールを用いて製造したときの FAME 含有量が 91%であったのに対し、バイオメタノールを用いて製造したものは 88%であり、良好な品質の BDF は得られなかった。そこで、バイオメタノール量を 40mL から 50mL に増やして製造したところ、FAME 含有量は 91%となり、良好な品質の BDF が製造できることが示唆された。次に、バイオメタノール量を 40mL として、KOH 量を増やして製造したところ、KOH 量が増えるほど製造した BDF の FAME 含有量も向上するという結果が得られた。そこで、バイオメタノール量と KOH 量をどちらも増やして BDF 製造を行ったところ、FAME 含有量が 93%とバイオメタノールを使用した中でも最も良好な品質の BDF が得られた。製造にかかるコスト等も考慮し、廃食用油量 200mL に対しバイオメタノール量 50mL、KOH 量 2.4g を投入するのが最適な製造条件と考えられた。今後は長崎県内の BDF 製造者に協力していただき、実際の製造スケールでバイオメタノールを使用した BDF 製造を実施する予定である。

■ 学会発表 4

平成 27 年度全国環境研協議会廃棄物資源循環学会年会併設研究発表会 2015 年 9 月 3 日 九州大学

もみ殻炭によるリン除去効果の検証

玉屋千晶¹⁾、船越章裕¹⁾、富永勇太¹⁾、山内康生¹⁾、成田修司²⁾
長崎県環境保健研究センター¹⁾、秋田県健康環境センター²⁾

諫早湾干拓事業に伴い諫早湾奥部が潮受堤防により締め切られ、諫早湾干拓調整池が創出された。調整池には水質保全目標が設定され、目標達成のために様々な対策が展開されている。秋田県が開発したカルシウム含有もみ殻炭は、リン酸イオンを選択的に回収する機能を持つだけでなく、リン回収後に肥料や土壌改良材として再利用可能である。今回新干拓地内ほ場を通過した浸透水が集合する遊水池(最終的に調整池へ放流される)において、諫早湾干拓調整池への水質汚濁負荷削減に向けた適応手法の一環として、水質浄化材としての活用が期待できるもみ殻炭のリン除去効果について検証した。中央遊水池においてフィールド施設(もみ殻炭充填レーン)を設置し、9月～1月まで遊水池の水を通水し、通水前後の T-P 濃度より効果検証をおこなった。試験概要を表1に、実験施設の概略図を図1に示す。

表1 試験概要

試験期間	(第1期) 2013年9月10日～12月24日 (第2期) 2014年7月15日～11月18日
調査頻度	0日、1日後、2日後、1週間後、以降 1週間おきに調査
通水方式	下横向流式
設定流量	5 L/min (滞留時間は約1日)
調査項目	全りん (T-P)、りん酸態りん (PO ₄ -P) および浮遊物質 (SS)

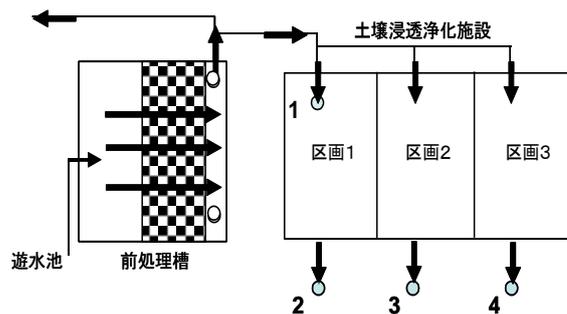


図1 遊水池実験施設外略図

試験の結果、以下のことが明らかになった。

- 1) T-P 除去率、PO₄-P 除去率の結果から、リン除去効果が最も高いのは、もみ殻炭のみの試験区であった。土壌のみの区画でも一定のリン除去効果があることがわかった。
- 2) もみ殻炭のみの試験区では攪拌することで、低下したリン除去率が再び上昇すること明らかになった。
- 3) 土壌のみの区画、土壌ともみ殻炭の区画において、T-P 吸着除去率、SS 除去率は、昨年度より上昇したが、植物の繁茂状態が昨年度よりも良好であったことが影響していると考えられた。
- 4) 植物の生育によるリン吸収効果は、土壌のみの試験区で 15% 見られた。土壌ともみ殻炭の試験区では、19% の差が生じたが、これはもみ殻炭と植物によるリン除去効果と考えられた。

■ 学会発表 5

第120回日本畜産学会 2015年9月12日 札幌グランドホテル

肥育牛の生検皮下脂肪材料を用いた脂肪酸組成推定の可能性

橋元大介¹・辻村和也²・早田 剛¹

(1 長崎県農林技術開発センター、2 長崎県環境保健研究センター)

【目的】牛肉中の脂肪酸組成は、美味しさに関与するとされている。一方、我々は第116回大会で、出荷1ヵ月前の肥育牛の最後位胸椎位胸最長筋から得られた生検筋肉材料の粗脂肪含量によって BMS No.を推定する可能性を報告した。そこで、生検法を用いた生体時肥育牛脂肪酸組成分析の可能性を明らかとするために、生体から生検皮下脂肪材料を採取し、その脂肪酸組成と枝肉の脂肪酸組成との関係を調査した。

【方法】黒毛和種去勢牛 18 頭、乳用種去勢牛 5 頭および交雑種去勢牛 5 頭の計 28 頭(26.6±5.1 ヶ月齢)を供試し、出荷約 1 ヶ月前に生体左側の最後位胸椎位から頭部方向へ生検針(11G×150 mm)を皮下脂肪に対して水平に差し込み、皮下脂肪材料約 20 mm が採取されるまで数回穿刺した。この生検皮下脂肪材料と枝肉の第 6-7 肋骨間皮下脂肪および筋間脂肪の脂肪酸をガスクロマトグラフにより測定し、それらの脂肪酸割合の関係を調べた。

【結果】枝肉の皮下脂肪と筋間脂肪の不飽和脂肪酸割合の間に有意な正の相関が認められた($r=0.81$, $P<0.01$)。また、生検皮下脂肪材料と枝肉皮下脂肪の不飽和脂肪酸割合との間にも有意な正の相関が認められた($r=0.83$, $P<0.01$)。以上より、出荷 1 ヶ月前の肥育牛の最後位胸椎位から得られた生検皮下脂肪材料の脂肪酸割合によって、出荷後の牛肉中脂肪酸割合を推定する可能性が示唆された。

■ 学会発表 6

大気環境学会 2015 年 9 月 15 日～17 日 早稲田大学

長崎県の春季 PM_{2.5} 成分分析結果について —炭素成分を中心に—

○田村圭¹⁾, 土肥正敬¹⁾, 浅川大地²⁾, 山本重一³⁾, 鶴野伊津志⁴⁾

1) 長崎県環境保健研究センター, 2) 大阪市立環境科学研究所, 3) 福岡県保健環境研究所, 4) 九州大学

【はじめに】長崎県は九州北西部に位置し、大陸方向からの大気の流れにより、長距離輸送される黄砂や PM_{2.5} の影響を受けやすい。特に 3 月～5 月は高濃度の PM_{2.5} が観測されており、その寄与は硫酸塩が最も大きい、炭素成分も多くを占める。炭素成分の起源を検討するため、有機炭素 (OC)、元素状炭素 (EC) に加え、光化学生成粒子の指標とされる水溶性有機炭素 (WSOC)、しゅう酸や植物燃焼の指標とされるレボグルコサンを測定した。

【方法】2014 年 2 月中旬から 3 月は諫早 (諫早市、諫早局)、2014 年 5 月は大村 (大村市、環境保健研究センター) 及び五島 (五島市、五島局) で PM_{2.5} サンプラー (諫早: 柴田科学 LV-250、大村及び五島: 東京ダイレック FRM2025) を用いて石英ろ紙及び PTFE ろ紙に 24 時間サンプリングを行った。(図 1) 石英ろ紙は、イオン成分 (Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, しゅう酸, Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺)、OC、EC、WSOC、レボグルコサンの測定に使用した。イオン成分はイオンクロマトグラフを使用し、OC 及び EC は熱分離・光学補正式炭素分析装置、IMPROVE プロトコルを用い、分析中の OC 炭化は反射光で補正した。レボグルコサンはイオンクロマトグラフィー質量分析 (IC/MS) 法により測定した。WSOC は超純水による抽出後、TOC 計により測定した。PTFE ろ紙は無機元素成分を ICP-MS 法により測定するために用いた。それぞれ PM_{2.5} 重量濃度及びその他の常時監視項目は、県常時監視局 (諫早局、五島局、大村局) の値を用いた。



図 1 サンプリング地点

【結果と考察】期間中の各地点における炭素成分 (OC+EC) は、PM_{2.5} 重量濃度に対して、諫早 26%、五島 16%、大村 19% を占めていた。OC と EC はいずれの地点もよい相関を示し ($r^2=0.86\sim0.91$)、期間中の OC/EC 比の平均値は、諫早 (2.0) 五島 (2.0) 大村 (2.7) であった。採取時期は異なるもののその値は既報¹⁾²⁾の値を参考にした場合、石炭燃焼の寄与が大きいことを示していた。しかし光化学反応の寄与等を考慮する必要がある。2 月から 3 月に諫早で観測した炭素成分の経日変化を示す (図 2)。EC や OC、WSOC 濃度の上昇に連動してレボグルコサン濃度の上昇が観測された。この期間のレボグルコサンの平均値は、49 ng/m³ (2~155 ng/m³) であり、やや高めではあるものの 2002 年から 2003 年にかけて済州島で観測された値³⁾と近い値を示した。レボグルコサンは地域由来で高濃度となる場合があるが、これまでの報告³⁾⁴⁾から長距離輸送による濃度上昇も考えられる。また今回の事例は石炭燃焼の寄与が大きいとすると、大陸からの移流の影響を示している可能性がある。今後も植物燃焼起源の指標として継続して測定する予定である。また諫早での観測結果から WSOC

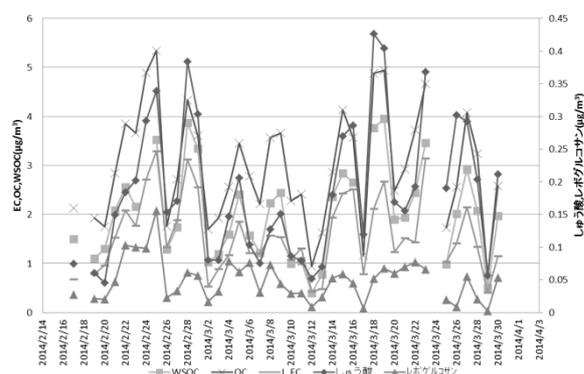


図 2 炭素成分のグラフ (諫早)

濃度の上昇が観測された。この期間のレボグルコサンの平均値は、49 ng/m³ (2~155 ng/m³) であり、やや高めではあるものの 2002 年から 2003 年にかけて済州島で観測された値³⁾と近い値を示した。レボグルコサンは地域由来で高濃度となる場合があるが、これまでの報告³⁾⁴⁾から長距離輸送による濃度上昇も考えられる。また今回の事例は石炭燃焼の寄与が大きいとすると、大陸からの移流の影響を示している可能性がある。今後も植物燃焼起源の指標として継続して測定する予定である。また諫早での観測結果から WSOC

としゅう酸はよい相関 ($r^2=0.91$) が得られ、これらと $PM_{2.5}$ 日平均濃度は相関があった ($r^2=0.88, 0.93$)。さらに WSOC やしゅう酸と Ox の日最大値との相関も得られた ($r^2=0.48, 0.52$) ことから、WSOC の生成に光化学反応が関与していると考えられるが、 Ox 濃度によらず WSOC が上昇している場合があることから、今後も検討を続けていく。また植物燃焼由来とされる char-EC や主にディーゼル排気由来とされる soot-EC についても検討した。なお五島や大村の結果からは 2014 年春季の特徴であった長期間の黄砂事例についても後方流後線解析などを交えながら報告する予定である。

【参考文献】 1) Bond et al., J. Geophys. Res., 109, D14203, doi:10.1029/2003JD003697 2) Cooke et al., Geophys. Res., 104, D18, doi:10.1029/1999JD900187 3) Kumata et al., Chikyukagaku (Geochemistry) 41, 135—143 (2007) 4) Mochida et al., Atmospheric Environment 44(2010)3511-3518

■ 学会発表 7

大気環境学会 2015 年 9 月 15 日～17 日 早稲田大学

2015 年 1 月の九州北部地域の越境 PM 汚染の集中観測の概要

○ 鶴野伊津志 1), 長田和雄 2), 田村 圭 3), 山本重一 4), PAN Xiaole 1), 原由香里 1), 桑原昇平 1), 板橋秀一 4), 弓本桂也 5), 金谷有剛 6)

1)九州大学応力研, 2)名古屋大学, 3)長崎県環境保健研究センター, 4)福岡県保健環境研究所, 5)電力中央研究所, 6)気象研究所, 6)JAMSTEC

【はじめに】 2015 年 1 月 10 日から 24 日かけて、九州北部地域で 3 回の $PM_{2.5}$ の高濃度汚染が起こった。我々は同時期に集中観測を行い、高濃度汚染の詳細な時間変化・組成を捉えることに成功した。観測・モデル解析結果を一連の 5 件の発表として報告する。本報では観測概要と PM 変化の特徴を述べる。

【観測と化学輸送モデル】九州大学・福岡県保健環境研究所では、(1) エアロゾル化学成分連続自動分析装置 (ACSA-12; 紀本電子製) による $PM_{2.5}$ と PM_{10} のエアロゾル成分 (SO_4^{2-} , NO_3^- , OBC, WSOC, 酸性度) の 1 時間値、(2) 偏光光散乱式粒子数濃度計 POPC; 山梨技研製) による $0.5 \sim 10\mu m$ の粒径の全個別粒子の個数濃度計測、(3) 多波長ミー・ラマン散乱ライダー観測、(4) MAAP- BC & Thermo CO 連続観測 (福江島でも同一装置で) を行った。九大では、同時に名古屋大学の長田研究室による NH_3 ガスと NH_4^+ 粒子の連続測定 (Osada et al., AAQR 2011)、6 時間毎の粗大と微少粒子のフィルターパック・デニューダ法でのエアロゾル組成分析を行った。福岡市と風上離島の比較のため、長崎県環境保健研究センターによる国設対馬酸性雨局と五島局の PM_{712} のテープフィルター捕集の粗大と微少成分のイオンクロマトによるエアロゾル組成分析も行った。観測と連携して越境汚染の解析を行うために、化学輸送モデルとしては CMAQ (Community Multi-scale Air Quality Model Ver. 4.7.1) と GEOS CHEM ver. 9.2 を用いた数値シミュレーションも実施した。

【結果】 図 1 に $PM_c (=PM_{10} - PM_{2.5})$, $PM_{2.5}$, SO_4^{2-} , NO_3^- , BC の

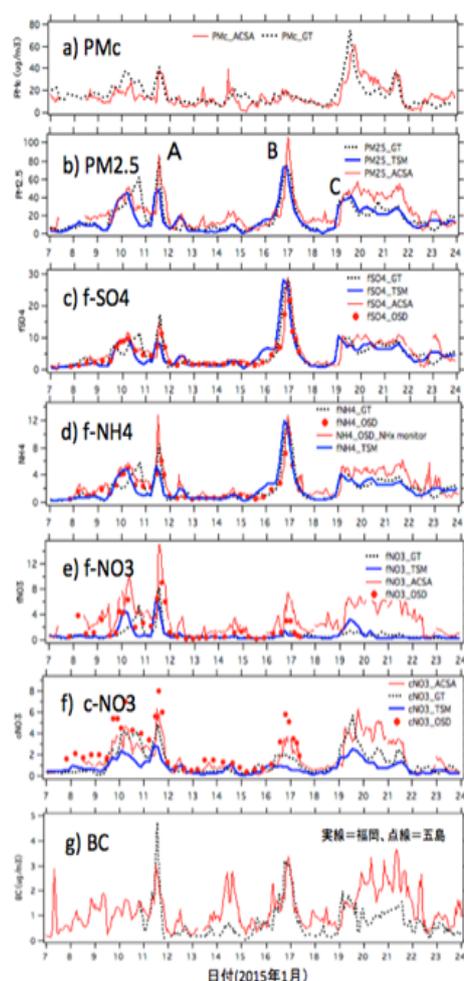


図1 濃度の時間変化(GT:五島, TSM:対馬, ●はフィルターパック, ACSA:九大)

福岡、対馬、五島の観測時系列を示す。期間中 $\text{PM}_{2.5}$ の3回の高濃度 (図の A-C) が起こったが、主成分が異なっていた (Aは NO_3^- の高濃度、Bは SO_4^{2-} の高濃度、Cは両方とも高濃度)。 SO_4^{2-} 、 NH_4^+ は3地点もほぼ同じ挙動で越境が主であり、fine NO_3^- には、越境寄与と国内寄与が存在する。BC (福岡、福江) からも越境と国内寄与が示される。一方、1月19-21日には Ca^{2+} が上昇し黄砂の飛来と同期して、粗大 NO_3^- 濃度が上昇し、f NO_3^- と c NO_3^- の割合が非黄砂時と明らかに異なっていた。A-C ケースについて POPC による偏光解消度-粒径分布を図2に示す。ACSA による成分と POPC の2D分布を組み合わせることで、汚染の主要なエアロゾルの寄与が明瞭に示された。今後はより詳細な総合解析を進める予定である。

謝辞) 本研究は科研費基盤研究S(25220101)の一部として行った。

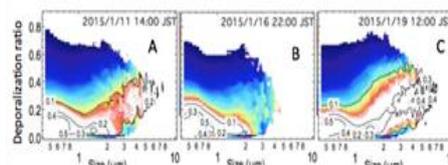


図2 図1bのA-Cに対応したPOPCによる体積濃度の粒径-偏光解消度プロット、Bピーク時では微小粒子が主、Cピーク時は非球形的粗大粒子(黄砂)と微小大気汚染粒子の混在を示す。

■ 学会発表 8

大気環境学会 2015年9月15日~17日 早稲田大学

2015年1月の九州北部域の越境PM汚染の集中観測期間のモデル解析

○板橋秀一 1), 鶴野伊津志 2), 長田和雄 3), 山本重一 4), 田村圭 5), Pan Xiaole 2), 原由香里 2), 金谷有剛 6)
 1) 電力中央研究所, 2) 九州大学応用力学研究所, 3) 名古屋大学,
 4) 福岡県保健環境研究所, 5) 長崎県環境保健研究センター, 6) 海洋研究開発機構

2015年1月には九州北部域で $\text{PM}_{2.5}$ が高濃度となるエピソードが3回続けて生じた。本研究では、この期間中について、領域化学輸送モデルの再現性を包括的に評価し、さらに感度実験により国内外の寄与推定を行った。Aerosol Chemical Speciation Analyzer (ACSA) では、硫酸塩 (SO_4^{2-}) や硝酸塩 (NO_3^-)、水溶性有機炭素 (WSOC) を微小粒子と粗大粒子の2粒径について高時間分解能 (本研究では1時間と設定) で観測できる。この機器を福岡県の都市部から約10km程度離れた太宰府市内の施設屋上 (地上から16.4m) に設置した。また、アンモニア計によるガス態および粒子態アンモニア (NH_4^+)、Multi-Angle Absorption Photometer (MAAP) による元素状炭素 (EC) の観測も九州大学筑紫キャンパス内で行われている。これらに加え、1月11日から17日には、フィルターパック・デニューダ法による6時間毎のサンプリングを行った。領域化学輸送モデルには CMAQ を適用し、気象データは気象モデル WRF、排出量データは REAS version 2.1 を用いた。計算領域は東アジア全域をカバーし、水平解像度は81kmである。解析対象としたのは2015年1月であるが、REASは2008年まで利用可能であり、試験計算として2008年の排出量データを用いた計算を行った。日本の人為起源排出量をゼロにした感度実験も合わせて行った。Fig. 1には2015年1月11日から24日までの種々の大気汚染物質の濃度変化の時系列を示す。この期間中には11日に半日程度 (Fig. 1のA)、17日に1日程度 (同B)、19日から22日にかけて3日程度 (同C) 持続した計3回の高濃度事例が観測された。Fig. 1には灰色実線でモデル計算値を、灰色点線でモデル感度実験の結果を示す。灰色のシェード部分は両者の差で日本の人為起源排出量の寄与を示す。Fig. 1(a)より SO_4^{2-} に対しては国内の寄与はほぼ見られなかった。期間を通じてモデルは SO_4^{2-} を過小評価した。Fig. 1(b)および(c)には微小および粗大粒子の NO_3^- 、Fig. 1(d)には NH_4^+ を示す。AとBのピークは越境輸送が支配的であったが、Cにおいては特に後半にかけて国内のローカル汚染との複合的な汚染状況が考えられる。このときは黄砂が飛来しており、粗大粒子の NO_3^- 濃度が高かった。Fig. 1(e)に示す EC には、微小粒子の NO_3^- と同様にローカルの寄与が見られたが、一方で Fig. 1(f)に示す WSOC は SO_4^{2-} と同様に越境輸送の寄与が支配的であった。

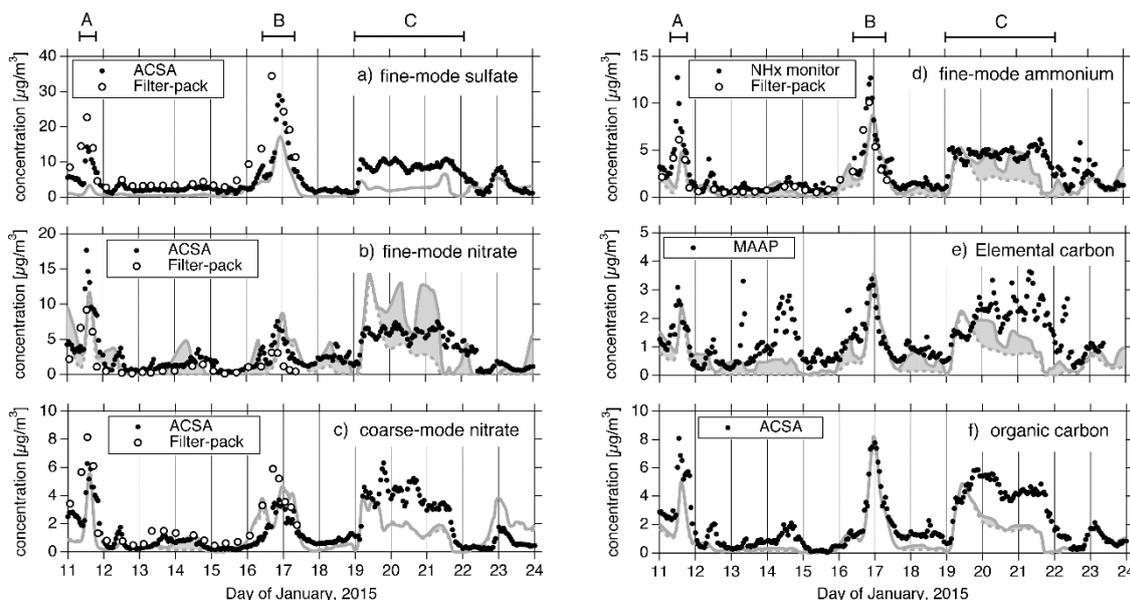


Fig. 1. Temporal variation of (a) fine-mode SO_4^{2-} , (b) fine-mode NO_3^- , (c) coarse-mode NO_3^- , (d) fine-mode NH_4^+ , (e) elemental carbon, and (f) organic carbon during January 2015 at Fukuoka. Open and closed black circles denote observation data, and gray lines indicate model simulation

■ 学会発表 9

大気環境学会 2015年9月15日～17日 早稲田大学

2014年におけるPM_{2.5}高濃度事例の特徴について—福岡での観測を中心に—

○山本重一¹⁾, 長田健太郎²⁾, 山田早紀³⁾, 田村圭⁴⁾, 緒方美治⁵⁾, 鶴野伊津志⁶⁾, Pan Xiaole⁶⁾

1) 福岡県保健環境研究所, 2) 山口県環境保健研究センター, 3) 佐賀県環境センター, 4) 長崎県環境保健研究センター, 5) 熊本市環境総合センター, 6) 九州大学

【はじめに】福岡のPM_{2.5}濃度は春季に高い傾向を示す。2014年もPM_{2.5}の月平均濃度や環境基準を超えた日平均濃度日数は春季に高かった。このような高濃度時の現象を詳細に解明するため、高時間分解能でのPM_{2.5}成分濃度分析を実施した。その結果、汚染単独のケースや汚染と黄砂が混在するケースなど、時間経過とともに変化する汚染の特徴を把握することができた。

【観測方法】PM_{2.5}の採取に際して、複数のシミュレーション、東アジアの大気汚染状況、衛星画像の情報から高濃度期間を予測して採取期間を決定した。この採取期間においてPM_{2.5}粒子はローポリウムエアサンプラで6時間毎に石英繊維製ろ紙上に採取し、水溶性成分と炭素成分を分析した。また、大気エアロゾル化学成分連続分析装置（紀本電子工業社製ACSA-12）により微小粒子（PM_{2.5}）と粗大粒子（PM_{10-2.5}、以下PM_c）の1時間毎の質量濃度及び成分濃度〔硫酸イオン、硝酸イオン、水溶性有機化合物（以下、WSOC）、酸性度、光学的ブラックカーボン（以下、OBC）（微小粒子のみ）〕を測定した。偏光式光学粒子計測装置（以下、POPC）では0.5～10μmの粒子に対する偏光消光度（粒子の形状）と体積濃度を計測した。後方流跡線はNOAAのHYSPLIT MODELを利用した。今回は2014年3月から6月における結果を報告する。

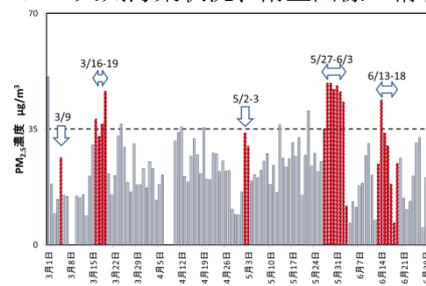


図1 PM_{2.5}日平均濃度

【結果と考察】 2014年3月から6月におけるPM_{2.5}の日平均濃度を図1に示す。図中の矢印と日付は成分濃度観測を実施した期間である。先に述べたように予測情報等により決定した計5回の採取は、日平均濃度が環境基準[図1の点線]を超える事例を採取することができていた。これらのうち、3月9日と3月18-19日の2事例について紹介する。

3月9日のPM_{2.5}濃度、PMc濃度、微小の硫酸イオン濃度及び微小の硝酸イオン濃度を図2に、3月18-19日の各濃度を図3に示す。3月9日はPM_{2.5}の日平均濃度は低かったが、時間値最高濃度は100 μg/m³を超えていた。最高濃度となった3月9日14時、福岡を起点とした後方流跡線は山東半島付近から黄海、朝鮮半島南西部を経て九州北部に至る経路となっていた。図2を見るとPM_{2.5}濃度の急上昇とともに硫酸イオンと硝酸イオンが同時に濃度上昇していた。これらのことから大陸からの大気汚染による影響を受けてPM_{2.5}濃度が上昇したと考えられる。次に3月18-19日について、PM_{2.5}は18日の12時から濃度上昇していた。高濃度となった3月18日17時、福岡を起点とした後方流跡線は、大陸から黄海を経て九州北部へ至っていた。図3を見ると、微小粒子と硫酸イオン濃度が同時に上昇していた。その後19日1時に粗大粒子濃度が急上昇した。この時刻の後方流跡線はモンゴルと中国の国境付近から至る経路となっており、黄砂の飛来と考えられる。なお、この粗大粒子濃度上昇時に微小粒子が継続して高濃度であったことから黄砂と大気汚染が混在した状態であったと考えられる。

発表では成分濃度結果による構成成分の割合や発生源の推定、POPCによる粒径分布と粒子の形状、大気汚染物質の空間分布を合わせた結果を報告する。

■ 学会発表 10

大気環境学会 2015年9月15日～17日 早稲田大学

2015年1月の九州北部域の越境PM汚染の集中観測期間の排出量逆推計

○弓本桂也 1), 鶴野伊津志 2), 長田和雄 3), 山本重一 4), 田村圭 5),

1) 気象研究所, 2) 九州大学応用力学研究所, 3) 名古屋大学, 4) 福岡県保健環境研究所, 5) 長崎県環境保健研究センター

【はじめに】九州大学応用力学研究所を中心とした研究グループでは、九州北部に焦点を当てたエアロゾルの長期観測を2013年11月から行っている。そのうち、高PM_{2.5}濃度イベントが3回発生した2015年1月を対象に、観測データと、数値モデルを利用した感度実験結果を用いて排出量逆推計を行った。

【手法】最適化法としてグリーン関数法(Yumimoto et al., 2014)を採用した。グリーン関数法では、観測された濃度とモデルで再現された濃度の差の二乗和を評価関数として定義し、その値が最小となるように各地域の排出量を最適化する。各地域の排出量と評価関数を繋ぐ感度の情報は、ソースレセプター解析による計算で求めた。本研究では、日本、朝鮮半島、台湾、11の地域に細分化した中国、東南アジア諸国に火山起源を加えた16の排出源を逆推計の対象とした。

【結果】図1に一酸化炭素(CO)に対する逆推計の結果を示す。モデル結果は過小評価の傾向であったが、逆推計によって改善していることがわかる(相関係数、平均二乗誤差の値も大きく改善している)。特に10日、17日、19-20

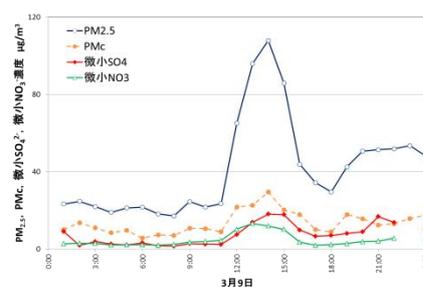


図2 3月9日のPM_{2.5}、PMc、微小の硫酸イオン及び硝酸イオン時間値濃度

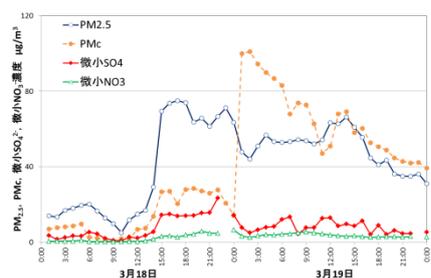


図3 3月18-19日のPM_{2.5}、PMc、微小の硫酸イオン及び硝酸イオン時間値濃度

日の高濃度イベントでのインパクトが大きい。逆推計された排出量を見ても、北京周辺、遼東半島、中国東北部で排出量が大きく増加しており、この領域での排出量の過少評価がモデルの再現性に大きく影響していることを示唆している。図2に黒色炭素(BC)に対する逆推計の結果を示す。全体の印象はCOに近く、COほどではないが濃度の過少評価がモデルには見られる。逆推計後は、全体的に濃度が増える傾向にあり、3つの高濃度イベントを中心に再現性が向上している(相関係数、平均二乗誤差ともに改善している)。しかし14日付近のイベントは逆推計後も捉えられていない。これは、モデルに含まれていないメカニズムが原因と考えられる(局地的な大気汚染など)。COとBCをそれぞれについて逆推計を行ったが、その結果には幾つかの共通点が見られる。まず、両物質とも3つの高濃度イベントにおいて大きな改善が見られた点(越境大気汚染が原因と見られる)と、逆推計後の排出量の増減の分布(両物質とも北京、遼東半島、中国東北部といった比較的北の地域で排出量が大きく増加し、上海周辺や安徽省といった南寄の地域で減少または微増している)である。発表時には、他の物質(例えばSO₄など)の排出量逆推計の結果も示す予定である。

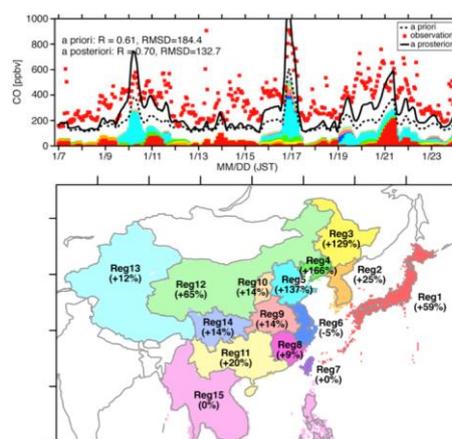


図1 COに対する逆推計結果。上段は観測とモデルの時系列の比較。●は観測、破線は逆推計前、実線は逆推計後の濃度。色付きのバーは各領域(下段参照)の寄与(逆推計前)。逆推計前後の統計量(相関係数とRMSD)も付記する。下段は各領域における逆推計前後の排出量の増減。

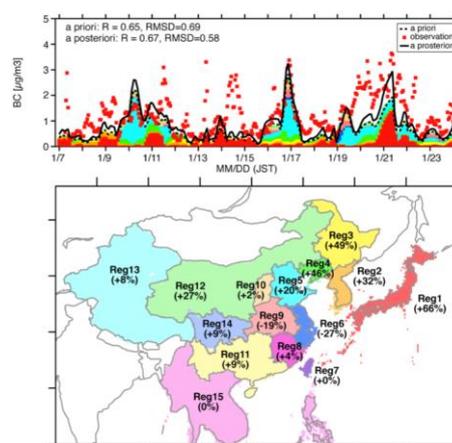


図2 BCに対する逆推計結果。上段は観測とモデルの時系列の比較。●は観測、破線は逆推計前、実線は逆推計後の濃度。色つきのバーは各領域(下段参照)の寄与(逆推計前)。逆推計前後の統計前後の排出量増減。

■ 学会発表 11

平成 27 年度日本獣医三学会(獣医学術九州地区学会) 2015 年 10 月 16 日 メルパルク熊本

ELISA による日本脳炎ウイルスの流行探知

吉川 亮

【はじめに】日本脳炎患者の報告数は、全国で 1990 年代以降 10 名以下となっており、長崎県においても 2001～2009 年の 9 年間患者報告がない状況である。その一方で、厚生労働省、国立感染症研究所及び地方衛生研究所等により実施される感染症流行予測調査事業の日本脳炎感染源調査では、日本脳炎に対する県内産豚の HI 抗体価は毎年 100%を示し、調査血清からは日本脳炎ウイルス(JEV)が分離されている。そのような状況下、長崎県では 2010 年、2011 年と患者報告が続き、2013 年には死亡事例が発生したことから、患者発生防止に向けた県民への早期注意喚起が必要と考えられた。そこで、流行の早期把握を目的とした ELISA による豚の抗 JEV-IgM 検出について検討を行うとともに、感染症流行予測調査事業の日本脳炎感染源調査に示された現行法(赤血球凝集抑制試験)と比較した。

【材料と方法】材料は、日本脳炎の流行が確認されている場所と時期に JEV に未感染な 5 週齢の子豚 5 頭を感染曝露させ、1 週間おきに採血を 10 回行ってえられた血清 50 検体とした。方法は、これら血清を用いて anti JEV-IgM capture ELISA による JEV に対する IgM 抗体価を測定し、日本脳炎に対する抗体の陽転を確認した。

また、併せて行った現行法との比較には、2011～2014 年に本県で実施した日本脳炎感染源調査で採取した豚血清 320 検体を材料として用いた。

【結果と考察】曝露後、3～6 週間後にすべての子豚から IgM 抗体が確認された。このことから曝露開始から感染成立までの時期は特定できないが、野外飼育された豚を対象とした ELISA による流行の探知は可能であることが示された。

また、現行法との比較では、いずれの年も IgM 抗体は HI 試験における初期感染を示す 2-ME 感受性抗体より早期に検出された。以上の結果から ELISA は現行法である HI 試験に比べ早期に流行を探知できることが明らかとなった。特に 2014 年のように流行が低調であった場合、IgM 抗体検出と 2-ME 感受性抗体検出には 1 か月の開きがあり、その有用性が顕著であった。

■学会発表 12

第 74 回日本公衆衛生学会 2015 年 11 月 4 日～6 日 長崎ブリックホール

循環ろ過式入浴施設における細菌数迅速測定法を用いた衛生管理の塩素消毒への影響

田栗 利紹¹、蔡 国喜¹、安部恵代²、有馬和彦²、西村貴孝²、青柳 潔²

¹長崎県環境保健研究センター

²長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

【目的】浴槽水を再利用する循環風呂は温水の保温や浄化機能のための利便性を備えているが、レジオネラ症等感染症の不安とその対策として施される消毒剤の過剰投与等の問題を抱えている。本研究では、レジオネラ属菌汚染のリスク評価¹⁾や浴槽水の消毒効果判定機能²⁾を備えた細菌数迅速測定法(以下 RDM)により浴槽水中の細菌数を一定基準以下に制御することを試みた結果、レジオネラ属菌予防だけでなく、消毒剤使用量や塩素剤の安定性への寄与が認められたので報告する。

【方法】1 日入浴者数が千人規模の循環ろ過式入浴施設の中で最も利用頻度が高いと予想された浴槽を調査した。本浴槽は、もともと浴槽水中の塩素濃度が不安定であったことから調査を開始し、市販の配管洗浄剤による洗浄の過程で高度の生物膜汚染(レジオネラ属菌を含む)を認めたことから 2010 年 6 月にろ材を交換した。RDM による細菌数の基準値はモデル実験により設定して 3000 個/mL とした。月 2～3 回の頻度で浴槽水とろ過器逆流洗浄水(以下逆洗水)を測定し、浴槽水が基準を超えた場合には配管洗浄を行った。RDM 値はろ材交換後の 1 年 7 ヶ月間(2010 年 7 月～2012 年 2 月)と最近 10 ヶ月間(2014 年 8 月～2015 年 5 月)を比較した。消毒剤使用量と遊離塩素濃度は、施設管理者の衛生管理記録から抽出した。後者は DPD 法により毎日計測されており、ろ材交換前(2007 年)、交換後(2011 年)および本年(2015 年)の繁忙期(1 月)のデータを比較した。

【結果】浴槽水の細菌数はろ材交換後から最近まで低い値を保っていた。逆洗水の細菌数はろ材交換後でも高い数値を示したが、適切な配管洗浄後に明らかに減少した。入浴施設全体の消毒剤使用量において、2011 年は 2007 年よりも 1 日あたり 3%次亜塩素酸 Na として 12.6 L 減少し、2015 年にはさらに 9.4 L 低減した(対 2007 年比 30.7%減)。各年の営業中の遊離塩素濃度(平均値±標準偏差)は 1.21±0.91、0.80±0.42 および 0.98±0.58 (mg/L)であり、0.2 mg/L を下回る頻度は 18 回、5 回、2 回と減少した。

【結論】循環施設の塩素の安定性にはろ材交換と配管洗浄が大きく影響していた。RDM による循環施設の衛生管理はレジオネラ属菌予防に効果があるだけでなく、消毒剤使用量の低減や薬剤の安定性に寄与できる。

¹⁾ Taguri *et al.*, *J. Microbiol. Method*, 2011

²⁾ 倉ら, 厚生労働科学研究費総合分担報告書 201134019A, 2011

■ 学会発表 13

第74回日本公衆衛生学会 2015年11月4日～6日 長崎ブリックホール

長崎県における日本脳炎流行の早期探知法

吉川亮^{1,2}、松本文昭¹、三浦佳奈¹、蔡国喜^{1,2}、斎藤佳子¹、西村貴孝²、有馬和彦²、安部恵代²、青柳潔²

¹長崎県環境保健研究センター

²長崎大学大学院医歯薬総合研究科

【目的】国内の日本脳炎患者は1990年代以降10名以下を推移し、本県は2001年から2009年の9年間患者報告がなかったが、2010年、2011年と患者報告が続き、2013年には死亡事例が発生したことから患者発生防止に向けた県民への早期の注意喚起が必要となった。そこで、注意喚起を行うにあたり流行の端緒を早期に把握するために感染症流行予測調査事業の日本脳炎感染源調査に示された現行法(HI試験)に加え、迅速かつ感度の高いELISA及びRT-PCRの併用を検討したので報告する。

【方法】日本脳炎感染源調査で2011年から2014年に採取したブタ血清320検体を用いた。ブタ血清は毎年7月初旬から9月中旬まで概ね10日おきに8回採取し、1回につきブタ10頭の血清を採取した。これら血清からIgM capture ELISAによる日本脳炎ウイルス(JEV)に対するIgM抗体価及びRT-PCRによるJEV遺伝子の検出を試み、その結果とHI試験で流行の端緒を示す2-ME感受性抗体の検出結果を比較した。

【結果】IgM抗体、JEV遺伝子及び2-ME感受性抗体を各々の年で最初に検出したのは、2011年は7月初旬、7月中旬及び7月下旬で、2012年は8月初旬、8月初旬及び8月中旬で、2013年は7月下旬、7月下旬及び8月上旬で、2014年は7月下旬、8月上旬及び8月下旬であった。すべての年で2-ME感受性抗体よりIgM抗体及びJEV遺伝子は早期に検出された。

【結論】以上の結果からELISA及びRT-PCRはHI試験に比べ早期に流行を探知できることが明らかとなった。特に2014年のように流行が小さい場合、IgM抗体検出と2-ME感受性抗体検出には1か月の開きがあり、その有用性が顕著となった。日本脳炎は、発症すると重症化し後遺症が残るケースも多く、場合によっては死亡に至る公衆衛生上留意すべき疾患であることから、現在、これら成績をもとに本県では独自の基準を設け、日本脳炎に対する早期の注意喚起を行なっている。

■ 学会発表 14

第74回日本公衆衛生学会総会 2015年11月4日～6日 長崎ブリックホール

ヒスタミン産生菌 *M.morganii* 食中毒分離株からの HDC 遺伝子のクローニング

蔡国喜¹、田栗利紹¹、吉川亮¹、本多 隆¹、長富 潔²、吉田朝美²、青柳潔³、山本太郎³

¹長崎県環境保健研究センター

²長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

³長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

【目的】魚肉やその加工品中で異常に蓄積したヒスタミンによって起こる食中毒のことをアレルギー様食中毒と呼ぶ。食品中のヒスタミンは、ヒスチジン脱炭酸酵素(histidine decarboxylase, HDC)を保有するヒスタミン産生菌により産生される。本研究では、長崎県で発生したアレルギー様食中毒の原因食品から分離したヒスタミン産生菌 *Morganella morganii* (以下 *M. morganii*)のHDC遺伝子に着目し、アレルギー様食中毒の予防及び対策へとつながる基盤研究を目指している。その第一歩として、*M. morganii* 食中毒分離株 HDC遺伝子のクローニングによりそ

の塩基配列を決定し、標準株と比較したので報告する。

【方法】実験材料: 2008年9月、長崎県内の保育所で喫食した園児、保育士35名中8名が喫食後30分以内に蕁麻疹と発赤を呈した。原因はすりみ揚げと考えられ、その食品と原料から各々59 mg/100g及び100 mg/100gのヒスタミンが検出されたためにアレルギー様食中毒と断定した。

ヒスタミン産生菌の分離: すりみ揚げから100個の分離株を検索し、HDC遺伝子を保有する *M. morgani* が検出された。

HDC遺伝子のクローニング: *M. morgani* の食中毒分離株を35°C、18時間培養後、得られた菌体(約 2×10^9 個)から全DNAを抽出した。これを鋳型として、*M. morgani* JCM1672(標準株)のHDC遺伝子の配列情報より設計したプライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR産物をTAクローニング後、サイクルシーケンシング法により塩基配列を決定した。

【結果】*M. morgani* の食中毒分離株よりHDC遺伝子のクローニングを行ったところ、そのコード領域の塩基配列1,137 bp(378アミノ酸)を決定した。次に、*M. morgani* 食中毒分離株と標準株のHDC遺伝子を比較した。その結果、食中毒分離株HDC遺伝子では、6カ所の塩基置換が認められたものの、アミノ酸置換は見られなかった。

【結論】今回、*M. morgani* 食中毒分離株よりHDC遺伝子をクローン化することができた。今後はHDC遺伝子を用いて、大腸菌による大量発現系の構築、更には組換えHDC酵素を用いた酵素活性阻害物質の探索を行う必要がある。

■ 学会発表 15

第74回日本公衆衛生学会総会 2015年11月4日～6日 長崎ブリックホール

長崎県における学校欠席者情報収集システムによる保健所別のインフルエンザ流行状況

竹野大志¹、松本文昭²、森史江³、菅原民枝⁴、大日康史⁴

- 1 長崎県医療政策課感染症対策班
- 2 長崎県環境保健研究センター
- 3 長崎県教育庁体育保健課
- 4 国立感染症研究所感染症疫学センター

【目的】長崎県において導入、実施されている「学校欠席者情報収集システム」を用いて、保健所別のインフルエンザ流行状況を比較し、流行状況の把握、早期探知、感染拡大防止対策等における有用性を検討する。

【方法】2014年9月1日から2015年3月29日までを対象期間とした。長崎県内の10の保健所(長崎市保健所、佐世保市保健所、西彼保健所、県央保健所、県南保健所、県北保健所、五島保健所、上五島保健所、壱岐保健所、対馬保健所)の管内に所在する全学校を対象とし、学校欠席者情報収集システムに登録された小、中、高等学校の在籍者数(45,910人)及びインフルエンザ欠席者数(出席停止者数)から、日別の新規患者数による流行曲線及び累積罹患率を計算し、保健所単位での流行の立ち上がりと期間全体での流行規模を比較した。

【結果】対象期間中の累積罹患率の動向は保健所によって異なっていた。上五島保健所管内では11月上旬には他の地域に比べて流行の立ち上がりが観測されたものの流行規模は小さかった。五島保健所管内では12月中旬に立ち上がりが観測され、そのまま拡大の傾向が見られた。壱岐保健所管内は県内でも最も遅く流行が立ち上がったが流行規模は大きかった。

【考察】インフルエンザ流行の動向の違いは特に離島保健所においてみられ、システムによる患者数は、週報値より早期に流行を探知していた。このことから、各施設や地域への日々の情報提供は、システム内におけるお知らせ等、保健所単位で行う必要があると考えられた。

■ 学会発表 16

第 74 回日本公衆衛生学会総会 2015 年 11 月 4 日～6 日 長崎ブリックホール(長崎市茂里町 2-38)他

長崎県下の結核対策における遺伝型別(VNTR)の有用性

○右田雄二¹ 中村まき子² 田栗利紹² 眞崎哲太郎³ 藤田利枝¹ 長谷川麻衣子⁴ 大塚俊弘⁵ 和田崇之⁶

- 1 長崎県上五島保健所
- 2 長崎県環境保健研究センター
- 3 長崎県対馬保健所
- 4 長崎県県南保健所
- 5 長崎県県央保健所
- 6 長崎大学熱帯医学研究所環境医学部門国際保健学分野

【目的】大部分が北京型に属する国内結核菌株の識別には、JATA12-VNTR(Variable Number of Tandem Repeats)法が適しており、国内標準法となっている。長崎県においても、感染症法第 15 条の積極的疫学調査の一環として、結核菌の伝播経路の推定や集団感染の探知のために追加領域[JATA15(3) + 超可変領域(3)]を加えた計 18 領域で解析を行っている。本総会では、2011 年以降、県内の結核病床を有する医療機関から分与された結核菌株の遺伝型別結果を取りまとめたので報告する。

【方法】2011 年 12 月から 2015 年 3 月までの結核発生届に基づき収集された 121 株を解析対象とした。鋳型 DNA は熱処理による小川培地粗抽出液を精製して作製し、VNTR 領域ごとの反復回数の測定方法は「結核菌 VNTR ハンドブック(地研協議会保健情報疫学部会マニュアル作成ワーキンググループ編)」に準拠した。本研究では、反復回数が 18 領域中 1 領域違いまでを同一の遺伝型(クラスタ)と判定し、保健所の実地疫学との関連性を調査した。

【結果】県内 121 株の解析結果では 15 クラスタ[(2 株間:12 クラスタ、3 株間:2 クラスタ、10 株間:1 クラスタ)]が認められ、クラスタ形成率は 27.4%であった。実地疫学との関連性が確認された事例は 3 事例あり、そのうちの 1 事例は 10 株間でクラスタが確認された集団発生例であった。この集団との接触可能性が疑われた患者 1 名は遺伝子型が集団と異なることで関連性が否定できた。一方、県内株のうち 50 株(41.3%)を占めた県南保健所管轄地域では、3 クラスタ[(2 株間:2 クラスタ、3 株間:1 クラスタ)]を認め、クラスタ形成率は 14.0%と低かった。解析した患者の平均年齢は全株および県南保健所管轄株でそれぞれ 74.6 歳および 79.5 歳であった。

【考察】長崎県は全国でも結核罹患率が高く(2013 年:19.9)、県内では県南保健所管轄(2013 年:36.5)が最も高い地域となっている。今回の解析結果から、県南地域では罹患率に反してクラスタ形成率が低く、多様な遺伝型が存在することが分かった。このことは、本地域内における特定菌株の流行、拡散がなかったことを意味しており、県南地域における高罹患率は高齢者の再燃によるものと推察される。現在の結核対策は、地域DOTSやクオンティフェロン等が導入され成果を挙げているが、これに分子疫学的手法であるVNTR法を加えることで効率の良い疫学調査が推進されると思われる。

■ 学会発表 17

第 36 回日本食品微生物学会総会 2015 年 11 月 12 日(木)～13 日(金) 川崎市教育文化会館

原因不明事例の患者糞便からの多殻目粘液胞子虫遺伝子の検出法

○江藤良樹¹⁾、前田詠里子¹⁾、村上光一¹⁾、丸山浩幸²⁾、右田雄二³⁾、世良暢之¹⁾、堀川和美¹⁾

1) 福岡県保健環境研究所, 2) 福岡市保健環境研究所, 3) 長崎県環境保健研究センター

【目的】我々は、2013年12月に経験した原因不明胃腸炎事例から、多殻目粘液胞子虫の多くの種が食中毒を起こす可能性があるのではないかと仮説を立てた。しかし、生鮮魚喫食歴のある食中毒疑い事例で刺身・寿司等が残っていることがほとんど無い為、食品残品から多殻目粘液胞子虫と健康被害との関連性を調べることは困難である。そこで、この研究では、比較的確保が容易な糞便から多殻目粘液胞子虫遺伝子を網羅的に検出する手法を確立する事を目的とした。

【方法】12種の多殻目粘液胞子虫の28S ribosomal DNA (rDNA)を元に information content (IC)を計算し、最も多様性の高い部分が増幅されるようプライマーを設計した。PCRによる遺伝子増幅は、Quick Taq HS DyeMix(東洋紡)を用いて50 μ l系で実施した。サイクル条件は、94°C 2分の後、94°C 30秒、58°C 30秒、68°C 40秒を45回繰り返した。PCR産物は、Big Dye Terminator v3.1 (Life Technologies)を用い、3500 Genetic Analyzer (Life Technologies)にて塩基配列を決定した。評価の対象として、2011年から2014年に起きた生鮮魚喫食歴のある原因不明胃腸炎事例16事例(患者糞便74検体)と粘液胞子虫以外が原因と特定された食中毒確定事例15事例(患者糞便79検体)を用いた。糞便からのDNA抽出には、QIAamp stool mini kit (QIAGEN)、又は、QIAamp fast stool mini kit (QIAGEN)を用いた。

【結果】ICの計算から28S rDNAの5'側に連続して多様性のある領域があったことから、この領域を増幅するようにプライマーを設計した。設計したプライマーを用いて糞便153検体を検査したところ、37/153(24%)で約638-701bpの増幅が観察された。このうち、原因不明胃腸炎事例の陽性数は36/74(49%)で、これらのPCR産物は塩基配列決定により、*K. septempunctata*、*K. hexapunctata*、*K. iwatai*、*Unicapsula seriola*、及び、未知の*Kudoa*属の28S rDNAと同定された。喫食から検体採取(排便)までの時間が、48時間未満の場合の陽性率は66%(21/32)、48時間以上では35%(14/40)であった。一方、食中毒確定事例では2/79(2.5%)で遺伝子が増幅され、塩基配列を決定した結果、未知の*Kudoa*属の28S rDNAと粘液胞子虫の28S rDNAでは無い未知の遺伝子であった。

【考察】この手法は、生鮮魚喫食歴のある原因不明胃腸炎事例の患者糞便の49%から粘液胞子虫の28S rDNAの遺伝子を検出・同定することができた。このことから、これらの事例において多殻目粘液胞子虫の関与を網羅的に検査できる有用なツールとなるだろう。今後、患者糞便からの遺伝子検出と生鮮魚の喫食調査の情報を蓄積することで、粘液胞子虫と感染魚と健康被害の関係を明らかにする一助となると考えられた。

■ 学会発表 18

第42回 環境保全・公害防止研究発表会 2015年12月1日～12月2日 文京シビックホール

陶磁器くずなどの再生砂を用いた大村湾(長崎県)におけるアサリ生息場造成の可能性について

粕谷智之

【はじめに】大村湾では海への栄養蓄積進行にともなう水環境の悪化が問題となっている。長崎県環境保健研究センターではアサリなどの二枚貝を増やして漁獲することによって海から栄養物質を取り上げることに取り組んでおり、2012年度からはテストプラントとして二枚貝人工生息場(以下、生息場)を覆砂により造成した。講演では生息場造成に至るまでの研究経緯を併せて紹介し、生息場のアサリ出現状況および底質状況について報告する。

【材料と方法】生息場は2012年7月大村競艇場横水路に長さ12m×幅1.5m、厚さ20cmの規模で造成した。土嚢で地盤を安定させた後、杉板製の木枠を設置し、その中に、先ず軽く砕いたカキ殻を敷き、次に陶磁器くず(長崎県認定リサイクル製品 A108008、粒径0～5mm)と廃ガラス砂(同 A108007、0～3mm)を容積比1:1でよく混ぜ合

わせた人工砂を15cm厚となるように投入した。覆砂面高は大村湾の平均潮位(50cm)−50cmとした。底生生物および底質を数ヶ月ごとに調査するとともに、生息場の水温、塩分および溶存酸素量を測器を覆砂面と同じ高さとなるように設置して連続観測した。

【結果と考察】(水質・底質環境) 生息場造成後から2015年1月までの間で、底質は、中央粒径および泥分率については、生息場ではそれぞれ1.0~1.2mm、および2.1~5.3%の範囲、周辺では0.075~0.11mm および46.1~69.2%の範囲で推移した。また、強熱減量は生息場では1.4~1.9%、周辺では10.9~11.9%の範囲であった。生息場の底質は造成当初と比較して大きな変化は見られず、造成後2年6ヶ月経過した時点でアサリの生息適性範囲内であった。

(アサリ出現状況) 生息場におけるアサリ出現密度は造成した翌年、2013年2月に263個体/m²を観測した後、2013年9月に37個体/m²まで減少した。2014年1月には若干増えたものの、70個体/m²と前年同時期の1/3以下に留まった。その後、徐々に増加し、2015年1月には144個体/m²となった。一方、周辺ではアサリは2013年2月に7個体/m²確認されたものの、それ以降の調査では採集されなかった。

2014年1月のアサリ出現密度が前年同時期と比べて大幅に低いのは、殻長5mm未満のアサリの加入が少なかったからである。大村湾ではアサリの産卵盛期は主に夏期であるが、2013年は7月中旬から8月にかけての生息場の水温はアサリの成長可能水温を超える30℃以上を記録したとともに、斃死する個体が観察され始める35℃以上にしばしば達した。加えて、魚介類に有害な植物プランクトンであるカレニア・ミキモトイの赤潮が観察されたことから、2013年9月から2014年9月におけるアサリ出現密度の減少は、これらの要因によって大村湾内のアサリ産卵個体群が疲弊したとともに、アサリ稚貝の生残が悪かったことによると考えられる。2015年1月のアサリ出現密度は増加したものの、2013年2月の出現密度と比較して半分程度であることから、湾内の産卵個体群は十分に回復していない可能性がある。引き続き、アサリ出現密度をモニタリングする必要がある。

■ 学会発表 19

大気環境学会九州支部第16回研究発表会 2016年1月29日 アクロス福岡

2015年1月に北部九州域で観測された2回の高濃度PM2.5 エピソードのモデル解析

○板橋秀一 1), 鶴野伊津志 2), 長田和雄 3), 上口友輔 3), 山本重一 4), 田村圭 5)

1) 電力中央研究所, 2) 九州大学応用力学研究所, 3) 名古屋大学,
4) 福岡県保健環境研究所, 5) 長崎県環境保健研究センター

【はじめに】

2015年1月に北部九州域ではPM2.5が高濃度となるエピソードが2回生じた。本研究ではこの期間について、北部九州域における包括的な観測網により領域化学輸送モデルの再現性を評価し、モデルと後方流跡線解析とを統合的に解析したことで高濃度事例の特徴をそれぞれ明らかとした。

【観測とモデルの概要】

九州大学と福岡県保健環境研究所では、Aerosol Chemical Speciation Analyzer (ACSA; Kimoto et al., 2013)により、福岡県の都市部から約10km程度離れた太宰府市内の施設屋上(地上から16.4m)において、硫酸塩(SO₄²⁻)や硝酸塩(NO₃⁻)などを微小粒子と粗大粒子の2粒径について高時間分解能(本研究では1時間と設定)で観測を行っている。また、九州大学と名古屋大学では、アンモニア計(Osada et al., 2011)によるガス態および粒子態アンモニア(NH₄⁺)の観測を九州大学筑紫キャンパス内で行っている。これらに加え、1月7日から18日には、フィルターパック・デニューダ法による6時間毎のサンプリングを九州大学筑紫キャンパスにて行った。以上に述べた福岡県における観測結果に加えて、風上側での比較として、長崎県環境保健研究センターによる国設対馬酸性雨局と五島局のPM-712のテープフィルター捕集の微小粒子と粗大粒子の粒子成分のイオンクロマトによる組成分析も合わせて行った。領域化学輸送モデルにはCMAQを適用し、気象データは気象モデルWRF,

排出量データは REAS version 2.1 などを用いた。東アジア全域をカバーした計算領域は水平解像度は 81 km であり、これに中国東部から日本域を 27 km でカバーしたネスト計算領域を設定した。解析対象としたのは 2015 年 1 月であるが、REAS は 2008 年まで利用可能であり、ここでは暫定的に 2008 年の排出量データを用いた計算を行った。

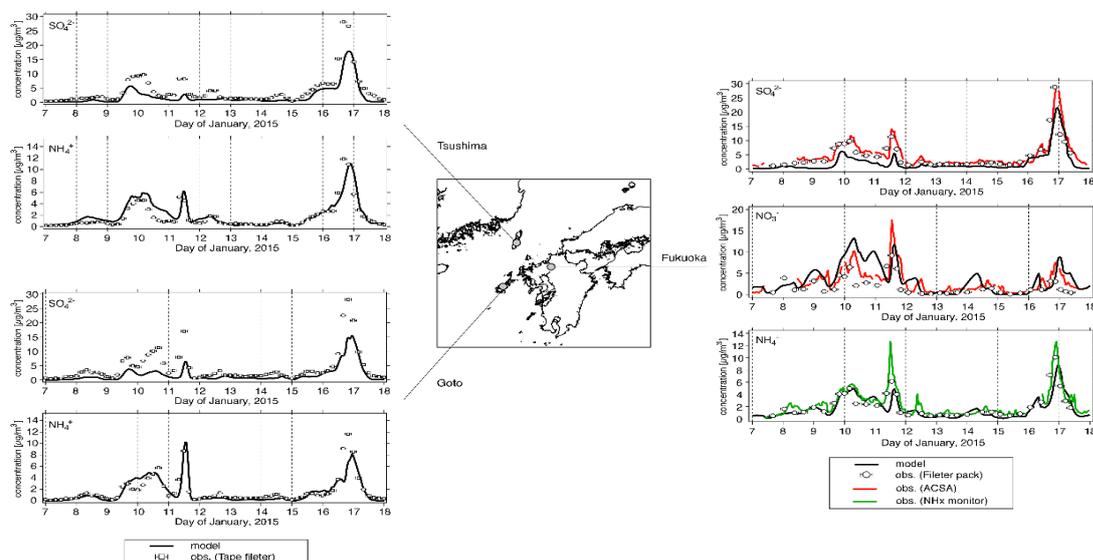


Fig. 1. Temporal variation of SO_4^{2-} , NO_3^- , and NH_4^+ in $\text{PM}_{2.5}$ during January 2015 at Fukuoka, Tsushima, and Goto. Black thick lines indicate model simulation and other symbols denote observations.

■ 学会発表 20

第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 23 日～25 日 大阪国際交流センター

国内における腸管出血性大腸菌 O146 の発生動向について

石原朋子¹⁾、伊豫田淳¹⁾、寺嶋淳²⁾、泉谷秀昌¹⁾、大西真¹⁾、EHECWorking group³⁾

1) 感染研・細菌第一, 2) 国衛研・衛生微生物, 3) 地衛研等,

1999 年以降、国内で報告される腸管出血性大腸菌(enterohemorrhagic E.coli : EHEC)の感染者数は毎年 3,000 例(無症状保菌者を含む)を超える。分離された EHEC の O 群は例年 O157 が最も多いが、近年 non-O157 の分離株数が増加している。さらに、同一感染源による感染事例が広域で散発的に発生する事例が増加傾向にあり、それらの動向には注意が必要である。EHEC の国内サーベイランスにおいて、2013 年以降 EHEC O146 分離株数の増加が認められる。

本研究では、国内における流行株の把握、広域・散発的発生事例の探知、およびこれらの原因究明や今後の発生予防・対策に寄与するため、分子疫学解析により EHEC O146 の発生動向を調べた。2007 年以降に地方衛生研究所等から感染研・細菌第一部に送付されたヒト由来の EHEC O146 分離株 68 株(2016 年 3 月 10 日現在)について、PFGE(pulsed-field gel electrophoresis)による分子疫学解析を実施した。PFGE 解析の結果、同一 PFGE 型(type number: TN)146k1 株が広域で検出されていることが明らかとなった。TN146k1 株は 2013 年に初めて 2 株(1 県)が検出され、2014 年には 4 県(12 株)、2015 年には 1 道 3 県(6 株)において検出された。いずれも散発事例由来株(家族内事例株を含む)であったが、2014 年以降の EHEC O146 分離株の半数以上を占め、PFGE 解析結果から近縁と推測される EHEC O146 が近年広域で流行していることが示唆された。

【環境保健研究センター案内図】



〒856-0026 長崎県大村市池田2丁目1306番地11

TEL 0957-48-7560 FAX 0957-48-7570

E-Mail: s09070@pref.nagasaki.lg.jp

URL: <http://www.pref.nagasaki.jp/section/kankyo-c>

業務時間

9:00～17:45 休業日/土・日・祝日 年末年始(12月29日～1月3日)

アクセス

長崎自動車道「大村IC」より車で3分

JR大村線大村駅からバスで約20分(1日朝夕2便) タクシーで約10分

長崎空港からタクシーで約15分

編集委員

委員長 山口仁士 (企画環境研究部)

委員 本多隆 (保健衛生研究部) 委員 國光健一 (企画・環境科)

委員 山内康生 (地域環境科) 委員 田栗利紹 (保健科)

委員 本村秀章 (生活化学科) 委員 立花祐二 (総務課)

長崎県環境保健研究センター所報(平成27年度業務概要・業績集)

平成28年11月 発行

編集・発行 長崎県環境保健研究センター