

平成 28 年度に福井県の集団発生事例から検出された ノロウイルスの遺伝子解析

酒井妙子・佐藤かおり・平野映子・小木圭子

Genetic Analysis of Noroviruses Detected from Outbreaks in Fukui Prefecture in 2016/2017

Taeko SAKAI, Kaori SATO, Eiko HIRANO, Keiko KOGI

1. はじめに

ノロウイルス（以下 NoV）は、カリシウイルス科に属し、ノーウォークウイルス種を唯一の種として持つ¹⁾エンベロープを持たない約 7,600 塩基のプラス 1 本鎖 RNA ウイルスである²⁾。また、NoV は主に糞口感染により、嘔吐、下痢、腹痛および発熱等を発症する。さらに、感染経路が多種多様で、汚染食品の喫食や、調理従事者を介した食中毒およびヒト・ヒト感染による感染症の集団発生原因となることが知られている^{3),4)}。

NoV には 5 つ（Ⅰ～Ⅴ）の Genogroup があり、その中の Genogroup Ⅰ（以下 GⅠ）、Genogroup Ⅱ（以下 GⅡ）、Genogroup Ⅳがヒトを宿主とすることが知られているが、GⅠ、GⅡによる感染が主である³⁾。さらに、GⅠは 9、GⅡは 22 の遺伝子型が報告されている^{5),6)}。中でも遺伝子型 GⅡ.4 の検出率は、世界的に高いことが報告されており、胃腸炎の大流行に関与することがある⁷⁻⁹⁾。過去に胃腸炎が大流行した平成 18 年度冬期（平成 18 年 10 月～19 年 1 月）および平成 24 年度冬期（平成 24 年 10 月～25 年 1 月）には GⅡ.4 の変異株が出現しており、その関連性が指摘されている^{10),11)}。福井県においても、GⅡ.4 変異株出現時には胃腸炎が大流行した^{12),13)}。一方、平成 26 年 12 月には神奈川県川崎市において GⅡ.17 におけるキメラウイルスが検出され¹⁴⁾、それ以降全国的にも検出されるようになった¹⁵⁾。このように、NoV の流行動態の把握は、公衆衛生において非常に重要であり、これまでに NoV の検査および遺伝子解析を実施してきた^{12),13)}。

本報では、平成 28 年度に福井県内で発生した集団発生事例および県外での関連調査事例を含め当センターにおいて検査を実施した事例から検出された NoV について報告する。

2. 方法

2. 1 検査材料

平成 28 年度（平成 28 年 4 月～29 年 3 月）に当センターへ行政検査依頼があった急性胃腸炎集団発生 27 事例 417 検体を対象とした。検体の種類は、有症者由来の糞便または吐物 143 検体、調理従事者および施設職員由来糞便 114 検体、ふきとり 145 検体、食品 15 検体であった。

2. 2 検査方法

糞便および吐物は滅菌水で 10%乳剤とし、8,500×g、10 分間冷却遠心後の上清を試料とした。ふきとり検体に

ついてはふきとりした綿棒を滅菌水 1mL で洗い出し、8,500×g、10 分間冷却遠心後の上清を試料とした。前処理後の試料から厚生労働省通知¹⁶⁾に準じ、RNA 抽出、DNase 処理および逆転写反応を実施し、cDNA を合成した。その後、糞便・吐物はリアルタイム PCR 法で、ふきとりは PCR 産物を用いた nested リアルタイム PCR 法を実施した。食品については厚生労働省通知¹⁶⁾に準じパンソルビントラップ法を実施した。リアルタイム PCR 装置は、Step One Plus Real-Time PCR System（Applied Biosystems）を使用した。

NoV 陽性と判定した検体については、Kojima ら¹⁷⁾の方法に準じダイレクトシーケンス法により Capsid 領域（GⅠ：295nt、GⅡ：282nt）の塩基配列を決定し、相同性解析および系統解析を実施した。シーケンス装置は、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を使用した。データの解析は、MEGA（Molecular Evolutionary Gene Analysis）ver. 6.0 プログラム¹⁸⁾を使用し、最尤法（ML 法）により系統樹を作成した。系統樹評価のため 1,000 回のブートストラップを実施した。各遺伝子型の標準株は、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティー（以下 NoV S.C.）が推奨する株を使用した^{5),6)}。

3. 結果

調査対象の集団発生 27 事例 417 検体のうち、表 1 のとおり 21 事例 138 検体（有症者 113 検体、従事者 20 検体、ふきとり 5 検体）で GⅡが検出されたが、GⅠは検出されなかった。NoVGⅡが陽性となったふきとりの箇所はトイレ便器内側、炊飯器周辺作業台、水切台であった。また食品 15 検体からは NoV は検出されなかった。

Capsid 領域の遺伝子解析において、検出塩基配列を比較したところ、各事例ごとに 99.7～100%の相同性を示した。特に、事例番号 22802、22804、22815、22817、22820、22821、22823、22826 の 8 事例については、有症者と調理従事者やふきとり由来の配列が 99%以上一致していた。発生施設は飲食店（10 事例）が最も多く、次いで学校・保育所（4 事例）が多かった（表 1）。

検出された NoV の塩基配列について、各事例の代表株を用いて系統樹解析を実施したところ、GⅡ.2、GⅡ.3、GⅡ.4、GⅡ.17 の 4 種類の遺伝子型が確認された（図 1、2）。平成 28 年度に検出された NoV の Capsid 領域における塩基配列の相同性は、GⅡ.2 は 97.2%、GⅡ.17 は 99.3%であり、非常に高い相同性を示した（図 2）。

遺伝子型別の検出頻度を比較すると、GⅡ.2 が 14 事例（66.7%）で突出して多く、次いで GⅡ.17 が 5 事例（23.8%）であった（図 1）。

表 1 NoV が陽性となった事例

事例番号	初発患者 発生日	発生地域	発生施設	推定感染経路	有症者	調理従事者	食品	ふきとり	検出した 遺伝子型	代表株名
					陽性数/検査数	陽性数/検査数	陽性数/検査数	陽性数/検査数		
22801	2016.4.19	二州 (丹南)	保育園	ヒト-ヒト感染	8 / 10	0 / 2			G II.17	Fukui/22801N17/H28-4
22802	2016.4.19	福井 坂井	飲食店	従事者を介する 食中毒	11 / 11	6 / 24		0 / 8	G II.17	Fukui/22802F9/H28-4
22804	2016.5.21	二州	給食センター	従事者を介する 食中毒	7 / 9	3 / 11	0 / 8		G II.17	Fukui/22804N4/H28-5
22805	2016.6.13	福井	結婚式場	ヒト-ヒト感染	6 / 10	0 / 11			G II.4	Fukui/22805F10/H28-6
22809	2016.11.22	県外	飲食店	不明	2 / 2				G II.3	Fukui/22809F2/H28-12
22810	2016.12.5	二州	飲食店	不明	4 / 5				G II.2	Fukui/22810N2/H28-12
22811	2016.12.6	二州	小学校	ヒト-ヒト感染	3 / 4			0 / 30	G II.2	Fukui/22811N1/H28-12
22812	2016.12.12	県外	飲食店	不明	2 / 2				G II.2	Fukui/22812F1/H28-12
22813	2016.12.11	福井	飲食店	不明	8 / 9	0 / 6		0 / 10	G II.2	Fukui/22813F12/H28-12
22814	2016.12.11	県外	飲食店	不明	1 / 1				G II.2	Fukui/22814N1/H28-12
22815	2016.12.9	若狭	仕出店	ヒト-ヒト感染	12 / 12	3 / 4		0 / 15	G II.2	Fukui/22815W16/H28-12
22816	2016.12.19	二州	小学校 保育園	ヒト-ヒト感染	5 / 5	0 / 3	0 / 7		G II.2	Fukui/22816N12/H28-12
22817	2016.12.21	福井	飲食店	従事者を介する 食中毒	5 / 5	3 / 8		2 / 10	G II.2	Fukui/22817F11/H28-12
22818	2016.12.28	福井	飲食店	ヒト-ヒト感染	4 / 5	0 / 7		0 / 10	G II.2	Fukui/22818S1/H28-12
22819	2017.1.4	二州	旅館	ヒト-ヒト感染	7 / 7	0 / 4		0 / 4	G II.2	Fukui/22819N11/H29-1
22820	2017.1.10	福井	飲食店	不明	3 / 4	1 / 15		0 / 18	G II.2	Fukui/22820F14/H29-1
22821	2017.1.30	福井	飲食店	従事者を介する 食中毒	1 / 2	3 / 6		1 / 10	G II.2	Fukui/22821F1/H29-2
22823	2017.3.1	若狭	社員寮	従事者を介する 食中毒	13 / 15	0 / 0		2 / 10	G II.17	Fukui/22823W4/H29-3
22824	2017.3.20	県外	旅館	不明	1 / 1	0 / 0		0 / 0	G II.2	Fukui/22824F1/H29-3
22826	2017.3.24	丹南	飲食店	従事者を介する 食中毒	4 / 4	1 / 3		0 / 3	G II.17	Fukui/22826T7/H29-3
22827	2017.3.29	福井	中学校	ヒト-ヒト感染	6 / 9	0 / 2		0 / 7	G II.2	Fukui/22827F11/H29-3

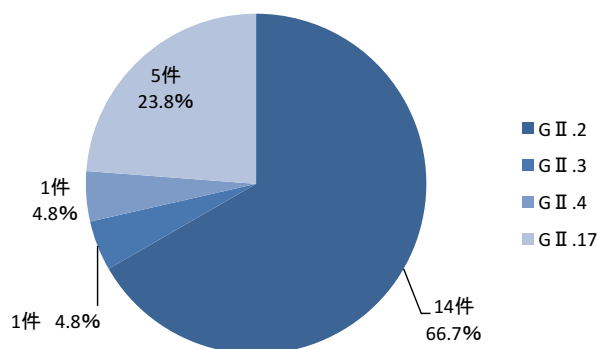


図 1 検出された NoV の遺伝子型

発生月別では、12月（9事例）が最も多く、3月（4事例）、1月（2事例）などNoV流行期にあたる冬季に多かった（表1、図3）。

遺伝子型別にみると、平成28年4月から5月には平成28年1月から3月に引き続き3事例からG II.17が検出された。平成28年6月には1事例からG II.4、11月には関連調査の1事例からG II.3が検出された。平成28年12月から翌年3月には14事例からG II.2、3月には2事例からG II.17が検出された。

4. 考察

NoVの感染経路は多種多様であり、集団発生の原因になることも報告されている^{3),4)}。集団発生事例として検査依頼のあった27事例のうち21事例からNoVが検出され、そのうちの6事例が食中毒事件となった（事例番号:22802、22804、22817、22821、22823、22826）。

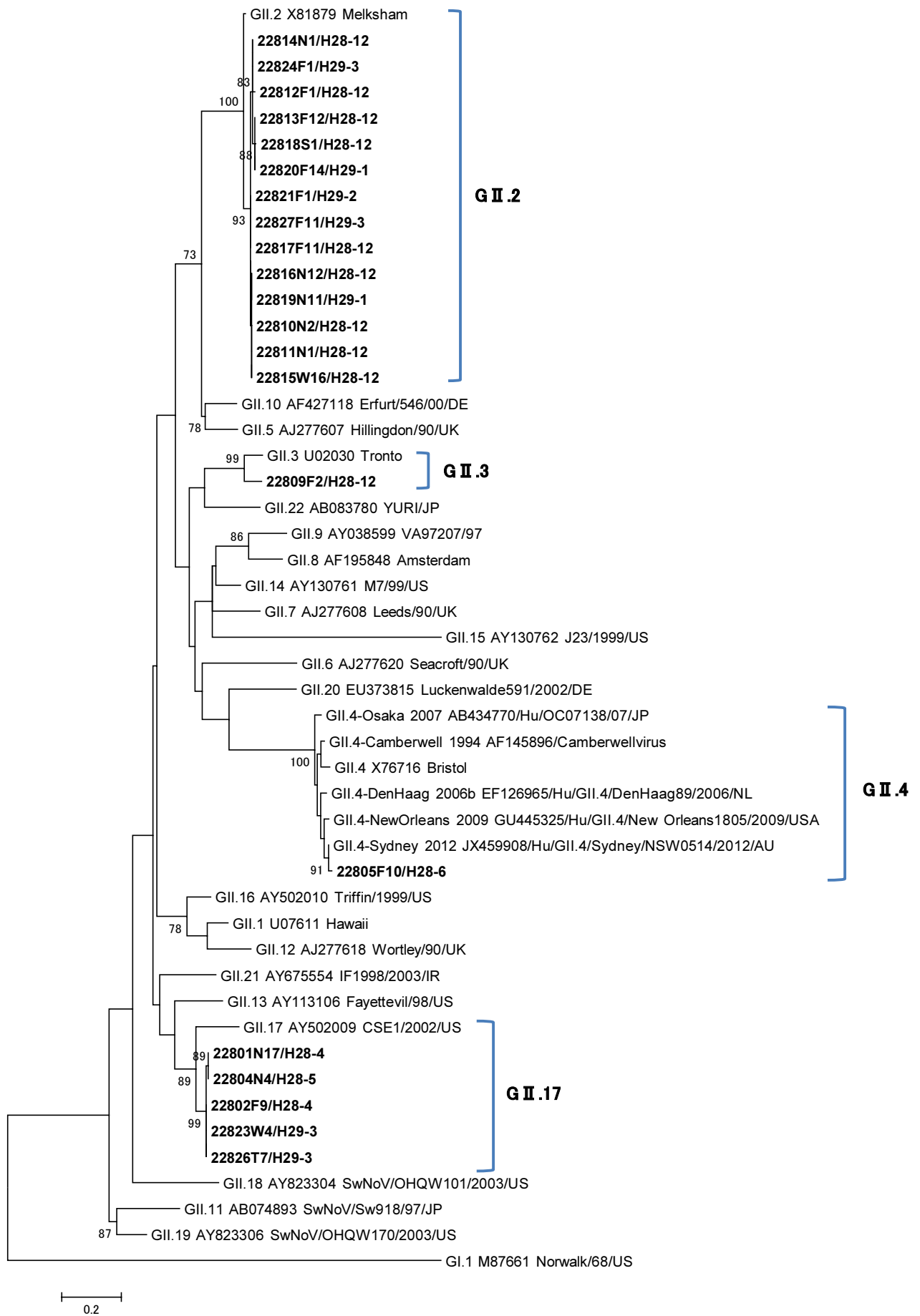


図 2 Genogroup II の系統樹解析

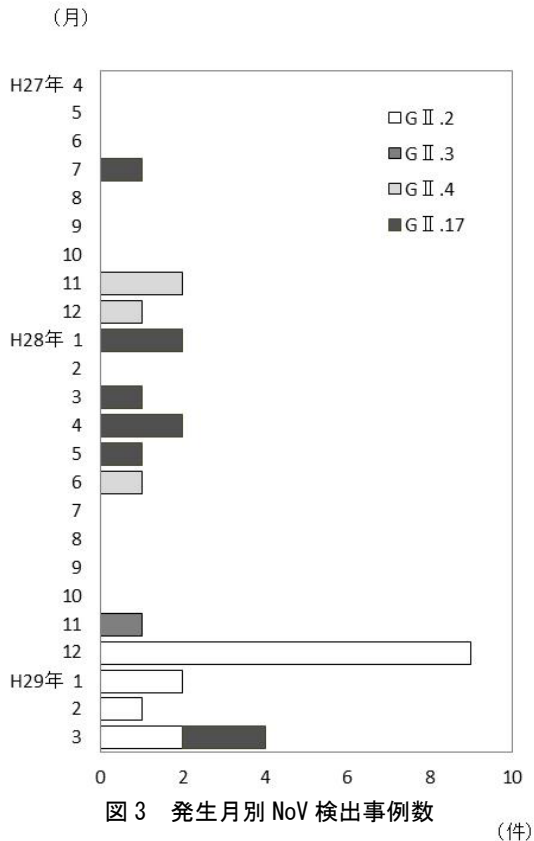


図3 発生月別 NoV 検出事例数

このことから、当県においても NoV は集団発生に大きく関与していることが示唆された。食中毒事件にはならなかったが、ヒト-ヒト感染が感染経路と推定された事例も多く、NoV の予防対策は重要であると考えられる。

Capsid 領域における遺伝子解析の結果、平成 28 年度は GII.17、GII.4、GII.3、GII.2 の 4 種類の遺伝子型が検出された。

GI.17 は平成 28 年 4 月から 5 月までの 3 事例と平成 29 年 3 月の 2 事例で検出されており、Capsid 領域における相同性は高かった (99.3%)。川崎市では平成 26 年 3 月の糞便検体より、Hu/GII/JP/2014/GII.P17-GII.17 (以下 GII.17 Kawasaki 2014) の検出が報告され、GII.P17 が新規遺伝子型と認定された。以降、平成 26 年 12 月から平成 27 年 3 月にかけて全国の食中毒事例から類似株の検出が相次いだ。GII.17 Kawasaki 2014 は以前に検出された GII.17 や GII.4 と抗原性が大きく異なることが示唆されている¹⁴⁾。福井県内でも同時期に GII.17 が検出されたことから、県内で流行した GII.17 も GII.17 Kawasaki 2014 類似株であった可能性がある。

GI.4 は平成 28 年 6 月に 1 事例から検出された。小児の散発胃腸炎症例において GII.4 は常に主要な遺伝子型であり¹⁹⁾、2015/16 シーズンにおける小児の散発例胃腸炎患者からの NoV 検出割合は GII 型別不明 (38%) を除くと、GII.4 (31%) が最も多かったとの報告がある²⁰⁾。当センターで検出された 1 事例 (22805) では、式典参加者である小児が先行発症していたとの情報もあり、小児感染事例との関連も考えられる。

GI.2 は平成 28 年 12 月から翌年 3 月までの 14 事例か

ら検出され、平成 28 年度において最も多く検出された遺伝子型であった。県内では平成 26 年以降の検出となった²¹⁾。国内では 2016 年内に宮城県、千葉市において GII.2 による集団発生事例の多発について報告があった^{22),23)}。また、同時期に茨城県と川崎市において検出された GII.2 について詳細な分子疫学解析が行われ、過去に検出された GII.2 株とは遺伝学的性状が異なる変異株 (GII.P16-GII.2) であることが示された²⁴⁾。よってこの遺伝子型に対する感受性者が多く存在し、流行の主流となることが予想された。2016/17 シーズンに検出されている NoV の約半数は GII.2 となっており¹⁵⁾、全国と同様に県内でも GII.2 が流行の主流であった。

平成 28 年度は県内で検出された NoV の遺伝子型に変遷が見られた。NoV 感染により遺伝子型特異的な防御反応が誘導されるが、異なる遺伝子型の NoV 感染は防御できないとの報告もあることから²⁵⁾、今後も検出される遺伝子型の変遷に注視する必要があると考えられる。

5. まとめ

平成 28 年度に検査した集団発生 27 事例 417 検体のうち、21 事例 138 検体から NoV を検出した。遺伝子解析を実施したところ、4 種類の遺伝子型 (GI.2、GI.3、GI.4、GI.17) が検出され、特に GII.2 が多数 (14 事例: 66.7%) を占めた。

謝辞

疫学等の情報収集および検体の搬入を御担当された健康福祉センター、福井県健康福祉部医薬食品・衛生課、健康増進課の関係各位に深謝いたします。

参考文献

- 1) 武田直他：カリシウイルスの命名変更について、IASR., 24, 311-312(2003)
- 2) 片山和彦：胃腸炎関連カリシウイルス (ノロウイルス、サポウイルス) 総論、IASR., 24, 312-314(2003)
- 3) 田代真人他：ウイルス感染症の検査・診断スタンダード、羊土社 (2011)
- 4) 丸山務他：つけない・うつさない・持ち込まない ノロウイルス現場対策 その感染症と食中毒、幸書房 (2006)
- 5) 片山和彦：ノーウォークウイルス (ノロウイルス) の遺伝子型 2014 年版 IASR., 35, 173-175(2014)
- 6) Kroneman A. et al. : Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping., Arch. Virol., 158, 2059-2068(2013)
- 7) Siebenga J.J. et al. : Epochal Evolution of GGII.4 Norovirus Capsid Proteins from 1995 to 2006., J. Virol., 81, 9932-9941(2007)
- 8) Vega E. et al. : Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States., Emerg. Infect. Dis., 17, 1389-1395(2011).
- 9) J. van Beek et al. : Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012., Eurosurveillance, 18, 03 Jan(2013).
- 10) 本村和嗣 他：ノロウイルスのゲノム解析と流行発生のしくみ、感染症誌, 86, 563-568(2012)

- 11) 田村務 他：ノロウイルス GⅡ/4 の新しい変異株の遺伝子解析と全国における検出状況，IASR., 33, 333-334(2012)
- 12) 東方美保 他：平成 14～18 年度に福井県で検出されたノロウイルスの遺伝子解析，福井県衛生環境研究センター年報, 5, 60-72(2006)
- 13) 小和田和誠 他：平成 22～24 年度に福井県の集団発生事例から検出されたノロウイルスの遺伝子解析，福井県衛生環境研究センター年報, 11, 58-62(2012)
- 14) Matsushima Y. 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., *Eurosurveillance*, 20, 02 Jul (2015).
- 15) 国立感染症研究所感染症疫学センター：都道府県別ノロウイルス GⅡ 遺伝子型検出状況報告 2015/16&2016/17 シーズン
https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/rapid/noro/160920/noro201617_170126.gif
- 16) 厚生労働省医薬局食品安全部監視安全課長通知：「ノロウイルスの検出法について」の一部改正について，食安監発第 1022 第 1 号，平成 25 年 10 月 22 日
- 17) Kojima S. et al. : Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses, *J. Virol. Methods.*, 100, 107-114(2002)
- 18) Tamura K. et al. : *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.*, *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729 (2013)
- 19) 左近直美 他：ノロウイルスの流行と遺伝子型，*日本食品微生物学会雑誌*, 33, 97-106(2016)
- 20) ノロウイルス感染症 2015/16 シーズン, IASR., 38, 1-3(2017)
- 21) 小和田和誠 他：近年の福井県におけるノロウイルスの検出状況（平成 22～26 年度），福井県衛生環境研究センター年報, 13, 70-73(2014)
- 22) 宮城県内で流行しているノロウイルス（NoV）の遺伝子型について, IASR., 38, 17-18(2017)
- 23) 2016 年 9～11 月のノロウイルス感染集団発生事例について - 千葉市, IASR., 38, 18-19(2017)
- 24) 茨城県と川崎市における 2016/17 シーズンに検出されたヒトノロウイルス GⅡ.P16-GⅡ.2 の分子疫学, IASR., 38, 19-20(2017)
- 25) Ryder R. W. et al. : Evidence of immunity induced by naturally acquired rotavirus and Norwalk virus infection on two remote Panamanian islands., *J. Infect. Dis.*, 151, 99-105(1985)

2016/17 シーズンの福井県のインフルエンザ

佐藤かおり・酒井妙子・平野映子

Epidemiological Studies of Influenza in Fukui Prefecture in 2016/17 Season

Kaori SATO, Taeko SAKAI, Eiko HIRANO

1. はじめに

インフルエンザの感染者は例年 1,000 万人、死亡者は 1 万人と推定されており、社会生活に与える影響は大きい。

インフルエンザウイルスには A、B、C の 3 つの型があるが、このうち A 型および B 型は、毎年のように大きな流行を引き起こしている¹⁾。

当センターでは毎シーズン、県内の患者から採取された検体を用いてインフルエンザウイルスの分離、型の同定および薬剤耐性サーベイランス等の性状解析を行っている。本報では、2016/17 シーズン（以下「今シーズン」）のインフルエンザの流行状況について、これらの結果をまとめたので報告する。

2. 調査方法

2. 1 調査期間

2016 年 9 月～2017 年 5 月

2. 2 検査材料

県内 5 医療機関（嶺北 3 機関、嶺南 2 機関）でインフルエンザ様疾患患者から採取された 149 検体（149 名）を用いた。その内訳は、鼻腔拭い液 130 検体、咽頭拭い液 17 検体、その他 2 検体であった。

2. 3 ウイルス分離および同定

ウイルス分離は MDCK 細胞を用い、既報²⁾に準じて実施した。細胞変性効果が見られた培養上清は、0.75%モット血球を用いて赤血球凝集（HA）試験を実施した。

同定および抗原解析には、国立感染症研究所から分与された抗血清（A/California/7/2009（H1N1）pdm09、A/Hong Kong/4801/2014（H3N2）、B/Phuket/3073/2013（山形系統）、B/Texas/2/2013（ビクトリア系統））を用いて赤血球凝集阻止（HI）試験を実施した。

2. 4 ウイルス遺伝子検索

HA 価が十分に上がらず HI 試験を実施できない場合は MDCK 細胞の培養上清を、ウイルス分離陰性および非流行期検体の場合は臨床検体を材料として、それぞれリアルタイム RT-PCR 法にてウイルス遺伝子を検索した。RNA 抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いた。

「インフルエンザ診断マニュアル（第 3 版）」³⁾に準じ、A 型については A 型インフルエンザウイルス共通の M 遺

伝子および A（H1N1）pdm09（以下「AH1pdm」）、A（H3N2）（以下「AH3」）の HA 遺伝子、B 型については B 型インフルエンザウイルス共通の NS 遺伝子、B 型山形系統（以下「B（山形）」）および B 型ビクトリア系統（以下「B（Vic）」）の HA 遺伝子の計 6 種類の遺伝子の検索を、リアルタイム RT-PCR 法により実施した。

リアルタイム RT-PCR 法には、QuantiTect Probe RT-PCR Kit（QIAGEN）、機器は Step One Plus Real-Time PCR System（Applied Biosystems）を使用した。

2. 5 薬剤耐性株サーベイランス

AH1pdm の分離株について、国立感染症研究所の「A/H1N1pdm09 H275Y 耐性株検出法実験プロトコール（2011 年 8 月 ver.2）」に準じ、TaqMan RT-PCR 法を用いてオセルタミビルおよびペラミビル耐性株に特徴的な NA 遺伝子上の H275Y 耐性マーカー検査を実施した。

TaqMan RT-PCR 法には、QuantiTect Virus Kit（QIAGEN）を用い、機器は Step One Plus Real-Time PCR System を使用した。

2. 6 患者発生状況調査

インフルエンザ様疾患の集団発生については、福井県健康増進課感染症対策グループからの公表に基づき、集計を行った。

インフルエンザ様疾患発生報告数については、県内の 32 の定点医療機関（小児科および内科）から報告のあったインフルエンザ（鳥インフルエンザを除く）の患者情報について、感染症サーベイランスシステム（National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases: NESID）内の感染症発生動向調査システムの数値を用いて集計した。

3. 結果および考察

3. 1 病原体検出および性状把握

3. 1. 1 ウイルス分離および同定

供試検体 149 検体から 31 株（20.8%）のインフルエンザウイルスが分離された。分離株について培養上清を用いて HA 試験を実施したところ、31 株中 27 株は HA 価が十分に上がったため、HI 試験を実施した。

HI 試験により 27 株中 11 株は AH1pdm、5 株は AH3、8 株は B（山形）、3 株は B（Vic）と同定された。

3. 1. 2 分離ウイルスの抗原性状

分離ウイルスの抗原性状を表 1 に示す。

(1) AH1pdm

ワクチン株である A/California/7/2009 のホモ価 320 に対し、分離株の HI 価は 160 (3 株) および 320 (8 株) であった。分離株の HI 価は全てホモ価の 2 倍以内でありワクチン株と抗原性が類似していた。

(2) AH3

ワクチン株である A/Hong Kong/4801/2014 のホモ価 5120 に対し、分離株の HI 価は 20 (1 株)、40 (1 株)、80 (1 株)、160 (1 株) および 640 (1 株) であった。分離株の HI 価は全てホモ価の 8 倍以上でありワクチン株と抗原性に相違が見られた。

(3) B (山形)

ワクチン株である B/Phuket/3073/2013 のホモ価 160 に対し、分離株の HI 価は 80 (1 株)、160 (6 株) および 320 (1 株) であった。分離株の HI 価は全てホモ価の 2 倍以内でありワクチン株と抗原性が類似していた。

(4) B (Vic)

ワクチン株である B/Texas/2/2013 のホモ価 160 に対し、分離株の HI 価は 320 (2 株) および 640 (1 株) であった。分離株の HI 価は全てホモ価の 4 倍以内であり

表 1 分離ウイルスの抗原性状

AH1pdm				
HI価				分離数
A/California /7/2009	A/Hong Kong /4801/2014	B/Phuket/ /3073/2013	B/Texas /2/2013	
160	<10	<10	<10	3
320	<10	<10	<10	8
PCRで同定				0
計				11
AH3				
HI価				分離数
A/California /7/2009	A/Hong Kong /4801/2014	B/Phuket/ /3073/2013	B/Texas /2/2013	
<10	20	<10	<10	1
<10	40	<10	<10	1
<10	80	<10	<10	1
<10	160	<10	<10	1
<10	640	<10	<10	1
PCRで同定				4
計				9
B (山形)				
HI価				分離数
A/California /7/2009	A/Hong Kong /4801/2014	B/Phuket/ /3073/2013	B/Texas /2/2013	
<10	<10	80	<10	1
<10	<10	160	<10	6
<10	<10	320	<10	1
PCRで同定				0
計				8
B (Vic)				
HI価				分離数
A/California /7/2009	A/Hong Kong /4801/2014	B/Phuket/ /3073/2013	B/Texas /2/2013	
<10	<10	<10	320	2
<10	<10	<10	640	1
PCRで同定				0
計				3
ホモ価				
320	5120	160	160	

ワクチン株と抗原性が類似していた。

3. 1. 3 ウイルス遺伝子検索

HA 価が十分に上がらず HI 試験を実施できなかった 4 株について、細胞培養上清を用いてリアルタイム RT-PCR 法にてウイルス遺伝子を検索したところ全て AH3 であった。

分離陰性および非流行期検体であった 118 検体について、臨床検体を用いてウイルス遺伝子を検索したところ、AH1pdm が 2 検体、AH3 が 84 検体、B (山形) が 1 検体および陰性が 31 検体であった。

3. 1. 4 ウイルス検出状況

インフルエンザウイルスの検出状況を検体採取週別に図 1 に示した。今シーズンは AH1pdm 13 件 (11.0%)、AH3 93 件 (78.8%)、B (山形) 9 件 (7.6%) および B (Vic) 3 件 (2.5%) が検出された。

全国の検出状況でも本県同様、AH3 が全体の約 8 割を占め、B 型は B (山形) が B (Vic) よりやや優位であった⁴⁾。

2015/16 シーズン (以下「昨シーズン」) の流行の主流は AH1pdm であった⁵⁾が、今シーズンの流行の主流は AH3 であった。AH1pdm は 2016 年第 44、46、48~51、2017 年第 2、3 および 5 週に採取された検体から検出された。AH3 は 2016 年第 43、47~52、および 2017 年第 1~16 週に採取された検体から検出された。B (山形) は 2017 年第 4、10、12、14 および 16~18 週に採取された検体から検出された。B (Vic) は 2017 年第 19 および 20 週に採取された検体から検出された。

今シーズンは例年に比べ、インフルエンザの検出開始が比較的早かった。例年通りシーズン当初は A 型、後半に B 型が検出された。A 型はシーズン当初 AH1pdm が検出されていたが、2016 年第 52 週以降は AH3 型が大半を占めた。

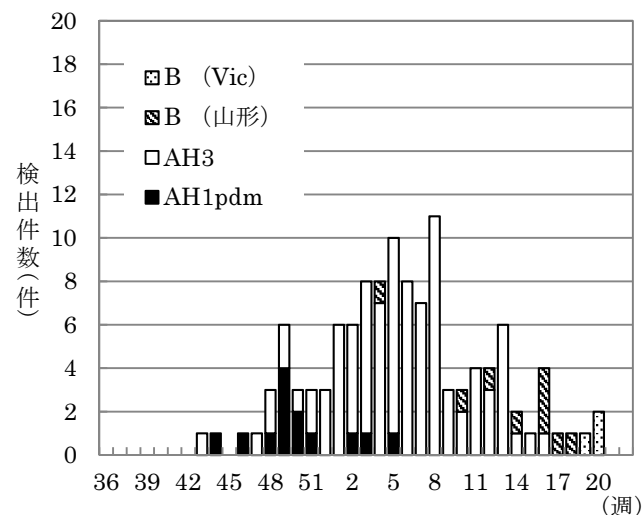


図 1 検体採取週別検出状況

3. 1. 5 薬剤耐性サーベイランス

今シーズンに分離された AH1pdm 11 株について薬剤耐性マーカー検査を実施した。H275Y および H275H/Y (H と Y の混合ウイルス) は検出されなかった。

3. 2 患者発生状況

3. 2. 1 インフルエンザ様疾患集団発生報告

インフルエンザ様疾患の集団発生状況を図2（施設数および患者数）に示した。今シーズンの初発は2016年第42週、ピークは2016年第5週（施設数：64件、患者数：666人）であり、2017年第22週に終息した。集団発生施設数は344件、総患者数3,698人、総欠席者数3,331人であった。施設別では、小学校（244件）が最も多く、次いで中学校（55件）、高校（26件）と続いた。昨シーズン⁵⁾と比較すると、初発は9週、ピークは4週早かったが、終息は同時期に迎えた。

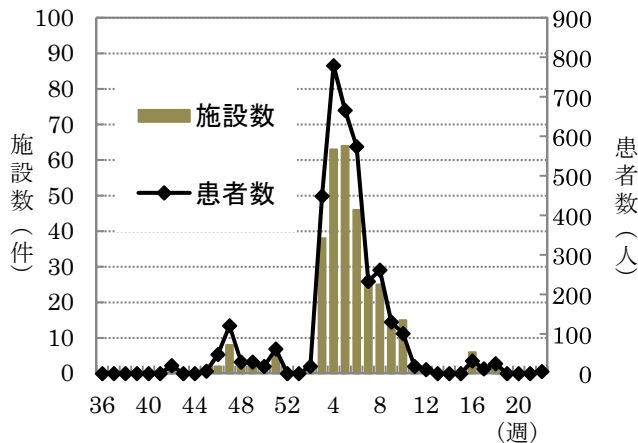


図2 インフルエンザ様疾患集団発生の状況
（施設数および患者数）

3. 2. 2 感染症発生動向調査（患者報告）

患者発生動向調査における定点あたりのインフルエンザ様疾患の患者報告数を図3（福井県：2012年第36週～2017年第24週）および図4（福井県と全国：2016年第36週～2017年第24週）に示した。

定点あたり患者報告数は、2016年第43週に1.66人/定点となり流行開始指標値（1.0人/定点）に達し、流行期に入った。2016年第50週には11.16人/定点となり、流行発生注意報の基準値（10.0人/定点）を超え、注意報が発令され、2017年第5週に今シーズンのピーク（44.47人/定点）に達した。第14週に10.0人/定点を下回り、第24週に1.0人/定点以下となりインフルエンザの流行は終息した。

今シーズンの累積患者数における年齢階層別割合を図5に示した。累積患者数は、例年同様5～9歳（3,647名）が最も多く、次いで10～19歳（2,870名）、0～4歳（2,867名）の順であった。今シーズンは9歳未満が47%と約半数を占めた。

4. まとめ

本県における2016/17シーズンのインフルエンザウイルスの流行は、2シーズンぶりにAH3が流行の主流となった。

本県で分離されたAH1pdmからは薬剤耐性マーカーは検出されなかった。

例年に比べ流行の開始は早かったが、終息は例年と同様であった。患者年齢は例年通り0～19歳の占める割合が高く、集団発生は小学校での発生が多かった。

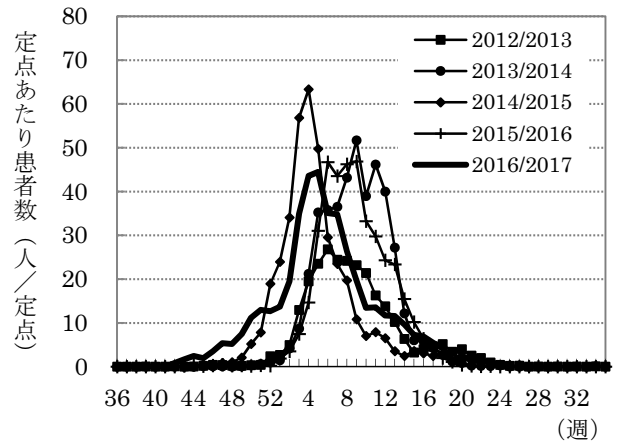


図3 インフルエンザ様疾患患者報告数
（シーズン別）

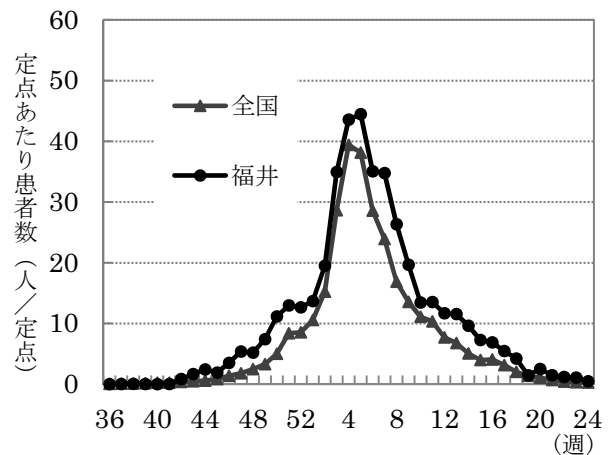


図4 インフルエンザ様疾患患者報告数

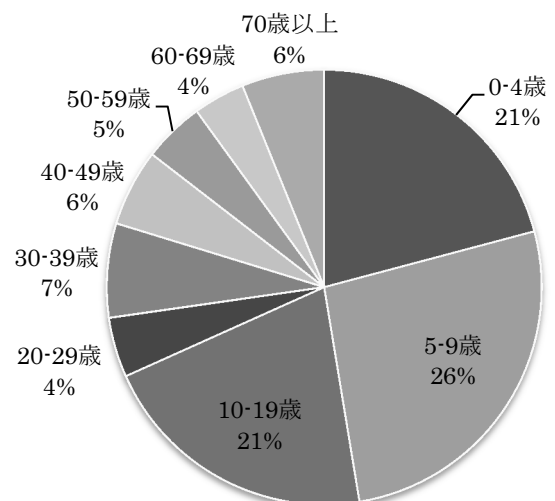


図5 年齢階層別割合

謝辞

検体採取に御協力いただきました各健康福祉センターおよび医療機関の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) 押谷仁：新型インフルエンザと鳥インフルエンザ，臨床と微生物，**41**, 55-58(2014)
- 2) 中村雅子 他：2002/03 シーズンの福井県のインフルエンザ，福井県衛生環境研究センター年報，**1**, 126-131(2003)
- 3) 国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル（第3版）
- 4) 国立感染症研究所感染症疫学センター：週別インフルエンザウイルス分離・検出報告数，2012/13～2016/17 シーズン
- 5) 平野映子 他：2015/16 シーズンの福井県のインフルエンザ，福井県衛生環境研究センター年報，**14**, 77-80(2015)

フザリウムトキシナー斉分析法の検討

酒井康行・小西伊久江

Study of Simultaneous Analysis Method for Fusarium Toxin

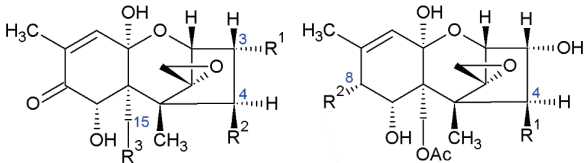
Yasuyuki SAKAI, Ikue KONISHI

1. はじめに

フザリウムトキシンは、フザリウム属のかびが産生する
かび毒の総称である。デオキシニバレノール、ニバレノール
等のトリコテセン系やゼアラレノンが広く知られてい
る。ヒトや動物が摂取すると、下痢、嘔吐等の消化器症状
や免疫抑制等を起こす^{1,2)}。

これまでの調査によって、汚染食品は小麦、大麦、トウ
モロコシ等の穀類およびその加工品に多く、その汚染濃度
は、かびの生息分布・天候等が影響するため地域性があり、
わが国では、かびの生息域に該当し、かつ、汚染食品とな
る小麦、大麦の収穫期がちょうど梅雨の時期と重なること
から、比較的高濃度の汚染が報告されている^{3,4)}。平成 14
年には、食品衛生法に基づきデオキシニバレノールの暫定
的基準 1.1ppm (小麦) が設定された⁵⁾。また、平成 19 年
には、「麦類のデオキシニバレノール・ニバレノール汚染
低減のための指針」が農林水産省から発出されたことによ
り、麦類の生産段階(栽培・乾燥調製・貯蔵)における低
減化対策が推進され、汚染濃度は徐々に減少しているが、
完全にコントロールされるまでには至っていない(図 1)
6,7)。

新たに、トリコテセン系の A タイプやアセチル化体・配
糖体等の類縁化合物(図 2)の汚染も明らかとなった⁸⁾。
一部の化合物については、食品安全委員会または
FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA)で既に
健康影響が評価され、平成 27 年には国際規格である
Codex 規格で、アセチル化体を含めたデオキシニバレノール
の基準値が設定された(表 1)。フザリウムトキシンの



B-type	R1	R2	R3	A-type	R1	R2
デオキシニバレノール	OH	H	OH	T-2 トキシン	OAc	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
3-アセチルデオキシニバレノール	OAc	H	OH	HT-2 トキシン	OH	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
15-アセチルデオキシニバレノール	OH	H	OAc	ジアセトキシニバレノール	OAc	H
ニバレノール	OH	OH	OH			
フザレノン-X	OH	OAc	OH			

図 2 代表的なトリコテセン系かび毒
(構造式は ChemSketch で作成)

基準値設定に向けた検討は、今後ますます進むと予想され
る。

本県は六条大麦の収穫量日本一を誇る大産地であり、県
内産穀類等を対象とした汚染実態調査を実施することに
した。今回は、LC-MS/MS を用いたフザリウムトキシナー
斉分析法の検討を行った。検討対象は、MS 条件(イオ
ン化、MRM トランジション)および HPLC 条件(分析カ
ラム、移動相等)であり、各項目について最適化した後、
定量限界および検量線の範囲・直線性について評価したの
で、その結果を報告する。

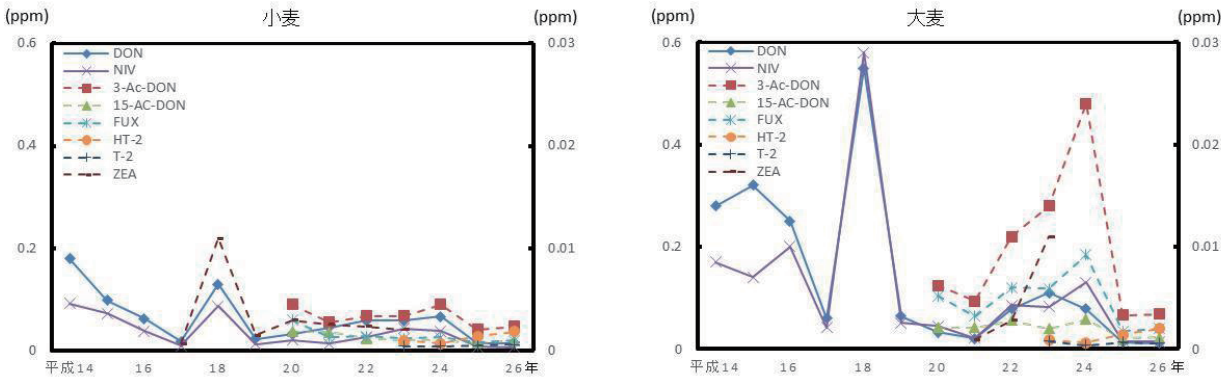


図 1 小麦および大麦におけるフザリウムトキシンの汚染濃度推移

[DON、NIV、3-AcDON、15-AcDON、FUX、HT-2、T-2、ZEN はそれぞれデオキシニバレノール、ニバレノール、3-アセチルデオキシニバレノール、15-アセチルデオキシニバレノール、フザレノン-X、HT-2 トキシン、T-2 トキシン、ゼアラレノンの略。DON および NIV は第 1 軸、その他のフザリウムトキシンは第 2 軸を使用。図は、農林水産省の汚染実態調査結果を基に作成。]

表1 主なトリコテセン系かび毒のリスク評価とリスク管理の状況

化合物名	リスク評価		リスク管理	
	国内（食安委）	国際（JECFA）	国内（厚労省）	国際（Codex）
デオキシニパレノール	1 μ g/kg 重/日	1 μ g/kg 重/日	1.1 mg/kg （小麦）	2.0 mg/kg（小麦、大麦、トウモロコシ） 1.0 mg/kg（ワウ、ミル、セリナ、フレク） 0.2 mg/kg（乳児用食品）
3-アセチルデオキシニパレノール	—		—	
15-アセチルデオキシニパレノール	—		—	
ニパレノール	0.4 μ g/kg 重/日	—	—	—
フザレノン-X	—	—	—	—
T-2 トキシン	—	0.06 μ g/kg 重/日	—	—
HT-2 トキシン	—		—	—
ジアセトキシシルペノール	—		—	—

2. 実験方法

2. 1 測定対象

デオキシニパレノール、ニパレノール、3-アセチルデオキシニパレノール、15-アセチルデオキシニパレノール、フザレノン-X、HT-2 トキシン、T-2 トキシン、ジアセトキシシルペノール、ゼアラレノン（以下、それぞれ「DON」、「NIV」、「3-AcDON」、「15-AcDON」、「FUX」、「HT-2」、「T-2」、「DAS」および「ZEN」という。）

2. 2 試薬等

2. 2. 1 標準物質および使用溶媒等

かび毒標準品：A,B-トリコテセン、ゼアラレノン混合標準液（各 10 μ g/mL アセトニトリル溶液、和光純薬工業）、3-AcDON 標準品（和光純薬工業）および 15-AcDON 標準品（和光純薬工業）を用いた。

かび毒混合標準溶液：A,B-トリコテセン、ゼアラレノン混合標準液および 15-AcDON 標準品をアセトニトリルで 10 μ g/mL になるよう希釈した標準溶液を 500 μ L ずつ 1.5mL バイアルに採り、40℃以下で溶媒除去した。残留物に、10mM 酢酸アンモニウム水溶液：メタノール(9:1) 混液 500 μ L を加えて調製した。

内部標準品：ベルカロール標準品（和光純薬工業）およびゼアラレノン標準品（和光純薬工業）を用いた（以下、それぞれ「VEL」および「ZAN」という。）。

内部混合標準溶液：各内部標準品をアセトニトリルで 10 μ g/mL になるよう希釈した。

使用溶媒等：アセトニトリル、メタノール、超純水およびギ酸は LC/MS 用を用いた。酢酸アンモニウムは液体クロマトグラフ用（和光純薬工業）を用いた。メーカーを特

に記載していないものは、和光純薬工業または関東化学のものを使用した。

2. 2. 2 評価用標準溶液の調製

かび毒混合標準溶液（各 10 μ g/mL）および内部混合標準溶液（各 10 μ g/mL）を 10mM 酢酸アンモニウム水溶液：メタノール(9:1)混液で希釈した。

2. 2. 3 検量線用標準溶液の調製

かび毒混合標準溶液（各 10 μ g/mL）を 10mM 酢酸アンモニウム水溶液：メタノール(9:1)混液で適宜希釈し、各 1、2、5、10、20、50、100、200ng/mL の標準溶液を調製した。内部標準法で定量する場合は、別途、内部混合標準溶液（各 10 μ g/mL）を 100ng/mL となるよう添加した。

2. 3 装置および測定条件

装置：液体クロマトグラフ質量分析計 Prominence 20A/3200Q TRAP（島津製作所/Sciex）、カラム：L-column2 ODS メタルフリー 粒子径 3 μ m、2.0mm i.d. $\times$ 150mm（化学物質評価研究機構）、Kinetex PFP 粒子径 2.6 μ m、2.1mm i.d. $\times$ 150mm（Phenomenex）、CAPCELL CORE ADME 粒子径 2.7 μ m、2.1mm i.d. $\times$ 150mm（資生堂）（以下、それぞれ「ODS カラム」、「PFP カラム」、「ADME カラム」と言う。）、移動相：A 液 10mM 酢酸アンモニウム水溶液、B 液メタノール、グラジエント条件：B 液 10%(0min)→90%(15min)→90%(20min)、流速：0.2mL/min、カラム温度：40℃、注入量：5 μ L、MRM 条件：表 2 のとおり。

上記条件で、標準溶液を LC-MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法または内部標準法により定量した。内部標準物質には、トリコテセン系かび毒は VEL を、ZEN には ZAN を割り当てた。

表2 MRM トランジション

	DON	NIV	3-AcDON	15-AcDON	同左	FUX	HT-2	T-2	DAS	VEL	ZEN	ZAN
イ化法	ESI(-)	同左	ESI(+)	同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左
定量イ	371>281	355>295	339>231	356>321	339>261	372>355	442>263	484>305	384>307	284>267	319>187	321>303
確認イ	371>311	355>265	339>203	356>137	339>137	372>247	442>215	484>185	384>247	284>249	319>283	321>189

2. 4 試験法の開発

フザリウムトキシシンには、小麦中の「デオキシニバレノール試験法」を除いて告示または通知で示された、いわゆる公定法が存在しない。そのため、ジェネリックアプローチ⁹⁾による試験法の開発に取り組んだ。ジェネリックメソッドは、準公定法として扱われる食品衛生検査指針やカビ毒試験法評価委員会¹⁰⁾で示された試験法等を参考にして、図3のとおり設定した^{1,10)}。

前処理	測定法
試料 25g	測定機器 LC-MS/MS
AcCN/水 (85:15) 100mL	カラム ODS
振とう	粒子径 3 μ m、2.0mm $\times$ 150mm
遠心分離	移動相 A 10mM 酢酸アンモニウム
10mL 負荷	移動相 B メタノール
多機能カラム	グラジエント 10% (0min) $\rightarrow$ 90% (10min) $\rightarrow$ 90% (15min)
溶媒除去	流速 0.2mL/min
10mM 酢酸アンモニウム : メタノール (9:1) 1mL	カラム温度 40°C
試料液	

図3 設定したジェネリックメソッド

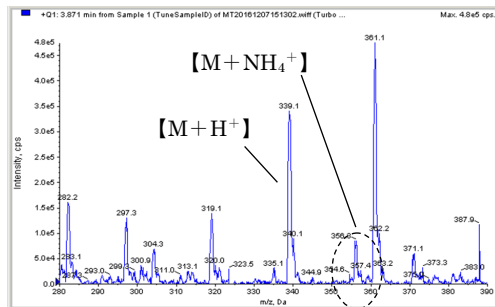
設定したメソッドから、LC-MS/MS の MS 条件、分析カラム、移動相、グラジエント条件の順に検討した。

3. 結果および考察

3. 1 MS 条件の検討

評価用標準溶液をインフュージョン法で MS 部へ直接導入し、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) のポジティブとネガティブの両モードでスキャン測定することにより、プリカーサーイオンを選定した。ただし、3-AcDON と 15-AcDON については、同定が困難であったことから、単体標準溶液を用いて再測定した。

3-AcDON



15-AcDON

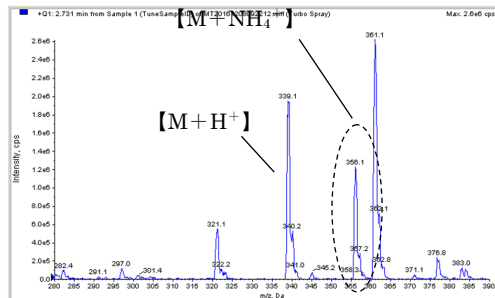


図4 3-AcDON および 15-AcDON のインフュージョン法による SCAN 測定

プリカーサーイオンは、DON および NIV はネガティブモードで酢酸イオン付加体を選定した。FUX、HT-2、T-2、

DAS および VEL はポジティブモードでアンモニア付加体とし、3-AcDON、ZEN および ZAN はプロトン付加体、15-AcDON はアンモニア付加体とプロトン付加体の両方とした。15-AcDON を 2 種類とした理由は、プロトン付加体 (m/z 339) は強度は高いが、3-AcDON と同じプリカーサーイオンのため、選択性が得られない可能性があったためである。そこで、3-AcDON と 15-AcDON の強度に明らかな有意差があるアンモニア付加体 (m/z 356) を追加した (図4)。

次に、解析ソフト (Analyst) の最適化ツールを用いてプロダクトイオンおよび MS パラメータ (コリジョンエネルギーおよび電圧等) の最適化を行い、MS 条件を決定した。原則として、化合物ごとに定量用と確認用に 2 チャンネルを設定したが、15-AcDON については 4 チャンネルを設定した。なお、その後の検討により、15-AcDON にはアンモニア付加体が適当であると判明した。これについては次項で詳述する。

3. 2 分析カラムの検討

ジェネリックメソッドと決定した MS 条件を用いて、評価用標準溶液を測定した。その結果を図5に示す。

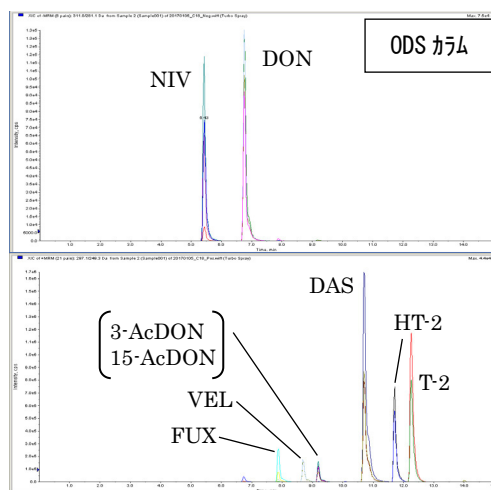


図5 ODS カラムを用いた評価用標準溶液の測定 (上段 ESI(-) 下段 ESI(+), 以下同じ)

概ね良好なクロマトグラムが得られたが、位置異性体である 3-AcDON と 15-AcDON を分離することができなかった。そこで、既報^{8,11,12)}を参考にして、官能基に含まれるフッ素原子の静電的相互作用による分離を目的とした PFP カラムと、カゴ状のアルキル基の表面極性による分離を目的とした ADME カラムを用いて、3-AcDON と 15-AcDON の分離を試みた (図6)。

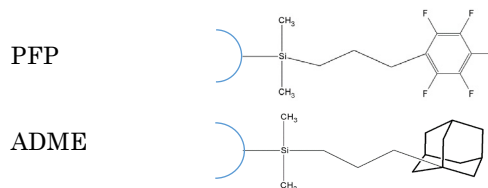


図6 検討した分析カラム

結果を図7に示す。いずれの分析カラムも3-AcDONと15-AcDONを分離することができ、その他の化合物のクロマトグラムも良好であった。したがって、両カラムとも使用可能と考えられたが、PFPカラムは装置の耐圧上限付近まで圧力が上昇してしまったことから、装置への影響を考慮してADMEカラムを採用することにした。

また、分析カラムによって3-AcDONと15-AcDONの分離が可能となったことにより、15-AcDONのMRMトランジションについては、プロトン付加体をプリカーサーイオンとする定量用339>261、確認用339>137でも、アンモニア付加体をプリカーサーイオンとする定量用356>321、確認用356>137でも検出可能であることがわかった(図8)。ただし、後者は3-AcDONをほぼ検出せず、15-AcDONを選択的に検出できるため、356>321、356>137を用いることにした。

なお、3-AcDONの定量用339>231、確認用339>203については、15-AcDONを検出してしまいが、分析カラムで分離することができ、かつ、他に有効なトランジションを見つけ出せなかったため、そのまま採用した。

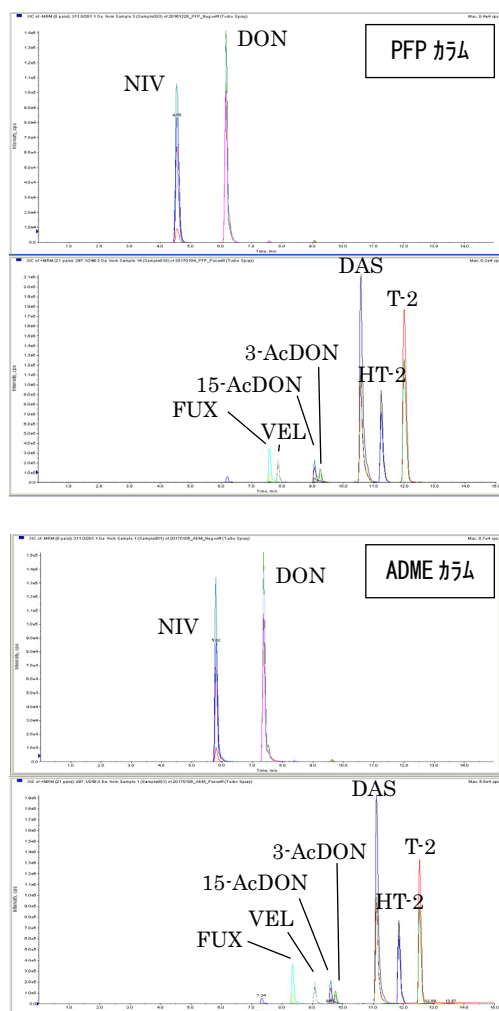


図7 PFPカラムおよびADMEカラムを用いた評価用標準溶液の測定

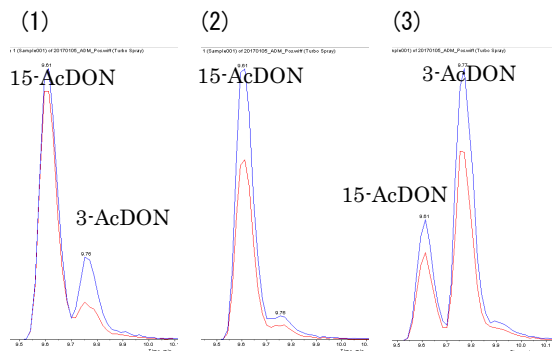


図8 3-AcDONと15-AcDONのMRM測定

- | | |
|------------------|-----------------------|
| (1) 15-AcDON 測定用 | 定量 339>261、確認 339>137 |
| (2) 同上 | 定量 356>321、確認 356>137 |
| (3) 3-AcDON 測定用 | 定量 339>231、確認 339>203 |

3.3 移動相の検討

移動相B液に用いる有機溶媒を検討した。メタノールからアセトニトリルに換えて、評価用標準溶液を測定したところ、3-AcDONと15-AcDONのピークの近接は解消されたが、各化合物の感度は最大で1/10程度まで減少した(図9)。フザリウムトキシンには微量分析が求められるので、移動相B液はメタノールのままとした。

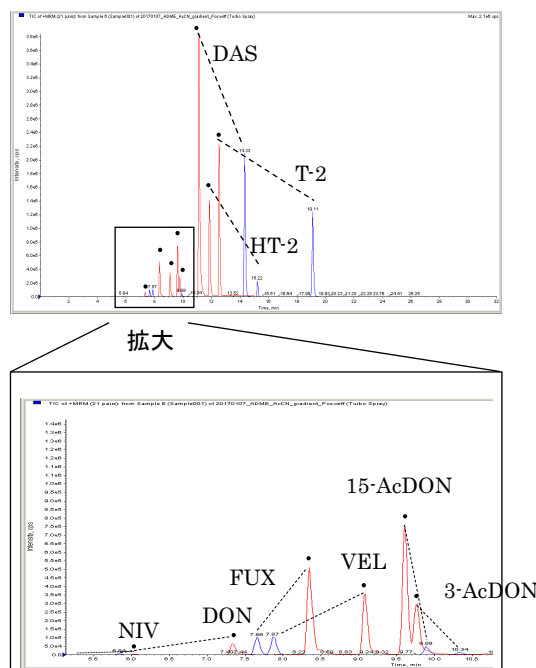


図9 移動相に用いる有機溶媒(メタノール、アセトニトリル)の違いによる測定強度の差

- 〔ピーク上部の●印はメタノールの結果を示した。メタノールとアセトニトリルの結果を破線で繋いだ。〕

次に、移動相A液に用いる酢酸アンモニウム水溶液のpHと塩濃度を検討した。pH検討用として、pH調整していない通常の10mM酢酸アンモニウム水溶液(pH6.5、実測値)と、それぞれ0.01%、0.1%になるよう乙酸を加えた10mM酢酸アンモニウム水溶液(pH4.9、pH3.4)を調製した。また、塩濃度検討用として、塩濃度が0、1、5、10、20mMの酢酸アンモニウム水溶液を調製した。これらを移動相A液に用いて、評価用標準溶液を測定した。

その結果、pH が低下するにつれて、ポジティブモードで測定する化合物の感度は上昇し、逆に、ネガティブモードで測定する化合物の感度は減少することがわかった (図 10)。これは pH の変化に伴って、イオン化効率が変化するためと考えられた。全体では、ネガティブモードで測定する DON および NIV の感度が低かったため、pH 調整はしないことにした。

酢酸アンモニウム水溶液の塩濃度については、明らかな有意差を確認できなかった。しかしながら、アンモニア付加体をプリカーサーイオンに選択していることに加えて、上述の結果からフザリウムトキシシンの感度は pH に依存することがわかったため、酢酸アンモニウムが持つ緩衝能に期待して 10mM のままとした。

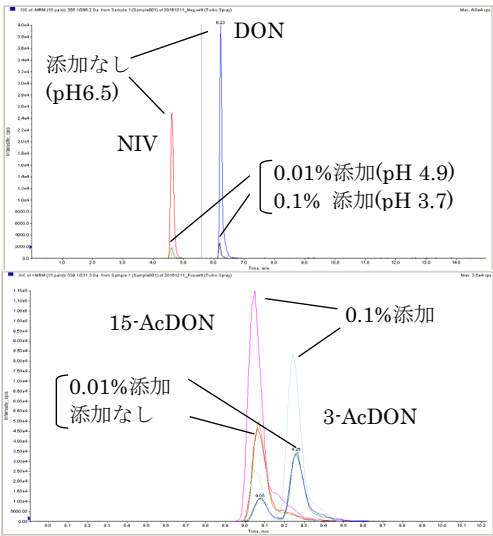


図 10 緩衝液 (pH) の違いによる測定強度の差

3. 4 グラジエント条件の検討

3-AcDON と 15-AcDON をさらに分離することを目的として、グラジエント条件を検討した。評価用標準溶液を既存メソッドである B 液: 10%(0min)→90%(10min)→90%(15min)から、初期濃度 (5%、10%)、溶出時間 (90%(10min)・90%(15min)、90%(20min)、90%(30min))、終了濃度 (70%、80%、90%) を順に換えて測定し、その挙動を確認した。

結果的に、3-AcDON と 15-AcDON の分離という点では、初期濃度や終了濃度を変えても大きな効果は得られず、溶出時間を長くすることが最も有効な手段であることがわかった (図 11)。一方で、溶出時間を長くすれば、分析時間も長くなる。今回の調査では、多検体を処理する予定のため、完全分離の目安となる分離度 1.5 を満たした最短条件 B 液: 10%(0min)→90%(15min)→90%(20min)を採用した。

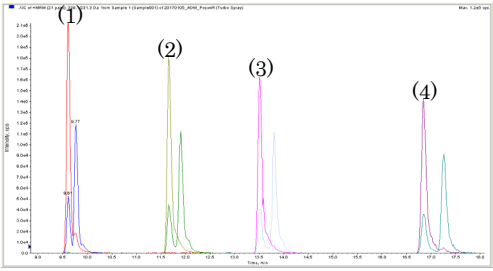


図 11 グラジエント条件 (溶出時間) の違いによる 3-AcDON と 15-AcDON の分離の差

- (1) 10%(0min)→90%(10min)→90%(15min)
- (2) 10%(0min)→90%(15min)→90%(20min)
- (3) 10%(0min)→90%(20min)→90%(25min)
- (4) 10%(0min)→90%(30min)→90%(35min)

3. 5 定量限界および検量線の範囲・直線性

最適化した条件を用いて、かび毒混合標準溶液 (各 1ng/mL 10mM 酢酸アンモニウム水溶液: メタノール(9:1) 混液) をそれぞれ併行測定 (n=6) し、得られたピーク面積から標準偏差 (σ) を算出した。その値に 3 と 10 を乗じた値から、検出限界および定量限界を推定した (表 3)。この結果から、A・トリコテセン系である T-2、HT-2、DAS の定量限界を 1ng/mL、B・トリコテセン系である DON、NIV、3-AcDON、15-AcDON、FUX、VEL と ZEN、ZAN の定量限界を 10ng/mL とした。なお、定量限界と同濃度のかび毒混合標準溶液を併行測定 (n=6) したところ、各々の相対標準偏差は 10RSD%以下であった。

次に、検量線の範囲および直線性を確認した。定量限界を 1ng/mL と定めた化合物については 1・200ng/mL の範囲で、また、定量限界を 10ng/mL と定めた化合物については 10・200ng/mL の範囲でかび毒混合標準溶液を測定し、絶対検量線法および内部標準法で検量線を作成した。

結果、どちらも全ての化合物で相関係数 0.997 以上の良好な検量線となり、それぞれの真度もほぼ 90・110%以内に収まったので、両法とも使用可能と判断した。どちらの定量法を用いるかは、今後、実試料の測定を行ったうえで判断したい。

4. まとめ

LC-MS/MS を用いたフザリウムトキシシン一斉分析法の検討を行った。検討対象は、MS 条件、分析カラム、移動相、グラジエント条件とした。位置異性体である 3-AcDON と 15-AcDON については、ODS カラムでは分離できなかったが、ADME カラムまたは PFP カラムを用いることで分離することができた。また、15-AcDON のプリカーサーイオンをアンモニア付加体に変更することで、選択的に検出することがわかった。

表 3 各化合物の定量限界

	DON	NIV	3-AcDON	15-AcDON	FUX	HT-2	T-2	DAS	VEL	ZEN	ZAN
検出限界 (3σ) 推定	2.49	2.47	0.74	0.91	0.42	0.41	0.29	0.20	3.01	0.78	0.45
定量限界 (10σ) 推定	8.29	8.25	2.47	3.04	1.39	1.36	0.96	0.66	10.1	2.59	1.51
定量限界 決定	10	10	10	10	10	1	1	1	10	10	10

単位は ng/mL

確立した分析法の性能評価を行った。DON、NIV、3-AcDON、15-AcDON、FUX、VEL、ZEN、ZAN の定量限界は 10ng/mL であり、10-200ng/mL の範囲で定量可能であった。HT-2、T-2、DAS の定量限界は 1ng/mL であり、1-20ng/mL の範囲で定量可能であった。

今後は、前処理法の検討を行い、試験法の妥当性を確認したうえで、県内産穀類等の汚染実態調査を実施する予定である。

参考文献

- 1) 小西良子 他：食品衛生検査指針理化学編 2015 第 6 章 5.マイコトキシン, 562-647, 公益社団法人日本食品衛生協会,東京(2015)
- 2) 永山敏廣 他：衛生試験法・注解 2015 2.2 天然有毒物質試験法, 287-305, 金原出版株式会社, 東京(2015)
- 3) 芳澤宅實：厚生労働科学研究費補助金厚生労働特別研究事業 平成 13 年度研究報告書(主任研究者 熊谷進)「食品中のかび毒のリスクアセスメントに関する研究」, 98-113(2001)
- 4) 熊谷進：厚生労働科学研究費補助金厚生労働特別研究事業 平成 14 年度研究報告書(主任研究者 熊谷進)「小麦等のデオキシニバレノールに係る規格基準設定のための緊急調査研究」, 6-9(2002)
- 5) 平成 14 年 5 月 21 日付け食発第 0521001 号 厚生労働省医薬局食品保健部長通知「小麦のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設定について」(平成 15 年 7 月 17 日一部改正)
- 6) 平成 20 年 12 月 17 日付け 20 消安第 8915 号 20 生産第 5731 号 農林水産省消費・安全局長 生産局長連名通知「麦類のデオキシニバレノール・ニバレノール汚染低減のための指針の策定・普及について」
- 7) http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/result.html (2017.6.25 閲覧)
- 8) 中川博之：高速液体クロマトグラフィー質量分析法によるフザリウムトキシン分析に関する最新の知見,JSM Mycotoxins, 64(1), 55-62(2014)
- 9) 社団法人日本分析化学会液体クロマトグラフィー研究懇談会:液クロ文の巻 誰にも聞けなかった HPLC Q&A, 84-85, 株式会社筑波出版会, 東京(2006)
- 10) <http://www.nihs.go.jp/dmb/4th/sample3.html>(2017.6.25 閲覧)
- 11) 田村昌義 他：ペンタフルオロフェニルカラムを用いたトリコセセン系カビ毒の LC-MS/MS 高感度一斉分析法,食品衛生学雑誌, 55(1), 19-24(2014)
- 12) 木村圭介 他：LC-MS/MS によるフザリウムトキシンの一斉分析法,東京都健康安全研究センター年報, 65, 95-101(2014)

PM_{2.5} 成分分析試料捕集における揮発・吸着の影響について

岡 恭子・藤田大介・吉川昌範

Influence of Volatilization and Adhesion in PM_{2.5} Sampled on the Filter for Ingredient Analysis

Kyoko OKA, Daisuke FUJITA, Masanori YOSHIKAWA

1. はじめに

PM_{2.5} の成分分析は、環境省「大気中微小粒子状物質 (PM_{2.5}) 成分測定マニュアル」¹⁾ に準拠して実施しており、PM_{2.5} ローボリウムエアサンプラーを用いて 24 時間吸引し、フィルター上に捕集している。当センターでは、設定した時間にフィルターを自動で交換するサンプラーを使用しているが、フィルターに捕集された PM_{2.5} は、揮発や吸着の懸念があるため、できるだけ早く回収・分析することが望ましいとされている。しかし、遠方の採集地点に回収のため頻繁に通うことは多大な時間を要する。そこで、採取後のフィルターをサンプラー内で保管する期間等によって分析結果に影響が生じないかの確認を行った。

2. 方法

1 地点に 2 台あるサンプラーにおいて同時採取（以下「二重測定」という。）を行い、フィルターの回収日を変えた場合に分析結果に差が生じないかの確認した。

2. 1 試料採取

試料採取には大気用シーケンシャルサンプラー (Thermo Scientific 社製 2025i) を用い、イオン成分および炭素成分分析用フィルターとして石英繊維フィルター (Pall 社製 2500QAT-UP)、質量濃度測定用フィルターとして PTFE フィルター (Pall 社製 Teflo) を使用した。

サンプラー内部の写真および概略図を図 1 に示す。フィルターはカセットと呼ばれるプラスチック製のリングにはさみ供給部の筒状のケースに入れておく。設定時間になると、採取部にあったカセットが保管部へ移動し、空いた採取部へは供給部からカセットがひとつ移動する。

2. 1. 1 調査日および調査地点

調査は、気温が高く揮発量が多いと思われる夏季に実施した。また、今までの調査で、冬季に高濃度になる成分があったため、冬季にも実施した。

採取日およびフィルター回収日を表 1、2 に示す。調査期間を 1 週間とし、サンプラー 2 台のうち、サンプラー A では、4 日目の採取終了後と 7 日目の採取終了後にフィルターの回収を行い、サンプラー B では、7 日目の採取終了後のみフィルターの回収を行った。

サンプリングは、PTFE フィルターを大気汚染常時監視福井観測局 (福井市豊島 2-5-26) で、石英フィルターを自排福井局 (福井市下六条町 17-2) で実施した。

サンプリング時間は朝 10:00～翌朝 10:00 とした。

2. 2 分析法

環境省「大気中微小粒子状物質 (PM_{2.5}) 成分測定マニュアル」¹⁾ に準拠して分析した。

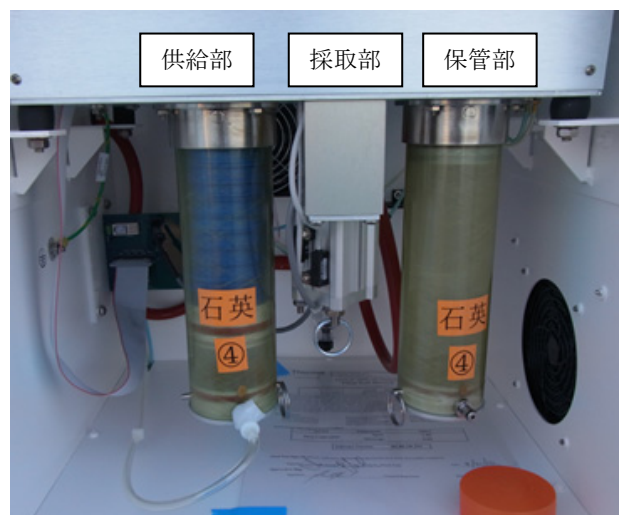


図 1 サンプラーの内部写真と概略図

なお、無機元素成分については、揮発しにくいと考えられ、また今までの調査において二重測定に差がみられる場合があるため、差が生じたとしても原因が保管期間の差かわからないことから、調査対象外とした。

2. 2. 1 質量濃度

試料採取前および採取後の PTFE フィルターを室温 $21.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $35 \pm 5\%$ の恒温恒湿室に 24 時間以上放置した後、精密天秤を使用して $1 \mu\text{g}$ の単位まで秤量した。

2. 2. 2 イオン成分

石英繊維フィルターの 2 分の 1 を分析に使用し、超純水 20mL で 15 分間超音波抽出した後、イオンクロマトグラフで測定した。

〈分析項目〉アニオン: SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 Cl^-

カチオン: NH_4^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}

表1 フィルター回収日（夏季調査）

採取日 (福井局、 自排福井局)	2016/7/7		2016/7/8		2016/7/9		2016/7/10		2016/7/11		2016/7/12		2016/7/13	
フィルター No.	A-①	B-①	A-②	B-②	A-③	B-③	A-④	B-④	A-⑤	B-⑤	A-⑥	B-⑥	A-⑦	B-⑦
回収日	7/11	7/14	7/11	7/14	7/11	7/14	7/11	7/14	7/14	7/14	7/14	7/14	7/14	7/14
保管日数	3	6	2	5	1	4	0	3	2	2	1	1	0	0

表2 フィルター回収日（冬季調査）

採取日 (福井局)	2016/12/9		2016/12/10		2016/12/11		2016/12/12		2016/12/13		2016/12/14		2016/12/15	
フィルター No.	A-①	B-①	A-②	B-②	A-③	B-③	A-④	B-④	A-⑤	B-⑤	A-⑥	B-⑥	A-⑦	B-⑦
回収日	12/13	12/16	12/13	12/16	12/13	12/16	12/13	12/16	12/16	12/16	12/16	12/16	12/16	12/16
保管日数	3	6	2	5	1	4	0	3	2	2	1	1	0	0
採取日 (自排福井局)	2016/12/12		2016/12/13		2016/12/14		2016/12/15		2016/12/16		2016/12/17		2016/12/18	
フィルター No.	A-①	B-①	A-②	B-②	A-③	B-③	A-④	B-④	A-⑤	B-⑤	A-⑥	B-⑥	A-⑦	B-⑦
回収日	12/16	12/19	12/16	12/19	12/16	12/19	12/16	12/19	12/19	12/19	12/19	12/19	12/19	12/19
保管日数	3	6	2	5	1	4	0	3	2	2	1	1	0	0

※フィルターNo.は、[サンプラー]—[調査開始日からの日数]とした。（調査開始日を①とした。）

2. 2. 3 炭素成分

石英繊維フィルターをφ8mmのポンチでくり抜き、炭素分析装置(柴田科学社製 DRI)を使用し、サーマルオプティカル・リフレクタンス法(IMPROVE 条件)で分析した。
〈分析項目〉OC(有機炭素)、EC(元素炭素)

3. 結果および考察

3. 1 分析結果

保管期間の差による試料への影響の有無を判断するための指標として、二重測定濃度差を下記の式から求めた。

$$\text{濃度差(\%)} = \frac{(\text{【試料2】} - \text{【試料1】}) \times 100}{(\text{【試料2】} + \text{【試料1】}) \div 2}$$

【試料1】 サンプラーAで採取した試料濃度

【試料2】 サンプラーBで採取した試料濃度

二重測定試料において、調査開始から4日目の試料(①～④)は、採取後の保管日数が異なり、5～7日目の試料(⑤～⑦)は、保管日数は同じであるが、同時保管する試料数が異なる。

揮発の影響がある場合、採取後の保管日数が長いほど濃度差がマイナス側に大きくなり、吸着による影響がある場合、保管日数が長いほど濃度差がプラス側に大きくなると考えられる。また、一度に保管する試料量が多いほど、他試料からの影響は強くなる。

揮発も吸着も同時に起こっている可能性があり、分けて考えることはできないが、保管日数の差としてサンプル①～④を、保管中の試料数の差としてサンプル⑤～⑦を比較することとした。

また、環境省「大気中微小粒子状物質(PM_{2.5})成分測定マ

ニュアル」¹⁾では、試料捕集および分析における総合的な信頼性を確保するために、同一条件で採取した2つ以上の試料について同様に分析し、定量下限値以上の濃度の測定対象物質について、両者の差が30%以下であることとしている。そこで、二重測定濃度差が30%以下の場合であれば、濃度差はないものとした。

分析結果および二重測定濃度差を、表3、4に示す。定量下限値未満の場合は、定量下限値に不等号をつけて記した。なお、夏季のNO₃⁻、Cl⁻、K⁺、冬季のK⁺、Ca²⁺、OCの濃度は、定量下限値未満が多かった。

二重測定濃度差が、30%以上になった試料・項目はなかった。夏季は気温が高いため、揮発による影響が想定されたが、保管期間が長いほど二重測定濃度差がマイナス側に大きくなる傾向の成分はなかった。また同時保管数が多いほど濃度差が大きくなる傾向も見られなかった。

以上のことから、サンプラー内保管期間および保管試料数と、二重測定濃度差との間に関係性は見られなかった。

4. まとめ

今回の調査では、夏季、冬季とも保管期間および保管試料数の差による質量濃度、イオン成分、炭素成分の揮発・吸着の影響はみられなかった。

参考文献

- 1) 環境省：大気中微小粒子状物質(PM_{2.5})成分測定マニュアル(平成24年4月)

表3 夏季調査結果

フィルター No.	保管 日数	質量 濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	SO_4^{2-} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	NO_3^- ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	Cl^- ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	NH_4^+ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	Na^+ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	K^+ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	Ca^{2+} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	Mg^{2+} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	OC ($\mu\text{g}/\text{C}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	EC ($\mu\text{g}/\text{C}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)
A-①	3	8.3	-1%	2.9	7%	<0.063	-	<0.13	-	1	10%	0.062	15%	<0.012	-	<0.013	-	0.019	0%	2.3	-14%	1	-13%
B-①	6	8.2		3.1		<0.063		<0.13		1.1		0.072		<0.012		<0.013		0.019		2		0.88	
A-②	2	10.7	-2%	2.7	0%	0.065	-	<0.13	-	1	0%	0.03	24%	<0.012	-	0.068	-27%	0.017	11%	3.5	-19%	1.8	-12%
B-②	5	10.5		2.7		<0.063		<0.13		1		0.038		<0.012		0.052		0.019		2.9		1.6	
A-③	1	4.5	-9%	0.73	-1%	<0.063	-	<0.13	-	0.25	4%	<0.019	-	<0.012	-	0.023	-14%	0.017	-6%	1.8	5%	0.83	7%
B-③	4	4.1		0.72		<0.063		<0.13		0.26		<0.019		<0.012		0.02		0.016		1.9		0.89	
A-④	0	7.1	-3%	1.6	0%	<0.063	-	<0.13	-	0.59	0%	0.022	4%	<0.012	-	0.094	-24%	0.018	-6%	2.5	-8%	0.77	-11%
B-④	3	6.9		1.6		<0.063		<0.13		0.59		0.023		<0.012		0.074		0.017		2.3		0.69	
A-⑤	2	14.4	1%	4.5	0%	<0.063	-	<0.13	-	1.7	0%	0.031	0%	0.035	-15%	0.013	0%	0.018	0%	3.4	8%	1.5	13%
B-⑤	2	14.5		4.5		<0.063		<0.13		1.7		0.031		0.03		0.013		0.018		3.7		1.7	
A-⑥	1	10	1%	2.3	-4%	<0.063	-	<0.13	-	0.86	-4%	0.025	4%	<0.012	-	0.1	-13%	0.018	-6%	3.7	-8%	1.4	-15%
B-⑥	1	10.1		2.2		<0.063		<0.13		0.83		0.026		<0.012		0.088		0.017		3.4		1.2	
A-⑦	0	6.4	3%	2.1	-5%	<0.063	-	<0.13	-	0.74	-1%	0.031	-12%	<0.012	-	<0.013	-	0.017	16%	1.8	5%	0.89	-11%
B-⑦	0	6.6		2		<0.063		<0.13		0.73		0.034		<0.012		<0.013		0.02		1.9		0.8	

表4 冬季調査結果

フィルター No.	保管 日数	質量 濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	SO_4^{2-} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	NO_3^- ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	Cl^- ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	NH_4^+ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	Na^+ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	K^+ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	Ca^{2+} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	Mg^{2+} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	OC ($\mu\text{g}/\text{C}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)	EC ($\mu\text{g}/\text{C}/\text{m}^3$)	濃度差 (%)
A-①	3	9.8	10%	1.7	0%	0.67	-3%	1.3	-8%	1.5	-7%	0.067	4%	<0.012	-	<0.15	-	0.016	0%	0.21	-5%	0.19	-5%
B-①	6	10.8		1.7		0.65		1.2		1.4		0.07		<0.012		<0.15		0.016		0.2		0.18	
A-②	2	7.5	4%	1.1	0%	0.62	-5%	0.28	-11%	0.74	-11%	0.059	8%	<0.012	-	<0.15	-	0.016	-6%	<0.17	-	0.11	0%
B-②	5	7.8		1.1		0.59		0.25		0.66		0.064		<0.012		<0.15		0.015		<0.17		0.11	
A-③	1	4.2	2%	1.8	5%	0.16	6%	0.099	11%	0.73	-1%	0.11	0%	<0.012	-	<0.15	-	0.021	-5%	<0.17	-	0.075	-10%
B-③	4	4.3		1.9		0.17		0.11		0.72		0.11		<0.012		<0.15		0.02		<0.17		0.068	
A-④	0	7.7	6%	1.1	0%	0.34	-13%	0.27	-16%	0.63	-3%	0.055	-27%	<0.012	-	<0.15	-	0.015	0%	<0.17	-	0.085	-4%
B-④	3	8.2		1.1		0.3		0.23		0.61		0.042		0.022		<0.15		0.015		<0.17		0.082	
A-⑤	2	5.7	-7%	0.88	6%	0.52	11%	0.34	8%	0.64	6%	0.051	18%	<0.012	-	<0.15	-	0.014	7%	<0.17	-	0.061	6%
B-⑤	2	5.3		0.93		0.58		0.37		0.68		0.061		<0.012		<0.15		0.015		<0.17		0.065	
A-⑥	1	5.7	-5%	1.7	-6%	1.1	-18%	0.33	-16%	1.1	-10%	0.036	-12%	<0.012	-	<0.15	-	0.018	-25%	<0.17	-	0.067	14%
B-⑥	1	5.4		1.6		0.92		0.28		1		0.032		<0.012		<0.15		0.014		<0.17		0.077	
A-⑦	0	4	7%	4.3	5%	0.6	0%	0.36	5%	2	5%	0.043	-12%	0.013	-8%	<0.15	-	0.02	-22%	0.22	-5%	0.12	0%
B-⑦	0	4.3		4.5		0.6		0.38		2.1		0.038		0.012		<0.15		0.016		0.21		0.12	

水質事故対応時の多項目迅速分析法についての検討

田中宏和・荻野賢治・山崎慶子

Examination of Simple and Simultaneous Methods of the Quick Analysis for a Water Quality Accident

Hirokazu TANAKA, Kenji Ogino, Keiko Yamazaki

1. はじめに

県内では年間数件の魚類へい死事故が発生しているが、多くの事例で原因の特定には至っていない。また、このような水質事故の対応は緊急性が求められるため他の業務に優先して行っているが、一連の分析を終えるまでに多くの時間と労力を費やしている。

本稿では、著者らが考案した農薬および金属類についての簡易的な多項目一斉分析法について、実際の水質事故での適用可能性を評価・検討した。本研究の成果は、緊急分析の迅速化および省力化に寄与し、その結果、水質事故時の原因特定の一助になることが期待される。

2. 調査方法

2. 1 農薬分析

前処理に時間を要する固相抽出を省略し、シリンジと 0.45 μm PTFE 製メンブレンフィルターカートリッジを用いてろ過した検体を用い、農薬 154 種について LC/MS/MS による一斉分析の適用可能性を添加回収試験から判定した。対象農薬中、63 種が通常は GC/MS を用いて分析する農薬であり、91 種が LC/MS で分析する農薬である。添加濃度は 0.1 mg L^{-1} とした。添加回収試験は超純水と平成 28 年 1 月に E 市で発生した魚類へい死事故現場の河川水 1 検体について行った。

2. 2 金属類分析

前処理に時間を要する加熱分解処理を省略し、試料に硝酸添加後、シリンジと 0.45 μm セルロースアセテート製メンブレンフィルターカートリッジを用いてろ過した検体を用い、金属類 66 種について ICP-MS による一斉分析法の適用可能性を添加回収試験から判定した。添加濃度は 9.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ とした。添加回収試験は超純水と平成 28 年 11 月に E 市で発生した魚類へい死事故現場の農業用水路水 1 検体について行った。

3. 結果

3. 1 農薬分析

添加回収試験結果を図 1 に示す。超純水を用いた添加回収試験では、農薬 154 項目中、144 項目の回収率が 70～120% の範囲内であった。それ以外については 8 項目が 30～70% の範囲内であり、2 項目が 30% 未満となった。

へい死事故時の実試料（河川水）を用いた試験では、140 項目の回収率が 70～120% の範囲内であった。それ以外については、1 項目が 120% を超過し、11 項目が 30～70% の範囲内となり、2 項目が 30% 未満であった。回収率が 120% を超過したのはフェントラザミドであり、回収率は 127% であった。30% 未満の低回収率となった農薬は、共にトリフルラリンとフルアジナムであった。

3. 2 金属類分析

添加回収試験結果を図 2 に示す。超純水を用いた添加回収試験では、金属類 66 項目中、55 項目の回収率が 70～120% の範囲内となった。ナトリウム、マグネシウム、カリウム、カルシウム、チタン、銅、亜鉛、パラジウム、銀、タンタルおよび金の 11 項目が 120% 以上の回収率となり、70% 未満の項目はなかった。

へい死事故時の実試料（水路水）を用いた試験では、52 項目の回収率が 70～120% の範囲内であった。それ以外については、リチウム、亜鉛、パラジウム、銀、タンタルおよび金の 6 項目が 120% を超過した。アルミニウムとスト

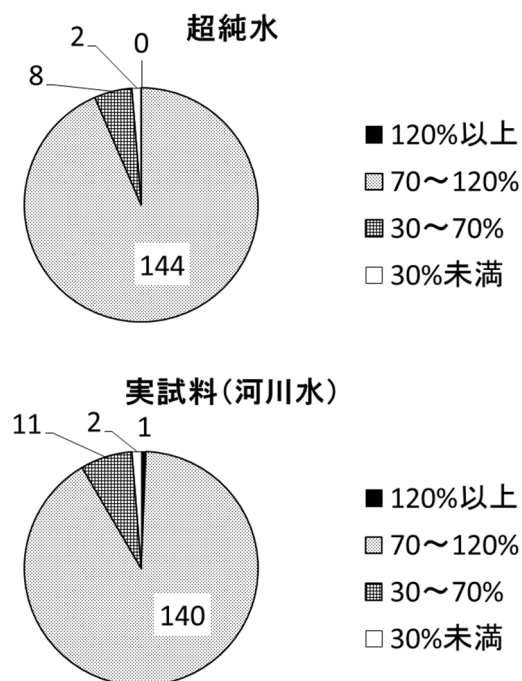


図 1 農薬の添加回収試験結果

ロンチウムの2項目は30～70%の範囲内にあり、30%未満の低回収率となったのはナトリウム、マグネシウム、ケイ素、カリウム、カルシウムおよびチタンの6項目であった。

4. 考察

4. 1 農業分析

一般的な手法を用いた農業分析では、前処理に約5時間を要するが、本研究で採用した手法では1検体当たり5分間程度で処理できる。

本研究で評価した迅速分析法では、農業154項目の一斉分析が可能であり、通常はGC/MSを用いて分析する項目の多くについても分析可能であった。トリフルラリンとフルアジナムは回収率が低く、分析値の信頼性は低いが、水質事故の原因物質は高濃度であるため、実際の事故時において、この2項目が原因であった場合にも検知は可能であると考える。

トリフルラリンとフルアジナムの回収率が低値を示した原因としては、ろ過操作の過程でメンブレンフィルターに吸着することにより、検体中の濃度が低下した可能性が高い。近年実施された「産業廃棄物に含まれる金属等の検定方法（昭和48年 環境省告示第13号）」に関する見直し調査の結果、PTFE製のメンブレンフィルターは疎水性の有機物が吸着しやすい特徴を有することが報告されている¹⁾。そのため、他の農業の回収率の低下についても、メンブレンフィルターへの吸着が要因の一つと考えられた。

4. 2 金属類分析

水質汚濁防止法に定められる方法、いわゆる「公定法」を用いた金属類の分析では、前処理に約4時間を要するが、本研究で採用した手法は1検体当たり2分間程度で処理できる。

本研究で分析した手法では、66項目の一斉分析が可能であったが、定量値の信頼性があるのは52項目であった。しかし、回収率が低い項目についても、水質事故の原因物質は高濃度であるため、検知は可能であると考える。また、超純水で高回収率となり、実試料で30%未満の低回収率となった項目はチタンを除き、ナトリウムやカルシウムなどの環境水中に高濃度で存在する物質である。つまり、実試料中の含有濃度に対して添加濃度が低かったことが低い回収率を示した原因と考えられる。すなわち、これらの物質が原因で水質事故が発生する場合は、添加回収試験濃度よりも著しく高濃度であるため、本迅速分析法では定量できないが、検知は可能である。さらに、このような場合はpHが高値を示すことが多く、原因となるこれらのイオン類が高濃度で含有することが事前に予測できるため、定量分析には希釈法を用いるのが普通である。

パラジウムと金は添加濃度の10倍以上の濃度を示したが、共に貴金属であり、水質事故の原因物質にはなりにくい。これらの金属を使用する事業所排水が原因であるような特殊な場合においても、実濃度よりも高濃度側(安全側)に検出されるため、原因事業所を特定することは可能であろう。

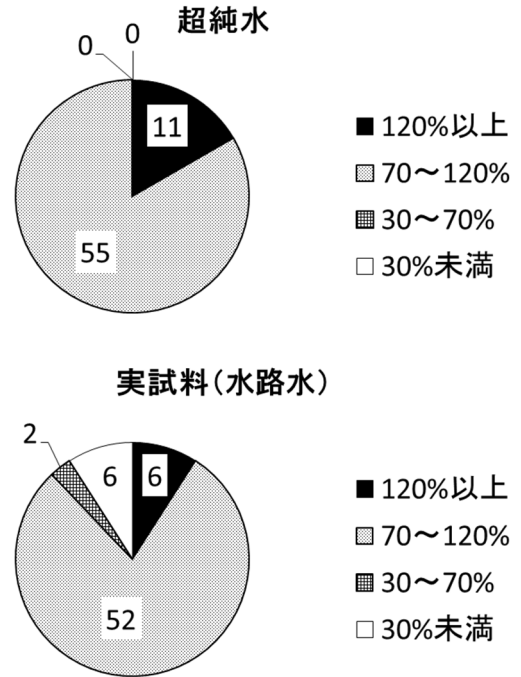


図2 金属類の添加回収試験結果

5. まとめ

水質事故等の緊急対応には原因物質の特定が最優先課題である。そのため、短時間で多項目を分析することが重要となる。また、魚類がへい死するような現場の環境水中には、原因物質が高濃度に含まれるのが一般的である。水流などにより原因物質の濃度が低下した後の試料においては、公定法を用いても原因や発生源を特定することは難しい。

上述したような魚類へい死などの水質事故時の現場状態と求められる水質情報を考えると、本研究で開発した農業類と金属類の迅速分析法は、短時間で多項目の分析結果が得られるため有効である。今後は当センターの水質事故の緊急対応において、本研究の成果を活用する予定である。また、さらなる迅速化や多項目化にむけて、今後も分析方法の改良を重ねていく必要がある。

参考文献

- 1) 藤森英治：改正環告13号試験における金属類分析の留意点, 廃棄物資源循環学会誌, 25(5), 28-35(2014)

夏季三方湖における植物プランクトン優占種

森山 充

Phytoplankton Dominant Species of the Lake Mikata in Summer

Mitsuru MORIYAMA

1. はじめに

三方湖は富栄養化湖と区分されており¹⁾、1990年代には植物プランクトン（藍藻類）の異常増殖であるアオコの発生が問題視されてきたが²⁾、2001年以降はアオコの発生は確認されていない。

三方湖は植物プランクトン細胞総数の経年変化から見て浄化に向かっているとの報告もあるが³⁾、近年はヒシ *Trapa japonica* の発生などの問題も顕在化してきている。

福井県では、水質の監視を2ヶ月に1度行っており、その一環として1980年代から植物プランクトン細胞数の調査を夏季に実施してきた。

今回は得られた細胞数から優占種を決定し、優占種の交替から三方湖水質の経年変化を考察したので、報告する。

2. 方法

2. 1 調査水域の概要

調査した三方湖は三方五湖の1つである。三方五湖は汽水湖である三方湖、水月湖（一部を菅湖と呼ぶ）および久々子湖と、海水湖である日向湖からなる。三方湖と水月湖および水月湖と久々子湖はおのおの水路で結ばれ、最も下流である久々子湖は水路で日本海と結ばれており、最も上流部にある三方湖まで海水が遡上する。一方、水月湖と日向湖も水路で結ばれているが、水門が閉じており、湖水の交流はない状況にある⁴⁾。

2. 2 試料の採取

1988～2015年の28年間、毎年8月に行った。採水は三方湖に設けた定点（N35°33'50" E135°53'35"）の表層から行った。

2. 3 植物プランクトンの計数

採水した試料を1,000mL取り、5mLのグルタルアルデヒド固定液を加え、上水試験方法に準じて計数した⁵⁾。出現細胞数の最も多かった種を第一優占種とした。

2. 4 pHの測定

採水した試料のpHをJIS規格⁶⁾に準じて測定した。

3. 結果および考察

3. 1 植物プランクトンの計数

植物プランクトンの計数結果から決定した各年の第一優占種を表1に示した。2014年まではおおむね藍藻類が第一優占種であったが、2015年には図1に示すような鞭

毛藻類である *Dinobryon* sp.が第一優占種となった。

3. 2 pHの測定

pHの経年変化を図2に示した。pHは1993年以降8.0以上だったが、2008年以降は8.0未満になる年も見られた。そして2015年には7.4となった。

以上の結果と中性を好む *Dinobryon* sp の特性⁷⁾から、pHの低下により *Dinobryon* sp.が増殖し、第一優占種になったと考えられた。

一般に富栄養化の進んだ湖沼においては、春から夏にかけて植物プランクトンによる光合成の活発化によりpHが高くなるとされているが⁸⁾、今回のpH低下要因としては、近年の水質浄化結果としての植物プランクトン減少と、夏季におけるヒシの繁茂に伴う日照障害による光合成の抑制が考えられた⁹⁾。

また、*Dinobryon* sp.は山間部のダムなど貧栄養湖にも良く増殖することから¹⁰⁾、三方湖の水質は植物プランクトン優占種の交替からも改善に向かっていることが示唆された。

4. まとめ

2015年に鞭毛藻類の *Dinobryon* sp.が第一優占種となった。*Dinobryon* sp.の特性から三方湖の水質は改善に向かっていると考えられた。

参考文献

- 1) 田中正明：日本湖沼誌Ⅱ，名古屋大学出版会，378-381(2004)
- 2) 青木啓子 他：福井県三方湖で発生したアオコ（1991年の事例），福井県環境センター年報，21，78-84(1991)
- 3) 森山充：経年変化から見た夏季三方五湖の水質評価，水産技術，7(2)，105-111(2015)
- 4) 日本水環境学会：日本の水環境4 東海・北陸編，技報出版堂，36-40(1999)
- 5) 日本水道協会：上水試験方法 2011年版・生物編，日本水道協会，東京，120-131(2011)
- 6) 日本規格協会：JISハンドブック環境測定Ⅱ水質，日本規格協会，東京(2014)
- 7) 小島貞男，須藤隆一，千原光雄：環境微生物図鑑，講談社，190-191(1995)
- 8) 竹内俊郎：水産海洋ハンドブック，生物研究社，26-47(2004)
- 9) 小澤秀明 他：長野県の湖沼環境，水環境学会誌，38(7)，244-248(2015)
- 10) 森下雅子：川と湖の博物館，山海堂，100-102(1991)

表1 三方湖定点における8月の植物プランクトン第一優占種(1988～2015年)

年	類	種
1988	珪藻	<i>Cyclotella meneghiniana</i>
1989	珪藻	<i>Cyclotella meneghiniana</i>
1990	藍藻	<i>Lyngbya limnetica</i>
1991	藍藻	<i>Microcystis wesenbergii</i>
1992	緑藻	<i>Scenedesmus</i> spp.
1993	藍藻	<i>Anabaena</i> spp.
1994	緑藻	<i>Crucigeniella crucifera</i>
1995	緑藻	<i>Coelastrum microporum</i>
1996	珪藻	<i>Cyclotella</i> spp.
1997	藍藻	<i>Microcystis aeruginosa</i>
1998	藍藻	<i>Microcystis aeruginosa</i>
1999	藍藻	<i>Merismopedia tenuissima</i>
2000	藍藻	<i>Planktothrix</i> spp.
2001	藍藻	<i>Phormidium</i> sp.
2002	藍藻	<i>Lyngbya</i> sp.
2003	藍藻	<i>Planktothrix</i> sp.
2004	藍藻	<i>Planktothrix</i> sp.
2005	藍藻	<i>Planktothrix agardhii</i>
2006	藍藻	<i>Anabaena aphanizomenoides</i>
2007	藍藻	<i>Planktothrix agardhii</i>
2008	緑藻	<i>Staurastrum</i> spp.
2009	珪藻	<i>Melosira</i> sp.
2010	藍藻	<i>Anabaena</i> spp.
2011	緑藻	<i>Endorina elegans</i>
2012	藍藻	<i>Oscillatoria</i> sp.
2013	藍藻	<i>Oscillatoria</i> sp.
2014	藍藻	<i>Oscillatoria</i> sp.
2015	鞭毛藻	<i>Dinobryon</i> sp.

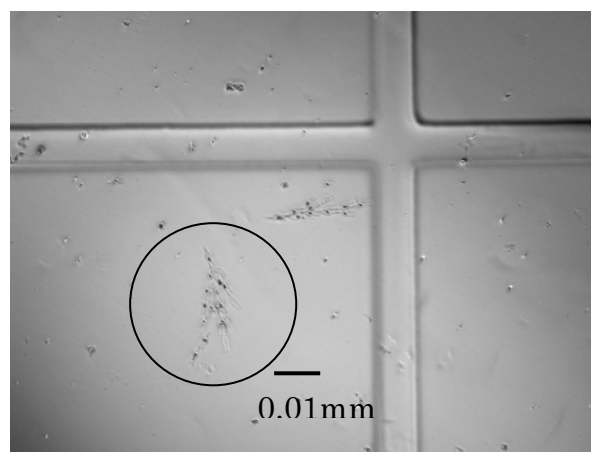
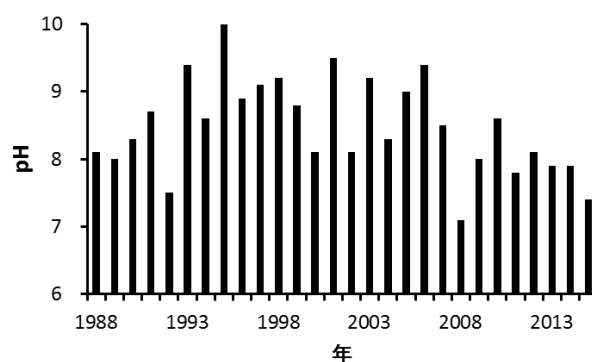
図1 観察された *Dinobryon* sp. (2015年8月採集)

図2 三方湖定点におけるpHの経年変化(8月)

湖沼中の難分解性有機物に関する挙動解析（第2報）

松井 亮・荻野賢治・中村大充・山崎慶子・田中宏和・熊谷宏之*¹

Behavior of Refractory Dissolved Organic Matter in Mikata Lake(2)

Ryo MATSUI, Kenji OGINO, Masamitsu NAKAMURA, Keiko YAMAZAKI, Hirokazu TANAKA, Hiroyuki KUMAGAI*¹

1. はじめに

福井県内の湖沼のうち、三方五湖や北潟湖の一部の水域では、有機物等汚濁の代表的な指標である化学的酸素要求量（COD）の環境基準（B 類型）が達成できていない。

他県においても、琵琶湖の生物化学的酸素要求量（BOD）は、低減傾向であるにもかかわらず、琵琶湖の COD が 1984 年を境に徐々に増加しており、これは、微生物によって分解されにくい難分解性有機物が蓄積しているためと推察されている¹⁾。また、石川県の河北潟においても難分解性有機物の動態に関する調査研究が行われ、新たな知見が示されている²⁾。

そこで、当県の三方五湖においても、環境基準を達成できない原因の一つと考えられる難分解性有機物に着目した生分解実験を行い、その結果の一部を報告した³⁾。本報では、さらに生分解実験を進めたデータを追加し、有機物の生物分解性を長期的な視点から評価したので報告する。

2. 実験方法

2. 1 試料

三方湖東部地点の表層湖水を試料とし、採水頻度は平成 26 年度が 1 回、平成 27 年度が 3 回、平成 28 年度が 6 回とした。

2. 2 長期生分解実験の方法

分析項目は生物化学的酸素要求量（BOD）、化学的酸素要求量（COD_{Mn}）および溶存態有機体炭素（DOC）とした。DOC は直径 28 mm、Glass Fiber 製プレフィルターでろ過した。各項目の測定方法は既報³⁾のとおりである。

長期的な生分解の挙動を把握するため、分析は採水当日と、数か月間隔で複数回実施した。試料は室温 25℃の室内において密封や遮光はせず、静置状態で保管した。

3. 結果および考察

3. 1 BOD 長期変化挙動

採水からの経過時間を横軸に、BOD の経日変化を図 1 に示した。

BOD は生物易分解性有機物の濃度を示す。平成 28（2016）年 2 月 2 日採水の試料以外については、採水後短時間で著しく低下し、約 100 日以降の結果はほとんどが 0.5 mgO/L 未満となった。この結果から、湖水中の大部分の生物易分解性有機物の分解は 100 日以内で終了すると考えられる。

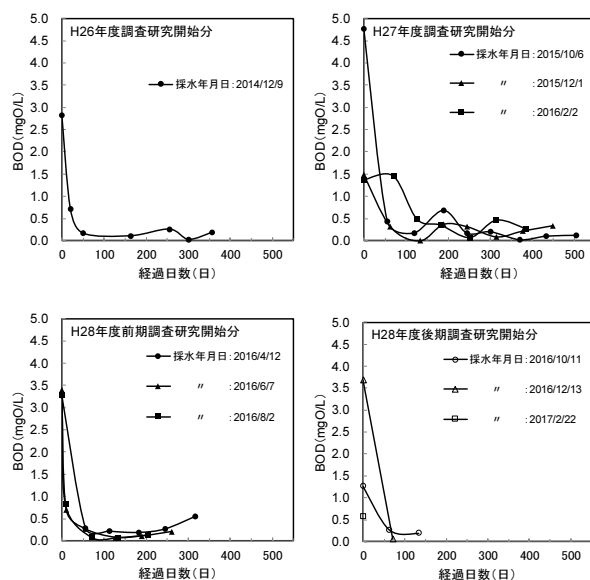


図1 三方湖湖沼水における採水後の生分解経過日数と BOD との関係

3. 2 COD_{Mn} 長期変化挙動

採水からの経過時間を横軸に、COD_{Mn} の経日変化を図 2 に示した。

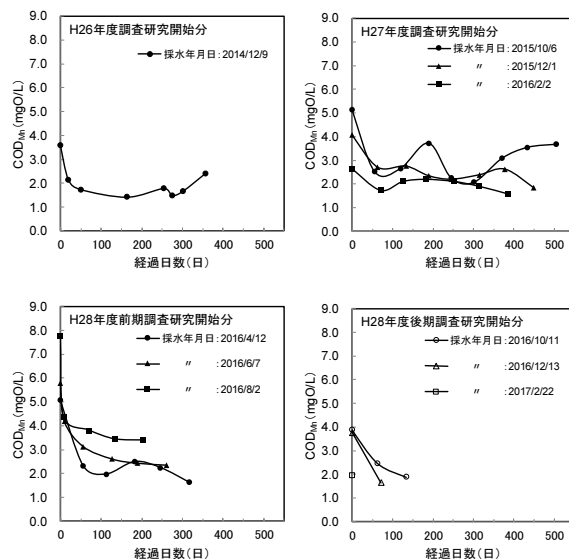


図2 三方湖湖沼水における採水後の生分解経過日数と COD との関係

試料によって差異があるが、全体的には BOD と同様に採水後短時間で濃度低下し、約 100 日以降では大きな変化

*¹ 福井県日野川地区水道管理事務所

がみられない傾向にあった。また、COD_{Mn}については100日間経過後も全ての試料で0.5 mgO/L以上の値を示したことから、100日間生分解経過後の湖沼水試料中には、生物学的反応では分解されにくく、過マンガン酸カリウムの化学的な酸化力で分解される有機物が残存していることが確認された。

3.3 BOD/COD_{Mn}長期変化挙動

採水からの経過時間を横軸に、BOD/COD_{Mn}の経日変化を図3に示した。

試料によって差異があるが、全体的には採水時はほぼ0.5以上の値を示した。その後は短時間で低下し、約100日以降は0.0～0.3の範囲内に収束した。また、BOD/COD_{Mn}は100日間以上の長期間を経過した後も変動した。特に、平成26年度と平成28年度前期の試料では、100～250日の経過日数でBOD/COD_{Mn}が微増する傾向がみられる。この原因は明確でないが、窒素由来のBODの増加が原因か、または生物難分解性有機物の一部がこの期間にゆっくりと易分解性に転化している可能性が考えられる。

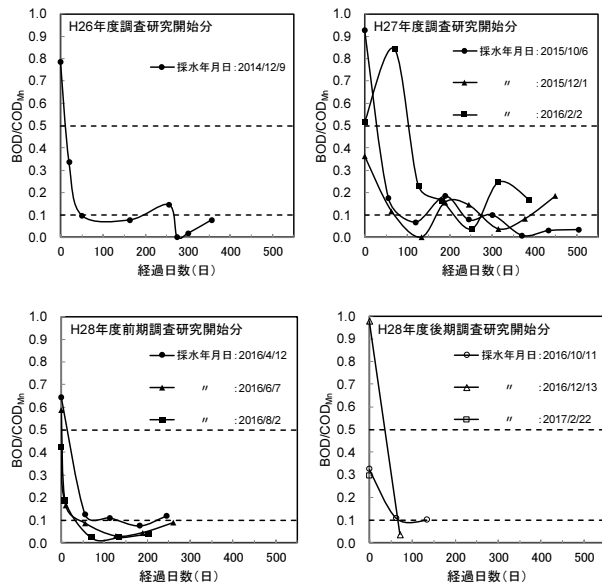


図3 三方湖湖沼水における採水後の生分解経過日数とBOD/COD_{Mn}との関係

3.4 DOC長期変化挙動

採水からの経過時間を横軸に、DOCの経日変化を図4に示した。

平成26年度と平成27年度の試料はBODやCOD_{Mn}に比べて大きな濃度変化はみられなかった。一方、平成28年度の試料はBODと同様に、時間経過に伴い濃度が低下したが、その速度はBODに比べて緩やかであった。また、約100日以降の濃度変化は小さく、ほぼ横ばいであった。ただし、試料間では濃度に差異がみられた。

100日間経過以降のDOC濃度変化が小さい理由は不明であるが、DOCは経過後の検体を分析しているため、溶存性の生物難分解性有機物が長期間存在することを示している。この生物難分解性溶存有機物が試料採取当初から含有していた物質か、試料採取後100日間に懸濁態またはコロイド状の有機物が細分化および低分子化されて生成したものは不明である。ただし、100日間経過以降の

DOC濃度が、平成27年度は2月に比べて10月と12月の採取試料が高く、平成28年度は8月、6月、4月の順に低くなっている。このことから、水温が高い時期に湖水中で多量に含まれる植物等が原因物質である可能性が考えられる。

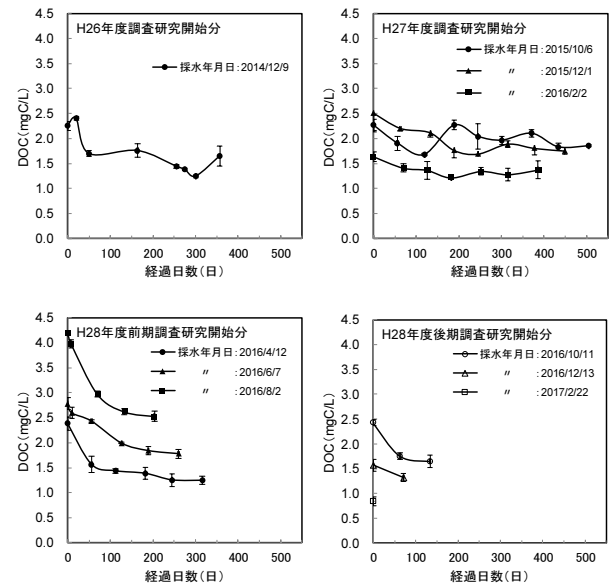


図4 三方湖湖沼水における採水後の生分解経過日数とDOCとの関係

3.5 各有機物指標の比較

平成28(2016)年6月7日に採水した試料を例に、各有機物指標の長期変化挙動を比較した結果について図5に示した。なお、DOCは、溶存態有機体炭素を全て酸化するのに要する酸素量として、O₂/C(2.67)を乗じ、理論酸素要求量を求め比較した。

これをみると、試料採取日および100日間経過以降において各有機物指標間で明らかな差が認められる。CODは初期値から半減しているが、DOCの減少幅は小さい。仮に、CODでカウントされないDOC成分が、時間の経過とともにCODにカウントされる有機物に変化するとすれば、CODを環境基準の有機物指標としている以上、その低下は容易ではなく、環境基準の達成が困難となる。

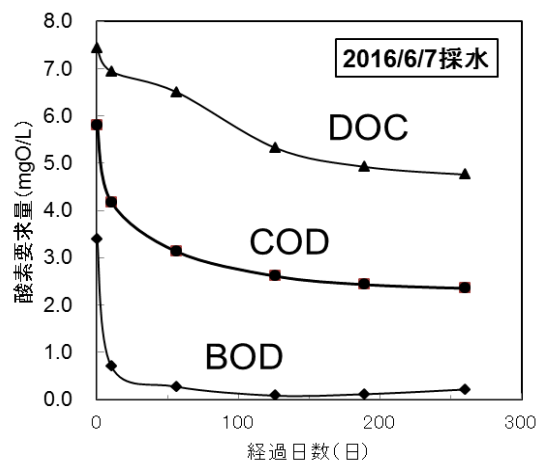


図5 三方湖湖沼水における各有機物指標の比較

4. まとめ

COD_{Mn}は「酸化力が弱い」、「物質によっては酸化率が異なる」、および「酸化の程度が温度や反応時間に影響を受けやすい」などの理由により、有機物の総量を表す指標としては不適切とする考え方がある。一方、DOCは有機物そのものの炭素量を示すため加算性が高く、有機物の物質収支を明確に捉えることができる長所を有する。本研究においても一部の湖水試料では、DOCに比べてCOD_{Mn}は長期的な時間経過による濃度変化が大きかった。そのため、湖沼水における生活環境項目の基準超過問題に関してはCOD_{Mn}のみで議論すべきではなく、全有機炭素(TOC)等の有機物総量を表す指標を併用して評価することが重要と考えられる。今後、公共用水域の良好な水質保全のため、難分解性有機物の低減化に向けた研究の進展が望まれる。

参考文献

- 1) 岡本高弘 他：水質汚濁メカニズムの解明に関する政策課題研究－難分解性を考慮した琵琶湖における有機物の現状と課題，滋賀県琵琶湖環境科学研究センター研究報告書, 7, 87-102(2011)
- 2) 安田能生弘 他：河北潟における難分解性有機物に関する実態調査（第2報），石川県保健環境センター研究年報, 51, 34-38(2014)
- 3) 松井亮 他：湖沼中の難分解性有機物に関する挙動解析，福井県衛生環境研究センター年報, 13, 104-105(2014)