

Ⅲ 調査研究

Ⅲ 調査研究 目次

1. 調査研究

- (1) 毒性同定評価 (TIE) 手法を用いた北潟湖流入河川水の藍藻生長阻害要因の同定
保月勇志 他 40

2. ノート

- (1) 藻類生長阻害試験と増殖ポテンシャル試験による三方湖流入河川水の評価
保月勇志 他 45

3. 資料

- (1) 2023/24 シーズンの福井県のインフルエンザ
坂井伸成 他 49

毒性同定評価（TIE）手法を用いた北潟湖流入河川水の 藍藻生長阻害要因の同定

保月勇志・蔦原仁平・吉舎直輝・田中宏和

Identification of Factors Inhibiting the Growth of Cyanobacteria
in the Inflowing River Water of Lake Kitagata

Takeshi HOZUKI, Jinpei TSUTAHARA, Naoki KISA, Hirokazu TANAKA

藍藻生長阻害試験で毒性が確認された北潟湖流入河川水を対象とし、毒性同定評価手法（TIE）を用いた毒性原因の同定を試みた。特に毒性が高かった河川水試料を対象に TIE を実施したところ、Phase1 では毒性原因が金属類と推定され、Phase2 ではさらに 4 種類の金属にまで絞り込むことができ、Phase3 ではニッケル、銅および亜鉛の毒性が強いことが確認された。また、銅と亜鉛の EC₅ は既存情報よりも高い毒性が確認された。しかしながら、本研究で求めた EC₅ を用いて計算した金属類による予測毒性値の総和については、評価した 4 試料中 3 試料でリスクが懸念されるレベルには到達せず、金属類のみでは生長阻害の原因を説明することができなかった。

1. はじめに

福井県あわら市に位置する北潟湖は、有機汚濁指標や栄養塩類の環境基準が超過している汽水湖である。また、漁業をはじめとした利水、観光やカヌースポーツ等による親水に活用され、渡り鳥の飛来地としても生物多様性の保全が求められている湖でもある。これらのことから、湖水中の有機汚濁の低減と水生生物の保全が共に求められ、そのために着目すべき点として湖水に生きる藻類がある。なぜなら、藻類は水中の二酸化炭素から有機物を生産する一次生産者であることから、生態系の上位の生物にとっては重要な生物であるとともに、異常増殖すると溶存酸素量の低下やアオコ等を発生する原因となる。そのため、藻類の種構成やバイオマスは湖の健全な水環境を保全するうえで重要な情報である。

特に北潟湖は河川の最末端に位置する地理的条件から、流域の汚濁負荷が集中するため、湖内の藻類は流域の影響を受けやすい。著者らは、2022 年度に北潟湖の代表的な流入河川である観音川の河川水を対象とし、藍藻生長阻害試験を実施した¹⁾。その結果、春季から夏季にかけて採取した一部の試料で非常に強い毒性を確認したが（図 1）、各種イオン成分や金属類、農薬類等の分析濃度からは毒性原因を特定することはできなかった。そこで今回、毒性同定評価手法（TIE：Toxicity Identification Evaluation）を用いて毒性原因の探索を試みた。TIE は、全排水毒性（WET：Whole Effluent Toxicity）を中心とした排水管理を行う際に排水の毒性を削減するための毒性削減評価（TRE：Toxicity Reduction Evaluation）に含まれるプロセスの一部であり^{2,3)}、米国等で導入されている。TIE は毒性原因の特徴化、同定、確認の 3 段階の手順で構成される。今回の試行では次のとおり実施した。

Phase1（特徴化）では、2 種類の固相カラムにより有機化学物質または金属類を除去した試料をそれぞれ生長阻害試験に供することで毒性原因の特徴づけを行った。また、Phase2（同定）では、カラムによる除去率や既存の毒性情報から対象物を絞り込んだ。最後の Phase3（確認）では、絞り込んだ物質を個別に生長阻害試験に供し、5%影響濃

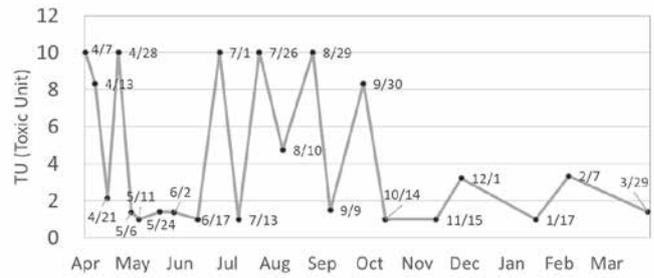


図 1 北潟湖流入河川（観音川）の TU 推移（2022 年度）
度（EC₅）を求めるとともに河川水濃度と比較した。本報では藍藻（*Microcystis aeruginosa*）に対する毒性原因の推定について得られた知見を報告する。

2. 方法

2022 年度に実施した生長阻害試験で毒性単位（TU：Toxic Unit）が高かった試料を対象として TIE を実施した。

2.1 試料

試料は観音川の崎田橋付近で 2022 年 4 月 7 日、4 月 28 日、8 月 29 日、9 月 30 日に採取したもの（計 4 試料）を冷凍保存し、試験開始前に解凍して使用した。

2.2 TIE

2.2.1 Phase1（特徴化）

各試料を逆相カラム（GL Science 社製 PLS-2(250mg)）または金属キレートカラム（GL Science 社製 ME-2(250mg)）に通水し、通液を生長阻害試験^{4,5)}に供した（表 1、図 2）。試験生物には国立環境研究所から分与された *Microcystis aeruginosa*（NIES-843）を用いた。試験は各濃度区 3 並行で実施し、平均値を求めた。また、無処理試料（以下、「Whole」と呼ぶ。）の生長阻害試験結果と比較し、式 1 により各画分の阻害率を求めた。ここで Control とは試料水を添加しなかった場合（濃度区 0%）を指す。

$$\text{阻害率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{各濃度区の生長速度}}{\text{Control の生長速度}} \right) \times 100 \text{ (式 1)}$$

2. 2. 2 Phase2 (同定)

同定対象は金属類とし、Phase1 においてカラム処理を実施した試料および Whole 中の各金属類濃度を ICP-MS にて測定し、式 2 によりカラム処理による除去率を求めた。

$$\text{除去率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{カラム処理試料の濃度}}{\text{Whole の濃度}} \right) \times 100 \text{ (式 2)}$$

また、各金属類について、環境省ホームページ等を参考に、EC₅ または無影響濃度 (NOEC: No Observed Effect Concentration) 毒性情報を取得し、式 3 によりハザード比 (HQ: Hazard Quotient) を計算し、毒性に作用しうる金属類を予測した。

$$\text{HQ} = \frac{\text{試料濃度}}{\text{EC}_5 \text{ または NOEC}} \text{ (式 3)}$$

2. 2. 3 Phase3 (確認)

Phase2 において候補として絞り込んだ原因物質について生長阻害試験を実施し、濃度反応曲線を求めて EC₅ を算出した。さらに、求めた EC₅ から HQ を算出し、生長阻害への影響を評価した。なお、添加した金属については、ICP 分析用として市販されている標準溶液を使用したため添加剤の硝酸を含むが、今回の試験系の培養液中の濃度は最大 1.3 mg/L (NO₃-N) であり、生長阻害試験には影響しないことを確認している (表 2)。

3. 結果と考察

3. 1 Phase1 (特徴化)

Phase1 の結果を図 3 に示した。ここで、エラーバーは最大値および最小値を示している。また、Control と比較し、有意差がある濃度区 (p<0.05) は、*と阻害率を併記した。

いずれの試料も Whole において、80%濃度区での生長阻害が確認された。ただし、4月28日の試料は、他の試料と比べて生長阻害の程度が弱かった。また、逆相カラム処理区では、いずれも 80%濃度区での生長阻害が確認されたが、4月28日は Whole と比較して生長阻害率が 56% から 33% となり、僅かな回復傾向がみられた。一方、金属キレートカラム処理区では、いずれの試料も Whole と比較して 80%濃度区での生長阻害が明らかに回復した。このことから、いずれの試料の生長阻害についても金属類が強く影響していることが推察された。

3. 2 Phase2 (同定)

各カラム処理による各金属類の除去率について、試験に供した 4 試料の平均値を図 4 に示した。また、毒性情報が得られた金属類について、カラム処理試料の HQ を図 5 に示した。

図 4 に示したとおり、金属キレートカラムについてはカルシウム (Ca)、クロム (Cr)、マンガン (Mn)、ニッケル

表 1 藻類生長阻害試験条件

試験生物	藍藻 <i>Microcystis aeruginosa</i> (NIES-843)
培地	OECD 培地 ・ OECD 培地濃縮液 I、III、IV (富士フィルム和光純薬株式会社製) ・ OECD 培地濃縮液 II (用時調整後フィルターろ過滅菌、FeCl ₃ · 6H ₂ O 64 mg/L、Na ₂ EDTA · 2H ₂ O 100 mg/L)
温度	25°C
初期濃度	100,000 cell/mL
照明条件	明期 10 時間、暗期 14 時間
照度	20 μ photons/m ² /s
振とう	50 rpm
培養容器	γ滅菌済み PS 製 6 穴ウェルプレート (Corning 社製)
濃度区	Control (0%)、20%、40%、80%
容量	5 mL

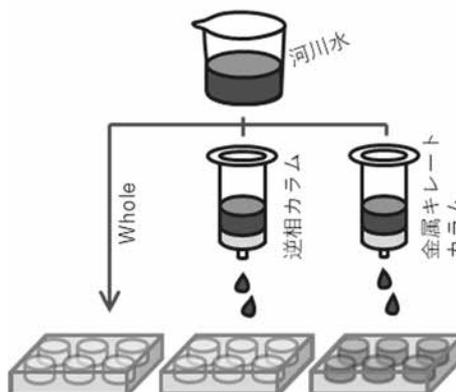


図 2 Phase1 の概略図

表 2 添加した金属標準溶液

試薬	濃度範囲 (mg/L)
クロム (Cr)	0.0002~0.048
ニッケル (Ni)	0.0002~0.024
銅 (Cu)	0.0002~0.048
亜鉛 (Zn)	0.0004~0.91

(Ni)、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、ヒ素 (As)、カドミウム (Cd)、鉛 (Pb) の除去率が高く、通水処理により効率よく除去できることが分かった。一方これらの金属について、逆相カラムでは金属キレートカラムに比べて除去されにくいことが分かった。一方これらの金属について HQ を算出すると Cr、Ni、Cu、Zn の HQ が高かったことから (図 5)、この 4 種の金属が生長阻害に作用していることが推察された。

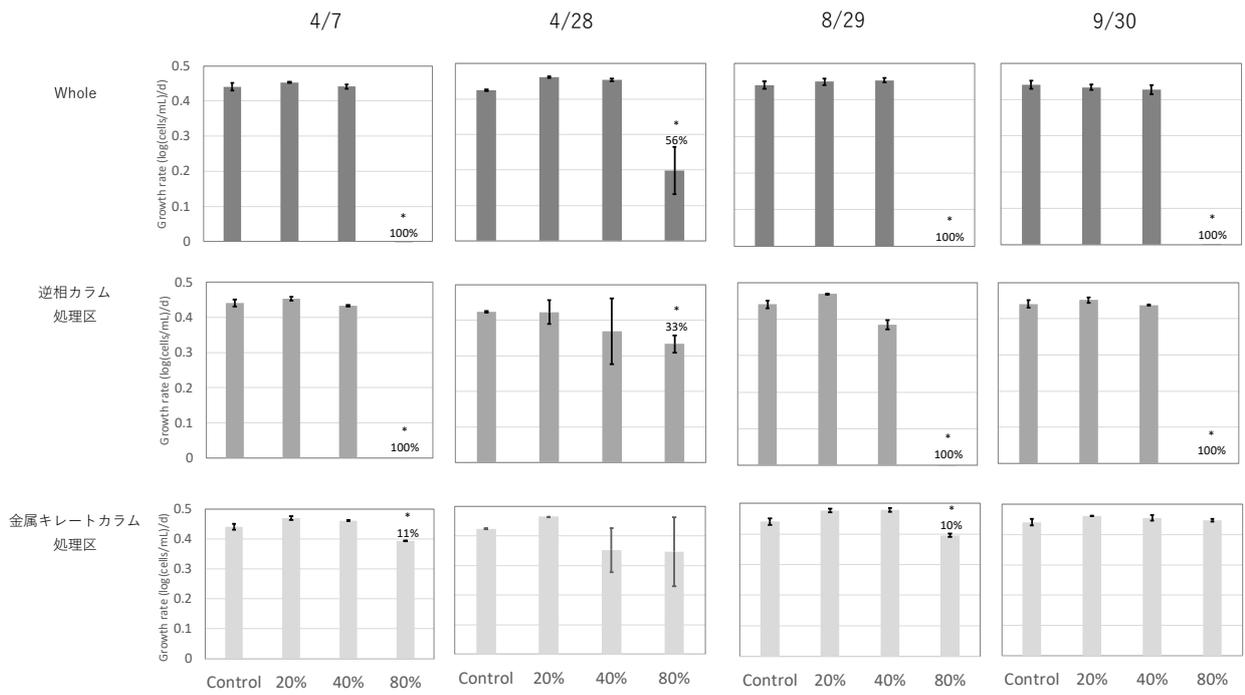


図3 Whole および各カラム処理区の藍藻生長阻害試験の結果

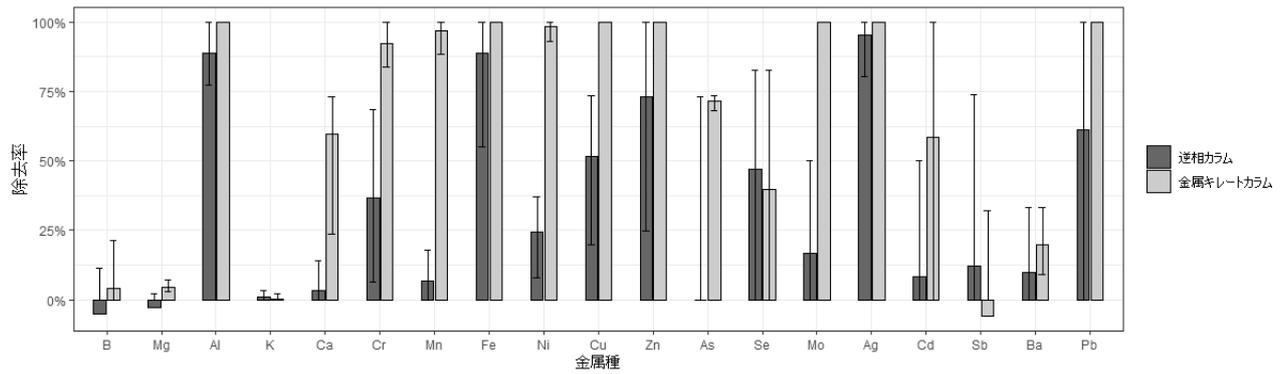


図4 各カラム処理による金属類の除去率

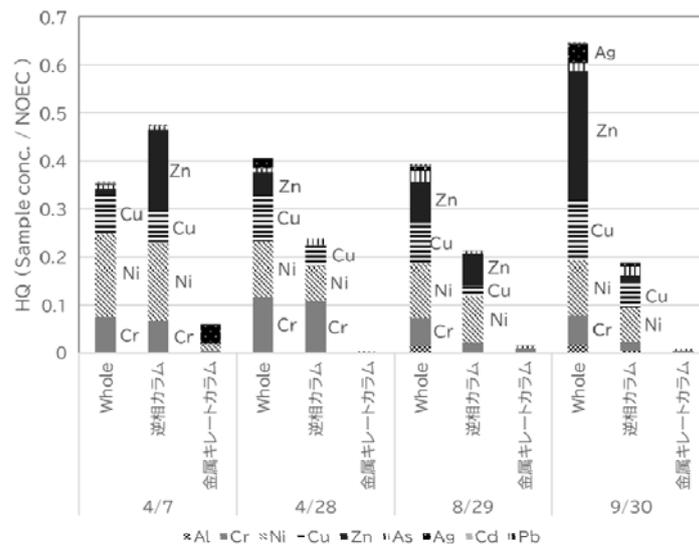


図5 既存毒性情報から算出した各カラム処理試料のHQ

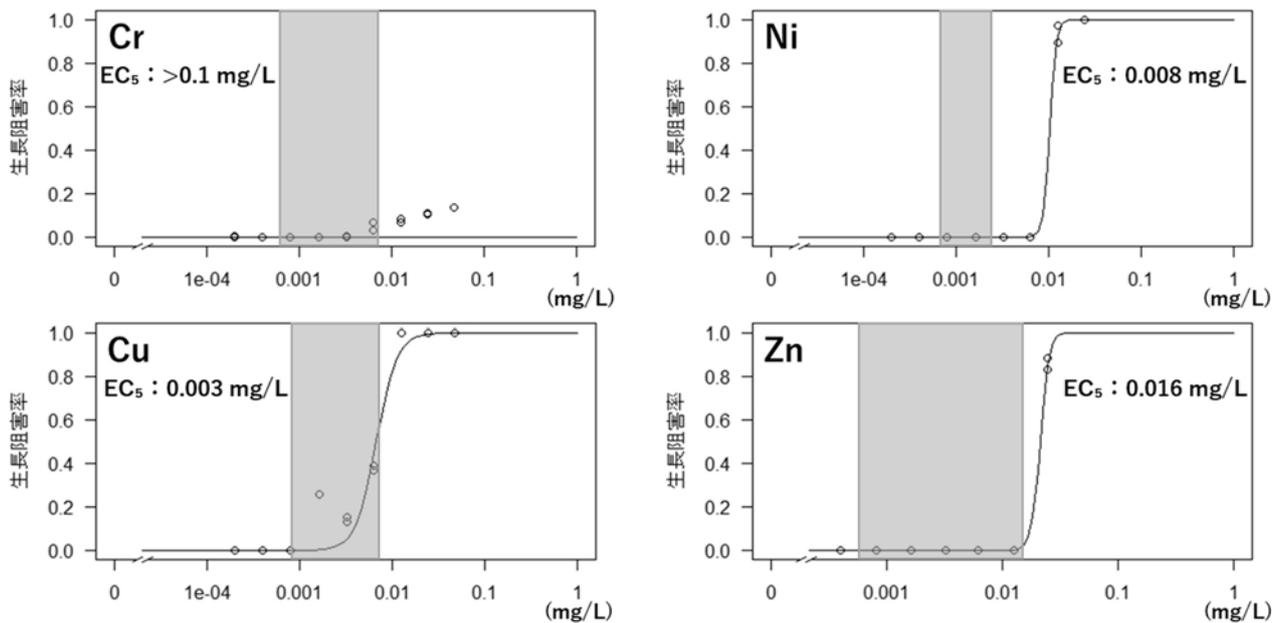


図6 Cr、Ni、Cu、Znの藍藻に対する濃度反応曲線

3.3 Phase3 (確認)

Cr、Ni、Cu、Znの藍藻 (*Microcystis aeruginosa*) に対する濃度反応曲線およびEC₅₀を図6に示した。EC₅₀は、Niが0.008 mg/L、Cuが0.003 mg/L、Znが0.016 mg/Lであった。なお、図中の網掛け部は、2022年度に調査した試料の各金属の濃度範囲を示している¹⁾。Crは河川水濃度程度では生長阻害率が低く、EC₅₀を算出できなかった。一方、CuとZnは、既存情報⁶⁾よりも高い毒性が示された。

本研究で求めたEC₅₀からWholeの金属濃度のHQを算出し、図7に示した。その結果、Cu、ZnおよびNiの占める割合が大きかったことが分かった。しかしながら、4試料中3試料で予測毒性値の総和(ΣHQ)が1よりも低値であり、金属類のみでは生長阻害の原因を説明できなかった。

なお、前述したとおりPhase1において、4月28日の試料が逆相カラム処理区で僅かな回復傾向を示したことから、一斉分析で検出された農薬のうち、特にHQが高かったブタクロール¹⁾を対象として、金属と同様に濃度反応曲線を求め、図8に示した。その結果、河川水中に含まれる濃度程度では藍藻 (*Microcystis aeruginosa*) への生長阻害は確認されなかった。このことから、Phase1でみられた逆相カラム処理区による生長阻害の僅かな回復傾向の原因物質はブタクロールではないことが判明した。このように、特定の農薬を想定した検証を行っても原因物質の特定は困難であり、他の有機化学物質や複数の有機化学物質の複合的な作用、もしくは逆相カラムで除去可能な何らかの物質の影響が考えられたが、本研究では原因物質を解明することはできなかった。

4. 総論

今回、Ni、CuおよびZnのEC₅₀が河川水中に存在する濃度でも藻類に作用する可能性が考えられたが、Wholeの金属類濃度から求めたΣHQは4試料中3試料で1よりも低く、金属類のみで生長阻害の原因を説明できなかった。ただし、実際の河川水中の金属類は、荷電により毒性が異

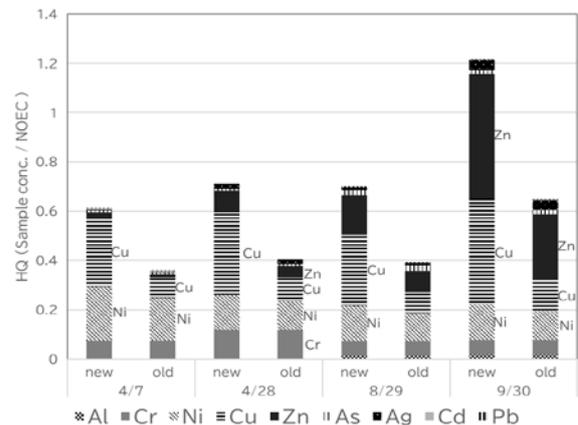


図7 本研究で求めたEC₅₀から算出したHQ(new)と、既存情報から算出したHQ(old)

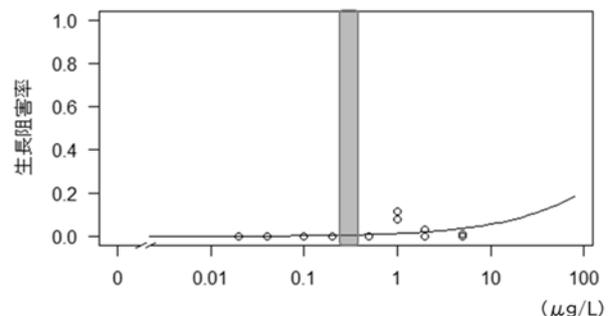


図8 藍藻 (*Microcystis aeruginosa*) に対するブタクロールの濃度反応曲線

なるだけでなく、溶存態有機物(DOC)成分との錯形成作用やイオンバランスによる荷電の変化等、複雑な毒性作用機構(相加・相乗・拮抗)⁷⁾が働く。つまり、Phase3で求めたEC₅₀はフリー態イオンによる毒性値であるため、実際の河川水中の金属による毒性が今回算出した予測毒性と乖離があっても不思議ではない。

本研究で求めた EC₅を用いて 2022 年度に調査した観音川試料水の金属類濃度から ΣHQ を求めると図 9 のとおりであり、年間を通してほとんどの試料で 1 を超える予測毒性が示された。今回の TIE に供した 4 試料は TU の高いものを選定したが、それ以外の試料の ΣHQ の方が高値を示したことは注視すべきである。一般的に、錯形成した金属はフリー態のものに比べて毒性が弱まるが、汽水湖の高塩分により錯体から離れてフリー態として溶出される場合がある⁸⁾。つまり、河川水中で錯形成していた金属が湖内でフリー態となった場合には図 9 に示したような高い毒性に変換される可能性があり、藻類の生長に影響する可能性は十分に考えられる。

今回の試験で EC₅ が求められた Ni、Cu および Zn は、河川の上流でも検出されることから、山林からの流出も発生源の一つと考えられる。さらに加えて、河川水中の DOC が高い時期に併せてこれらの金属が高濃度に検出されやすい報告¹⁾や農業濁水にもこれらの金属が高濃度で含まれている報告⁹⁾があることから、農繁期においては農排水由来の Ni、Cu および Zn が、下流の河川水中の金属濃度を上昇させる大きな原因とも考えられる。特に、重金属は土壌に吸着した形態で存在しやすい。そのため、河川から汽水湖に供給される金属量を低減させるためには農排水の管理が重要であり、特に落水の際に濁水の排出を抑える工夫が有効であると思われた。

5. まとめ

本研究では観音川河川水の生長阻害試験調査において毒性が高かった試料を対象とし、TIE による原因物質の探索を実施した。その結果、以下の知見を得た。

- ・ Phase1 では金属類が毒性原因であることが推察され、Phase2 ではさらに Cr、Ni、Cu および Zn に毒性要因が絞り込まれ、Phase3 では Ni、Cu および Zn の毒性が強いことが確認された。
- ・ 本研究で求めた Cu と Zn の EC₅ は既存情報よりも高い毒性を示した。そのため、調査した 4 試料について金属類の ΣHQ を再計算したが 3 試料については 1 未満であり、金属類のみでは生長阻害の原因を説明できなかった。
- ・ 本研究で求めた EC₅ を用い、年間を通じた観音川河川水中の金属類による ΣHQ を計算したところ、1 を超える予測毒性が多く確認された。このことから、汽水湖中では金属が錯体から離れてフリー態となり毒性が上昇することを考慮すると、河川水中の金属が湖沼の藻類の生長に影響を及ぼす可能性があると考えられた。

謝辞

本研究は、文部科学省「特別電源所在県科学技術振興事業費補助金」により実施したものである。また、国立研究開発法人国立環境研究所と地方環境研究所等のⅡ型共同研究課題「多様な水環境の管理に対応した生物応答の活用に関する研究」の参加機関の皆様には多大なご助言をいただいた。関係者の皆様に深謝申し上げる。

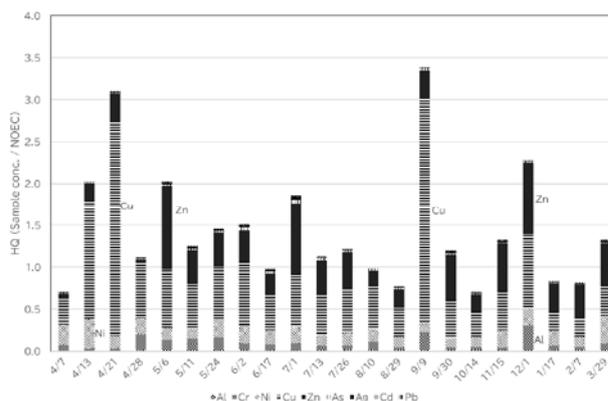


図 9 観音川河川水の HQ の推移 (2022 年度)

参考文献

- 1) 保月勇志, 吉舎直輝, 蔦原仁平, 田中宏和 : 藻類生長阻害試験と増殖ポテンシャル試験による北潟湖流入河川水の評価. 福井県衛生環境研究センター所報, 22 (2024)
- 2) 山本裕史, 池幡佳織, 安田侑右, 田村生弥, 鎌迫典久 : 徳島県内の事業所排水を対象にした TIE の事例. 環境化学 Vol.25, No.1(2015)
- 3) 渡部春奈 : 生物応答試験による事業場排水の複合影響評価と毒性原因物質の同定. 環境毒性学会誌, 27 (S1), S76-S92 (2024)
- 4) 保月勇志, 吉舎直輝 : 藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いた生長阻害試験方法の構築. 福井県衛生環境研究センター所報, 21 (2023)
- 5) OECD : Fresh Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, Guidelines for the Testing of Chemicals NO.201(2006)
- 6) European Chemicals Agency. <https://echa.europa.eu/brief-profile/-/briefprofile/100.028.326>
- 7) 鎌迫典久 : 水生生物における化学物質の複合作用-相加・相乗・拮抗作用. 環境毒性学会誌, 27(S1), S3-S1(2024)
- 8) 永井孝志 : 環境水中重金属のスペシエーションと生物利用性. 環境毒性学会誌, 14(1), 13-23(2011)
- 9) 保月勇志 : 福井県の湖沼における有機物の新たな指標による評価による評価と浄化に関する研究(第 3 報)-北潟湖に流入する有機物の特性評価-. 福井県衛生環境研究センター所報, 19 (2021)

藻類生長阻害試験と増殖ポテンシャル試験による 三方湖流入河川水の評価

保月勇志・蔦原仁平・吉舎直輝・田中宏和

Algal Growth Inhibition and Growth Potential Tests in Inflow Rivers of Lake Mikata.

Takeshi HOZUKI, Jinpei TSUTAHARA, Naoki KISA, Hirokazu TANAKA

1. はじめに

三方五湖は福井県美浜町と若狭町にまたがって位置する5つの湖の総称であり、それぞれの湖は海水と淡水の比率や水深が異なることから、近隣の梅丈岳山頂から見る水の色には差がみられ、景勝地として有名である。その中の三方湖は三方五湖の最上流部に位置し、代表的な流域河川である鱒川の水が流入している。この地理的条件により、三方湖には鱒川流域の田畑、住居、事業場等の排水に含まれる栄養塩類（窒素、燐）や化学物質が最初に流入し、集積しやすい。このことから、他の湖に比べて三方湖は有機汚濁が進行しやすく、また、湖に棲息する生物にとっては流域からの化学物質等の影響を直接受けやすい環境にある。特に湖水中の藻類は流入水の影響を受けやすい生物であるが、有機汚濁の主要因であるとともに、一次生産者として水圏生態系の基底をなす生物でもある。そのため、そのバイオマスや種構成は、湖沼の水質や水圏生態系に大きな影響を及ぼす重要な指標である。

著者らは前報²⁾において、北潟湖の代表的な流入河川である観音川の水が湖内の藻類へ与える影響を評価するために、藻類生長阻害試験と増殖ポテンシャル試験を併せて実施した。その結果、春季から夏季にかけて、毒性と増殖ポテンシャルがともに高い傾向を確認し、これらの相反する特性から、限られた種の藻類が異常に増殖する事象（ブルーム）が発生しやすい環境が形成される可能性を指摘した。

このような研究結果を受けて、同じく福井県内にある三方湖に流入する河川水の特長評価を目的とし、同様な調査を実施した。本報ではその結果を紹介する。

2. 方法

2.1 試料

試料は、鱒川の末端付近（図1）において、2023年4月10日、5月12日、6月6日、7月19日、8月1日、9月13日、10月3日、11月7日、12月5日、2024年1月17日、2月14日、3月15日に河川水を採取した。試料は冷暗条件で実験室に持ち帰り、前処理として1mm ガラスフィルターおよび0.22mm メンブレンフィルター（PVDF）でろ過したものをステンレス缶に入れ、試験に供するまで-30℃で冷凍保存した。

2.2 藻類生長阻害試験

藻類生長阻害試験は、既報³⁾の試験方法を用い、*Microcystis aeruginosa* (NIES-843) を使用した。なお、本株は国立環境研究所微生物系統保存施設から分譲を受けた。



図1 採水地点

2.3 増殖ポテンシャル試験

増殖ポテンシャル試験は、前報²⁾を参考に実施した。なお、従来のAGP試験と比較するために、光合成活性指標（Fv/Fm、ETR）と29日間培養後のクロロフィル量との関連性を検討し、培養10日目の電子伝達速度の最大値（rETR max）がクロロフィル量と相関が確認されたことから、rETR maxを増殖ポテンシャル指標とした。

2.4 水質分析

前報²⁾と同様に実施した。

2.5 解析

毒性影響の評価指標には、無影響濃度（NOEC：No Observed Effect Concentration）、5%影響濃度（EC₅）および毒性単位（TU：Toxic Unit）の3種を用いた。NOECは、ダネット検定によりコントロールとの有意差（p<0.05）がなかった濃度区の最大値とした。また、EC₅は統計解析ソフトRのdrcパッケージを用い、ロジスティック回帰により毒性閾値として生長速度を5%減少させる影響濃度を求めた。TUはEC₅の逆数として算出した（式1）。なお、TUは試料が無影響となるまでに必要な希釈倍率と考えることができる。

$$TU = \frac{1}{EC_5} \quad (\text{式1})$$

また、試料水に含まれる金属および農薬の測定濃度を、文献等^{4,5)}から得た藻類に対するNOECで除して予測毒性値（HQ：Hazard Quotient）を求めた（式2）。

$$HQ = \frac{\text{測定濃度}}{\text{NOEC}} \quad (\text{式 2})$$

3. 結果

3.1 生長阻害試験

生長阻害試験の結果を表 1 に示した。12 検体中 5 検体の NOEC が 80% 以上であり、TU の最高値は 2.6 であった。春季から秋季にかけての TU は低い傾向を示し、冬季はやや高めの 2.0~2.6 であったが、北潟湖流入河川水の TU (10 以上) と比較すると²⁾明らかに低い値であった。

3.2 水質分析

pH 等の基本的な項目および栄養塩に関する水質分析結果を表 2 に示した。生物応答試験に使用した *Microcystis aeruginosa* は塩分の影響を受けやすい種であるが、試料中の塩分は 0.05~0.06 PSU であり、*Microcystis aeruginosa* の塩分耐性閾値 (2~35PSU)⁶⁾よりも著しく低く、生長阻害への影響は考えにくい濃度であった。また、栄養塩の濃度範囲は、亜硝酸態窒素が 0.00~0.01 mg/L、硝酸態窒素が 0.24~0.65 mg/L、アンモニア態窒素が 0.03~0.08 mg/L、磷酸態磷が 0.000~0.022 mg/L であり、OECD 培地の窒素および磷の含有濃度 (N:3.927mg/L、P:0.285mg/L)⁷⁾と比べて低値であった。

次に、金属類濃度から HQ を算出し、時系列の積み上げ棒グラフとしたものを図 2 に示した。種別にみると、ニッケル、銅および亜鉛の HQ が占める割合が大きく、年間を通して高値を示した。ただし、全ての金属類を積算した Σ HQ metal の平均値は 0.4 であり、北潟湖流入河川水 (Σ HQ metal 平均値 0.6)²⁾と比較すると低値であり、全体的にも低い傾向がみられた。

さらに、農薬の測定結果を図 3 に示した。農薬は年間を通じて検出されたが、特に高濃度となったのは 5 月から 8 月であり、その間に検出された農薬は測定対象の 128 種のうち 22 種であった。図 3 では、それぞれの農薬を除草剤、殺虫剤、殺菌剤および植物成長調整剤に区分して表記した。また、それぞれの農薬から積算した HQ の推移も併せて示した。HQ は、5 月および 6 月に高値を示したが、いずれも除草剤の影響が強く、5 月ではプレチラクロールが 0.67、フェントラザミドが 0.21 となり、6 月ではフェントラザミドが 0.21、ピラクロニルが 0.27 となり高値を示した (表 3)。

表 1 生長阻害試験結果一覧

採取日	NOEC	EC ₅	TU
2023/4/10	≥80%	100%	1.0
5/12	≥80%	100%	1.0
6/6	40%	62%	1.6
7/19	≥80%	77%	1.3
8/1	40%	68%	1.5
9/13	40%	64%	1.6
10/3	40%	68%	1.5
11/7	≥80%	100%	1.0
12/5	≥80%	100%	1.0
2024/1/17	40%	50%	2.0
2/14	40%	38%	2.6
3/15	40%	43%	2.3

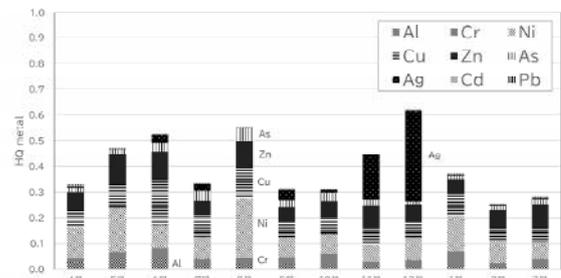


図 2 HQ metal の年間推移

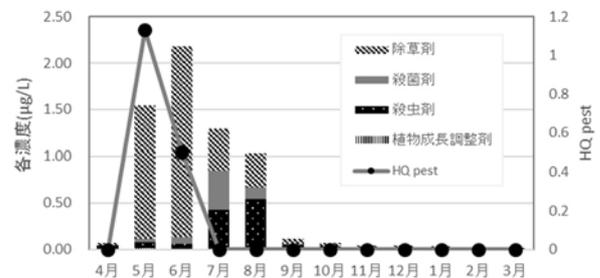


図 3 農薬の剤別濃度推移と HQ pest の年間推移

表 2 試料の水質情報

採取日	水温 (°C)	EC (µS/cm)	塩分 (PSU)	pH	DO (mg/L)	DOC (mg/L)	DN (mg/L)	NO ₂ -N (mg/L)	NO ₃ -N (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	DP (mg/L)	PO ₄ -P (mg/L)
2023/4/10	16	94	0.05	7.4	10.2	1.2	0.62	0.01	0.47	0.05	0.018	0.000
2023/5/12	17	87	0.05	7.5	9.6	1.3	0.66	0.00	0.50	0.08	0.024	0.000
2023/6/6	18	85	0.05	7.5	8.9	1.4	0.65	0.00	0.45	0.08	0.023	0.000
2023/7/19	23	104	0.05	7.5	8.2	1.2	0.62	0.00	0.45	0.07	0.034	0.003
2023/8/1	30	139	0.06	7.5	8.7	2.0	0.44	0.00	0.24	0.08	0.042	0.003
2023/9/13	26	119	0.05	7.5	8.7	1.2	0.61	0.00	0.53	0.04	0.027	0.022
2023/10/3	21	109	0.05	7.5	9.3	1.2	0.57	0.00	0.45	0.04	0.024	0.002
2023/11/7	17	91	0.05	7.5	9.3	1.3	0.62	0.00	0.51	0.03	0.021	0.000
2023/12/5	11	85	0.05	7.7	11.1	0.8	0.75	0.00	0.65	0.04	0.011	0.000
2024/1/17	10	77	0.05	7.8	11.9	0.8	0.69	0.00	0.60	0.05	0.010	0.000
2024/2/14	11	72	0.05	7.9	11.0	0.7	0.59	0.00	0.52	0.04	0.011	0.000
2024/3/15	10	69	0.05	7.7	11.4	0.8	0.53	0.00	0.45	0.04	0.010	0.000

表 3 HQ が高値を示した主な農薬

採水日	農薬名	農薬種別	logPow	藻類NOEC(μg/L)	濃度(μg/L)	HQ
5/12	ピラズルスフロンエチル	除草剤	0.01	0.35	0.07	0.19
	フェントラザミド	除草剤	3.6	0.49	0.10	0.21
	プレチラクロール	除草剤	3.9	0.53	0.35	0.67
	ピラクロニル	除草剤	2.2	3.00	0.07	0.02
	ブタクロール	除草剤	4.4	0.49	0.02	0.04
6/6	フェントラザミド	除草剤	3.6	0.49	0.10	0.21
	プレチラクロール	除草剤	3.9	2.92	0.10	0.03
	ピラクロニル	除草剤	2.2	3.00	0.82	0.27

3.3 増殖ポテンシャル試験

増殖ポテンシャルを調査した結果を図4に示した。増殖ポテンシャルは、春季から秋季(4月~11月)にかけて高い傾向にあり、冬季(12月~3月)は低い傾向を示した。最大値は8月の67μmol electrons/(m²・s)であり、最小値は1月の29μmol electrons/(m²・s)であった。

4. 考察

4.1 生長阻害試験

金属類濃度および農薬濃度から算出した予測毒性値(HQ)とTUを図5に示した。今回の調査ではTUの最高値は2.6であり、前報の北潟湖の流入河川水の結果²⁾と比較すると全体的に毒性が低い傾向を示した。また、金属類由来の予測毒性値(HQ metal)についても同様に、北潟湖の流入河川水に比べて低い傾向がみられた。一方、農薬由来の予測毒性値(HQ pest)は北潟湖流入河川水と同程度であり、最も高い5月には1を超えた。しかし、同月のTUは他の月に比べて特に高い値でないことから、農薬の影響はそれほど大きくないものと考えられた。以上から、三方湖の流入河川の鱒川においては、年間を通して藍藻に対する毒性は低く、また毒性要因も少ないことが示唆された。

4.2 増殖ポテンシャル

増殖ポテンシャル試験の培養条件において指標に用いたrETRmaxと有機物生成能との関係を求めるため、予備試験を行った。その結果、有機物の増加は約29日間で定常状態となることが分かった。そのため、29日目の培養液中のTOCと10日目のrETRmaxとの関係を直線回帰により近似し、式3を得た。4月~11月の増殖ポテンシャルについて式3からTOC濃度を求めた結果、TOC換算で40mg/L程度を増加させるポテンシャルであると計算された。

$$\text{TOC (mg/L)} = 0.24 \times \text{rETRmax} + 25 \quad (\text{式3})$$

これは、過去に小規模なアオコが発生した際の三方湖の湖水中の濃度TOC 7.5mg/L⁸⁾と比較しても高値であり、藻類の異常増殖を起こしうるポテンシャルであると考えられる。また、北潟湖流入河川水の調査において増殖ポテンシャルが高値を示した6~7月のrETRmaxはTOCを30~36mg/L増加させるポテンシャルであったこと²⁾と比較すると、鱒川はさらに高い増殖ポテンシャルが長期間にわたり続くと推定された。

次に、増殖ポテンシャルと各水質調査項目との相関を求め図6に示した。正の相関が強かった項目は溶存有機炭素(DOC)と溶存態燐(DP)であり、DPは主たる栄養塩で

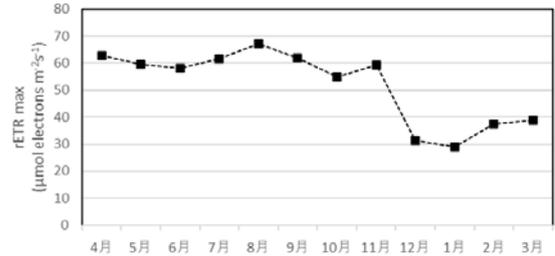


図4 増殖ポテンシャルの年間推移

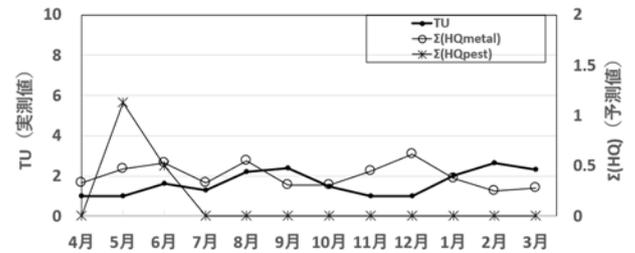


図5 毒性実測値(TU)と毒性予測値(ΣHQmetal, ΣHQpest)の推移

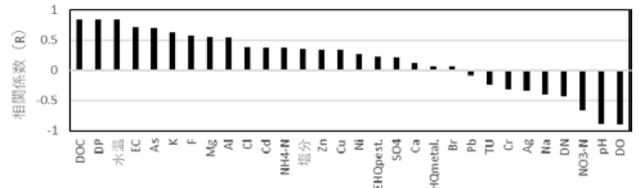


図6 増殖ポテンシャルと各水質項目との相関係数(R)

あることから、生長を促す因子として増殖ポテンシャルと強い相関があることは理解しやすい。またDOCと増殖ポテンシャルとの相関が高かったことは北潟湖流入河川の調査でも共通しており、生物利用可能な一部の有機物(糖やビタミン等)を従属的に利用^{9,10)}して藻類が増殖した可能性が考えられた。

4.3 湖内の藻類への影響と対応

今回の調査で鱒川の水は藍藻に対する毒性が低く、増殖ポテンシャルが高いことがわかった。そのため、流入河川水の毒性が湖内の藻類の種構成に影響するリスクは低いと考えられるが、春季から秋季にかけてはバイオマスが増加することが想定され、このことは藻類が異常増殖するリスクが高いことを意味している。その対応策としては生長を促す因子として確認された燐やDOCの流入河川水中の量を低減させることが有効と考えられる。鱒川流域においては、燐やDOCは濁水に由来する負荷量が多いことが分かっていることから¹¹⁾、増殖ポテンシャルの低減を図るためには田畑からの農業濁水流出を適切に管理することが重要と考えられた。

5. まとめ

三方湖に流入する鱒川河川水を対象とし、藍藻生長阻害試験と増殖ポテンシャル試験を行った。毒性は冬季に高くなる傾向がみられたが、TUは2.0～2.6であり、北潟湖流入河川と比較すると明らかに低値であった。また増殖ポテンシャルは、4月～11月において高値を示した。

これらのことから、三方湖流入河川水の低毒性は湖内の藻類の種構成には影響を及ぼしにくいものの、増殖ポテンシャルはブルームを発生しうる程度に高いことが懸念された。増殖ポテンシャルにはDOCやDPが寄与していることが確認されたため、これらの流入を抑制することが有機汚濁進行に対して有効と考えられた。

謝辞

本研究は、文部科学省「特別電源所在県科学技術振興事業費補助金」により実施したものである。また、国立研究開発法人国立環境研究所と地方環境研究所等のⅡ型共同研究課題「多様な水環境の管理に対応した生物応答の活用に関する研究」の参加機関の皆様には多大なご助言をいただいた。関係者の皆様に感謝申し上げる。

参考文献

- 1) 環境省：日本の汽水湖 ～汽水湖の水環境の現状と保全～ (2014)
- 2) 保月勇志, 薦原仁平, 吉舎直輝, 田中宏和：藻類生長阻害試験と増殖ポテンシャル試験による北潟湖流入河川水の評価, 22 (2024)
- 3) 保月勇志, 吉舎直輝：藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いた生長阻害試験方法の構築. 福井県衛生環境研究センター所報, 21 (2023)
- 4) European Chemicals Agency. <https://echa.europa.eu/brief-profile/-/briefprofile/100.028.326>
- 5) 環境省：<https://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun.html>
- 6) Yu Qiu et al：The Detrimental Effect of High Salinity on the Growth and Microcystins Contamination of *Microcystis aeruginosa*. *Water*, 14(18), 2871 (2022)
- 7) OECD：Fresh Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, Guidelines for the Testing of Chemicals NO.201 (2006)
- 8) 保月勇志：福井県の湖沼における有機物の新たな指標による評価による評価と浄化に関する研究(第1報). 福井県衛生環境研究センター所報, 17 (2019)
- 9) Andreeva, A., et al.: Influence of Carbohydrate Additives on the Growth Rate of Microalgae Biomass with an Increased Carbohydrate Content. *Marine Drugs*, 19(7), 381 (2021).
- 10) Sanudo-Wilhelmy, Sergio A., et al.: The Role of B Vitamins in Marine Biogeochemistry. *Annual Review of Marine Science*, 8, 25-51 (2016).
- 11) 保月勇志：福井県の湖沼における有機物の新たな指標による評価による評価と浄化に関する研究(第2報). 福井県衛生環境研究センター所報, 18 (2020)

2023/24 シーズンの福井県のインフルエンザ

坂井伸成・高橋美帆・大久保香澄・小和田和誠

Epidemiological Studies of Influenza in Fukui Prefecture in 2023/24 Season

Nobushige SAKAI, Miho TAKAHASHI, Kasumi OKUBO, Kazuaki KOWADA

1. はじめに

インフルエンザとは、インフルエンザウイルスを病原とする感染症で、インフルエンザウイルスにはA、B、C、Dの4つの型がある。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おり^{1,2)}、社会生活に与える影響は大きい。

当センターでは、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、2023/24 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

2023年9月（第36週）～2024年8月（第35週）までの期間を対象とした。

2. 2 患者発生状況調査

インフルエンザ様疾患発生報告数については、県内の定点医療機関（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。

インフルエンザ様疾患の集団発生については、厚生労働省の公表資料³⁾に基づき、集計を行った。

2. 3 検査材料

県内4医療機関でインフルエンザ様疾患患者から採取された50検体（49名）を用いた。その内訳は、鼻汁27検体、咽頭拭い液16検体、鼻腔洗浄液5検体、その他2検体であった。

2. 4 ウイルス分離および同定

県のインフルエンザ流行期（1.0人/定点以上）に採取された42検体について、ウイルス分離を実施した。

ウイルス分離はMDCK細胞を用い、既報⁴⁾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%モル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/Victoria/4897/2022（H1N1）pdm09、A/Darwin/9/2021（H3N2）、B/Phuket/3073/2013（山形系統）、B/Austria/1359417/2021（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. 5 ウイルス遺伝子検索

十分なHA価が得られず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法により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4版）」⁵⁾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AH1pdm09、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StepOnePlus Real-Time PCR System（Applied Biosystems）を使用した。

2. 6 薬剤耐性株サーベイランス

AH1pdm09分離株について、国立感染症研究所の「インフルエンザ診断マニュアル」に準じ、Allele-specific 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。

MDCK細胞の培養上清を材料とし、QuantiTect Virus Kit（QIAGEN）を用いてAllele-specific RT-PCRを行い、機器はStepOnePlus Real-Time PCR System（Applied Biosystems）を使用した。

3. 結果および考察

3. 1 患者発生状況

3. 1. 1 インフルエンザ様疾患患者発生報告

感染症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1（福井県：2023年第36週～2024年第35週）および図2（全国と福井県：2023年第36週～2024年第35週）に示した。

定点あたりの患者報告数は、2023年第36週に1.41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。第46週には11.54人/定点となり、流行発生注意報の開始基準値（10.0人/定点）を超え、インフルエンザ注意報が発令された。第49週には今シーズンのピーク（30.69人/定点）となり、流行発生警報の開始基準値（30.0人/定点）を超え、インフルエンザ警報が発令された。2024年第14週に終息基準値（10.0人/定点）を下回り警報は解除され、第18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。また、患者報告数は、全国と同様に推移した。今シーズンは、流行期間が長期にわたり、ピークも二峰性を示すなど、過去5シーズンで最も流行が大きい。

いものとなった。新型コロナウイルス感染症の5類移行後初のシーズンであり、感染対策意識が変化したことなどが影響したと考えられる。

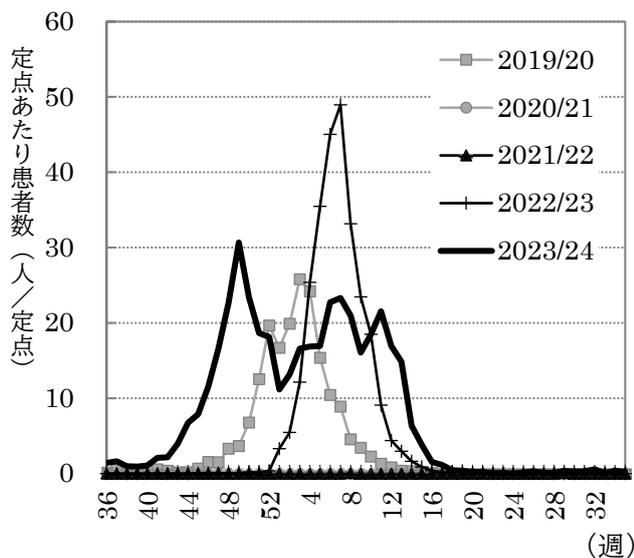


図1 インフルエンザ様疾患の患者報告数 (シーズン別)

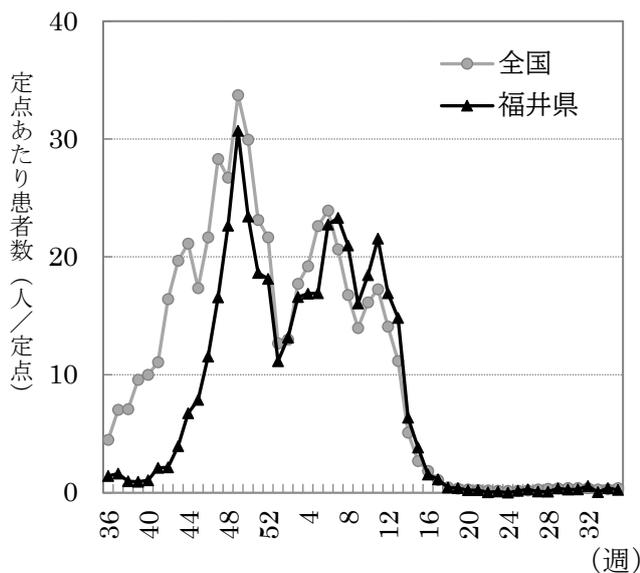


図2 インフルエンザ様疾患の患者報告数 (全国と福井県)

今シーズンの累積患者数は16,257人であった。年齢階層別の患者報告数および割合を図3に示した。年齢階層別では、5～9歳(6,305人、38.8%)で患者数が最も多く、次いで10～14歳(4,350人、26.8%)、0～4歳(2,942人、18.1%)の順で、14歳以下が報告数の83.7%を占めた。

昨シーズン^⑥と比較すると、10～14歳の報告割合が増加し、0～4歳の報告割合が減少したが、14歳以下の報告割合はほぼ変わらなかった。

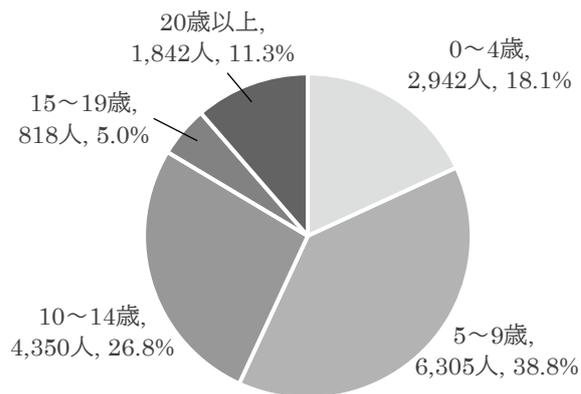


図3 年齢階層別患者報告数および割合

3. 1. 2 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4(施設数および患者数)に示した。今シーズンの初発は2023年第36週、施設数および患者数のピークは2023年第49週(48件、889人)であった。集団発生施設総数は521件、総患者数7,995人、総欠席者数6,734人であった。昨シーズン^⑥と比較すると、施設数は約1.5倍、患者数は約3倍多く、初発は18週早かった。

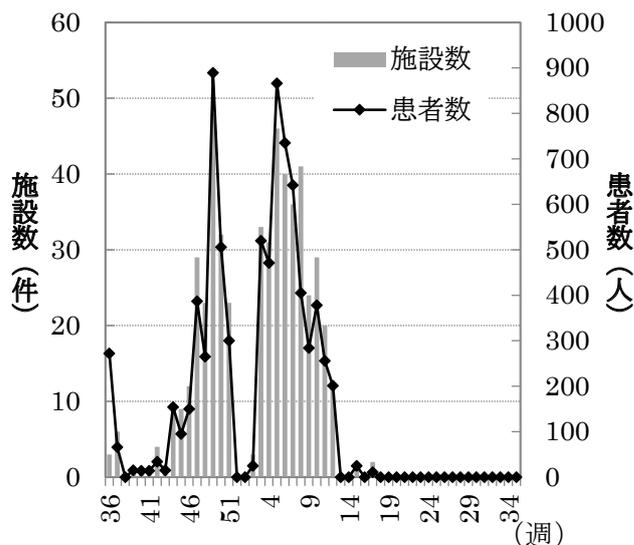


図4 インフルエンザ様疾患集団発生の状況 (施設数および患者数)

3. 2 病原体検出および性状把握

3. 2. 1 ウイルス分離および同定

供試検体42検体から31株(74%)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、すべてHA価が8以上となり、HI試験を実施した。

HI試験により31株中17株はAH1pdm09、4株はAH3、10株はB(Vic)と同定された。

3. 2. 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。

AH1pdm09は、ワクチン株であるA/Victoria/4897/2022のホモ価640に対し、分離株のHI価は320(5株)、64

0 (10 株)、1280 (2 株) であった。全てホモ価の 4 倍以内でありワクチン株と抗原性が類似していた。

AH3 は、ワクチン株である A/Darwin/9/2021 のホモ価 1280 に対し、分離株の HI 価は 640 (2 株)、1280 (2 株) であった。全てホモ価の 4 倍以内でありワクチン株と抗原性が類似していた。

B (Vic) は、ワクチン株である B/Austria/1359417/2021 のホモ価 320 に対し、分離株の HI 価は 640 (2 株)、1280 (7 株)、2560 (1 株) であった。90%がホモ価の 4 倍以内でありワクチン株と抗原性が類似していた。

3. 2. 3 ウイルス遺伝子検査

分離陰性および非流行期の検体であった 19 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、AH1pdm09 が 3 検体、AH3 が 2 検体、B (Vic) が 1 検体および陰性が 13 検体であった。

表 1 分離ウイルスの抗原性状

AH1pdm09				
HI価				分離数
A/Victoria /4897/2022	A/Darwin /9/2021	B/Phuket /3073/2013	B/Austria /1359417/2021	
320	<10	<10	<10	5
640	<10	<10	<10	10
1280	<10	<10	<10	2
計				17

AH3				
HI価				分離数
A/Victoria /4897/2022	A/Darwin /9/2021	B/Phuket /3073/2013	B/Austria /1359417/2021	
<10	640	<10	<10	2
<10	1280	<10	<10	2
計				4

B (Vic)				
HI価				分離数
A/Victoria /4897/2022	A/Darwin /9/2021	B/Phuket /3073/2013	B/Austria /1359417/2021	
<10	<10	<10	640	2
<10	<10	<10	1280	7
<10	<10	<10	2560	1
計				10

ホモ価			
640	1280	160	320

3. 2. 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 5 に示した。今シーズンは AH1pdm09 が 20 件 (40.0%)、AH3 が 7 件 (14.0%) および B (Vic) が 11 件 (22.0%) 検出された。B (山形) は検出されなかった。

AH1pdm09 は 2023 年第 40 週から 2024 年第 26 週に採取された検体から検出された。AH3 は 2023 年第 38 週から 2024 年第 12 週に採取された検体から検出された。B (Vic) は 2024 年第 7 から 16 週に採取された検体から検出された。検出状況から、流行したウイルスは A 型 (H1pdm09、H3) から B 型 (Vic) へ変遷した。これが患者報告数において二峰性のピークとなった要因の 1 つと考えられる。

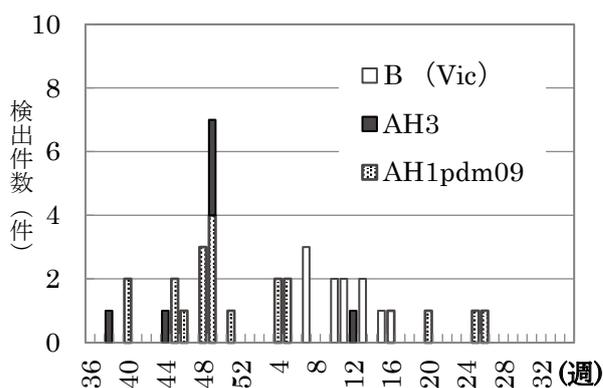


図 5 検体採取週別検出状況

3. 2. 5 薬剤耐性株サーベイランス

今シーズンに分離された AH1pdm09 17 株について、H275Y 耐性マーカーの検査を実施したが、耐性株は検出されなかった。

4. まとめ

今シーズンは、新型コロナウイルス感染症が 5 類感染症になり初めてのインフルエンザのシーズンであった。過去 5 シーズンで最も流行が大きいものとなったのは、感染対策の緩和や流行したウイルスの変遷が要因として考えられる。

年齢階層別患者報告数では、昨シーズン同様に 14 歳以下の報告に占める割合が高かった。

インフルエンザウイルスの検出状況では、AH1pdm09 がシーズンを通して検出された。分離したウイルスの抗原性は、ワクチン株と類似していた。

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) 杉田繁夫: インフルエンザのウイルス学的特徴, 臨床と微生物, **44**, 3-12(2017)
- 3) 厚生労働省: インフルエンザに関する報道発表資料 2023/2024シーズン, 厚生労働省ホームページ, https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/kekaku-kansenshou01/houdou_00014.html
- 4) 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)
- 5) 国立感染症研究所: インフルエンザ診断マニュアル (第4版) (2018)
- 6) 小和田和誠 他: 2022/23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, **22** 64-66(2024)