

研究成果報告書(1)

研究課題名	ノロウイルス検出感度向上に関する研究
担 当	保健科学部 主査専門研究員 佐藤 直人
<p>1 目的</p> <p>ノロウイルス (NoV) は、食中毒患者数の 50%以上を占める食中毒対策上重要な病因物質である。NoV に汚染された食品を特定することは、感染経路の究明や再発防止を図る上で重要であるが、食品中に含まれる NoV 量は低レベルの場合が多く、食品から NoV が検出されない事例が多い。このため、より高感度な食品からの NoV 検出法の開発が望まれている。</p> <p>今般、食品中の NoV 検出に、磁気ビーズを用いた濃縮工程を追加することにより、NoV 検出感度の向上が図れないか検討した。</p>	
<p>2 方法</p> <p>NoV RNA: 2014年に県内で発生したNoVによる感染性胃腸炎の集団発生事例の患者の糞便から RNA を抽出し、TE Buffer (pH8.0)で段階希釈し、RNA 濃度を調整した。</p> <p>NoV RNA 捕集用プローブ: NoV GI および GII 用プローブは、通知法(厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: ノロウイルスの検出法について、平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号、2007)に基づき設計した。各プローブは TE Buffer (pH8.0)で希釈し、濃度を調整した。</p> <p>磁気ビーズ: 市販の磁気ビーズを用い、メーカーの推奨するプロトコールに従い、試験に供した。</p> <p>反応条件の検討: 磁気ビーズにプローブを加え、おだやかに攪拌しながらインキュベートし、プローブを磁気ビーズ上に固定した。プローブを固定した磁気ビーズに、NoV RNA を加え、15 分間から一晩、室温でインキュベートした後、PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)(TaKaRa)により逆転写反応を行い、cDNA を作成した。得られた cDNA を用い、上記の通知法に準拠し、リアルタイム PCR 法により定量試験を行った。定量値から回収率を算出し、最適な反応条件を検討した。</p>	
<p>3 結果</p> <p>当初、磁気ビーズへの RNA の非特異的な結合が認められたため、その改善策として反応溶液の pH 及び塩濃度について検討した結果、概ね良好な回収率が得られる条件を決定することが出来た。現在は、回収率をさらに向上させるためインキュベーションの温度、時間等について検討を続けている。</p>	
<p>4 今後の研究方向等</p> <p>上記の予備試験で得られた条件により、実際の食品サンプルを用いて NoV の添加回収実験を行うとともに、従来の方法で陰性であった食品サンプルについて本法により NoV の濃縮を行い、本法の有用性について検討する予定である。</p>	

研究成果報告書(2)

研究課題名	腸管出血性大腸菌 (EHEC) による健康被害発生時における疫学的解析手法の検討に関する研究
担 当	保健科学部 主査専門研究員 高橋 雅輝
<p>1 目的</p> <p>(1) 平成 25 年度に分離された EHEC 026 の MLVA システムによる遺伝子型別及びクラスター解析</p> <p>(2) 血清群 O103 に対する MLVA 法の検討</p> <p>2 材料及び方法</p> <p>(1) 22 株の EHEC 026 分離株について、Izumiya¹⁾のローカスのうち 7 ローカスを標的として、当所において確立した one tube PCR による MLVA システムにより型別を行った。</p> <p>(2) 2007 年から 2013 年に分離された EHEC 0103 19 株について、26 ローカス (EHC-1、EHC-2、EHC-5、0157-9、EHC-6、0157-37N、EH26-7 : Izumiya¹⁾、K10、K3、K9、K34、K17、K19、K25、K36、K37 : Keys²⁾、CVN001、CVN002、CVN003、CVN004、CVN007、CVN014、CVN015 : Lindstedt³⁾、CCR001、CVN016、CVN017 : Løbersli⁴⁾) の型別能を精査した。各ローカスの多型性 (Diversity) 評価には polymorphism index [$1 - \Sigma$ (アリル出現頻度)^{2]} を用いた。</p> <p>3 結果及び考察</p> <p>(1) EHEC 026 の MLVA 型に基づく樹形図を示した (図 1)。供試した 22 株うち、散発事例由来 9 株が 8 種類の MLVA 型に型別された。集団発生 5 事例由来株 (家族内発生 3 事例、保育園発生 1 事例、イベント関連 1 事例) はそれぞれ異なる 5 つの MLVA 型を示した。散発事例由来の MLVA 型と集団発生事例由来の MLVA 型で一致するものはなかった。2009 年に MLVA 型によるクラスター解析を開始して以来、4 つのクラスターに分類される傾向は現在も続いており、それぞれのクローンを由来とする多様な株が県内に広がっていると考えられる。</p> <p>(2) EHEC 0103 18 株について 26 ローカスを比較したところ、10 ローカス (CVN001、CVN002、CVN003、CVN004、CVN007、CVN014、CVN015、CCR001、CVN016、CVN017) の組み合わせが最も高い型別能を示した。各ローカスにおける polymorphism index は 0.100~0.837 となり、全体では 0.469 (95%信頼区間 : 0.151) であった (図 2)。クラスター解析では散発事例由来 14 株は 13 種類の MLVA 型に、二つの家族内発生由来株はそれぞれ同じ MLVA 型に分類され、これらは PFGE と同等の結果であった (PFGE データ示さず)。Lindstedt³⁾ の 7 ローカスは血清群を問わず汎用性の高いローカスとして提唱されているが、県内で分離された 026 の型別には不向きであった⁵⁾。しかしながら、EHEC 0103 に対しては多型性を示し、さらに Løbersli⁴⁾ の 3 ローカスを加えることによって MLVA 型別が可能であることが示唆された。</p> <p>4 今後の研究方向等</p> <p>MLVA 型別は、PFGE 型別に比較して簡便で、短時間で結果が得られることから、集団発生時のスクリーニングとして有用性が高い。EHEC 026 の MLVA 型別はルーチン検査として継続するが、遺伝子変異によって 7 ローカスでは型別できない株が出現する可能性もあるため、新たな標的ローカスの追加も視野にいれながら実施することとする。</p> <p>主要血清群 O157、026 及び O111 の MLVA 型別は Izumiya¹⁾ が報告しているが、それ以外の血清群に対する MLVA 型別法は国内では報告されていない。今回、O103 に対して MLVA 型別が可能と思われる 10 ローカスが見出された。しかし、解析株数が十分ではないため、今後も株の収集を継続し、定期的にローカスの多型性を検証することとする。</p>	

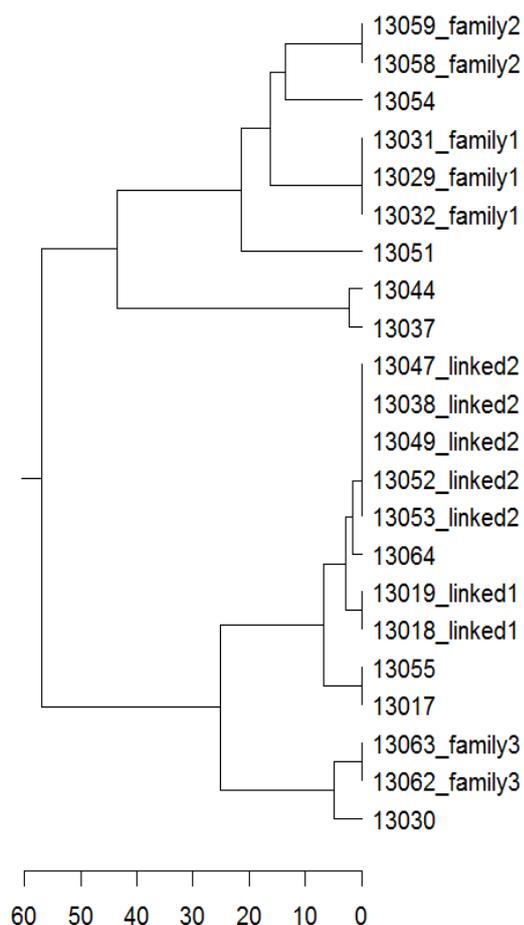


図1. EHEC O26 の MLVA 型に基づく系統解析

family 1, 2, 3: 家族内発生
 linked 1: 保育園での集団発生
 linked 2: イベントでの集団発生

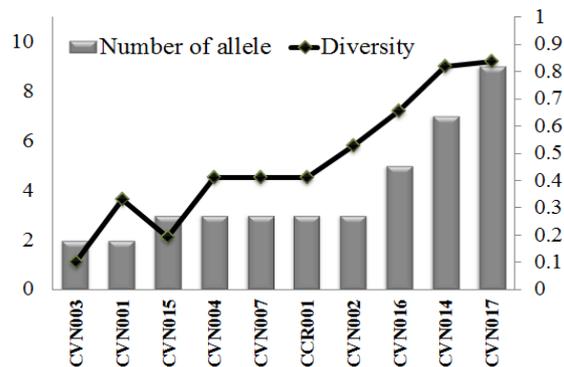


図2. EHEC O103 のローカス別多型性の評価

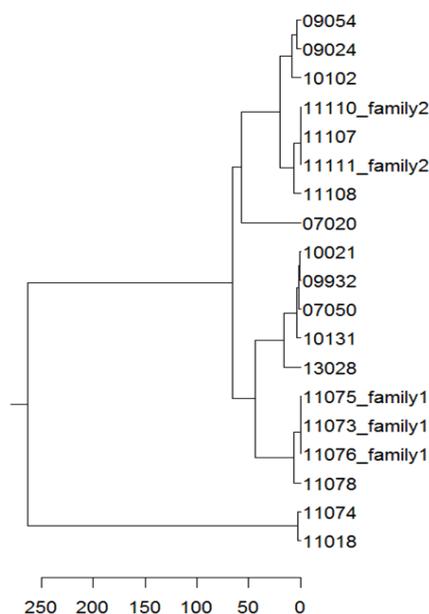


図3. EHEC O103 の MLVA 型に基づく系統解析

- 1) Hidemasa Izumiya (2010) New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups—O157, O26, and O111. *Microbiol Immunol* 54:569–577
- 2) C. Keys (2005) Highly diverse variable number tandem repeat loci in the *E. coli* O157:H7 and O55:H7 genomes for high-resolution molecular typing. *J Appl Microbiol* 98:928–940
- 3) Bjørn-Arne Lindstedt (2007) Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates for use in a genotyping assay. *J Microbiol Methods* 69:197–205
- 4) Løbersli, I (2012) Rapid and high resolution genotyping of all *Escherichia coli* serotypes using 10 genomic repeat-containing loci. *J Microbiol Methods* 88(1):134–9
- 5) 高橋雅輝 (2011) 腸管出血性大腸菌による健康被害発生時における疫学的解析手法の検討に関する研究. 岩手県環境保健研究センター年報第10号 (平成22年度版) 研究成果報告書 (2) ;
http://www.pref.iwate.jp/dbps_data/_material/_files/000/000/031/595/06hokoku10.pdf

研究成果報告書(3)

研究課題名	病原微生物の分子疫学指標のデータベース化に関する研究
担 当	保健科学部 上席専門研究員 岩淵 香織

1 目的

結核菌の VNTR 法による DNA 解析結果のデータベースを構築し、感染源や感染ルートの解明に役立てること、サルモネラの広域散発的食中毒事例の検討、臨床で分離の少ないレジオネラの性状解析を目的に、これら3つの病原体について、県内の臨床検査機関と協力して菌株の収集を行い、解析を実施した。

2 方法

(1) サルモネラは4か所の臨床検査機関から、平成25年から平成26年1月までに散発の胃腸炎患者より分離された64株を収集し、血清型別および PFGE 法による解析を行った。PFGE は、*Salmonella* Typhimurium、O4:i-、*S. Infantis*、*S. Rissen* および *S. Schwarzengrund* の5血清型について、制限酵素 *Bln* I、CHEFIII (Bio-Rad) 電圧6V/cm、スイッチングタイム2.2~63.8秒で19時間泳動を行い、泳動像の比較を行った。また、平成24年の散発事例株や当センターで検出された食品由来株なども泳動像を比較した。

(2) レジオネラは、臨床検査機関で分離された1株と当センターで分離した2株の血清型別試験を実施した。

(3) 結核菌は、平成24年2月から平成25年12月までに、10ヶ所の医療機関から収集した116株のうち重複の患者株を除く112株について、JATA(15)-VNTR法およびHV-VNTR法による解析を実施した。

3 結果

(1) 収集されたサルモネラ64株の血清型は、52株は18の血清型に分類されたが、12株は型別不能でO4:i-であった。血清型は、多い順に、*S. Typhimurium* 19株、O4:i- 12株、*S. Infantis* 6株、*S. Rissen* 5株、*S. Schwarzengrund* 3株であった。PFGE法による解析では、人由来株間で同時期に同じPFGEパターンを示すクラスターがみられた。*(S. Typhimurium)*:平成26年1月~2月、盛岡市周辺の12株、O4:i-:平成24年4月~平成25年9月、盛岡市周辺・花巻市・奥州市・大船渡市の15株(図1)。O4:i-:平成25年7月下旬、盛岡市周辺の3株(図1)等)。また、同じ年に検出された人由来株と食品由来株のPFGEパターンに一致もしくは類似する株があった(*S. Typhimurium*、*S. Infantis*)。

(2) レジオネラ3株は、全て *Legionella pneumophila* 血清群1であった。(表1)

(3) 結核菌は、112株のうちJATA(15)-VNTR法によるアリルプロファイルが一致した事例は5例あった。さらに、3つの多形性に富んだ超可変領域を解析するローカス(HV)を追加して比較した。事例2について1カ所のHVが違っている以外は一致しており、共通の感染源・感染ルートが疑われた。事例1~3は施設や病院での感染事例、事例4、5は家族内感染事例である。(表2)

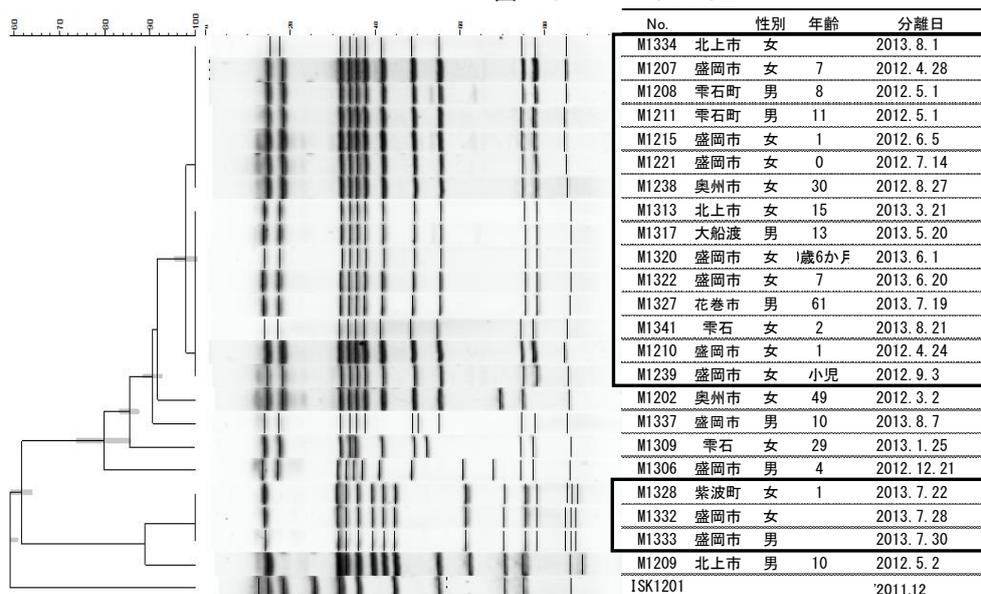
4 今後の研究方向

(1) サルモネラについては平成18年から調査を行っており、散発事例にもかかわらずPFGEパターンが一致し食中毒の広域散発発生の可能性があることを明らかにしてきた。引き続き臨床検査機関と連携し、監視をしていくことが重要と考えられた。また、平成24年から多く検出されているO4:i-は *S. Typhimurium* の単相変異株と考えられており、MLVA法による遺伝子解析も実施したい。

(2) レジオネラの分離培養する機関を増やす等、臨床検査機関の育成を図る。

(3) 結核菌のVNTR法は有用な疫学指標と考えられており、今回の解析結果では、疫学データがないので、判明していた過去の事例を確認した結果となった。迅速に検査を行い、データベースを活用し感染源の究明を行っていく予定である。また検査法が煩雑であるため、検査法の検討を行う予定である。

図1 O4:i:- の PFGE



No.	性別	年齢	分離日
M1334	北上市	女	2013. 8. 1
M1207	盛岡市	女 7	2012. 4. 28
M1208	雫石町	男 8	2012. 5. 1
M1211	雫石町	男 11	2012. 5. 1
M1215	盛岡市	女 1	2012. 6. 5
M1221	盛岡市	女 0	2012. 7. 14
M1238	奥州市	女 30	2012. 8. 27
M1313	北上市	女 15	2013. 3. 21
M1317	大船渡	男 13	2013. 5. 20
M1320	盛岡市	女 1歳6か月	2013. 6. 1
M1322	盛岡市	女 7	2013. 6. 20
M1327	花巻市	男 61	2013. 7. 19
M1341	雫石	女 2	2013. 8. 21
M1210	盛岡市	女 1	2012. 4. 24
M1239	盛岡市	女 小児	2012. 9. 3
M1202	奥州市	女 49	2012. 3. 2
M1337	盛岡市	男 10	2013. 8. 7
M1309	雫石	女 29	2013. 1. 25
M1306	盛岡市	男 4	2012. 12. 21
M1328	紫波町	女 1	2013. 7. 22
M1332	盛岡市	女	2013. 7. 28
M1333	盛岡市	男	2013. 7. 30
M1209	北上市	男 10	2012. 5. 2
ISK1201			2011.12

平成24年4月～

平成25年9月

盛岡市周辺・花巻市・

北上市・奥州市

大船渡市

平成25年7月

盛岡市周辺

表1 臨床検体から分離されたレジオネラ一覧(岩手県 平成18～25年)

	平成18年	平成19年	平成20年	平成21年	平成22年	平成23年	平成24年	平成25年	total
<i>L.pneumophila</i> SG1	1		3	2	2	5	2	3	18
<i>L.pneumophila</i> SG2		1			1				2
<i>L.pneumophila</i> SG6						1			1
<i>L.pneumophila</i> SG9						1			1
<i>L.pneumophila</i> SG15				1					1
<i>L.pneumophila</i> UT						1			1
菌株数(患者数)	1		4	2	4	8(6名)	2	3	24
報告数名	7	4	17	12	11	14	6	15	86

表2 JATA(15)-VNTR で一致した事例

事例 No.	届出保健所	ID	JATA No.													HV				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	3232	3820	4120
			0424	MIRU 10	1955	2074	2163b	2372	MIRU 26	3155 (QU B)	MIRU 31	3336	4052 (QU B26)	4156	1982 (QUB 18)	2163a	ETR-A			
1	奥州	201220879	4	3	3	4	3	2	7	4	5	7	8	4	14	8	4	8	9	10
	盛岡市	201128254	4	3	3	4	3	2	7	4	5	7	8	4	14	8	4	8	9	10
	盛岡市	201141796	4	3	3	4	3	2	7	4	5	7	8	4	14	8	4	8	9	10
	盛岡市	201030164	4	3	3	4	3	2	7	4	5	7	8	4	14	8	4	8	9	10
2	宮古	201128299	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	7	5	10	9	4	16	22	12
	宮古	201141547	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	7	5	10	9	4	16	22	12
	宮古	201145040	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	7	5	10	9	4	16	22	12
3	釜石	201221840	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	7	5	10	9	4	16	14	12
	釜石	201234514	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	4	4	11	12	5
	釜石	201224807	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	4	4	11	12	5
	釜石	201216138	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	4	4	11	12	5
	釜石	201204085	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	4	4	11	12	5
	釜石	201235617	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	4	4	11	12	5
	釜石	201224723	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	4	4	11	12	5
	釜石	201239734	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	4	4	11	12	5
	中部	201212445	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	4	4	11	12	5
4	二戸	201386744	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	10	4	4	11	12	5
	一関	201205274	4	3	3	3	7	3	3	4	5	7	8	5	10	8	4	13	>20	>20
5	一関	201200834	4	3	3	3	7	3	3	4	5	7	8	5	10	8	4	13	>20	>20
	宮古	201241426	4	3	3	3	3	2	7	3	5	8	8	4	10	8	4	13	15	13/16
	宮古	201363955	4	3	3	3	3	2	7	3	5	8	8	4	10	8	4	13	15	13

研究成果報告書(4)

研究課題名	マダニ媒介性感染症に関する基礎研究
担 当	保健科学部 上席専門研究員 梶田 弘子
<p>1 目的</p> <p>マダニ媒介性感染症は、体内にウイルス、細菌であるリケッチア、ボレリアなどの病原体を保有するマダニの刺咬によって媒介される感染症で、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）、日本紅斑熱、ライム病や回帰熱などがあり、いずれも感染症法で定められた全数把握の4類感染症あり、本県における浸潤状況の把握が急がれる感染症の一つである。そこで、感染の潜在的リスクを把握することを目的に、マダニについて生息調査とPCR法による病原体遺伝子保有調査を実施した。</p> <p>2 方法</p> <p>(1)調査は平成25年6～12月にかけて実施した。遺伝子検査を実施した検体は、県内数ヵ所において旗振り法により採集した植生上のマダニ55検体、犬・猫に付着したマダニ58検体、野生動物に付着したマダニ27検体、ヒトに付着したマダニ2検体の計142検体で、実体顕微鏡で種を同定後、QIAamp DNA Mini Kitを用いてDNA抽出を行った。病原体保有調査は日本紅斑熱リケッチア（R.j）、ライム病および回帰熱ボレリア遺伝子検出をリアルタイムPCR法で行った。さらに、植生マダニ73検体を国立感染症研究所が実施するSFTSウイルス国内分布調査に提供した。</p> <p>(2)R.j、ライム病および回帰熱群ボレリア遺伝子の検出はリアルタイムPCR法で行った。標的遺伝子の増幅が確認された検体は紅斑熱群リケッチア遺伝子（R1-R2）、Rj遺伝子（R5-R10）、ボレリア遺伝子（flaB）を標的としたconventional PCR法を行い、陽性検体について遺伝子塩基配列の解析を行った。</p> <p>3 結果および考察</p> <p>(1)生息調査の結果、2属8種のマダニが確認された。旗振り法ではオオトゲチマダニが最も多く採集され、とくに五葉山周辺に多数生息していた。ヤマトマダニ、フタトゲチマダニは地域的な偏りはなく採集された。犬・猫に付着したマダニについては、動物病院から185検体の提供があり、フタトゲチマダニなどのチマダニ属が多く、6～7月は成ダニ、8月以降は幼・若ダニが主に付着していた（図1）。野生動物では、捕獲された場所によって付着マダニに違いがあった。</p> <p>(2)Rj遺伝子を保有するマダニは確認されなかったが、ヤマトマダニ5検体（13.5%）からライム病群ボレリアの<i>B.japonica</i>遺伝子が検出された（表1、表2）。</p> <p>(3)シュルツェマダニはライム病および回帰熱ボレリアを媒介することがわかっているが、今回の調査ではシュルツェマダニからボレリア遺伝子は検出されなかった。</p> <p>(4)犬に付着したフタトゲチマダニから回帰熱ボレリアの <i>B.miyamotoi</i> 遺伝子が検出された（表1、表2）。このマダニは吸血しており、マダニがボレリアを保有していたものか、あるいは、犬が感染していたものかは不明で、今後、より詳細な調査が必要である。</p> <p>(5)国立感染症研究所の SFTS ウイルス国内分布調査の結果、本県において SFTSV 遺伝子保有マダニが生息することが明らかとなった。</p> <p>4 今後の研究方向等</p> <p>(1)植生マダニ、動物付着マダニの採集および病原体遺伝子検査を継続する。</p> <p>(2)国立感染症研究所より SFTSV 遺伝子検査用のリアルタイム PCR キットが配布されることから、マダニについて SFTSV 遺伝子保有調査を実施する。</p>	

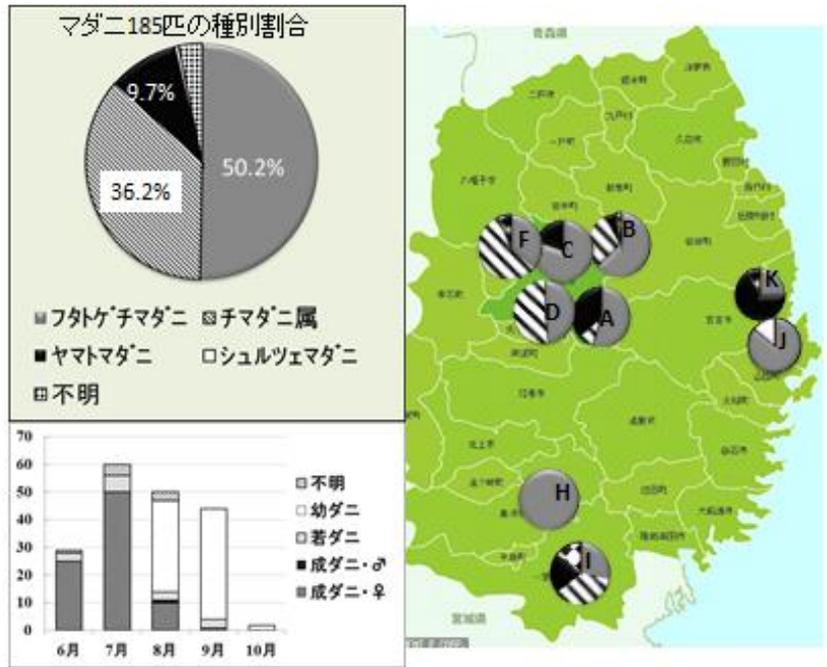


図1 イヌ、ネコから採集されたマダニの種類（動物病院別・発育ステージ別）

表1 マダニの日本紅斑熱リケッチア、ライム病及び回帰熱群ボレリア遺伝子検査結果

	種類	検体数	植生上	犬・猫	野生動物	ヒト
マダニ属	ヤマトマダニ	37	4/18 <i>Borrelia japonica</i>	0/12	1/5 <i>Borrelia japonica</i>	0/2
	シュルツェマダニ	4	0/1	0/2	0/1	
チマダニ属	フタゲチマダニ	55	0/9	1/44 <i>Borrelia miyamotoi</i>	0/2	
	オオトゲチマダニ	21	0/15		0/6	
	ヒゲナガチマダニ	13	0/9		0/4	
	キチマダニ	2	0/2			
	ヤマトチマダニ	9			0/9	
	イスカチマダニ	1	0/1			
	合計	142	4/55	1/58	1/27	0/2

表2 検出されたボレリア遺伝子一覧

検出ボレリア遺伝子	マダニ種	由来	採集された場所
<i>Borrelia japonica</i>	<i>Ixodes ovatus</i>	植生上	盛岡市
<i>Borrelia japonica</i>	<i>Ixodes ovatus</i>	植生上	花巻市
<i>Borrelia japonica</i>	<i>Ixodes ovatus</i>	植生上	花巻市
<i>Borrelia japonica</i>	<i>Ixodes ovatus</i>	植生上	早坂高原
<i>Borrelia japonica</i>	<i>Ixodes ovatus</i>	ニホンカモシカ	岩手町内で保護
<i>Borrelia miyamotoi</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	犬	動物病院より提供

研究成果報告書(5)

研究課題名	ウイルス媒介性節足動物の生息に関する研究
担 当	地球科学部 主査専門研究員 西井 和弘
1 目的 <p>ヒトスジシマカは、デング熱等のウイルス疾患を媒介する感染症対策上重要な節足動物である。近年、その生息北限が北上しており、気温の上昇が影響しているといわれている。岩手県内における同蚊の生息分布状況を明らかにするとともに、年平均気温等の生息条件を検討することにより地球温暖化防止対策に資することを目的とする。</p>	
2 方法 <p>生息北限における蚊類の生息状況調査は平成25年6～10月、岩手県盛岡市、宮古市、二戸市、岩泉町、岩手町、一戸町、滝沢村3市3町1村の58地点で行った。</p> <p>調査対象は主に寺院の花生けや手水鉢、屋外に放置された古タイヤなどの人工容器の貯留水に生息する主にヤブカの幼虫及び蛹で、太口ピペットで採取した。1調査地点につき1～8人工容器を調査した。採取した蚊の幼虫を室温で飼育し、羽化させた成虫を、実体顕微鏡下で形態学的に同定した。</p>	
3 結果 <p>成虫の羽化が確認された58地点287人工容器について、計935頭を同定した。今回採集された蚊の種類はヤマトヤブカ、ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、オオクロヤブカ、キンパラナガハシカ及びイエカ類であった。このうちヤブカ類では、ヤマトヤブカは全採集地点58か所のうち53か所で確認され、捕集数も最も多く、調査地域全域において優先種で在来種であった。次いで多く採取されたのはヒトスジシマカで、盛岡市仙北町、大慈寺町、下ノ橋付近、天昌寺町の6地点で採集された。</p> <p>この結果今回の調査でヒトスジシマカの生息が確認された北限地域は、平成24年度の北限であった下ノ橋付近より北西に位置する天昌寺町(39°42'42"N, 141°07'16"E)であった。平成22年にヒトスジシマカの北限として確認された玉山区及び下ノ橋の北に位置する名須川町においては、平成25年には同蚊の生息は確認できなかった。</p> <p>東北地方の主要幹線道路が貫通し県庁所在地でもある盛岡市では、生息地からのヒトスジシマカの移入も頻繁で、気温の温暖化や、ヒトスジシマカの生態的適応や社会・経済的環境の変化に伴い分布の北上・南下を繰り返しつつ、徐々に北上を続けていると考えられる。ヒトスジシマカの分布は気温の上昇に併せ、岩手県内を北上と南下を繰り返しながら北上しつつある。このように、今後とも生息状況を確認することは、地球温暖化の観点からも重要である。</p>	
4 今後の研究方向等 <p>今回の調査ではヒトスジシマカの生息北限は盛岡市天昌寺町であったが、近年冬場の低温が続いており、同蚊がすでに定着しているかどうか判断するには、次年度も同地点周辺で再度生息を確認する必要がある。さらに、同蚊の県内の生息分布を明らかにするため、沿岸部等より多くの地点で調査を行うことが必要である。今後、地球温暖化などによる気温の上昇に伴い、同蚊の分布域がさらに拡大することが予想され、継続して監視していくことが必要である。</p>	

研究成果報告書(6)

研究課題名	粒径別大気粒子状物質の環境リスク評価と大気環境情報の可視化に関する研究
担 当	地球科学部 主任専門研究員 佐々木 和明 技師 菊池 一馬

1 目的

本研究の目的は、東日本大震災によって発生した大量のがれき処理と保管、移動に伴って発生する大気中粒子状物質による県民の健康への影響の懸念から、県内各所、特に沿岸被災地における大気中粒子状物質の濃度と成分の特定と放射性物質の濃度を測定し、県民に与える影響を情報発信することである。

2 方法・結果

被災地山田町がれき置場周辺、自動車排気ガスの影響を受けると推定される一関市国道沿い及び産業活動の影響が少ない八幡平網張の試料について粒径別 (PM₁₀ 及び PM_{2.5}) に捕集し、捕集フィルターの重量変化から濃度を測定しリスク評価を実施した。

山田町及び一関市測定結果の一部を図1及び2に示す。これらのグラフが示す通り PM₁₀ 及び PM_{2.5} の濃度については、いずれの地区も大きな濃度差はなく米国環境基準及び国内環境基準を下回っており、これにより県内大気環境の安全安心が確認された。PM_{2.5} の成分分析結果としては、山田町及び一関市並びに八幡平市において有機性の炭素及び硫酸イオンが主成分として検出された。山田町がれき置場周辺については、他所より硫酸イオンの割合が大きく、一関市国道沿いについては、自動車排気ガスの影響と推定される無機性炭素が高い値を示した。

また、平成23年度に県内8ヶ所で調査したSPM中の放射性セシウム濃度についても平成23年9月以降は震災以前の水準に低下しており、平成23年度から継続実施している県内被災地12市町村における大気中のアスベスト濃度調査結果(がれき周辺241検体、生活環境236検体、平成26年1月時点)についてもすべて大気中アスベスト敷地境界基準値(10本/L)未満であった。

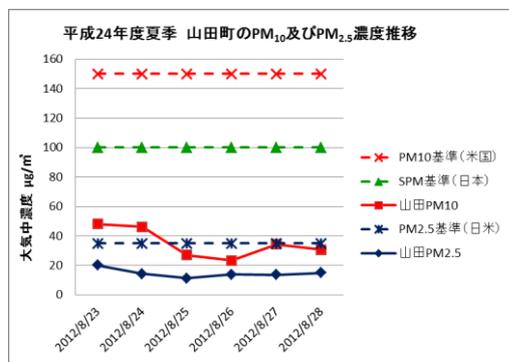


図1 平成24年度山田町のPM₁₀及びPM_{2.5}濃度推移

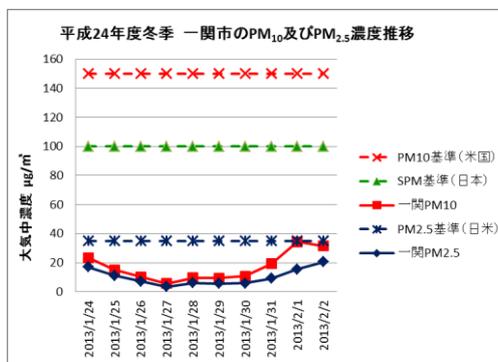


図2 平成24年度一関市のPM₁₀及びPM_{2.5}濃度推移

3 まとめ

被災地におけるPM_{2.5}、PM₁₀、SPM中の放射性セシウム及び大気中アスベストの濃度を調査した結果はいずれも基準値未満の水準であり、これらの調査項目については安全・安心が確認されたと思料された。また、これらの結果については、県ホームページで測定結果の表及びグラフ等で県民に広く情報提供している。

今後の方針としては、本研究の調査対象としたPM_{2.5}について大陸からの影響等県民の関心も高く県環境行政担当課からの強い要請もあることから、その固定発生源や移動発生源の排出状況の把握にかかる成分分析調査を重点的に取り組む予定である。

研究成果報告書(7)

研究課題名	酸性雨による環境影響の総合的評価（広域連携事業）
担 当	地球科学部 主査専門研究員 西井 和弘

1 目的

酸性雨に影響をおよぼす乾性沈着物調査(ガス状酸性化成分)を行い、既存の酸性雨や酸性雪データと併せて解析を行うことにより、本県の降水の酸性化現象による環境影響の総合的評価に資することを目的とする。また、全国環境研協議会によって実施する第5次酸性雨全国調査及び全国環境研北海道・東北支部酸性雨専門部会による調査・研究に参加することにより、本県のみならず、北海道・東北ブロックさらに全国的観点からも酸性雨を取り巻く評価を行うことを目的とする。

2 方法

国設八幡平酸性雨測定所及び環境保健研究センターの2ヶ所でパッシブ法（0法）により毎月1回4成分（NO₂、NO_x、NH₃、O₃）の分析を行った。

3 結果

平成25年度の結果を下に示す。

表1 平成25年度酸性雨パッシブ法測定結果

単位：ppbv

項目	測定場所	最小値	最大値	平均値
NO ₂	盛岡	3.59	11.74	6.70
	八幡平	0.34	0.74	0.51
NO	盛岡	0.18	4.86	1.42
	八幡平	ND	0.46	0.14
NO _x	盛岡	3.78	16.60	8.12
	八幡平	0.34	1.16	0.65
O ₃	盛岡	19.03	43.81	29.11
	八幡平	24.54	60.69	43.41
NH ₃	盛岡	0.80	2.29	1.38
	八幡平	0.12	0.62	0.39

次に、平成20年度～25年度の経年変化を下に示す。盛岡では、NO₂、NO_x、O₃に減少傾向が見られた。八幡平では、NO₂、NO_x、NH₃は1ppbv未満の低濃度で推移しているが、O₃には減少傾向が見られた。

表2 酸性雨測定結果経年変化

	盛岡 (ppbv)					八幡平 (ppbv)				
	NO ₂	NO	NO _x	O ₃	NH ₃	NO ₂	NO	NO _x	O ₃	NH ₃
H20	7.0	2.5	9.8	31.3	0.9	0.5	0.1	0.7	49.0	0.2
H21	7.3	1.7	9.0	32.1	1.4	0.6	ND	0.6	47.0	0.3
H22	8.3	4.6	12.9	33.6	2.5	0.6	0.1	0.7	52.3	0.5
H23	6.7	2.3	8.7	29.1	1.3	0.5	0.3	0.6	43.9	0.2
H24	6.6	1.7	8.3	29.4	1.4	0.5	ND	0.6	46.2	0.2
H25	6.7	1.4	8.1	29.1	1.4	0.5	0.1	0.7	43.4	0.4

図 パッシブ法 濃度経年変化(盛岡)

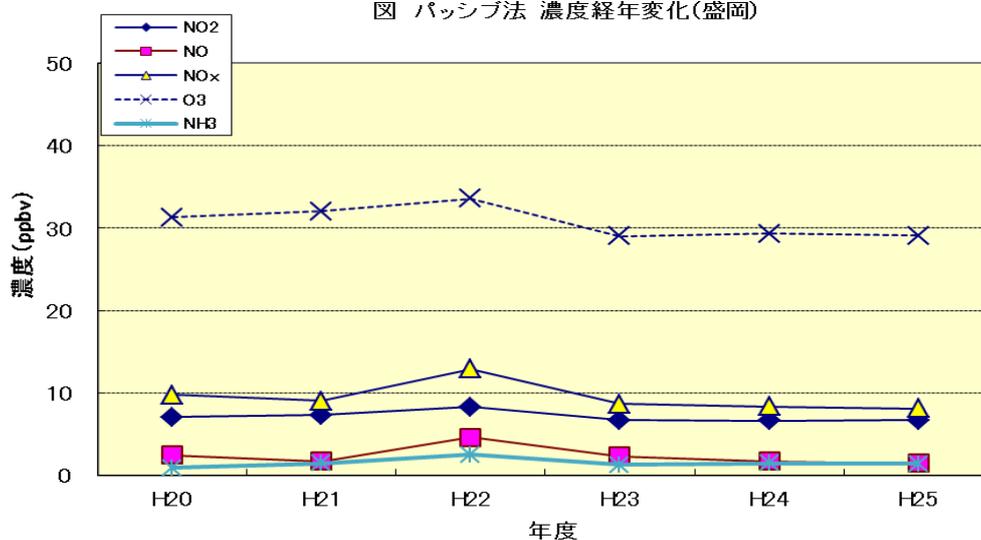
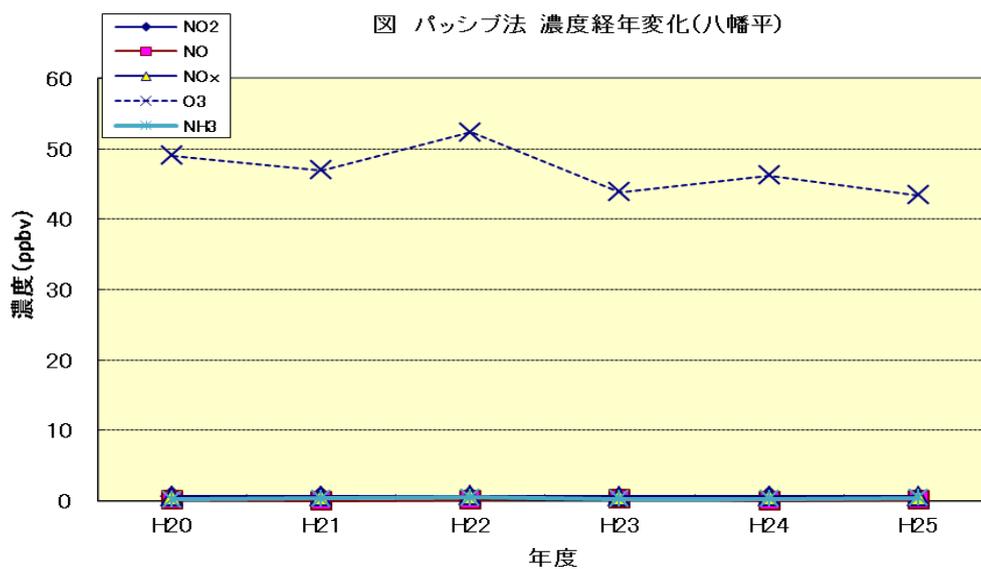


図 パッシブ法 濃度経年変化(八幡平)



4 今後の研究方向等

大気汚染状況の長期的な推移をみるため、乾式沈着成分のモニターは今後とも継続する必要があり、全国環境研協議会が主催する本調査に引き続き参加する。

研究成果報告書(8)

研究課題名	食品中有害化学物質検査の精度管理体制の強化及び検証
担 当	衛生科学部 菅原 隆志、中南 真理子、吉田 敏裕、長澤 敦

1 目的

精度管理等を目的とした食品 GLP (Good Laboratory Practice=業務管理基準) は、当所でも平成 13 年度より導入し、12 年目を迎えている。一定の成果を上げ、信頼性を高めてきたところであるが、管理体制を含め、更なるボトムアップが必要となっている。そこで、今年度は、厚生労働省通知の精度管理ガイドラインに従い、評価対象となる物質に対する当所で実施している試験法の妥当性を評価することを目的とする。

2 方法

評価方法は、H22.12.24 食安発 1224 第 1 号「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」による。試験法は、農薬：「GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物)」、「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」。動物用医薬品：「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 III (畜水産物)」。添加物：着色料「食品衛生検査指針追補 II」、保存料「食品衛生検査指針 食品添加物編 (2003) とした。定量法は、農薬：GC (内部標準法)、LC (絶対検量線法)。動物用医薬品：絶対検量線法。添加物：絶対検量線法で行った。検査人員と日数は、1 人が 5 日間で行った。

3 結果

- 1) 農薬の妥当性評価は、検討した農薬項目数が 210 (GC) 及び 180 (LC) 項目で実施し、検討した食品の種類は、ガイドラインが示す穀類、豆類、野菜及び果実の中から表 1 の 13 種類で実施した。ねぎを除く 12 種類の食品で適合項目数は、101~190 項目 (GC)、100~126 項目 (LC) で、すべての種類で適合する項目数は、99 (GC)、52 (LC) であった。ねぎは適合項目数が少なく、検査実施の種類から削除することとした。
- 2) 動物用医薬品の評価は、検討した動物用医薬品項目数が 127 (LC) 項目で実施し、検討した食品の種類は、ガイドラインに示す牛・豚・鶏、鶏卵及び魚介類の中から表 2 の 6 種類で実施した。適合項目数は、59~75 項目ですべての種類で適合する項目数は、41 (LC) であった。
- 3) 添加物の評価は、検討した添加物項目数が着色料 12 (LC)、保存料 4 (LC) 項目で実施し、検討した食品の種類は着色料が油脂を含む食品、固形食品及びアルコールを含む食品の 3 種類で、保存料が液体食品、固形食品、油脂を含む食品及びしょう油の 4 種類で実施した。適合項目数は着色料で 12 (LC)、保存料で 7 (LC) 項目であった。

4 今後の方針

今後は、行政検査採用項目の検討及び適合項目から選択して内部精度管理等を行いたい。

表1 農薬の妥当性評価結果

種類	実施項目数	適合項目数
玄米	210 (GC)、180 (LC)	167 (GC)、106 (LC)
枝豆	210 (GC)、180 (LC)	189 (GC)、118 (LC)
ほうれん草	210 (GC)、180 (LC)	161 (GC)、123 (LC)
キャベツ	210 (GC)、180 (LC)	190 (GC)、120 (LC)
きゅうり	210 (GC)、180 (LC)	151 (GC)、115 (LC)
トマト	210 (GC)、180 (LC)	148 (GC)、118 (LC)
なす	210 (GC)、	175 (GC)
春菊	180 (LC)	101 (LC)
オレンジ	210 (GC)、180 (LC)	127 (GC)、100 (LC)
りんご	210 (GC)、180 (LC)	152 (GC)、121 (LC)
バナナ	210 (GC)、180 (LC)	155 (GC)、126 (LC)
ぶどう	180 (LC)	122 (LC)
ねぎ	180 (LC)	22 (LC)
総合	210 (GC)、180 (LC)	99 (GC)、52 (LC)

表2 動物用医薬品の妥当性評価結果

種類	実施項目数	適合項目数
さけ	127 (LC)	71 (LC)
こい	127 (LC)	74 (LC)
牛肉	127 (LC)	75 (LC)
豚肉	127 (LC)	73 (LC)
鶏肉	127 (LC)	75 (LC)
卵	127 (LC)	59 (LC)
総合	127 (LC)	41 (LC)

表3 添加物の妥当性評価結果

項目	種類	実施項目数	適合項目数
着色料	ビスケット	12 (LC)	12 (LC)
	大根塩漬	12 (LC)	12 (LC)
保存料	赤ワイン	12 (LC)	12 (LC)
	ワイン	7 (LC)	7 (LC)
	たくあん漬	7 (LC)	7 (LC)
	ウィンナー	7 (LC)	7 (LC)
	しょう油	7 (LC)	7 (LC)

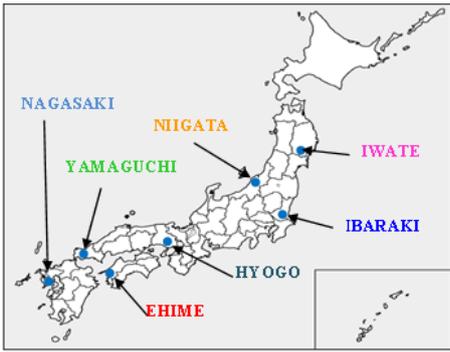
添加濃度

- 1) 農薬：0.1ppm、0.01ppm、トリシ系は、0.05ppm、0.005ppm
- 2) 動物用医薬品：基準値
- 3) 添加物：着色料は2ppm。保存料は、基準値(基準のない食品は、類似食品の基準値。)

研究成果報告書(9)

研究課題名	腸管出血性大腸菌 (EHEC) の検査法に関する研究
担 当	検査部 主任専門研究員 山中 拓哉
<p>1 目的</p> <p>腸管出血性大腸菌感染症は小児や高齢者を中心に重篤な合併症を起こすことがあるため迅速な確定診断が必要とされる。現在、腸管出血性大腸菌の主要な血清型である O157、O26 については選択分離培地等が示された検査法が確立されているが、それ以外の血清型に関しては分離の決め手となる生化学的性状が不明な場合が多く、有効な選択分離培地が確定していない。この点については、菌分離、迅速性、コスト、操作性に大きな影響を及ぼすことから、検査に際しての問題点となっている。このため、本研究では県内で分離された腸管出血性大腸菌のうち O157、O26 以外の血清型の菌株を対象として、種々の培地におけるコロニーの所見や生化学的性状等のデータを詳細に解析しこれを記録・集積する。これを基に当所における腸管出血性大腸菌全般の検査マニュアルの構築の一助とすることを目的とする。</p>	
<p>2 方法</p> <p>(1) 平成 25 年度に検査依頼を受け分離した腸管出血性大腸菌のうち、O157、O26 以外の血清型の菌株について、生化学的性状試験（糖の分解、リジン脱炭酸試験、インドール産生試験等）、運動性の有無、EHT 培地での溶血の有無、多種の選択分離培地上のコロニーの所見、血清型別試験（O 抗原・H 抗原）、V T 型別試験等の解析を行った。</p> <p>(2) 当所にて保存している腸管出血性大腸菌のうち、選択分離培地の無い血清型に属する菌株集団についても（1）と同様の解析を行った。特に本年度は血清型 O121 に着目し、当センターに保存されている同血清型の腸管出血性大腸菌全ての菌株について解析を実施した。</p>	
<p>3 結果</p> <p>(1) 平成 25 年度に依頼を受け分離した菌株のうち研究対象となるもの（O157、O26 以外の血清型）について調査を実施し、データを集積した。</p> <p>(2) 2002～2013 年に県内で分離され当センターに保存されている 25 株の O121 菌株全てについてその性状を詳細に解析した。その結果、解析した全ての O121 菌株がラフィノース非分解性を示した。これより分離培地として CT 加ラフィノース・マッコンキー培地が有効であることがわかった。また、市販の酵素基質培地であるクロモアガー-STEC 培地が有効であることも判明し、分離の際にはこれら 2 種の培地を用いるとよいことが示唆された。また、TSI 寒天培地において大腸菌は通常（A/A）という性状を示すが、今回解析した O121 菌株の多くが非定型的な性状（-/A）を示し、これが他の大腸菌との有効な鑑別法となることが分かった。以上より、腸管出血性大腸菌 O121 の有効な検査法の確立に成功した。</p>	
<p>4 今後の研究方向等</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 依頼菌株、保存菌株の解析ならびにデータの集積を継続して実施する。 ・ O121 以外の血清型の腸管出血性大腸菌についての検査方法を取りまとめる。 ・ 当所における腸管出血性大腸菌の検査マニュアルの作成をめざす 	

研究成果報告書(10)

研究課題名	有機フッ素系化合物に係る日中韓汚染状況比較及び生体影響解明等に関する研究
担 当	環境科学部 主査専門研究員 岩渕 勝己、国際研究推進専門員 齋藤 憲光
<h3>1 目的</h3> <p>PFOS/PFOA は、生物への濃縮性が大きく環境試料に比べて数千倍も濃縮される汚染物質であることから、水生生物の中で上位に位置し、日韓で捕獲できる同種の生物であるメダカを対象に、日韓・標準分析法を用いて有機フッ素化合物の濃縮性を解明することを目的とした。</p>	
<h3>2 方法</h3> <p>○サンプル</p> <p>河川水及び底質（各県一検体ずつ）及びメダカ（全国 198 検体）を、岩手、茨城、新潟、兵庫、山口、愛媛、長崎の 7 県で採取した（Fig.1）。底質は、1 検体あたり 3 回の繰り返し分析を行った。</p> <p>○PFCs 測定</p> <p>【河川水】固相カートリッジ（Oasis WAX）をコンセンレーター（Waters Sep-Pak Concentrator Plus）にセットし、毎分 10 mL の流量で通過させて濃縮し、LC-MS/MS を用いて測定した。</p> <p>【底質・メダカ】炭酸緩衝液に懸濁させたサンプルを t-butyl methyl ether で抽出し、固相カートリッジ（Oasis WAX）で濃縮・精製し、LC-MS/MS を用いて測定した。</p>	
	
<p>Fig.1 サンプル採取地点</p>	
<h3>3 結果</h3> <p>【河川水】Perfluorocarboxylates で 10 ng/L を超えたのは、茨城県の C5、兵庫県の C5 ～ C9、愛媛県の C5 と C7 及び C8 の化合物であった。全国的に C11 ～ C14 はほとんど検出されなかった。Perfluorosulfonates では PFOS の検出率が一番高く、兵庫県が 7.7 ng/L 及び愛媛県が 4.6 ng/L であったが、他は数 ng/L 以下あるいは検出下限値未満であった。メダカが生息する河川水の PFCs 構成割合は、太平洋側（岩手・茨城）では C5、C6 で約 60%を占めて高く、一方、日本海側（新潟）と西日本（兵庫・山口・愛媛・長崎）では、C7、C8 の割合が高いという傾向が見られた。このことから、今後は中国から飛来する PFCs の影響を考慮した調査が必要と考えられた。また、兵庫の C6 の濃度及び割合は他県に比べて高く、国内の主要な汚染源が近傍にあることによる影響と考えられた。</p> <p>【底質】底質では、いずれの PFCs も全国的に検出下限値未満の値が多く見られたが、その中で茨城県が C7 (0.21ppb)・C8 (0.30ppb) と、水の場合とは異なり兵庫県に比べても高い濃度で検出された。全体的に底質から PFCs の検出率が低く、水汚染の影響を確認するまでには至らなかった。</p> <p>【メダカ】メダカからは、河川水から検出されなかった PFUdA (C11) ～ PFTTrDA (C13)が、他の Perfluorocarboxylates に比べて高濃度で検出された。これは、全国のメダカ濃度に見られる傾向であった。なお、Perfluorosulfonates では、PFOS が高濃度で検出された。</p> <p>メダカ中 PFCs の構成割合をみると、検出濃度の高かった兵庫、新潟、茨城、長崎では C11 以上の長鎖の Perfluorocarboxylates の割合が高い傾向が見られた。河川水では PFCs 構成割合に太平洋側と日本海側・西日本との間に差が見られたが、メダカ中 PFCs 構成割合には反映されず、C11 ～ C13 が高濃度で蓄積され、PFCs 構成割合に地域的な偏りの傾向は認められなかった。</p>	

【水とメダカの相関性】水とメダカの相関性については、昨年同様 PFOS 濃度に関して相関が認められた (Fig.2)。メダカ中の PFCs 濃度の相関性については、PFOS 及び PFOA は、PFNA (C9) より長鎖の Perfluorocarboxylates とそれぞれ相関性が認められ、特に、PFUdA (C11)－PFDoA (C12)、PFUdA (C11)－PFTrDA (C13) 及び PFDoA (C12)－PFTrDA (C13) 間には強い相関が見られることが、本年の解析で明らかとなった (Fig.3)。

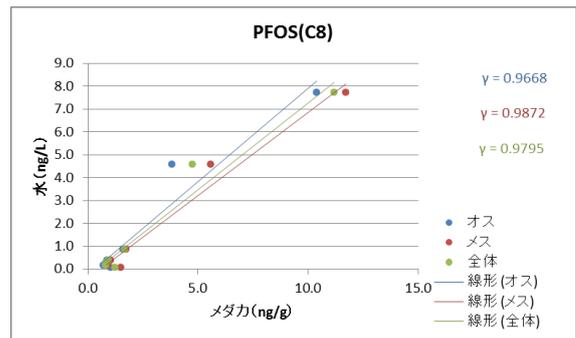


Fig.2 水とメダカの PFOS 濃度の相関

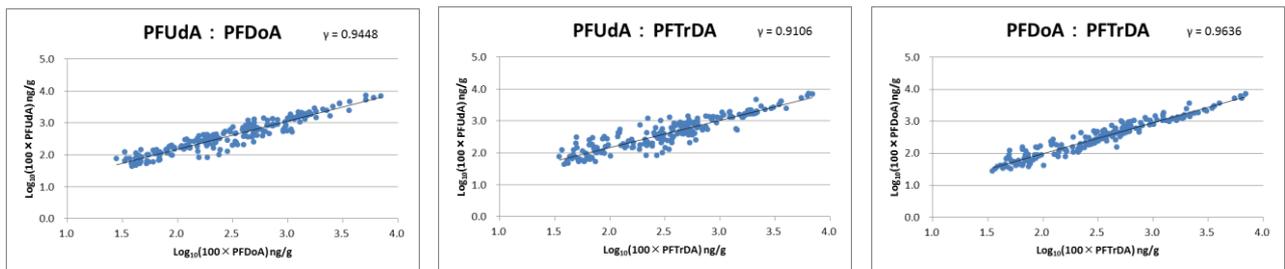


Fig.3 メダカ中 PFCs 間の相関性

【メダカへの濃縮係数】また、水からメダカへの濃縮係数 (メダカ体内濃度 / 水中濃度) は、Perfluorocarboxylates の炭素数の多い化合物ほど濃縮係数が大きくなるという傾向が認められた (Fig.4)。

4 今後の研究方向等

本研究により C11～C13 の長鎖 Perfluorocarboxylates のメダカへの濃縮係数は、これまで報告されてきた PFOS/PFOA と比べても桁違いに大きい結果であった。底質の寄与率を解明するためには、底質の状態やサンプリング方法などを統一しながら更に検討を重ねる必要がある。

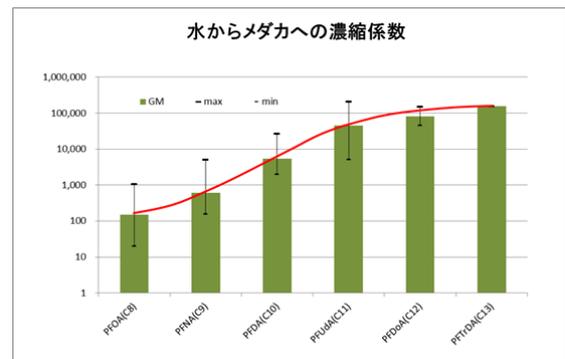


Fig.4 水からメダカへの濃縮係数

研究成果報告書(11)

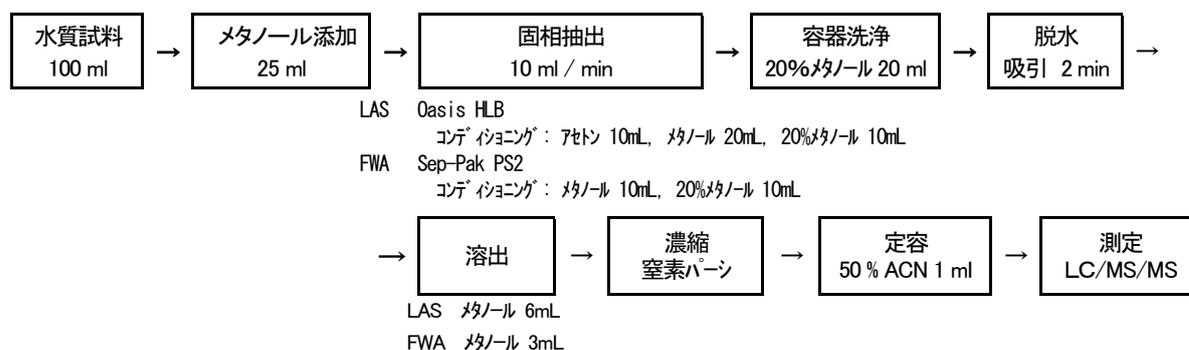
研究課題名	PPCPs (Pharmaceutical and Personal Care Products) 等化学物質実態調査 (岩手県内の河川水中のLAS及び蛍光増白剤の分析)
担 当	環境科学部 安部 隆司、八重樫 香、岩淵 勝己、奈良 裕佳子、小野 正文

1 目的

LASは、淡水域での検出率が高く、公共用水域における濃度の低減を図る必要があることから、平成25年3月から新たに環境基準生活項目として追加され、蛍光増白剤として家庭用洗濯洗剤に配合される代表的な化学物質であるFWA1及びFWA5は、下水処理の除去率が低く、微生物分解性も低いことから、環境への残存が懸念されている。

本調査では、LASと蛍光増白剤についてLC/MS/MSによる分析法について確立し、岩手県の公共用水域水質測定計画に基づいて採水が行われている地点と生活雑排水による汚濁がみられる小河川においてLAS及び蛍光増白剤を分析した概要を報告する。

2 方法



LC/MS/MSの分析条件を表1に示す。本分析ではLAS及び蛍光増白剤をシングルピークかつ短時間で検出するためにC8カラムを用いた。本分析方法における操作検出下限は、LAS(C10~14合算値)が0.2 ng/mL、FWA1とFWA5がそれぞれ0.002、0.003 ng/mLであり、分析した全て化学物質における回収率は90~100%、0.5~100 ng/mLの濃度範囲で検量線の相関係数は0.995以上と良好であった。

表 1. LC/MS/MS 分析条件

HPLC		MS		MRM				
Inst.	: Agilent 1200	Inst.	: Agilent 6460	Compound	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Fragmentor (V)	Collision (eV)
Column	: InertSustainC8(3um,2.1x150mm)	Polarity	: Negative	C8-LAS(ISTD)	269	183	175	36
Mobile phase	: A: CH3CN B: 10mM HCOONH4	Ionization	: ESI(Jet Stream)	C10-LAS	297	183	175	36
	LAS) 0 → 5min A: 80%	Nebulizer	: N2(50psi)	C11-LAS	311	183	175	36
	FWA) 0 → 3min A: 20 → 90%	Drying gas	: N2(300°C, 10mL/min)	C12-LAS	325	183	175	38
	3 → 5min A: 90%	Sheath gas	: N2(300°C, 12mL/min)	C13-LAS	339	183	175	38
	5 → 8min A: 90 → 20%	Capillary	: 3500V	C14-LAS	353	183	200	42
	8 → 12min A: 20%	Nozzle	: 500V	FWA1	879	799(649, 569)	200	65
Flow	: 0.3mL/min			FWA5	517	373(437, 348)	210	51
Oven	: 40°C Injection volume : 2µL							

3 結果

調査では、LASがnd ~ 145.3 ng/mL、FWA1がnd ~ 0.104 ng/mL、FWA5がnd ~ 0.232 ng/mLの濃度で検出された。なお、LASは、類型が当てはめられている地点においては環境基準値(30ng/mL)未満であった。

分析値について、BODの種類ごとにまとめたものを表2に示す。LAS及び蛍光増白剤の濃度の中央値及び最大値はAA<A<C種類の順で高くなる傾向を示した。

表2 BOD種類指定ごとの河川水中LAS及びFWA濃度 (ng/mL)

BOD 種類	BOD 基準値 (mg/L)	LAS (C10~14)		FWA-1		FWA-5	
		地点数	濃度 中央値 (最小値 - 最大値)	地点数	濃度 中央値 (最小値 - 最大値)	地点数	濃度 中央値 (最小値 - 最大値)
AA	1	20	0.5 (<0.2 - 5.7)	5	0.002 (nd - 0.012)	5	0.003 (nd - 0.011)
A	2	52	1.2 (<0.2 - 22.4)	19	0.002 (nd - 0.044)	19	0.008 (nd - 0.080)
C	5	3	12.8 (11.4 - 16.2)	1	0.009	1	0.021
-	-	15	7.5 (<0.2 - 145.3)	10	0.020 (nd - 0.104)	10	0.046 (nd - 0.232)

BODの種類が指定されている地点において、LASの濃度範囲はnd ~ 22.4ng/mLであった。生物A (LAS:30ng/mL) を全ての地点で満たしており、全国の濃度レベルと比較して低い値であった。

一方、BODの種類が指定されていない地点においては、生物Aを超過した地点は15地点中4地点であり、その濃度も高かった。

生活雑排水による汚濁がみられる小河川では、LASは11.1 ~ 77.2ng/mL、FWA1とFWA5合計値は0.020 ~ 0.938ng/mLの濃度範囲であった。この小河川では、下水処理排水が流入する地点(図1)においてLASの濃度が減少し、FWA1及びFWA5の濃度が急激に上昇した。

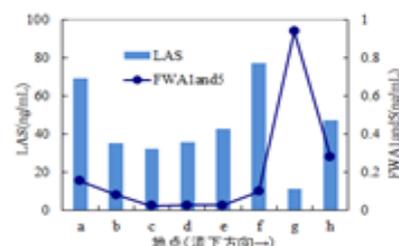


図1. S小河川におけるLAS及びFWA濃度

このことからLASは下水処理における除去率が高く、FWA1及びFWA5は下水処理排水が汚染源となり得ることが示された。

4 結論

岩手県内の河川におけるLAS及び蛍光増白剤をLC/MS/MSにより分析したところ、BODの種類指定されている地点ではLASの濃度は全国と比べて低い値であり、LAS環境基準生物Aを満たしていた。また、下水処理排水の流入する地点では、河川中のLAS濃度が減少し、蛍光増白剤濃度が増加した。

研究成果報告書(12)

研究課題名	LC/MS/MSによるDNAアダクトームの解析
担 当	環境科学部 主任専門研究員 八重樫 香

1 目的

化学物質に暴露されたDNAは、付加体を形成することが知られている。DNA付加体 (DNAアダクト) は、DNA複製の過程でほとんどが修復されるが、修復されなかった場合、DNAの変異が起こる可能性がある。培養細胞に暴露した化学物質の毒性を評価する際、その化学物質により誘発されたDNA付加体の濃度を高感度で測定することは、非常に重要である。そこで、本研究ではDNA付加体のひとつである8-OHdGについて、培養細胞中の濃度をLC/MS/MSにより高感度で分析する条件を検討した。

2 方法

培養細胞 (100-200 mg) からDNAを抽出し酵素処理を行い、デオキシヌクレオチドに分解した試料 (120 μL) の8OHdGの濃度を求めた。8OHdGの分析条件を表1に示す。

表1 LC/MS/MSの分析条件

【LC】		【MS】																	
Instrument	: Agilent 1200	Instrument	: Agilent 6460																
Column	: Inertsustain C18 (2.1*100mm,1.8um)	Polarity	: Positive																
Mobile phase	: A) 5mM CH3COONH4/ACN B) 50mM CH3COONH4	Ionization	: ESI(Jet stream)																
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Time</th> <th>Solv. Ratio B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.0</td><td>100</td></tr> <tr><td>3.0</td><td>100</td></tr> <tr><td>15.0</td><td>90</td></tr> <tr><td>15.1</td><td>50</td></tr> <tr><td>18.0</td><td>50</td></tr> <tr><td>20.0</td><td>100</td></tr> <tr><td>30.0</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Time	Solv. Ratio B	0.0	100	3.0	100	15.0	90	15.1	50	18.0	50	20.0	100	30.0	100	Nebulizer	: N2(50psi)
Time	Solv. Ratio B																		
0.0	100																		
3.0	100																		
15.0	90																		
15.1	50																		
18.0	50																		
20.0	100																		
30.0	100																		
Flow	: 0.2ml/min	Drying gas	: N2(10L/min)																
Oven temp.	: 40°C	Drying gas temp.	: 300°C																
Injection vol.	: 2ul	Sheath gas	: N2(12L/min)																
		Sheath gas temp.	: 375°C																
		【MRM】																	
		Compound	: 8OHdG																
		Precursor ion (M+1)	: 284(m/z)																
		Product ion (M+1-116)	: 168(m/z)																
		Fragmentor	: 80V																
		Collision energy	: 12eV																

3 結果

本分析条件による装置の検出下限は、0.3 ng/mLであった。0.5-10 ng/mLの濃度範囲で検量線の相関係数は0.996と良好であった (図1)。さらに培養細胞からDNAを抽出した試料に8-OHdG標準液を添加して行った添加回収試験では、回収率97% (n=5) と良好であった。

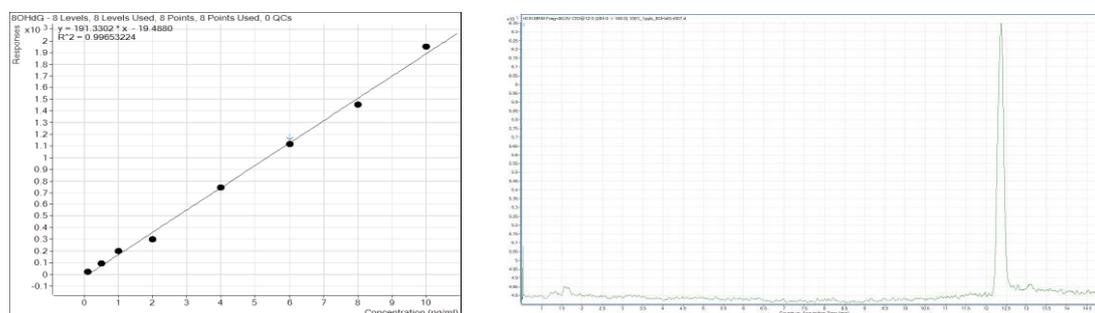


図1 検量線 (0.5-10 ng/mL) 及びクロマトグラム (1 ng/mL)

また、同様の分析条件でデオキシグアニン (dG) を測定することで、培養細胞中に誘発されたDNA付加体8-OHdGの量は、dGに対するDNA付加体8-OHdG量 (8-OHdG/dG) で解析することが可能となった。

今後は、8OHdGやその他のDNA付加体について、より簡単で精度よく分析できる方法の検討を行い、化学物質の毒性を評価する手法を確立することとしたい。

研究成果報告書(13)

研究課題名	希少植物の種の保存および地域資源としての活用に関する研究
担 当	地球科学部 主査専門研究員 小山田 智彰
<p>1 目的</p> <p>岩手県において絶滅の危険性が高まっている植物を対象に「種の保存」を進める増殖技術の開発を検討する。特に本県の歴史や、文化・産業に深いかかわりを持つ植物を対象にする。本研究で開発した技術は、国内の絶滅危惧植物の種の保存および本県の環境保全政策に役立てるのはもちろん、地域の産業振興や農業振興などの高度な要求に応えられるように取り組む。</p> <p>【研究分類1】<u>試験対象種の現状調査</u></p> <p>【研究分類2】<u>増殖に関する研究</u></p> <p>【研究分類3】<u>地域資源の活用に関する研究</u></p> <p>2 方法</p> <p>【研究分類1】自生地確認、周辺環境の状況、保護の取り組み、先進地の活動状況について調査をおこなう。</p> <p>【研究分類2】絶滅の危険度が高い種については種の維持を進めるための科学的な手法開発を進める。</p> <p>【研究分類3】地域資源の活用として新品種の作出に関する研究を進める。</p> <p>3 結果</p> <p>①東日本大震災後によって減少した海浜性植物の保全について、沿岸広域振興局や市町村の依頼に応じた助言、現地指導を展開した【研究分類1】</p> <p>②ユリ科植物の発芽期間短縮法「種子カット法」の開発に成功し、論文投稿を行った【研究分類2】</p> <p>③アツモリソウ新品種4種を開発し、国際登録（登録機関：英国王立園芸協会）を実現した【研究分類3】</p> <p>④新交配種を材料にした明所条件下におけるアツモリソウ生育促進培養法の開発に着手した【研究分類3】</p> <p>⑤①～③の研究成果を中心に技術指導や講演を行った（青森県、長野県富士見町、十和田市・北里大学）</p> <p>4 今後の研究方向等</p> <p>①震災復興に関連する希少野生植物の保全や移植などの指導を継続する必要がある。</p> <p>②種や生育数が極めて少ない種から特に絶滅の危険性が高い種については、調査を継続しながら保全の取り組みを進める必要がある。</p> <p>③地域資源の活用に関する研究においては、苗生産技術の開発を進めながら育種についての可能性を検討する必要がある。</p>	

研究成果報告書(14)

研究課題名	イヌワシ個体群の生態的特性および遺伝的構造に関する研究
担 当	地球科学部 主査専門研究員 前田 琢
<p>1 目的</p> <p>本研究では、イヌワシの個体群としての特性の把握を主目的とし、個体の移動追跡調査や、羽根、卵殻、ペレット等のサンプルによる遺伝子解析を通して、移動分散や遺伝的多様性に関する知見を収集する。また、森林の等高線方向列状間伐施業地におけるイヌワシの利用状況を明らかにし、希少種保全のための森林管理手法への寄与を目指す。さらに、県全域における繁殖状況の把握や、繁殖支援事業の効果測定についても継続し、保全に貢献するデータの拡充を図る。</p> <p>25年度に調査研究を行なった主な内容は次の通りである： ①県内各営巣地における2013年の繁殖状況調査、②羽根等を利用した遺伝子解析、③営巣場所の改良と効果のモニタリング、④繁殖支援のための給餌と効果の検証、⑤列状間伐地の利用状況の調査と解析、⑥映像を用いた個体識別による移動解明。</p> <p>2 方法</p> <p>① 県内の全営巣地で、繁殖期全般にわたってつがいの行動、巣の状態、ひなの生育状態等を調査した。また、県内の観察者からネットワークを通じてイヌワシの観察情報を収集し、生息・繁殖状況の詳細をまとめた。</p> <p>② 野外において羽根、ペレット、卵殻、糞などを採取し、これらの試料よりDNAを抽出し、マイクロサテライト12マーカーおよびミトコンドリアD-loopとCOIについて解析を行なった。</p> <p>③ 繁殖後の営巣場所を踏査して、巣の状態を点検するとともに、樹木が茂って出入りに支障の生じている営巣地において、許可を得て樹木の伐採作業を行なった。また、過去にこうした改良作業を実施した営巣地において、その後の利用状況をモニタリングした。</p> <p>④ 繁殖率の向上を目的として、2つがいを対象に給餌を行ない、効果の検討を行なった。</p> <p>⑤ 等高線方向の列状間伐施業が行なわれた3地域において、イヌワシの飛来や採餌行動を記録し、区画単位で出現頻度を算出、解析した。また、間伐地において施業後のノウサギの生息数や草本層植生の変化を調査した。</p> <p>⑥ 様々な地域でイヌワシの撮影を試み、映像に基づいて個体の特徴を比較することにより、同一個体と判断できた記録から、個体の移動の状況を明らかにした。</p> <p>3 結果</p> <p>① 2013年にひなの巣立ちを確認したのは6つがい、繁殖成功率は18.8%で、近年では2012年に次いで良好な成績となった。繁殖が不成功となった時期は、育雛期3例、抱卵期4例、造巣期5例、造巣前14例（推定含む）であり、産卵まで至ったつがいは例年とほぼ同じ13つがいであった。消失が疑われるつがいが4組いる一方、消失したとされていたつがいが復活する例もあり、県内の生息個体数に大きな変化は生じていないと考えられた。</p> <p>② 繁殖後の営巣地周辺において、新たに17点の遺伝子試料を収集した。これまでに集めた126試料について、DNAの抽出とマイクロサテライトの解析を京都大学と共同で進め、遺伝的多様性や個体間の血縁度の分布を明らかにした。</p> <p>③ 人工巣台を設置した2営巣地のうち1か所がイヌワシに利用され、防雪屋根を設置した5営巣地のうち2か所で繁殖利用が確認された。また、出入り支障木の除去を行なった7営巣地のうち2か所が使用され、うち1か所では初めてイヌワシの巣立ちが記録された。改良作業を実施してから効果が現れるまで数年かかることが多いが、次第に成果が得られるようになってきており、近年の繁殖成功率の向上にも貢献していると考えられる。</p>	

- ④ 給餌対象とした2つがいでも餌の利用が見られ、利用率は54%および74%と昨年度より増加した。両つがいとも繁殖行動を示し、1つがいでは雛も誕生したが、巣立ちには至らなかった。
- ⑤ 列状間伐地では草本層植生が増加し、それを餌とするノウサギも増えて、採餌場としての価値が向上していることが明らかになったが、イヌワシによる施業地の高頻度な利用は確認されなかった。しかし、3 施業地ともに採餌行動を行なう個体が観察され、採餌のために林内に突入する個体も観察されていることから、間伐施業は採餌場の創設に一定の効果を持つと考えられた。
- ⑥ 映像によって離れた場所の出現個体が同一であると確認できた事例が8例得られ、数キロから最大約56キロにおよぶ個体の移動を明らかにすることができた。また、巣立ち後の若鳥の移動を示す事例も複数得られ、定着していない個体が広域的な移動をしている様子が明らかになった。

4 今後の研究方向等

- (1) 各営巣地の繁殖状況の把握を進めるとともに、未確認のつがいがある可能性の高い地域について探索調査を行なう。
- (2) より多くの地域から個体の映像を集めて、同一個体の発見を促進し、移動事例を増やす。
- (3) 巣内ビデオ映像から親鳥の出入り頻度などを定量的に解析し、調査に役立つ知見を明らかにする。

研究成果報告書(15)

研究課題名	ヘア・トラップ法によるツキノワグマの生息動向と個体数推定法の開発
担 当	地球科学部 主任専門研究員 山内 貴義
<p>1 目的</p> <p>ヘア・トラップ調査のモデル地域を設定し、個体群のトレンドを把握する。そして継続したヘア・トラップ調査の結果を組み入れる統計シミュレーションモデルを試行し、岩手版の生息動向と個体数推定法を確立することを本研究課題の目的とした。本年度はヘア・トラップ調査を実施し、昨年度との比較を行うこととした。また同時に実施している県事業のヘア・トラップ調査との比較検討も行った。</p>	
<p>2 方法</p> <p>北奥羽地域(岩手大学御明神演習林)に15基のヘア・トラップを5月下旬に設置した。トラップは有刺鉄線を2本張る構造にした(図)。また急峻な地形のためヘア・トラップが設置出来ない1カ所についてはヘア・トラップパーを設置した(図)。トラップ設置後2~3週間ごとに5回の体毛回収を行った。体毛は野外で茶封筒に回収した。研究室で直ぐに30℃の恒温機で乾燥させ、分析まで-20℃で保存した。体毛は実態顕微鏡を用いて毛根の有無を確認し、毛根部分のみを1サンプルあたり30本までマイクロチューブに回収した。1トラップのサンプルで30本に満たない場合は、直ぐそばの有刺鉄線の棘から採取されたサンプルを混合して1サンプルとした。抽出はDNA Extractor FM kitを用いた。抽出したDNAは分光光度計で濃度を測定した後、マイクロサテライト部位を増幅するMultiplex PCRと、アメロゲニン部位を増幅するPCRをそれぞれ行った。マーカーセットはG10C・G10L・G10Bと、MUUT2・UarMU23・UarMU05を用い、それぞれMultiplex PCRを実践した。フラグメント解析はABI社製Genetic Analyzer 3130xlを用い、対立遺伝子の判定はGeneScan 600 LIZ Size Standardに基づいてGeneMapper v4.0によって行った。ミスマッチの照合や再分析の方法はUno et al. 2012の方法に準じた。</p>	
<p>3 結果</p> <p>遺伝子解析に用いたセッションごとのサンプル数と分析成功率、各セッションの確認頭数を表に記した。遺伝子解析成功率はどのセッションにおいても7から8割以上の高い値を維持した。最終的な演習林での確認頭数は18頭であった。演習林では過去7年間のヘア・トラップ調査が実施されており、その結果と比較してもほぼ同等の頭数であった。県事業のヘア・トラップ調査において、花巻市豊沢湖周辺でヘア・トラップ調査を実施している。これらの結果と合わせて空間明示型標識再捕獲モデルによって個体数密度を推定した結果、1.0頭/km²であった。同時期に行われた遠野市のヘア・トラップ調査では0.5頭/km²であったことから、北奥羽地域は非常に密度が高いことが示された。</p>	
<p>4 今後の研究方向等</p> <p>上記の調査を来年度も継続して実行する。そしてヘア・トラップ調査の結果を説明変数として組み込むharvest-based modelの作成に着手する。</p>	

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

セッション	サンプル数	分析成功率	確認頭数
第1セッション	28	78.57	7
第2セッション	30	86.67	8
第3セッション	31	83.87	9
第4セッション	24	83.33	8
第5セッション	29	75.86	9

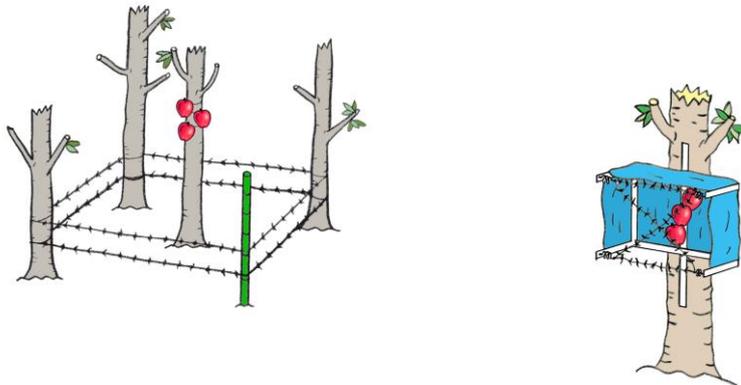


図1 ヘア・トラップ装置の模式図

研究成果報告書(16)

研究課題名	里山における半自然草原の生物多様性保全に関する研究
担 当	地球科学部 主任専門研究員 新井 隆介
<p>1 目的</p> <p>里地里山の茅場や採草地など半自然草原における植物群落の環境や特性、成立機構を明らかにするとともに、市民活動・研究活動を通じた行政機関への提案や、民間団体・地域住民が保全活動を展開できるよう、研究成果の情報提供など保全活動の支援を行うことにより、その生物多様性の保全を図る。</p>	
<p>2 方法</p> <p>(1) 里地里山調査</p> <p>2013年6月および8月に八幡平市および葛巻町のシバ群落において、植生調査と立地環境調査を行った。</p> <p>(2) ゴマシジミ生息地調査</p> <p>ゴマシジミ生息地の保全に有効な刈取り管理を検討するため、生息地に隣接する同様な立地環境の湿生群落において、2012年から選択的に食草であるナガボノワレモコウのみを残す刈取り処理を6月に行っている。また、11月に全ての草木を刈り取る保全区の一部プロットにおいても、2013年から同様の刈取り処理を実施した。調査は2013年6月上旬および8月下旬から9月上旬の年2回、植生調査と立地環境調査を行うとともに、花穂をつけた食草のシュートについては、プロットごとにその数を計測し、全シュートの花穂数も計測した。</p>	
<p>3 結果および考察</p> <p>(1) 里地里山調査</p> <p>八幡平市のシバ群落は、葛巻町と比べると生活型組成で地上植物の割合が大きい値を示し、ススキや木本類の侵入や定着がみられた。シバ群落の保全には現在実施されている放牧や刈取りを継続することが重要であるが、八幡平市では刈取り回数を増加することにより、木本類などを抑制することも検討する必要があると考えられた。</p> <p>(2) ゴマシジミ生息地調査</p> <p>対照区 (n=5) および刈取り区 (n=5)、保全対照区 (n=4)、保全刈取り区 (n=4) 間で比較したところ、2013年8-9月の群落内における相対光量子密度は各々、対照区 $19.07 \pm 13.56\%$ (平均値\pm標準偏差)、刈取り区 $53.57 \pm 6.74\%$、保全対照区 $6.53 \pm 5.06\%$、保全刈取り区 $27.02 \pm 27.02\%$ であり、刈取り区が他の3区に比べ有意に高く、保全刈取り区は保全対照区に比べて有意に高かった (Tukey-Kramer: $p < 0.05$)。食草とその競合種ヨシが出現したプロットにおいて、2013年8-9月の食草の積算優占度は各々、対照区 22.86 ± 9.60、刈取り区 49.96 ± 12.21、保全対照区 34.38 ± 6.02、保全刈取り区 61.27 ± 29.36、ヨシの積算優占度は各々、対照区 85.56 ± 25.02、刈取り区 71.11 ± 25.02、保全対照区 74.03 ± 8.12、保全刈取り区 63.67 ± 11.68 であり、いずれも有意な差はなかった (Tukey-Kramer: $p > 0.05$)。花穂をつけた食草のシュート数は各々、対照区 2.00 ± 1.73 本、刈取り区 18.67 ± 5.51 本、保全対照区 13.50 ± 4.80 本、保全刈取り区 48.75 ± 7.89 本、花穂数は各々、対照区 6.33 ± 5.24 個、刈取り区 10.57 ± 8.01 個、保全対照区 12.35 ± 7.91 個、保全刈取り区 9.85 ± 7.15 個であり、いずれも有意な差はなかった (Steel-Dwass: $p > 0.05$)。保全刈取り区は保全対照区より食草の優占度やシュート数は大きな値を示したが、花穂数は小さな値を示したため、刈取りによる攪乱の影響を受けたと考えられたが、ヨシの優占度は低い値を示し、光環境条件も良好であることから、生息地である保全区においても選択的に食草のみを残した6月の刈取り処理は有効であると考えられた。</p>	