

## 2 研究概要報告

## 研究成果報告書（1）

<b>研究課題名</b>	<b>生食用カキのノロウイルス不活化に関する研究</b>
<b>担 当</b>	<b>保健科学部 高橋知子、川上修央、藤森亜紀子、梶田弘子 企画情報部 佐藤 卓 水産技術センター 加賀克昌</b>
<b>1 目的</b>	
<p>冬季に多く発生する感染性胃腸炎の主な原因であるヒトノロウイルス（以下、「NoV」）は、人から環境水中へ排出され、カキ等の二枚貝に蓄積することが知られている。我々は、平成 29 年度から、食品のウイルス制御として効果が期待されており、しかも生の食感を損いにくい、高圧処理<sup>1)2)</sup>という方法を用いてノロウイルスの不活化の効果を調査してきた。今回、カキむき身での実験に加えて、県外施設が所有する大型の高圧処理機で実験を行い、殻付きカキにおける高圧処理の不活化効果について検証した。また、高圧処理に併用を検討している薬剤（柿渋製剤）の不活化効果についても検討した。</p>	
<b>2 方法</b>	
<p>(1) 人工汚染カキを用いた高圧処理による NoV 不活化効果</p> <p>① 汚染カキの作成：NoV 感染者の糞便乳剤 (<math>2.26 \times 10^6</math> コピー/mL) 5~6mL を添加した海水 25L 中に、生カキ 5~6 個を入れ蓄養（72 時間、水温 15°C、給餌（1 回/日）した。そのむき身をビニール袋に入れシールし試料を作製し実験を 3 回繰り返し行った（n=5）。</p> <p>② 高圧処理：装置は「Dr. CHEF」（神戸製鋼所）を使用した。NoV 汚染カキむき身に対して、圧力 400MPa、加圧保持時間 10 分の条件で処理を行った。処理時の温度はいずれも 4°C に保持した。</p> <p>③ NoV のコピー数測定：高圧処理を行ったカキについて、中腸腺を切り出し、<math>\alpha</math>-アミラーゼ溶液によるグリコーゲン消化を行った後、ポリエチレングリコール沈殿法により濃縮を行った。ここから感染性推定遺伝子検出法<sup>*</sup>を用いて RNA を抽出及び逆転写を行った後、リアルタイム PCR 法で NoV コピー数を測定した。（検出下限値：中腸腺 1.5g の場合、約 180 コピー/中腸腺 1g）</p> <p>※感染性推定遺伝子検査法<sup>3)</sup>：不活化したウイルス粒子の検出を抑えるため、カプシドが破壊されて露出した RNA を RNase 処理で消化し、カプシドが正常でも損傷した RNA はオリゴ dT プライマーを用いて逆転写を行うことで排除する方法。</p>	
<p>(2) 柿渋製剤の NoV 不活化効果</p> <p>柿渋製剤は、いずれも市販されている食品添加物である以下の 2 種類について検討した。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・柿渋製剤 A：柿渋原液にデキストリンを加えて粉末化したもの</li> <li>・柿渋製剤 P：柿渋原液をそのまま粉末状にしたもの</li> </ul> <p>① 柿渋製剤の糞便中 NoV の不活化効果</p> <p>NoV 感染者の糞便乳剤（G I . 6、G II . 2 および G II . 4）それぞれに柿渋製剤 A 及び P を添加（G I . 6、G II . 2 には 500、1000ppm、G II . 4 には 500、1000、2000、4000ppm）し、転倒混和後、12000rpm 20 分の冷却遠心を行った。その上清を試料として感染性推定遺伝子検出法<sup>*</sup>を用いて RNA を抽出及び逆転写を行った後、リアルタイム PCR 法で NoV コピー数を測定した。（検出下限値：約 4,290 コピー/糞便 1g）</p> <p>② 柿渋製剤 P 添加海水による浄化の汚染カキ NoV の不活化効果</p> <p>(1) ①による汚染カキを作成し、柿渋製剤 P（10ppm、100ppm、2000ppm）を添加した海水および添加しない海水中で 48 時間蓄養を行った後、(1) ②と③により高圧処理、NoV コピー数の測定を行った。</p>	
<p>(3) 殻付きカキを用いた高圧処理による NoV 不活化効果の検証</p> <p>① (1) ①による汚染カキを作成し、柿渋製剤 P を 10ppm 添加した海水で 48 時間蓄養したものを、殻付</p>	

きの状態で、滅菌した人工海水とともにビニール袋に入れシールした試料を作製し、実験を行った。

- ② 高圧処理：装置は、石川島播磨重工業株式会社製食品加工用特別機を使用した。加圧条件は、圧力 400MPa、加圧保持時間 10 分の条件で行った。処理時の温度は 4℃に保持した。
- ③ NoV のコピー数測定：前述の (1) ③により NoV コピー数の測定を行った。

#### (4) 高圧処理効果の検証

高圧処理後に、リアルタイム PCR 法で NoV コピー数が検出限界以下となった 40 検体について、1stPCR で増幅 (n=4) 後、10 倍希釈したものをリアルタイム PCR 法で測定し、ノロウイルスの不活化効果を検証した。

#### (5) データ解析：R version 3.4.3 を使用して分散分析及び多重比較を行った。

### 3 結果

#### (1) 人工汚染カキを用いた高圧処理の不活化効果 (表 1)

3 回の実験のいずれでも、加圧していないカキに比較して、400Mpa、10 分間の加圧により、ノロウイルスコピー数は  $2.0 \times 10^2$  コピー (以下、2Log と表記) 減少し、高圧処理がノロウイルス不活化に一定の効果を示すことが示唆された。

#### (2) 柿渋製剤の NoV 不活化効果

##### ① 柿渋製剤の糞便中 NoV の不活化効果 (表 2)

・GI.6 の糞便乳剤の場合：柿渋製剤 A では 500ppm で 2.2Log、1000ppm で検出限界以下となり 4.1Log の減少となった。柿渋製剤 P では、500ppm で 3.1Log、1000ppm で検出限界以下となり 4.1Log 減少した。

・GII.2 の糞便乳剤の場合：柿渋製剤 A では、500ppm では減少せず、1000ppm で 3.0Log 減少し、柿渋製剤 P では 500ppm で 2.6Log、1000ppm で検出限界以下となり 5.0Log 減少した。

・GII.4 の糞便乳剤の場合：柿渋製剤 A では 500、1000ppm、2000ppm で減少せず、4000ppm 添加した時に 1.9Log 減少した。柿渋製剤 P では、500ppm、1000ppm で 0.6Log、2000ppm で 1.8Log、4000ppm で 2.6Log の減少となった。

##### ② 柿渋製剤 P 添加海水による浄化の汚染カキ NoV の不活化効果 (表 3)

柿渋製剤 P を添加した海水で蓄養したカキと海水のみで浄化したカキの NoV に有意な差は認められず、常圧における柿渋製剤 P の効果は認められなかった。また、柿渋製剤 P で蓄養し、高圧処理を併用した実験では、汚染カキの NoV の汚染濃度が低く、すべての検体が検出限界以下となったため、柿渋製剤との併用の効果については不明であった。

以上のことから、柿渋製剤は、NoV に直接作用させた場合、NoV の遺伝子型による効果の差はあるが、NoV 不活化に一定の効果を示すことが示唆された。この場合、実験に使用した 2 種の柿渋製剤 2 種 (A および P) では、P の方で不活化効果が高いことが示唆された。一方、カキに蓄積した NoV に対しては、不活化効果は認められず、生きたカキが柿渋製剤を体内に取り込まないことが考えられた。このことから、蓄養時の柿渋製剤の使用は効果が期待できないと考えられた。

#### (3) 殻付きカキを用いた高圧処理による NoV 不活化効果の検証 (表 4)

汚染カキの NoV 汚染の初期濃度が、むき身で実験を行った時よりも低かったが、加圧した殻付きカキの NoV は、いずれも検出下限値以下になった。

高圧処理により、殻付き、むき身のいずれでもノロウイルスは検出限界以下となったことから、高圧処理 (400MPa、10 分間) は、殻付きの場合でも、カキの中のノロウイルス不活化に有効であることが確認できた。

#### (4) 高圧処理効果の検証

高圧処理後に、リアルタイム PCR 法で NoV コピー数が検出下限値以下となった検体 40 検体について、1stPCR で増幅 (n=4) 後、リアルタイム PCR 法で測定したところ、柿渋製剤 P 添加海水 (10ppm) で蓄養し、高圧処理

を行った検体のうち1検体からノロウイルスが検出された。それ以外の検体からはノロウイルスは検出されなかった。このことから、高圧処理は、リスクをゼロにすることは困難であるが、NoVの不活化に有効な方法であると思われた。

#### 4 今後の研究方向等

昨年度から、加熱に代わるウイルス不活化法として、近年注目されている高圧処理を用いてNoVの不活化を検討してきた。今回は、人工汚染カキを用い、一定の不活化効果を確認することができた。また、殻付きカキを使用した高圧処理でも、不活化効果が得られることを確認することができた。

高圧処理後にリアルタイムPCR法で検出下限値以下であった検体について、NoVの不活化を検証した結果から、高圧処理はNoVのリスクをゼロにすることは困難であるが、不活化に有効でありリスクを低減化できる処理方法であると考えられた。今回、NoVのリスクの低減化をより確実なものとするために高圧処理方法と併用できる方法として、柿渋製剤を検討したが、糞便等のNoVに直接作用させた場合には、一定の減少効果が得られることが分かった。一方、カキの中に蓄積しているNoVに対しては、減少効果は認められなかった。カキ蓄養時に十分なNoV低減化ができれば、高圧処理を行うことで、より確実なリスク低減につながるものと考えられる。今後は、高圧処理との併用が効果的な方法をさらに検討する必要があると考える。

#### 参考文献

- 1) Renduelesa, E., Omerb, M.K., Alvseikeb, O., Alonso-Callejaa, C., Capita, R., Prietoa, M. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. LWT-Food Sci. Technol., 44, 1251-1260 (2011)
- 2) Kingsley, D. H., Holliman, D. R., Calci, K.R., Chen, H., Flick, G. J. Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. Appl. Environ. Microbiol., 73, 581-585 (2007)
- 3) 野田衛. 食品のウイルス汚染のリスクを評価のための遺伝子検査法の開発と応用に関する研究 平成 24~25 年度報告書. 内閣府食品安全委員会食品健康影響評価技術研究 (2014)

表1 NoV 汚染カキ(むき身)を用いた高圧処理によるNoVコピー数<sup>\*</sup>の変化

加圧条件	カキ(n=5)						
	1	2	3	4	5	Ave	
1回目	なし(0MPa)	$4.5 \times 10^2$	$9.5 \times 10$	$4.2 \times 10^2$	$1.1 \times 10^2$	$4.0 \times 10^2$	$2.9 \times 10^2$
	400MPa	3.3	8.0	2.6	2.7	1.9	3.7
2回目	なし(0MPa)	$1.2 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$4.3 \times 10^2$	$1.3 \times 10^2$	不検出	$2.0 \times 10^2$
	400MPa	2.9	不検出	4.8	3.7	3.6	3.8
3回目	なし(0MPa)	$3.0 \times 10^2$	$1.5 \times 10^2$	$1.4 \times 10^2$	$1.4 \times 10$	4.8	$1.2 \times 10^2$
	400MPa	不検出	2.0	2.2	1.8	2.3	2.1

※:リアルタイムPCR法におけるコピー数(/2.5 μl)

\*\*\*: P<0.001

表2 柿渋製剤の糞便中NoVの対数減少値(ΔLogコピー数)

	糞便乳剤の NoV遺伝子型	添加柿渋製剤濃度(ppm)			
		500	1000	2000	4000
柿渋製剤A	G I .6	2.2	4.1	NT	NT
	G II .2	<0.1	3.0	NT	NT
	G II .4	<0.1	<0.1	<0.1	1.9
柿渋製剤P	G I .6	3.1	4.1	NT	NT
	G II .2	2.6	5.0	NT	NT
	G II .4	0.6	0.6	1.8	2.6

表3 柿渋製剤P添加海水浄化および高圧処理(むき身)による汚染カキNoVコピー数<sup>※</sup>の変化

	高圧処理 (400MPa10分間) (むき身)	浄化方法(n=5)				
		なし	海水 (48時間)	柿渋添加海水(48時間)		
				10ppm	100ppm	2000ppm
1	なし	$2.8 \times 10^3$	$7.0 \times 10^2$	NT	NT	$2.8 \times 10^2$
	あり	NT	不検出	NT	NT	不検出
2	なし	$9.4 \times 10$	$1.8 \times 10^2$	$8.8 \times 10$	$3.9 \times 10^2$	NT
	あり	NT	不検出	不検出	不検出	NT
3	なし	$9.7 \times 10^2$	$3.8 \times 10^2$	$4.1 \times 10^2$	NT	NT
	あり	NT	不検出	不検出	NT	NT

※リアルタイムPCR法におけるコピー数(/2.5μl)

表4 柿渋製剤P添加海水浄化および高圧処理(殻付き)による  
汚染カキNoVコピー数<sup>※</sup>の変化

高圧処理 (400MPa10分間) (殻付き)	浄化方法(n=5)		
	なし	海水 (48時間)	柿渋添加海水 10ppm(48時間)
なし	1.1 × 10	3.6	2.2
あり	NT	不検出	不検出

※リアルタイムPCR法におけるコピー数(/2.5 μl)

## 研究成果報告書（2）

研究課題名	医療機関との連携による薬剤耐性菌の解析
担 当	保健科学部 上席専門研究員 岩淵香織
<p><b>1 目的</b></p> <p>岩手県内の薬剤耐性菌の検出状況の把握のため、医療機関で多く検出され、市中感染も発生している ESBL (extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamase) 産生菌 (以降 ESBL) の解析と、海外からの持ち込みが危惧される CRE (Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae) について、感染症発生動向調査により届け出のあった CRE 患者分離株及び環境汚染の視点から下水道流入水についてカルバペネマーゼ遺伝子の検査を実施した。</p> <p><b>2 方法</b></p> <p><u>ESBL 解析：</u></p> <p>(1) 材料</p> <p>県内 4 カ所の医療機関で、平成 29 年 3 月から平成 31 年 3 月にかけて検出され、当センターに提供された 133 株の ESBL 産生菌株を対象とした。菌種は、<i>E. coli</i> が 118 株 (88.7%)、<i>Klebsiella pneumoniae</i> が 5 株 (3.8%)、<i>Proteus mirabilis</i> が 10 株 (7.5%) で、これらを検出した材料は、尿検体 79 検体 (59.4%)、呼吸器検体 28 検体 (21.0%)、動脈血 5 検体 (3.8%)、静脈血 2 検体 (1.5%) その他 19 検体 (14.3%) であった。</p> <p>(2) 血清型別</p> <p>大腸菌の血清型別は、市販抗血清 (デンカ生研) を用い、O 血清群別はスライド凝集反応法で行った。また、H 血清群別は、クレーギー管を通し運動性を増強した菌について、試験管法で行った。</p> <p>(3) ESBL 産生遺伝子の検出</p> <p>TEM 型、SHV 型および CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-9 group の ESBL 遺伝子について、PCR 法による検出を行った<sup>1)</sup>。なお、今年度協力機関となった医療機関から提供された、血清型が O25:H4 の CTX-M-1 group の遺伝子が検出された <i>E. coli</i> についてのみ、ESBL の CTX-M-15 を産生する <i>Escherichia coli</i> で血清型が O25:H4 で Multilocus Sequence Typing (MLST) が ST131 である特定クローンかどうか推定するため、シーケンス解析により CTX-M 型の遺伝子型別を行った<sup>2)</sup>。</p> <p><u>CRE 解析：</u></p> <p>(1) 患者分離株届け出のあった 5 株の CRE について、カルバペネマーゼ遺伝子 (NDM、KCP、IMP、VIM、OXA-48、GES) の PCR 法による検出を実施した<sup>1)</sup>。</p> <p>(2) 2018 年 4 月～2019 年 3 月まで月 1 回採水した流入水 100～150mL について、5,000rpm で遠心分離した沈渣をスキムミルク培地に入れマイナス 80℃で保存しておいた検体の半量 (50～75mL 相当) を、10 <math>\mu</math>g/1 枚のメロペネムディスク 2 枚を加えたトリプトソイブイオン 20mL で 35℃14 時間増菌培養した。その 10 <math>\mu</math>L をクロモアガー-mSuper CARBA 培地に塗抹し、37℃18～24 時間培養し、CRE と推定されるコロニーを CLIG 培地に釣菌した。37℃18～24 時間培養後、菌株を熱抽出し、カルバペネマーゼ遺伝子 (NDM、KCP、IMP、VIM、OXA-48、GES) の PCR 法による検出を実施した<sup>1)</sup>。遺伝子の検出された菌株について、簡易同定キット ID20 により、菌種と同定した。</p> <p><b>3 結果</b></p> <p><u>ESBL 解析：</u></p> <p>(1) 提供された 104 株から、CTX-M-1 group が 44 株 (33.1%)、CTX-M-2 group が 10 株 (7.5%)、CTX-M-8 group が 2 株 (1.5%)、CTX-M-9 group が 71 株 (53.4%)、SHV が 8 株 (0.6%)、TEM が 38 株 (28.6%) 検出された (表 1 複数遺伝子保有株あり)。</p>	

(2) 今年度協力機関となった医療機関から提供され、血清型が O25:H4 の CTX-M-1 group の遺伝子が検出された *E. coli* 3 株は、シーケンス解析により、2 株が CTX-M-15 に、1 株が CTX-M-3 に型別された。

CRE 解析：患者分離株 5 株ともカルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかったが、下水道流入水から、表 2 のとおりカルバペネマーゼ遺伝子が検出された。

#### 4 今後の研究方向等

岩手県における ESBL は、菌種は *E. coli* が多く、検出された遺伝子は CTX-M-9 group が 133 株中 71 株と 53.4% を占めていた。前回調査の 73.1% から減少し、CTX-M-1 group が前回 22.1% から 33.1% と増加した。また、前回検出されていなかった CTX-M-8 group が検出されている。今年度協力機関となった医療機関においても ST131 クローンと推定される菌株が検出されており、今後の動向を注視していく必要がある。

また、CRE については、県内では患者から耐性遺伝子は検出されていないが、下水道流入水から検出され、すでに県内に、持ち込まれている可能性がある。引き続き、医療機関と連携し、早期探知及び拡散防止に向け、迅速に遺伝子検査等を実施していく必要性を感じた。

表1 菌種別、耐性遺伝子型別結果

	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumophila</i>	<i>P.mirabilis</i>
CTX-M-1group	24		
CTX-M-1group・TEM	15		
CTX-M-1group・SHV		1	
CTX-M-1group・TEM・SHV		3	
CTX-M-2group			8
CTX-M-2group・TEM			2
CTX-M-8group	2		
CTX-M-9group	52		
CTX-M-9group・TEM	17		
CTX-M-1group・CTX-M-9group		1	
SHV	2		
TEM・SHV	1		
※N.D.	5		
	118	5	10

文献

- 1) 薬剤耐性菌サーベイランスの強化及びゲノム解析の促進に伴う迅速検査法開発に関する研究によるマルチプレックス PCR 法, Ver 170928
- 2) Canton R, Gonzales-Alba JM, Galan JM. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. Front Microbiol. 2012;3:110

表2 下水から検出されたカルバペネマーゼ遺伝子

採水年月	遺伝子型	菌種	
2018年	4月	GES型 NDM型	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>
	6月	NDM型	<i>Escherichia coli</i>
		IMP型	<i>Citrobacter freundii</i>
	7月	OXA-48型	<i>Escherichia coli</i>
		GES型	<i>Enterobacter cloacae</i>
		GES型	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	8月	NDM型	<i>Escherichia coli</i>
		GES型	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	9月	IMP型	<i>Citrobacter freundii</i>
		GES型	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	10月	IMP型	<i>Citrobacter freundii</i>
	11月	IMP型	<i>Citrobacter freundii</i>
12月	GES型	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
2019年	1月	OXA-48型	<i>Escherichia coli</i>
		NDM型	<i>Escherichia coli</i>
	3月	GES型	<i>Enterobacter cloacae</i>
		GES型	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter taylorae</i>

### 研究成果報告書（3）

<b>研究課題名</b>	<b>岩手県における小児呼吸器ウイルスの疫学に関する研究</b>
<b>担 当</b>	<b>保健科学部 上席専門研究員 高橋雅輝</b>
<b>1 目的</b>	<p>小児の呼吸器疾患起因ウイルスの検出を行うとともに、患者の疫学的背景との関連を解明することにより、充実した感染症発生動向調査事業の推進に貢献する。</p>
<b>2 材料及び方法</b>	<p>(1) 2018年1月から2018年12月までの間に、もりおかこども病院を受診した上気道炎及び下気道炎患者の咽頭ぬぐい液及び喀痰93検体について、呼吸器ウイルスの分離・検出並びに血清型別・遺伝子型別を行った。検体採取にあたっては、迅速診断キットにより診断されえなかった症例及び明らかな細菌性疾患を除外した。</p> <p>(2) 2013年1月から2017年12月までに検出されたパラインフルエンザウイルス3型（HPIV3）57株のHN遺伝子について、最尤法（MEGA6）による進化系統樹解析を行った。</p> <p>(3) HPIV3を感染させたVERO-E6細胞の抗原スライドを作製し、FITC間接蛍光抗体法（IF）による正常ヒト血清中のHPIV3に対するIgG検出を試みた。正常ヒト血清は、横浜市立大学血清バンクに保存されている20～30歳代女性の血清10検体とした。</p>
<b>3 結果及び考察</b>	<p>(1) 2018年は93検体中66検体（71.0%）から病原ウイルスが検出された（重複検出例含む）。検出されたウイルスの内訳は、ライノウイルス（HRV）が17例（17.2%）、RSウイルス（RSV）が8例（8.6%）、パラインフルエンザウイルス（HPIV）が11例（11.8%）、ヒトメタニューモウイルス（HMPV）が3例（3.2%）であった。HMPVの検出率が低かったものの、これら4ウイルスが陽性検体の59.4%を占めた。2013年から2018年のこれら主要4ウイルスの検出数を表に示した。5年平均の検出率が最も高いのはHRV（21.7%）で、HPIV（16.1%）、RSV（11.9%）、HMPV（8.8%）の順であった（表1）。また、2017年は主要4ウイルス以外のウイルス（アデノウイルス、エンテロウイルス、コロナウイルス、インフルエンザCウイルス等）の検出率が増加し、呼吸器感染症の起因ウイルスは多様であることが示された。（業績1、2）。</p> <p>(2) HPIV3のHN遺伝子進化系統ではA、B及びCの3クラスターに大別され、さらにクラスターCはサブクラスターC1、C3及びC5に分岐した（図）。株の多くはC3に属しており、C3は流行の中心となる系統であると考えられた。一方、C1系統株は少なく、2017年は検出されなかった。また、2013年の調査開始以来、初めてC5系統株が検出された（2017年の4株）。C5に属する4株の株間距離は短いことから、2017年は類似性の高い株による小流行があったものと思われた。今後もC3系統株が流行の中心となると考えられるが、C5系統株の動向も注目される。</p> <p>(3) 正常ヒト血清中におけるHPIV3に対するIgG検出結果を表2に示した。IFで蛍光を認めた血清の最大希釈倍率をみると、各被験者のIgGには大きな差があった。また、感染細胞作製に用いたウイルス株の系統（クラスターA、サブクラスターC1、C3及びC5）別でもIgG量に差が認められた（要因については現在解析中）。</p>
<b>4 今後の研究方向等</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・平成31年度においても呼吸器感染症検体からのウイルス検出を継続し、ウイルスの詳細解析を行う。</li> <li>・HPIV3のHN抗原解析を継続し、正常ヒト血清におけるIgG量について解析を行う。</li> </ul>

表 1 検体採取年別ウイルス検出実績

検体採取年	2013		2014		2015		2016		2017		2018	
検体数	129		105		83		124		89		93	
病原体検出数	117		78		53		91		71		64	
ライノウイルス	32	24.8%	22	21.0%	9	10.8%	32	25.8%	27	30.3%	16	17.2%
RSウイルス	24	18.6%	10	9.5%	10	12.0%	13	10.5%	11	12.4%	8	8.6%
パラインフルエンザウイルス	35	27.1%	16	15.2%	10	12.0%	18	14.5%	14	15.7%	11	11.8%
ヒトメタニューモウイルス	15	11.6%	18	17.1%	5	6.0%	14	11.3%	3	3.4%	3	3.2%
その他のウイルス	11	8.5%	12	11.4%	19	22.9%	14	11.3%	16	18.0%	26	28.0%
不検出	23	17.8%	35	33.3%	30	36.1%	40	32.3%	31	34.8%	37	39.8%

表 2 間接蛍光抗体法を用いたヒト抗パラインフルエンザウイルス 3 型 IgG 検出結果 (数値は蛍光が認められた血清の最大希釈倍率)

抗原株名/ 分離年/クラスター	ワシントン/ 1957/A	岩手113/ 2016/C1	岩手126/ 2017/C5	岩手82/ 2015/C3	岩手6/ 2005/C3
血清001	128	128	256	256	256
血清002	256	128	128	256	256
血清003	8	8	8	8	16
血清004	256	128	256	512	512
血清005	64	64	64	64	64
血清006	512	64	256	256	256
血清007	128	512	512	512	256
血清008	512	256	512	512	256
血清009	128	128	128	128	128
血清010	512	256	512	512	512

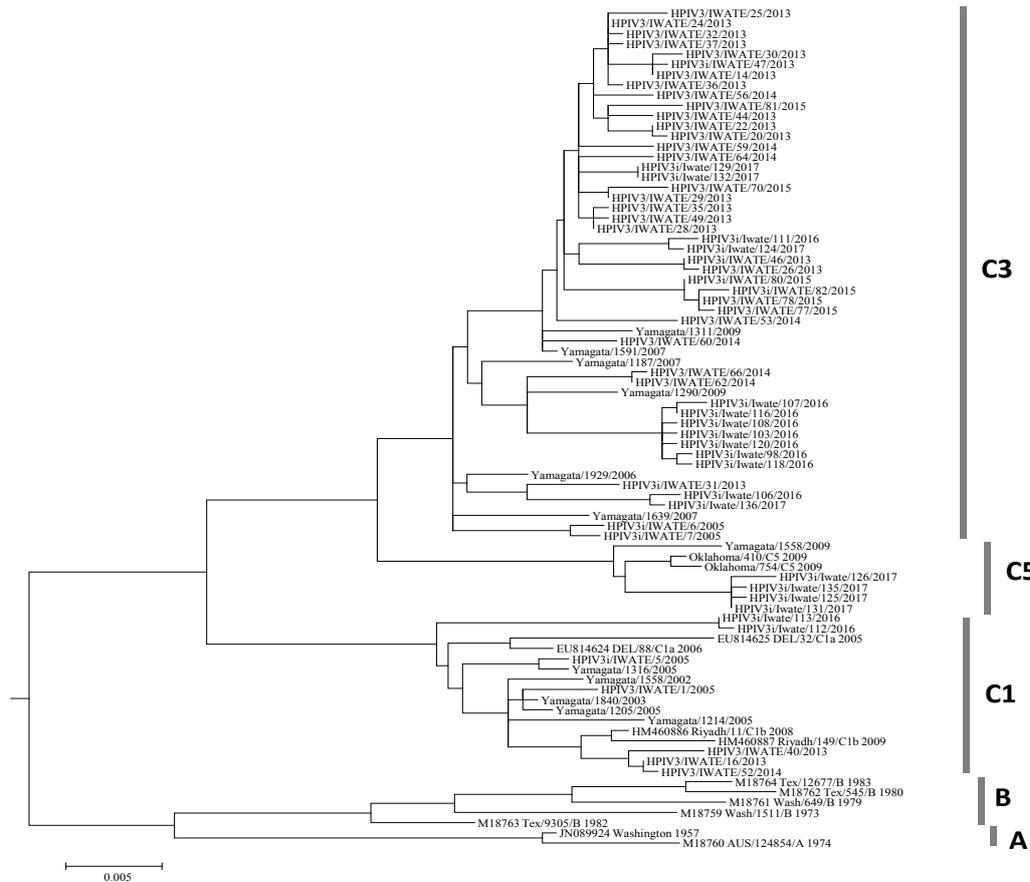


図 パラインフルエンザウイルス 3 型の HN 遺伝子進化系統樹 (最尤法、MEGA6 による)

業績 1 Masaki Takahashi *et al.*, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 71 (2018) 393-395

業績 2 高橋雅輝ら, 第 66 回日本ウイルス学会 (2018)

研究成果報告書（４）

研究課題名	麻痺性貝毒に関する機器分析法の研究
担 当	衛生科学部 専門研究員 沼野 聡

1 目的

麻痺性貝毒 (Paralytic shellfish toxins, PSTs) は、Saxitoxin (STX) を中心に、Gonyautoxin (GTX) や C toxin などの類縁体が知られている毒である。海洋における産生生物は、*Alexandrium* 属や *Gymnodinium* 属等の有毒渦鞭毛藻であり、それらを餌として捕食した貝類中に毒が蓄積する。毒成分は、ふぐ毒として知られる Tetrodotoxin (TTX) と同様に、神経や筋肉細胞に存在する電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルを阻害するため、喫食者に呼吸困難などの麻痺性症状を引き起こす。現在、我が国における麻痺性貝毒の公定法は、マウス毒性試験法 (MBA) が採用<sup>1)</sup>されており、4MU/g (※ 1MU とは、体重 20g のマウスが 15 分間で死ぬ毒量を示す) 以上の場合に出荷規制措置が講じられている。近年、国際的に MBA の代替法として、HPLC や LC-MS/MS 等を用いた機器分析法の報告例<sup>2-4)</sup>が増えてきており、我が国でも検討段階を迎えている。

そこで、本研究は LC-MS/MS を用いた検討を行うことを目的として、平成 28 年度より取り組んでいる。これまでに得られた知見は、第 16 号および第 17 号年報において報告した。今年度は、機器分析法とマウス毒性試験との相関性について検証を行ったので報告する。

2 方法

2-1) 前処理方法

県内で定期的に採取したホタテガイ (採取協力：岩手県水産技術センター) より、毒の主な蓄積部位である中腸腺を取り出し、公定法に準じて 0.1N 塩酸による加熱抽出を行った。得られた抽出液を、固相カラムおよび限外ろ過を用いて精製した。

2-2) LC-MS/MS 測定

測定対象は、標準品が発売されている成分とし、強毒成分の GTX1~4 と dcSTX、および弱毒成分の C1~2 の 7 成分とした (図 1)。分析装置は、AB Sciex 社製の API4000 を用いた。絶対検量線により定量し、得られた各成分の測定濃度に対して、比毒性<sup>2)</sup>を乗じることで、マウスユニット値 (MU/g) に変換した。7 成分の MU/g 値を合算し、7~100 MU/g の範囲において濃度が異なる 18 サンプルを得た。

2-3) マウス毒性試験

マウスは ddY 系 (♂, 体重 19~21g) を用いた。前述の比毒性を用いた換算によって、MU/g 値が判明している検液を、マウスが 5 分間で死ぬ毒量 (1.92 MU/g) となるように、それぞれ 0.01N 塩酸で希釈を行った。各サンプルを 3 匹ずつに投与し、致死時間を計測した。

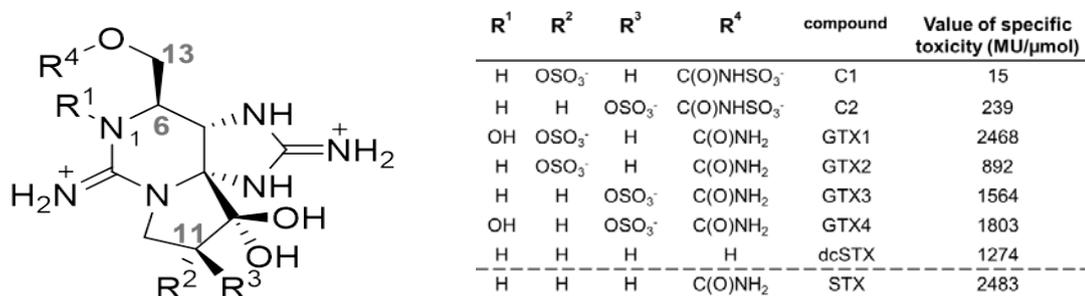


図 1. 測定対象とした麻痺性貝毒成分の構造式および比毒性<sup>2)</sup>

(換算：機器分析の MU/g 値 = 成分濃度 μmol/g × 比毒性 MU/μmol)

※ STX は、標準品の入手に制約があるため、分析対象外とした。

### 3 結果

LC-MS/MS とマウス毒性試験により、測定した毒力との相関性を、図2に示す。7.5~99.7MU/g の範囲で高い相関性 ( $r=0.981$ , 18 点) が得られた。麻痺性貝毒は、Saxitoxin 類縁体が 57 種類あると提唱<sup>5)</sup>されているが、今回対象とした7成分をLC-MS/MS で測定することで、貝類中の毒量を十分に推定することが出来ると言える。これは、先行研究<sup>6)</sup>で報告があるように、日本近海で採取されるホタテガイの主要成分が GTX 群および C toxin であるため、高い相関性が得られたものと考察する。

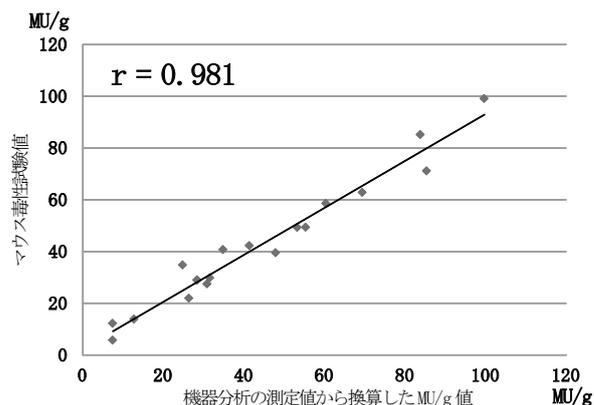


図2. LC-MS/MS およびMBA より測定した毒力の相関図

図3には、マウス毒性試験に供した検体のLC-MS/MSによる毒組成比を示す。図では、7検体分を示したが、全18検体においてGTX1-4が全体の80~90%を占めており、C toxin やdcSTXは20%未満であった。構成比および比毒性から、総毒力に寄与しているのは、GTX1~4であることが分かった。

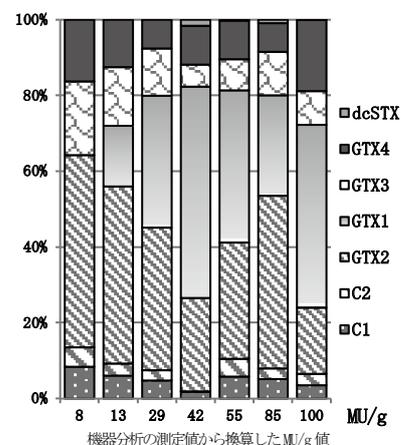


図3. 各サンプルの構成比

仲谷らは、大阪湾周辺で採取されたシジミとイガイを用い、同様の検証を行った結果、両手法間で高い相関性を得ている<sup>7-8)</sup>。よって、LC-MS/MSによるPSTs分析は、貝種の違い等に影響されることなく、マウス毒性試験の毒力と同等の結果を短時間で得ることが可能であると考えられる。

一方で、LC-MS/MSを用いた麻痺性貝毒含有のホタテガイ分析では、C toxin やGTX群の測定条件 (SRMモード,  $m/z$  412 > 332 および  $m/z$  396 > 298) で、新規ピークを複数検出する(図4)。これらは、先行研究<sup>9)</sup>のクロマトグラムと比較し、麻痺性貝毒の代謝物であるM toxinである可能性が高いと推察する。標準品が発売されていないため、これらの定性および定量は出来ないが、M toxin類を定量せずとも、対象とした7成分の測定でマウス毒性試験との高い相関性が取れることから、それぞれの代謝物の毒力は弱いと考えられる。

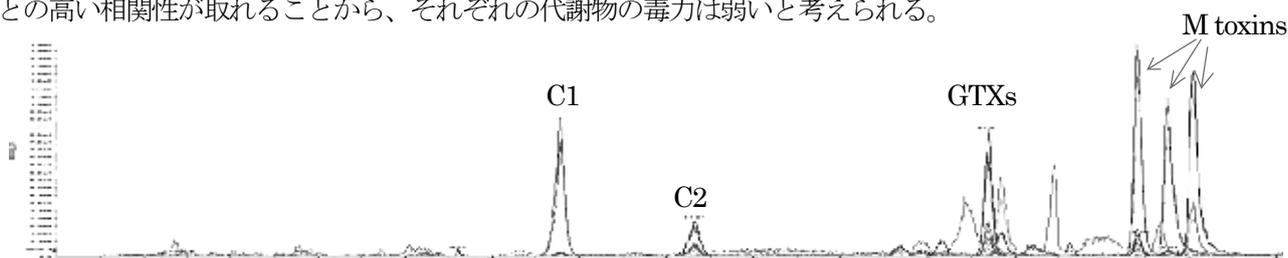


図4. LC-MS/MSを用いたホタテガイ中の麻痺性貝毒分析例 (TIC = Total Ion Chromatograph)

### 4 今後の研究方向等

毒成分の組成については、季節間や他種で異なる可能性が高いため、引き続きLC-MS/MSでの検証が必要であると考えられる。近年、EU圏を中心にLC-MS/MSを用いた麻痺性貝毒分析のバリデーションが進んでおり、動向を注視していく必要がある。また、麻痺性貝毒の代謝物(M toxin)と推定した成分は、PSTsの上昇期より複数検出されている。今後は、未同定のM toxinについて検討をし、各M toxin類の経時変化から代謝経路や速度を明らかにしていきたいと考えている。

### 参考文献

- 1) 食品衛生検査指針-理化学編-(2015)
- 2) oshima, *J. AOAC Int.* **1995**, 78, 528-532.
- 3) Dell' s Aversano, C. *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 1518-1523.
- 4) Turner, A. D. *et al.*, *J. AOAC Int.* **2015**, 98, 609-621.
- 5) Maria, W. *et al.*, *Mar. Drugs.* **2010**, 8, 2185-2211.
- 6) 貝毒, 日本水産学会監修, 恒星社厚生閣発行, **2017**
- 7-8) 食品衛生学会 学術講演会 (第110回、第113回) 要旨
- 9) Li, A., *et al.*, *Food addit. Contam., Part A.* **2012**, 29, 1455-1464

研究成果報告書（5）

研究課題名	DNA 抽出時における前処理効果の検討について
担 当	衛生科学部 主任専門研究員 昆野 智恵子
<p><b>1 目的</b></p> <p>遺伝子組換え食品及びアレルギー物質検査の検査では、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）により目的 DNA の増幅を行う。この PCR には、「十分な量」と「十分な品質」という条件を満たした DNA が抽出される必要があるが、厚生労働省や消費者庁から発出されている市販の抽出キットを用いた抽出法で加工食品の全てに対応できるわけではない。</p> <p>そこで本研究では、DNA の抽出に困難がある加工食品から上記の条件を満たす DNA を抽出することができるよう、試料に適切な前処理を追加し、抽出結果へどのような効果を与えるかを検討したので報告する。</p> <p><b>2 方法</b></p> <p>(1) 試料（ダイズ加工品） 小売店で購入した次のものを試料として用いた。 木綿豆腐、にがり充填豆腐、納豆、おから、厚揚げ、油揚げ、大豆缶詰、みどり豆、きな粉</p> <p>(2) DNA 抽出用キット DNeasy Plant mini kit (QIAGEN 社製)</p> <p>(3) 前処理装置 試料の均一化にはオスターブレンダー（オスター社製）を用いた。乾熱乾燥には、ドライオープン DS44（ヤマト社製）、粉碎にはミルサー（大阪ケミカル社製）を用いた。</p> <p>(4) 前処理方法 全ての試料は、オスターブレンダーにより混合し測定を行った。均一化が困難な納豆及び大豆缶詰は、JAS 法分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析ハンドブック」（独立行政法人農林水産消費安全技術センター）記載の方法に従い等量の滅菌水を加えて混合した。DNA 濃度の測定結果、十分な量が抽出できない試料については、さらに以下の前処理を追加して行った。</p> <p>①試料の粉碎・均一化が不十分である食品を対象に、試料をドライオープンで DNA インキュベート温度と同じ 65℃で 14 時間乾燥させ、その後ミルサーで粉碎した。</p> <p>②デンプン等の夾雑物質が多い食品を対象に、分解酵素を添加し夾雑物質の分解を試みた。使用する酵素は、プロテイナーゼ K (QIAGEN 社製) と <math>\alpha</math>-アミラーゼ (和光純薬工業社製) とした。</p> <p>③油脂成分等の夾雑物質が多い食品を対象に、試料 10 g に n-ヘキサン (関東化学社製) 20mL を加え 30 秒間振とうし、吸引ろ過することにより脱脂を行った。</p> <p>(5) DNA の抽出方法 1 試料あたり 2 並行で抽出を行い、抽出方法は、消費者庁通知のとおりとした。</p> <p>(6) DNA 量の測定 DNA 試料原液は、分光光度計 GaneSpec III (日立) を用いて、吸光度 230-320nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260nm の値の 1 を 50ng/<math>\mu</math>L DNA として DNA 濃度を算出した。 タンパク質等不純物質由来の影響を見るため、260nm の吸光度/280nm の吸光度の吸光度比を確認し、1.7-2.0 の範囲であるかどうかを確認した。全ての値は、320nm の吸光度により補正した。</p>	

### 3 結果と考察

#### (1) ダイズ加工品の測定結果

大豆加工品 9 品目の DNA 抽出結果を表 1 に示す。DNA 抽出量は、納豆と大豆缶詰以外は、十分な量の DNA を抽出することが出来た。260/280 比は、揚げ豆腐、油揚げ、納豆と大豆缶詰について、1.7-2.0 の範囲を外れた。

DNA の抽出量が  $20 \mu\text{g/mL}$  を下回り、260/280 比も範囲を外れた納豆と大豆缶詰について、前処理を追加で行うこととした。

#### (2) 納豆及び大豆缶詰への前処理の追加

(4) ①～③の前処理を追加した納豆及び大豆缶詰の DNA を測定した結果を表 2 に示す。

試料を乾燥させミルサーで粉砕することにより、納豆及び大豆缶詰において、 $20 \mu\text{g/mL}$  を超える DNA が抽出された。260/280 比は問題なかったが、フェノール等低分子化合物由来の夾雑物質の指標となる 230nm で大きなピークが見られたことから（データ未掲載）、さらなる精製が必要と考えられた。

試料に酵素添加を行った場合は、いずれも DNA の抽出量に大きな違いは見られなかった。

n-ヘキサンにより試料の脱脂を行った場合は、表 1 に比べると納豆は DNA の抽出量は増加したが、ダイズ缶詰はあまり変わらず、いずれも PCR に必要な  $20 \mu\text{g/mL}$  を超える量は抽出することが出来なかった。

また、最も効果が高かった粉砕した納豆試料を、18～30 メッシュ、30～42 メッシュ、42 メッシュ以下と、メッシュ径ごとにふるい分けして別々に DNA の抽出を行った結果、粒子径が小さいほど多くの DNA が抽出されるという傾向があった。

これらの結果から、納豆及び大豆缶詰から DNA を抽出する場合は、物理的により細かく粉砕する方法により多くの DNA を抽出することができる方法であると考えられた。

### 4 今後の研究方向等

今回の結果をもとに、他の前処理を組み合わせることにより、さらに効率的な抽出を検討し、リアルタイム PCR 装置を用いて実際に検査に使用可能な品質の DNA が検出されているのかどうかを確認・検証していくこととしている。

表 1 大豆加工品の DNA 濃度測定結果

	抽出DNAの濃度 260nm/280nm			
	( $\mu\text{g/mL}$ )			
	RUN1	RUN2	RUN1	RUN2
木綿豆腐	40.5	45.8	2.0	2.0
充填豆腐	41.0	49.6	2.0	2.0
納豆	4.3	3.9	1.5	1.7
おから	41.9	61.9	3.5	2.3
揚げ豆腐 全体	50.0	30.2	2.0	1.9
揚げ豆腐 外側を除いたもの	26.2	25.9	2.3	2.1
油揚げ	22.6	23.1	2.1	2.2
大豆缶詰	5.7	8.0	3.5	6.4
みどり大豆穀粒	94.5	92.4	2.0	1.9
きな粉	78.7	76.2	2.0	2.0

表 2 納豆及び大豆缶詰の DNA 濃度測定結果

	抽出DNAの濃度 260nm/280nm			
	( $\mu\text{g/mL}$ )			
	RUN1	RUN2	RUN1	RUN2
納豆粉砕	46.9	31.7	1.7	1.7
大豆粉砕	20.7	38.4	2.0	1.9
大豆酵素添加	5.2	6.8	2.2	1.8
納豆酵素添加	13.4	8.0	1.8	1.8
納豆ヘキサン脱脂	7.6	7.4	1.8	1.4
大豆ヘキサン脱脂	3.0	2.4	1.7	1.6
納豆18～30メッシュ	15.0	20.8	1.7	1.7
納豆30～42メッシュ	21.4	27.2	1.7	1.8
納豆42メッシュ以下	92.0	62.0	1.8	1.8

研究成果報告書（6）

研究課題名	有機フッ素化合物の環境動態及び生物蓄積に関する研究
担当	環境科学部 上席専門研究員 岩渕 勝己、環境科学部長 川村 裕二

【研究①】水質及び底質における新規注目化学物質の分析法及び環境モニタリングに関する共同研究

(H29年度で日韓共同研究における PFAAs を対象としたモニタリング調査が終了となったことから、H30年度は実施しなかった。)

【研究②】パッシブサンプラーを用いた河川中の有機フッ素化合物の測定及び環境動態に関する研究

1 目的

パッシブサンプラーにより環境水中の PFAA の中長期的な平均濃度を測定し、サンプラーへの蓄積量から底質あるいはメダカへの蓄積量を把握できる技術として確立すること。

2 方法及び結果

PFAA をパッシブサンプラーに適用できることは、基礎研究で確認できており、次の段階としてフィールド調査へ適用させるにあたり、必要となる知識や技術を習得するため、文献、学会等で情報収集を行っている。

【研究③】下水処理場における生活由来化学物質の発生原単位の把握とその低減化技術に関する研究～有機フッ素化合物に着目して～

1 目的

下水処理場（STP）を対象とし、流入水の PFAA 濃度から発生原単位を、放流水の PFAA 濃度から排出原単位を把握して、下水道区域からの発生負荷量や環境中への排出負荷量を推計する。また、下水処理工程における除去率についても検討する。

2 方法

対象の STP として、全国から処理人口 20 万人以上の STP 8 か所（A～H 処理場）を選定した。2017 年 2 月～2018 年 2 月にかけて 3～4 回採水し、流入水及び放流水の 24 時間コンポジットを調製し試料水とした。試料水をコンセントレーターで固相カートリッジ（Waters Oasis WAX Plus）に濃縮し、アンモニア含有メタノールで抽出後、濃縮、遠心分離し、上清を LC-MS/MS で測定した。分析対象は、PFAA15 種類とした（カルボン酸系（PFCA）：CXA（X は炭素数）、スルホン酸系（PFSA）：CXS と表記）。

3 結果と考察

各 STP から検出された流入水及び放流水の PFAA 濃度は Table 1 のとおりである。各 STP の流入水及び放流水を調べたところ、PFAA 濃度に明らかな違いがあり、D 処理場では流入水と放流水の両方、G 処理場では放流水が、全 STP の平均総濃度よりも有意に高濃度であった。PFAA 濃度及び組成比は、各 STP 間で異なっていたが、C5A～C9A と C8S はほとんど

Table 1 流入水、放流水の PFAA 濃度 (ng/L)

	influent									effluent								
	A	B	C	D	E	F	G	H	mean±SD	A	B	C	D	E	F	G	H	mean±SD
C5A	1.8	1.5	1.3	6.1	4.1	6.3	5.9	2.0	3.6±2.2	3.2	1.7	1.3	6.7	4.9	6.6	13	2.2	5.0±4.0
C6A	2.8	2.0	1.7	13.3	5.3	10.0	34.2	2.8	9.0±11	4.2	3.9	2.3	15	9.0	10	64	4.3	14±21
C7A	1.5	1.2	1.2	5.8	3.4	4.3	8.2	1.7	3.4±2.5	1.3	1.2	1.0	5.5	4.1	3.7	23	1.7	5.2±7.3
C8A	3.0	1.8	2.9	9.0	5.4	8.8	34.1	3.6	8.6±11	4.6	2.9	3.8	11	8.0	9.9	47	4.5	11±15
C9A	3.9	4.1	3.8	16.9	7.8	4.1	25.8	7.4	9.3±8.0	5.8	3.7	3.7	24	9.4	4.3	527	7.7	73±184
C10A	0.90	0.45	0.45	1.1	1.0	0.59	2.2	0.83	0.94±0.56	1.2	0.63	0.61	1.3	0.83	1.0	6.4	0.56	1.6±2.0
C11A	0.76	0.85	1.0	2.8	1.0	0.72	5.3	1.2	1.7±1.6	0.87	0.33	0.38	1.9	0.44	0.32	5.6	0.34	7.5±19
C12A	0.18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.15	0.54	n.d.	0.11±0.19	0.20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.08	n.d.	0.04±0.07
C13A	n.d.	n.d.	0.15	0.19	n.d.	n.d.	0.28	n.d.	0.08±0.11	0.07	n.d.	0.03	n.d.	n.d.	n.d.	0.05	n.d.	0.02±0.03
C14A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.04	n.d.	0.01±0.01						
C4S	2.2	3.5	4.0	5.5	6.6	3.4	2.3	2.7	3.8±1.6	0.44	0.38	0.77	3.9	2.3	3.2	5.2	1.0	2.1±1.8
C6S	n.d.	1.2	0.66	27	4.0	25	4.9	3.4	8.4±11	0.23	1.0	0.74	21	3.5	22	7.9	2.6	7.3±8.9
C7S	1.0	0.93	0.68	6.5	1.1	1.9	1.0	0.57	1.7±2.0	n.d.	0.08	n.d.	2.4	0.26	0.77	1.9	0.23	0.70±0.92
C8S	3.9	7.1	4.5	93	10	24	23	10	22±30	5.1	5.2	2.7	71	10	23	68	9.2	24±29
C10S	0.89	n.d.	0.46	n.d.	n.d.	0.85	0.48	n.d.	0.34±0.39	0.06	n.d.	0.01±0.02						
total	23	25	23	190	50	90	150	36	73±64	27	21	17	160	53	85	820	34	150±270

n.d.: 検出下限値未満

すべての STP の流入水と流出水から検出された。これらの PFAA は、日本国内における過去の使用量と、

PFAA の水溶性の高さに影響を受けているものと推測された。流入水と放流水で濃度を比較すると、ほぼすべての施設において C5A～C9A は放流水が高濃度であったが、C10A～C13A は放流水が低濃度であった。しかし、スルホン酸系 (PFSA) は、G 処理場を除き、すべての施設において放流水が低濃度であった。有意に高濃度であった D 及び G 処理場を除いて、処理工程における除去率を算出した

(Fig. 1)。下水処理工程中で C10A～C13A 及び PFSA は活性汚泥に吸着して除去され、C5A～C9A は処理中に前駆体から生成していると考えられた。

流入水と放流水の PFAA 濃度と水量、及びそれぞれの STP の処理人口から、人間活動によって発生する、又は下水道を通じて環境中に排出される人口 1,000 人、1 日あたりの原単位を算出した (Fig. 2)。流入水から発生源単位を、放流水から排出原単位を求めたところ、C5A～C9A は、1 日に 1～2 mg 程度発生し、それよりも若干多い量が環境中へ排出されていた。また C4S、C6S、C8S は、1 日に 1.5～4 mg 程度発生するが、下水処理工程中で若干除去されていた。そのほかの PFAA については、発生も排出も少量であった。

人間活動によって発生した PFAA 発生量及び STPs から排出された PFAA 発生量を、発生源単位及び排出原単位から算出した。各 STP における発生量の中央値から、国内から発生又は環境中へ排出される発生量を推計したところ、国内から発生発生量は年間 800 kg (最大は C8S で、210kg)、全国の STP から排出発生量は年間 810 kg (最大は C8S で、190 kg) と算出された。

人間活動によって発生した PFAA 発生量及び STPs から排出された PFAA 発生量を、発生源単位及び排出原単位から算出した。各 STP における発生量の中央値から、国内から発生又は環境中へ排出される発生量を推計したところ、国内から発生発生量は年間 800 kg (最大は C8S で、210kg)、全国の STP から排出発生量は年間 810 kg (最大は C8S で、190 kg) と算出された。

#### 4 今後の研究方向等

今年度は、主に昨年度に採水された試料の分析結果を取りまとめ、下水処理工程における除去率や発生、排出発生原単位の算出、及び国内からの発生量や環境中への排出量の推定を行った。今回の検討には予備試験の結果も含まれており、対象とした STP で年間を通して得られた試料 (季節ごとに採水した試料) がまだ全部が揃ってはいなかったため、暫定的な結果となっているが、今年度に最後の試料を採水し、その分析が終了したことから、季節毎に採水した全データが揃うこととなる。この分析結果については現在データとりまとめ中であり、今後は、季節により特徴的な濃度変化や除去率の変化があるかどうかなど、これまでよりもさらに詳細な解析を行うこととしている。

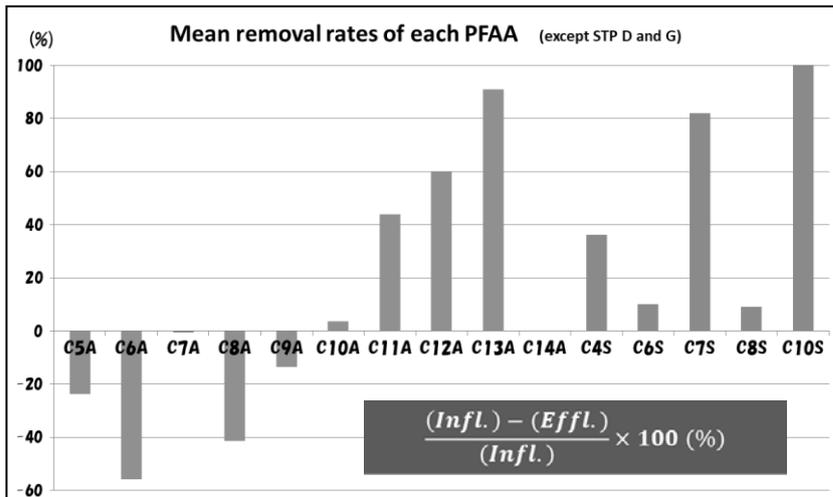


Fig. 1 下水処理工程における PFAA 除去率 (%)

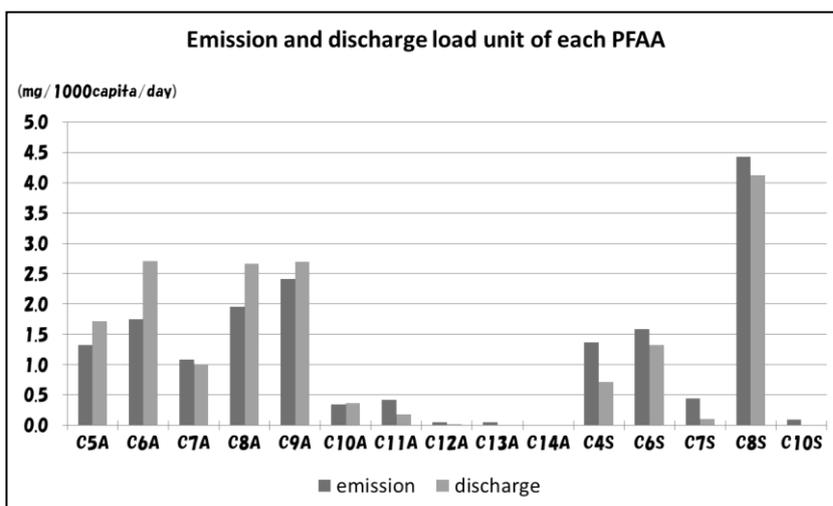


Fig. 2 人口 1,000 人、1 日あたりの発生、排出原単位 (mg)

研究成果報告書（7）

研究課題名	PPCPs (Pharmaceutical and Personal Care Products) 等化学物質実態調査
担 当	環境科学部 主査専門研究員 伊藤 朋子、主任専門研究員 佐々木 和明

1 目的

PPCPs について、LC/MS/MS を活用した測定法を開発し、本県の河川・海域等の水質濃度を測定することで、環境汚染状況を把握しようとするものである。今年度は、環境省化学物質環境実態調査で、環境水中のチアベンダゾール、ピリメタニル及びアゾキシストロビンの分析法を開発した。また、高病原性鳥インフルエンザ発生時の防疫措置に関連し、環境への影響を把握することとなっている陽イオン界面活性剤 (CS) について、昨年度に引き続き検討を行った「スクリーニング測定 (JIS 改良法) と LC/MS/MS による確認試験の検討」の 2 項目について報告する。

2 分析方法の概要と測定結果

2-1 環境水中のチアベンダゾール、ピリメタニル及びアゾキシストロビンの分析法開発

環境水中に存在するチアベンダゾール (TBZ)、アゾキシストロビン (Az) 及びピリメタニル (Py) (用途: 防カビ剤) を、LC/MS/MS で定量する方法を検討した。なお、Az の光分解物である (Z)-アゾキシストロビン (z-Az) について、プレカーサー並びにプロダクトイオンが Az と同一であったため、カラム分離を検討し、同時分析を行った。

[方法] 水質試料にサロゲート物質を添加後、固相カートリッジに通水しメタノールで溶出する。溶出液を精製水で定容したものを試験液とし、LC/MS/MS-SRM で測定する。分析フローを図 1、装置条件を表 1 に示す。

[結果] 本法の検出下限値 (MDL) は、TBZ 0.40 ng/L、Az 0.75 ng/L、z-Az 0.31 ng/L Py 0.17 ng/L であった。また、水質試料 (河川水、海水) を用いた添加回収試験による回収率は、すべての物質が 96~108% (サロゲート回収率 89~94%) の範囲であった。MDL 算出時のクロマトグラムを図 2 に示す。なお、岩手県内の河川水 (豊沢川) 並びに海域 (広田湾) を本法により測定した結果はすべて MDL 未満であった。

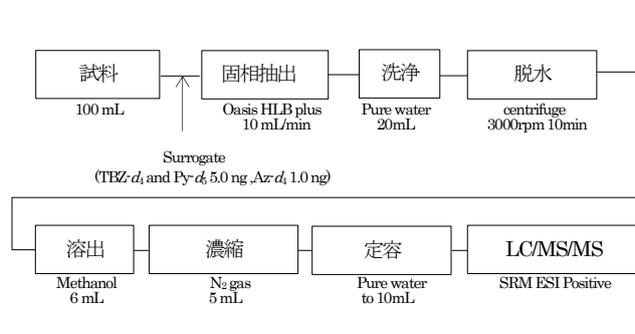


図 1 分析フロー

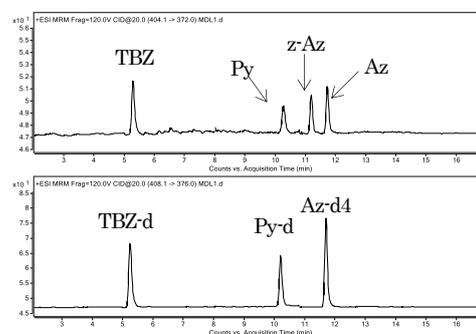


図 2 MDL 試料のクロマトグラム

表 1 装置条件

<p>[LC 条件]</p> <p>使用機種 : Agilent 1200</p> <p>カラム : Agilent 製 Poloshell 150 mm × 2.1 mm, 2.7 μm</p> <p>移動相 : A : 精製水、B : 0.1% ぎ酸添加アセトニトリル</p> <p>0 min A:B=90:10</p> <p>0→9 min A:90→30,B:10→70 linear gradient</p> <p>9→14 min A:B=30:70</p> <p>14→14.01 min A:30→10, B=70→90</p> <p>14.01→16.5=10:90</p> <p>16.51→22 min A:B=90:10</p> <p>カラム流量 : 0.2 mL/min</p> <p>カラム温度 : 40° C</p> <p>試料注入量 : 5 μL</p>	<p>[MS 条件]</p> <p>使用機種 : Agilent 6460 Jet Stream</p> <p>イオン化法 : ESI-Positive (イオンソース Agilent Jet Stream)</p> <p>測定モード : SRM</p> <p>フラグメンター電圧 : TBZ、TBZ-d4 140V、その他 120V</p> <p>コリジョン電圧 : TBZ、TBZ-d4 (37eV)、Py (24eV)、Py-d5 (40eV)、Az、z-Az、Az-d4 (20eV)</p> <p>モニターイオン : TBZ: (定量用) m/z 202.0 &gt; 131.0 (確認用) m/z 202.0 &gt; 174.9、: TBZ-d4 : (定量用) m/z 206.1 &gt; 134.9 (確認用) m/z 206.1 &gt; 178.9、Py : (定量用) m/z 200.1 &gt; 107.1: (確認用) m/z 200.1 &gt; 167.9、Py-d5: (定量用) m/z 205.2 &gt; 185.1 (確認用) m/z 205.2 &gt; 81.0、Az、z-Az: (定量用) m/z 404.1 &gt; 372.0: (確認用) m/z 404.1 &gt; 344.1、Az-d4: (定量用) m/z 408.1 &gt; 376.0: (確認用) m/z 408.1 &gt; 348.1</p>
--	---

## 2-2 陽イオン界面活性剤 (CS) 調査結果

### 2-2-1 スクリーニング結果

昨年度検討した JIS K 0102 2013 年度版付属書 (参考) 補足の改良法 (図 2-1) を用いて県内 5 地点の CS 測定を実施した。結果を表 2 に示す。この結果は、JIS 法 (オレンジ II 吸光光度法) に準じて、CS をテトラデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリドとして表わしたものである。

また岩手県鳥インフルエンザ対応マニュアルに消毒剤と指定されているモノ、ビス (塩化トリメチルアンモニウムメチレン) アルキルトルエン (製品名:パコマ) についての添加回収 (2 ppm) を同時に実施したところ回収率は、98.2~104.4% (n=3) と良好であった。今後も本法における検出下限の低減化、パコマ以外の消毒剤製品等についての本法の適用等引き続き検討していく方針である。

### 2-2-2 成分分析結果

2-2-1 において、いくつかの地点で陽イオン界面活性剤が検出されたことから、検出成分がパコマであるか確認するため、LC/MS/MS-SRM (ESI positive) による成分分析を実施した。なお、今回の測定では、パコマの主成分である、モノ、ビス (塩化トリメチルアンモニウムメチレン) アルキルトルエンのほか、パコマと同じく、畜産関係の消毒剤として用いられるアストップの成分である塩化ジデシルジメチルアンモニウムを対象とした。サンプルブ

ランク、標準液及び代表的な環境試料のクロマトグラムを図 4 に示す。大向橋ではアストップ、報国橋ではパコマのモノ体とアストップの成分が検出された。なお、アストップは装置への吸着が強く、サンプルブランクからも微量ながらピークが検出された。

## 3 まとめ

LC/MS/MS による環境水中の TBZ, PY, Az の分析法開発では、全ての物質について 1.0 ng/L オーダーの測定が可能となったほか、本法による県内河川及び海域の水質測定では、全ての地点で MDL 未満となった。

陽イオン界面活性剤の測定では、JIS 改良法による測定で陽イオン界面活性剤が検出された地点において、パコマだけでなく、アストップその他の成分が検出されると考えられる地点もあった。今後は、JIS 改良法によるスクリーニング測定と、LC/MS/MS による確認試験について、さらに検討を進めたいと考えている。

試料 250ml (pH7 に調整)

↓ WAX 通液 (WAX:メタノール 10ml と水 10ml でコンデショング)

↓ 10ml 精製水で洗浄

↓ メタノール 5mL で溶出

↓ 窒素気流下で乾燥

↓ 3ml 酢酸酢酸トリウム+0.3g 塩化トリウム+2.5ml ホンダ 2 溶液を加え混合する

↓ 2.5ml クロホルムを加え、4 分間激しく振り混ぜ、放置

↓ クロホルム層をポリ製遠沈管に移す 2 回

↓ クロホルムで 5ml にする

↓ 0.6g 硫酸トリウムを加えて振り混ぜ、水分を除く

↓ 波長 485nm で測定

図 3 分析フロー

表 2 県内河川調査結果

サンプル名 2018.12.16	試料濃度 (mg/L)
報国橋	0.024
大向橋	0.035
岩谷橋	0.038
芋田橋	<0.02
南大橋	<0.02

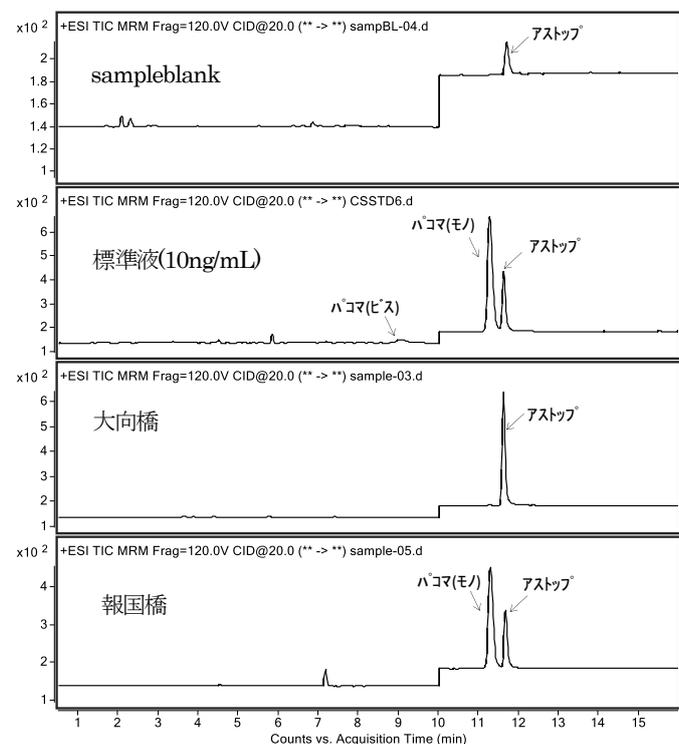


図 4 LC/MS/MS による成分分析のクロマトグラム

研究成果報告書（8）

研究課題名	化審法関連物質の排出源及び動態の解明
担 当	環境科学部 上席専門研究員 岩淵勝己

1 目的

昨年度までの研究成果として、環境水レベルの濃度の PFOS 及び PFOA をパッシブサンプラーの 1 つである POCIS (Polar organic chemical integrative sampler) でサンプリングして濃度を算出することが可能であり、水温と  $R_s$  の間に相関があることも確認できたことから、フィールドへ展開させていくための基礎データとして、今年度は、環境水への適用可能性、また PFOS、PFOA 以外の PFAA への適用可能性を確認することを目的とした。

2 方法

【ターゲット物質】PFAA15 種類 (カルボン酸系 (PFCA) : CXA (X は炭素数)、スルホン酸系 (PFSA) : CXS と表記)。

【試験方法】昨年度までに検討した条件で POCIS を作成した (membrane filter : PALL 社製 (材質 : PES)、固相 (Solid Phase ; SP) : Waters 社製 Oasis WAX (POCIS1 つに 200mg 使用))。環境水 (下水処理施設からの放流水が多く入る地点の河川水) を 1 L ビーカー 5 個に入れ、またブランク用に 1 個のビーカーに超純水を入れ、POCIS を浸漬した (Fig. 1)。20°C の恒温槽で一定時間 (1、3、6、9、14 日間) 放置後に、SP に吸着した PFOA・PFOS 量及び水溶液濃度を測定してサンプリングレート ( $R_s$ ) を算出した。

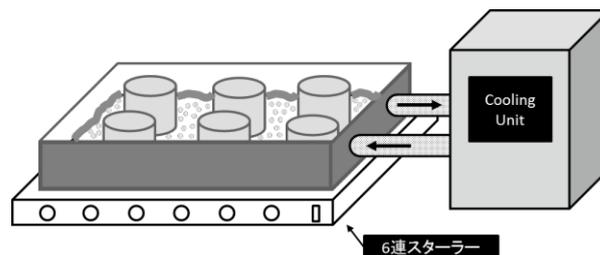


Fig. 1 実験装置

【サンプリングレートの算出】POCIS によるサンプリングでは、一般に以下の関係が成立する。

$$C_w = \frac{M_s}{R_s \cdot t} \quad (C_w: \text{water concentration (ng/L)}, M_s: \text{mass of adsorption (ng)}, R_s: \text{sampling rate (L/day)}, t: \text{time (day)})$$

$M_s/C_w = CF_t$  とおくと、 $CF_t = R_s \cdot t$  となり、 $CF_t$  は  $t$  の関数となる。 $M_s/C_w$  と  $t$  の散布図から得られた回帰直線の傾きが  $R_s$  となることから、測定結果から直線回帰し、 $R_s$  を算出した。

3 結果と考察

(1) 各 PFAA の  $CF_t$

実際の環境水の水温を想定して 20°C で試験し、得られた  $M_s$ 、 $C_w$  から算出した  $CF_t$  を Table 1 に示す。環境水からは、PFCA は C5A~C11A、PFSA は C4S、C6S、C8S が検出され、また、固相からも同様に検出されたことから、 $CF_t$  が算出可能であった。C11A については、環境水からは検出されていたものの、1、3、6 日目の固相からは検出されず、その間の  $CF_t$  は 0 となった。一方、C12A~C14A と C7S、C10S については、環境水から検出されず、 $CF_t$  は算出できなかった。

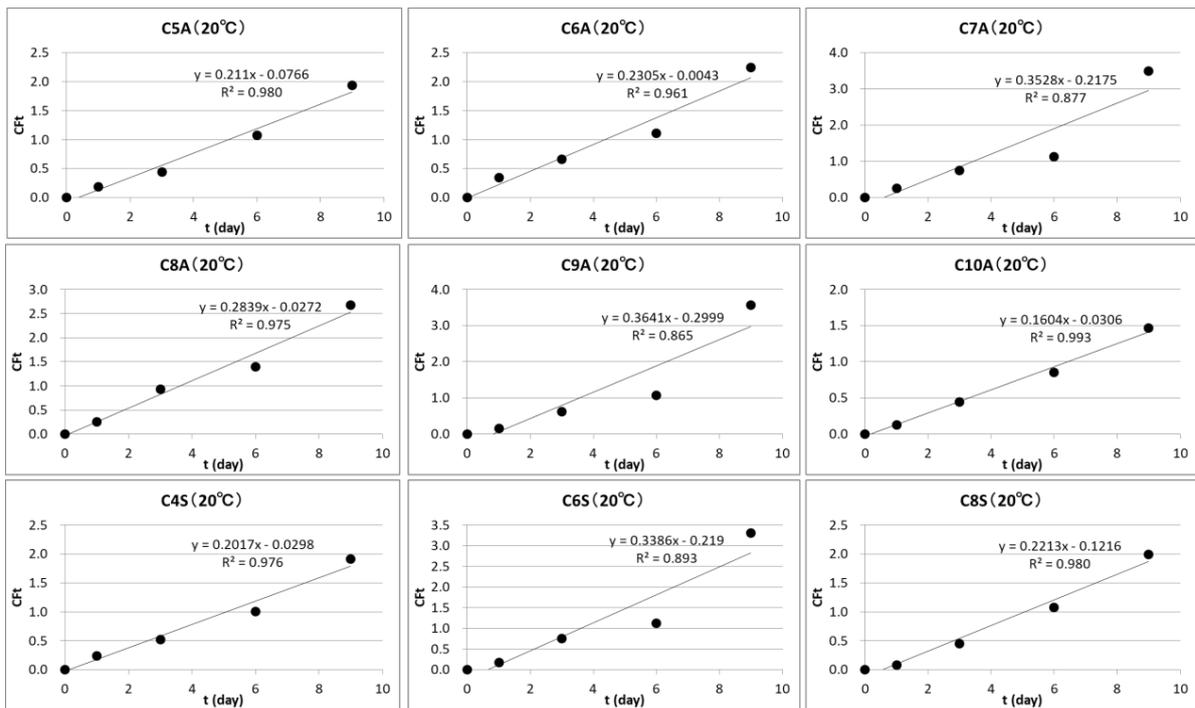
PFCA の C12A~C14A、PFSA の C7S、C10S は、環境水中にほとんど存在していなかったため、POCIS にも吸着されなかった。長鎖の PFAA は短鎖のものよりも疎水性が高いことから、溶存体ではほとんど存在しないものと考えられる。C7S は C8S よりも炭素数が少ないことから、疎水性は C8S よりも低いと考えられるため、環境水中に溶存体として存在していれば、POCIS による吸着は可能であると推察される。このことから、本研究で適用した POCIS の条件であれば、C5A~C10A、C4S~C8S の環境水中の濃度を把握することが可能であると考えられた。

**Table 1** 各 PFAA の  $CF_t$

	t	C5A	C6A	C7A	C8A	C9A	C10A	C11A	C12A	C13A	C14A
PFCA	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
	1	0.18	0.34	0.25	0.25	0.16	0.13	0	-	-	-
	3	0.44	0.66	0.74	0.93	0.62	0.44	0	-	-	-
	6	1.07	1.1	1.1	1.4	1.1	0.85	0	-	-	-
	9	1.94	2.2	3.5	2.7	3.6	1.5	1.2	-	-	-
	t	C4S	C6S	C7S	C8S	C10S					
PFSA	0	0	0	-	0	-					
	1	0.24	0.17	-	0.08	-					
	3	0.52	0.75	-	0.45	-					
	6	1.0	1.1	-	1.1	-					
	9	1.9	3.3	-	2.0	-					

(2) 各 PFAA の  $R_s$

各 PFAA の  $CF_t$  と経過日数  $t$  について、その回帰直線（線形回帰）から  $R_s$  を求めた。  $t = 0$  (day) 以外で環境水及び固相から検出し、 $CF_t$  を算出することのできた C5A~C10A と C4S、C6S、C8S について検討した。各 PFAA の  $CF_t$  と経過日数  $t$  の関係は Fig. 2 のとおりである。また、本試験から得られた  $R_s$  (= 回帰係数)、決定係数 ( $R^2$ ) 及び P 値を Table 2 に示す。



**Fig. 2** 各 PFAA の  $CF_t$  と経過日数  $t$  の関係

**Table 2** 本試験から得られた  $R_s$ 、 $R^2$ 、P 値

	C5A	C6A	C7A	C8A	C9A	C10A	C4S	C6S	C8S
$R_s$ (=回帰係数)	0.21	0.23	0.35	0.28	0.36	0.16	0.20	0.34	0.22
$R^2$	0.980	0.961	0.877	0.975	0.865	0.993	0.976	0.893	0.980
P 値	0.00002	0.0001	0.002	0.00004	0.003	0.000002	0.00003	0.001	0.00002

各 PFAA の  $CF_t$  と経過日数  $t$  の線形回帰の決定係数は、0.87~0.99 程度であった。また相関係数の検定を行ったところすべてにおいて有意 (1 %水準) であり、高い相関性があることが確認された。回帰直線の傾きから、各 PFAA のサンプリングレート  $R_s$  を求めたところ、C5A が 0.21、C6A が 0.23、C7A が 0.35、C8A が 0.28、C9A が 0.36、C10A が 0.16、C4S が 0.20、C6S が 0.34、C8S が 0.22 程度であることが明らかとなった。

#### 4 今後の研究方向等

これまでのラボでの試験において、POCIS による代表的な PFAA である PFOS (C8S) と PFOA (C8A) の濃度の把握は可能であることが確認されていたが、今年度の試験において C8S、C8A だけでなく、さらに環境水中において適用範囲を広げられることが明らかとなった。今後は、河川等実際のフィールドにおいて試験を行い、採水して分析した結果と POCIS でサンプリングして分析した結果を比較し、フィールドにおけるパッシブサンプラーの有用性を実証していくこととする。

研究成果報告書（9）

研究課題名	「重要な絶滅危惧植物を存続させるための技術開発に関する研究」
担 当	地球科学部 上席専門研究員 小山田智彰
<p><b>1 目的</b></p> <p>絶滅の危険性が極めて高い植物、特に「絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律（「種の保存法」）」の指定を受けている絶滅危惧植物を対象に、自生個体を存続させるための手法と苗生産を行うための技術の開発を行う。また、国や他機関からの絶滅危惧植物の保全に対する要請や指導依頼に対応し、研究によって培われた技術により国内屈指の技術支援実績を積み重ねて行き、希少野生植物の保護に資する。</p> <p>【研究対象絶滅危惧植物】</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・岩手県に自生する「種の保存法」指定植物：アツモリソウ【研究分類①】</li> <li>・国から要請を受けた「種の保存法」指定植物：チョウセンキバナアツモリソウ【研究分類②】</li> </ul> <p><b>2 実施内容</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) 自生地の調査及び周辺環境の状況確認、保護対策への取り組み、先進地の活動状況についての調査を行う。</li> <li>(2) 種を存続させるための科学的な技術開発とその活用の評価を行う。</li> <li>(3) 国、県、市町村等の依頼に対応した技術指導を行う。（地域資源の活用等を含む）</li> </ol> <p><b>3 成果</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) アツモリソウについては、開発に伴うアツモリソウの保護措置と野生株の移植に成功した。さらに国への許可申請を行った後に採種・発芽試験に取り組み、プラスチック内での発芽まで到達するなど成果が得られている。（「種の保存法」施行以来、野生株の移植実施と成功の報告は初めてとなり、平成 31 年 3 月に原著論文を投稿） 【研究分類①】</li> <li>(2) チョウセンキバナアツモリソウは、環境省から保存種子を受けて発芽試験に取り組み、種子の発芽・育成と野外栽培を開始するまでの成果が得られている。（国内において成功の前例なし）【研究分類②】</li> </ol> <p>○学会（口頭発表） 第 19 回自然環境復元学会全国大会（口頭発表 1 題） ・生息域外保全を目的にしたチョウセンキバナアツモリソウの苗生産—H27 年環境省採種・新宿御苑保存種子の発芽—</p> <p><b>4 今後の取り組み</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) 希少植物の絶滅回避に有効な技術を継続して開発する。</li> <li>(2) 「種の保存法」指定植物の生息域外保全に有効な技術を継続して開発する。</li> <li>(3) 地域資源の活用に関する技術を継続して開発する。</li> <li>(4) 国、地方公共団体等からの希少野生植物の保護に対する依頼に応じて技術指導を行う。</li> <li>(5) 研究成果の各種発表と学会発表を進める。</li> </ol>	

表1 主な発表業績(平成30年度)

No.	掲載書誌名刊号頁	年月日	カテゴリー	タイトル名
1	◆環境省東北地方環境事務所報告 ◆環境省新宿御苑管理事務所報告	2018/10/3 2018/10/10	発表	チョウセンキバナアツモリソウ保存種子の発芽
2	やまくさ69	2018/11/15	報文	アツモリソウ花酵母の増殖
3	●第19回自然環境復元学会研究発表会要旨	2019/2/15	発表	生息域外保全を目的にしたチョウセンキバナアツモリソウの苗生産 -H27年環境省採種・新宿御苑保存種子の発芽-
4	自然環境研究センター訪問・講演	2019/2/16	講演	アツモリソウ-生息域内保全と域外保全の実際-



図1 保護柵を襲撃するツキノワグマ (移植: A1③株)

Photo : Asian black bears attacking a protective barrier (Transplant A1③)

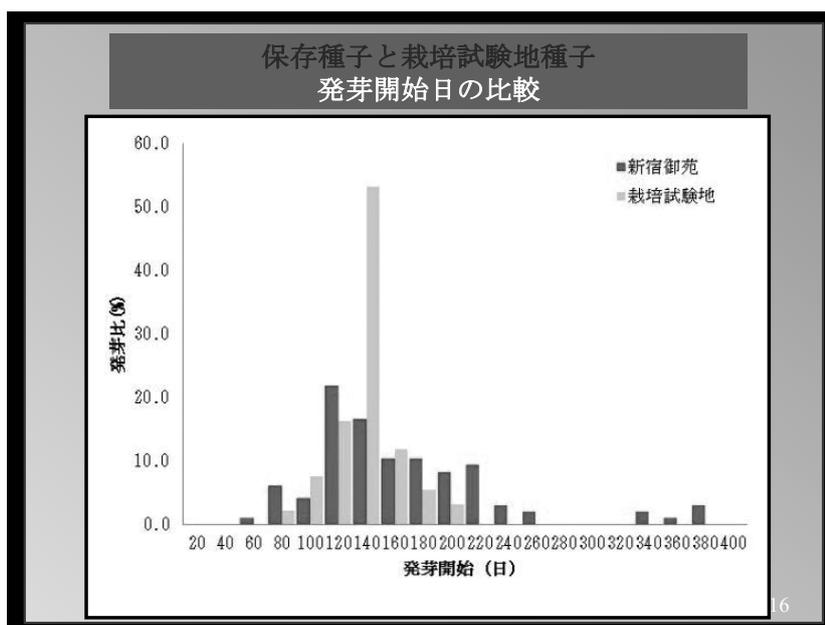


図2 チョウセンキバナアツモリソウの発芽 (長期保存種子と保存処理のされていない種子) (自然環境復元学会 発表スライドより)

研究課題名	ツキノワグマの個体群動態と将来予測手法の開発ならびに人里への出没メカニズムの解明
担 当	地球科学部 専門研究員 鞍懸 重和

### 1 目的

継続したヘア・トラップ調査の結果を組み入れた、岩手版の個体群動態モデルと将来予測モデルを開発する。また、ツキノワグマ（以下、クマ）にGPSテレメトリー首輪を装着して詳細な行動圏を把握し、大量出没年時の行動圏の変化や個体数密度の変化等を観測してクマの人里への出没要因を検討する。

### 2 方法

本年度はクマにGPSテレメトリー首輪を装着し、行動圏を把握することとともに、出没が多くなる7月、8月前後の餌資源の季節変化を調査した。

岩手大学御明神演習林内に2基のドラム缶ワナを5月下旬に、もう2基を9月上旬に設置した。各ドラム缶ワナの周囲に遠隔監視装置1機を設置した。(ISE社製、ほかぱと) エサはハチミツを利用し交換は週に1回行った。捕獲が確認された場合には、不動化し、各部形態を測定した後、体毛60本、血液20cc及び歯1本を採取し、GPSテレメトリー首輪(Followit社製TellusGPS)を装着して放獣した。GPSテレメトリーの測位間隔について、5~8月は1時間に1点、9~11月は2時間に1点、12月~4月は24時間に1点に設定した。捕獲した個体から得られた6月から11月までの2時間おきの測位点から、可変カーネル法により50%行動圏及び95%行動圏を算出した。また、半径50mの円内で連続して3点以上測位した地点を集中利用地点として、6月15日から10月15日までに確認された集中利用地点の中の111地点について、2週間以内に現地踏査し、確認された痕跡を記録した。

### 3 結果・考察

5月29日に推定年齢1.5才メス1個体(F1801)、5月31日に推定年齢2.5才メス1個体(F1703)、6月16日に推定年齢3~4才オス1個体(M1801)、6月26日に推定年齢2~3才オス1個体(M1802)、10月21日に推定年齢5才以上のオス1個体(M1803)の計5個体を捕獲した。7月以前に捕獲された4頭の50%行動圏及び95%行動圏面積は、F1801で4.0km<sup>2</sup>と24.8km<sup>2</sup>、F1703で17.8km<sup>2</sup>と151.8km<sup>2</sup>(図1)、M1801で55.6km<sup>2</sup>と4223.1

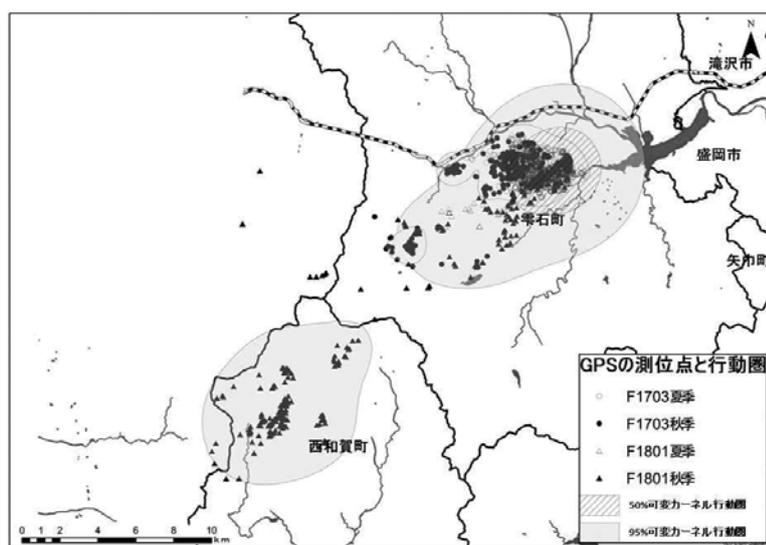


図1 メス2個体のGPSの測位点と行動圏

km<sup>2</sup>, M1802で132.5km<sup>2</sup>と665.9km<sup>2</sup>であった(図2)。

いずれの個体も6~8月に400m未満の低標高帯に滞在し、9月上旬から400m以上の標高帯に移動した。また行動圏はメスよりもオスが広い傾向にあり、移動距離も長い傾向にあった。

痕跡調査では、6月中旬から8月中旬は倒木、クマハギ及びヤマグワの痕跡出現率が高かったが、8月中旬以降は倒木とヤマグワの痕跡出現率が下がり、代わってクリ、ミズキ及びオニグルミの痕跡出現頻度が高くなった。

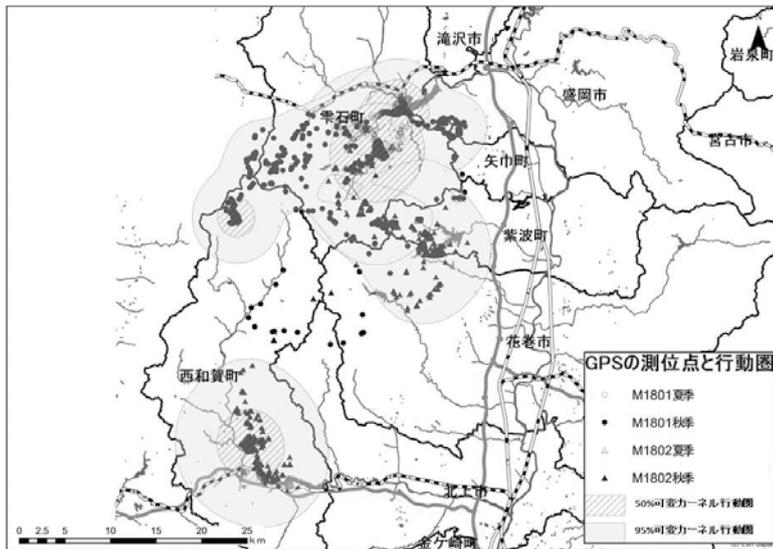


図2 オス2個体のGPSの測位点と行動圏

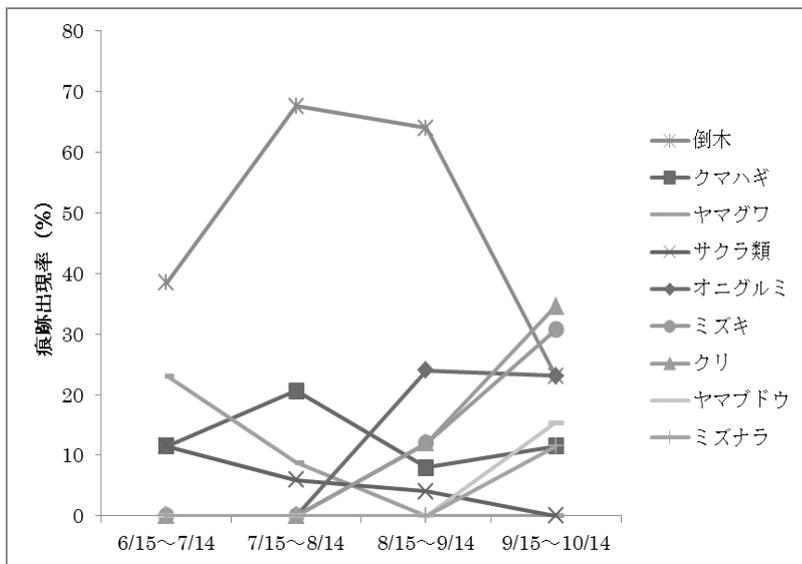


図3 痕跡種類別出現率の推移

これらのことから、クマが8月中旬まではヤマグワ、サクラ類及びアリを利用していたのに対し、9月上旬からオニグルミ、クリ及びミズキ等の堅果、液果類に餌資源がシフトし、それともない400m以上の標高帯に移動したものと推察された。

2010年の全国的なツキノワグマの大量出没時には、11月まで集落周辺に滞在した事例もあり、人里への大量出没のメカニズムを解明する上で、夏季だけでなく秋季の季節移動の要因を検討する必要があるため、今後も出没前後のクマの餌資源の利用状況のモニタリングを継続していくことが必要である。

#### 4 今後の研究方向等

次年度もヘア・トラップ調査を継続してモデル地域の個体数密度を推定し、経年変化をモニタリングする。クマの行動圏調査については、新たな個体にGPSを装着する予定である。そして新しい行動解析法を用いて個体の移動や活動中の滞在、休息中の滞在で行動区分における植生利用の相違や、季節による特性について詳細に検討する。

研究成果報告書（11）

研究課題名	イヌワシの生息数維持に向けた保全生態学的研究
担当	地球科学部 上席専門研究員 前田 琢
<p><b>1 目的</b></p> <p>岩手県内に生息するイヌワシは、これまでに 35 つがいが確認されている一方、2002 年以降は消失したつがいも確認され、その数は 6 つがいに増えている。消失つがいが現れてきた背景には、長年続く繁殖成功率の低迷があると推測される。イヌワシの生息数を今後安定的に維持していくためには、繁殖率の向上に寄与する保全方法を明らかにすることが重要となる。</p> <p>岩手県内のイヌワシの生息状況や生態的特性は、これまでの研究によって詳しい解明が進められてきたが、個体の移動分散、遺伝的特性、生存率など、今後の生息動向を予測するうえで必要となる事項には、未解明な点も少なくない。また、つがいごとに異なる繁殖成績や営巣場所の選択についても、地形や土地利用、植生、気象要因等を考慮した多角的な分析を行なう必要がある。本研究では、このような課題に取り組むことを通じて、岩手県のイヌワシの生息数を維持していくために必要な保全手法を明らかにし、提言を行なうことを目的とする。</p> <p>30 年度（2018 年）に調査研究を行なった項目は以下のとおりである： ①県内に生息するつがいの動向および繁殖状況の調査、②個体識別による移動分散調査、③羽根等を利用した遺伝子解析（京都大学野生動物研究センターとの共同研究）、④生息環境特性を考慮した繁殖成績の分析（横浜国立大学との共同研究）。</p> <p><b>2 方法</b></p> <p>① 県内で確認されている全つがいを対象に、繁殖期全般にわたる行動、巣の状態、ひなの生育状況等を調査し、繁殖経過を明らかにした。また、これまでに生息が確認されていない地域で、新たなつがいや営巣地を発見するための探索調査を実施した。調査したつがいは可能な限り個体識別を行ない、個体の入れ替わり等も明らかにした。</p> <p>② 県内外で観察されたイヌワシを写真撮影するとともに、各地の観察者が撮影した個体の映像も収集、整理し、特徴の比較を行なった。そして、同一個体を判別することにより、個体の移動分散の状況を明らかにした。</p> <p>③ イヌワシの巣の周辺や採餌場所から、脱落した羽根、ペレット、卵殻、糞といった試料を採集するとともに、剥製標本や飼育個体などからも試料を収集した。得られた試料から DNA を抽出し、核 DNA のマイクロサテライトおよびミトコンドリア DNA のコントロール領域（CR）や擬似コントロール領域（<math>\Psi</math>CR）等について、多様性やハプロタイプの解析を行なった。マイクロサテライトの分析にあたっては、既存のマーカに加え、独自に開発したイヌワシ専用のマーカも用いた。特定の 1 個体については、全ゲノム解析を行なった。また、個体群存続可能性分析（PVA）を用いて、遺伝的多様性を考慮した飼育個体群の個体数推移を予測した。</p> <p>④ 岩手県内で 2002 年以降使用されている 77 巣について、JAXA 衛星写真判別データや国土数値情報を利用して、巣の周辺の環境条件（標高、傾斜、土地利用、植生など）を 1km 四方スケールで集計し、繁殖成績（2002～18 年の巣立ち数）との関係を分析した。</p> <p><b>3 結果</b></p> <p>① 2018 年には県全体で 28 つがいの生息が確認され、このうち 14 つがいで抱卵、8 つがいで育雛、3 つがいでひなの巣立ちが観察された。繁殖成功率は 10.7%であり、過去 10 年間の平均 16%を下回る結果となった。新たなつがいや営巣場所の発見はなかった。45～57 日齢で死亡が確認されたひな 1 羽を回収し、解剖検査を行なったところ、低栄養状態であったことや、出血性腸炎、吸虫の寄生が確認された。</p>	

② 同一個体であることが確認できた個体映像が新たに複数得られ、なかでも 2016 年に岩手町で巣立ちした可能性の高い若鳥が、約 91 キロ離れた住田町や一関市で再確認され、一関市では既存の個体とつがいになる事例を得ることができた。また、釜石市に生息する成鳥雄個体が、約 17 キロ離れた遠野市に出現していたことも明らかになった。

③ イヌワシから得られた全ゲノム情報に基づいて、有効集団サイズの歴史的変遷について解析を行なったところ、ニホンイヌワシの祖先種は北米の祖先種から約 110 万年前に亜種分化したことが示唆されたほか、10 万年前に有効集団サイズが急激に増加していたことが推定された。個体群存続可能性分析 (PVA) では、3 つがいのみが繁殖を続けている現在の飼育個体群は、100 年後に遺伝的多様性の 25.6% が失われ、156 年目までに絶滅すると予想された。

④ 標高、傾斜、土地利用、植生などに関する 47 要因を用いて、繁殖成績を目的変数とした回帰モデルを作成した結果、標高が低く、傾斜が急峻な営巣地ほど、繁殖成績が有意に高い傾向がみられた。一方、土地利用や植生に関する要因は、ほとんどがモデルに寄与しなかった。営巣地を岩棚 (53 か所) と樹上 (24 か所) に分けた場合にも、同様に有意な関係がみられたが、関係がより強く現れることはなかった。

#### 4 今後の研究方向等

(1) 各営巣地において繁殖状況の把握や失敗原因の解明を進めるとともに、未確認つがいや消失つがいが示唆される地域を中心に、引き続き情報収集や探索調査を行なう。

(2) イヌワシの採餌に好適な環境を、衛星写真から独自に抽出して GIS を用いて数値化し、他の要因とともにつがい間にみられる繁殖成績の解明に活用する。

(3) 個体の映像収集を促進し、従来の知見にない移動分散の実態を明らかにする。

(4) イヌワシ専用の DNA マーカーを追加開発し、個体識別や近親度の解析方法について検討する。また、機能遺伝子の存在についても検討し、個体の適応能力などの評価を目指す。

(5) 個体ベースモデルによるシミュレーション等を用いて、さまざまな条件下でのイヌワシの存続可能性について検討する。

## 研究成果報告書（12）

<b>研究課題名</b>	<b>五葉山地域に生息するニホンジカの個体数推定</b>
<b>担 当</b>	<b>地球科学部 専門研究員 鞍懸重和</b>

### 1 目的

岩手県では、ニホンジカに対する様々なモニタリング調査を実施して保護管理計画を運用してきた。しかし急激な分布の拡大、里周辺に生息するニホンジカの個体の増加など、従来までの個体数推定法では正確な生息状況並びに将来予測が不可能になっている。そこで本研究では個々の事業で蓄積されたデータを用いて、ヘリコプター調査に代わる五葉山地域の個体数推定法を確立することを目的とした。

### 2 方法

現在、糞塊密度調査結果による Harvest-based model を用いる個体数推定法を検討しているが、本手法による個体数推定では、推定期間内に分布拡大期等の生息状況が異なる地域が存在する場合、地域を分離し評価するモデルが必要となる。そこで今年度は、推定対象地域を分け、個体数密度指標に用いる糞塊密度を地域ごとに比較し、データの傾向を把握した。

糞塊密度調査は5km×5km メッシュを調査単位とし、調査メッシュ内の主要な尾根上に2～3kmの踏査線を設定した。調査線の左右1m、計2mの幅内の10粒以上の糞塊数を記録し、糞塊密度は踏査距離1kmあたりの糞塊数とした。地域は五葉山を中心とした周囲25メッシュを五葉山周辺地域、北上川東側と閉伊川南側に囲まれたメッシュから五葉山周辺地域を除いたものを北上南部地域、そしてそれ以外のメッシュを北上北部とし、2006年及び2018年の糞塊密度を地域ごとに Steel-Dwass 検定により比較した。

### 3 結果・考察

2006年の五葉山周辺地域、北上南部地域及び北上北部地域における糞塊密度の平均値は、それぞれ58.4個/km、15.0個/km及び4.5個/kmであり、五葉山周辺地域の糞塊密度は、北上北南部地域及び北上北部地域より有意に多かった（図1）。一方2018年の五葉山周辺地域、北上南部地域及び北上北部地域における糞塊密度の平均値は、それぞれ48.4個/km、44.1個/km及び10.7個/kmであり、五葉山周辺地域及び北上北南部地域における糞塊密度は北上北部地域より有意に多かった（図2）。これは、地域により糞塊密度に差があり、その傾向として狭い地域で継続的に高い捕獲圧を維持してきた五葉山周辺地域に対し、広域な北上南部地域においては捕獲圧が低く、2006年時よりも個体数密度が高まっていることが考えられた。

### 4 今後の研究方向等

岩手県では過去にシカの歯、腎臓を収集していたことから、齢別の栄養状態と自然増加率の関係を明らかにし、個体数推定モデルに導入可能かを検討する。

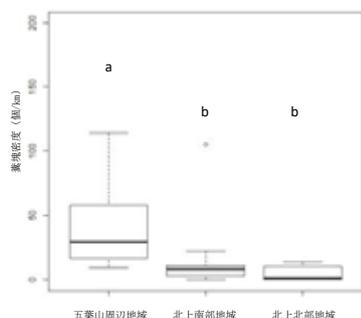


図1 2006年の地域ごとの糞塊密度

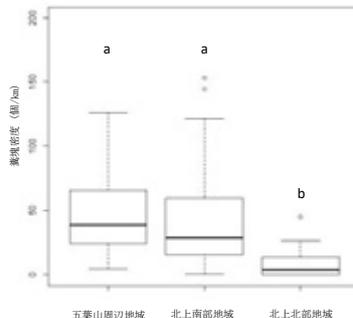


図2 2018年の地域ごとの糞塊密度

## 研究成果報告書（13）

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 菊池一馬、中村隆
1 目的	<p>酸性雨の原因物質となる大気中のガス成分及びエアロゾル成分の濃度をモニタリングし、組成の変化を気象条件等に注目し解析することで、本県における酸性雨の実態把握に資する。</p> <p>全国環境研協議会酸性雨広域大気汚染調査研究部会第6次酸性雨全国調査（以下、「全環研調査」という。）に参加することで、分析技術の向上に資するとともに、広域的な大気汚染の実態把握に資する。</p>
2 方法	<p>調査地点は盛岡市の1地点とし、当センターの屋上にて、原則2週間単位のサンプリングを通年連続で行った。調査期間は2018年4月2日から2019年4月1日までとし、サンプリングは全26回行った。</p> <p>サンプリング装置の概要を図1に示す。サンプリング装置は、全環研調査要領に基づくフィルターパック法とした。これは、異なる性質のフィルターを連続設置し、ポンプで吸引することで大気中のガス成分及びエアロゾル成分をそれぞれのフィルターに捕集する方法である。捕集後のフィルターはそれぞれ水+超音波等で成分を抽出し、イオンクロマトグラフ法により分析を行った。</p> <p>本年度はフィルターパック法による通年調査の初年度であり、当センターにおけるサンプリングの正確さを検証する必要があることから、測定結果の評価を行った。評価項目は、F<sub>0</sub>におけるイオンの総量、F<sub>0</sub>におけるイオンバランス、全フィルターのCl/Na比、全フィルターのMg/Na比とした。F<sub>0</sub>におけるイオンの総量及びF<sub>0</sub>におけるイオンバランスは、全環研調査要領に定められる基準値を用いて判定した。Cl/Na比及びMg/Na比は、調査地点で同時並行して行った降水及び降下物のバルク採取により、通年、概ね海塩組成比に近い測定結果が得られたことから、海塩組成比を目安に判定した。</p>
3 結果	<p>(1) 各成分の濃度推移</p> <p>2018年度における各成分の形態別濃度推移を図2～図9にそれぞれ示す。硫黄酸化物成分及びアンモニア成分については、ガスとしての存在割合が大きかった。窒素酸化物成分は、ガス、微小粒子及び粗大粒子のいずれにも存在しており、いずれかの形態が常に多いということはない。海塩起源成分であるナトリウムイオン、塩化物イオン、カルシウムイオン及びマグネシウムイオンは、いずれも微小粒子よりも粗大粒子に多く存在していた。植物の燃焼等を起源にもつカリウムイオンは、微小粒子と粗大粒子が同等程度存在していた。</p> <p>(2) 測定結果の評価</p> <p>F<sub>0</sub>におけるイオンの総量、F<sub>0</sub>におけるイオンバランス及び全フィルターのCl/Na比について測定結果の評価を行ったところ、いずれの項目も適正であった回は9回、いずれかの項目に不適正があった回は17回あった。特に7月～10月は、F<sub>0</sub>におけるイオンの総量及び全フィルターのCl/Na比の不適正が多く、リークの可能性があった。リークチェックや0リングの交換等により徐々に改善したところ、12月～3月は適正になる回が多く、9回中6回が適正であった。Mg/Na比は全結果において0.10～0.16であり、降水及び降下物のバルク採取が0.25程度であるのに対して低い結果となったことから、今後原因を追究していく。</p>
4 今後の研究方向等	<p>大気汚染状況の長期的な推移を把握し、汚染の実態を解明するために、今後もモニタリングを継続する必要がある。全環研調査にも引き続き参加する。</p> <p>今後は、フィルターパック法によるサンプリングを検証しより正確なデータを蓄積していくとともに、各成分の存在形態の関係性について解析していく。</p>

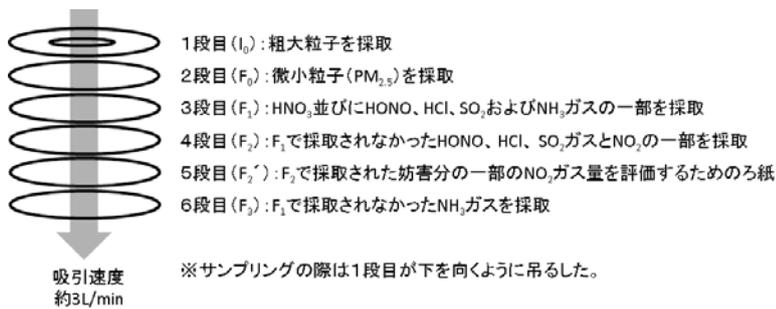


図1 フィルターパック法採取装置の概要

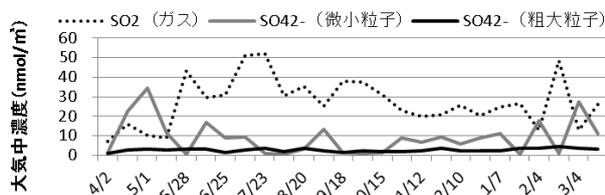


図2 硫酸化合物成分の形態別濃度推移(2018年度)

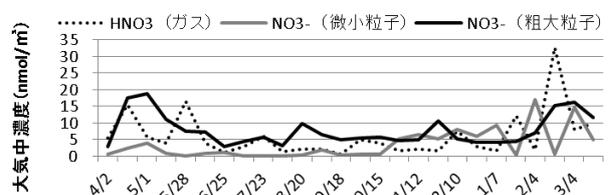


図3 窒素酸化合物成分の形態別濃度推移(2018年度)

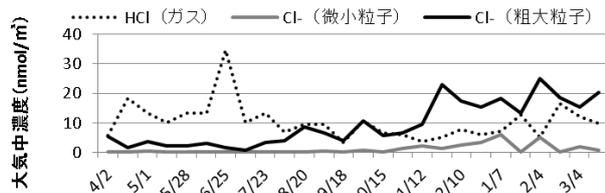


図4 塩化物成分の形態別濃度推移(2018年度)

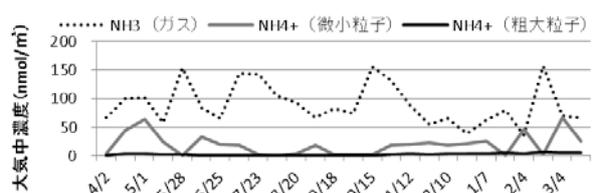


図5 アンモニア成分の形態別濃度推移(2018年度)

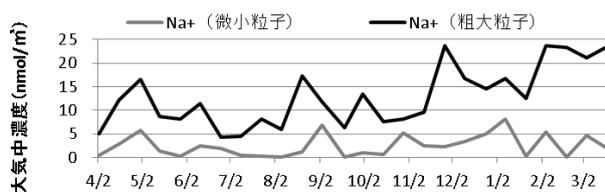


図6 ナトリウムイオンの形態別濃度推移(2018年度)

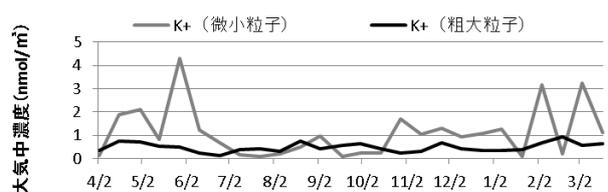


図7 カリウムイオンの形態別濃度推移(2018年度)



図8 カルシウムイオンの形態別濃度推移(2018年度)

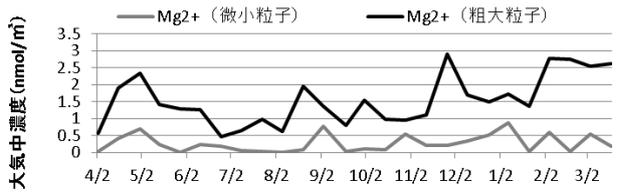


図9 マグネシウムイオンの形態別濃度推移(2018年度)

研究成果報告書（14）

研究課題名	微小粒子状物質の発生源解明に関する研究
担当	地球科学部 菊池一馬、多田敬子、中村隆
<p><b>1 目的</b></p> <p>微小粒子状物質（以下、「PM2.5」という。）は、大気中に浮遊する粒径<math>2.5\mu\text{m}</math>以下の微小粒子であり、人の健康に影響を及ぼす恐れがあることから環境基準値が設定されている。PM2.5の削減対策を検討するには、県内の実態把握に加え発生源の把握等が必要となる。</p> <p>本研究では、県内2地点のPM2.5濃度の変動を比較し、成分分析結果をもとに濃度差の原因を考察した。</p> <p><b>2 方法</b></p> <p>調査地点は、PM2.5濃度自動測定器が設置されている常時監視局のうちから、PM2.5濃度が比較的高濃度である奥州市水沢局と、比較的低濃度である滝沢市菓子局の2地点とした。調査期間は2016年度から2018年度までの3年間（1095日）とした。</p> <p>PM2.5濃度は、PM2.5濃度自動測定器の日平均値を集計した。いずれかの地点に欠測等（装置停止、異常なマイナス濃度及び測定時間20時間未満等）がある日は欠測日とした。データの比較に当たり、経験的に得られた値として、両地点の濃度差が<math>3.0\mu\text{g}/\text{m}^3</math>以下のものは差が小さいとみなした。</p> <p>水沢局のPM2.5濃度が菓子局よりも高濃度となった期間を「高濃度期間（水沢）」、両地点で同程度の濃度だった期間を「同濃度期間」とし、両期間の成分組成を比較した。高濃度期間（水沢）は、水沢局と菓子局のPM2.5濃度差が<math>3.0\mu\text{g}/\text{m}^3</math>を超えた日のうち、菓子局のPM2.5濃度日平均値が<math>5.0\mu\text{g}/\text{m}^3</math>以下の日及びいずれかの地点に降水があった日を除いた日とした。同濃度期間は、水沢局と菓子局のPM2.5濃度差が<math>1.0\mu\text{g}/\text{m}^3</math>未満であった日のうち、いずれかの地点に降水があった日を除いた日とした。</p> <p>PM2.5成分分析は、四半期ごとに1日単位の採取を14日間連続して実施した。試料採取装置はPM2.5用ローボリウムサンプラー（Thermo製FRM2025）を1地点につき2台ずつ使い、PTFEフィルター及び石英繊維フィルターにより採取を行った。測定項目は、PM2.5質量濃度、炭素成分、イオン成分、無機元素成分であり、測定方法はいずれも「大気中微小粒子状物質（PM2.5）成分測定マニュアル」（環境省）に基づく方法によった。いずれかの成分に欠測があった日は欠測日とし、検出下限値未満は集計対象から除外した。</p> <p><b>3 結果・考察</b></p> <p>(1) 水沢局及び菓子局のPM2.5濃度</p> <p>2016年度から2018年度までの水沢局及び菓子局におけるPM2.5濃度及び両地点の濃度差の変動をそれぞれ図1、図2、図3に示す。両地点のPM2.5濃度の変動は全期間で強く一致しており、PM2.5濃度の変動は広域汚染の影響を強く受けていることが推察された。また、水沢局と菓子局のPM2.5濃度の差について、水沢局の方が高濃度の日が229日、菓子局の方が高濃度の日が41日、差が小さい日が722日、欠測日は103日であり、水沢局の方が菓子局よりも高濃度となる日が起こりやすいことが分かった。</p> <p>(2) 水沢局及び菓子局のPM2.5成分組成</p> <p>高濃度期間（水沢）及び同濃度期間における各地点の平均成分組成（イオン成分及び炭素成分）を図4に、各期間における各地点の無機元素成分の平均濃度を表1に示す。成分組成はいずれの期間及び地点においても、OC（有機炭素）、硫酸イオン、EC（元素状炭素）及びアンモニウムイオン（以下、「主要成分」という。）が大部分を占め、主要成分の組成比に大きな違いは見られなかった。</p> <p>一方、無機元素成分濃度は成分ごとに異なる傾向が見られ、両期間で水沢局の方が高濃度となる成分（グループⅠ）、高濃度期間（水沢）で水沢局の方が高濃度となる成分（グループⅡ）、両期間で概ね同程度の濃度となる成分（グループⅢ）に分類できた。このことから、無機元素成分については複数の異なる発生源が存在し</p>	

ており、その一部は主要成分とは異なる経路で移流していることが示唆された。

#### 4 今後の研究方向等

3年間の調査期間を終えたことから今後は調査地点を変更し、引き続きデータの蓄積及び解析によってPM2.5の削減施策へ繋がる研究を進めていく。具体的には、成分組成をより細分化させるため水溶性有機炭素等の測定を行うほか、無機元素成分と主要成分等の関係性の統計的な解析等を行う。また、Ⅱ型共同研究における活動を通じて、先進の知見を得るとともに広域的汚染要因の解明へ繋げていく。

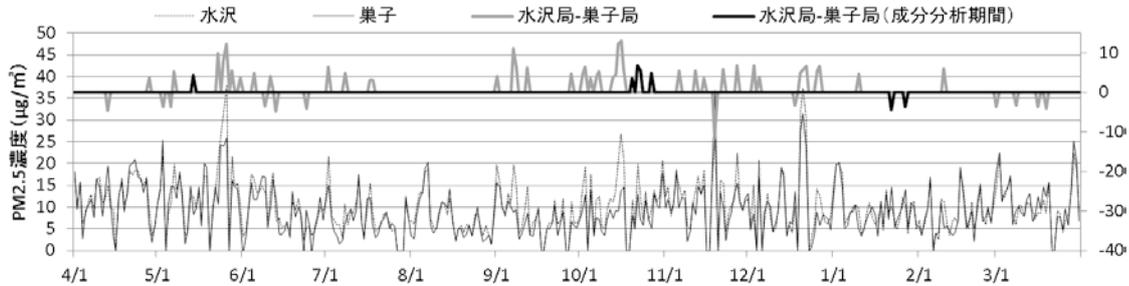


図1 水沢局及び巣子局におけるPM2.5濃度及び両地点の濃度差の変動(2016年度)

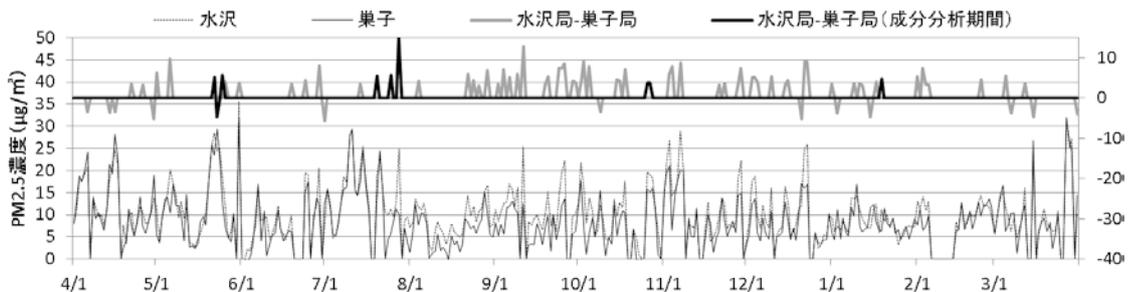


図2 水沢局及び巣子局におけるPM2.5濃度及び両地点の濃度差の変動(2017年度)

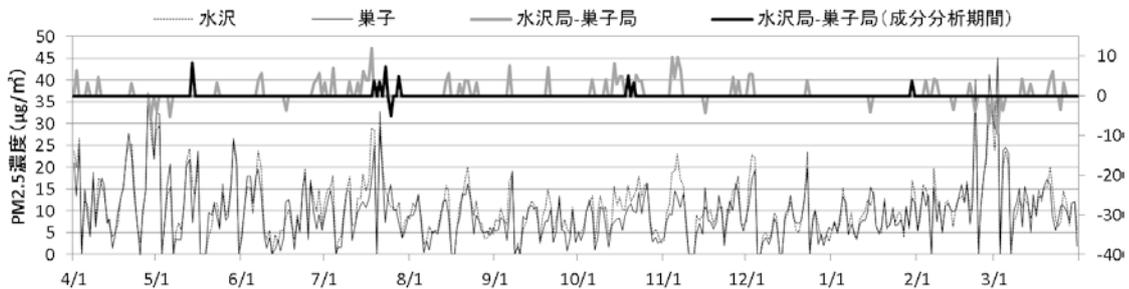


図3 水沢局及び巣子局におけるPM2.5濃度及び両地点の濃度差の変動(2018年度)

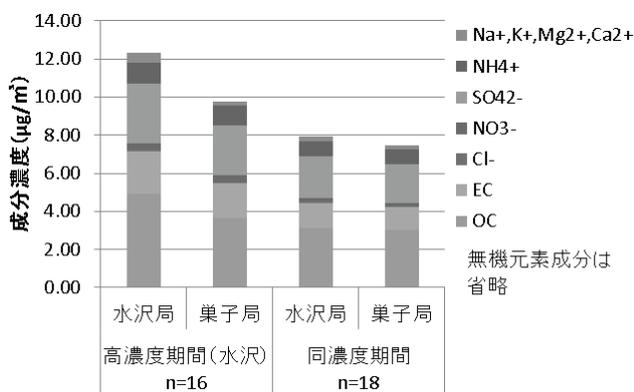


図4 各期間における各地点の平均成分組成

表1 各期間における各地点の無機元素成分の平均濃度

グループⅠ		Na	Al	K	Ca	V	Zn	Pb
高濃度期間(水沢)	水沢局	179.0	32.5	185.9	34.2	1.6	25.5	3.6
	巣子局	114.9	28.8	141.2	16.2	0.9	10.2	2.8
同濃度期間	水沢局	170.0	37.0	120.8	29.7	1.0	13.8	2.3
	巣子局	99.4	27.0	74.6	14.1	0.7	7.8	2.0

グループⅡ		Ni	As	Sb
高濃度期間(水沢)	水沢局	0.80	1.01	0.89
	巣子局	0.40	0.75	0.48
同濃度期間	水沢局	0.41	0.52	0.32
	巣子局	0.41	0.45	0.28

備考  
・単位: ng/m<sup>3</sup>  
・Scは検出下限値未満が多いため未掲載とした。

グループⅢ		Cr	Mn	Fe
高濃度期間(水沢)	水沢局	0.52	6.6	46.7
	巣子局	0.49	5.4	49.2
同濃度期間	水沢局	0.31	3.4	30.4
	巣子局	0.27	3.1	31.6

研究成果報告書（15）

研究課題名	ウイルス媒介性節足動物（ヒトスジシマカ）の生息に関する研究
担 当	（所属部）地球科学部 （職・氏名）専門研究員 大橋 慶太郎
<p><b>1 目的</b></p> <p>ヒトスジシマカは、ジカ熱や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、生息北限地域における生息条件を検討することにより地球温暖化適応策や感染症予防対策に資することを目的とする。</p> <p><b>2 方法</b></p> <p>（1）蚊類の生息状況調査</p> <p>蚊類の生息状況調査は平成30年6～9月、岩手県盛岡市、釜石市、宮古市、久慈市、大槌町、九戸村の4市2町の延べ12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とし、生息している蚊の幼虫及び蛹を太口ピペットで採取した。1調査地点につき1～5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> <p>（2）ヒトスジシマカの生息条件の解析</p> <p>2010年から2018年までのヒトスジシマカ生息分布調査結果と1kmメッシュ気温情報等を基に、統計モデリング手法を用いて岩手県におけるヒトスジシマカ生息リスクマップを作成した。ヒトスジシマカのほぼ生息北限である本県では、越冬卵による繁殖が成立している地域と、越冬はしないが成虫の移入によってシーズン限定で繁殖している地域があると考えられる。このことから、冬季の平均気温、有効積算温度をパラメータとして検討した。パラメータ選択はAIC及びAUCを評価基準とした。GISアプリケーションはGisway light ver.2.2.4、統計計算アプリケーションはR ver.3.5.1 パッケージglmMLを用いた。</p> <p><b>3 結果</b></p> <p>（1）蚊類の生息状況調査</p> <p>成虫の羽化が確認された12地点44人工容器について、計187頭を同定した。今回採集された蚊の種類はヤマトヤブカ、キンイロヤブカ、ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、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、ヤマトヤブカは捕集数が最も多く、調査地域全域において優先種であった。2018年のヒトスジシマカは、盛岡市においてのみ確認された。</p> <p>（2）ヒトスジシマカの生息条件の解析</p> <p>一般化混合線形モデルによる解析の結果、メッシュごとのヒトスジシマカの検出割合は、2017年の解析時と同様に「2月平均気温」、「人口密度」、「調査年における1月1日から調査日までの10.8℃を閾値とする有効積算温度」が有意なパラメータとして選択された。ROC解析では、AUC=0.81と本モデルのあてはまりは良好である。2017年解析時（AUC=0.78）より予測精度が向上した。</p> <p>本モデルでは、<math>q_i</math>をメッシュごとのヒトスジシマカ生息確率としたとき以下の式で算出される。</p> $\text{logit}(q_i) = -5.0706542 + [2\text{月平均気温}]_i \times 0.5675356 + [\text{人口密度}]_i \times 0.0006602 + [\text{調査年における1月1日から調査日までの10.8℃を閾値とする有効積算温度}]_i \times 0.0019142$ <p>本モデルにより、岩手県内の任意の3次メッシュ及び任意の日について、生息確率を算出することができる。また、カットオフ値をTrue Positive Rate=0.80、False Positive Rate=0.30として、任意の日におけるヒトスジシマカ生息リスクマップを作成した（図1～4）。</p>	

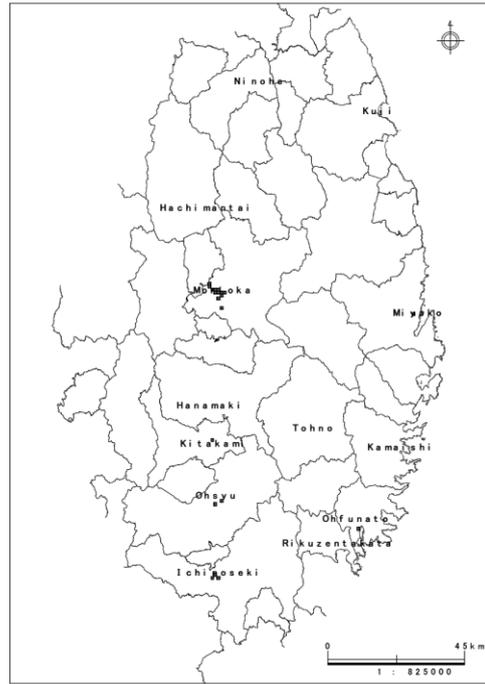
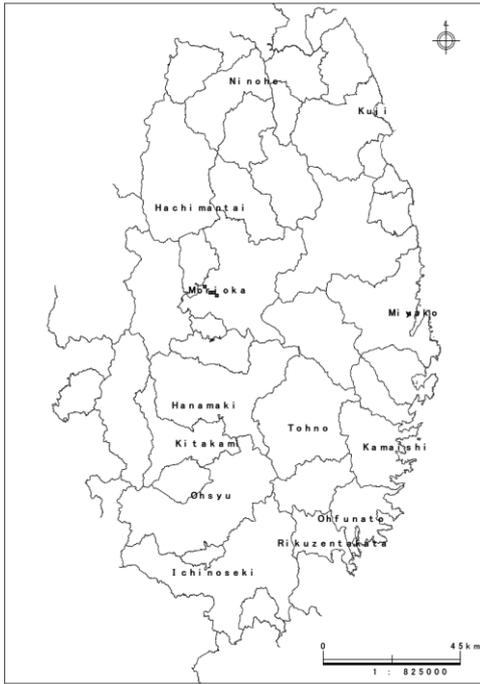


図1.生息リスクマップ(平成30年6月30日現在) 図2.生息リスクマップ(平成30年7月31日現在)

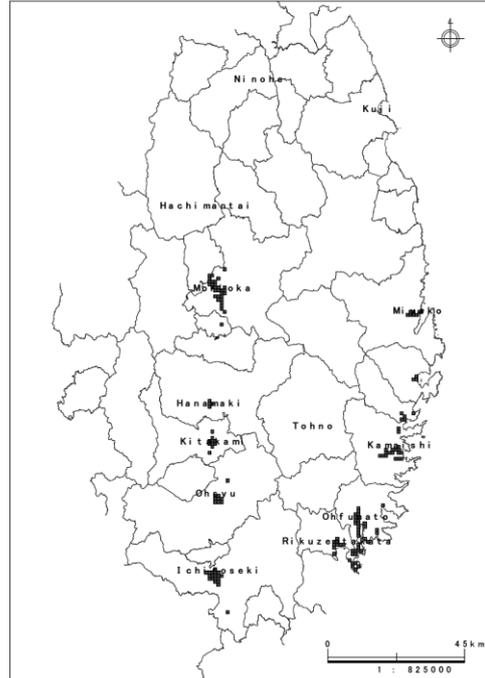
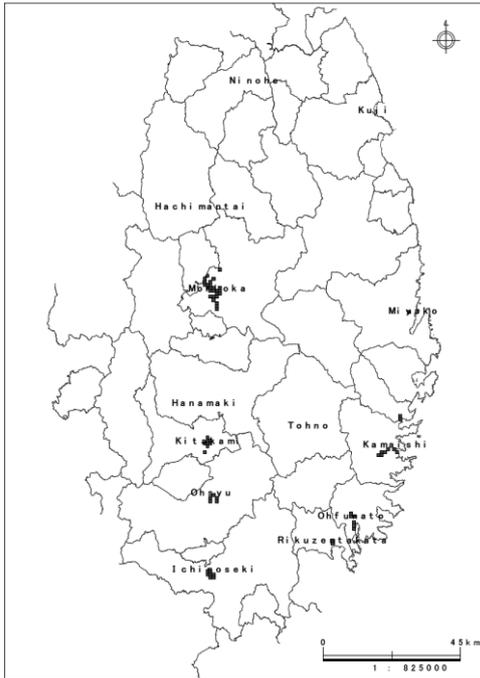


図3.生息リスクマップ(平成30年8月31日現在) 図4.生息リスクマップ(平成30年9月30日現在)

#### 4 今後の研究方向等

ヒトスジシマカの生息調査及び生息条件の解析は、生息北限地域におけるヒトスジシマカの分布の変化や、生息条件を明らかにするうえで重要である。また、地球温暖化に伴う適応策を検討し、感染症予防に関する知見を得るため、今後とも調査を継続することが必要である。

## 研究成果報告書（16）

研究課題名	糞便からの腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検出法の検討
担 当	山中拓哉、太田美香子、高橋幸子、上山昭
1 目的	<p>腸管出血性大腸菌 (EHEC) は下痢原性大腸菌のうちベロ毒素 (VT) を産生するものである。EHEC 感染症は小児や高齢者を中心に重症化・死亡のリスクがあるため迅速な検査が求められる。当所では、本菌症感染者の早期発見・治療により感染拡大を防ぐため、保健所からの依頼により患者家族等接触者の検便検査を実施しているが、本検査の検査件数は年間数百件に及び、本菌を原因とする感染症・食中毒発生時には、一度に大量の検体が搬入される可能性があることから、検査の効率化が望まれてきた。</p> <p>本症の確定診断には、通常、便からの菌分離が必要である。EHEC の分離は各 O 血清群に特徴的な生化学的性状を指標に行われるが、O157、O26 以外のマイナーな血清型については、生化学的性状に関する情報が充分でないため効率的な検査ができないという問題があった。このため我々は、平成 25～27 年度に実施した研究課題「腸管出血性大腸菌 (EHEC) の検査法に関する研究」において、当所で保管している O157、O26 以外の EHEC 菌株について選択分離培地上における所見や生化学的性状に関するデータの解析を行った。研究期間中およびその後に解析を実施した EHEC の血清型別菌株数を表 1 に示す。これにより、血清型 O111、O103、O121、O145 等について鑑別に最適な選択分離培地の種類といった、検査法に関する知見を得ることに成功した。</p> <p>これを踏まえ、本研究では検査において EHEC 陽性であった便検体を対象として選択分離培地における培養所見等のデータを集積し、菌株の解析により得た知見が便検査において実用可能であるかどうかを検証した。本研究および前研究で得られた知見を総合的に考察することにより、当所における腸管出血性大腸菌の検査マニュアルを構築し、より迅速な検査対応を可能にすることが本研究の目的である。</p>
2 方法	<p>(1) 平成 28～30 年度に当所に依頼され EHEC 培養検査で陽性となった便検体のうち、O157、O26 以外の血清型の EHEC が検出されたものについて選択分離培地での所見を中心に検査データを収集した。</p> <p>(2) (1) で収集したデータをもとに、前研究課題ならびにそれ以降に解析を行った EHEC 菌株の性状に関する知見が、糞便検体においても有効であるかの検証をおこなった。</p> <p>(3) 本研究および前研究で得られた知見を統合し、当所における腸管出血性大腸菌の検査マニュアルを構築した。</p>
3 結果	<p>(1) O111、O103、O145 については前研究課題の菌株解析において見出された検査法が糞便検体においても有効であることを確認した (表 2)。O121 については研究期間中に検証可能な便検体が得られなかったが、今後対象となる検体が得られた際には検証を行う予定である。</p> <p>(2) O111 集団例の便検体を解析することで、糞便検体の状態が EHEC の性状 (CT 感受性) に影響を与えることを示唆した (平成 29 年度保健福祉環境行政セミナー)。</p> <p>(3) 本研究および前研究で得られた知見を統合し、血清型 O111 については既存マニュアルの改良版を作成し、血清型 O103、O121、O145 については新規の検査マニュアルを作成した。</p>

表1 解析を実施したEHEC176菌株の血清型別内訳\*

血清型	菌株数	血清型	菌株数
O111	59	O74	1
O103	35	O91	1
O121	26	O114	1
O145	14	O115	1
O63	4	O126	1
O165	3	O128	1
O1	1	O136	1
O55	1	O169	1
O8	1	OUT	24

\*平成31年3月25日現在

表2 各血清型の検査に適した選択分離培地

血清型	培地名	糞便検体における検証
O111	・CT-ソルボースマッコンキー寒天培地 ・クロモアガーO157TAM ・クロモアガーSTEC	○
O103	・CT-ソルボースマッコンキー寒天培地 ・クロモアガーSTEC	○
O121	・CT-ラフィノースマッコンキー寒天培地 ・クロモアガーSTEC	未実施
O145	・CT-ソルボースマッコンキー寒天培地 ・CT-ラフィノースマッコンキー寒天培地 ・クロモアガーSTEC	○

#### 4 今後の研究方向等

平成30年度で研究期間は終了となったが、今後の業務においてもEHECの検査データを蓄積し、常に検査法の改善・更新に努めていく予定である。