

岩手県環境研センター年報  
Annual Report, I-RIEP.

ISSN: 1348-1886  
CODEN: IKHKBM

ANNUAL REPORT OF  
IWATE PREFECTURAL RESEARCH INSTITUTE FOR  
ENVIRONMENTAL SCIENCES AND PUBLIC HEALTH  
No.23 2023

# 岩手県 環境保健研究センター 年報

第23号 令和5年度(2023)

岩手県  
環境保健研究センター

IWATE PREFECTURAL RESEARCH  
INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL  
SCIENCES AND PUBLIC HEALTH  
(I-RIEP)



## はじめに

岩手県環境保健研究センターは、平成13年の開所以来、健康や環境に関する科学的・技術的拠点として、県民の皆様の健康といわての環境を守るため、保健所や関係機関と連携しながら、試験検査、監視測定等の業務や研究に取り組んでおります。

本県では、「いわて県民計画（2019～2028）」において、各政策分野に「いわて幸福関連指標」を定め、県民一人ひとりの幸福を守り育てる取組を進めており、当センターは健康づくりの推進や食の安全・安心の確保、感染症対策の推進、自然環境の保全に関連した調査・研究に取り組んでいます。また、東日本大震災津波からの復旧・復興の取組として、引き続き県内各地における空間線量率や食品中の放射能物質の測定を行っています。

令和5年度は、新型コロナウイルス感染症の位置付けが5月から「5類感染症」へ変更され、行政の対応も転換点を迎えました。当センターは行政検査機関として、PCR検査やゲノム解析を通じ、感染症対策を推進してきたところですが、今後の感染症危機にも十分に機能が発揮できるよう、新たに策定した「岩手県環境保健研究センター健康危機対処計画（感染症）」に基づき、体制整備等を図っております。

今回の年報では、健康や環境の危機管理対応を始め、試験検査、監視測定、調査研究、技術支援、情報発信及び研修指導等の業務状況について掲載しています。併せて研究報告として、水環境の保全のための『化学物質による環境リスクの把握・低減化に向けた各種スクリーニング分析法の開発と応用』、自然環境の保全のための『岩手県における絶滅危惧植物を対象にした種の存続の技術開発に関する研究』、『ツキノワグマの個体数推定精度の向上ならびに生息密度がツキノワグマの出没に及ぼす影響』等の調査研究成果を掲載しています。

皆様方には、本年報を通じて、当センターの業務や研究の状況を御理解いただき、お気づきの点について御意見や御要望をお寄せください。

引き続き当センターの使命を果たすべく試験検査、研究等を実施してまいりますので、一層の御支援・御協力を賜りますよう、よろしくお願い申し上げます。

令和7年（2025年）1月

岩手県環境保健研究センター 所長 永井 榮一



# 目 次

## 第1章 総説

1 沿革	1
2 施設の概要	1
3 組織及び業務内容	2
4 歳入歳出決算	5
5 試験研究費等の推移	6
6 主な試験検査機器	7

## 第2章 業務の概要

1 企画情報部	11
2 保健科学部	13
3 衛生科学部	17
4 環境科学部	19
5 地球科学部	21
6 検査部	24

## 第3章 研究報告

1 研究体系	27
2 研究概要報告	
(1) 食中毒原因となる自然毒の特定方法等に関する研究 衛生科学部 主査専門研究員 宮手 公輔	31
(2) 陽イオン性界面活性剤の分析法の検討 衛生科学部 主任専門研究員 後藤 吉乃、主査専門研究員 宮手 公輔	33
(3) 残留農薬検査におけるGC-MS/MS分析の水素キャリアガス使用の検討 衛生科学部 主任専門研究員 川村 あさひ	35
(4) 残留動物医薬品検査における分析対象化合物の見直し検討 衛生科学部 技師 藤田 涼斗	37
(5) 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 保健科学部 主任専門研究員 岩渕 香織	39
(6) 環境水サーベイランスにおける病原ウイルスアセスメント 保健科学部 専門研究員 梶田 弘子	41
(7) 地域の健康課題解決を目的とした保健情報の効果的活用に向けた基礎的研究 保健科学部 主任専門研究員 並岡 亜希子、上席専門研究員 三浦 紀恵、 主査専門研究員 平野 春菜	43
(8) 化学物質による環境リスクの把握・低減化に向けたスクリーニング分析法の開発 環境科学部 上席専門研究員 伊藤 朋子、専門研究員 今野 博貴	45
(9) 微小粒子状物質 (PM2.5) 濃度の地域的な特性に関する研究 地球科学部 専門研究員 畠山 幸大	47
(10) 岩手県における絶滅危惧植物を対象にした種の存続の技術開発に関する研究 地球科学部 上席専門研究員 小山田 智彰	49
(11) 個体特性および個体群構造に基づいたイヌワシの保全に関する研究 地球科学部 上席専門研究員 前田 琢	51
(12) ツキノワグマの個体数推定精度の向上 ならびに生息密度がツキノワグマの出没に及ぼす影響 地球科学部 主任専門研究員 鞍懸 重和	53
(13) 公共用水のメンブランフィルター法による大腸菌数測定方法の改善 及び実用化へ向けた検証	55

3	外部評価-----	59
4	資料	
	(1) 感染症発生動向調査事業における病原体検出状況（令和5年度）-----	71
	梶田 弘子、岩渕 香織、高橋 知子、山中 拓哉、平野 陽、佐藤 直人	
	(2) 腸管出血性大腸菌の検出状況（令和5年）-----	75
	山中 拓哉、岩渕 香織、平野 陽、梶田 弘子、高橋 知子、佐藤 直人	
5	学術雑誌等掲載論文	
	(1) 繁殖期に魚類を利用するイヌワシ-----	81
	前田 琢	
	(2) 生息域外保全を目的にした絶滅危惧種チョウセンキバナアツモリソウの発芽法の開発と 保存種子を用いた苗生産-----	82
	小山田 智彰、鞍懸 重和、千崎 則正	
	(3) Molecular evolutionary analyses of the fusion protein gene in human respirovirus 1-----	96
	Tomoko Takahashi, Mao Akagawa, Ryusuke Kimura, Mitsuru Sada, Tatsuya Shirai, Kaori Okayama, Yuriko Hayashi, Mayumi Kondo, Makoto Takeda, Akihide Ryo, Hirokazu Kimura	
	(4) Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp) Region and VP1 Gene in Human Norovirus Genotypes GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 -----	104
	Tomoko Takahashi, Ryusuke Kimura, Tatsuya Shirai, Mitsuru Sada, Toshiyuki Sugai, Kosuke Murakami, Kazuhiko Harada, Kazuto Ito, Yuki Matsushima, Fuminori Mizukoshi, Kaori Okayama, Yuriko Hayashi, Mayumi Kondo, Tsutomu Kageyama, Yoshiyuki Suzuki, Haruyuki Ishii, Akihide Ryo, Kazuhiko Katayama, Kiyotake Fujita and Hirokazu Kimura	
6	研究発表抄録-----	127

#### 第4章 研究発表目録

1	学術雑誌原著論文-----	149
2	総説・報告等-----	149
3	学会等での口頭発表-----	150
4	県民等に対する啓発活動の状況-----	151

# 第1章

総

説



# 第1章 総説

## 1 沿革

大正12年10月	岩手県警察部衛生課所属の岩手県細菌検査所を新設
昭和2年2月	化学試験室を併設
昭和23年11月	岩手県衛生研究所設置条例をもって岩手県衛生研究所となり、庶務部、細菌検査部、化学試験部、食品衛生部の新体制で発足
昭和27年4月	庁舎を加賀野小路に移転
昭和44年3月	庁舎を内丸に移転
昭和46年4月	衛生研究所に環境衛生部を新設 岩手県公害センターを新設
昭和47年5月	庁舎増築工事竣工
昭和49年4月	公害センターが管理係、大気科、水質科の体制となる
昭和56年4月	衛生研究所の細菌検査部を微生物部に部名を変更
平成13年3月	盛岡市飯岡新田1-36-1に現庁舎竣工、移転（平成24年2月20日 住居表示変更）
平成13年4月	岩手県衛生研究所と岩手県公害センターを統合し、岩手県環境保健研究センターを設置
平成17年4月	盛岡保健所、一関保健所、宮古保健所及び二戸保健所の検査室を統合し、「検査部」を設置

## 2 施設の概要

所在地	盛岡市北飯岡一丁目11番16号
竣工	平成13年3月31日
敷地	21,743m <sup>2</sup>
建物	本館 鉄筋コンクリート造3階建 5,697m <sup>2</sup> 付属棟 鉄骨造平屋建 312m <sup>2</sup>

### ( 本館 )

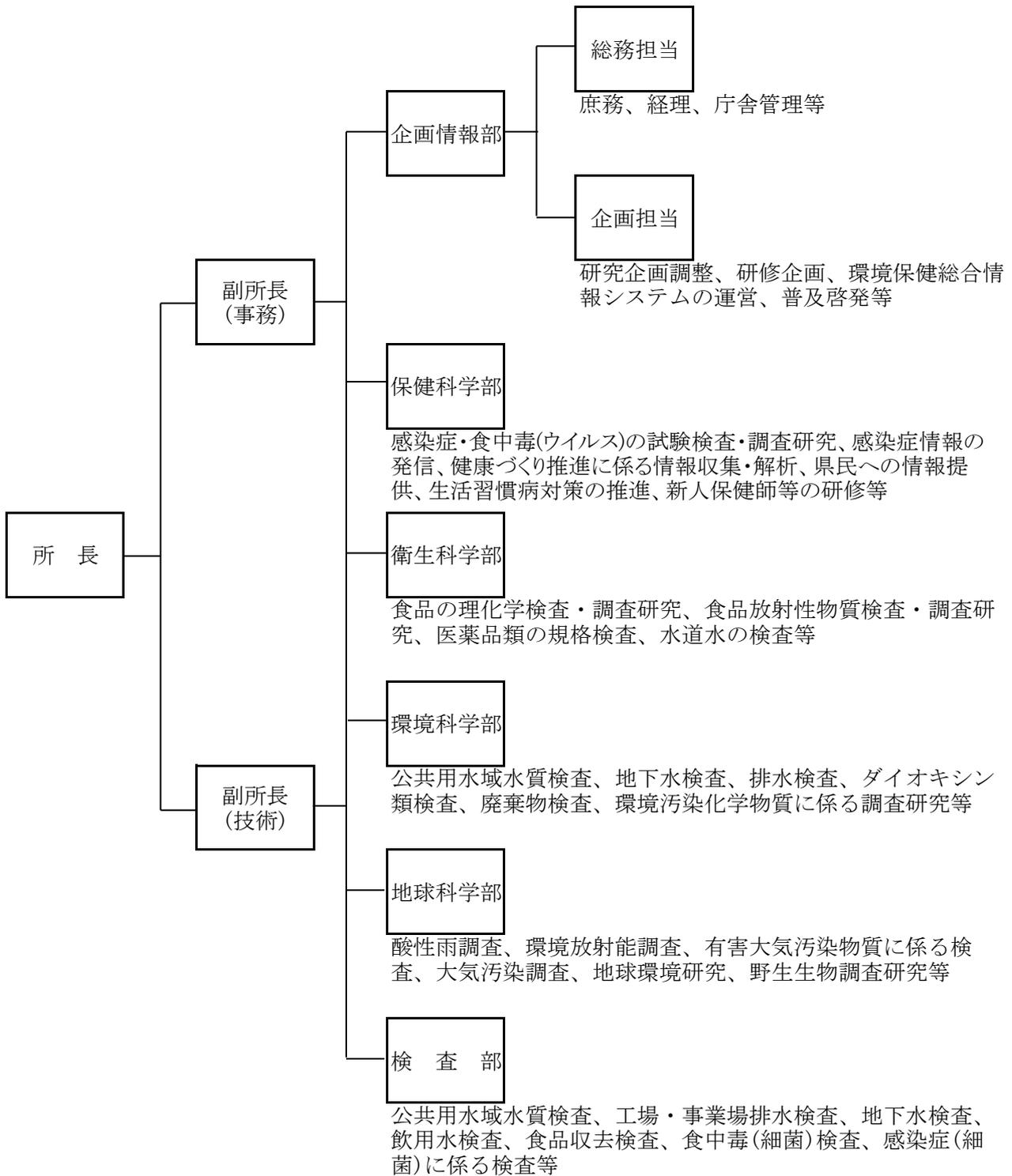
3階	研究員室 環境科学第1研究室 環境科学第2研究室 環境科学第3研究室 水質第1研究室 水質第2研究室 水質第3研究室 衛生科学第1研究室 衛生科学第2研究室 衛生科学第3研究室 第1機器分析室 第2機器分析室 第3機器分析室 第4機器分析室 第5機器分析室 クリーンルーム 灰化蒸留室 第2天秤室 薬品庫
2階	大気第1研究室 大気第2研究室 大気第3研究室 自然環境第2研究室 環境放射能研究室 研究員室 電子顕微鏡室 微生物第1研究室 微生物第2研究室 (安全実験室 P3) 微生物第3研究室 微生物第4研究室 微生物第5研究室 試薬調製室
1階	所長室 事務室 図書室 小会議室 自然環境第1研究室 解剖室 研究員室 印刷室 大会議室 研修室 超微量化学物質分析室

### ( 付属棟 )

	動物実験室 動物感染実験室 (P3) 飼育室 車庫 倉庫
--	------------------------------

### 3 組織及び業務内容

#### (1) 組織



## (2) 職員数調

令和6年3月31日現在

内部所属・職位		事務	技術	職員数
所長		1		1
副所長		1	1	2
主幹・首席専門研究員		1	2	3
企画情報部	部長 (※ <sup>1</sup> )			0
	主任主査	2		2
	主査・主任 (※ <sup>2</sup> )	2	1	3
	主事			0
保健科学部	部長		1	1
	上席		3	3
	主査・主任		4	4
	専研・技師		1	1
衛生科学部	部長 (※ <sup>1</sup> )			0
	上席			0
	主査・主任		4	4
	専研・技師		1	1
環境科学部	部長		1	1
	上席		1	1
	主査・主任		3	3
	専研・技師		3	3
地球科学部	部長 (※ <sup>1</sup> )			0
	上席		4	4
	主査・主任		1	1
	専研・技師		2	2
検査部	部長		1	1
	上席		1	1
	主査・主任		5	5
	専研・技師		1	1
職員数計		7	41	48

(技術職員凡例)

「上席」上席専門研究員

「主査・主任」主査専門研究員、主任専門研究員

「専研・技師」専門研究員、技師

(※<sup>1</sup>) 主幹が企画情報部長、首席専門研究員が衛生科学部長、地球科学部長をそれぞれ兼任(※<sup>2</sup>) 技術職員は主任専門研究員

## (3) 職員名簿

令和6年3月31日現在

組織	職名	氏名	組織	職名	氏名	
	所長	熊谷正則	環境科学部	部長	佐藤真帆	
	副所長(事務)	川村康範		上席専門研究員	伊藤朋子	
	副所長(技術)	三浦節夫		主任専門研究員	長澤敦	
企画情報部	主幹兼部長	佐々木千津子		主任専門研究員	小澤慶一	
	主任主査	阿部勝則		主任専門研究員	吉田敏裕	
	主任主査	川村道敬		専門研究員	今野博貴	
	主任	高安優奈		専門研究員	川上修央	
	主任専門研究員	五日市千秋		技師	深渡柚	
保健科学部	主任行政専門員	和山敏秀		地球科学部	首席専門研究員兼部長	千崎則正
	部長	佐藤直人			上席専門研究員	小山田智彰
	上席専門研究員	三浦紀恵	上席専門研究員		西井和弘	
	上席専門研究員	平野陽	上席専門研究員		門脇日和	
	上席専門研究員	山中拓哉	上席専門研究員		前田琢	
	主査専門研究員	平野春菜	主任専門研究員		鞍懸重和	
	主任専門研究員	高橋知子	専門研究員		畠山幸大	
	主任専門研究員	岩渕香織	専門研究員		西家弘真	
	主任専門研究員	並岡亜希子	検査部		部長	阿部なるみ
	専門研究員	梶田弘子			上席専門研究員	中南真理子
衛生科学部	首席専門研究員兼部長	千葉和久		主任専門研究員	鳴海史	
	主査専門研究員	宮手公輔		主任専門研究員	高橋幸子	
	主任専門研究員	涌井玲		主任専門研究員	吉田由佳	
	主任専門研究員	川村あさひ		主任専門研究員	齊藤里美	
	主任専門研究員	後藤吉乃	主任専門研究員	八重樫満		
	技師	藤田涼斗	専門研究員	太田美香子		

## (4) 人事異動

転入出等の別	転入出年月日	職名	氏名	旧所属・新所属等
転入等	R5. 4. 1	所長	熊谷正則	文化スポーツ部
	R5. 4. 1	副所長(事務)	川村康範	沿岸広域振興局 大船渡保健福祉環境センター
	R5. 4. 1	副所長(技術)	三浦節夫	保健福祉部 医療政策室
	R5. 4. 1	保健科学部長	佐藤直人	環境生活部 県民くらしの安全課
	R5. 4. 1	環境科学部長	佐藤真帆	県南広域振興局 保健福祉環境部 花巻保健福祉環境センター
	R5. 4. 1	主任主査	川村道敬	地方独立行政法人 岩手県工業技術センター
	R5. 4. 1	上席専門研究員	三浦紀恵	県北広域振興局 保健福祉環境部 二戸保健福祉環境センター
	R5. 4. 1	上席専門研究員	平野陽	沿岸広域振興局 保健福祉環境部 宮古保健福祉環境センター
	R5. 4. 1	主任専門研究員	小澤慶一	沿岸広域振興局 保健福祉環境部
	R5. 4. 1	主任専門研究員	吉田由佳	県北広域振興局 保健福祉環境部 二戸保健福祉環境センター
R5. 4. 1	専門研究員	西家弘真	県北広域振興局 保健福祉環境部	
転出等	R5. 3. 31	所長	田村輝彦	退職
	R5. 3. 31	副所長(事務)	今俊晴	盛岡広域振興局 経営企画部
	R5. 3. 31	副所長(技術)	八重樫満	退職
	R5. 3. 31	健康情報調査監	高橋友三	退職
	R5. 3. 31	首席専門研究員兼保健科学部長	高橋知子	退職
	R5. 3. 31	首席専門研究員兼環境科学部長	吉田敏裕	退職
	R5. 3. 31	主任主査	岩渕美保	環境生活部 自然保護課
	R5. 3. 31	上席専門研究員	光井太平	沿岸広域振興局 保健福祉環境部 宮古保健福祉環境センター
	R5. 3. 31	上席専門研究員	藤森亜紀子	県南広域振興局 保健福祉環境部 花巻保健福祉環境センター
	R5. 3. 31	主査専門研究員	今野鈴子	県北広域振興局 保健福祉環境部 二戸保健福祉環境センター
	R5. 3. 31	主任専門研究員	田中久美子	県南広域振興局 保健福祉環境部 花巻保健福祉環境センター
	R5. 3. 31	主任専門研究員	菊池一馬	環境生活部 資源循環推進課
	R5. 3. 31	主任専門研究員	木登梢	県南広域振興局 保健福祉環境部 花巻保健福祉環境センター
	R5. 3. 31	主任専門研究員	橋本裕子	環境生活部 環境保全課

#### 4 歳入歳出決算

歳 入	
科目	決算額 (円)
衛生使用料 (8-1-3)	81,357
衛生補助金 (9-2-3)	7,482,424
物品売払収入 (10-2-2)	4,338,704
合 計	11,902,485

歳 出	
科目	決算額 (円)
<b>【一般会計】</b>	
総務管理費	526,257
一般管理費 (2-1-1)	522,566
人事管理費 (2-1-2)	3,691
企画費	150,645
企画総務費 (2-2-1)	150,645
県民生活費	30,000
県民生活総務費 (3-2-1)	30,000
公衆衛生費	36,493,061
結核対策費 (4-1-2)	73,380
予防費 (4-1-3)	36,419,681
環境衛生費	281,461,885
環境衛生総務費 (4-2-1)	881
食品衛生指導費 (4-2-2)	8,261,684
環境衛生指導費 (4-2-3)	5,972,024
環境保全費 (4-2-4)	78,853,783
鳥獣保護費 (4-2-6)	2,680,900
環境保健研究センター費 (4-2-7)	185,692,613
保健所費	62,900
保健所費 (4-3-1)	62,900
医薬費	2,154,925
薬務費 (4-4-4)	2,154,925
畜産業費	68,022
家畜保健衛生費 (6-2-4)	68,022
林業費	1,500
林業総務費 (6-4-1)	1,500
計	320,949,195
<b>【特別会計】国民健康保険会計</b>	
保健事業費	580,199
保健事業費 (3-1-1)	580,199
計	580,199
合 計	321,529,394

## 5 試験研究費等の推移

### (1) 予算の推移

単位：千円

内 訳	R2年度	R3年度	R4年度	R5年度	備 考
試験研究費	17,025	18,318	19,498	19,963	
(うち県単独分)	13,417	13,909	14,489	14,943	
試験研究以外の業務費	152,752	159,957	168,700	168,887	
施設、設備整備費	—	—	—	—	
庁舎改修費	—	—	—	—	
情報システム費	35,796	35,044	31,284	32,027	
合計	205,573	213,319	219,482	220,877	

### (2) 研究数、職員数

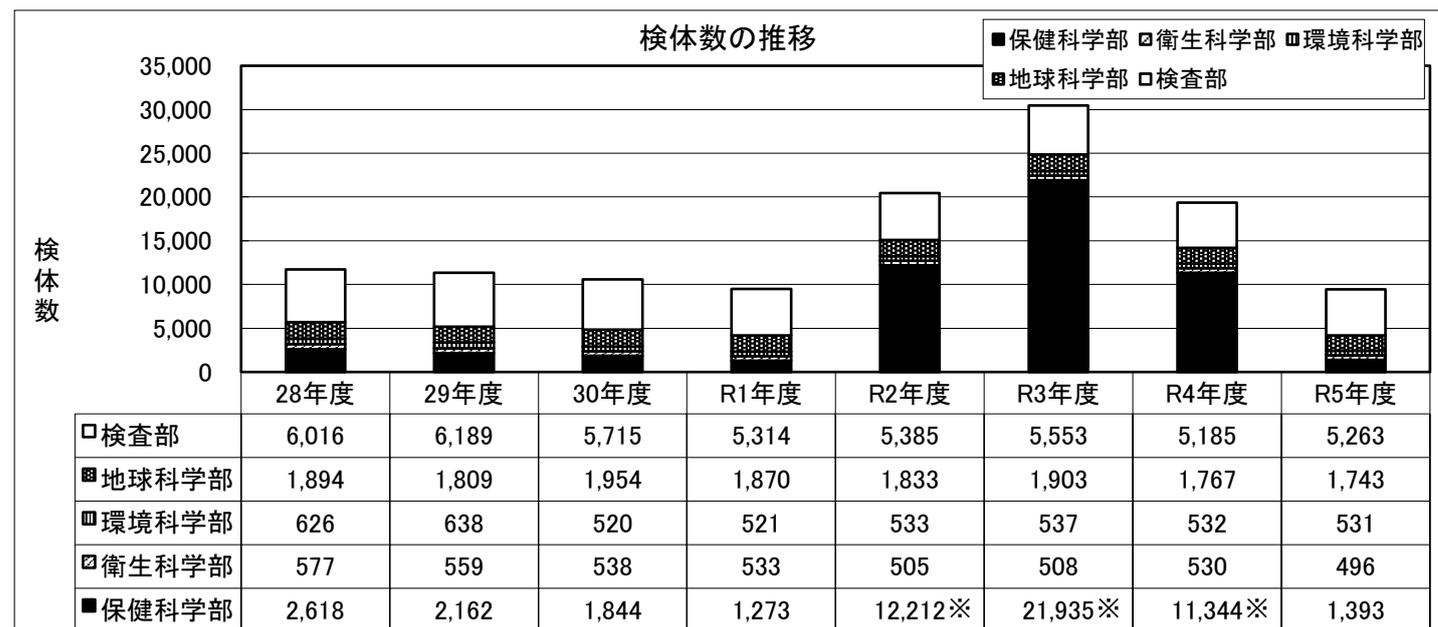
単位：人・件

	28年度	29年度	30年度	R1年度	R2年度	R3年度	R4年度	R5年度
県単の試験研究数	20	19	16	17	20	18	16	16
うち重点・特別研究数	5	6	6	6	5	5	5	5
うち基礎研究数	15	13	10	11	※ <sup>1</sup> 15	※ <sup>1</sup> 13	※ <sup>2</sup> 11	8
センター職員数	46	46	47	47	49	49	48	48

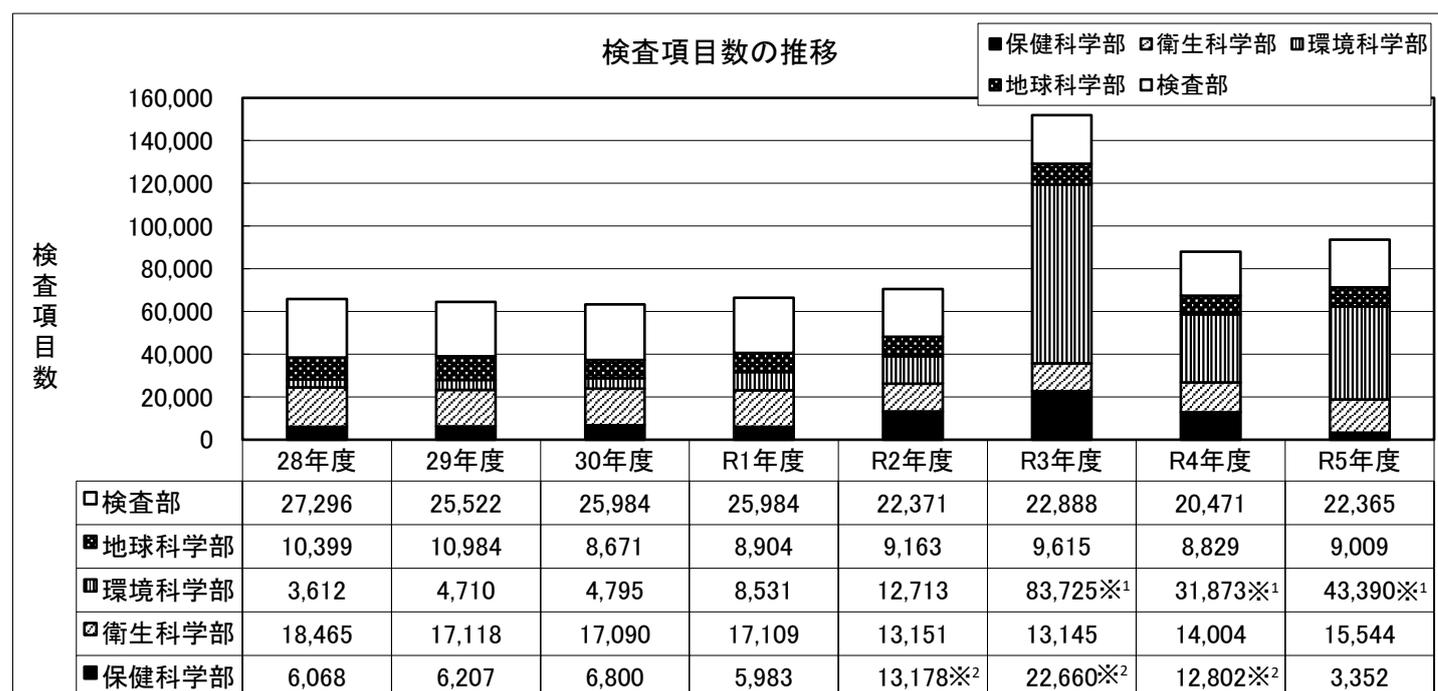
※<sup>1</sup>新型コロナウイルス検査業務対応のため4題は年度途中で中止

※<sup>2</sup>新型コロナウイルス検査業務対応のため2題は年度途中で中止

### (3) 検査件数



※新型コロナウイルス感染症検査による増



※<sup>1</sup>環境汚染事故及び研究等に係る多成分分析による増  
 ※<sup>2</sup>新型コロナウイルス感染症検査による増

## 6 主な試験検査機器（1品目100万円以上の主なもの）

### (1) 企画情報部

機器名	メーカー名・規格・型式	使用目的	数量	導入年度
4面マルチビジョンシステム	東芝 マルチビジョン他	展示用	1	H12
デジタル印刷機	理想科学 リソグラフRP350	資料等作成	1	H12
図書管理システム	N E C NP8500	書籍・資料等管理用	1	H12

### (2) 保健科学部

機器名	メーカー名・規格・型式	使用目的	数量	導入年度
落射蛍光顕微鏡	XF-EFD	細菌の観察	1	S59
分離用超遠心機	日立工機 CP80 α	ウイルスの精製	1	H5
マイクロ冷却遠心機	クボタ 1920型	ウイルス精製	1	H8
微分干渉位相差顕微鏡	オリンパス BX6034F LB	クリプトスポリジウム観察	1	H9
倒立型システム顕微鏡	オリンパス IX70-11PH	細胞観察	1	H10
遠心濃縮機	トミー精工 CC105	DNA精製	1	H11
クリーンベンチ	三洋電機メディカル MCV-B131F	組織培養	1	H12
バイオハザード対策高速冷却遠心機	トミー精工 RS-20BH	検体前処理	1	H12
微量高速冷却遠心器	トミー精工 MX-300	検体前処理	1	H12
リアルタイムPCRシステム	アプライドバイオシステムズ 7900HT	遺伝子検査	1	H14
OCR装置	日立 HT-4133	がん等疾病予防支援システムデータ処理	1	H17
小型冷却遠心機	日立工機 HIMAC CF12RX	検体前処理	1	H20
リアルタイムPCRシステム	アプライドバイオシステムズ 7500F-B	遺伝子検査	1	H21
DNAシーケンスシステム	アプライドバイオシステムズ 3500	遺伝子検査	1	H21
DNA・RNA自動抽出装置	QIAGEN QIAcube	ウイルス検査	1	H21
CO2インキュベーター	ヒラサワ CPE-2602	細胞・ウイルス培養	1	H21
顕微鏡用デジタルカメラ	オリンパス DP72	原虫検査	1	H21
パルスフィールド電気泳動システム	バイオ・ラッドラボラトリーズ CHUEF-DRIII	細菌遺伝子検査	1	H21
微量高速冷却遠心器	トミー精工 MX-305	検体前処理	1	H21
電気泳動撮影装置	アトー AE-6933FXCF-US	遺伝子検査	1	H21
吸光マイクロプレートリーダー	日立ハイテクノロジーズSH-1000Lab	酵素免疫測定法の検査	1	H23
高速冷却遠心機	HITACHI CR20GIII	ウイルス調査の環境水の遠心	1	H23
超低温槽	レボコ ULT-1386-5	病原微生物等の長期間超低温保存	3	H23
サーモグラフィー	日本アビオニクス R 3 0 0	感染症検査	1	H24
超低温フリーザー	レボコRLE30086A	病原微生物等の長期間超低温保存	1	H30
DNA・RNA自動電気泳動装置	QIAGEN QIAxcel Advanced	遺伝子解析に用いる電気泳動装置	1	H30
PCR用サーマルサイクラー	アプライドバイオシステムズ ProFlex	遺伝子検査	1	R1
核酸自動精製装置	QIAGEN QIAcube connect	ウイルス検査	1	R1
リアルタイムPCRシステム	アプライドバイオシステムズ QuantStudio5	遺伝子検査	1	R1
リアルタイムPCRシステム	アプライドバイオシステムズ QuantStudio5	遺伝子検査	2	R2
卓上冷却遠心分離装置	Thermo Fisher SCIENTIFIC Sorvall ST8R	検体前処理	1	R2
DNAシーケンサー	アプライドバイオシステムズ SeqStudio	遺伝子検査	1	R2
核酸自動精製装置	QIAGEN QIAcube connect	ウイルス検査	2	R2
微量高速冷却遠心機	トミー精工 MDX-310	検体前処理	1	R2
安全キャビネット	Thermo Fisher 1375	検体前処理	1	R3
超低温槽	RDE40086	病原微生物等の長期間超低温保存	1	R3
倒立顕微鏡イメージングシステム	オリンパス IX73型	細胞観察	1	R3
微量高速冷却遠心機	トミー精工 MDX-310	検体前処理	1	R3
バイオクリーンベンチ	PHC MCV-B131Fほか	組織培養	1	R3
超低温槽	朝日ライフサイエンス RDE30086FAKほか	病原微生物等の長期間超低温保存	1	R3
次世代シーケンサー	オックスフォード・ナノポアテクノロジーズ Mk1C	新型コロナウイルスのゲノム解析	1	R3
次世代シーケンサー	イルミナ製 iseq100システム	新型コロナウイルスのゲノム解析	1	R5

### (3) 衛生科学部

機器名	メーカー名・規格・型式	使用目的	数量	導入年度
GPCクリーンナップシステム	島津製作所 GPCクリーンナップシステム	農薬分析前処理	1	H12
多本架冷却遠心機	トミー精工 LX-140	農薬分析前処理	1	H12
高速液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS/MS)	アプライドバイオシステムズ API4000	食品中の残留農薬検査等	1	H16
超臨界流体抽出装置	西川計測 SFX1220	農薬分析前処理	1	H16
高速冷却遠心機	久保田商事 7780 II	検体前処理	1	H21
高速液体クロマトグラフ (HPLC)	アジレントテクノロジーズ 1200	食品添加物検査等	1	H21
三連四重極液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS/MS)	アプライドバイオシステムズ JPTR5500B	食品中の残留農薬検査等	1	H21
超臨界自動残留農薬抽出システム	日本分光	農産物中の残留農薬を自動抽出	1	H23
ガスクロマトグラフ質量分析装置	島津製作所 GCMS-QP2010NCU1tra	食品中の残留農薬検査等	1	H23
熱量測定装置一式	吉田製作所 熱量測定装置-J	バイオマス素材の熱量測定装置	1	H23
NaIシンチレーションスペクトルメータ	CAPINTEC社 CAPTUS-3000B	食品等放射能検査	1	H24
ゲルマニウム半導体検出器	セイコー・イージーアンドジーGEM30-70	食品等放射能検査	1	H24
溶出試験機	日本分光 DT-810	医薬品溶出試験	1	H28

機器名	メーカー名・規格・型式	使用目的	数量	導入年度
フロア型冷却遠心機	KUBOTA S700FR	検体前処理	1	H30
高速液体クロマトグラフ	日本ウォーターズ(株) ACQUITY UPLC H-class Plus	食品添加物検査等	1	R1
ゲルマニウム半導体検出器用データ処理装置	セイコー・イーザーアンドジー Gamma Station	食品等放射能検査	1	R1

#### (4) 環境科学部

機器名	メーカー名・規格・型式	使用目的	数量	導入年度
高速液体クロマトグラフ	HP 1100 1046A	環境水・排水等の農薬分析	1	H10
ユニバーサル冷却遠心機	クボタ 5930	水質分析の前処理	1	H12
ICP質量分析装置	アジレント・テクノロジー 7700X	環境水・排水等の重金属分析	1	H21
高速溶媒抽出装置	日本ダイオネックス ASE-350	ダイオキシン類分析前処理	1	H21
三連四重極ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC/MS/MS)	アジレント・テクノロジー 7000A	環境汚染化学物質分析	1	H21
バージ&トラップガスクロマトグラフ質量分析装置	アジレント・テクノロジー P&T-GC/MS	有害揮発成分の測定	1	H23
ヘッドスペースガスクロマトグラフ質量分析装置	アジレント・テクノロジー HS-GC/MS	有害揮発成分の測定	1	H27
超微量化学物質測定用超純水製造装置	日本ミリポア Milli-Q Integral-10L環境分析タイプ	試薬調製、分析用器具等の洗浄	1	H23
超微量重金属測定用超純水製造装置	日本ミリポア Milli-Q Integral-10L環境分析タイプ	試薬調製、分析用器具等の洗浄	1	H23
ICP発光分光分析装置	ICAP7400DUO	環境水・排水等の重金属分析	1	H25
加圧型固相抽出用定流量ポンプ	日本ウォーターズ製	水質分析の前処理	1	H27
ふっ素蒸留装置	スギヤマゲン製5連JISK0102準拠	事業所排水のふっ素分析	1	H29
窒素リン自動分析装置	ビーエルテック AA3	事業所排水の窒素・リン分析	1	R1
高分解能ガスクロマトグラフ質量分析装置	日本電子 JMS-800D	ダイオキシン類分析	1	R1
三連四重極型液体クロマトグラフ質量分析装置	島津製作所 LCMS-8060N X	環境汚染化学物質分析	1	R4
還元気化水銀測定装置	日本インスツルメンツRA-7000A	水質中の水銀分析	1	R5

#### (5) 地球科学部

機器名	メーカー名・規格・型式	使用目的	数量	導入年度
実体顕微鏡デジタルカメラシステム	オリンパス	顕微鏡画像撮影	1	H12
バイオマルチインキュベーター	新日本医科機械製作所 LH-30-8CT	植物の発芽・生育試験用	1	H12
パラフィン包埋ブロック作製装置	サクラ精機 エンベディングコンソールIV	組織標本前処理(包埋)	1	H12
分骨オートクレーブ脱臭システム	サクラ精機	頭骨標本作製	1	H12
密閉式自動固定包埋装置	サクラ精機 EPT-150C	組織標本前処理(包埋)	1	H12
マイクロプレートシステム	バイオ・ラッドラボラトリーズ 680	生体ホルモン測定	1	H14
アスベスト測定用位相差・分散顕微鏡	ニコン ECLIPSE80i	アスベスト測定	1	H18
環境騒音観測装置	リオン NA-37	航空機騒音測定	2	H21
ガスクロマトグラフ	島津製作所 GC-2014	悪臭・理化学項目分析	1	H21
標準ガス調整装置	紀本電子工業 AFC-127	大気測定装置校正	1	H21
高純度ゼロガス精製装置	紀本電子工業 RG-127	大気測定装置校正	1	H21
オゾン校正用基準器	日本サーモ 49i-P S	オゾン測定装置校正	1	H22
熱光学式炭素成分分析装置	東京ダイレック CAA-202M-D	大気中微粒子状物質の炭素成分を分析	1	H23
フィルタ測定用ウルトラマイクロ電子天秤	ザルトリウス MSA2.7S-000-DF	大気中微粒子状物質を採取したフィルタの秤量	1	H23
イオンクロマトグラフシステム	日本ダイオネックス ダイネクス ICS-1600	酸性雨の分析	1	H23
モニタリングシステム	日立アロカ MAR-22他	県内全域の放射能の状況を常時把握	1	H23
走査型電子顕微鏡制御システム	日本電子	アスベスト測定のための制御システム	1	H23
大気中窒素酸化物自動測定機	紀本電子工業 NA-721	大気中の窒素酸化物の自動測定装置	2	H24
大気中窒素酸化物自動測定機	紀本電子工業 NA-721	大気中の窒素酸化物の自動測定装置	2	H25
大気中オゾン自動測定装置	堀場製作所 APOA-3700R	大気中のオゾン濃度の自動測定装置	1	H26
大気中窒素酸化物自動測定機	紀本電子工業 NA-721	大気中の窒素酸化物の自動測定装置	1	H26
エネルギー補償型モニタリングポスト	日立アロメディカル MAR-22	大気中の空間放射線の自動測定装置	1	H27
二酸化硫黄及び浮遊粒子状物質自動測定機	東亜ディーケーケー GFS-327c	大気中の二酸化硫黄・浮遊粒子状物質自動測定装置	1	H27
大気中窒素酸化物自動測定機	東亜ディーケーケー GLN-354	大気中の窒素酸化物の自動測定装置	1	H28
大気中オゾン自動測定機	東亜ディーケーケー GUX-353B	大気中のオゾンの自動測定装置	1	H28
全ベータ放射能自動測定装置	日立製作所 JDC5200	環境放射能測定	1	H28
誘導結合プラズマ質量分析装置	アジレント・テクノロジー7900	有害大気物質の測定	1	H28
高速液体クロマトグラフ	日本ウォーターズ ALLIANCE HPLC Systems	有害大気物質の測定	1	H28
大気中窒素酸化物自動測定機	紀本電子工業 NA-721	大気中の窒素酸化物の自動測定装置	1	H29
大気中オゾン自動測定機	堀場製作所 APOA-3700R	大気中のオゾンの自動測定装置	1	H29
大気中二酸化硫黄及び浮遊粒子状物質自動測定機	紀本電子工業 SAP-700	大気中の二酸化硫黄・浮遊粒子状物質自動測定装置	1	H29
環境放射線モニタリングシステム	(株)日立製作所製	環境放射能測定	1	H29
大気中窒素酸化物自動測定機	東亜ディーケーケー GFS-327C	大気中の窒素酸化物の自動測定装置	2	H30
水銀測定装置	日本インスツルメンツ MA-3000	排ガス中の水銀測定装置	1	H30
有害大気汚染物質測定装置	日本電子 JMS-Q1500GC	大気中の揮発性有機化合物測定装置	1	H30
排ガス中水銀採取装置	OCTSCIENCE社製 AT-WD100	排ガス中の水銀採取装置	1	H30
微小粒子状物質ロウボリウムエアサンプラ	Themo model 2025i	微小粒子状物質の成分分析用試料採取装置	1	H30
大気中窒素酸化物自動測定機	東亜ディーケーケー GLN-354	大気中の窒素酸化物の自動測定装置	1	H30
大気中微小粒子状物質自動測定機	東亜ディーケーケー FPM-377C	大気中の微小粒子状物質の自動測定装置	1	H30

機器名	メーカー名・規格・型式	使用目的	数量	導入年度
微小粒子状物質ロウポリウムエアサンプラ	Thermo社 model2025i	微小粒子状物質の成分分析用試料採取装置	1	R1
二酸化硫黄・浮遊粒子状物質測定機	東亜ディーケーケー GFS-327C	大気中の二酸化硫黄・浮遊粒子状物質自動測定装置	2	R1
微小粒子状物質ロウポリウムエアサンプラ	Thermo社 model2025i	微小粒子状物質の成分分析用試料採取装置	1	R1
超純水製造装置	Milli-Q IQ7005	器具洗浄用水	1	R1
大気中微小粒子状物質自動測定機	東亜ディーケーケー FPM-377C	大気中の微小粒子状物質の自動測定装置	1	R2
大気中二酸化硫黄及び浮遊粒子状物質自動測定機	紀本電子工業 SAP-700	大気中の二酸化硫黄・浮遊粒子状物質自動測定装置	2	R2
浮遊粒子状物質自動測定機	紀本電子工業 PM-711	大気中の浮遊粒子状物質自動測定装置	1	R2
脱臭装置付灰化炉	東京技術研究所 DDAF4501ER	環境放射能分析前処理	1	R2
二酸化硫黄・浮遊粒子状物質自動測定機	紀本電子工業 SAP-700	大気中の二酸化硫黄・浮遊粒子状物質自動測定装置	1	R3
大気中オゾン自動測定機	堀場製作所 APOA-3700	大気中のオゾンの自動測定装置	1	R3
大気中微小粒子状物質自動測定機	紀本電子工業 PM-712	大気中の微小粒子状物質の自動測定装置	1	R3
大気中窒素酸化物自動測定機	堀場製作所 APNA-3700R	大気中の窒素酸化物の自動測定装置	1	R3
大気中微小粒子状物質自動測定機	紀本電子工業 PM-712	大気中の微小粒子状物質の自動測定装置	3	R4
環境騒音観測装置	リオン NA-39A	航空機騒音測定	1	R4
揮発性有機化合物測定装置	島津製作所 VMS-1000F	VOC排出規制のための測定	1	R5
気中水銀測定装置	日本インストルメンツ マーキュリー/WA-5A	大気常時監視（有害大気汚染物質測定）	1	R5
大気中窒素酸化物自動測定機	紀本電子工業 NA-721	大気中の窒素酸化物の自動測定装置	1	R5
大気中微小粒子状物質自動測定機	東亜ディーケーケー FPM-377C	大気中微小粒子状物質の自動測定装置	2	R5
大気中非メタン炭化水素自動測定機	東亜ディーケーケー GHC-355B	大気中の非メタン炭化水素の自動測定装置	1	R5
イオンクロマトグラフ	H P I C システム	大気中の微小粒子状物質のイオン成分分析	1	R5
ゲルマニウム半導体検出器	セイコーGEM30-70	放射線量測定（詳細核種分析）	1	R5

## (6) 検査部

機器名	メーカー名・規格・型式	使用目的	数量	導入年度
安全キャビネット	三洋器械メディカル MHE130AJ	病原微生物検査	1	H12
ガスクロマトグラフ質量分析装置	アジレント・テクノロジー 7890GC 5975MS P&T	理化学項目分析	1	H21
イオンクロマトグラフ	日本ダイオネックス ICS-1500	イオン濃度分析	1	H21
全有機炭素計	島津製作所 TOC-Lcph他	水質検査、水質事故に係る検査	1	H23
飲用水等検査用超純水製造装置	日本ミリポア Milli-Q Integral 5L機器分析タイプ	試薬調整、ガラス器具等の洗浄	1	H23
ガスクロマトグラフ質量分析装置	サーモフィッシャー ISQ LT	理化学項目分析	1	H26
リアルタイム濁度測定装置	栄研化学㈱ M-L300・M-L302	病原微生物検査	1	H29
濁度・色度測定器	日本電色工業㈱ WA6000	水質検査	1	H29
液体クロマトグラフ質量分析計	株島津製作所 LCMS-8050	水質検査	1	H29
ポストカラムイオンクロマトグラフ	株島津製作所 Prominence	シアン類分析	1	H29
超純水製造装置	Milli-Q IQ7005	水質検査	1	H30
イオンクロマトグラフ	サーモフィッシャー Integrion	イオン濃度分析	1	R2
ガスクロマトグラフ質量分析装置	アジレント・テクノロジー 8860GC 5977MS HSS	理化学項目分析	1	R2

## (7) 共用

機器名	メーカー名・規格・型式	使用目的	数量	導入年度
DNAシーケンスシステム	PEバイオシステムズ ABI PIRSM310	遺伝子検査	1	H12
DNAシーケンスシステム	PEバイオシステムズ ABI PIRSM3100	遺伝子検査	1	H12
走査型電子顕微鏡	日本電子 JSM-5900LV	異物検査	1	H12
透過型電子顕微鏡	日立製作所 H-7600形	ウイルス観察	1	H12
高速液体クロマトグラフ	アジレント・テクノロジー アジレント1100シリーズ	食品・医薬品分析	1	H12
ポータブルガスクロマトグラフ	日本電子テータム GC-311	大気VOC分析	1	H12
DNAシーケンス用システムバージョンアップソフト	アプライドバイオシステムズ (3100⇒3130用)	遺伝子検査	1	H21
マイクロウェーブ試料分析装置	アントンパール社 Multiwave PRO	重金属分析の前処理（地・環・衛）	1	R1

## (8) リース機器

機器名	メーカー名・規格・型式	使用目的	数量	導入年度
【共用】GC/MS/MS	アジレント・テクノロジー 7000	農薬分析	1	R1
【共用】LC/MS/MS	Sciex X500R	化学物質分析	1	R1



## 第2章

# 業務の概要



## 第2章 業務の概要

### 企 画 情 報 部

企画情報部は、総務担当及び企画担当により組織されており、総務担当は、庶務業務や予算経理、庁舎管理、職員の安全衛生等の業務を行った。

また、企画担当は、企画運営全般にわたる連絡調整、研究業務に関する企画調整、情報システムの整備・運用やホームページ・広報誌等による情報発信、施設見学等の受入れ等を通じた普及啓発などの業務を行った。

#### <総務担当>

- |           |                          |
|-----------|--------------------------|
| 1 庶 務     | 人事管理事務、会計年度任用職員の任用、文書管理等 |
| 2 予算経理    | 収入・支出事務等                 |
| 3 庁舎管理    | 防火管理、各種保守管理、公用車管理等       |
| 4 職員の安全衛生 | 職員衛生委員会の開催等              |
| 5 その他     | 他部に属さない事項                |

#### <企画担当>

##### 1 企画調整

###### (1) 企画運営体制の整備・運用

センターの企画運営に関する基本方針等を定めた「岩手県環境保健研究センター企画運営要綱」に基づき、企画運営全般を行った。研究課題の設定・評価に関する運営規程等に従い、関係機関との協議・連絡体制を整え、的確な実施に努めた。

センター業務の基本方針や重要事項の検討・協議等については、本庁関係部（環境生活部・保健福祉部）と調整を図った。

###### (2) 研究業務の企画調整

センターにおける今後の環境と保健に関する研究推進の目標・方向性等を定めた「岩手県環境保健研究センター研究推進基本構想」、センターにおける研究課題の設定・事前審査等について定めた「研究推進実施要領」等に基づき、研究計画を作成した。

###### (3) 研究評価

効果的・効率的な試験研究の推進を図るため、「岩手県環境保健研究センター機関評価及び研究評価実施要領」に基づき、外部の専門家・有識者等で構成する評価委員会を開催し、研究評価を実施した。

研究評価の評価対象は、事前評価1題及び事後評価2題であった。

##### 2 情報管理

センター及び保健所等関係機関が環境・保健に関する各種業務で使用している「環境保健総合情報システム」を活用し、公開可能な情報についてセンターホームページに掲載し、周知を図った。

##### 3 普及啓発

当センターが担っている県の環境・保健に関する科学的・技術的中核機関としての役割や業務について、効果的な方法を組み合わせて分かりやすい情報発信に努め、環境や保健について広く県民の理解を深めることを目的として、普及啓発を行った。

(1) 施設の公開行事

施設の公開行事として、「夏休み子ども講座」を行った。「一般公開」は、新型コロナウイルス感染症拡大防止及び特定病原体の保持に係るセキュリティ対策により中止した。

ア かんぼけん夏休み子ども講座 2023 ～実験で不思議な世界を体験しよう！～

夏休み中の小学5年生及び6年生を対象に、環境や保健に対する興味を喚起するため、夏休み子ども講座を開催した。

「実験で不思議な世界を体験しよう！」として、5つの選択テーマを提示し、テーマごとにグループに分かれて実験を行った。

開催日：令和5年7月28日（金） 参加者：38名

○選択テーマ

- ① こうぼの魔法へようこそ ～小さな生き物（微生物）がもたらす大きな力～
- ② めざせ！食品探偵団 ～着色料について楽しく実験しよう！～
- ③ つくってアイス！わかってサイエンス！ ～冷凍庫を使わないで、アイスを作ろう～
- ④ マイナス196℃の世界を体験しよう！
- ⑤ 色が変わる？虹色実験にトライ！！

(2) 施設見学

令和4年度まで新型コロナウイルス感染症拡大防止のため受入れを中止していた施設見学について、令和5年度より希望者の受入れを再開した。令和5年度における施設見学者は延べ3回9名であった。

(3) イベント参加等による普及啓発

ア 環境学習交流センターが発行する「いわて環境情報板」へ、当センターからの情報提供として、通年で記事の提供を行った。

イ ふるさと振興部科学・情報政策室が主催する「いわてまるごと科学・情報館」に出展し、業務内容について周知に努めた。

(4) ホームページによる情報提供

岩手県がホームページの運用で全庁的に導入しているコンテンツマネジメントシステム（CMS）により、環境・保健情報の発信の充実及び分かりやすいデータの公開に努めるなど、ホームページによる情報提供の充実強化を図った。

(5) 広報誌「環保研聞録～I-RIEP Journal～」の発行

当センターの情報発信ツールとして広報誌「環保研聞録～I-RIEP Journal～」を発行した。写真や図を用いるなどして広く県民に伝えることができるように努めた。令和5年度は計4回発行した。

#### 4 職員の資質向上

職員の有する環境・保健分野の専門知識及び検査技術をさらに向上させるため、各種研修会等の案内を行った。

※I-RIEP：岩手県環境保健研究センターの英文表記”Iwate Prefectural Research Institute for Environmental Sciences and Public Health

# 保 健 科 学 部

## 1 令和5年度の動向

保健科学部の微生物分野では、感染症や食中毒（ウイルス）に関連した試験・検査を実施した。特に、流行が続いている新型コロナウイルス感染症については、NGS解析等のより専門性及び精度の高い検査を実施した。また、地方感染症情報センターとして、感染症情報の収集・解析・提供を行った。

地域保健分野では、健康づくり推進のための情報収集・データ解析、県民への情報提供等を実施した。また、特定健診・特定保健指導従事者及び新人保健師等の人材育成のための研修会を開催した。

## 2 行政検査

健康危機管理対応のための県内各保健所からの依頼を中心に、感染症又は食中毒集団発生に係る検査323件、感染症発生動向調査に係る検査140件、感染症の原因調査に係る検査834件、感染症流行予測調査に係る検査96件を実施した。

### (1) 感染症、食中毒等の健康危機管理対応に係る検査

食中毒や感染症の健康危機管理対応に係る検査として323件（細菌78件、ウイルス245件）の検査を実施した。病因物質別内訳は、下痢原性大腸菌61件、黄色ブドウ球菌8件、クドア6件、ノロウイルス等の胃腸炎ウイルス159件であった（R5は食中毒菌関連の遺伝子検査は検査部が実施）。

### (2) 感染症発生動向調査に係る検査（感染症法第14条関係）

感染症に係る病原体の流行状況を把握するため、病原体定点医療機関により患者から採取され、当センターに搬入された臨床検体140件（インフルエンザ45件、突発性発疹4件、感染性胃腸炎19件、A群溶血性レンサ球菌咽頭炎8件、ヘルパンギーナ4件等）について、ウイルス検査138件、細菌検査2件を実施した。

### (3) 感染症の原因調査に係る試験検査（感染症法第15条関係）

感染症の発生予防又は発生状況、動向、原因を明らかにする目的で、ウイルス・細菌等に係る各種検査を計834件実施した。内訳は、2類感染症：結核遺伝子検査12件、3類感染症：44件（腸管出血性大腸菌症44件）、4類感染症：88件（レジオネラ症60件〔浴槽水等54、患者6〕）、つつが虫病11件、デング熱4件、E型肝炎7件、SFTS6件）、5類感染症9件（麻しん・風しん9件）、新型インフルエンザ等感染症：新型コロナウイルスNGS解析323件（Ct値確認含む）、令和4年4月27日付け厚生労働省事務連絡に基づく小児の原因不明の急性肝炎検査22件等を実施した。

### (4) 感染症流行予測調査

予防接種事業の効果的な運用のため長期的に感染症の流行を予測する「感染症流行予測調査」の「ポリオ感染源調査」として、環境水96件についてウイルス分離試験を実施した。

## 3 受託検査

保健所設置市である盛岡市との委託契約に基づき、依頼検体数88件、延べ162項目（①新型コロナウイルスNGS解析65検体、118項目（Ct値確認含む）、②呼吸器ウイルス検査6検体、20項目、③結核遺伝子検査6検体、6項目）④麻しん・風しん・水痘ウイルス検査4検体、9項目、⑤ダニ媒介感染症検査1検体、2項目、⑥レプトスピラ症検査1検体、1項目、⑦E型肝炎遺伝子解析1検体、2項目、⑧蚊媒介感染症検査4検体、4項目について検査を実施した。

#### 4 岩手県感染症情報センターの業務

感染症の発生予防、まん延防止に資するため、岩手県感染症発生動向調査事業実施要綱に基づき、当研究センター内に「岩手県感染症情報センター」を設置し、感染症情報の収集、報告、還元を行っている。

県民に対しては、岩手日報紙上及び当研究センターのホームページに感染症発生動向調査結果の概要を毎週掲載しているほか、「岩手県感染症週報」及び「岩手県感染症月報」の発行、メールマガジン「岩手県感染症情報ウィークリーマガジン」の配信など、感染症に関する情報サービスの向上に努めている。

また、令和5年度の岩手県感染症発生動向調査協議会を次のとおり開催した。

第1回 令和5年10月2日 「感染症発生動向調査の解析評価について」 オンライン開催

第2回 令和6年2月26日 「感染症発生動向調査の解析評価について」 オンライン開催

#### 5 岩手県感染症検査ネットワーク会議事務局の業務

岩手県感染症検査ネットワーク会議は、本県における感染症の検査において、医療機関の検査部門、民間検査機関、動物由来感染症担当部門並びに当研究センター等が相互に連携する体制を整備するとともに、検査技術と精度管理の向上及び感染症対策に係る知識の向上を図ることを目的に活動を行っている。

令和5年度は、岩手県感染症検査ネットワーク研修会を次のとおり開催した。

第1回研修会（令和6年3月2日開催、参加者44名） 環境保健研究センター大会議室

情報提供 「最近の感染症発生動向について」

教育講演

講演1 「最近の梅毒と性感染症」

講演2 「非結核性抗酸菌症の最近の話題」

話題提供 「能登半島地震における支援活動報告」

会長からのメッセージ 「新型コロナウイルス感染症と臨床検査」

#### 6 保健情報の発信

##### (1) いわて健康データウェアハウス事業

いわて健康データウェアハウスは、本県の生活習慣病予防対策の充実強化に資するため「健診・生活習慣データ」、「人口動態統計データ」等を一元的に集約・解析し、結果を市町村や医療保険者、教育現場等に還元するために運用しているシステムで、次のとおり実施した。

ア 学校領域、市町村領域における定期健診・生活習慣データ等を収集し、協力機関、関係機関へ解析データの還元を行った。

イ 環境保健総合情報システム（多次元分析システム）における「人口動態」、「健診・生活習慣」、「脳卒中登録」等の統計情報の更新を行った。

ウ 保健科学部のホームページ「保健情報の広場」により、市町村等関係機関が必要な統計を随時閲覧できるよう情報の更新を行った。

また、人口動態統計や健診・生活習慣データの分析結果から見えた県の健康課題について、「目で見る岩手の健康状態」と題して、分かりやすい資料を作成し掲載した。

(2) 特定健康診査・特定保健指導データ等を活用した周知還元事業

各保健所等が開催する保健関係職員等の研修会等において、地域別集計・分析結果の説明を行い、地域の健康課題についての情報提供を行った（8回、延べ304名）。

また、保健所や市町村・学校等関係機関からの要望に応じ、随時、集計結果の提供やデータ分析に関する相談支援を行った（72回）。

## 7 地域保健従事者の育成

(1) 特定健診・特定保健指導従事者研修

各医療保険者が実施する特定健診・特定保健指導事業が円滑に推進されるよう、次のとおり開催した。

<開催状況>

研修名	開催日時	開催場所	内容	参加者
一定の研修	初任者コース	令和5年8月8日 9:20~16:40	オンライン開催 講義 「特定健診・特定保健指導の概要、特定保健指導の流れ第4期の見直しの概要」、「生活習慣病やメタボリックシンドロームに関する知識、喫煙・アルコールに関する保健指導」、「食生活・身体活動・運動に関する保健指導」 演習 「初回面接保健指導の実際」、「栄養・身体活動・運動アセスメントの実際」	51名
	経験者コース	令和5年10月13日 9:20~16:40	環境保健研究センター 講義 「特定健診・特定保健指導、生活習慣病予防、データヘルス計画に関する最新情報」、「保健指導の効果分析、保健指導方法の見直しと改善」、「肥満の診断と取り扱い」、「行動変容に関する理論と実践」 演習 (グループワーク) 「特定保健指導の評価と事例」	31名
	事業運営コース	令和5年8月31日 9:00~16:30	オンライン開催 講義 「保健指導の質の向上に関する仕組み」、「特定健診・特定保健指導の計画策定と評価」 話題提供 「青森市保健所の特定保健指導の取組み」 演習 (グループワーク) 「特定保健指導事業の評価計画から効果的な特定保健指導の実施を目指す」	24名
スキルアップ研修	第1回	令和5年11月14日 13:00~16:00	環境保健研究センター 講演 「健康日本21(第二次)の最終評価、そして第三次の方向性を見据えた第4期特定健診・特定保健指導の取り組み」 情報交換 「第4期特定健診・特定保健指導に向けて今からできること」 報告 「糖尿病性腎症重症化予防事業の実態に関するアンケート調査の結果について」	55名
	第2回	令和6年1月29日 13:30~16:30	オンライン開催 講義 「GIS(地理情報システム)を用いた特定健診・特定保健指導の可能性」、「特定健診・特定保健指導における医療費分析」 情報提供 「NDBオープンデータ等からみる岩手県健康状態」	93名

(2) 新人保健師等研修会

新人保健師等の人材育成や資質向上のため、新人保健師指導担当者研修会及び新人保健師研修会を次のとおり開催した。

<開催状況>

研修名	開催日時	開催場所	内容	参加者
新人保健師指導担当者研修会	令和5年7月12日 10:00~16:30	環境保健研究センター	講義 「岩手県における人材育成体制の整備状況、人材育成の現状と今後の方向性」、「新任期の特性を踏まえた人材育成」 演習 グループワーク 「自分の指導方法の評価と改善」、「新人保健師指導計画の修正」	22名

研修名	開催日時	開催場所	内容	参加者	
新人保健師研修会	第1回	令和5年9月7日 10:00~16:00	環境保健 研究センター	講義「公衆衛生と保健師活動」、「事例管理の方法」 演習グループワーク「お互いの支援事例から学ぶ」、「1事例を取り上げて今後の支援方法を考える」	40名
	第2回	令和5年10月19日 10:00~16:00	環境保健 研究センター	講義「地域診断」、「地域診断や事業評価に使用したい保健統計」 演習グループワーク「地域診断の共有」 情報提供「環境保健研究センターが提供する保健情報」	24名
	第3回	令和5年12月14日 13:30~16:30	オンライン 開催	地域診断発表会 演習グループワーク「保健師の職業的アイデンティティ形成～今日までを振り返って」	23名

## 8 臨地実習等

大学の臨地実習等にあわせて、健康づくり業務等について説明を行った。

施設等	実施日	対象者・人数
盛岡大学栄養科学部 臨地実習	令和5年5月12日	学生等 41名

## 9 調査研究

- (1) 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
- (2) 環境水サーベイランスにおける病原ウイルスアセスメント
- (3) 地域の健康課題解決を目的とした保健情報の効果的活用に向けた基礎的研究

## 10 協力研究等

- (1) 食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究（分担研究）
- (2) 食中毒原因ウイルス等の汎用性を備えた検査法と制御を目的とした失活法の開発のための研究
- (3) 岩手県北地域コホート研究

# 衛 生 科 学 部

## 1 令和5年度の動向

衛生科学部では、県が各種計画、要領等に基づいて収去等を行った食品、医薬品の理化学検査及び放射性物質検査、水道水の放射性物質検査等を実施した。

また、これら試験検査の体制を強化するため、分析方法等に関する研究を行った。

## 2 行政検査

食品、医薬品、水道水について、495検体、15,544項目の検査を実施した。

### (1) 収去食品の検査

「令和5年度岩手県食品衛生監視指導計画」に基づいて県が収去した検体について、以下の検査を行った。

#### ア 残留農薬検査

国内産農産物及び輸入農産物計100検体について、延べ11,436項目の検査を行った。検査の結果、39検体から延べ75農薬が検出されたが、残留基準を超過したものはなかった。

このうち、畜産物20検体（牛肉6、鶏肉10、豚肉4）については、有機塩素系農薬3種類、延べ60項目の検査を実施し、農薬は検出されなかった。

#### イ 食品添加物検査

加工食品等40検体について、着色料、合成保存料、酸化防止剤、甘味料延べ153項目の検査を行った。検査の結果、使用基準を超過した食品はなかった。

#### ウ 遺伝子組換え食品検査

大豆加工品の原料大豆粒6検体について、安全性審査済組換え遺伝子（RRS, LLS, RRS2）の定量試験2検体、定性試験4検体を行った。検査の結果、遺伝子組換え大豆は不検出であった。

#### エ アレルギー物質検査

「そば」混入の可能性がある県内で製造された小麦粉食品（中華めん、うどん、冷めん等）6検体及び「小麦」混入の可能性がある県内で製造された米粉食品等4検体について検査を行った。検査の結果、小麦粉食品及び米粉食品は全て陰性であった。

#### オ 残留動物用医薬品検査

県内産鶏卵9検体、県内産魚介類2検体、輸入豚肉2検体、輸入牛肉2検体、輸入鶏肉2検体及び輸入魚介類4検体の合計21検体について、合成抗菌剤及び抗生物質延べ926項目の検査を行った。検査の結果、基準を超過したものはなかった。

#### カ 放射性物質検査

県内に流通する一般食品182検体、飲料水9検体、乳児用食品及び牛乳9検体の合計200検体について、放射性物質（セシウム）検査を実施した。検査の結果、基準を超過した検体はなかった。

#### キ 麻痺性貝毒

県内に流通するホタテ貝10検体について、麻痺性貝毒検査を実施した。検査の結果、基準を超過した検体はなかった。

### (2) 野生山菜・きのこの放射性物質検査

食の安全安心の確保を目的として県と市町村が連携して実施した調査において、野生山菜58検体、野生きのこ9検体の計67検体について、検査を実施した。検査の結果、放射性物質（セシウム）を6検体から検出したが基準を超過したものはなかった。

(3) 医薬品検査

「医薬品等一斉監視指導実施要領」に基づき、県が県内の医薬品製造業者より収去した医薬品2検体および県内の医薬品販売業者から提供された後発医薬品15検体の合計17検体について溶出試験を行った。検査の結果、全ての検体が医薬品製造承認で定める基準に適合した。

(4) 無承認無許可医薬品買上調査

県が県内の店舗から買い上げた健康食品等3製品について、強壮成分、痩身成分及び指定薬物成分延べ2,697項目の検査を行った。検査の結果、医薬品や指定薬物等に該当する成分を検出した検体はなかった。

(5) 水道水の放射性物質検査

県がモニタリングのために選定した県内4か所の上水道について、年4回16検体の放射性物質検査を行った。検査の結果、放射性物質（セシウム）は検出されなかった。

### 3 受託検査

盛岡市との契約に基づき、食品添加物12検体42項目について検査を行い、盛岡市に結果を通知した。

### 4 事件事故等関連分析

令和5年度の食品、医薬品等に起因する事件事故等の発生はなかった。

### 5 調査研究

令和5年度は次の研究課題を実施し、成果は学会や報告会等で口頭等により発表した。

- (1) 陽イオン性界面活性剤の分析法の検討
- (2) 残留農薬検査におけるGC-MS/MS分析の水素キャリアガス使用の検討
- (3) 食中毒原因となる自然毒の特定方法等に関する研究
- (4) 残留動物医薬品検査における分析対象化合物の見直し検討

# 環境科学部

## 1 令和5年度の動向

環境科学部では、環境行政に対応した検査（水質汚濁防止法に基づく常時監視、環境事故調査における検査等）及び環境調査、水環境の保全に係る研究並びに環境省からの委託事業等を実施した。

## 2 行政検査

### (1) 公共用水域の常時監視

「令和5年度岩手県公共用水域水質測定計画」に基づき、河川水及び河川底質の検査を実施（34検体146項目）するとともに、県、盛岡市及び国土交通省の機関（岩手河川国道事務所、北上川ダム統合管理事務所）が分析した県内公共用水域の水質及び底質の測定結果についてデータベースを作成した。

### (2) 地下水質の常時監視

「令和5年度岩手県地下水質測定計画」に基づき、県内各市町村（盛岡市を除く）における概況調査、概況調査で新たに汚染が確認された場合の汚染井戸周辺地区調査及び従来から汚染が確認されている井戸の経年水質変化監視のための継続監視調査を実施（121検体863項目）するとともに、盛岡市を含む各分析機関からの測定結果についてデータベースを作成した。

### (3) ダイオキシン類（大気）の常時監視

ダイオキシン類対策特別措置法の規定に基づき、一般環境3地点（二戸市、北上市、大船渡市）及び沿道1地点（一関市）並びに発生源周辺2地点（北上市、八幡平市）計6地点の大気について、ダイオキシン類の分析を年4回実施した。

### (4) 特定事業場等の立入に係る水質検査

振興局が水質汚濁防止法に基づく事業場の立入検査で採取した排水について、重金属、ポリ塩化ビフェニル、シアン化合物、フェノール類、ふっ素、ほう素、窒素、磷及び農薬等を分析した（239検体622項目）。

### (5) 環境事件事故に関連した検査

鳥インフルエンザ等家畜感染症発生時の防疫に伴う環境調査において環境水中の陽イオン界面活性剤を分析したほか、事業場排水の海域への放流事故、燃えがら不法投棄事案等に対応した（28検体65項目）。

## 3 環境調査

### (1) 海洋プラスチックごみ実態調査

県海岸漂着物対策推進地域計画に基づき、県内海域におけるプラスチックごみの分布状況を把握するため、三陸沖4地点で漂流プラスチックごみ（マイクロプラスチック）の数量、材質、形状等を調査した。

### (2) 水生生物調査

水生生物を指標とした県内河川水の水質調査に関し、調査の補助及び調査結果の集計（水質マップ作成）を行った。

## 4 研究

### (1) 化学物質による環境リスクの把握・低減化に向けたスクリーニング分析法の開発（重点研究）

液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析装置（LC-QTOFMS）NegativeモードによるAIQS-DB（アイクス-データベース）の拡充や、高極性物質の分析法開発を行い、より幅広い化学物質スクリーニング法を確立するとともに、環

境試料測定への適用可能性を検討するため、データベースに収載する化学物質の情報収集や網羅分析のための装置測定条件、装置性能評価物質の検討、物質同定精度を担保するためのRT（リテンションタイム）補正法の検討を実施した。また岩手大学との共同研究によって、マクロライドをはじめとした医薬品の河川水中での濃度・総量の推移調査を行った。本研究成果については、関連の学会等で発表した。

## (2) 国環研Ⅱ型共同研究

国立研究開発法人国立環境研究所及び地方環境研究所と共同で、環境問題に関する下記課題に取り組んだ。

- ・ 災害時等における化学物質の網羅的簡易迅速測定法を活用した緊急調査プロトコルの開発
- ・ 公共用水域における有機-無機化学物質まで拡張した生態リスク評価に向けた研究
- ・ 河川プラスチックごみの排出実態把握と排出抑制対策に資する研究

## 5 受託事業

### (1) 化学物質環境実態調査

環境省からの委託を受けて、初期環境調査、詳細環境調査、モニタリング調査並びに分析法開発を行った。

#### ア 初期環境調査、詳細環境調査、モニタリング調査

初期環境調査において河川水中のミコナゾール及びフルコナゾール（抗真菌剤）の測定を行うとともに、環境リスクが懸念される化学物質及び「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」で指定された化学物質の一般環境中における残留状況等を把握するため、次の試料についてサンプリング、概要調査等を実施した。

- ・ 花巻市内の河川（豊沢川）の河川水及び底質
- ・ 山田湾のムラサキイガイ及びアイナメ
- ・ 滝沢市菓子の大気（地球科学部担当）

#### イ 分析法開発

環境調査の対象物質とされているN,N,N-トリメチルドデカン-1-アミニウムの塩（化粧品（リンス、シャンプー）原料）について、河川や海域中における濃度レベルを測定するための分析法を開発した。

## 地球科学部

### 1 令和5年度の動向

地球科学部は、大気常時監視、新幹線鉄道等の騒音・振動調査、酸性雨調査及び環境放射能水準調査等の大気環境の調査等及びイヌワシなど鳥類の保護、クマ・シカなど大型哺乳動物の保護管理、希少植物の保全等の自然環境調査等に加えて地球温暖化防止に関する調査を行うとともに、それらに関連した研究を行った。

### 2 取扱件数

令和5年度における取扱件数は、行政検査26,822件であった。

### 3 行政検査

#### (1) 大気の常時監視

##### ア 一般環境大気測定局

一般大気環境中の二酸化硫黄、二酸化窒素、浮遊粒子状物質、光化学オキシダント、非メタン炭化水素、微小粒子状物質(PM<sub>2.5</sub>)等に係る環境基準等の達成状況を把握するため、県内12測定局において自動測定機による常時監視を実施した。環境基準の達成状況は、全測定局で二酸化硫黄、二酸化窒素、浮遊粒子状物質及び微小粒子状物質は環境基準を達成したが、光化学オキシダントは4測定局全てが環境基準を超過した。

##### イ 自動車排出ガス測定局

自動車の走行による大気汚染の監視・測定のため、都市部の幹線道路沿い1測定局において、自動測定機により二酸化窒素、浮遊粒子状物質及び微小粒子状物質(PM<sub>2.5</sub>)の常時監視を実施した。環境基準の達成状況は、全項目で環境基準を達成した。

##### ウ 微小粒子状物質の成分分析

平成25年度から微小粒子状物質の成分分析を開始し、県内2地点で年4回(1日毎2週連続採取)検体を採取し、炭素成分、各種イオン及び無機元素成分を測定した。構成成分比から、季節変動や広域汚染などの影響が認められた。

##### エ 有害大気汚染物質のモニタリング

有害大気汚染物質のモニタリングのため、県内6地点において、毎月ベンゼン等21物質(ただし、1地点については14物質、2地点については11物質)の測定を行った。

調査結果は、環境基準が定められている物質については、全地点で基準以下であった。

#### (2) 酸性雨実態調査

酸性雨の降水成分の実態を把握するため、県内1地点において、pHや各種イオンを測定した。

pH測定結果は降水量加重平均で5.41であり、過去10年間の変動の範囲内であった。

#### (3) 新幹線鉄道騒音・振動調査

新幹線鉄道騒音環境基準及び新幹線鉄道振動対策の状況を把握するため、7地点において調査を行った。

調査の結果、4か所(25m地点)において騒音環境基準を超過しており、関係機関に対応を求めた。

#### (4) 航空機騒音調査

花巻空港の環境基準達成状況を把握するとともに、航空機騒音調査の地域指定の見直しの基礎資料を得るため、6地点の調査を行った。

測定は県南広域振興局花巻保健福祉環境センターで行い、当センターはデータのとりまとめ及び解析を担

当した。調査結果は、環境基準が設定されている全地点で基準以下であった。

(5) 特定粉じん調査

従来から建築物のアスベスト除去作業等における周辺環境調査に加え、被災地におけるがれき撤去・処理等の作業に伴う周辺環境の調査を実施してきた。令和5年度には実績がなかった。

(6) 放射能関係測定検査

福島第一原子力発電所の事故による影響に関して、環境試料等の検査を行った。

#### 4 自然環境保全調査等

(1) 指定希少野生動植物調査

希少野生動植物保護条例に規定する指定種について生育・生息状況を調査した。

また、いわてレッドデータブックに掲載された希少野生動植物についても、その分布や生育・生息状況を調査した。さらに、津波等による被災沿岸地域の海浜性希少野生植物に係る影響調査を継続して実施した。

(2) イヌワシ生息状況調査

イヌワシの適切な保護対策を実施するため、繁殖状況、行動圏、移動分散、営巣場所整備の効果、遺伝的特性等について調査した。

(3) ガンカモ類生息調査

県内の鳥獣保護巡視員等の協力を得て、わが国におけるガン・カモ・ハクチョウ類の冬期生息状況を把握し、野生生物保護行政の基礎資料を得るための全国一斉調査に参加、とりまとめを行った。

(4) ツキノワグマのヘア・トラップ調査

「ツキノワグマ管理計画」に基づき、モデル地域に定められた遠野市荒川高原周辺において25基のトラップを設置し、ヘア・トラップ法による生息状況調査を行った。

(5) ニホンジカ植生（ササ）調査

「シカ管理計画」に基づき、ササの被食状況を調査した。

(6) ニホンジカ糞塊密度調査

「シカ管理計画」に基づき、広範囲の山林を踏査してシカの糞塊数をカウントする糞塊法による生息状況調査を県内50カ所で実施した。

#### 5 温室効果ガス排出量推計

地球温暖化対策を推進するための基礎資料として、各種エネルギー統計資料等を用いて、県内の温室効果ガス排出量の推計を行った。

#### 6 受託調査

(1) 環境放射能水準調査

原子力規制委員会からの委託を受け、定時降水の全β線の測定を実施しているほか、降下物、上水、牛乳、野菜、精米、土壌、海水、海産物、海底土、大気浮遊塵についてγ線核種分析を行った。また、モニタリングポストによる空間線量率の連続測定(自動記録、24時間連続毎日)を行った。

福島第一原子力発電所の事故直後には、γ線核種分析において事故前に検出されていなかった新たな核種が検出され、空間線量率も上昇したが、現状では状況は落ち着いてきており、令和5年度には新たな核種は検出されず、空間線量率も事故以前並のレベルで推移した。

## 7 研究課題

次の課題を研究し、成果を学会等において口頭及び論文等にて発表した。

- (1) 岩手県における絶滅危惧植物を対象にした種の存続の技術開発に関する研究
- (2) 個体特性および個体群構造に基づいたイヌワシの保全に関する研究
- (3) ツキノワグマの個体数推定精度の向上ならびに生息密度がツキノワグマの出没に及ぼす影響
- (4) 微小粒子状物質 (PM<sub>2.5</sub>) の発生源解明に関する研究

## 検 査 部

### 1 令和5年度の動向

検査部では、振興局・保健所からの依頼又は監視指導に伴う行政検査及び県民からの依頼による井戸水等の水質検査を行い、総計で5,263検体、22,365項目の試験検査を実施した。

また、これら検査に関連した調査研究や、振興局・保健所に対する業務支援を併せて実施した。

### 2 行政検査

#### (1) 振興局(保健所)の健康危機管理に係る試験検査

##### ア 水質事故等に係る検査

漏洩事故の追跡調査や鳥インフルエンザ等家畜伝染病の防疫措置に伴う環境調査等8件の事案について、原因究明や周辺環境への影響の有無を確認するため、公共用水域又は地下水における環境基準項目等の検査を行った(101検体)。

##### イ 食中毒及び不良食品に係る検査

食中毒が疑われた11事例に係る検便、食品、施設の拭き取り及び利用井戸水の細菌検査を行った(106検体)。このうち、病原細菌の陽性が確認されたのは7事例であり、黄色ブドウ球菌4事例、病原大腸菌及びカンピロバクターがそれぞれ2事例、ウエルシュ菌1事例であった。

##### ウ 細菌性感染症に係る検査

医師から届出のあった感染症患者及び家族等接触者の糞便の細菌検査を行った(126検体)。検査内容としては、腸管出血性大腸菌、チフス菌及び赤痢菌であった。

#### (2) 振興局(保健所)の監視指導に係る試験検査

##### ア 公共用水域の常時監視に係る検査

岩手県公共用水域水質測定計画に基づき、県内の河川、海域及び湖沼2,407検体について、生活環境項目等の水質測定を実施した。

##### イ 地下水の常時監視に係る検査

岩手県地下水質測定計画に基づく概況調査、汚染井戸周辺地区調査等の地下水74検体について、環境基準項目の水質測定を実施した。

##### ウ 工場・事業場排水に係る検査

振興局が立入検査に伴い採水した、水質汚濁防止法に基づく特定事業場の排水783検体について、生活環境に係る排水基準項目等の汚染状態測定を実施した。このうち、基準超過又は基準超過のおそれがあった検体は延べ23件であった。

##### エ 海水浴場調査

令和5年度に開設を予定した県内10水浴場13地点の海水浴場について水質調査を行い、遊泳に適した水質であることを確認した。

##### オ 食品の規格基準等検査

岩手県食品衛生監視指導計画に基づき、保健所が行った食品の収去検査において、成分規格基準等の化学検査を35検体、細菌検査を289検体実施した。このうち、基準不適合が確認されたのは8検体であった。

### 3 県民からの依頼による飲用水検査

保健所で受け付けした井戸水等について、水道法の基準に照らして試験する検査を実施した。

簡易検査においては飲用水水質の基本となる14項目を検査し、一般検査においてはこの基本となる項目に消

毒副生成物の項目を加えた26項目を検査した。

令和5年度には、化学検査576検体及び細菌検査587検体（一般検査の内数：化学検査24、細菌検査18）の検査依頼があった。このうち約81%が基準に適合していた。不適合となる項目として多かったのは一般細菌、続いて大腸菌、pH、色度、濁度、臭気であった。

#### 4 調査研究

令和5年度は、行政課題や検査法の向上に係る調査研究を行ったほか日本水環境学会地域水環境行政研究委員会が実施する共同研究に携わった。

- (1) 公共用水のメンブランフィルター法による大腸菌数測定方法の改善及び実用化へ向けた検証
- (2) 水環境中の有機物の分解特性の評価のための新たな手法の開発とその検証



# 第3章

## 研究報告



### 第3章 研究報告

#### 1 研究体系（令和5年度）

No.	研究課題	研究	県施策	共同研究機関	担当部
		年度	項目		
1	食中毒原因となる自然毒の特定方法等に関する研究	R3-R5	食の安全 安心の確保	水産技術センター	衛生科学部
2	陽イオン性界面活性剤の分析法の検討	R5			
3	残留農薬検査におけるGC-MS/MS分析の水素キャリアガス使用の検討	R5			
4	残留動物医薬品検査における分析対象化合物の見直し検討	R4-R5			
5	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	R4-R5	地域の保健 医療体制の 確立	子どもは未来もりおか こどもクリニック、群馬 パース大学、横浜市立 大学	保健科学部
6	環境水サーベイランスにおける病原ウイルスアセスメント	R5			
7	地域の健康課題解決を目的とした保健情報の効果的活用に向けた基礎的研究	R4-R5			
8	化学物質による環境リスクの把握・低減化に向けたスクリーニング分析法の開発	R5-R7	多様で豊かな 環境の保全	国立環境研究所及び II型共同研究に参画す る地方環境研究所、岩 手大学	環境科学部
9	微小粒子状物質(PM <sub>2.5</sub> )濃度の地域的な特性に関する研究	R4-R5			地球科学部
10	岩手県における絶滅危惧植物を対象にした種の存続の技術開発に関する研究	R4-R8		環境省新宿御苑管理 事務所ほか	
11	個体特性および個体群構造に基づいたイヌワシの保全に関する研究	R3-R5		京都大学野生動物研 究センター	
12	ツキノワグマの個体数推定精度の向上ならびに生息密度がツキノワグマの出没に及ぼす影響	R4-R8		岩手大学	
13	公共用水のメンブランフィルター法による大腸菌数測定方法の改善及び実用化へ向けた検証	R4-R5			検査部
計	13テーマ				



## 2 研究概要報告



研究成果報告書（1）

研究課題名	食中毒原因となる自然毒の特定方法等に関する研究
担当	衛生科学部 主査専門研究員 宮手 公輔

1 目的

国内では、例年、自然毒に起因する食中毒が多く発生しており、2018年から2022年までの5年間だけでも全国で321件（患者757名、うち死者14名）、本県では12件（患者31名）が報告されている<sup>1)</sup>。細菌やウイルス等を含む全食中毒事案のうち、植物性又は動物性自然毒によるものは、事件数が全体の約7%、患者数は約1%と少ない。一方、食中毒による死者数の約80%は自然毒によるものであり、他の食中毒と比較してその致死率の高さが特徴として挙げられる。そのため、事案発生時には早期に原因物質を特定し、適切な治療へと繋げることが重要となる。

しかし、自然毒の分析には公定法がなく、各地方衛生研究所等は独自に試験法を検討し、原因究明を行っている状況である。当センターでも、令和3年度から、自然毒による食中毒の早期原因究明に向けた体制の構築を目指し、検討を進めてきた。

今般、これまでの検討結果を取りまとめ、自然毒による食中毒を想定した試験検査等対応マニュアルを作成したので、その概要を報告する。

2 方法・結果

(1) LC-MS/MS を用いた毒成分分析法の検討と体制整備

毒成分の分析はLC-MS/MSを用いることとし、試験条件は毒成分の性質から植物性自然毒（キノコ毒を含む）と動物性自然毒に分けて設定した。また、以前より保有していた標準品に加えて市販の標準品を購入し、植物性自然毒については既報<sup>2)</sup>により、動物性自然毒については鈴木らの方法<sup>3)</sup>により添加回収試験等を実施した。

Table 1 に示す成分について標準品等を整備し、これらの成分について添加回収試験等を実施した結果、いずれも分析が可能であることを確認した。

(2) PCR 法によるキノコ種の特定方法の検討

毒キノコの中には、毒成分の特定ができていないためLC-MS/MSによる成分分析が困難なものがある。このことから、LC-MS/MSによる成分分析と並行してDNA解析による種の特定を行うこととし、その方法を検討した。

市販のキノコ6種（エノキ、エリンギ、シイタケ、ナメコ、ブナシメジ及びマイタケ）を購入し、それぞれの粉砕物を採取したもの及び6種のキノコの粉砕物を混合したものを試料とし、DNeasy Plant mini kit（QIAGEN社製）を用いてDNAを抽出・精製を行い、次に、キノコDNAのITS領域を増幅するユニバーサルプライマー（F-Primer：5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'、R-Primer：5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'）を用いてサーマルサイクラー（Applied biosystems社製Pro Flex PCR System）によりITS領域を増幅させ、その後、サンガーシーケンス法又はNGS（次世代シーケンス）法により、塩基配列の解析を行った。

サンガーシーケンス法は、増幅産物をMonoFas DNA精製

Table 1. LC-MS/MS 分析対象成分

区分	成分	含有生物種等	
植物性	α-ソラニン α-チャコニン	ジャガイモ	
	アトロピン スコポラミン	チョウセンアサガオ、 エンジェルトランペット など	
	アコニチン メサコニチン ヒバコニチン ジェサコニチン	トリカブト	
	ニコチン	タバコ	
	アミグダリン	アンズ、アーモンド、 梅などの種子	
	ククルピタシンB	ゴーヤ、ユウガオ、 ズッキーニ など	
	ジギトキシン ジゴキシン	ジギタリス	
	グラヤノトキシンI	レンゲツツジ	
	ジオスゲニン ジオスシン	カエデドコロ など	
	リコリン ガラタミン ガラタミノン	スイセン、 タマスダレ など	
	コルヒチン デメコルシン	イヌサフラン、 グロリオサ など	
	ジェルビン シクロバミン	バイケイソウ など	
	フェブリフジン	アジサイ、アマチャ	
	α-アマニチン β-アマニチン フロイジン	シロタマゴテング、 テングタケ など	
	イルジンS	ツキヨタケ	
	ムスカリン	テングタケ など	
	動物性	テトラミン	ツブ貝
		Cトキシン群 ゴニオトキシン群	麻痺性貝毒 (ホタテガイ等)
		テトロドトキシン	フグ

キット I (アニモス社製) を用いて DNA を精製したのち BigDye Terminator v3.1 cycle Sequencing Kit (Applied biosystems 社製) を用いて蛍光ラベル化したものを SeqStudio Genetic analyzer (Applied biosystems 社製) で塩基配列を決定した。データ解析は、得られた配列データについて MEGA X を用いてアライメントを行ったのち、BLAST 解析を行った。

NGS 法は、機器に Nanopore 社製 MinION Mk1C、シーケンシングキットに SQK-LSK109 を用いて行った。3 で得られた各試料について End Prep 処理のちバーコーディング処理を行い、全試料を混合した。混合液を Adapter 結合処理したのち MinION Mk1C のフローセルにアプライし、run 時間を 4 時間として分析した。

データ解析は、得られた Fastq.gz ファイル (Fastq の圧縮ファイル) について、プログラム言語の Python を用いてアライメントの一致度による分類を行ったのち、分類した配列について BLAST 解析を行った。

その結果、サンガーシーケンス法及び NGS 法のいずれにおいても、試料としたキノコ 6 種を検出することが可能であった。また、NGS 法では、6 種のキノコの混合物を同様に試験したところ、混合物であっても 6 種のキノコを検出することが可能であった。

### (3) 理化学試験における人体試料取扱規程の整備

自然毒による食中毒が発生した場合、主な検体は調理品や食材であるが、稀に患者の尿、血液、吐しゃ物等の人体試料が搬入されることがある。人体試料は、微生物部門の試験検査では感染性試料として取り扱うため、安全キャビネット等の設備を用いて検査を行ってきたが、理化学検査部門では、感染性試料の取扱いについての基準等が無く課題となっていた。そこで今後、作業者の安全と設備の汚染防止を図ることを目的に、理化学試験部門における人体試料等の取扱い要領等の規程類を策定した。

規程類の策定にあたっては、微生物部門で策定している「病原体等安全管理要綱」等の規程を参考としながら、試験室、検体、器具・機器、廃棄物の管理方法の他、作業上の留意点、使用後の清掃手順、作業者の教育訓練等について明記した。

### (4) 試験検査等対応マニュアル案の作成

自然毒による食中毒は、発生頻度が細菌やウイルス等に比べて少ないうえに、本県では発生しない年度もある。そのため、人事異動により、事案発生時に対応すべき担当者が自然毒分析の未経験者である状況も考えられ、技術継承が課題となっている。このことから、これまで行ってきた各分析法の検討結果を踏まえ、試験検査等対応マニュアル案を作成した。これには、食中毒が発生した際の検査方法のほか、検体受入や連絡調整の手順に加え、実際に行った添加回収試験の分析方法別の比較結果や、試験実施時の留意点等についても併せて記載した。また、遺伝子解析に不慣れな理化学試験担当者でも容易に理解が進むよう、操作手順に画像を多く掲載することにより作業理解度の向上を図った。また、マニュアルはチェック方式とし試験記録としても活用できる形式とした。

## 3 考察

これまで当センターでは、自然毒食中毒が発生してから試験法を確認していたため、対応に遅れが生じていた。併せて、技術継承が困難であったり人体試料の取扱い・管理方法が不明確であったりと課題が複数散見された。

今般、理化学検査における人体試料の取扱いを規定するとともに、試験検査等対応マニュアル案を作成した。自然毒による食中毒は県内での発生が稀であるものの即時対応が必要となることから、作成の際には①通常業務で使用している試薬、器具、機材等を用いること、②未経験の職員でも操作が容易に理解できることの 2 点を念頭に置き作業を進めた。今回作成したマニュアルが、従前の課題解決に寄与すると考える。

## 4 まとめ

自然毒による食中毒の原因究明体制の構築に向け、当センターにおける健康危機管理発生時のマニュアルを策定した。

- 1) 厚生労働省ホームページ：食中毒統計資料
- 2) 宮手、岩手県環境保健研究センター年報第 21 号令和 3 年度
- 3) 鈴木ら、第 58 回全国衛生化学技術協議会年会

## 研究成果報告書（２）

<b>研究課題名</b>	<b>陽イオン性界面活性剤の分析法の検討</b>
<b>担 当</b>	<b>衛生科学部 主任専門研究員 後藤吉乃、主査専門研究員 宮手公輔</b>
<p><b>1 目的</b></p> <p>令和4年度、県内のそうざい製造業者が、指定外食品添加物である陽イオン性界面活性剤のジデシルジメチルアンモニウムクロリド（以下、「DDAC」という。）を味付き卵の製造に使用し、行政処分を受けた。当該事例は本県で2度目であり、今後も類似事例の発生が懸念される。</p> <p>そこで、昨年度開発したゆで卵中の DDAC 分析法を用いて、DDAC と同様に広く消毒剤として使用されている陽イオン性界面活性剤の塩化ベンザルコニウムも分析できないかを検討した。</p> <p>また、類似事例発生の際に、陽イオン性界面活性剤の故意の使用を判断する材料となるよう、通常市場に流通している鶏の生卵及び卵加工品の DDAC 及び塩化ベンザルコニウムによる汚染実態を調査したので、併せて報告する。</p> <p><b>2 方法</b></p> <p>1) LC-MS/MS を用いた塩化ベンザルコニウムの分析</p> <p>塩化ベンザルコニウムの構造式はFig. 1 のとおりであり、アルキル基が C8 から C18 の混合物として存在する。主成分はアルキル基が C12、C14 及び C16 とされているため<sup>1)</sup>、分析対象成分をこれら 3 成分（それぞれ BAC12、BAC14 及び BAC16 と呼ぶ。）とした。</p> <p>ゆで卵中の塩化ベンザルコニウムの分析は、昨年度開発した DDAC 分析法に則った。前処理方法を Fig. 2 に、測定装置及び測定条件を Table. 1 に示す。</p> <p>妥当性評価試験は、厚生労働省通知「妥当性評価ガイドライン」<sup>2)</sup>に従い試験を実施した。すなわち、1 試験当たり非添加試料(n=1)、定量下限値相当添加試料（0.01 ppm, n=2）及び鶏卵（可食部）における DDAC の残留基準値相当添加試料（0.05 ppm, n=2）の試験を行い、これを 5 回繰り返した。そこで得られた結果から、選択性、真度（回収率）、併行精度、室内精度により妥当性を評価した。</p> <p>なお、試料は県内で購入した鶏卵を沸騰水浴中で 10 分間ゆで、殻を剥いて粉碎均一化したものを用いた。試料 5 g を分取し、標準溶液を添加して 30 分間放置したものを添加試料とした。検量線用標準溶液は、2%ギ酸含有メタノールを用いて 0.5～20 ppb 標準溶液の 6 点を調製した。</p> <p>2) 市場流通する生卵及び卵加工品の汚染実態調査</p> <p>令和5年7月、盛岡市内の複数のスーパーマーケットから、鶏の生卵を 8 種類、温泉卵や味付き卵等の卵加工品を 8 種類購入し、可食部及び殻における DDAC 及び塩化ベンザルコニウムを測定した。</p> <p><b>3 結果</b></p> <p>1) LC-MS/MS を用いた塩化ベンザルコニウムの定量</p> <p>非添加試料については、妨害ピークは認められなかった。また、添加試料のピークは S/N<math>\geq</math>10 であることを確認した。真度（回収率）、併行精度、室内精度の結果は Table. 2 に示すとおりで、いずれも妥当性評価ガイドラインの判定基準を満たした。</p> <p>2) 市場流通する生卵及び卵加工品の汚染実態調査</p> <p>生卵及び卵加工品の可食部では、測定対象成分はすべて 0.01 ppm 未満であった。</p> <p>一方、殻では、Table. 3 及び Table. 4 に示すとおり、多くの製品では測定対象成分は 0.01 ppm 未満であったが、一部の製品では 0.01～0.05 ppm 検出されるものもあった。</p>	

なお、令和4年度の事例では、原料由来のもので殻から0.01~0.02 ppm程度だったのに対し、DDACを防カビ目的で添加した際、殻から1~10 ppmというオーダーでDDACが検出されている。

以上のことから、今後同様の事例が発生した際、生卵及び卵加工品から検出された陽イオン性界面活性剤が、原料由来なのか、故意に添加されたものなのか判断する材料として、本結果が参考となりうると思う。

#### 4 今後の研究方向等

今後、同様の事案が発生した際は、本研究の成果をもって保健所の調査に寄与していくこととする。

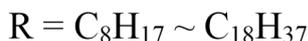
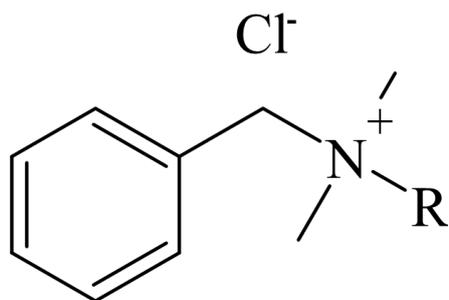


Fig. 1 塩化ベンザルコニウムの構造式

Table.1 LC-MS/MS測定条件

装置	LC : Shimadzu LC-20AD MS : Sciex Triple Quad 5500
カラム	Imtakt scherzo SM-C18 (2 mm×150 mm, 3 μm)
移動相	A液…20 mMギ酸アンモニウム水溶液 B液…20 mMギ酸アンモニウム含有80%アセトニトリル
グラジエント条件(B液%)	0 min(5%) → 7 min(100%) → 15min(100%) → 16 min(5%) → 20 min(5%)
カラム温度	40℃
流速	0.4 mL/min
注入量	5 μL
イオン化モード	ESI (+)
Spray voltage(V)	4500 (V)
SRM条件	DDAC …326.4 > 186.2 BAC12 …304.0 > 91.2 BAC14 …332.1 > 90.9 BAC16 …360.0 > 90.9

Table.2 妥当性評価確認結果

成分名	試料中濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
BAC12	0.01	88.5	18.7	19.7
	0.05	92.5	5.14	8.45
BAC14	0.01	87.6	13.9	16.6
	0.05	87.3	5.26	8.91
BAC16	0.01	80.8	9.09	14.1
	0.05	79.1	5.43	11.0

【抽出】	試料 5 g (50 mL容PP製遠沈管) + 0.2%アンモニア含有メタノール 20 mL ホモジナイズ (11,000rpm, 1min) 0.2%アンモニア含有メタノールで25 mLにメスアップ 遠心分離 (3,000rpm, 5min) 上清【抽出液】
【精製】	固相カラム OASIS WCX (150 mg/6 cc) <コンディショニング> メタノール 3 mL 水 3 mL 0.2%アンモニア含有メタノール 3 mL 抽出液 5 mL負荷 (流出液は廃棄) <洗浄 (流出液は廃棄)> 5%アンモニア水 4 mL (流出液は廃棄) メタノール 4 mL (流出液は廃棄) <溶出 (流出液を採取)> 2%ギ酸含有メタノール 4 mL (流出液を採取) 2%ギ酸含有メタノールで 5 mLに定容 試験溶液【LC-MS/MS測定液】

Fig. 2 抽出及び精製方法

Table.3 陽イオン性界面活性剤の検出結果 (生卵の殻)

生卵	DDAC	塩化ベンザルコニウム		
		BAC12	BAC14	BAC16
A	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
B	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
C	<0.01	0.05	0.02	<0.01
D	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
E	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
F	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
G	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
H	0.03	<0.01	<0.01	<0.01

単位: ppm

Table.4 陽イオン性界面活性剤の検出結果 (卵加工品の殻)

卵加工品	DDAC	塩化ベンザルコニウム			備考
		BAC12	BAC14	BAC16	
A	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	半熟卵
B	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	半熟卵
C	<0.01	0.01	0.02	0.01	半熟卵
D	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	半熟卵
E	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	ゆで卵
F	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	ゆで卵
G	—	—	—	—	ゆで卵 (殻無し)
H	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	ゆで卵

単位: ppm

#### [参考文献]

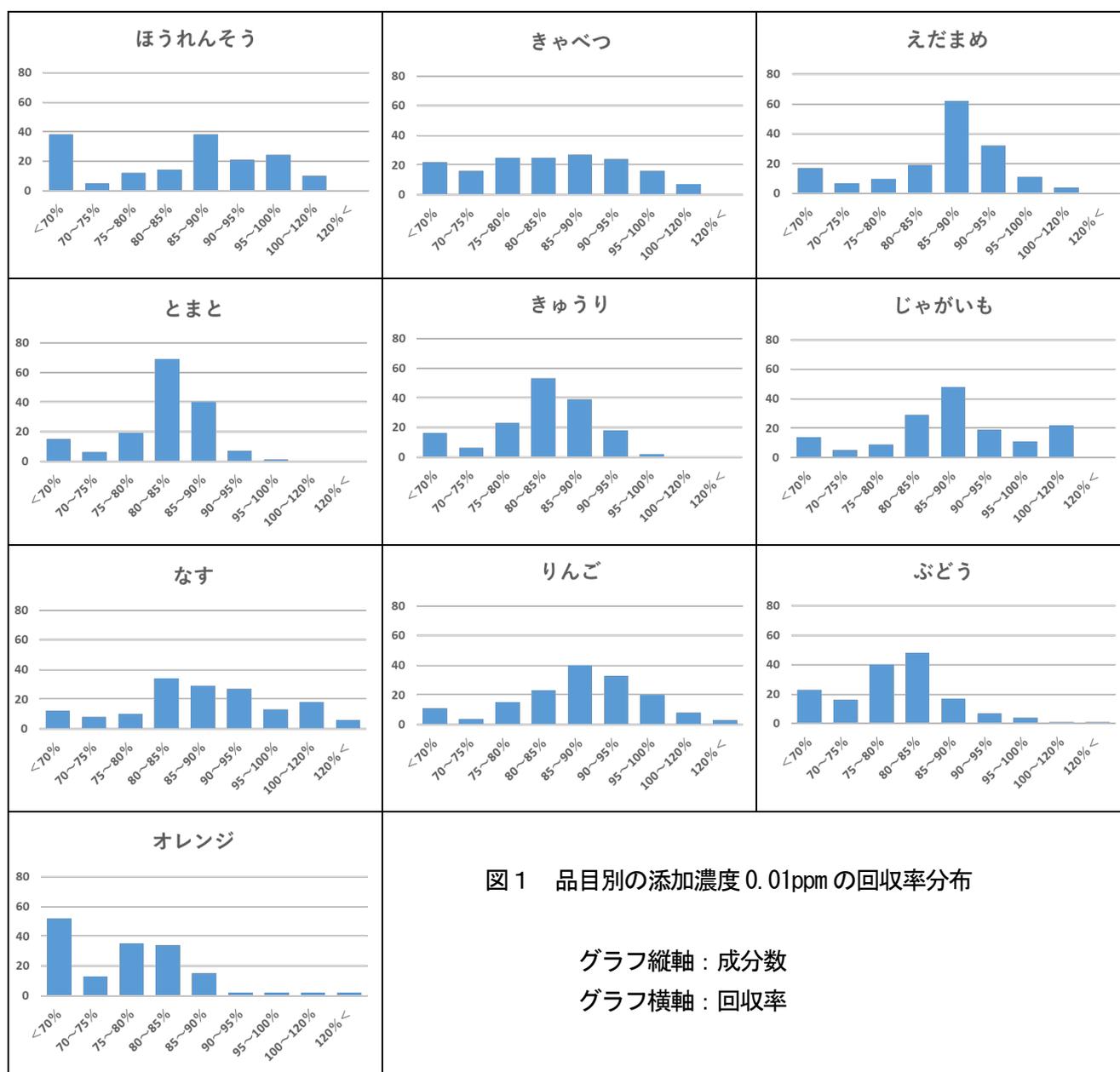
- 株式会社島津製作所 アプリケーションニュース「消毒剤中ベンザルコニウムの高速分析」  
[https://www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/pim/pim\\_document\\_file/an\\_jp/applications/application\\_note/17752/an\\_01-00249-jp.pdf](https://www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/pim/pim_document_file/an_jp/applications/application_note/17752/an_01-00249-jp.pdf)
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(平成22年12月24日食安発1224第1号)

### 研究成果報告書（3）

<b>研究課題名</b>	残留農薬検査における GC-MS/MS 分析の水素キャリアガス使用の検討		
<b>担 当</b>	衛生科学部 主任専門研究員 川村 あさひ		
<b>1 目的</b>	<p>当センターでは、食品衛生法に基づく収去検査により、年間 100 検体程度の野菜、果実等の残留農薬検査を実施しており、当該検査は、GC-MS/MS 及び LC-MS/MS により分析している。</p> <p>このうち、GC-MS/MS 分析で使用するキャリアガスについては、測定感度の高いヘリウムを使用していたが、近年、日本国内へのヘリウム供給が不安定化し、価格も高騰するなどの問題が発生しており、当センターへの供給もいつまで続くか不透明となっている。</p> <p>ヘリウムの供給が停止されれば、GC-MS/MS 分析による検査ができなくなるため、ヘリウムの代替ガスとして水素による分析に切り替えを行うこととし、その妥当性評価試験を実施することで、収去検査測定成分の再設定を行い、検査体制の維持継続を図ることを目的として検討を行ったので、その概要を報告する。</p>		
<b>2 方法</b>	<p>前処理方法は、株式会社アイステイサイエンスが開発した STQ 法（GC-B 法）により行った。</p> <p>品目毎に、試験対象である農薬を含まない試料に試験対象の農薬を 2 濃度（0.01ppm 及び 0.04ppm）添加した試料を調製し、1 日（1 回）2 併行、5 日間の枝分かかれ試験を行った。</p> <p>品目は、代表農産物 10 品目（ほうれんそう、きゃべつ、えだまめ、とまと、きゅうり、じゃがいも、なす、りんご、ぶどう、オレンジ）とし、試験対象の農薬は、162 成分とした。</p> <p>GC-MS/MS の測定条件は、表 1 のとおりである。</p> <p>測定結果について、「妥当性評価ガイドライン」に基づき、選択性、回収率、精度及び定量限界を求め、目標値に適合しているかを確認した。</p>		
	<b>表 1 GC-MS/MS 測定条件</b>		
	機 器	GC : Agilent社製 7890B MS/MS : Agilent社製 7000D	
	キ ャ リ ア ガ ス	水素	
	注 入 口 温 度	250 °C	
	オ ー プ ン 温 度	70 °C (2 min) - 25 °C/min - 150 °C - 3 °C/min - 200 °C - 8 °C/min- 310 °C (5 min) → 310 °C (ポストラン5 min)	
	トランスファーライン温度	290 °C	
	カ ラ ム	Agilent社製 VF-5MS (0.25 mm × 30 m , 0.25 μm)	
	注 入 モ ー ド	パルスドスプリットレス	
	試 料 注 入 量	3 μL	
	イ オ ン 化 方 式	EI (70 eV)	
	イ オ ン 源 温 度	320 °C	
	測 定 モ ー ド	MRM	
<b>3 結果</b>	<p>妥当性評価の結果について、表 2 に妥当性評価項目毎の適合数を、図 1 に品目別の添加濃度 0.01ppm の回収率の分布を示した。</p> <p>水素キャリアガスによる分析においても、多くの農薬成分の定量が可能であることが示された。</p> <p>一方、オレンジは、他の品目に比べて低回収率で精度も低く、妥当性評価不適合となる成分が多くあった。オレンジは、以前にもキャリアガスがヘリウムの際に妥当性評価を行っているが、あまり良好な結果は得られていなかった。これは、柑橘類に含まれるフラボノイド類などの夾雑成分の影響と推定されたことから、今回の検討では、夾雑成分除去のために固相カラム（GCK-20mg）を追加して前処理を行ったが、平面構造を有する対象農薬も除去されてしまい、回収率が改善した成分よりも悪くなった成分のほうが多くなってしまった。そのため、オレンジの前処理や機器分析の方法については、今後も検討を要する。</p>		
<b>4 今後の研究方向等</b>	<p>本検討により、水素キャリアガス分析による残留農薬検査実施標準作業書を作成したため、収去検査を維持継続することが可能となった。今後は、収去検査対象品目を拡充するため、今回妥当性評価を実施した代表農産物に類似する食品についても添加回収試験を実施し、試験検査体制の充実強化を図りたい。</p>		

表2 妥当性評価項目毎の適合数（対象農薬 162 成分中）

品目	選択性	0.01 ppm			0.04 ppm			定量下限	全評価項目 適合数
		回収率	併行精度	室内精度	回収率	併行精度	室内精度		
ほうれんそう	161	124	151	121	146	147	149	155	108
きゃべつ	162	140	156	142	147	152	148	157	128
えだまめ	162	145	153	147	147	152	150	158	138
とまと	157	142	155	151	143	148	148	157	136
きゅうり	157	141	153	150	138	151	144	157	135
じゃがいも	157	143	152	141	142	152	145	151	128
なす	157	139	154	139	138	146	137	151	117
りんご	157	143	154	147	144	147	146	153	133
ぶどう	156	133	149	142	141	134	148	152	121
オレンジ	153	103	148	117	111	118	100	143	87



## 研究成果報告書（４）

<b>研究課題名</b>	<b>残留動物医薬品検査における分析対象化合物の見直し検討</b>
<b>担 当</b>	<b>衛生科学部 技師 藤田 涼斗</b>

### 1 目的

本県で行っている残留動物用医薬品の収去検査は、牛・豚・鶏の筋肉、養殖魚、鶏卵等 6 品目を対象に、43 から 45 の分析対象化合物を一斉分析法で検査している。しかし、ここ 10 年余り、分析対象成分の見直しがほとんどなされていない。このことについて、一部の分析対象化合物の標準品の入手が難しくなっているほか、動物用医薬品の使用実態との乖離が危惧されるため、分析対象成分と併せて試験法を変更することとした。

本研究では、2 ヶ年で試験法の検討と分析対象化合物の選定を行うこととした。初年度は、分析条件の検討を行った。今年度は、本県での陽性事例などをもとに妥当性評価試験を実施する化合物を選定し、それらについて妥当性評価試験を実施し、収去検査における分析対象化合物を選定したのでその概要を報告する。

### 2 方法

はじめに、食肉衛生検査所に聞き込み調査を行い、近年の動物用医薬品の使用薬剤と残留薬剤のデータを得た。また、農林水産省動物医薬品検査所による令和 4 年動物用医薬品等製品販売高年報<sup>1)</sup>を参照した。それらのデータをもとに、これまで収去検査で対象としていた 48 成分と当センターで過去に LC-MS/MS 分析条件を設定した 54 成分に新たに 12 成分を加え、計 114 成分にて分析条件の検討を実施することとした。

初年度に 5 種類の前処理方法にて実施した添加回収試験の結果について、分析条件の検討を行う 114 成分のうち最も回収率等が良好であったことから、QuEChERS 法による抽出、SPEEDIA(三浦工業社製)を用いて精製する方法を採用した。前処理方法および精製方法は、昨年度の実施方法を一部改訂し、図 1 の通りとした。液体クロマトグラフ(LC)の条件および質量分析計(MS/MS)の条件は、今年度の収去検査と同じ条件にて実施することとした。

妥当性評価の方法は、以下の通りに実施することとした。

- ・品目：5 品目(牛・豚・鶏の筋肉、鶏卵、魚類(サケ目))

※県で行っている収去検査の品目に基づき決定

- ・添加濃度：低濃度 0.01ppm、高濃度 0.04ppm
- ・枝分かれ試験の方法：分析者 1 人、1 日(1 回) 2 併行、5 日間

測定結果については、妥当性評価ガイドライン<sup>2)</sup>に基づき、回収率及び精度を求めた。適合基準は、本ガイドラインの目標値に基づき、回収率が 70~120%であり、併行精度は低濃度(0.01ppm)で 25%未満、高濃度(0.04ppm)で 15%未満、室内精度は低濃度で 30%未満、高濃度で 20%未満であることとした。

また、回収率が 50~150%となった成分におけるその品目については、定性可能成分とすることとした。

### 3 結果

妥当性評価の結果について、成分・品目ごとに適合となったものを表 1 に示す。5 品目すべてで、適合した成分は 45 成分となった。使用傾向などを勘案し、当センターの収去について 43 項目、45 成分を対

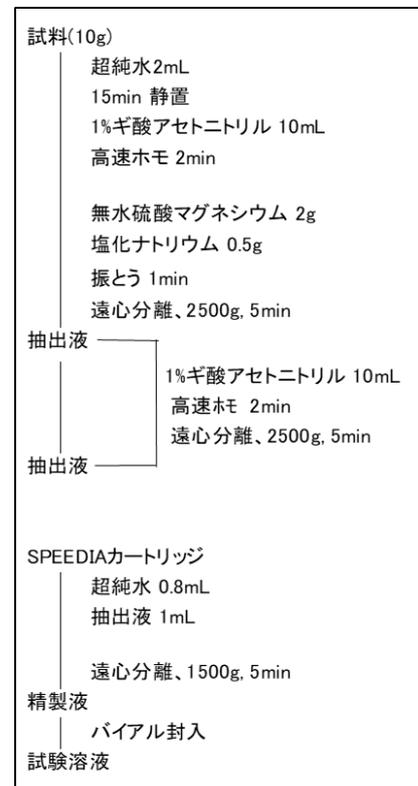


図 1：分析前処理方法

象とすることとした。また、回収率が 50~150%となった品目ごとの成分を表2に示す。これらは収去対象品目に併せて、事件事務対応時の検査またはモニタリング検査において定性可能な成分とする。

表1：妥当性評価適合成分

• clenbuterol	• marbofloxacin	• oxibendazole	• sulfamethoxazole
• dicloxacillin	• mebendazole	• oxolinic acid	• sulfamethoxypridazine
• difloxacin	• miloxacin	• pyrimethamine	• sulfamonomethoxine
• ethopabate	• nalidixic acid	• sulfabenzamide	• sulfapyridine
• famphur	• nicarbazin	• sulfacetamide	• sulfaquinolaxine
• fenbendazole	• ofloxacin	• sulfachlorpyridazine	• sulfathiazole
• florfenicol	• orbifloxacin	• sulfadiazine	• thiabendazole
• flubendazole	• ormetoprim	• sulfadimethoxine	• tiamulin
• flumequine	• oxacillin	• sulfadimidine	• trimethoprim
• flumixim	• oxfendazole	• sulfadoxine	• valnemulin
• ketoprofen	• oxfendazole sulfone	• sulfamerazine	• xylazine
• lebamisole			

表2：定性可能成分（回収率：50~150%）

成分名	牛筋肉	豚筋肉	鶏筋肉	鶏卵	魚類（サケ科）	成分名	牛筋肉	豚筋肉	鶏筋肉	鶏卵	魚類（サケ科）
イソプロチオラン	○	○	○	○	×	サラフロキサシン	○	○	○	○	○
フェノブカルブ	○	○	○	○	○	チアベンダゾール代謝物	○	○	○	○	○
プレドニゾン	○	○	○	○	×	プロカイン	○	○	○	○	○
ヒドロコルチゾン	○	×	○	○	○	ベタメタゾン	○	○	○	○	○
リンコマイシン	○	×	○	○	×	スルフィソキサゾール	○	○	○	○	○
アルベンダゾール代謝物	○	○	○	○	○	デキサメタゾン	○	○	○	○	○
αトレンボロン	○	○	○	○	○	ベンジルペニシリン	○	○	×	○	×
βトレンボロン	○	○	×	×	×	フェノキシメチルペニシリン	○	○	○	○	○
メレンゲステロール	×	×	○	×	×	クロキサリリン	○	○	○	○	○
エンロフロキサシン	○	○	○	○	○	ナフシリン	×	○	×	○	○
ダノフロキサシン	×	○	×	×	×	セファゾリン	×	×	×	○	○
スルファモイルダブソン	○	○	○	○	○	セフチオファル	○	×	○	○	○
オキシテトラサイクリン	○	×	×	○	×	ノルフロキサシン	○	○	○	○	○
クロルテトラサイクリン	○	○	○	○	○	シプロフロキサシン	○	○	○	○	○
テトラサイクリン	○	○	○	○	○	スピラマイシン	×	○	○	○	○
ドキシサイクリン	○	○	×	○	○	オレアンドマイシン	○	○	○	○	○
セフロキシム	×	×	×	○	○	トリクラベンダゾール	○	○	○	○	○
2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール	○	○	○	○	○	モランテル	×	×	×	×	○
スルファニトラン	○	○	○	○	○	クロビドール	○	○	○	○	○
チアンフェニコール	○	○	○	○	○	ピランテル	○	○	○	○	×
ゼラノール	○	○	○	○	○	クロルマジノン	×	○	○	×	×
ジクラズリル	○	○	○	○	○	カルバドックス	○	○	○	○	○
クラムフェニコール	○	○	○	○	○	ボスカリド	○	○	○	○	○
クロルスロン	○	○	○	○	○	ワルファリン	○	○	○	○	○
						ジフルベンズロン	×	○	×	○	×

#### 4 今後の研究方向等

動物用医薬品等検査実施標準作業書(SOP No. : 5-53-9)を作成し、当所における動物用医薬品検査の検査体制を整備した。一方、テトラサイクリン系、アミノグリコシド系、セファム系、ペニシリン系の薬剤では妥当性が取れない成分が目立った。今後は、それらの系統の動物用医薬品の妥当性が取れる分析方法を検討することで、引き続き、本県の食の安全を支えるための検査体制の拡充を図ることとする。

#### (参考文献)

- 1) 農林水産省 動物用医薬品検査所「令和4年動物用医薬品、医薬部外品、医療機器及び再生医療等製品販売高年報」
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」

## 研究成果報告書（5）

<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 主任専門研究員 岩淵香織</b>
<p><b>1 目的</b></p> <p>新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は2020年2月1日に指定感染症に定められ、当センターでも新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の遺伝子検査が実施されたが、検査対象の大部分はSARS-CoV-2不検出であり、他の呼吸器感染症が疑われた。COVID-19流行下で、SARS-CoV-2の他にどのような呼吸器ウイルスの流行があったのかを明らかにするため、これらCOVID-19不検出症例からウイルス等の検索を行った。その結果、998検体中119検体から病原ウイルス等が検出されている。これら結果について、ひとつは、COVID-19流行前と第8波以降（流行後とする）の感染症発生動向調査に基づく病原体サーベイランスの検査結果を比較し考察すること、もうひとつは、最も検出数の多かったヒトライノウイルス（HRV）52例の詳細な解析を行うこととした。</p> <p><b>2 方法</b></p> <p>(1) COVID-19流行前と流行後の感染症発生動向調査に基づく病原体サーベイランスの検査結果の比較集計をする期間（検体採取期間）は下記のとおりとし、検出されたウイルス別のグラフを作成した。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・流行前：2019年1月～12月（平成31年1月～令和元年12月）</li> <li>・流行後：2023年4月～8月（令和5年4月～令和5年8月）</li> </ul> <p>なお、SARS-CoV-2不検出症例からの検査期間（検体採取期間）は、2020年2月～12月（令和2年2月～令和2年12月）であり、流行中と呼ぶこととする。</p> <p>(2) HRVの解析</p> <p>HRVは、3つの遺伝子群HRV-A、B及びC群に分類されており<sup>1)</sup>、さらに遺伝子配列の違いから多数の血清型が存在する（A:81種類、B:31種類、C:60種類<sup>2)</sup>）。COVID-19不検出症例から検出された52例のHRVは、VP4/VP2領域を増幅するコンベンショナルRT-PCRを行い、そのPCR産物をダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。得られた遺伝子配列はRVdb<sup>2)</sup>及びEnterovirus Genotyping Tool Version 0.1<sup>3)</sup>により同定し、33例がHRV-Aに、1例がHRV-Bに、18例がHRV-Cに分類され、同時に50例（A:31、B:1、C:18）の血清型が特定された。また、シーケンスデータはMEGA6を使用しClustal Wを用いてアライメントを行い、参照配列はRVdb<sup>2)</sup>を参照しNJ法による系統樹を作成し検出されてウイルスのクラスター分類などを行った。</p> <p><b>3 結果及び考察</b></p> <p>(1) SARS-CoV-2不検出症例から検出されたウイルス等について、COVID-19流行前と流行後の感染症発生動向調査に基づく病原体サーベイランスの検査結果の比較したグラフを図1に示す。流行前と流行後は、インフルエンザウイルス（それぞれ34%、47%）が多くを占めているが、流行中は、インフルエンザウイルスは減少しHRVが46%（52例）と多くを占めていた。</p> <p>HRVが検出された症例の年齢層別では、0-9歳及び29-39歳が12名、19-29歳が10名の順に多くなっていた（図2）。「10歳未満の小児では、COVID-19の流行拡大後もSARS-CoV-2はほとんど検出されなかったが、HRVの検出率が著しく上昇した。」との報告があり<sup>4)</sup>、10歳未満の小児について県内でも同様であったことが推察された。また、HRV-Aが20歳代、30歳代の年齢層に多く検出されており病原体サーベイランスでは対象が小児科であることから把握できていなかった年齢層にライノウイルスの発生があったことが認められた。</p> <p>なお、HRVはエンベロープを持たないため、アルコールが効きにくいことが知られており<sup>5) 6)</sup>、COVID-19流行下でのHRVの流行は、アルコールによる予防効果が低かったことも関連すると考えられた。ただし、石鹸と水を使う手洗いはHRVにも有効であり<sup>5)</sup>、感染症対策としては特定のウイルスに絞った個別的な対策ではなく総括的な対策が必要と考えられた。</p>	

(2) 52例のHRVは、19の多様な血清型に分類された。HRV-Aは、33株から8つの血清型が検出された。集積の多い血清型は3つで、A82が11例、A106が8例、A103が6例である。また、HRV-Cは18例から10の血清型が検出された。集積した血清型はC43のみである。それらの地区別の状況は図3、4のとおりである。なお、HRV-Bは、1例検出され、血清型はB84であった。

系統樹解析は、HRV-AとHRV-Cに分けて実施した。HRV-Aで集積のあったA82の11例のうち9例、A106の8例、A103の6例はそれぞれの血清型によるクラスターを作った(図5)。A82の2例は9例のクラスターとは別のクラスターとなった。HRV-Cで集積のあったC43についてもクラスターを作った(図6)。同じ血清型でも塩基配列は異なっていることもあり(家族内、同一人物からの異なる検体は一致)、クラスターは作ったものの広域散発事例かどうかの判断は難しい。

HRV感染症の多くは軽症と考えられる一方で、児童の喘鳴や喘息の憎悪の60-70%にHRVが関与すると言われて<sup>1)</sup>いるが、多様な血清型等のためワクチンが開発されていない<sup>1) 2)</sup>。さらなる調査・研究が必要である。

#### 4 今後の研究方向等

本研究は終了となるが、研究が進んでいない小児呼吸器感染症の原因ウイルスがあること、また、さらなる新興感染症等の流行が危惧されることから、積極的に病原体サーベイランスを行っていくことが必要である。

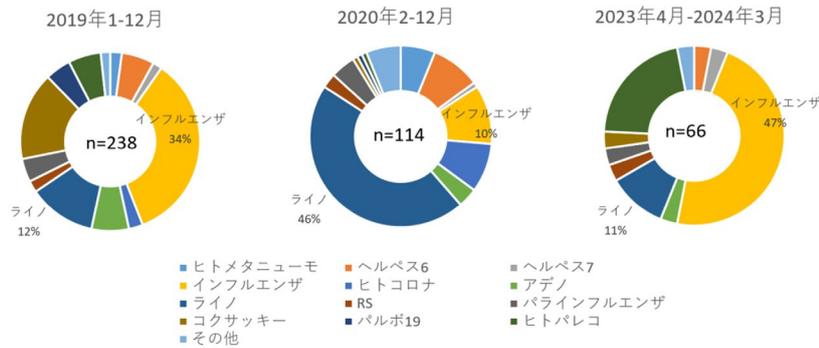


図1 COVID-19流行前と流行後の感染症発生动向調査に基づく病原体サーベイランスの検査結果の比較

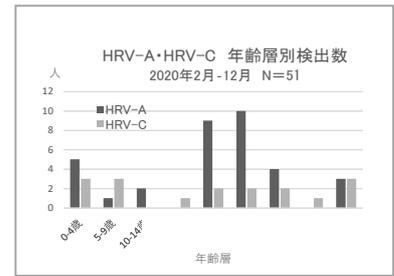


図2 HRV検出数 年齢層別

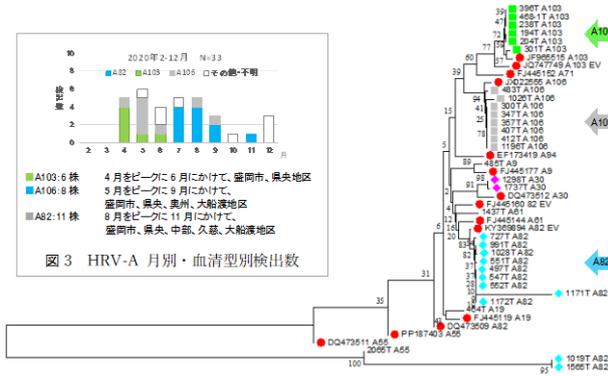


図3 HRV-A 月別・血清型別検出数

図5 HRV-Aの分子系統樹  
NJ法 P4/VP2領域(435bp) ●参照配列

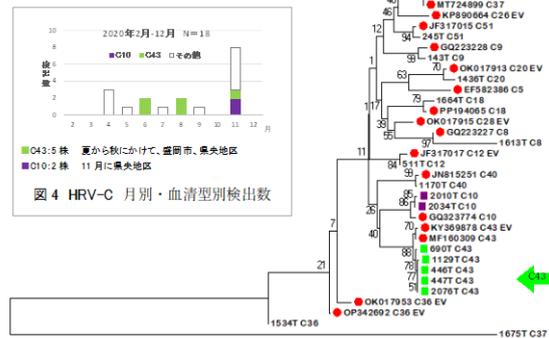


図4 HRV-C 月別・血清型別検出数

図6 HRV-Cの分子系統樹  
NJ法 P4/VP2領域(435bp) ●参照配列

#### 参考文献

- 1) 国立感染症研究所 ライノウイルス検査マニュアル
- 2) Rvdb: rhinovirus database (<http://rvdb.mgc.ac.cn>)
- 3) Enterovirus Genotyping Tool Version 0.1 (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus/>)
- 4) Emi Takashita, *et al.*, Influenza and Other Respiratory Viruses15: 488-494, 2021
- 5) Savolainen-Kopra C, *et al.*, J Med Virol 84: 543-547, 2012
- 6) 厚生省保健医療局結核感染症課監修, 消毒と滅菌のガイドライン, へるす出版, p36-80
- 7) 尾家重治, 消毒薬の選び方・使い方, じほう, p71-109

## 研究成果報告書（6）

研究課題名	環境水サーベイランスにおける病原ウイルスアセスメント
担 当	保健科学部 専門研究員 梶田弘子
<p><b>1 目的</b></p> <p>当センターでは、感染症流行予測調査事業のポリオウイルス感染源調査のため、環境水（流入下水）サーベイランスを毎月実施している。感染源調査で実施している下水濃縮法（陰電荷膜濃縮法）は、ポリオウイルス以外のエンテロウイルス等ウイルスを効率的に捕捉できるため、感染症発生动向調査における病原体サーベイランスの一助となっている。また、顕性、不顕性を問わず多くの病原ウイルス RNA を検出できるため、患者発生の状況を把握するだけでなく感染症の早期探知や流行を予測することが期待される。</p> <p>本研究は、下痢症を引き起こす腸管系病原ウイルスや新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) について、流入下水の実態調査を行い、感染症発生动向調査事業の充実に資することを目的に実施した。</p>	
<p><b>2 方法</b></p> <p>(1) 令和元年度以降の感染症流行予測調査事業で月 1 回の頻度で採水し濃縮した流入下水について、下痢症を引き起こす腸管系病原ウイルスを対象として PCR 検査を実施した。検出されたウイルスについては、感染性胃腸炎集団発生事例の原因ウイルスと比較した。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・令和元～5 年度 60 検体 (12 検体/年 × 5 年)</li> <li>・検査対象ウイルス：ノロウイルス G I (NV G I)、ノロウイルス G II (NV G II)、サポウイルス (SaV)、アデノウイルス (AdeV)、アイチウイルス (AichiV)、アストロウイルス (AstV)、パレコウイルス (ParechoV)</li> </ul> <p>(2) SARS-CoV-2 感染症の流行状況把握の一助とすべく、5 年度の検体を用いて、検査法を検討した。下水濃縮法については、ポリオウイルス検出で実施している陰電荷膜濃縮法と市販キット「Promega Wizard Enviro TNA kit」の 2 つの手法を用いた。リアルタイム PCR 法は、QIAGEN QuantiTect Probe RT-PCR kit (NIID_N2) と TaKaRa SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater (CDC_N1/N2) の 2 種類の Primer/Probe セットを検討した。</p>	
<p><b>3 結果及び考察</b></p> <p>(1) 腸管系病原ウイルスの検出状況</p> <p>① NV G I 及び NV G II は、年度により検出状況に違いはあったが、概ね秋季から翌年初夏に検出され、季節による変動が認められた。令和 3 年 4・5 月は流入下水から G II. 4 が検出され、同時期、下水処理場の流域医療圏では、G II. 4 による感染性胃腸炎の集団感染事例が発生していることから、流入下水から検出されたウイルス遺伝子が地域での流行状況を反映していることが示された。しかし、令和 4 年 1・2 月の流入下水から G II. 2 が検出されているが、同時期は G II. 4 による集団感染事例が多発し、流行状況を反映していなかった。地域での流行を把握するには、月 1 回の採水頻度では難しいと考えられる。</p> <p>② SaV は、概ね通年検出され、特に、冬季から初夏にウイルス RNA 量が増加した。特に、令和 4 年 1 月から増加し、4～6 月にかけて高い値で推移した (図 1)。この時期、県内では 33 件の感染性胃腸炎集団感染事例が発生し、サポウイルスによるものが 22 件とサポウイルスが主流となっていた。地域での流行状況が流入下水に反映していることが示された。</p> <p>③ AstV は、流入下水からほぼ通年検出された。感染性胃腸炎の原因ウイルスとして検出頻度は低いが、県内で集団感染事例の発生が確認されており、今後、定量及び遺伝子型について検討予定である。</p> <p>(2) 下水中の SARS-CoV-2 検査法の検討</p>	

① 令和5年度採水した12検体について、陰電荷膜濃縮法で処理して得られた上清検体と沈渣検体を QIAamp Viral RNA Mini Kit で RNA 抽出し、上述の TaKaRa キットで定量した結果、全検体とも沈渣検体の RNA 量が多かった。しかし、上清検体の RNA 量は沈渣検体の 1/100 から 1/2 量とばらつきが大きく、両方の検体を定量する必要があり、作業時間もほぼ1日を要した。

市販キット「Promega Wizard Enviro TNA kit」の場合、約3時間で下水の濃縮-RNA抽出を行うことが可能で、上清と沈渣検体を1つのカラムで精製し定量可能なことから、「Promega Wizard Enviro TNA kit」で濃縮-RNA抽出することとした。

② 「Promega Wizard Enviro TNA kit」で濃縮-RNA抽出した下水検体を2つのPrimer/Probeセットで定量した結果(n=2)、CDC\_N1/N2法のRNAコピー数の方がNIID\_N2法より10<sup>2</sup>オーダー程度高かった。また、NIID\_N2法では、ばらつきが大きく、下水検体には適していないことからCDC\_N1/N2法で検査することとした。

③ 検討した下水中のSARS-CoV-2検査法を用いて、令和6年2月から岩手県感染症情報センターHPに新型コロナウイルス感染症情報の1つとして、毎週「下水サーベイランス調査結果」を県民に情報発信している(図2)。

#### 4 今後の研究方向等

流入下水からの検出が多かったウイルスについて、流行シーズンに週1回の頻度でのデータ集積を図り、感染症の早期探知や流行予測の可能性を検討し、感染症発生動向調査事業の充実を図る。

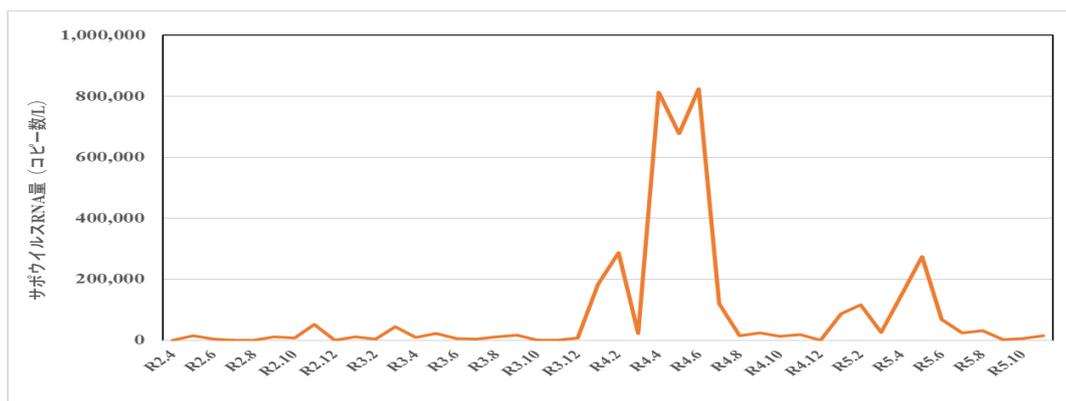


図1 流入下水中のサポウイルス RNA 量の推移 (令和2年4月～令和5年11月)

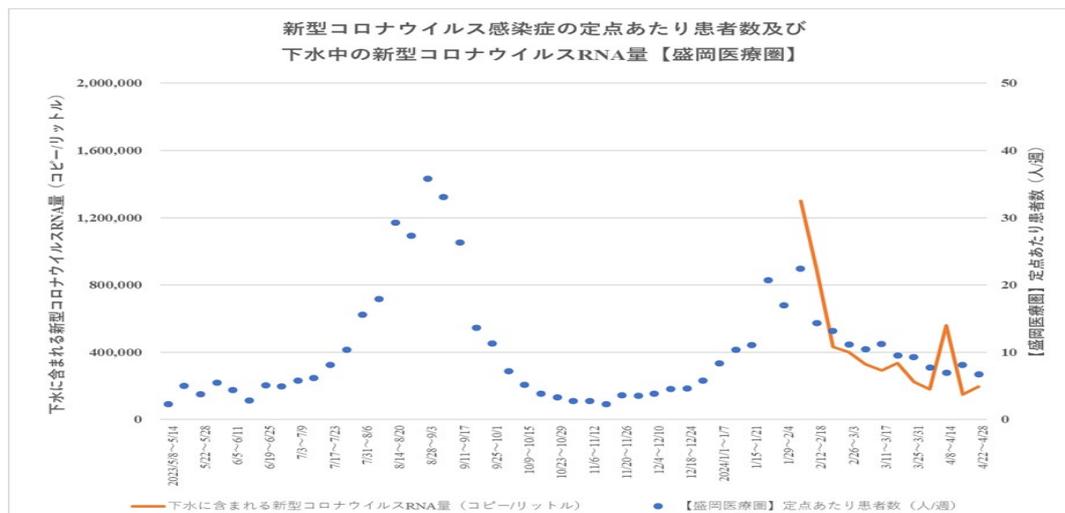


図2 岩手県感染症情報センターHPでの下水中の新型コロナウイルス RNA 量に関する情報提供 (一部抜粋)

研究成果報告書（7）

研究課題名	地域の健康課題解決を目的とした保健情報の効果的活用に向けた基礎的研究
担 当	保健科学部 主任専門研究員 並岡 亜希子、上席専門研究員 三浦 紀恵、 主査専門研究員 平野 春菜

1 目的

本研究は、当センターの保健情報について、データ活用の実態に即したより効果的な情報還元を進めるため、保健所や市町村等の関係機関における保健情報の活用状況及びニーズ等について把握することを目的とする。

また、地域の特徴的な健康課題等を抽出するための新たなデータ解析法の確立を目指す。

これにより、県内関係機関における地域の健康課題解決に向けた、保健情報の効果的な活用に寄与するとともに、地域での生活習慣病予防対策の充実強化に資するものである。

2 方法

(1) 保健情報の効果的活用に向けた情報還元の評価・検討

関係機関を対象に保健情報の活用状況及び課題、ニーズ等に関する調査を実施。回答を集計し、調査結果を基に当センターの情報還元の内容や方法等について評価・検討した。

(2) 特定健診・特定保健指導データの効果的なデータ解析法等の確立

保健情報の活用に関する調査結果及び当センターの解析項目・解析法の評価を踏まえ、具体的な解析項目・解析法・還元内容等を検討した。また、検討した解析項目について、NDB オープンデータや岩手県医療等ビッグデータ等の各種データを用いてデータ解析を行った。

3 結果

(1) 保健情報の効果的活用に向けた情報還元の評価・検討

ア 効果的な情報還元の推進に向けた保健情報の活用に関する調査

[調査期間] 令和5年7月3日～7月28日

[調査対象機関] 433 機関 } 県関係室課、市町村（保健担当課、国保担当課、教育委員会）、  
小・中・高等学校、医療保険者等、大学（保健師・管理栄養士養成施設）

[回答率] 75.5%（回答数 327/433）

[調査結果] 県・市町村（抜粋）（回答率：県本庁・保健所 100.0%、市町村保健担当課・国保担当課 81.8%）

当センターが提供する保健情報を活用している（「活用している」及び「やや活用している」）割合は、県本庁 42.9%、県保健所 100.0%、市町村保健担当課 92.3%、市町村国保担当課 37.0%であった（図1）。

また、当センターの保健情報を各種計画やモニタリング、現状分析等の指標として活用している割合は、県本庁 57.1%、県保健所 100.0%、市町村保健担当課 92.6%、市町村国保担当課 27.6%であった（図2）。保健情報を指標として活用していると回答した機関のうち、最も活用している計画は、健康増進計画で、県保健所 100.0%（9/9）、市町村保健担当課 84.0%（21/25）であった。県・市町村ともに、健康づくりや食育、母子保健、自殺対策、また、市町村では医療保険者に策定が義務付けられているデータヘルス計画等、様々な領域で活用されていた（図3）。

図1 当センターが提供する保健情報の活用状況 ※市町村については、保健所が提供する保健情報を含む。

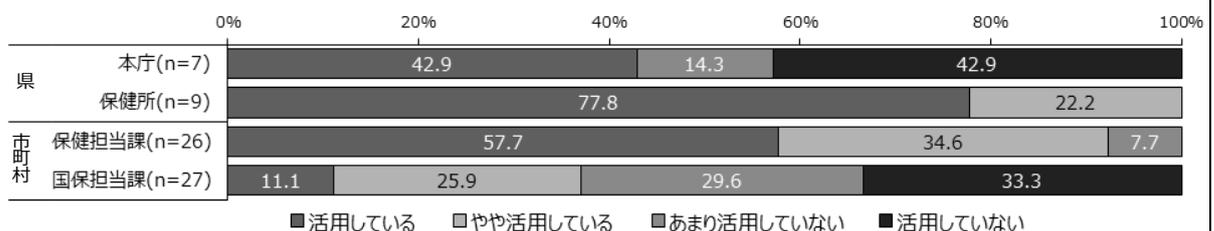


図2 当センターの保健情報を各種計画やモニタリング、現状分析等の指標として活用している割合

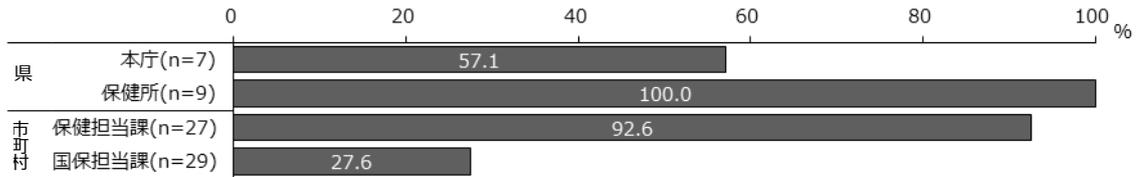
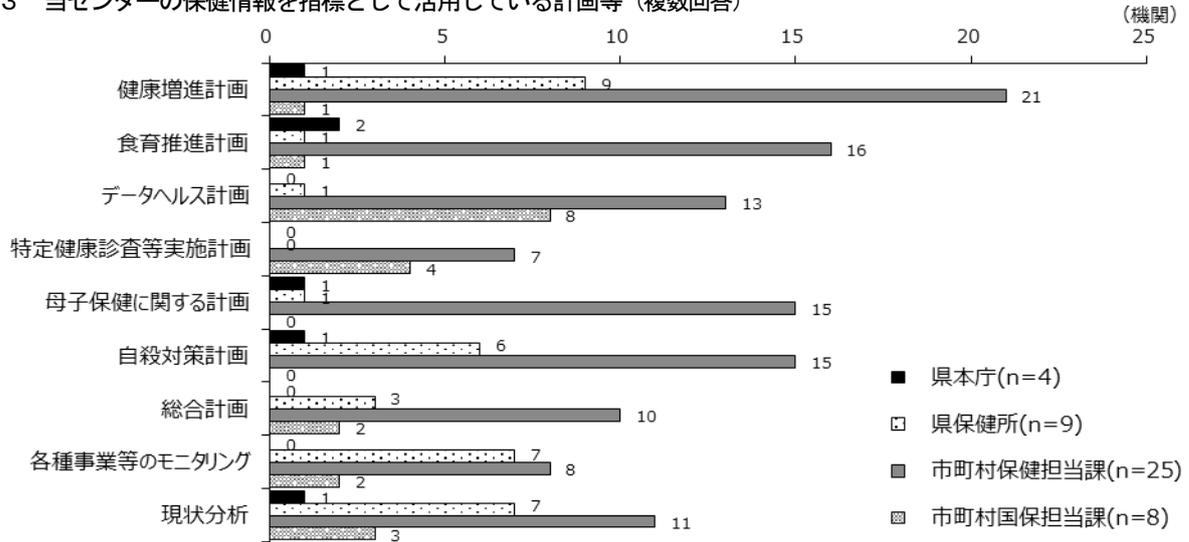


図3 当センターの保健情報を指標として活用している計画等（複数回答）



(2) 特定健診・特定保健指導データの効果的なデータ解析法等の確立

ア 解析項目・解析法・還元内容の検討

解析項目として計63項目を選定。また、データ解析の効率化・省力化を図るため、当センターの従来の解析方法を見直し、新たなデータ解析用の各種テンプレート（標準化該当比算出用・NDBオープンデータ処理用等）を作成した。これにより、データ解析作業に要する時間の大幅な削減に繋がった。

区分	項目数
特定健診・特定保健指導の実施状況	2
特定健診結果の状況	32
生活習慣の状況	29
計	63

イ データ解析

第8回NDBオープンデータ、岩手県医療等ビッグデータ（令和2年度）の特定健診データを用いて、標準化該当比を算出した。また、主催する特定健診・特定保健指導従事者を対象とした研修会において、解析結果の一部を公表した。全国における県の現状について、圏域別、性・年代別で示すことにより、県全体及び圏域の現状・健康課題の把握、また各種施策の立案・評価等の基礎資料になり得ると考える。

4 今後の研究方向等

本研究により、これまで把握が難しかった、関係機関における保健情報活用の実態に関する基礎資料を得ることができたと考える。本研究を踏まえ、今後は下記について取り組む。

(1) 保健情報の効果的活用に向けた情報還元の評価・検討

本研究の調査結果について、更に分析・評価を行い、より効果的な情報還元を行うための検討を進め、情報還元反映させていく。また、調査結果を取りまとめ、関係機関へ還元する。

(2) 特定健診・特定保健指導データの効果的なデータ解析法等の確立

本研究で検討した解析項目等について、解析用テンプレートを用いてデータ解析を進める。また、他の解析項目についても、並行して取り組んでいる情報還元の評価・検討の内容を考慮するとともに、作業の効率化も視野に入れて検討を進める。得られた解析結果については、関係機関へ還元していく。

研究成果報告書（8）

研究課題名	化学物質による環境リスクの把握・低減化に向けたスクリーニング分析法の開発
担 当	環境科学部 上席専門研究員 伊藤 朋子、専門研究員 今野 博貴

【研究①】 LC-QTOFMS Data independent acquisitionによる化学物質スクリーニング手法の検討

1-1 目的と方法

近年開発された LC-QTOFMS 用自動同定・定量システム (AIQS-LC)<sup>1)</sup>は、QTOFMS による精密質量測定と、MS スペクトル、保持時間 (RT) 及び検量線を登録したデータベースにより、標準物質を用いることなく、約 540 種の化学物質ターゲットスクリーニングを可能としている。しかし、AIQS-LC では、AIQS-GC のような RT 補正機能がなく、ラボにより登録 RT と実測 RT が大きくずれる場合があった。MS スペクトルを精密質量で取得することで、物質同定精度を高めているものの、RT が大きくずれる場合には、誤同定や誤不検出が生じる恐れがある。この問題を解決するため、LC 用保持指標 (RI) 物質 N-Alkylpyridinium sulfonates (NAPS)<sup>2)</sup>を用いて、AIQS-LC の RT 補正が可能か検討した。

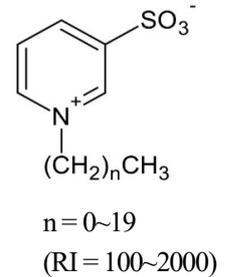


図1 NAPS

国立環境研究所、北九州市立大学、大阪市立環境科学研究センター及び当センターにおいて、NAPS と農薬混合標準 (112 物質) を AIQS-LC の装置条件で測定し、各物質の実測 RT を得た。農薬 RI は、北九大の測定結果と式 (1) から算出した。次に、北九大以外の NAPS RT と算出済み農薬 RI から、(1) 式を展開して、各機関における農薬の補正 RT を算出した。NAPS RI による補正効果は、実測 RT と補正前後の RT の残差により確認した。

$$RI = RI_0 + (RI_1 - RI_0) \frac{RT - RT_0}{RI_1 - RI_0} \quad (1)$$

RI、RT は対象物質の保持指標と保持時間  
 RI<sub>0</sub>、RT<sub>0</sub> は対象物質の直前に溶出する NAPS の RI 及び RT  
 RI<sub>1</sub>、RT<sub>1</sub> は対象物質の直後に溶出する NAPS の RI 及び RT

1-2 結果

各ラボにおける農薬の実測 RT に対する AIQS 登録 RT (補正前) 及び NAPS RI 補正 RT の残差を図 2 に、二乗平均平方根誤差 (RMSE) を表 1 に示す。NAPS による RT 補正を行わなかった場合、いずれの機関も平均してデータベースの登録 RT より 0.3 min 以上のずれが見られるが、NAPS 補正 RT は全ての機関で実測 RT との差の平均が ±0.3 min 以下となり、残差のばらつきや RMSE も小さくなった。このことから、NAPS を用いて、AIQS-LC の RT 補正を行い、物質同定精度を向上することが可能であると考えられた。

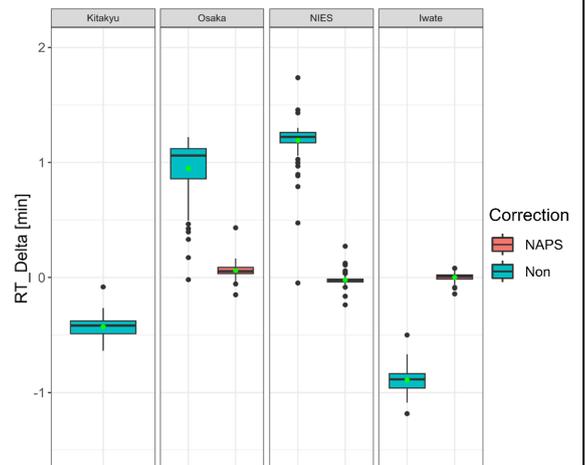


図2 各機関の実測 RT と補正前後の RT 残差の Box Plot

表1 各機関の RMSE

RMSE(min)	補正無し	NAPS補正有
北九大	0.44	-
大阪市	0.98	0.09
国環研	1.20	0.05
岩手県	0.90	0.03

【研究②】 環境リスク物質の環境残留実態の把握

2-1 目的と方法

環境中に放出された化学物質の残留実態と濃度推移を明らかにするため、県南地域に位置する下水処理施設 (STP) の処理水及び処理水が流入する河川の上流・下流並びに支流において、シーズンごとに採水と流量測定を実施し、門上らの方法<sup>1)</sup>に従い、AIQS-LC によるターゲットスクリーニングを行った。

## 2-2 結果

採水地点の模式図を図3に、シーズン毎流量を図4に示す。また、各地点におけるカテゴリーごとの検出物質数を表2に、下水処理水中の検出率と検出濃度が高かった10物質について、下流1地点と上流域の総量の比を表3、採取地点・季節ごとのカテゴリー別最大検出濃度のヒートマップを表4に示す。

検出物質数は、下水処理水が最も多く、年間で約80物質を検出した。カテゴリー別では医薬品が多く検出されたが、防さび剤に使用される1H-benzotriazolが高頻度で検出されていることも特徴的であった。また、下水処理水流入前の上流河川においても、Distyrylbiphenyl disulfonate(蛍光増白剤)やFexofenadine(抗ヒスタミン剤)などのPPCPsが高頻度かつ比較的高濃度に検出されており、浄化槽などを通じた生活排水の影響が伺われた。検出濃度のヒートマップでは、下水処理水の検出濃度が高く、流入後の下流地点が影響を受けていたほか、支流河川の春季の農薬類がやや高濃度となり、種類と用途、土地利用形態から、春季に水稲用に使用される農薬の影響であることが推察される。

下流1地点における総量と上流域の総量の比較から、多くの物質は水量により希釈されるのみで、そのまま拡散・流下していると考えられた。

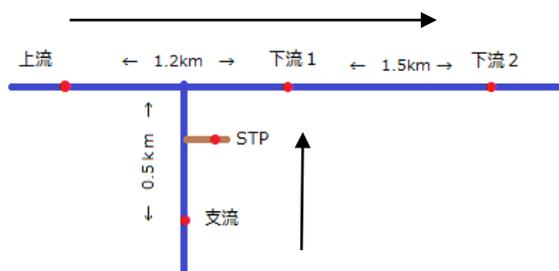


図3 採取地点の模式図

表2 各地点のカテゴリー別検出物質数

カテゴリー	支流	上流	下流1	下流2	STP
農薬	23	18	20	21	14
工業薬品	10	6	7	7	14
医薬品	17	10	22	20	44
生活関連物質等	7	5	6	5	7
合計	57	39	55	53	79

※生活関連物質等：ボディケア製品、人工甘味料、蛍光増白剤等の化学物質をカテゴライズ

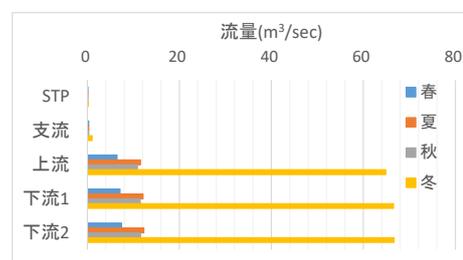


図4 採取時の各地点流量

※冬季採水時、降雨と雪解け水の影響で流量が大きくなった

表3 下流1と上流域の総量比\*

検出物質	総量比		
	春季	夏季	秋季
Sucralose	0.9	1.2	0.9
Distyrylbiphenyl disulfonate (FB351)	1.0	0.9	1.1
Fexofenadine	2.2	1.6	2.1
Metformin	1.1	1.1	1.2
Fluorescent brightener 71 (FB71)	1.6	0.0	0.0
Diphenhydramine	0.8	0.7	1.0
Sulpiride	1.4	1.6	1.6
Tetraglyme	0.6	0.0	0.7
Lidocaine base	1.2	1.5	1.3
1H-Benzotriazole	6.7	24.5	9.5

※総量比=下流1総量/(上流総量+支流総量+STP総量)

総量は水質濃度と流量から算出(降雨影響が大きい冬季の結果を除外)

表4 採取地点・季節ごとのカテゴリー別最大検出濃度のヒートマップ(単位: ng/L)

カテゴリー	支流				上流				下流1				下流2			
	spring	summer	autumn	winter	spring	summer	autumn	winter	spring	summer	autumn	winter	spring	summer	autumn	winter
農薬	157.2	240.3	103.8	311.3	30.3	18.2	12.0	23.3	40.8	20.7	19.2	27.4	45.9	20.8	21.8	32.6
工業薬品	343.0	242.0	24.9	15.0	6.1	0.4	3.4	20.5	153.5	280.3	68.7	29.7	206.6	360.4	58.8	68.3
医薬	126.7	47.2	97.0	30.5	24.1	16.5	12.2	2.9	289.5	131.3	186.5	43.6	302.7	135.6	229.1	47.3
生活関連物質	450.7	338.9	261.1	411.8	50.5	55.6	70.6	28.9	453.1	339.7	223.4	119.5	515.4	340.6	258.2	48.8
STP	183.3	115.7	75.1	393.9	826.0	964.4	2212.5	1211.1	5240.9	5696.6	6128.2	6035.0	22992.7	24884.6	14068.5	11466.7

### 【参考文献】

- 1) Kadokami, K.; Ueno, D. Anal. Chem. 2019, 91(12), 7749–7755
- 2) Rainer Stoffel et al., 2022, Anal. Bioanal. Chem. 414, 7387-7398

## 研究成果報告書（9）

<b>研究課題名</b>	<b>微小粒子状物質（PM2.5）濃度の地域的な特性に関する研究</b>
<b>担 当</b>	<b>地球科学部 専門研究員 畠山 幸大</b>

### 1 目的

大気中に浮遊する微小粒子状物質（以下「PM2.5」という。）はイオン成分、炭素成分及び無機元素成分などから構成されており、成分組成を解析することはPM2.5による大気汚染の地域的な特性を明らかにする手がかりとなる。

令和5年5月22日及び23日は全国各地で黄砂が観測され<sup>1)</sup>、岩手県の大気常時監視システムにおいても各測定局でPM2.5濃度の上昇が認められた。本研究では、令和5年度春期（令和5年5月10日～令和5年5月24日）の成分分析結果について検討することで、岩手県で採取されたPM2.5の成分組成と黄砂の関係について考察する。

### 2 方法

サンプラーとして Thermo 社製 FRM2025i 型を使用し、毎日午前0時から24時間採取した。PTFE及び石英フィルターに捕集した試料は「大気中微小粒子状物質（PM2.5）成分測定マニュアル」（環境省）<sup>2)</sup>に準拠して分析し、質量濃度、イオン成分（Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>及びMg<sup>2+</sup>）、炭素成分（有機炭素（OC）及び元素炭素（EC））及び無機元素成分（Na、Al、K、Ca、Sc、V、Cr、Fe、Ni、Zn、As、Sb及びPb）を測定した。なお、令和5年度の測定地点は滝沢市菓子局及び久慈市八日町局であるが、令和5年度春季においては菓子局で機器トラブルによる欠測があったため、本研究では主に八日町局の結果について扱う。

### 3 結果と考察

#### （1）PM2.5 質量濃度及び主要成分

八日町局で採取されたPM2.5試料についてPM2.5質量濃度を見ると、全国各地で黄砂が観測された5月22日～23日の他、5月18日～19日にも上昇が見られた（図1）。なお、菓子局で採取されたPM2.5試料についても同様の傾向が見られた。

主要成分の内訳を見ると、5月18日～19日については硫酸イオン（SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>）の濃度が他の日よりも高く、硫酸イオンがPM2.5質量濃度

の上昇に寄与したと考えられる。一方で、5月22日～23日については、同じくPM2.5質量濃度の上昇が見られた5月18日～19日に比べると主要成分の濃度の合計は小さく、主要成分に分類されない成分の割合が高くなっていることが分かった。5月22日～23日のPM2.5には、通常はPM2.5質量濃度への寄与が少ないとされる無機元素成分が多量に含まれていると考えられる。

#### （2）無機元素成分

無機元素成分は、PM2.5質量濃度への寄与が僅かな成分であっても発生源の情報を多く含んでいることがあり、濃度やその比を用いた解析が発生源の推定に有効である。

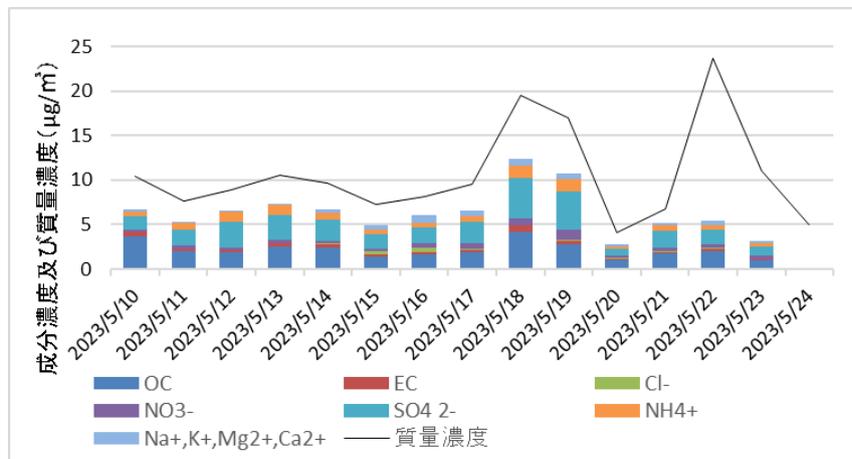


図1 主要成分の質量濃度（八日町局） 5月24日は炭素成分の採取をしない日であったため、主要成分の内訳は示さずPM2.5質量濃度のみ示す。

日本上空に飛来する黄砂粒子は、鉱物の組成としては石英、長石、雲母(イライト)、緑泥石、カオリナイト、方解石、石膏、カルサイト及び硫酸アンモニウム等が主成分とされる<sup>3)</sup>。また、無機元素の種類に着目して組成を捉える場合、ケイ素、アルミニウム、カルシウム及び鉄が主成分とされる<sup>4)</sup>。そこで、主成分の元素のうち ICP-MS のデータのないケイ素を除いたアルミニウム、カルシウム及び鉄と、一般に長石や雲母に含まれるナトリウム及びカリウムの計5元素について、PM2.5 質量濃度に対する各元素の含有率を見ると、5月22日～23日はアルミニウム、カリウム、カルシウム及び鉄の含有率が前後の日と比較して上昇していたことが分かった(図2)。

また、黄砂とは地上から巻き上げられた砂であること<sup>3) 4)</sup>を考慮し、土壌由来のPM2.5の指標成分とされているスカンジウム<sup>2)</sup>についても見ると、5月22日～23日はPM2.5質量濃度に対する含有率の上昇が見られた(図3)。

これは、八日町局における令和4年度のスカンジウム含有率の年間平均が $4.8 \times 10^{-5}$ %程度であったのに対し、20倍程度高い値であった。

一方、黄砂が観測されず、無機元素成分の質量濃度への寄与も大きくなかった5月18日～19日についても、5月22日～23日で上昇していたアルミニウム、カリウム、カルシウム、鉄及びスカンジウムの含有率が高い傾向にあることから、5月18日～19日のPM2.5成分組成にも黄砂の影響があった可能性がある。

#### 4 今後の研究方向等

黄砂の影響下におけるPM2.5成分組成は無機元素成分の増大が見られ、金属元素としてはアルミニウム、カリウム、カルシウム、鉄及びスカンジウムが増大するという特徴があることが分かった。この結果により、PM2.5成分の解析を通して黄砂の影響の有無について推定できる可能性が見出された。今後も黄砂等の気象イベント時のPM2.5成分の情報を蓄積していくことで発生源ごとの特性について検討し、もって岩手県における大気環境保全対策に寄与できることが期待される。

#### <参考文献>

- 1) 気象庁: "2023年黄砂観測日および観測地点の表", [https://www.data.jma.go.jp/env/kosahp/kosa\\_table\\_2023.html](https://www.data.jma.go.jp/env/kosahp/kosa_table_2023.html) (2024/3/24 閲覧)
- 2) 環境省: "大気中微小粒子状物質 (PM2.5) 成分測定マニュアル 無機元素測定法 第2版", 2019年5月
- 3) 環境省: "黄砂問題検討会報告書", 2005年9月
- 4) 西川 雅高: "黄砂(こうさ)エアロゾル", 国環研ニュース, Vol.17, No.2, 14(1998)

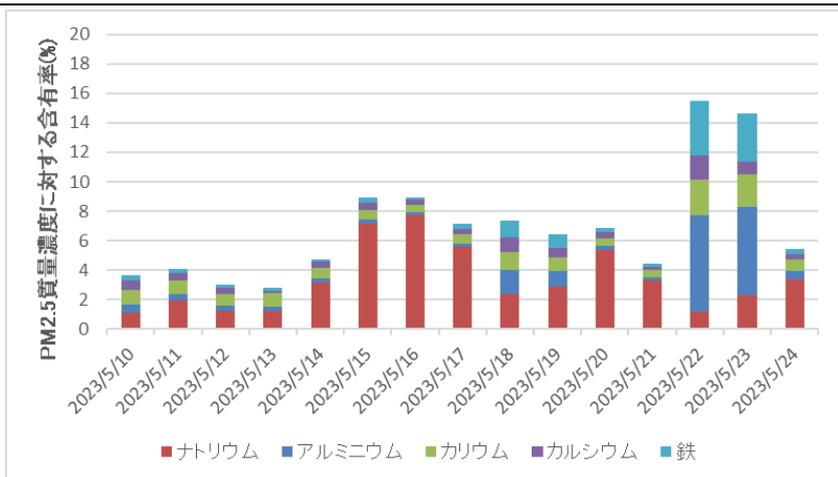


図2 PM2.5 質量濃度に対する主要な金属元素の含有率 (八日町局)

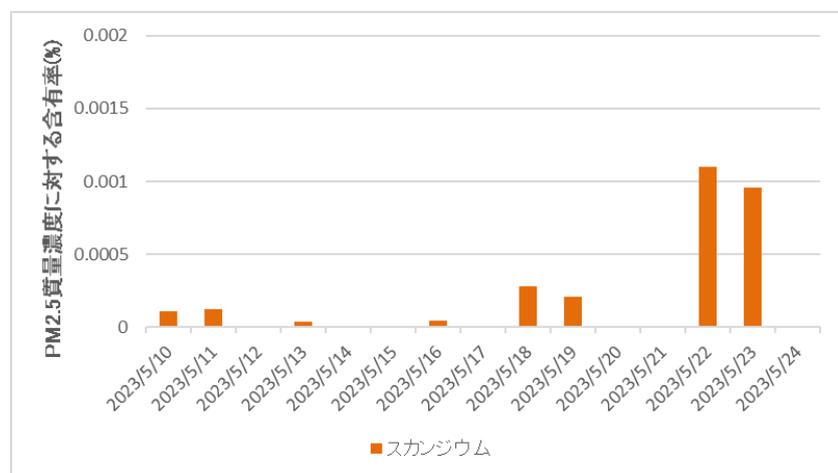


図3 PM2.5 質量濃度に対するスカンジウムの含有率 (八日町局)

## 研究成果報告書（10）

<b>研究課題名</b>	岩手県における絶滅危惧植物を対象にした種の存続の技術開発に関する研究		
<b>担 当</b>	地球科学部 上席専門研究員 小山田智彰		
<b>1 目的</b>	<p>岩手県は豊かな自然環境に恵まれているが、近年は希少植物が絶滅する危機も生じている。そこで、いわてレッドデータブックに掲載されている希少植物から保護の手立てが必要な絶滅危惧植物を対象に、種を存続させるための技術の開発を行う。また、希少植物の資源としての活用を模索し希少植物の保護PRへの活用を図る。その上で他機関からの高度な要求に対応できる技術・実績を獲得するように取り組む。</p>		
	<b>【研究の対象とした絶滅危惧植物】</b>		
	研究分類	対象植物名	いわてRDB
	I	アツモリソウ	Aランク
	I	ムラサキ	Aランク
	I	ナツエビネ	Aランク
	II	ハマナデシコ	Aランク
	II	スナビキソウ	Aランク
	II	エゾツルキンバイ	Aランク
	II	オオアカバナ	Aランク
	<p style="text-align: center;">I 型：内陸に自生する希少植物3種      II 型：沿岸地域に自生する希少植物4種</p>		
<b>2 実施内容</b>	<p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(3) 国、県、市町村等の依頼に対応した技術支援を行う。（地域資源の活用等を含む）</p>		
<b>3 主な成果</b>	<p>(1) 自生域外保全を進めるために、アツモリソウ、ムラサキ、ナツエビネの苗生産試験に取り組み、自生地由来の種子を用いた発芽と育苗試験に着手した。アツモリソウについては環境省新宿御苑管理事務所（国の種子保存機関）に自生地由来の種子を提出した。また、ムラサキについては、山中に設置した野生復帰試験区に苗を移植し、一部の苗について開花を確認した。</p> <p>(2) 環境省より依頼を受けて取り組んだチョウセンキバナアツモリソウの発芽をとりまとめた論文が受理され、自然環境復元研究 14 巻に掲載された。長期保存種子を用いた発芽と苗生産の成功は世界的にも初の報告例となる。</p> <p>(3) 日本大震災津波後の希少植物調査の調査結果を取りまとめて、自然環境復元学会で発表した。関連して、環境省新宿御苑管理事務所に岩手県内のオオアカバナ自生地から採種・保存処理を行った種子を提出した。更に、環境省新宿御苑管理事務所が主催した「第1回東日本地域植物多様性保全拠点ネットワーク会議」で発表した。</p>		
<b>4 今後の取り組み</b>	<p>(1) 内陸に自生する希少植物3種（I）について、野生復帰を目的にした種子保存と苗生産の技術開発を進める必要がある。特に、南部紫根染の原料となるムラサキについては、根系の成長を促進する育苗技術の開発が必要であり、課題として取り組む予定である。</p> <p>(2) 東日本大震災後から継続してきた沿岸部の希少植物調査の結果を取りまとめて学会誌への投稿を検討する。また、海浜性希少植物4種（II）の種子確保と保存法の検討や苗生産技術の開発を進めるが、エゾツルキンバイについては採種が困難であることから、開発等による自生地の消失がないように自生域内保全を進めて行く。</p>		

表1 主な発表業績(令和5年度)

No.	主催団体	掲載書籍名刊号頁	発表年月日	カテゴリー	タイトル名	発表者	査読審査
1	自然環境復元学会	自然環境復元研究第14巻	2024/3/〇	論文	生息域外保全を目的とした絶滅危惧種チョウセンキバナツモリソウの発芽法の開発と保存種子を用いた苗生産	小山田智彰・鞍懸重和・千崎剛正	有
2	自然環境復元学会	第24回自然環境復元学会研究発表会要旨	2024/2/16	口頭発表	岩手県における海浜性希少植物の消失リスクの推移と生息域外保全に関する取り組み～絶滅する前にできること～	小山田智彰・鞍懸重和・千崎剛正	無
3	環境省新宿御苑管理事務所	第1回東日本地域植物多様性保全拠点ネットワーク会議	2024/3/29	講演	岩手県における海浜性希少植物の消失リスクの推移と生息域外保全に関する取り組みから～絶滅する前にできること～	小山田智彰・鞍懸重和・千崎剛正	無

〈第24回自然環境復元学会全国大会の発表スライドより〉

a. 繁殖	c. 採集	e. 自然災害の影響
・自然状態での繁殖能力	・選択的採集の危険度	・東日本大震災後の自然災害(台風・高潮)
5 ほとんど増殖が認められない	5 極めて強い	5 完全に消失
4 弱い増殖力がある	4 強い	4 ほとんどが消失し復元が困難
3 中位の増殖力が認められる	3 中	3 個体の減少が激しい
2 著しい増殖力がある	2 弱い	2 個体の現象がある
1 強大な増殖力がある	1 無い	1 変化なし
b. 立地	d. 個体数	f. 生育基盤の変化
・ハビタットの消失危険度	・分布地点における個体数	・復興工事等の人為的な改変によるもの
5 極めて強い	5 消失	5 完全な改変あり
4 強い	4 10個体未満	4 大規模な改変あり
3 中	3 10個体以上数十個体	3 部分的な改変あり
2 弱い	2 100個体以上数百個体	2 一部に改変あり
1 無い	1 1000個体以上	1 変化なし

図1 独自の消失リスク評価

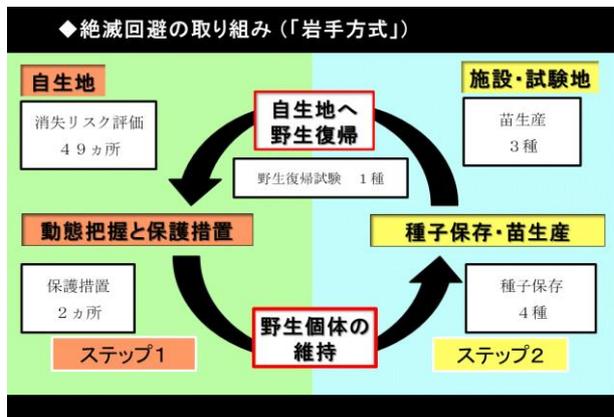


図2 「岩手方式」による絶滅回避の取り組み

〈第1回東日本地域植物多様性保全拠点ネットワーク会議の発表スライドより〉

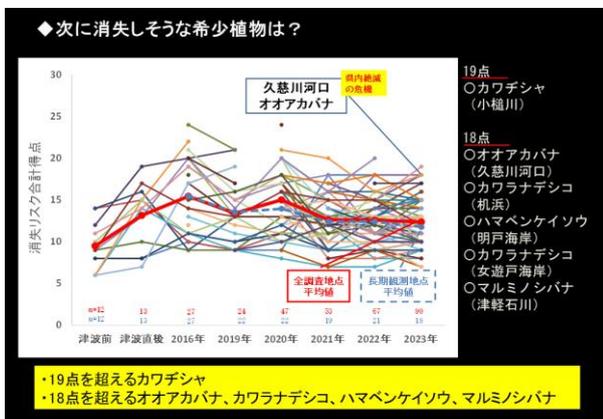


図3 消失する植物の予測

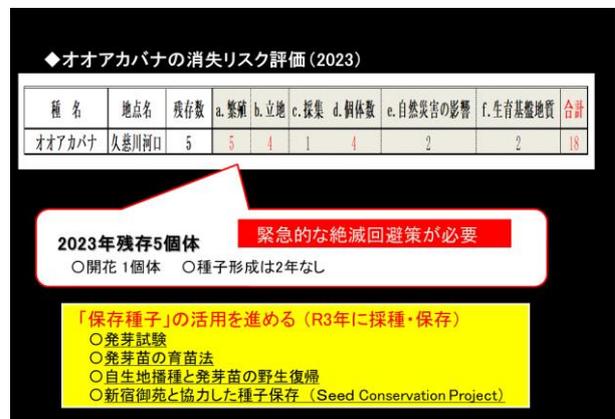


図4 オオアカバナの種子保存と活用

研究成果報告書 (11)

研究課題名	個体特性および個体群構造に基づいたイヌワシの保全に関する研究
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>国内最大規模のイヌワシ生息地を有する岩手県では、これまでにのべ 35 つがいの繁殖が確認されてきた。しかし、2002 年以降、つがいの消失が知られるようになり、その数は 2023 年時点で 11 つがいに増えている。その背景には、長年続く繁殖成功率の低迷による若齢個体の減少があると推測される。今後生息数を回復させていくためには、繁殖率の向上に資する保全方法を明らかにすることが重要となる。</p> <p>これまでの研究によって、県内のイヌワシの生息状況や生態的特性に関して様々な知見が集積されてきたが、個体の移動範囲、幼鳥の分散、地域間での遺伝的差異など、今後の生息動向を予測するために必要となる事項には、まだ十分解明されていないものも多い。また、つがい間でばらつきのある繁殖成績や営巣場所選択についても、標高、地形、土地利用、巣の形態等を考慮した分析により、そのしくみを明らかにすることが求められる。本研究では、こうした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知見を増やし、保全手法を明らかにすることを目的とした。</p> <p>5 年度 (2023 年) には次に挙げる 4 項目に関して調査研究を行なった。(1) つがいの動向および繁殖状況のモニタリング調査、(2) ビデオを用いた繁殖行動調査、(3) 映像を用いた個体識別による移動分散調査、(4) 標高や巣の形態を考慮した繁殖成績の解析。</p> <p><b>2 方法</b></p> <p>(1) つがいの動向および繁殖状況のモニタリング調査</p> <p>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も実施した。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を検討した。</p> <p>(2) ビデオを用いた繁殖行動調査</p> <p>巣に設置されたビデオカメラおよびインターバル撮影のできるスチルカメラによって、イヌワシの繁殖行動を長期的に撮影し、その映像に基づいて、親鳥の出入り頻度、抱卵・抱雛時間、雛の成長、給餌頻度、食餌率、餌内容などを定量的に分析した。</p> <p>(3) 映像を用いた個体識別による移動分散調査</p> <p>県内外で観察されたイヌワシを可能な限り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を収集、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、個体の行動圏、移動分散、つがい関係等を明らかにした。</p> <p>(4) 標高や巣の形態を考慮した繁殖成績の解析</p> <p>岩手県北上高地でこれまでに発見された 107 か所の巣のうち、67 か所は岩棚に 40 か所は樹上に造られている。また、巣の標高も最低 179m から最高 844m まで幅広い違いがある。こうした巣の形態や標高の違いによって、抱卵期以降の繁殖成績 (産卵が確認された事例における雛の巣立ち成否) がどの程度予測可能か、一般化線形混合モデルによるロジスティック回帰を用いて検討した。</p>	

### 3 結果

#### (1) つがいの動向および繁殖状況の調査

2023年には県全体で24つがいの生息が確認され、このうち8つがいで抱卵、6つがいで育雛、3つがいでひなの巣立ちが確認された。繁殖成功率は12.5%で、10%に満たなかった過去4年間に比べるとやや回復した。繁殖失敗の直接的原因が確認できた事例はなかったが、写真撮影者が営巣地に張り付いて繁殖活動に影響を及ぼしている事例が2つがいで見られた。新たなつがいや巣の発見はなかった。

#### (2) ビデオを用いた繁殖行動調査

撮影されたビデオ映像を元に、育雛期の食物供給について解析したところ、第1ひなの孵化後4日間、親鳥による餌の持ち込みがなかったことが明らかになった。過去の例では5日間の絶食でひなの死亡が知られており、もう1日供給が遅れたなら、繁殖中止になっていたと予想された。その後は著しい餌不足は生じなかったため、ひなは巣立ちを迎えることができたが、一時的な不足であっても、繁殖成績に大きく影響しうることが推察された。2011年から断続的に記録されている、魚類を餌としての持ち込む行動は、2023年はひなの孵化前に1回のみ確認された。

#### (3) 映像を用いた個体識別による移動分散調査

収集した写真に基づく個体識別の結果、岩泉町の東部で記録された若鳥（およそ3~4歳）が、4か月後に52 km離れた久慈市の東部で目撃されたことが明らかになった。また、秋田県北部で巣立ちした幼鳥が、30 km離れた青森県南部で目撃された後、また秋田県の出生地に戻っていた事例も明らかになった。

#### (4) 標高やや巣の形態を考慮した繁殖成績の解析

2002~2022年に確認された242件の産卵事例のうち、73件で雛が巣立ちに至った。これら巣立ちの成否を応答変数、巣の形態と標高を説明変数、つがい差をランダム効果としてモデル解析を行なった結果、標高のみを用いたモデルが最も予測が良く、巣の形態を含めると予測が悪くなった。標高の低い巣ほど繁殖に有利である一方、岩棚か樹上かの違いは繁殖成績に影響しないと考えられた。詳細は9月の日本鳥学会大会で発表した。

### 4 今後の研究方向等

(1) 各営巣地における繁殖状況や失敗原因の詳細な把握を進めるとともに、未確認つがいや消失つがいが示唆される地域を中心に、引き続き情報収集および探索調査を行なう。

(2) 個体映像を集めて識別事例を増やし、広域的な移動分散の実態やつがい関係の知見を拡充する。

(3) つがいごとに過去の繁殖成績の経年変化のパターンを明らかにし、営巣地の条件や採餌環境の面積などの指標と関係があるか解明を進める。

研究成果報告書 (12)

研究課題名	ツキノワグマの個体数推定精度の向上ならびに 生息密度がツキノワグマの出没に及ぼす影響
担 当	地球科学部 主任専門研究員 鞍懸 重和

1 目的

岩手県では、ツキノワグマ（以下、クマ）の集落や市街地への出没により人身被害、農林業被害が毎年継続し発生している。出没の要因は、ブナ科堅果類の結実量の変化に伴うクマの行動の変化や農作物の採餌を目的とした耕作地への侵入、低木等の被覆物の存在による警戒心の低下などが挙げられるが、生息密度と出没の関係は明らかになっていない。生息密度と出没の関係を明らかにするためには、地域ごとの個体数を推計し、生息密度とクマの出没数の関係を解析する必要がある。本年度の研究では多数の地域での生息密度を明らかにするため、空間明示標識再捕獲最尤法の個体数推定プログラム”Density”（Efford, 2004）を用い、クラスター状のトラップ配置から得た 2012 年および 2019 年の北上山地南部地域のデータから、クラスターごとの個体数推定を試みるとともに、その推定精度により地域間差を検出できるかを明らかにする。

2 方法

2012 年および 2019 年の 5 月下旬に北上山地南部地域において、ヘア・トラップ（以下、トラップ）を 1 つのクラスター単位が 8 基から 24 基となるよう構成し、2012 年には計 169 基、2019 年には計 137 基設置した（図 1）。体毛の回収は概ね 14 日間間隔で 4 セッション実施した。トラップの設置方法、体毛の処理方法、DNA の抽出、PCR 法およびフラグメント解析は Yamauchi et al. (2014) に従った。ただし、Multiplex PCR のプライマーセットは G10C、MU23、MU05、D2、D103 および D118 とした。DNA 分析により個体識別を行った後、個体、利用トラップおよび利用セッションから捕獲履歴を作成し、空間明示標識再捕獲最尤法によりクマの生息密度を推定した。生息密度の推定には、R のパッケージソフトである secr を用い、各試験区の全セッションの捕獲履歴及びトラップから 5 km 内のハビタットマスク（500m メッシュ）をデータとし、モデルをクマの生息密度 (D)、行動圏中心での捕獲率 (g0)、行動圏距離 (sigma) の各パラメーターに説明変数を設けない Null model に、検出確率関数を half-normal に設定し、D および D の変動係数 (CVD) を推定した。また、クラスターごとに個体数を推定するため、各トラップにクラスター ID を設定し（図 1）、secr 内に実装されている derived 関数によりクラスターごとに D および CVD を推定した。また D と CVD の関係を明らかにするため、クラスターごとの D の推定値と CVD の推定値についてスピアマンの順位相関係数を算出した。

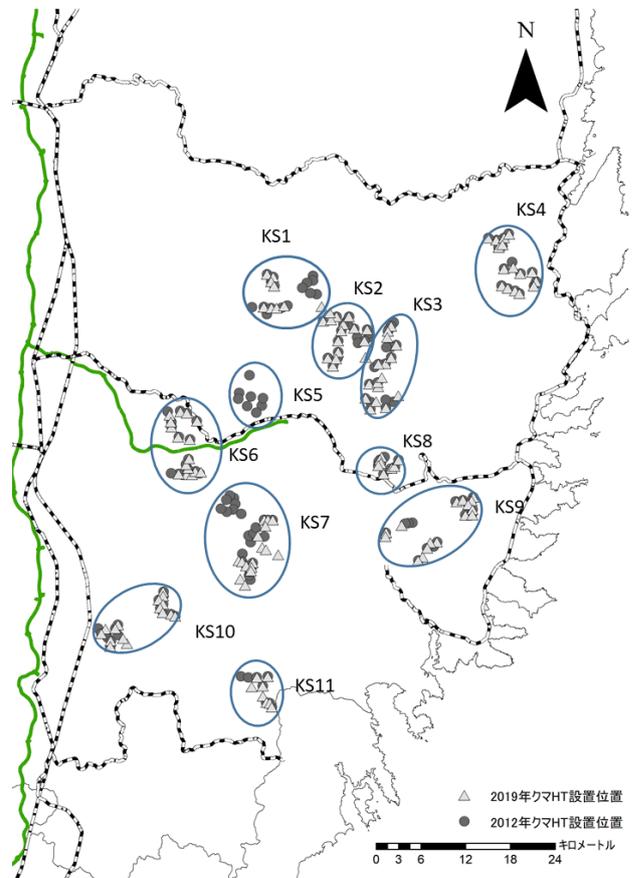


図 1 2012 年および 2019 年の北上山地南部地域におけるトラップ設置位置とクラスター ID

### 3 結果

2012年の北上山地南部全域におけるクマのDの推定値およびCVDは、0.286頭/km<sup>2</sup>および0.089であった。クラスター別のDは全クラスターで推定され、CVDのレンジは0.179-0.504であった（表1）。

2019年の北上山地南部全域におけるクマのDの推定値およびCVDは、0.238頭/km<sup>2</sup>および0.141であった。クラスター別のDはks11を除き推定され、CVDのレンジは0.223-0.458であった（表1）。

2012年のクラスター別のDの推定値とCVDのスピアマンの順位相関係数は-0.75（P=0.010）であり、2019年のクラスター別のDの推定値とCVDのスピアマンの順位相関係数は-0.83（P=0.008）であった。これらのことから、本手法でクマのDが0.25頭/km<sup>2</sup>前後の条件下においてクラスター別に個体数推定をした場合、クラスター別のDとCVDは負の相関をもつことが明らかになった。

### 4 考察

本手法では2019年のクラスターks11を除き、クラスターごとのDを推定することが可能であり、クラスターごとのDの推定精度は概ね0.25前後であった。データが同一で推定するパラメーター数が増加するという解析上の性質から、全域の推定と比較しクラスター別のCVDは低くなるものの、Dの推定値はほぼ全クラスターで得られ95%信頼区間が重複しないクラスターが散見されることから、地域差を検出する精度は保たれているものと考えられた。一方でクラスター別のDとCVDには負の相関がみられたこと、また体毛の採取が少なかった2019年のks11のDが推定困難であったことから、本手法によるクラスター別の個体数推定では、クマの生息密度が低くサンプルの得にくい地域において推定精度が低下する、ないしは推定困難となることが推察された。今後これらの地域の推定精度を向上し、より生息密度の地域間差を検出するためには、セッション数の増加や、クラスターあたりのトラップ基数の増加が有効と思われる。

表1 2012年および2019年の北上山地南部地域と各クラスターの推定生息密度と変動係数

2012年北上山地南部地域					2019年北上山地南部地域				
cluster	density(n/km <sup>2</sup> )	2.5%cl	97.5%cl	CVD	cluster	density(n/km <sup>2</sup> )	2.5%cl	97.5%cl	CVD
2012年ks全域	0.286	0.240	0.341	0.089	2019年ks全域	0.238	0.181	0.314	0.141
ks1	0.241	0.153	0.382	0.237	ks1	0.245	0.121	0.498	0.374
ks2	0.346	0.233	0.512	0.202	ks2	0.431	0.279	0.664	0.223
ks3	0.344	0.237	0.500	0.192	ks3	0.323	0.202	0.517	0.243
ks4	0.246	0.154	0.392	0.242	ks4	0.172	0.091	0.325	0.334
ks5	0.620	0.402	0.955	0.223					
ks6	0.187	0.101	0.346	0.321	ks6	0.117	0.050	0.276	0.458
ks7	0.360	0.254	0.509	0.179	ks7	0.362	0.226	0.581	0.245
ks8	0.482	0.300	0.774	0.245	ks8	0.279	0.138	0.566	0.373
ks9	0.188	0.114	0.309	0.258	ks9	0.195	0.108	0.355	0.312
ks10	0.094	0.043	0.205	0.412	ks10	0.112	0.051	0.248	0.421
ks11	0.103	0.040	0.261	0.504	ks11	0.001	NA	NA	NA

### 5 引用文献

- Efford, M. G. 2004. Density estimation in live-trapping studies. *Oikos* 106: 598-610.
- Yamauchi, K., Kurakake, S., Morosawa, T., Kondo, M., Uno, R., Yuasa, T., Tamate, B. H. and Yoneda, M. 2014. A pilot study of the hair-trapping method in Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*): determination of optimal survey period for estimating population size. *Mammal Study* 39: 191-200.

## 研究成果報告書 (13)

<b>研究課題名</b>	公共用水のメンブランフィルター法による大腸菌数測定方法の改善及び実用化へ向けた検証
<b>担当</b>	検査部 主任専門研究員 齊藤 里美、主任専門研究員 吉田 由佳、 専門研究員 太田 美香子、部長 阿部 なるみ

### 1 目的

令和4年4月1日から公共用水域の水質検査における糞便汚染の指標として新たに導入された大腸菌数測定法（特定酵素基質培地を用いたメンブランフィルター法。以下「告示法」という。）においては、大腸菌は菌が持つβ-グルクロニダーゼ活性により青色のコロニーとして検出される。

一方で、前研究（「公共用水域の水質検査において大腸菌と誤判定されるコロニーに関する研究（平成31・令和1年度から令和2年度まで）」においては、告示法による大腸菌数検査を実施した河川水の約28%で大腸菌でないことが疑われる小型の青色コロニーの発育が認められ、簡易同定キット（ID32 スタッフアピ（ビオメリュー・ジャパン株）、N-IDテスト・SP-18（日水製薬株））を用いた解析の結果、環境中に常在するグラム陽性球菌である *Staphylococcus* 属の6菌種が確認された。

本研究では、これまでの知見を基に、特定酵素基質培地の種類・組成及び培養時間について検討し、これを検証することにより、前研究で明らかになった大腸菌数測定法の問題点の改善方法を検討する。

### 2 方法

令和4年度に希釈水にグラム陽性球菌を添加した菌液を用いたモデル試験を実施し、「ラウリル硫酸ナトリウム（以下「SDS」という。）の最終濃度を0.03%に調整した培地Aで18時間から20時間の間に判定する」という仮定条件を定め、令和5年度はその条件について、実際の検体とその比較を想定して調製した以下の模擬検水を用いて検証した。なお、発育の有無はグラム陽性球菌の青色コロニーが2個以上確認された時点を発育有と判断した。

〔模擬検水1〕複数地点分を混合した河川水（以下「混合河川水」という。）6本に、グラム陽性球菌6菌種をそれぞれ添加したもの

〔模擬検水2〕滅菌混合河川水6本に大腸菌を添加し、グラム陽性球菌6菌種をそれぞれ添加したもの

〔模擬検水3〕滅菌混合河川水6本に、グラム陽性球菌6菌種をそれぞれ添加したもの

〔模擬検水4〕希釈水6本に大腸菌を添加し、グラム陽性球菌6菌種をそれぞれ添加したもの

### 3 結果

模擬検水1～4について、特定酵素基質培地のSDS濃度別に発育状況をまとめたものを図に示す。

この時、培養開始後20時間時点でグラム陽性球菌の青色コロニーの形成が確認されないこと（図中の灰色部）が最も望ましい結果であり、培養開始後18時間時点で同コロニーの形成が確認されること（図中の濃点線部）は、グラム陽性球菌の発育抑制効果が不十分であることを意味する。

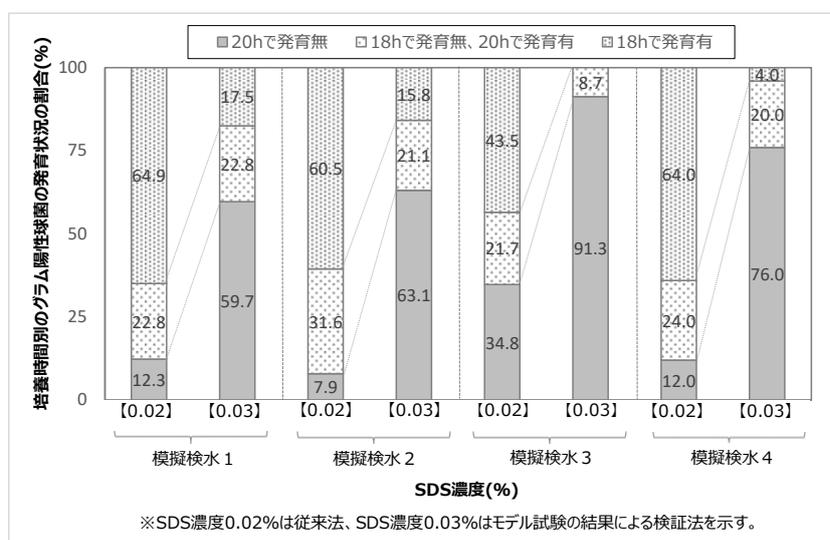


図 模擬検水を用いた検証結果

ア 培地A (SDS 濃度 0.02%) の時間別の発育状況について

図中の【0.02】に各検水の培地A (SDS 濃度 0.02%) の時間別の発育状況を示した。添加したグラム陽性球菌以外の細菌が存在する検水 (模擬検水 1、2 及び 4) では 60.5~64.9%で培養開始後 18 時間においてグラム陽性球菌の青色コロニーの形成が確認され、グラム陽性球菌以外の細菌が存在しない河川由来成分 (河川水中の有機物、無機物等) のみを含む検水 (模擬検水 3) でも、43.5%で培養開始後 18 時間においてグラム陽性球菌の青色コロニーの形成が確認された。

イ SDS 最終濃度 0.03%培地の時間別の発育状況について

図中の【0.03】に各検水の SDS 最終濃度 0.03%培地の時間別の発育状況を示した。SDS 最終濃度 0.03%培地では、培地A (SDS 濃度 0.02%) と比べると全ての模擬検水で改善が見られ、59.7~91.3%で培養開始後 20 時間においてもグラム陽性球菌の青色コロニーの形成が確認されないという結果になった。しかし、SDS 最終濃度 0.03%培地でも、河川由来成分を含み、かつ、添加したグラム陽性球菌以外の細菌が存在する検水 (模擬検水 1 及び 2) では 15.8~17.5%が培養開始後 18 時間でグラム陽性球菌の青色コロニーの形成が確認された。この結果は、グラム陽性球菌の種類によってもばらつきが見られた。また、グラム陽性球菌以外の菌が存在しない模擬検水 3 や河川由来成分を含まない模擬検水 4 では SDS 最終濃度 0.03%培地で比較的高いグラム陽性球菌の発育抑制効果が見られたことから、細菌数や河川由来成分が少ない河川では SDS 添加による効果が期待できる可能性はあるものの、検体として搬入される公共用水の大部分は原液から 10 倍希釈程度の濃度で計数することが多く、当然、模擬検水 1 の条件に当てはまることとなる。河川水の状況やグラム陽性球菌の種類により結果が異なるため、SDS 最終濃度 0.03%培地によるグラム陽性球菌の発育抑制効果は必ずしも十分とは言えず、採水地点や時期毎に細菌数や河川由来成分の状態を予測して、使用する培地を使い分ける等の対応も適切ではないことから、SDS の添加を実用化するためにはまだ検討を要すると考えられた。

なお、検証を進める中で、稀に発育の遅い大腸菌が、いずれの SDS 濃度の培地においても 18 時間以降に青色コロニーを形成することも確認された。

#### 4 まとめ

環境基準に適合しているかどうかを検査、判定する上で重要なのは、その方法を一定の条件とすることである。告示法に定まる検査方法に基づき検討した場合、判定時間については、時間の経過とともにグラム陽性球菌の数は増加する傾向があること、ほとんどの大腸菌は 18 時間でコロニーの形成が確認できることから、稀な発育遅延の大腸菌については考慮せず、培養開始後 18~20 時間で計数することに統一することが望ましいと考えられた。組成については、培地A (SDS 濃度 0.02%) では培養開始後 18~20 時間でも多くの試験でグラム陽性球菌の青色コロニーの発育が確認されたが、SDS 最終濃度 0.03%培地では SDS の添加による改善効果は見られるもののその効果は必ずしも十分でなく、SDS を添加することが過信につながり、かえって SDS を添加してもなお発育が抑制されずに青色コロニーを形成するグラム陽性球菌を誤計数し、大腸菌の過剰計数につながるおそれがあると考えられた。

以上のことから、当センターにおいては、グラム陽性球菌が青色コロニーを形成する可能性があることを改めて共有しつつ、「SDS の添加は行わず、培地Aを用いてグラム陽性球菌が形成する青色コロニーの数が少ない培養開始後 18~20 時間で計数すること」を検査、判定条件にすることとした。なお、グラム陽性球菌が疑われる青色コロニーについては、担当者の経験に基づく判定技術の向上を図るとともに、引き続き必要に応じたグラム染色等による確認を行い、グラム陽性球菌による大腸菌数の過剰報告の防止に努めるとともに、今後もより適切な検査を行うために、検査方法の改善について検討を行っていきたい。

### 3 外部評価



# 令和5年度岩手県環境保健研究センター機関評価協議会 及び研究評価協議会の評価結果

## 1 会議の名称

令和5年度岩手県環境保健研究センター機関評価協議会

令和5年度岩手県環境保健研究センター研究評価協議会

## 2 目的

試験研究機関の機能強化や効率的な業務運営の推進、また、効果的・効率的な試験研究の推進を図るため、「岩手県試験研究評価ガイドライン」及び「岩手県環境保健研究センター機関評価及び研究評価実施要領」に基づき、外部の専門家・有識者等で構成する機関評価及び研究評価協議会による外部評価結果を踏まえ、組織体制の強化や、研究計画の変更・見直し等に活用するものです。

## 3 開催日時

令和5年11月6日（月）13:30～16:00

## 4 開催場所

岩手県環境保健研究センター 大会議室（盛岡市北飯岡一丁目11-16）

## 5 評価対象

### (1) 機関評価項目

評 価 項 目	
1	機関の運営方針・研究推進計画に関すること
2	組織体制に関すること
3	人員の配置及び研究員の育成に関すること
4	予算の配分と研究施設・設備に関すること
5	大学・企業等との連携、外部資金の導入、受託研究への対応に関すること
6	研究開発に関すること
7	研究成果の活用に関すること
8	業務の情報発信に関すること
9	総括的事項

### (2) 研究評価課題

研 究 課 題		評価区分	研究期間
1	医薬品・生活関連物質の環境実態及び環境リスク解明に関する研究	事後評価	R2-R4
2	イヌワシの繁殖力回復のための保全生物学的研究	事前評価	R6-R10

## 6 評価協議会構成員

役 職	氏 名	所 属・職 名
会長	坂 田 清 美	岩手医科大学名誉教授 岩手県予防医学協会 予防医学部長
構成員	石 川 奈 緒	岩手大学理工学部 准教授
	渋 谷 晃 太 郎	岩手県立大学研究・地域連携本部 地域連携コーディネーター
	中 村 克 典	国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所東北支所 産学官民連携推進調整監
	村 上 賢 二	岩手大学農学部 教授
	米 倉 裕 一	地方独立行政法人岩手県工業技術センター 理事兼地域産業技術統括部長

※ 五十音順、敬称略

## 評価方法

評価協議会構成員には事前に説明資料を送付し、評価協議会は機関評価については事務局から説明、また、研究評価については研究課題の担当職員によるプレゼンテーションの後に質疑等を実施する形式で進め、後日構成員から評価調書を御提出いただきました。

機関評価及び研究評価の結果は、説明資料と構成員からの評価調書を取りまとめたもので、構成員の総合評価基準と評価結果に対するセンターの対応方針の基準は下記のとおりとなっています。

記

### 1 機関評価の基準及び対応方針

構成員には機関評価項目について、A：適当、B：要改善、C：不適當の3段階の評価基準により評価していただき、あわせて自由記載で評価コメントをいただいております。

評価結果に対する対応方針は、それぞれの評価項目に対して記述方式で示しています。

### 2 研究評価の基準及び対応方針

構成員には研究課題について、次のA～E評価基準により総合評価していただき、あわせて自由記載で記述評価をいただいております。

	A	B	C	D	E
【事前評価】 (新規課題に対して実施)	重要な課題であり、優先的に取り組む必要がある。	有用な課題であり、早期に取り組む必要がある。	解決すべき問題等があり、今後の検討を必要とする。	-	-
【中間評価】 (継続課題に対して実施)	順調に進行しており問題なし。	ほぼ順調であるが一部改善の余地がある。	研究手法等研究計画を大幅に見直す必要がある。	研究を中止すべきである。	-
【事後評価】 (終了課題に対して実施)	研究の成果は目標を十分達成した。	研究の成果はほぼ目標を達成した。	研究の成果は目標をかなり下回った。	研究の成果は目標を大幅に下回った。	研究成果がなかった

※ 令和5年度は、中間評価の対象となる研究課題はありませんでした。

研究課題に対する構成員からの総合評価及び記述評価等のセンターの対応方針は、次のとおりです。

	I	II	III	IV	V
【事前評価】	研究計画のとおり実施	一部見直しの上実施	今後検討	実施しない	-
【中間評価】	研究計画のとおり実施	一部見直しの上実施	研究を一時中断する	研究を中止・廃止する	-
【事後評価】	研究の成果は目標を十分達成した。	研究の成果はほぼ目標を達成した。	研究の成果は目標をかなり下回った。	研究の成果は目標を大幅に下回った。	研究成果がなかった

※ 令和5年度は、中間評価の対象となる研究課題はありませんでした。

## 【機関評価】

評価項目	評価	評価視点	主な意見等	対応方針案
機関の運営方針・研究推進計画に関する こと	A : 6	(1) 県の政策・施策推進と業務運営方針の整合性・妥当性	<ul style="list-style-type: none"> <li>・いわて県民計画に基づき、的確に対処していると評価できる。過去3年間は特にコロナ対策において重要な役割を果たした。</li> <li>・県の政策・施策に沿い、かつ臨機応変な業務運営がなされている。</li> <li>・最優先として新型コロナウイルス感染症への対応を高く評価している。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・今後も県庁関係各室課等と連携を図りながら、県の政策・施策に寄与するよう進めます。</li> <li>・引き続き、「県民本位」の視点に基づき、県民や関係機関等のニーズを的確に反映した研究課題を設定します。</li> </ul>
		(2) 県の政策・施策と研究推進計画の整合性・妥当性	<ul style="list-style-type: none"> <li>・健康・余暇、安全、自然環境の幅広い分野にわたり質の高い研究とそれを応用した実践ができており、評価できる。</li> <li>・県の政策・施策の内、センターの役割に寄与する研究が適切に推進されている。</li> <li>・コロナ対応の中、研究にも対応されている。</li> </ul>	
	(3) 研究への県民、企業等のニーズ反映の状況	<ul style="list-style-type: none"> <li>・行政、県民に幅広く公表し、県民のニーズの把握に務め、対応の努力をしていると認める。</li> <li>・ニーズを捉えた研究テーマの設定がなされている。</li> <li>・新型コロナ対策という突発的事態にも機関として適確に対処した。</li> <li>・研究の要望に対し丁寧に対応している。</li> </ul>		
2 組織体制に関する こと	A : 6	(1) 業務全般に対するマネジメントの実施状況	<ul style="list-style-type: none"> <li>・外部組織、県庁内組織、庁内組織を活用し、効率的な業務運営、研究の質の向上に積極的に取り組んでいると認める。</li> <li>・適切に実施されている。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・今後とも外部評価組織等を有効に活用し、業務全般に関するマネジメントを適切に実施します。</li> </ul>
3 人員の配置及び研究員の育成に関する こと	A : 2 B : 4	(1) 人材配置の状況	<ul style="list-style-type: none"> <li>・広範囲な業務に対応して適正に人材を配置していると認める。</li> <li>・業務量に応じた人材の配置がなされ、補充も適切に行われている。</li> <li>・定年に近い研究者が多く、若手が少ない。計画的に専門知識を有する人材の採用を行う必要がある。</li> <li>・職員の年齢構成がいびつであるので改善を期待する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・試験検査、監視測定、危機対応の充実強化及び研究の継続性を考慮した適正な人員配置に努めます。</li> <li>・今後も、再任用職員から若手職員への技術等</li> </ul>

		(2) 研究者の育成方策	<ul style="list-style-type: none"> <li>・長く取り組んでいる岩手県独自の野生動物の保護・生息状況に関する研究や最先端の分析機機器を用いた研究は研究者の育成に時間を要する。引き継ぎも踏まえ、十分な時間と人数で研究者の育成に取り組んでいただきたい。</li> <li>・研究者の育成については、近年の研究の高度専門化への対応が求められており、専門機関との連携をさらに強化し人材育成を図る必要がある。</li> <li>・コロナ禍の中であったが、可能な範囲での研修機会の確保がなされた。</li> <li>・Webを使用した外部研修を積極的に受講している。</li> </ul>	<p>の継承を確実に進めるほか、外部研究会や学会に積極的に参加し知見を広めるなど、職員の育成を進めます。</p>
4 予算の配分と研究施設・整備に関すること	A : 6	(1) 業務内容に関する経常的経費（施設管理費等）と政策的経費（研究費等）の関係	<ul style="list-style-type: none"> <li>・試験研究費、管理運営費、情報システム費の予算配分は適切と認める。</li> <li>・新型コロナ対応で要求された業務量に対し、県庁との調整等も行いながら適確な対応がなされた。</li> <li>・安定的な予算確保がされている。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・研究費等については、県民ニーズを反映した課題設定が行えるよう、今後とも継続して必要な予算の確保に努めます。</li> </ul>
		(2) 研究に必要な施設・設備の確保	<ul style="list-style-type: none"> <li>・PCR等の機器を迅速に導入し、コロナ感染症への早急な対応が行われたことは高く評価できる。新型コロナウイルス感染症の流行等に対応し適切な施設・機器の更新を実施していると認める。</li> <li>・きびしい財政事情の中、高度な検査、研究を推進するための施設・設備が確保されている。</li> <li>・計画的に整備されている。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・施設・設備については、今年度更新計画を作成したところであり、必要な予算の確保に努め、計画的な更新に努めます。</li> </ul>
5 大学・企業等との連携、外部資金の導入、受託研究への対応に関すること	A : 5 B : 1	(1) 大学、企業等との効果的な連携の実施	<ul style="list-style-type: none"> <li>・それぞれの専門分野に応じて、適切に大学、企業等との連携がなされていると認める。</li> <li>・国内外を通じた広い連携の実施を評価する。</li> <li>・大学他多くの研究機関連携を実施している。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・引き続き、大学等との連携を進め共同研究に取り組むとともに、研究実績を積み上げ、さらなる外部資金の</li> </ul>

		(2) 積極的な競争的資金への応募	<ul style="list-style-type: none"> <li>外部資金は限られているが、継続的に獲得できていると認める。</li> <li>毎年度厚労科研費を取っており評価出来る。</li> <li>実施されている研究や人員のレベルの高さからすれば、さらなる外部資金獲得が可能と考えられる。</li> </ul>	獲得に努めます。
		(3) 受託研究への十分な対応	<ul style="list-style-type: none"> <li>受託研究により質の高い研究が推進できていると認める。</li> <li>センターのミッションの枠内で適切な対応がなされている。</li> </ul>	
6 研究開発に関すること	A : 6	(1) 研究課題のマネジメント (研究課題設定方法、進行管理、研究評価)の実施状況	<ul style="list-style-type: none"> <li>外部の有識者の評価を受け、適切に推進されていると認める。</li> <li>行政、県民のニーズを反映した課題設定、綿密な進行管理と研究評価により適切に研究課題の管理がなされている。</li> <li>課題の吸上げ、決定、進捗管理、評価等確実に行われている。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>今後も、県民ニーズを的確に反映した研究課題の設定を行うとともに、適切な進行管理・評価を行っていきます。</li> </ul>
7 研究成果の活用に関すること	A : 6	(1) 研究成果の実用化、事業化の状況	<ul style="list-style-type: none"> <li>環境省や厚生労働省が整備する公定法の開発への貢献が評価できる。</li> <li>残留農薬の試験法、環境水中の未規制物質の分析等実用化、事業化で成果を上げている。</li> <li>化学物質分析手法や希少生物保全技術など開発された成果が着実に社会実装されている</li> <li>研究成果を行政施策に反映できていると思われる。</li> <li>試験法の改良、開発に貢献している。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>今後も、各種試験法や分析法の整備に貢献するほか、成果について関係機関と情報共有を図るなど、研究成果の普及・発信に取り組んでいきます。</li> </ul>
		(2) 研究成果の普及状況	<ul style="list-style-type: none"> <li>研究成果を積極的に発信し、普及を図っていると認める。</li> <li>多数の研究成果が県行政の現場等に反映されている。</li> <li>違反などの対する科学的根拠を見出す分析法に迅速に対応している。</li> </ul>	
		(3) 研究成果の知的財産権化、活用の的確性	<ul style="list-style-type: none"> <li>2件の特許を取得し成果を上げている。</li> <li>知財化が必要な案件について適切な対応がとられている。</li> </ul>	

8 業務の情報発信に関する こと	A : 5 B : 1	(1) 情報発信状況 (対象、内容、方法)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 広報誌、ホームページ、イベントなどで情報発信を積極的に行っていると認める。</li> <li>・ 広報誌、HP を通じ効果的な情報発信が行われている。コロナ禍で公開行事が実施できなかったことはやむを得ない。</li> <li>・ HP 等で積極的に情報発信をしている。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 広報誌、ホームページやイベント参加により、引き続き、関係機関や県民等に向けた効果的な情報発信に取り組んでいきます。</li> </ul>
9 総括的事項	A : 6	(1) 機関設立の意義・目的と業務内容の整合性	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 全体として質の高い、研究、業務推進、情報発信ができており、評価できる。</li> <li>・ 環境保健行政推進のための科学的・技術的中核機関としての検査業務、調査研究、研修指導を着実に実施し、成果を効果的に発信し、県民生活に貢献している。</li> <li>・ 設立の意義目的と整合性のとれた業務内容となっている。特にコロナ対応は特筆すべきものである。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 引き続き、環境・保健行政を推進するための科学的・技術拠点として必要な試験検査、監視測定、調査研究及び情報発信等を行うとともに、現場・県民ニーズを的確に反映した研究課題の設定や行政検査の充実強化に必要な人材の育成・確保と体制整備に努めていきます。</li> </ul>

## 【事後評価】

研究課題	1	医薬品・生活関連物質の環境実態及び環境リスク解明に関する研究 (R2-4)
研究目的・背景	高分解能 LC-MS/MS を用いて、医薬品・生活関連物質 (PPCPs) の環境実態を把握するとともに、国環研、地環研、国内外の大学等と共同で分析法の開発や環境リスクの解明を目指すもの。	
研究内容	<p>&lt;研究①&gt; 日韓共同研究：PPCPs の環境実態の把握、日本と韓国における現状の比較等を行う。(国立環境研究所、兵庫県環境研究センター、釜山大学との共同研究)</p> <p>&lt;研究②&gt; 国環研、地方環境研究所とのⅡ型共同研究：一部の PPCPs (→環境中濃度が PNEC を超過した事例のある物質) を対象とした環境実態調査、及び高分解能 LC-MS/MS による網羅分析法の開発を行う。</p> <p>&lt;研究③&gt; 岩手大学との共同研究：動物用医薬品の分解物等の環境影響を把握するために、高分解能 LC-MS/MS を用いて分解生成物の分析、構造の推定等を行う。</p>	
評価結果	<p>○総合評価 A (6人)・B (0人)・C (0人)・D (0人)・E (0人)</p> <p>○総合意見</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・全国的にも先進的な分析・解析方法により様々な化学物質の環境中の存在を明らかにする有益な研究であり、十分な成果が得られている。</li> <li>・研究は目標を達成できていると評価している。今後もこの研究成果は応用可能であると同時に、研究を発展させる必要性もあると考えられる。さらなる研究の発展を期待したい。</li> <li>・抗菌剤の環境残留性が確認できたことは高く評価。対策として吸着剤の検討がさらに必要。</li> <li>・環境中での動態が不明な PPCPs の検出、残留実態解明に取り組み、また検出された物質の除去方法の検討にも踏み込んで、期間内に十分な成果を上げた。多種にわたる PPCPs の実態解明に関する研究は緒に就いたところであり、さらなる研究の展開を期待する。</li> <li>・大きな成果が得られている課題と思われる。一方、この成果を県の水質管理にどのように活用できるかについては、新たな課題で検討すべきものと思われる。今後の発展を期待する。</li> <li>・本県河川の PPCPs の実態把握とその一種マクロライド系物質の除去法を開発したことを高く評価します。今後、他物質の同定及び除去技術の開発に期待します。</li> </ul>	

<p>センターの対応方針</p>	<p><b>【総合判定結果】</b></p> <p><b>I 研究成果は目標を十分達成した</b></p> <p>本研究により、未規制化学物質の環境残留実態を把握し、環境負荷低減のための除去方法を確認できたことは、新規環境汚染物質対策の策定、さらには水質事故対応体制（環境影響、原因究明）の充実につながる成果であり、所期の目的を十分達成できたと考えます。</p> <p>引き続き、関係機関と連携し、分析手法の拡充・普及と新たな解析手法の開発に向けた研究を進め、成果については学会等で広く発信していきます。</p>
------------------	--

【事前評価】

研究課題	2	イヌワシの繁殖力回復のための保全生物学的研究（R6-R10）
研究目的・背景	<p>個体数の減少が問題化している県内のイヌワシについて、個体増殖につながる新たな保全施策に活用できる知見を得ることを目的として、各つがいの繁殖事例や遺伝子に関するデータを集めて探索的に分析し、繁殖成績に影響する要因や特性を明らかにする。</p>	
研究内容	<p>繁殖状況モニタリング（巣内ビデオの解析を含む）や映像を用いた個体識別調査を行ない、最新の繁殖状況の把握と事例の収集を進めるとともに、前課題より取り組んできた繁殖成績の解析を産卵期前も含めて拡張し、行動圏内の環境の時間的変化、巣の構造、DNA から予想しうる近縁度などの情報も加えて、繁殖に影響する要因の探索的検討を行なう。</p>	
評価結果	<p>○総合評価 A（5人）・B（1人）・C（0人）</p> <p>○総合意見</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・岩手県として取り組むべき研究課題であり、有益な研究成果を期待します。</li> <li>・重要性、緊急性の高い研究であり、優先的に取り組むべき課題と認める。さらなる研究ネットワークの拡大等に取り組む必要がある。</li> <li>・重要な研究であり、継続して実施していただきたい。</li> <li>・全国的にも注目されるイヌワシの保全に関する研究について、継続性を確保しつつ新規な視点を提供している。研究の着実な進展と保全に向けた具体的な方策の提示が期待される。</li> <li>・特に本県が長年取り組んできたイヌワシの研究であり、是非絶滅危惧種が保全出来るよう進めて頂きたい。</li> <li>・重要な課題であるが、長期にわたる研究を実施しているにもかかわらず、今期の研究目標もイヌワシ減少の要因解析に終始しているように思われることから、より実際的な研究に期待する。</li> </ul>	
センターの対応方針	<p>【総合判定結果】</p> <p><b>1 研究計画のとおり実施</b></p> <p>本研究は、本県のみならず国内においても絶滅の危機にあるイヌワシの保護・繁殖を目的とした研究です。これまでの研究で得られた知見を総合して、イヌワシの繁殖成績向上に向けた具体的な方策が得られるよう研究を進めるとともに、関係機関とも協力のうえ精力的に保全対策に取り組んでいきます。</p>	



# 4 資 料



---

---

## 資 料

---

---

### 感染症発生動向調査事業における病原体検出状況（令和 5 年度）

保健科学部 梶田弘子 岩渕香織 高橋知子 山中拓哉 平野 陽 佐藤直人

令和 5 年度は、県内の病原体定点等から提出された 140 件について検査を実施したところ、99 の病原体（ウイルス 97 株、細菌 2 株）を検出した。

#### I はじめに

平成 14 年 2 月に岩手県結核・感染症発生動向調査事業の実施要綱が改められ、病原体定点が選定された。令和 4 年 1 月現在、28 医療機関（基幹定点 19、小児科定点 4、内科定点 3 眼科定点 2）が選定されている。本報では、令和 5 年度の病原体検出結果を報告する。

#### II 検査対象

定点把握対象の五類感染症に加え、対象外の不明熱、上気道炎および急性肺炎等も検査対象とした。検体は 13 医療機関（基幹定点 5、小児科定点 3、内科定点 3、眼科定点 1、定点外医療機関 1）において採取した。表 1 に診断名別月別検査依頼件数を示した。

#### III 検査方法

##### ウイルス検査

##### (1) ウイルス分離

MDCK 細胞を用いてインフルエンザウイルスの分離を行った。分離したウイルスの同定には、リアルタイム PCR 法、(RT-) PCR 法及びダイレクトシーケンス法を用いた。

##### (2) (RT-) PCR 法及びリアルタイム PCR 法

糞便検体については、(RT-) PCR 法によりノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、ア

ストロウイルス、エンテロウイルス、アデノウイルス等の胃腸炎ウイルスの検出を行った。同定にはリアルタイム PCR 法及びダイレクトシーケンス法を用いた。(鼻) 咽頭ぬぐい液、喀痰、血液及び皮膚病巣ぬぐい液等の検体については、(RT-) PCR 法により呼吸器ウイルス（ヒトオルソニューモウイルス（以下、RS ウイルス）、ヒトレスピロウイルス（以下、パラインフルエンザウイルス）、ヒトメタニューモウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、ヒトパレコウイルス等）及び発疹ウイルス（ヘルペスウイルス 1~7 型、アデノウイルス、麻疹ウイルス、風しんウイルス、パルボウイルス、エンテロウイルス等）の検出を行った。同定にはダイレクトシーケンス法を用いた。

##### (3) その他

必要に応じて市販キット（蛍光抗体法、イムノクロマトグラフィー等）を用い、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス等の検出を行った。

#### IV 検査結果

140 件について検査し、99 株の病原体を検出した。月別病原体検出状況を表 2 に、診断名別病原体検出状況を表 3 に示す。以下、主な診断名別の病原体検出状況について概要を述べる。

##### 1. インフルエンザ

2023/24 シーズンは、3月までに45件の咽頭ぬぐい液を検査したところ、インフルエンザウイルス AH1 (2009) pdm が9株、インフルエンザウイルス AH3 が20株、インフルエンザウイルス B型 (ビクトリア系統) が8株、新型コロナウイルスが1株検出された。

## 2. A群溶血性レンサ球菌咽頭炎

8検体の咽頭ぬぐい液を検査したところ、A群溶血性レンサ球菌が1株検出された。

## 3. 感染性胃腸炎／胃腸疾患

19検体の糞便を検査したところ、ノロウイルス GII が12株 (遺伝子型 GII.3 が9株、GII.4 が3株)、サポウイルス (遺伝子型 G1.1) が2株、アストロウイルス 1型が2株検出された。

## 4. 手足口病

3検体の咽頭ぬぐい液を検査したところ、コクサッキーウイルス A6 が2株、ライノウイルス A型が1株、ヒトパレコウイルス A1 が1株検出された。

## 5. 突発性発疹

4検体の咽頭ぬぐい液を検査したところ、ヘルペスウイルス 6型が2株、RSウイルスが1株検出された。

## 6. ヘルパンギーナ

4検体の咽頭ぬぐい液を検査したところ、ライノウイルス A型が1株、RSウイルスが1株、A群溶血性レンサ球菌が1株検出された。

## 7. 流行性角結膜炎

2検体の結膜ぬぐい液を検査したところ、アデノウイルス 3型が1株検出された。

## 8. 新型コロナウイルス感染症

9件の咽頭ぬぐい液を検査したところ、新型コロナウイルスが7株検出された。

## 9. 不明熱

6検体の血液、2検体の糞便、2検体の咽頭ぬぐい液を検査したところ、ヒトパレコウイルス A3 が9株検出された。

## V 終わりに

2023年5月に新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) が5類感染症 (定点把握対象疾患) に変更となり、国内の新型コロナウイルス感染症対策が緩和されたことで、飛沫感染による呼吸器ウイルス感染症のインフルエンザでは、感染者数は COVID-19 流行前の水準に戻った。2023/24 シーズンは例年より早く患者報告数が増加し、流行の期間が例年より長く続いた。他の感染症についても、COVID-19 感染対策により大きな流行がなかった感染症に対する免疫を持っていない小児を中心に、ヘルパンギーナ、咽頭結膜熱の患者報告数が増加したほか、RSウイルス感染症が夏季に流行する変化がみられている。

今後も、病原体の検査においては、病原体の種類や型の変化など感染症予防対策上重要な情報を得るとともに、不測の病原体にも備えた、病原体情報の収集 (病原体サーベイランス) を確実に運用していくことが重要である。

分離・検出した病原体情報は、岩手県感染症情報センターホームページで公開されるほか、国立感染症研究所の病原体検出情報 (IASR) データベースに登録されている。

岩手県感染症情報センター

<http://www2.pref.iwate.jp/~hp1353/kansen/main.html>

国立感染症研究所 病原微生物検出情報 (IASR)

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr.html>

文責 平野 陽

表1 診断名別検査依頼件数(令和5年4月～令和6年3月)

診断名		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
五類感染症指定疾患	インフルエンザ	2	2			3	1	2	10	7	8	4	6	45
	A群溶血性レンサ球菌咽頭炎			1			7							8
	感染性胃腸炎	1		1					1	3		12	1	19
	手足口病						1		2					3
	突発性発疹		1			1	2							4
	ヘルパンギーナ			1	3									4
	流行性角結膜炎								2					2
	新型コロナウイルス感染症										1	7	1	9
	無菌性髄膜炎					7			11					18
五類感染症指定疾患以外	不明熱			5	5									10
	多発皮下膿瘍			1										1
	気管支喘息				1									1
	急性肺炎		1											1
	急性気管支肺炎						6							6
	急性気管支炎			1							1			2
	上気道炎	1		1			5							7
総計	4	4	11	9	11	22	2	26	10	10	23	8	140	

表2 月別病原体検出状況(令和5年4月～令和6年3月)

検出病原体	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
Adenovirus 3								1	1				2
Herpes simplex virus 1									1				1
Human herpes virus 6		1			1								2
Human herpes virus 7	1												1
Respiratory syncytial virus (RSV)				1	1								2
SARS-CoV-2			1						1	2	5	1	10
Coxsackievirus A6								2					2
Norovirus genogroup II	1							1	1		6	3	12
Astrovirus 1			1						1				2
Sapovirus										2			2
Influenza virus AH1(2009)pdm								1	2	5		1	9
Influenza virus AH3	2	2					2	5	6	3			20
Influenza virus B(Victoria linesge)										1	3	5	9
Rhinovirus								2					2
Rhinovirus A		1		2				1					4
Rhinovirus C								1					1
Human Parechovirus A1								1					1
Human Parechovirus A3			4	5	3	1							13
Parainfluenza virus 3	1		1										2
Streptococcus pyogenes			2										2
検出せず			2	1	7	21		8	2		6		47
総計	5	4	11	9	12	22	2	23	15	13	20	10	146

表3 診断名別病原体検出状況(令和5年4月～令和6年3月)

(1) 五類指定疾患

診断名	( 検体数 )	検出病原体	検出数
インフルエンザ	( 45 )	Influenza virus AH1(2009) pdm	9
		Influenza virus AH3	20
		Influenza virus B(Victoria lineage)	8
		SARS-Cov-2	1
A群溶血性レンサ球菌咽頭炎	( 8 )	<b>Streptococcus pyogens</b>	1
感染性胃腸炎/胃腸疾患	( 19 )	Sapovirus	2
		Norovirus genogroup II	12
		Astrovirus 1	2
		Adenovirus 3	1
手足口病	( 3 )	Coxsackievirus A6	2
		Rhinovirus A	1
		Human Parechovirus A1	1
突発性発疹	( 4 )	Human herpes virus 6	2
		Human Parechovirus A3	1
		Respiratory syncytial virus(RSV)	1
ヘルパンギーナ	( 4 )	Respiratory syncytial virus (RSV)	1
		Rhinovirus A	1
		Streptococcus pyogens	1
流行性角結膜炎	( 2 )	Adenovirus 3	1
		Herpes simplex virus 1	1
新型コロナウイルス感染症	( 9 )	SARS-Cov-2	7
		Influenza virus B(Victoria lineage)	1
無菌性髄膜炎	( 18 )	Human Parechovirus A3	3
		Rhinovirus	2
		Rhinovirus C	1
検査検体数小計 ①	( 112 )	病原体陽性数小計 ③	83

(2) 五類指定疾患以外

診断名	( 検体数 )	検出病原体	検出数
不明熱	( 10 )	Human Parechovirus A3	9
多発性皮下膿瘍	( 1 )		0
気管支喘息	( 1 )	Rhinovirus A	1
急性肺炎	( 1 )	Rhinovirus A	1
急性気管支肺炎	( 6 )		0
急性気管支炎	( 2 )	SARS-Cov-2	2
上気道炎	( 7 )	Human herpes virus 7	1
		Parainfluenza virus 3	2
検査検体数小計 ②	( 28 )	病原体陽性数小計 ④(重複感染例あり)	16
検査検体数総計 ①+②	( 140 )	病原体陽性数総計 ③+④	99

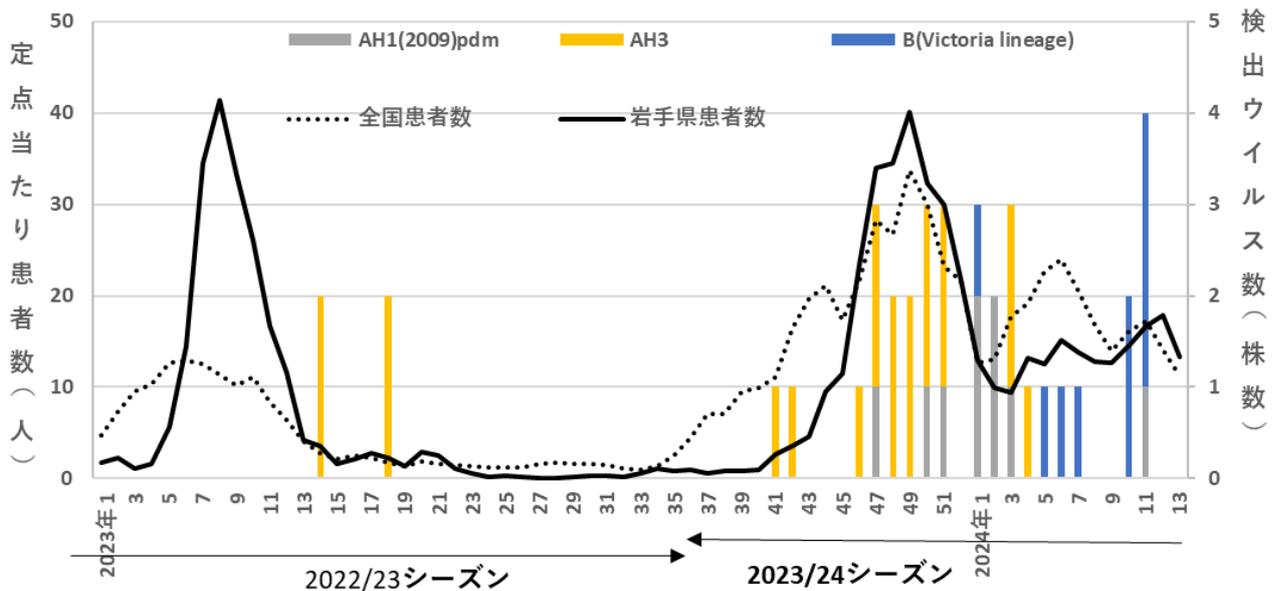


図 インフルエンザの定点当たり患者数の推移及び週別のインフルエンザウイルス検出数

## 資 料

### 腸管出血性大腸菌の検出状況（令和5年）

保健科学部 山中拓哉 岩渕香織 平野陽 梶田弘子 高橋知子 佐藤直人

#### I はじめに

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli* : 以降 EHEC）感染症は、感染症法（感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律）に基づき、発生時は三類感染症として保健所に届け出ることになっている。EHECは食中毒の原因物質でもあり、医師からの届出があれば調査を行うこととなる。なお、検査機関で分離された EHEC の菌株は、当所に収集され、血清型および VT 型を確認している。平成 30 年 6 月 29 日付け事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」により、分子疫学解析法の MLVA 法（Multilocus variable-number tandem-repeat analysis）への統一化が図られ、現在は、0157、026、0111 については MLVA 法による解析を実施している。収集された菌株は、平成 8 年 6 月 19 日付け衛食第 160 号「病原性大腸菌 O-157 の検体提供依頼について」及び平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514001 号「飲食店における腸管出血性大腸菌食中毒対策について」に基づき、必要に応じて国立感染症研究所（以降感染研）細菌第一部に送付している。感染研は、全国の地方衛生研究所から送付された菌株について遺伝子解析（0157、026、0111、0103、0121、0145、0165、091 については MLVA、その他の血清型の EHEC については PFGE

（pulsed-field gel electrophoresis））を実施し、全国における同一菌株による広域散発事例の把握に努めている。

#### II 感染症発生動向調査

岩手県における過去 5 年間の EHEC 感染症の届出数については、1 件の集団感染事例（0157VT1VT2 : 8 名）があった令和 3 年（2021 年）が 78 件と最も多かった。この間の年間届出数は 100 件以下で推移している。令和 5 年（2023 年）の EHEC 感染症の届出数は 52 例（表 1）で、過去 5 年間で比較して最も少なかった。しかしながら、令和 5 年の岩手県における人口 10 万対届出数は 4.0 を超えており全国でも上位に入っている。本症の届出数は例年 6 月から 10 月にかけて多いが、令和 5 年は 7 月がピークであった。（図 1）。また、52 例中、有症状者は 30 例（57.7%）で、無症状病原体保有者は 22 例（42.3%）であった。年齢層別では 40～49 歳が 10 例（19.2%）、0～9 歳および 70 歳以上が 9 例（17.3%）、60～69 歳が 7 例（13.5%）の順に多かった。例年、9 歳以下が 30%以上を占めるが、令和 5 年は、9 歳以下は 17.3%と少なく、20 歳以上が約 73%と多数を占めた。なお、溶血性尿毒症症候群（HUS）を合併した症例の報告が 1 例あり、患者からは 0157VT1VT2 が検出されている。

#### III 集団感染事例

令和 5 年は、菌陽性者が 10 名以上からなる

集団感染事例はなかった。また、施設における集団感染事例もなかった。家族内感染事例については10事例発生した。原因となった菌株の血清型および毒素型はO157VT1VT2が5例、O26VT1が2例、O111VT1が1例、O103VT1が2例であった。

#### IV 菌株の解析結果

届出のあった52例中44株が当所に収集され、これら菌株の血清型及びVT型の解析を実施した。結果を表2に示した。O157VT1VT2が18株(40.9%)と最も多く、次いでO103VT1が9株(20.5%)、O26VT1が5株(11.4%)、O111VT1が3株(6.8%)、O91VT1が2株(4.5%)、O157VT1、O157VT2、O26VT2、O128VT2、O128VT1VT2、O8VT2、OUTVT2がそれぞれ1株(2.3%)であった。これら菌株のうち、O157、O26、O111については、県内での広域散発事例探知のため、泉谷らが開発したMLVA法(Izumiya H. et al. (2010): Microbiol Immunol, 54: 569-577)による分子疫学解析を

実施した。

MLVA解析の結果、県内で広域食中毒が疑われた事例を表3に示した。このうちMLVA型22m0027のO157菌株は国内広域において検出され、馬刺し喫食との関連性が指摘されている菌株の型と同一であった。その他の血清型については、広域散発事例を疑われる事例はなかった。

#### V まとめ

令和5年は、10人以上のEHEC感染症の集団感染事例の発生はなく、届出数は52例と例年と比較して少なかったが、岩手県の人口10万対届出数は全国でも上位であった。血清型についてはO157の割合が高く、年齢層も20歳以上が73%を占めるなど例年と異なっていた。EHEC感染症はHUS合併症例などの重篤な症状を引き起こすこともあり、食中毒や感染症の個々の手洗い消毒などの感染対策のほか、関係機関による予防啓発と注意喚起が重要である。

表1 令和5年 EHEC感染症(52例)の保健所別・血清型別・VT型別届出数

保健所	届出数	O157				O26		O103		O111	O128		O91	O8	OUT		
		VT1	VT2	VT1,2	型不明	VT1	VT2	VT1	型不明	VT1	VT2	VT1,2	VT1	VT2	VT1	VT2	VT1,2
盛岡市	6			2		1			1								1
県央	9		1	2		3			2		1						
中部	12	2	3	2				2					1	1			1
奥州	9	1	1	2				2	1			2					
一関	1			1													
大船渡	2															1	1
釜石	2			2													
宮古	0																
久慈	4							2			2						
二戸	7			3		3											1
計	52	3	5	12	2	6	1	6	2	3	1	2	2	1	3	1	2
		5.8%	9.6%	23.1%	3.8%	11.5%	1.9%	11.5%	3.8%	5.8%	1.9%	3.8%	3.8%	1.9%	5.8%	1.9%	3.8%

表2 収集EHEC株(43株)の血清型及びVT型内訳

菌株数	O157			O26		O103	O111	O128		O91	O8	OUT
	VT1	VT2	VT1,2	VT1	VT2	VT1	VT1	VT2	VT1,2	VT1	VT2	VT2
44	1	1	18	5	1	9	3	1	1	2	1	1
	2.3%	2.3%	40.9%	11.4%	2.3%	20.5%	6.8%	2.3%	2.3%	4.5%	2.3%	2.3%

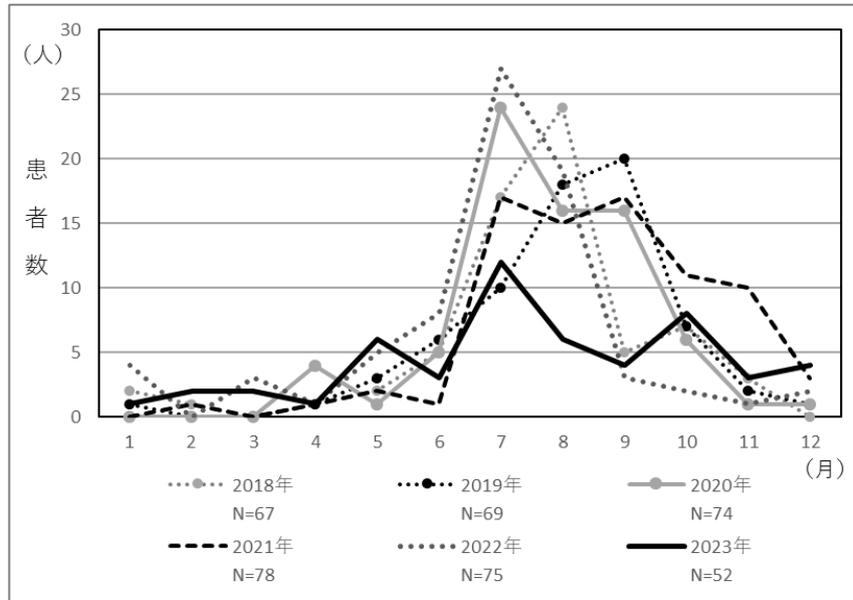


図1 EHEC 感染症 月別患者数 岩手県 2018年～2022年

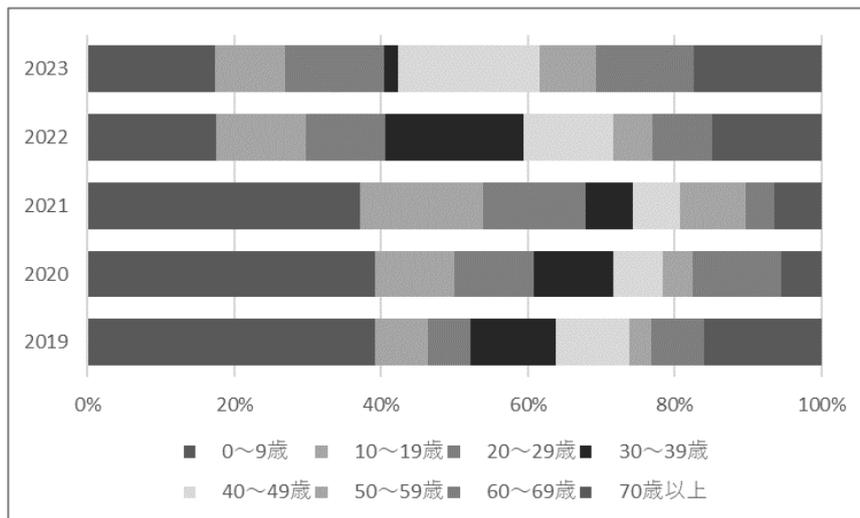


図2 EHEC 感染症 年齢層別 岩手県 2019年～2023年

表3 広域発生が疑われる MLVA 型について

O157VT1VT2 23c085

菌株番号	診断日	疫学情報	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37	MLVA型	
23031	10月13日	中部 散発	2	-2	1	4	-2	9	4	2	-2	13	12	7	6	6	6	6	6	7	24m0007
23034	10月17日	中部 家族内感染	2	-2	1	4	-2	9	4	2	-2	13	12	7	6	6	6	6	6	7	24m0007
23035	10月20日		2	-2	1	4	-2	10	4	2	-2	13	12	7	6	6	6	6	6	7	23m0689

O157VT2 (23027)、O157VT1VT2 (23043, 23044)

菌株番号	診断日	疫学情報	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37	MLVA型
23027	8月23日	県外在住 散発	2	-2	1	4	-2	6	4	10	-2	9	11	14	5	7	6	10	8	22m0027 23c017
23043	12月3日	奥州 家族内感染	2	-2	1	4	-2	6	4	10	-2	9	11	11	5	7	6	10	8	22m0443
23044	11月30日		2	-2	1	4	-2	6	4	10	-2	9	11	11	5	7	6	10	8	22m0443



## 5 學術誌等掲載論文



山階鳥類学雑誌, 55: 1-12, 2023

繁殖期に魚類を利用するイヌワシ

前田 琢

A Pair of Golden Eagles Suppling Fish as Food for Nestlings

Taku Maeda

Abstract

Video monitoring on breeding nests of a pair of Golden Eagles *Aquila chrysaetos japonica* in the Kitakami Mountains, Iwate, Northern Honshu, Japan, revealed that fish were supplied as food for nestlings. Fishes, totalling 57 individuals, were presented to chicks in four of the seven years analyzed, and comprised 19% of the 306 total prey animals detected. All fish were brought by the male, and most of them were removed from the nest by the female soon after, except for 10 fishes consumed by the female and nestlings. Fish supply during the nestling period was either continuous or temporary, depending on the year. Fish species could not be identified, but the variations in size, coloration, pattern and shape of fishes indicated various species were used. The method of obtaining fish was unknown, but the variation of fish species and irregular supply patterns suggested the possibility that Golden Eagles snatched prey from fish-eating birds, such as Western Ospreys *Pandion haliaetus*.

原著論文 Original Article

## 生息域外保全を目的にした絶滅危惧種チョウセンキバナアツモリソウの発芽法の開発と保存種子を用いた苗生産

小山田智彰<sup>1</sup>・鞍懸重和<sup>1</sup>・千崎則正<sup>1</sup>

岩手県環境保健研究センター<sup>1</sup>

Tomoaki OYAMADA, Shigekazu KURAKAKE, Norimasa SENZAKI:  
Development of a Method for Germinating Endangered *Cypripedium guttatum* and Efficacy of Seedling Production from Preserved Seeds Aimed at Ex Situ Conservation

要旨：国内において、チョウセンキバナアツモリソウ (*Cypripedium guttatum*) の自生地は1カ所であり、保護措置による個体数の増加傾向が見られないことなどから、生息域内保全を補完するための生息域外保全が急務になっている。本研究は、環境省東北地方環境事務所から要請を受け、環境省新宿御苑管理事務所に保存されてきた自生地由来となるチョウセンキバナアツモリソウの種子の発芽に取り組むことにより、生息域外保全の推進のために必要とされる保存種子の活用の有効性について検証した。研究は、保存種子の発芽に取り組む前に、予備試験として栽培地で維持されてきた栽培株より結実した種子900粒を材料にして、アツモリソウ属植物用に開発した小山田培地を使用し発芽試験を実施した。発芽した312個体を育苗培地に継代し、成長が認められた99個体をフラスコから取り出し、用土を充填したトロ箱に植え付けて2年間の育苗を行った。育苗によって生存した苗から30個体を栽培試験地に定植した結果、定植の翌年に初開花を確認した。この結果を参考にし、本試験として新宿御苑管理事務所に保管されていた2014年に採種された種子290粒を培地に播種したところ6個の発芽個体が得られた。これを育成用培地に継代して培養し、最終的に2個体の苗が得られた。また、2015年に採種された保存種子7265粒を材料に発芽試験に取り組んだ。その結果、培養開始50日から800日までの期間に断続的に108個体の発芽が確認された。発芽率は1.5%となり、予備試験として実施した栽培地由来の種子の発芽率34.7%と比較して有意に低くなることが分かった。発芽した108個体から器官分化が見られた101個体を育成培地に継代して育苗し、成長した57個体を培養フラスコから取り出して、栽培用土を充填したトロ箱に移植して2年間の育苗を行い、生存した22個体を環境省に提出した。本研究は、環境省が進めている絶滅危惧植物の保護増殖事業の中で取り組んだものであり、特にチョウセンキバナアツモリソウ野生株から採種された保存種子の発芽は国内外において初報告になり、生息域外保全に用いる保存種子の苗生産に成功した。

**Abstract :** *Cypripedium guttatum* (common name: Spotted Lady's Slipper) grows naturally in one location in Japan. However, the failure of conservation measures to increase the *C. guttatum* population has created an urgent need to supplement in situ conservation with ex situ conservation. We were contracted by the Ministry of the Environment (MOE) Tohoku Regional Environment Office to develop a method to germinate *C. guttatum* seeds collected from *C. guttatum*'s natural habitat and stored by the MOE Shinjuku Gyoen National Garden Management Office and to evaluate the efficacy

<sup>1</sup> 〒020-0857 岩手県盛岡市北飯岡1-11-16; Iwate Prefectural Research Institute for Environmental Sciences and Public Health (I-RIEP), 1-11-16 Kitaiioka, Morioka, Iwate, 020-0857, Japan

of using preserved seeds, which is essential for promoting ex situ conservation. Prior to attempting to germinate preserved seeds, we conducted a pilot study using 900 seeds collected from *C. guttatum* maintained in cultivation plots and Oyamada medium developed especially for *Cypripedium* spp. The 312 seedlings that germinated were subcultured in seedling growth medium; of these, the 99 seedlings that showed growth were removed from their flasks and transplanted to planting trays filled with horticultural soil and grown for 2 years. The 30 surviving seedlings were planted out in experimental plots and the first bloom was observed the following year. Based on these results, we sowed 290 seeds collected in 2014 and stored by the Shinjiku Gyoen National Park Management Office, which resulted in the germination of six seedlings. These seedlings were subcultured in seedling growth medium and ultimately yielded two plants. Based on the results of this pilot study, we conducted a germination experiment using 7,265 preserved seeds collected in 2015. Intermittent germination of 108 seedlings was observed between day 50 and day 800 after sowing. The resulting germination rate (1.5%) was significantly lower than the germination rate of seeds collected from cultivated plants (34.7%) conducted as a control experiment. Of these 108 seedlings, the 101 that exhibited differentiation were subcultured in seedling growth medium; of these, the 57 that showed growth were removed from their flasks and transplanted to planting trays filled with horticultural soil and grown for 2 years. The 22 surviving seedlings were submitted to MOE. This research, conducted as part of MOE's effort to conserve and increase populations of endangered plants, has yielded the first report both inside and outside Japan of germination of *C. guttatum* from preserved seeds collected from wild *C. guttatum* and demonstrates the efficacy of using preserved seeds for ex situ conservation.

キーワード: チョウセンキバナアツモリソウ, 自生地, 生息域外保全, 保存種子, 発芽

**Keywords:** *Cypripedium guttatum*, natural habitat, ex situ conservation, preserved seed, germination

## I. はじめに

チョウセンキバナアツモリソウ (*Cypripedium guttatum*) は、2002年に「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」の国内希少野生動植物種に指定されている（環境省、2018）。2004年には農林水産省・環境省共管で「保護増殖事業計画」を策定し、生育状況のモニタリング、盗掘防止の巡視、生育環境の改善のための植生管理等を実施している。しかし、国内の自生地は1カ所であり、2017年10月、2018年6月と7月に実施した自生地での現地調査では、開花まで到達した植物体はわずかで、開花から結実に至る個体はほとんど見られなかった（小山田ほか、2019；表1）。また、開花個体においても、地上部が黒色化し、その後に地上部が溶け落ちる現象が確認された。これは、栽培管理の中で健全に開花したチョウセンキバナアツモリソウには見られないことから、自生地のチョウセンキバナアツモリソウ群落は衰退傾向にあることが推測され、生息域内保全を補完す

るための生息域外保全が急務になっている。本種の生息域外保全の推進のために環境省東北地方環境事務所の要請を受けて環境省新宿御苑管

表1. チョウセンキバナアツモリソウ自生地の開花および結実状況

**Table 1.** Blooming and fruit bearing of *Cypripedium guttatum* in their natural habitat.

調査年	開花数	結実数	さく果回収
2004	9	0	0
2005	11	4	0
2006	21	2	0
2007	17	2	0
2008	17	2	0
2009	1	1	0
2010	8	3	0
2011	1	1	0
2012	5	1	0
2013	2	1	0
2014	6	1	1 <sup>z</sup>
2015	13	5	4 <sup>z</sup>
2016	10	1	1
2017	5	0	0
2018	6	1	1

<sup>z</sup> 2014年と2015年の種子を本研究に使用

理事務所（以下、「新宿御苑」）に長期保存されていた種子（以下、「保存種子」）の発芽に取り組んだ。

国外において、本種の発芽試験に取り組んだ報告は数例あるが、幼苗の育苗を進めて栽培・開花に至った報告例は確認できず（Bae et al.,2009；Ishii et al.,2005；佐々木,2000），これについて環境省に聞き取りを行ったが同様の回答であった。

そこで本研究では過去に取り組んだアツモリソウに用いた発芽法（小山田,2003;小山田ほか,2008；小山田ほか,2011）を参考に、予備試験として岩手県内に設置したアツモリソウ属植物の栽培試験地（以下、「栽培地」）のチョウセンキバナアツモリソウの種子（以下、「栽培地由来種子」）を用い、発芽・育成技術の確立に取り組んだ。初めに、今後の発芽・育成試験の材料となる種子数を把握、予測するため、栽培地から採取したさく果の外部形態と種子数の関係を明らかにし、その後栽培地由来種子を用いた発芽・育成試験を行った。また、保存種子の発芽・育成技術を確認する事前調査として、発芽、育成培地および培養土の組成を検討するため、自生地の土壌分析を行った。これらの結果を基に本試験として保存種子の発芽、育成試験に取り組む、生息域外保全における保存種子活用の有効性を検討した。

## II. 材料と方法

### 1. 予備試験

チョウセンキバナアツモリソウの種子および発芽の状況を取りまとめた既往の報告等がないため、貴重な保存種子を取扱うにあたり、著者が保有する「種の保存法」規制以前となる1993年に園芸店から購入した2株から増殖した株を使用して予備試験を行った。

#### (1) 栽培地由来のチョウセンキバナアツモリソウのさく果の外部形態と種子数の関係（試験1-1）

2010年に栽培地の19株からさく果を採取し、結実したさく果のサイズを「大」、「中」、「小」、「不

良（虫食い）」に目視分類した後、長さ、径をノギスで、重量を電子天秤（LIBROR EB-28, 島津製作所）で計測した。計測後、さく果内の種子をシャーレーに取り出し、実体顕微鏡（SZX-ILLB100, OLYMPUS）を用いて種子数をカウントした。計測後、さく果のサイズ中のものから900粒を発芽試験に用いた。

#### (2) 栽培地由来種子の発芽（試験1-2）

栽培地由来種子の発芽試験を2010年に行った。種子は、開花・結実から90日が経過した完熟種子を材料に用いた。

種子殺菌は、試験1-1で採取した種子を、次亜塩素酸ナトリウム水溶液（有効塩素0.6%）を入れた遠沈管に移し、振動殺菌を30分間行った。

播種は、殺菌した種子をクリーンベンチに搬入後、小山田培養液（小山田ほか,2011；小山田ほか,2021；表2）に30分間種子を沈殿させ、pH5.7に調整した小山田培地（小山田ほか,

表2. 小山田培養液と培地の組成

**Table2.** Composition of Oyamada culture solution and growth medium.

小山田培養液の組成	添加量	小山田固形培地の組成	添加量
塩酸チアミン	5 mg・L <sup>-1</sup>	Hyponex (6.5 - 6.0 - 19.0)	1 g・L <sup>-1</sup>
ニコチン酸	2.5 mg・L <sup>-1</sup>	ベプトン	1 g・L <sup>-1</sup>
塩酸ピリドキシン	5 mg・L <sup>-1</sup>	スクロース	20 g・L <sup>-1</sup>
ミオイノシトール	10 mg・L <sup>-1</sup>	小山田培養液	1 mL・L <sup>-1</sup>
植物活性剤	0.1 mL・L <sup>-1</sup>	ポテトキューブ <sup>2</sup>	5 mm角
木酢液	0.1 mL・L <sup>-1</sup>	活性炭 <sup>3</sup>	1 g・L <sup>-1</sup>
pH	5.8	ゲランガム	3 g・L <sup>-1</sup>
		pH	5.7-5.8

<sup>2</sup> 培養容器に1個加えた後に、オートクレーブで滅菌する。

<sup>3</sup> 活性炭は発芽培地に用いない。

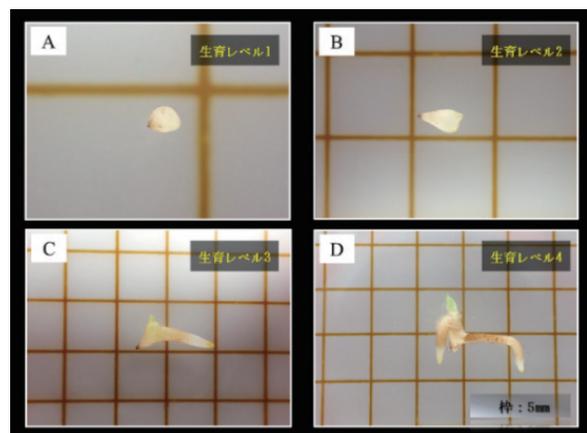


図1. 小山田培地で発芽した苗の生育レベル（4区分）A: 発芽直後のプロトコーム, B: プロトコームが変形肥大した形態, C: 器官分化を開始した形態, D: 芽と根が伸長した苗

**Fig.1.** Development stages of seedlings germinated in Oyamada medium (four stages).

2011；小山田ほか，2021；表2）を100 mL 充填した広口ガラス容器（450 mL，石塚硝子社）へ，1 容器あたり 300 粒を目安に 900 粒播種した。その後，培養容器に小山田培養液を 5 mL 添加した。

培養は，20℃の暗黒条件に設定したバイオマルチンキュベータ（LH-30-8CT,NK システム）に，播種した培養容器を 180 日間を目安に静置した。発芽の判断は目視により未分化で極小の白い球体形をなすプロコトームを確認した時とし，経過観察から発芽開始日を記録し，培養終了後に発芽個体をカウントした。

### (3) 栽培地由来の育成培養（試験 1-3）

継代は，試験 1-2 で発芽した 312 個体を小山田培養液に浸透させた後，活性炭入りの小山田培地（pH 5.7 に調整）を 100 mL 充填した広口ガラスの培養容器（450 mL，石塚硝子社）へ生育レベル別に，1 容器当たり 1～3 個体移植した。この時，生育レベル 2 で継代したものを生育レベル 2 区，3 で継代したものを生育レベル 3 区とした。培養は試験 1-2 と同条件で行った。尚，育成培養の期間は 180 日を目安に行った。

育成培養完了時に，生存個体をカウントし，その内 30 個体については草丈，根長をノギスで，重量を電子天秤で計測し，根数，越冬芽数をカウントした。また，生育レベル 2 区と 3 区で生存した各 15 個体についても，重量を除いた項目について同様の方法で調査し，生育レベル間で比較した。

### (4) 栽培地由来の順化・鉢上げ（試験 1-4）

栽培地由来種子の培養苗 99 個体の順化・鉢上げを 2011 年に行った。順化・鉢上げは，過去に実施した方法（小山田，2003）に従った。つまり，栽培容器（発泡スチロール製トロボ箱縦 50 cm × 横 30 cm × 高さ 20 cm）に硬質鹿沼土（小粒），硬質赤玉土（小粒），砂，もみ殻くん炭を比率 6:2:1:1 で混合した用土を深さ 15 cm まで充填し，その上に約 1 cm 深でスギ・ヒノキの樹皮を薄く敷き詰め，そこに栽培地由来種子の培養苗を栽培容器あたり 20 個体を目安に植栽した。植栽した栽培容器は屋外の棚に設置し，自然環境下

で管理した。順化・鉢上げは，野外の最高気温が 20℃以下の日が連続するようになったのを確認してから実施した。

苗の管理は，4 月から 11 月まで月 1 回の割合で小山田培養液（表 2）を各栽培容器に 1000 mL 散布した（小山田ほか，2021）。また，夏期の間は寒冷紗を設置して遮光を行ない，日中の照度が 10000 lx 以下になるよう調節した。降雪が確認された時点で苗の管理を終了し冬越した。

順化・鉢上げから 2 年後に生存個体をカウントした。また，生存した 45 個体については，縦 230 cm × 横 100 cm に設定した栽培地へ 30 個体を定植，15 個体を栽培容器のまま管理し，その後の生育，開花状況を観察して本試験で用いた発芽法の実用性について評価した。

## 2. 自生地の土壌分析（試験 2）

自生地の土壌は，2017 年，2018 年に自生地の上の群落（「以下，U 区」）（開花あり；写真 1）および下の群落（「以下，L 区」）（開花なし）の植物体付近から，1 サンプル 60 g，3 サンプルずつ採取した。この時，開花期に自生地に入り，土壌の採取は植物体の発生地点から根系の伸長範囲となる深度 5 cm を目安とし，植物体に損傷を与えないようにした。

土壌分析は，採取した土壌のアンモニア態窒素，硝酸態窒素，可給態鉄，交換性マンガン，可給態リン酸，交換性カリウム，交換性カルシウムおよび交換性マグネシウムを土壌養分検定器（Dr. ソイル，富士平工業）で分析した。pH と EC は測定器（H198129，HANNA 社）を使用して測定した。比較のために行ったアツモリソウとクマガイソウ自生地の土壌分析も同じ方法で分析した。分析 11 項目から，特にアツモリソウ属植物の土壌比較に用いられている窒素，交換性カルシウム，pH と EC に着目し（小山田ほか，2020；小山田ほか，2021），開花数および個体数の多い U 区と，開花のない L 区の土壌を評価し，培地調整に活用した。

## 3. 本試験

本試験については，予備試験および自生地の土壌試験結果を基に本試験を実施した。

### (1) 保存種子の発芽 (試験 3-1)

試験の種子には、新宿御苑の種子保存施設内で種子調整および乾燥作業を行った後に $-20^{\circ}\text{C}$ で長期保存されていた保存種子(環境省自然環境局, 2009; 環境省新宿御苑管理事務所, 2010)を用いた。保存後2年経過した2016年と2017年に受け取った保存種子は、それぞれ2014年開花1株の種子(290粒)と、2015年開花4株の種子(7265粒)で、どちらも完熟種子である(表1)。これらを材料に発芽試験に取り組んだ。

播種は、種子を小山田培養液に2時間沈殿させたこと、また、小山田培地のpHを5.8に調整したことを除き、試験1-2と同様の方法で行った。

培養は、試験1-2と同条件で行ったが、培養容器の静置期間は、発芽開始日数が個体によって50日から800日と大きく異なったため、培養容器を定期的に確認し、発芽後生育レベル2で取り出した。

計測は、試験1-2と同様の項目を同様の方法で行い、栽培地由来種子と比較した。

### (2) 保存種子の育成培養 (試験 3-2)

継代および培養は、試験3-1で発芽後生存した2014年採取種子由来の5個体および2015年採取種子由来の101個体について、試験1-3と同様の方法で行った。尚、発芽に要する日数に差が生じたため、育成培養の期間は180日を目安に実施した。計測は、育成培養完了時に試験1-3の生



写真1. 土壌採取地点のチョウセンキバナアツモリソウ野生株(U区)

Photo1. Wild *Cypripedium guttatum* growing at a soil sampling location (upper community).

育レベル間の生育比較を除いた項目を、同様の方法で計測した。この時、生育調査は57個体を対象とし、栽培地由来の培養苗と比較した。

### (3) 保存種子の順化・鉢上げ (試験 3-3)

保存種子の培養苗57個体の順化・鉢上げは2019年に行った。順化・鉢上げおよび苗の管理の方法は試験1-4と同様の方法で行った。ラン科植物は土中の菌と共生関係を結んでいること(松本ほか, 1988; 清水ほか2001)や、発芽と実生時の栄養摂取に菌根菌を必要とし、自生分布は、菌根の特異性によって制限されるという報告もある(Shefferson et al., 2005)ため、土壌分析に使用したU区の土壌を苗の根系に接するように充填した。順化・鉢上げ2年後に生存個体をカウントし、生存率を栽培地種子由来の培養苗の生存率と比較した。

## 4. 統計解析

さく果の外部形態と種子数の解析は、さく果内の種子数を目的変数、さく果の長さ、径および重量を説明変数とし、単回帰分析を行った。また、それぞれの相関係数について無相関の検定を行った。

栽培地由来種子の育成培養における継代時の生育レベル間での培養苗の生育比較では、生育レベル2区と生育レベル3区の培養苗の草丈および根長はウェルチのt検定で、根数と越冬芽数はマンホイットニーのU検定で、生存率はフィッシャーの正確確率検定で比較した。

2015年採取の保存種子と栽培地由来種子の発芽開始日数および発芽率の比較では、発芽開始日数はマンホイットニーのU検定で、発芽率はフィッシャーの正確確率検定で比較した。

育成培養完了時の保存種子および栽培地由来種子の培養苗の生育および生存率の比較では、培養苗の草丈、根長および重量はウェルチのt検定で、根数と越冬芽数はマンホイットニーのU検定で、生存率はフィッシャーの正確確率検定で比較した。

順化・鉢上げ2年後の生存率の比較では、保存種子および栽培地由来種子の培養苗の生存率をフィッシャーの正確確率検定で比較した。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 予備試験結果

##### (1) 栽培地由来のチョウセンキバナアツモリソウのさく果の外部形態と種子数の関係 (試験 1-1)

目視分類により, さく果は大 5 個, 中 5 個, 小 5 個, 不良 (虫食い) 4 個であった。また, サイズ別の種子数の平均値およびレンジは, 大 8337 粒 (レンジ:7271-10118 粒), 中 5816 粒 (レンジ:4651-6670 粒), 小 2910 粒 (レンジ:100-5229 粒), 不良 1772 粒 (レンジ:217-4469 粒) であった (表 3)。大のさく果と比較して, 中, 小および不良のさく果の平均種子数は少なく, 小および不良のさく果に含まれる種子数にはばらつきが見られた。

図 2 にさく果の長さ, 径, 重量と種子数の関係を示す。その結果, さく果の長さ, 径および重量と種子数で正の相関が見られ, 特に, 長さよりも径と重量に強い相関が見られた。また, 径が 10 mm 以上であること, 重量が 0.4 g 以上に達したさく果を回収することで, 平均的な種子数と言える 5000 粒の種子を確保できることが示唆された。

##### (2) 栽培地由来種子を用いた発芽 (試験 1-2)

播種後 80 日目からプロトコームが発生し, 発芽が確認された。平均発芽開始日数は  $126.3 \pm 22.7$  日 (平均  $\pm$  標準偏差), 発芽率は 34.7% であった。

##### (3) 栽培地由来の育成培養 (試験 1-3)

育成培養完了時の培養苗の草丈, 根長, 根数, 越冬芽数, 重量及び生存率は, それぞれ  $8.9 \pm 0.3$

表 3. 栽培地で回収したさく果の種子数調査

**Table 3.** Numbers of capsules and seeds collected from cultivated *Cypripedium guttatum*.

さく果の状況 (目視判定)	さく果数 (個)	平均種子数 (最大-最小値)
大	5	8337 (10118-7271)
中	5	5816 (6670-4651)
小	5	2910 (5229-100)
不良	4	1772 (4469-217)
参考: 人工交配	2	6143 (6908-5377)

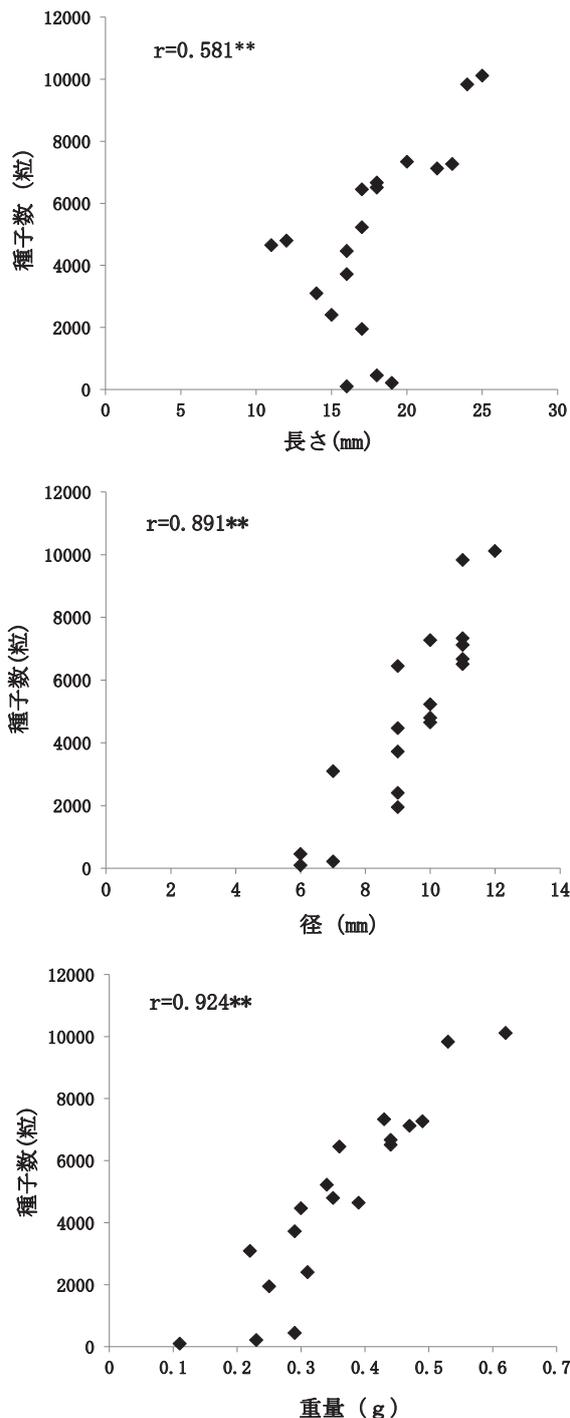


図 2. さく果の長さ・径・重量と種子数の関係

図中  $r$  はピアソンの相関係数を示す。\*\*は無相関の検定により, 1% 水準で有意差があることを示す。

**Fig. 2.** Relationship between capsule length, diameter, weight, and seed number.

mm (平均  $\pm$  標準誤差),  $46.7 \pm 2.2$  mm,  $4.7 \pm 0.3$  本,  $0.7 \pm 0.1$  本,  $0.23 \pm 0.11$  g および 31.7% であった。

表 4 に生育レベル 2 区と 3 区における培養苗の草丈, 根長, 根数, 越冬芽数および生存率を

示す。その結果、根長と生存率に有意な差が見られ、生育レベル2の根長が $51.4 \pm 2.3$  mm（平均±標準誤差）で、3の $41.9 \pm 2.4$  mmより有意に長かった。また、生育レベル2区の生存率が40.8%で、生育レベル3区の23.0%より有意に高かった。

これらのことから、生育レベル2で育成培養することで、培養苗の根長および生存率が高まることが示唆された。これを受け保存種子の育成試験は、生育レベル2で育成培地に継代した。

(4) 栽培地由来の順化・鉢上げ（試験1-4）

栽培地由来種子の培養苗の順化・鉢上げ2年後の生存率は45.5%であった（図3；2013年5月19日）。

露地の栽培試験地に定植した30個体（図3；2013年6月18日）は翌年に初開花が確認され（図3；2014年5月18日）、2021年には、開花数304株まで開花が認められた（図3；2021年5月16日）。

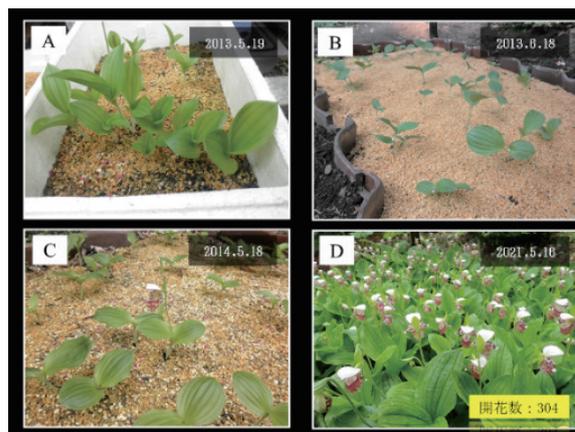


図3. 栽培地に定植した苗の初開花と群落化の様子（2013年定植：30個体）  
A: 順化・鉢上げ2年後の栽培地由来種子の培養苗, B: 露地の栽培試験地に定植後の個体, C: 初開花個体, D: 露地栽培8年後の開花株群

Fig.3. First bloom and clustering of *Cypripedium guttatum* seedlings planted out to a cultivation plot (30 plants planted out in 2013).

表4. 生育レベル2区と生育レベル3区の培養完了時の生育と生存率

Table4. Growth of seedlings subcultured at development stages 2 and 3 at completion of subculturing (acclimatization, potting).

試験区	草丈 (cm)	根長 (mm)	根数 (本)	越冬芽数 (本)	生存率 (%)
生育レベル2の継代区	9.3 ± 0.4 <sup>z</sup> (15)	51.4 ± 3.3 (15)	4.5 ± 0.3 (15)	0.6 ± 0.2 (15)	40.8 (179)
生育レベル3の継代区	8.6 ± 0.5 (15)	41.9 ± 2.4 (15)	4.9 ± 0.6 (15)	0.7 ± 0.2 (15)	23.0 (113)
有意性 <sup>y</sup>	n. s.	*	n. s.	n. s.	**

<sup>z</sup> 平均±標準誤差 (供試数)

<sup>y</sup> 草丈および根長の\*はウェルチのt検定により、根数および越冬芽数の\*はマンホイットニーのU検定により、生存率の\*\*はフィッシャーの正確確率検定により、5%水準で有意差があることを示す。n. s.は有意差がないことを示す。

表5. チョウセンキバナアツモリソウ自生地の土壌分析結果

Table5. Analysis of soil from the *Cypripedium guttatum* natural habitat.

分析項目	上の群落 (開花あり)			平均	標準偏差	下の群落 (開花なし)			平均	標準偏差
	サンプル①	サンプル②	サンプル③			サンプル④	サンプル⑤	サンプル⑥		
アンモニア態窒素 (mg/100g)	1.6	1.7	1.2	1.5	0.3	1.8	1.8	1.0	1.5	0.5
硝酸態窒素 (mg/100g)	1.0	1.2	1.5	1.2	0.3	0.9	1.3	0.7	1.0	0.3
可給態リン酸 (mg/100g)	1.0	2.1	2.0	1.7	0.6	3.0	2.2	1.3	2.2	0.9
交換性カリウム (mg/100g)	44.0	66.0	30.0	46.7	18.1	40.0	35.0	38.0	37.7	2.5
交換性カルシウム (mg/100g)	160.0	112.0	157.0	143.0	26.9	103.0	88.0	94.0	95.0	7.5
交換性マグネシウム (mg/100g)	40.0	17.0	82.0	46.3	33.0	43.0	98.0	9.0	50.0	44.9
可給態鉄 (PPm)	4.0	60.0	53.0	39.0	30.5	6.0	42.0	16.0	21.3	18.6
交換性マンガン (PPm)	6.0	16.0	11.0	11.0	5.0	6.0	4.0	9.0	6.3	2.5
塩分 (%)	0.006	0.006	0.03	0.0	0.0	0.008	0.059	0.07	0.0	0.0
pH	6.05	5.55	5.71	5.8	0.3	5.87	5.8	5.91	5.9	0.1
EC (μS/cm)	4	5	4	4.3	0.6	10	5	11	8.7	3.2

表6. アツモリソウ自生地とクマガイソウ自生地の土壌分析結果

**Table6.** Analysis of soil from the *Cypripedium macranthos* var. *speciosum* and *Cypripedium japonicum* Thunb. natural habitat.

試験項目	アツモリソウ自生地 (1株)		クマガイソウ自生地 (群生)	
	平均	標準誤差	平均	標準誤差
アンモニア態窒素 (mg/100g)	0.3 ± 0.1		15.0 ± 1.7	
硝酸態窒素 (mg/100g)	2.2 ± 1.8		11.3 ± 4.4	
可給態リン酸 (mg/100g)	1.5 ± 0.4		3.7 ± 0.9	
交換性カリウム (mg/100g)	42.5 ± 10.0		96.0 ± 11.6	
交換性カルシウム (mg/100g)	383.4 ± 40.6		41.3 ± 8.2	
交換性マグネシウム (mg/100g)	6.4 ± 3.4		36.0 ± 7.4	
可給態鉄 (ppm)	2.1 ± 0.6		22.7 ± 13.2	
交換性マンガン (ppm)	3.1 ± 1.6		9.7 ± 1.5	
塩分 (%)	0.003 ± 0.002		0.010 ± 0.001	
pH	7.6 ± 0.3		4.7 ± 0.1	
EC ( $\mu$ S/cm)	37.8 ± 23.3		48.3 ± 5.8	

以上の結果から、チョウセンキバナアツモリソウの種子を利用した無菌播種による発芽個体の作出と、発芽した苗の順化・鉢上げによる野外での育苗を経て、露地試験地に定植することによって開花および開花数の増加が確認できた。

## 2. 自生地の土壌分析 (試験 2)

表5にチョウセンキバナアツモリソウ自生地の土壌分析結果を示す。また、比較のためにアツモリソウとクマガイソウ自生地の土壌分析結果を表6に示す。

チョウセンキバナアツモリソウ自生地のU区とL区のアンモニア態窒素の平均値は、それぞれ1.5 mg/100 g, 1.5 mg/100 gであった。硝酸態窒素では1.2 mg/100 g, 1.0 mg/100 gとなり、U区とL区で大きな差は見られなかった。アンモニア態窒素と硝酸態窒素の合計値をアツモリソウ自生地と比較した場合、両者に大きな差は見られなかったが、クマガイソウ自生地と比較すると、チョウセンキバナアツモリソウとアツモリソウ自生地はクマガイソウ自生地の1/10程度になり低かった。

交換性カルシウムでは、143.0 mg/100 g, 95.0 mg/100 gとなり、アツモリソウ自生地よりも低くなったが、クマガイソウ自生地よりも高い値を示した。

U区のpHは平均5.8, L区は平均5.9となり、いずれも弱酸性土壌を示した。アツモリソウ自

生地の7.6よりも低くなったが、クマガイソウ自生地の4.7よりも高い値を示した。

本試験に使用する培地は、群落内の株数と開花数が多いU区に合わせて調整した。つまり、アンモニア態窒素と硝酸態窒素の合計値やpHに注目して培地作成時の窒素量とpHの調整を行った。

## 3. 本試験

### (1) 保存種子の発芽試験 (試験 3-1)

2014年採取種子の発芽率は2.4%, 2015年採取種子の発芽率は1.5%であり、それぞれ6個体と108個体の発芽個体が得られた。2015年採取種子と栽培地由来種子の発芽率を比較したところ、栽培地由来種子の方が有意に高かった(表7)。また、2015年採取種子の平均発芽開始日数は、 $203.4 \pm 150.4$ 日(平均 $\pm$ 標準偏差)となり、栽培地由来種子の $126.3 \pm 22.7$ 日と比べて有意に長く、また、標準偏差も大きく、保存種子は、発芽率が低いとともに、発芽の開始も遅く、発芽開始日数のばらつきが大きかった(表7, 図4)。

### (2) 保存種子の育成培養 (試験 3-2)

表8に育成培養完了時の保存種子の培養苗(写真2)と栽培地由来種子の培養苗の草丈、根長、根数、越冬芽数および重量を示す。その結果、根数に有意な差が見られ、保存種子の培養苗の根数は $3.5 \pm 0.2$ 本(平均 $\pm$ 標準誤差)と、栽培

表7. 小山田培地に播種した保存種子と栽培地由来種子の発芽開始日と発芽率の比較

**Table7.** Germination start dates and germination rates of preserved seeds vs. seeds from cultivated plants sown in Oyamada medium.

	発芽開始日数 (日)	発芽率 (%)
保存種子	203.4 ± 150.4 (108) <sup>2</sup>	1.5 (7265)
栽培地由来種子 (保存なし)	126.3 ± 22.7 (312)	34.7 (900)
有意性 <sup>3</sup>	**	**

<sup>2</sup> 平均±標準偏差 (供試数)

<sup>3</sup> 発芽開始日数の\*\*はマンホイットニーのU検定により、発芽率の\*\*はフィッシャーの正確確率検定により、1%水準で有意差があることを示す。

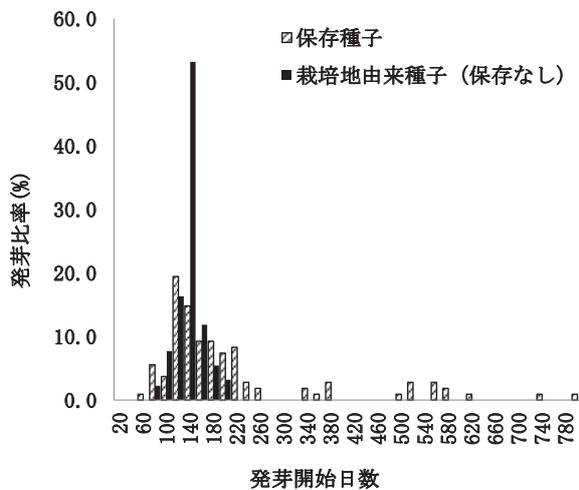


図4. 小山田培地に播種した保存種子と栽培地由来種子の発芽開始日と発芽比

**Fig.4.** Germination start dates and germination rates of preserved seeds vs. seeds from cultivated plants sown in Oyamada medium.

地由来種子の培養苗の  $4.7 \pm 0.3$  本より有意に少なかった。

育成培養完了時の保存種子の培養苗と栽培地由来種子の培養苗の生存率は、それぞれ 52.8% と 31.7% で保存種子の培養苗が有意に高かった。これらのことから、保存種子の培養苗は出根数が少ないが、生存率が高い苗であることが示唆された。

### (3) 保存種子の順化・鉢上げ (試験 3-3)

保存種子由来の培養苗の順化・鉢上げ 2 年後の生存率は 38.6% で、栽培地種子由来の培養苗の生存率と比較し、有意な差は見られなかった。

## IV. 考察

### 1. さく果と種子数の調査

本種の種子形成に関する情報を確認することができなかったことから、さく果の長さ、径、重量と種子数の関係を調査したところ、長さよりも径と重量で強い正の相関が見られた。特に、径が 10 mm 以上あるものや、重量が 0.4 g 以上に達しているものを選ぶことで、平均的な種子数を持ったさく果を選択できることが明らかになった。

これらの数値結果を参考にすることで、自生地等で結実が確認された際のさく果の選択が可能になると思われる。

### 2. 自生地の土壌分析

本種の自生地点を土壌分析した前例はなく、本研究の分析が国内初となる (小山田ほか, 2020)。群落の株数および開花数が多い U 区と、少ない L 区について、土壌分析結果の窒素、交換性カルシウムおよび pH の 3 項目を評価するとともに、アツモリソウとクマガイソウの自生地の分析結果 (小山田ほか, 2020) と比較して培地調整の参考とした (表 6)。

窒素成分は、U 区と L 区の両群落で少なく、交換性カルシウムは U 区でわずかに高い傾向にあり、U 区はクマガイソウよりもアツモリソウに近かった (小山田, 2020)。一般的な作物

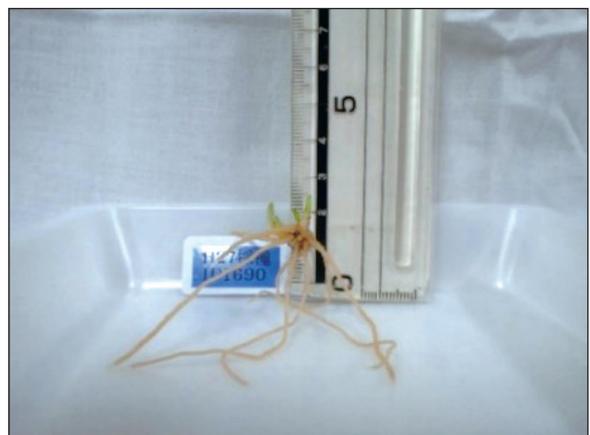


写真2. 保存種子由来の苗の順化・鉢上げ時の様子  
**Photo2.** *Cypripedium guttatum* seedling germinated from a preserved seed just prior to acclimatization.

表 8. 保存種子由来の苗の順化・鉢上げ時の生育

Table 8. Growth of seedlings germinated from preserved seeds just prior to acclimatization.

	供試数	草丈 (mm)	根長 (mm)	根数 (本)	越冬芽数 (本)	重量 (g)
保存種子由来の苗	57	8.5 ± 0.3 <sup>2</sup>	51.1 ± 3.9	3.5 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.22 ± 0.10
栽培地由来種子の苗	30	8.9 ± 0.3	46.7 ± 2.2	4.7 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.23 ± 0.11
有意性 <sup>2</sup>		n. s.	n. s.	*	n. s.	n. s.

<sup>2</sup> 平均±標準誤差

<sup>2</sup> 草丈、根長および重量の\*はウェルチのt検定により、根数および越冬芽数の\*はマンホイットニーのU検定により、5%水準で有意差があることを示す。n. s. は有意差がないことを示す。

の畑土では、土壌中の好適な濃度範囲はアンモニア態窒素が5～15 mg/100 g、硝酸態窒素が5～10 mg/100 gとされており（富士平工業, 1988）、チョウセンキバナアツモリソウとアツモリソウの硝酸態窒素は5 mg/100 g未満と貧栄養土壌に自生すること、また、交換性カルシウムが両種ともに100 mg/100 g以上と、カルシウム成分の多い土壌に自生する傾向が見られた。

pHは、両群落とも弱酸性土壌であった。アツモリソウでは平均7.6で弱アルカリ性土壌を示し、クマガイソウでは平均4.7で酸性土壌を示したことから、チョウセンキバナアツモリソウは、その中間的なpHの土壌に自生していた。

硝酸態窒素との間に正の相関関係を示すECは（藤原ほか, 2005）、両群落とも低く、窒素成分の傾向と一致した。分析数は少ないが本種はアツモリソウに近く、クマガイソウよりも水溶性塩類を必要としない植物である可能性が認められた。

以上の分析結果を参考にして、本試験に用いる小山田培地（表2）の組成は、開花株の見られるU区の窒素量からアンモニア態窒素と硝酸態窒素の平均値の合計からアツモリソウに用いる培地と同量にした。また、pHの数値を5.8に決定した。

### 3. 発芽試験

本研究では、生息域外保全の推進のために必要となる自生地由来の保存種子を発芽させることを第一の目的にしている。保存種子の発芽に取り組む前に、予備試験として栽培株より採種した種子を用いて小山田培地に播種した。その

結果、発芽率は34.7%となり、過去に同じ方法で実施したアツモリソウの68%よりは低い発芽率となった（小山田ほか, 2011）。

本種の無菌播種による発芽報告は、国内外で3例がある（Bae et al., 2009; Ishii et al., 2005; 佐々木, 2000）。Baeは、チョウセンキバナアツモリソウの完熟種子を材料に、1%NaOClを用いた種子への刺激によって発芽が進むことを確認しており、発芽したプロトコームからの発根には、Ga 3（ジベレリン酸）を添加している（Bae et al., 2009）。Ishiiらは、1 μMのBAP（6-ベンジルアミノプリン）を含むMS培地で、未成熟種子のプロトコーム誘導を介して発芽を確認している（Ishii et al., 2005）。佐々木は、受粉から47日後の未熟種子を使用して、ホルモンを含まない1/3MS寒天培地で発芽を確認しており、その後、0.2 mg/LのBAPを添加した場合において複数のシュートを増殖させ、根の伸長にはホルモンを含まない培地が好ましいことを確認している（佐々木, 2000）。これら3者が行った無菌播種法では、フラスコ内での発芽およびシュートの増殖や発根についてまとめているものの、作出した苗の栽培段階での成長や開花は取り組まれていない。

Harvaisは、アツモリソウ属植物のレギナエ（*C. reginae*）の完熟種子を用いて、培地にサイトカイニンを添加すると実生苗作出に生育・生存率が高まることを示している（Harvais, 1982）。また、城らは、アツモリソウ（*C. macranthos* var. *speciosum*）、ホテイアツモリソウ（*C. macranthos* var. *hoteiatsumorianum*）、レブンアツモリソウ（*C. macranthos* var. *rebunense*）

のアツモリソウ属3種について、未熟種子を材料にBAPを0.2 mg/Lを添加した培地で発芽させている(城ほか, 1996)。以上のように、チョウセンキバナアツモリソウを含むアツモリソウ属植物の無菌播種による発芽では、植物成長調節物質(松本ほか, 1998; 日本植物培養学会・日本植物組織培養学会, 1993)を積極的に用いて発芽を進めている例が多いが、植物の組織培養で一般的に活用される植物成長調節物質の利用は、体細胞突然変異による培養植物の突然変異の発生を助長することが知られており(日本植物培養学会・日本植物組織培養学会, 1993)、絶滅危惧植物の野生復帰を目的にした利用には課題がある。

本研究に用いた保存種子は自生地から採種された種子を用いており、発芽した苗はクローン苗ではない。また、植物成長調節物質を含まない小山田培地を用いており、絶滅危惧植物の野生復帰を進める場合において、有効性が高いと言える。

2014年および2015年に採種された保存種子を材料に発芽試験に取り組んだ結果、培養開始50日から800日までの期間に断続的に発芽が確認され、発芽率は1.5%となり、栽培地由来の種子の発芽率34.7%と比較して有意に低くなった。両者はいずれも完熟種子を用いているが、栽培地の種子は乾燥処理を行わず採種から直ちに播種試験を行っており、保存種子は自生地で完熟種子を採取した後に保存処理を行っている。また、自生地のチョウセンキバナアツモリソウ群落は衰退傾向にあり、近交弱性や自生地で確認された植物体の生育不良による種子の結実不良の影響も懸念される。これらのことから発芽率に影響を及ぼしたものと推察されたが、今回の結果からはどのような原因によるものかについては究明できず、今後の課題である。また、Zengらはアツモリソウ属の未熟な種子は、成熟した種子よりも発芽が良いことが、多くの研究で示されていると報告しており(Zeng et al., 2014)、過去に未熟種子を用いたアツモリソウの発芽試験では、発芽率が68%であった(小山田ほか, 2011)が、本研究では材料が限られていたため、同培地による未熟種子の発芽試験

は行わなかった。今後、種子の熟度によるチョウセンキバナアツモリソウ発芽の知見を得ることも本種の生息域外保全に向けた一つの検討課題となる。

保存種子を試験開始前に顕微鏡観察したところ、微細な種子が縮れて変形しているものが多数見られた。また、種皮の中に観察できる未分化の胚は、どれも褐色をなしていた。本研究で行った発芽試験では、種子殺菌を行った後に、小山田培養液に液浸処理を行い、その後、小山田培地に種子を播種した。この時、培養液に液浸することで乾燥した種子の湿潤が種子の状態に応じて促進され、発芽日数のばらつきを生じさせたものと推察された。この培養液は、本来アツモリソウ専用として開発したものであるが(小山田ほか, 2011)、チョウセンキバナアツモリソウ自生地の分析結果を参考にpHの調整を行うことで、発芽や発芽後の育成培養、さらに順化・鉢上げ後の野外栽培において活用することができた。ラン科植物は、根の表皮部分に水滴が付着したり、湿った状態の所に接触すると、その部分の表皮が伸長して吸水能を高めることが知られている(農文協, 2003)ことから、発芽から野外での栽培まで培養液を継続的に与えたことで、アツモリソウと同様に成長に効果が認められたものと推察された。

#### 4. 育成培養

チョウセンキバナアツモリソウの発芽から苗の成長過程の変化を報告した例がないことから、本研究では、栽培地由来種子から発芽させた苗を観察し、苗の成長過程を4段階の生育レベルに区別した(図1)。このことで、苗の成長進度や成長区分を把握することが可能になり、その結果、保存種子から発芽させた苗の評価や、育成培地への継代時期の判断、さらに、順化・鉢上げの野外栽培へ移行する際の判断が容易になった。

苗の成長を進める育成培地への継代適期を確認するために、生育レベル2と生育レベル3の苗を育成培地に継代した結果、根長および生存率が生育レベル2区で高くなった。ラン科植物の培養では、培地中に活性炭を添加することに

より、成長阻害物質である老廃物を吸着することが知られており（富山，2000）、チョウセンキバナアツモリソウの育成培養においても培地に活性炭を添加し、生育レベル2の早い段階で育成培地に継代することでその効果が発揮されたものと推察された。

この結果を受け、環境省から依頼を受けた保存種子の発芽試験では、発芽した全ての苗を生育レベル2の段階で育成培地に継代し、栽培地由来種子の苗よりも高い生存率が得られた。一方で、根数は栽培地由来種子より少なくなり、この要因について不明であるが、チョウセンキバナアツモリソウの自生地では開花株が極めて少なく、自家受粉による結実の可能性が高い。以上のことより、種子の持つ多様性の差が影響しているものと推察した。

本研究によって、チョウセンキバナアツモリソウの発芽による苗の成長を進める場合、生育レベル2で育成培地へ継代することで、より高い生存率が得られることを明らかにした。

## 5. 順化・鉢上げ

現在、チョウセンキバナアツモリソウの発芽に関する報告は数例あるが、その中で順化・鉢上げについて具体的に報告したものはない。そこで、本研究では、我々が過去に実施したアツモリソウの順化法（小山田，2003；小山田ほか，2011）に沿って行った。この方法により、栽培地由来の苗について2年間の栽培管理を行ったところ、最終的に定植した30個体から7年後の2021年に304株の開花が確認された。これは本栽培管理によって地下茎（清水ほか，2001）の形成が進み、群生化することができたことを示す（図3）。このことからチョウセンキバナアツモリソウにおいても、アツモリソウの順化法が活用できることを確認した。

保存種子由来の苗は、栽培地由来の苗と同じ方法で順化・鉢上げを行ったが、栽培地由来の苗と大きく異なる生存率であり、本手法が保存種子由来の苗においても有効であることが示された。

## 6. チョウセンキバナアツモリソウ保護増殖事業

### の展望および今後の課題

チョウセンキバナアツモリソウは、絶滅の危険性が高い植物であり、種の保存対策が急務となっている（環境省自然環境局野生生物課，2018）。特に国内で確認できる自生地は1ヵ所のみで、このことがより緊急性を高めている（森，2002；高橋，2009）。

アツモリソウ属植物の場合は、「生息域外保全」を進める必要があるが、その前段階として、「生息域内保全」（環境省，2009）を進めることが急務である（自然環境研究センター，2011；小山田ほか，2021）。

そのためには、これまでに取り組んだ保護措置の効果と課題を科学的に検証し、より効果的な保全策を進める必要がある。「生息域外保全」については、新宿御苑において、種子保存に合わせて発芽確認を積極的に進めており、今後は希少植物の自生地復元や再導入を可能にするための種子保存方法の改良をめざす研究も進むと思われる。

本研究では、栽培地由来のチョウセンキバナアツモリソウの種子を用いてアツモリソウ属植物用に開発した小山田培地を用いて発芽を試みた。その結果、発芽個体を得ることに成功し、その苗を育苗して開花まで導いた。続いて環境省から依頼された保存種子を材料に発芽に取り組み、自生地の土壌分析結果を参考に調整した培地を用いて発芽させ、苗を環境省へ提出することができた（環境省，2020；写真3）。

保存種子7265粒から最終的に22個体の育成を導いたことになり、得苗率にすると0.3%となる。これは、栽培地由来種子900粒から45個体を導いた得苗率約5.0%と比較すると、「保存種子の活用」は「非保存種子の活用」よりも結果で劣っており、長期間にわたり保存された種子は、保存処理を行っていない種子と比較して得苗率で劣るという結果となった。これは種子の保存処理によって種子内の胚がダメージを受けているためと推察したが、さらに、現地個体の近交弱性や植物体の生育不良による種子の不全によって発芽・生育が低下していることも考えられる。

本研究では、乾燥冷凍保存したチョウセンキ

バナアツモリソウの種子からも苗の生産が可能であることを証明できた。作出した苗については、クローン増殖によるものではなく、環境省が「生息域外保全の実施に係る基本的な事項」として示す、「生息域外において保存される個体は可能な限り野生復帰させることが期待されるため、野生復帰させ得る資質を保つことが原則となる」という方針（環境省，2009）に適合しており、生息域外保全の苗として利用できるものと思われる。今後、保存種子からの苗が開花に至れば、将来的には自生地で衰退した野生株に代わって種子繁殖による遺伝的多様性の復元（自然環境研究センター，2011）にも活用が期待できる可能性があり、そうすると本研究で開発した発芽技術と本論文が重要な前例として役立つことができる。チョウセンキバナアツモリソウを含め国内に自生するアツモリソウ属植物の保護は緊急性が高いと考えられることから、本研究の取り組みが今後の種の保存対策に役立てば幸いである。

### 謝辞

環境省新宿御苑管理事務所温室第一科長・保護増殖専門官の関勝雄氏より、種子の保存方法について説明をいただいた。環境省東北地方環境事務所野生生物課生息地保護連携専門官の松

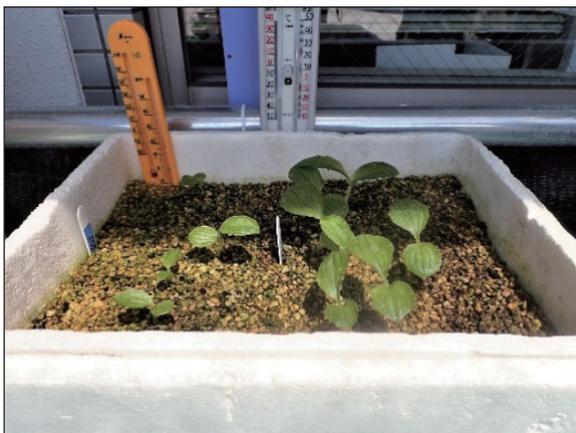


写真3. 環境省に提出したチョウセンキバナアツモリソウ保存種子由来の苗（2021年7月2日：秋田県立農業科学館）

**Photo3.** *Cypripedium guttatum* seedlings germinated from preserved seeds submitted to the Ministry of the Environment (July 2, 2021: Akita Prefectural Museum of Agricultural Science).

原豊氏と環境省秋田自然保護官事務所自然保護官の小笠原孝記氏より、研究のサポートや他機関との連絡調整に尽力をいただいた。本研究で作出したチョウセンキバナアツモリソウ苗の野外管理下の生育状況について、秋田県立農業科学館学芸班学芸主事の照井梓氏と、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター植物園技術専門職員の永谷工氏より報告を受けた。ここに記して感謝を申し上げる。

### 引用文献

- Bae, K. H., Kwon, H. K. & Choi, Y. E. (2009) In vitro Germination and Plantlet Conversion from the Culture of Fully Mature Seeds of *Cypripedium guttatum* swartz. *Propagation of Ornamental Plants* 9 (3) : 160-165.
- 富士平工業株式会社研究所 (1988) 土壌診断と施肥. 10-22. 富士平工業株式会社, 東京.
- 藤原俊六郎・安西徹郎・小川吉雄・加藤哲郎 (2005) 土壌肥料用語辞典. 78pp. 農文協, 東京.
- Harvais, G. (1982) An improved medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically, *Can.T. Bot.*, 60 : 2547-2555.
- Ishii, K., Maruyama, E., Hosoi, Y., Kanetani, S. (2005) IN VITRO PROPAGATION OF THREE ENDANGERED SPECIES IN JAPANESE FORESTS. *Propagation of Ornamental Plants* 5 (4) : 173-178.
- 城真一郎・秋田奈美樹・馬場徹代・筒井澄 (1996) アツモリソウ (*C.macranthum*) の無菌発芽における種子親による発芽率の変動, *園芸学会雑誌*, 65 別 2:632-633.
- 環境省 (2009) 絶滅のおそれのある野生動植物種の生息域外保全に関する基本方針.
- 環境省 (2020) 岩手県環境保健研究センターにおいてチョウセンキバナアツモリソウ自生地種子の発芽試験及び栽培を実施. <http://www.env.go.jp/nature/kisho/hogozoushoku/chosenkibanaatsumoriso.html> (参照：2020年3月17日).
- 環境省新宿御苑管理事務所 (2010) Seed Conservation Project リーフレット. 2, 51, 55pp.
- 環境省自然環境局 (2009) 絶滅危惧植物種子の

- 収集・保存等に関するマニュアル. 51, 54pp.  
環境省自然環境局野生生物課 (2018) 絶滅のおそれのある野生生物 - レッドデータブック -. 233pp.  
環境省自然環境局野生生物課 (2018) 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改訂法の施行リーフレット. 松本正雄・大垣智昭・大川清 (1998) 園芸辞典. 178pp. 朝倉書店, 東京.  
森和夫(2002)雲南の植物. 51. トンボ出版, 大阪.  
日本植物培養学会・日本植物組織培養学会(1993) 組織培養辞典. 158, 190pp. 学会出版センター, 東京.  
農文協 (編) (2003) 花卉園芸大百科 15 ラン. 23-26. 農山漁村文化協会, 東京.  
小山田智彰 (2003) 地域希少植物 (アツモリソウ) の無菌播種. 植物バイテクの実際. 131-135. 農山漁村文化協会, 東京.  
小山田智彰・平塚明・間山秀信 (2008) アツモリソウの種子発芽による苗の育成に関する研究. 自然環境復元研究 4, 43-50.  
小山田智彰・平塚明・鞍懸重和 (2011) ロールペーパーとバーミキュライトを培地支持材量に用いた絶滅危惧植物アツモリソウの苗生産に関する研究. 園芸学研究 10 (3) : 315-320.  
小山田智彰・鞍懸重和・千葉文也・佐藤香菜・長谷川啓一・古澤輝雄 (2019) 生息域外保全を目的としたチョウセンキバナアツモリソウの苗生産. 自然環境復元学会全国大会研究発表・講演要旨集, 25-28.  
小山田智彰・鞍懸重和 (2020) チョウセンキバナアツモリソウの自生地と栽培地の土壌分析. 自然環境復元学会全国大会研究発表・講演要旨集, 33-36.  
小山田智彰・鞍懸重和・高柳茂暢・吉田馨 (2021) 生息域内保全を目的にしたアツモリソウ野生株の移植と保全措置の有効性. 自然環境復元研究 12, 3-16.  
自然環境研究センター (編) (2011) 絶滅する前にできること. <http://www.env.go.jp/content/900491893.pdf> (参照: 2023年9月21日).  
佐々木揚 (2000) 日射量積算値による播種適期判定を利用したチョウセンキバナアツモリソウ (*Cypripedium guttatum*) の未熟種子培養. 植物工場学会誌 12 (4) : 268-274.  
Shefferson, R. P., Weiß, M. Kull, T. & Taylor, D. L. (2005) High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Molecular Ecology* 14 : 613-626.  
清水建美 (2001) 植物用語辞典. 267pp. 八坂書房, 東京.  
高橋英樹 (2009) 日本産アツモリソウ属 *Cypripedium* (ラン科) の地理分布パターン. 分類 9 (2) : 143-157.  
富山昌克 (2000) ラン科植物のクローン増殖. 345pp. トンボ出版, 大阪.  
Zeng S., Zhang Y., Teixeira da Silva J.A., Wu K., Zhang J., Duan J. (2014) Seed biology and in vitro seed germination of *Cypripedium*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 34 (4) : 358-371.

受付日: 2023年 2月 13日

受理日: 2023年 12月 2日



## Molecular evolutionary analyses of the fusion protein gene in human respirovirus 1

Tomoko Takahashi<sup>a</sup>, Mao Akagawa<sup>b</sup>, Ryusuke Kimura<sup>c,d</sup>, Mitsuru Sada<sup>b,c</sup>, Tatsuya Shirai<sup>c</sup>, Kaori Okayama<sup>b</sup>, Yuriko Hayashi<sup>b</sup>, Mayumi Kondo<sup>e</sup>, Makoto Takeda<sup>f</sup>, Akihide Ryo<sup>g</sup>, Hirokazu Kimura<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Iwate Prefectural Research Institute for Environmental Science and Public Health, Morioka-shi, Iwate 020-0857, Japan

<sup>b</sup> Department of Health Science, Gunma Paz University Graduate School of Health Sciences, Takasaki-shi, Gunma 370-0006, Japan

<sup>c</sup> Advanced Medical Science Research Center, Gunma Paz University Research Institute, Shibukawa-shi, Gunma 377-0008, Japan

<sup>d</sup> Department of Bacteriology, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi-shi, Gunma 371-8514, Japan

<sup>e</sup> Department of Clinical Engineering, Faculty of Medical Technology, Gunma Paz University, Takasaki-shi, Gunma 370-0006, Japan

<sup>f</sup> Department of Microbiology, Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>g</sup> Department of Microbiology, Yokohama City University School of Medicine, Yokohama-shi, Kanagawa 236-0004, Japan

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Human respirovirus 1  
Molecular evolutionary analyses  
Fusion protein gene  
B cell conformational epitope

### ABSTRACT

Few evolutionary studies of the human respiratory virus (HRV) have been conducted, but most of them have focused on HRV3. In this study, the full-length *fusion* (*F*) genes in HRV1 strains collected from various countries were subjected to time-scaled phylogenetic, genome population size, and selective pressure analyses. Antigenicity analysis was performed on the F protein. The time-scaled phylogenetic tree using the Bayesian Markov Chain Monte Carlo method estimated that the common ancestor of the HRV1 *F* gene diverged in 1957 and eventually formed three lineages. Phylodynamic analyses showed that the genome population size of the *F* gene has doubled over approximately 80 years. Phylogenetic distances between the strains were short (< 0.02). No positive selection sites were detected for the F protein, whereas many negative selection sites were identified. Almost all conformational epitopes of the F protein, except one in each monomer, did not correspond to the neutralising antibody (NT-Ab) binding sites. These results suggest that the HRV1 *F* gene has constantly evolved over many years, infecting humans, while the gene may be relatively conserved. Mismatches between computationally predicted epitopes and NT-Ab binding sites may be partially responsible for HRV1 reinfection and other viruses such as HRV3 and respiratory syncytial virus.

### 1. Introduction

Human respirovirus 1 (formerly called human parainfluenza virus 1, HRV1) is an RNA virus that belongs to the genus Respirovirus of the family Paramyxoviridae. HRV1 is a causative agent of acute respiratory diseases, such as common colds, acute laryngotracheobronchitis (croup), bronchiolitis, and pneumonia, and is distributed world-wide as the most prevalent type of the former human parainfluenza virus as well

as HRV3 (Henrickson, 2003; Karron, 2007). Epidemiological studies showed that HRV is a causative agent for croup in children under five years of age, among which approximately 26–74% experience HRV1 infection (Denny et al., 1983). HRV1 reinfection and HRV3 may occur throughout life; however, the reinfection mechanisms are not exactly known (Henrickson, 2003).

The HRV1 genome encodes six genes that are translated into seven proteins (Karron, 2007). Among these, fusion protein (F protein) and

**Abbreviations:** HRV, Human respirovirus; F protein, fusion protein; HN, haemagglutinin-neuraminidase; NT-Ab, neutralising antibodies; RSV, respiratory syncytial virus; *F* gene, *fusion* gene; BMCMC, Bayesian Markov chain Monte Carlo; ESS, effective sample sizes; HPDs, highest posterior densities; ML, marginal likelihood; BSPs, Bayesian skyline plots; *dN*, non-synonymous substitution rates; *dS*, synonymous substitution rates; SLAC, single-likelihood ancestor counting; FEL, fixed effects likelihood; IFEL, internal fixed-effects likelihood; FUBAR, fast unconstrained Bayesian approximation; MEME, mixed-effects model of evolution; 3D, three-dimensional; BRV, bovine respiratory virus.

\* Corresponding author at: Department of Health Science, Gunma Paz University Graduate School of Health Sciences, Takasaki-shi.

E-mail address: [kimhiro@nih.go.jp](mailto:kimhiro@nih.go.jp) (H. Kimura).

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199142>

Received 22 January 2023; Received in revised form 26 April 2023; Accepted 31 May 2023

0168-1702/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

haemagglutinin-neuraminidase (HN) proteins are the major viral antigens (Karron, 2007). In particular, the F protein consists of a homotrimer and may be associated with infection of airway epithelial cells in the host (Karron, 2007). Moreover, the existence of two conformations of the F protein, prefusion and postfusion, have been confirmed (Yin et al., 2006). However, detailed F protein structure is not well understood (Shao et al., 2021).

Antibody responses are central to acquired immunity against viral infections. Epitopes are classified into two categories: conformational and linear epitopes (Van Regenmortel, 2001). Linear epitopes are continuous amino acid sequences of the primary antigen structure. Conformational epitopes are composed of discontinuous residues that are in proximity on the protein three-dimensional (3D) structure. Both epitopes are recognised by the immune system, triggering the production of antibodies (Sharon et al., 2014; Collins and Karron, 2013; Van Regenmortel, 2001). A previous report showed that over 90% of B cell epitopes are conformational, and only a few are linear (Van Regenmortel, 2001). In contrast, due to an explicit distinction between antigenicity and immunogenicity, these epitopes in antigenic proteins may not be adequately recognised by a neutralising antibody (NT-Ab) (Sharon et al., 2014; Collins and Karron, 2013). Our previous data suggested that the computationally predicted conformational epitopes in the respiratory syncytial virus (RSV) and HRV F proteins do not correspond to the NT-Ab binding sites of these proteins (Aso et al., 2020; Saito et al., 2021). However, to the best of our knowledge, the relationship between conformational and linear epitopes and the NT-Ab binding sites of the HRV1 F protein is not known. Moreover, the detailed phylogeny of the viral *fusion* (*F*) gene is unknown. Therefore, detailed molecular evolutionary analyses of the HRV1 *F* gene were performed in strains collected globally, using bioinformatic technologies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains used in this study

To better understand the molecular evolution of the HRV1 *F* gene, nucleotide sequences, including the full-length coding region of the gene (positions 5060–6727; 1668 nt for the hPIV1/USA/ATCC VR-94/1957 strain; GenBank accession No. JQ901971) was retrieved from GenBank on 11 June 2019. Among these, sequences from strains with confirmed information on the detected/isolated years and regions were selected. In addition, data of strains that displayed ambiguity with undermined sequences (e.g., N, Y, R, and V) were omitted from the dataset, providing data from 71 strains for the analysis. Homologous sequences were identified using Clustal Omega (Sievers and Higgins, 2021). When three or more similar sequences were present, only two among them were randomly retained, which reduced the final sequence set to those from 66 strains.

Temporal signal analysis of the sequences from 66 HRV1 strains was performed to determine whether the dataset was suitable for molecular clock analysis. Maximum likelihood method was used to generate a phylogenetic tree using molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 (MEGA 7; for bigger datasets) software. The data were analysed using TempEst software (version 1.5.3) (Rambaut et al., 2016).

All data are presented in Supplementary Table S1. These sequences were aligned using MAFFT version 7 (Katoh and Standley, 2013) and subsequently trimmed to 1668 nt based on the prototype *F* gene sequences.

### 2.2. Time-Scaled phylogenetic analysis and phylodynamic analyses using the bayesian markov chain monte carlo method (BMCMC)

To investigate the evolution of HRV1 strains, a time-scaled phylogenetic analysis of full-length sequences of the HRV1 *F* gene was conducted using the Bayesian Markov chain Monte Carlo (BMCMC) method

in BEAST (version 2.4.8) (Bouckaert et al., 2014). To select a suitable substitution model, jModelTest program (version 2.1.10) was used (Darriba et al., 2012). The path-sampling implemented in the BEAST package was used to determine the best of four clock models (strict clock, exponential relaxed clock, log-normal relaxed clock, and random local clock) and three prior tree models (coalescent constant population, coalescent exponential population, and coalescent Bayesian skyline). The TrN + I substitution model, log-normal of the relaxed clock model, and coalescent exponential from the tree prior model were used for BMCMC analysis of all strains. An BMCMC tree was constructed using BEAST software with the obtained strains and selected models. We analysed the MCMC chains for the 100,000,000 steps with sampling performed after every 2000 steps. To confirm convergence, the effective sample sizes (ESS) were evaluated using Tracer (version 1.6), and values above 200 were considered acceptable. After burn-in of the first 10% of the trees, a maximum clade credibility tree was generated using TreeAnnotator (version 2.4.8) in the BEAST package. The BMCMC phylogenetic tree was visualised using FigTree (version 1.4.03), and the 95% highest posterior densities (HPDs) of all internal nodes were computed. Moreover, strain clustering in the constructed phylogenetic tree of the HRV1 *F* gene followed the illustrated tree topology. Simultaneously, the evolutionary rates of the 66 HRV1 strains and strains of each lineage determined by the BMCMC phylogenetic tree were estimated using the BMCMC method, and the values were confirmed using the Tracer software. The marginal likelihood (ML) values for model selection and the detailed parameters of the BMCMC analyses are shown in Supplemental Tables S2 and S3. The statistics calculated by Tracer for each dataset are listed in Supplementary Tables S2–S6. Statistical analysis for comparing evolutionary rates between the lineages was performed using the Kruskal–Wallis test with the EZR software (Kanda, 2013). The evolutionary rates sampled every 2000 steps from the MCMC chains after discarding the 10% burn-in (45,001 samples) were used for statistical analysis. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . Past genome population dynamics of the HRV1 *F* gene were examined using Bayesian skyline plots (BSPs) in BEAST. A coalescent Bayesian skyline was selected as the prior tree model.

### 2.3. Phylogenetic distance calculation

The phylogenetic distances among all HRV1 strains were analysed to estimate *F* gene diversity. A phylogenetic tree of all HRV1 strains was constructed using the ML method with MEGA7 software (Kumar et al., 2016), and branch reliability was supported by 1000 bootstrap replications. The jModelTest program was used to select the best substitution model for the ML method. Subsequently, the phylogenetic distance of the ML tree was calculated using Patristic (Fourment and Gibbs, 2006).

### 2.4. Selective pressure analyses

The selective pressure sites for the F protein of HRV1 were analysed by calculating the non-synonymous ( $dN$ ) and synonymous ( $dS$ ) substitution rates at each amino acid site using the Datamonkey web server (<https://www.datamonkey.org/>) (Weaver et al., 2018). Single-likelihood ancestor counting (SLAC), fixed effects likelihood (FEL), internal fixed-effects likelihood (IFEL), fast unconstrained Bayesian approximation (FUBAR) (Murrell et al., 2013), and the mixed-effects model of evolution (MEME) (Murrell et al., 2012) were used to estimate positive selection sites, whereas, SLAC, FEL, IFEL, and FUBAR were used to predict negative selection sites. The positive ( $dN/dS > 1$ ) and negative ( $dN/dS < 1$ ) selection was determined based on the  $p$  values ( $p < 0.05$ ) for SLAC, FEL, IFEL, and MEME and on the posterior probability values ( $> 0.9$ ) for FUBAR.

### 2.5. Modelling of three-dimensional structure of the HRV1 F protein

Experimentally validated 3D structure of the HRV1 F protein is not

available. Hence, we employed a homology modelling method to construct trimeric structural models of the prefusion F protein of HRV1 for representative strains from each group, determined using the BMCMC phylogenetic tree (prototype, ATCC VR-94/USA/1957 strain, JQ901971; lineage 1, HPIV1/WI/629-008/1997 strain, JQ901978; lineage 2, HPIV1/WI/629-007/1997 strain, JQ901979; and lineage 3, HPIV1/USA/629-D02161/2009 strain, KF687308). The cryo-electron microscopy structure of HRV3 F protein (Protein Data Bank accession ID: 6MJZ) was selected as the template based on the results from BLAST web server (Shao et al., 2021). The amino acid sequences of each strain and template were aligned using MAFFT. The percentage sequence identity of each strain to the template was calculated using Clustal Omega. Based on the template sequence, 3D structures were constructed using Modeller software (version 10.2). The generated models were assessed by Ramachandran plot analyses using WinCoot implemented in the CCP4 package, and the models with the best scores were selected. Energy minimisation of the generated structures was performed using GROMOS96, which was implemented in Swiss PDB Viewer (version 4.1.0) (Guex and Peitsch, 1997).

## 2.6. Analyses of conformational and linear epitopes and amino acid substitution sites

To accurately analyse the pressure of human immune defence against the natural state of the HRV1 F protein, epitopes in the trimeric prefusion state were predicted. The conformational epitopes of the constructed models were analysed using Disco-Topo (version 2.0) (Kringelum et al., 2012), ElliPro (Ponomarenko et al., 2008), SEMA (Shashkova et al., 2022) and SEPPA (version 3.0) (Zhou et al., 2019) with cut-off values of  $-3.7$ ,  $0.5$ ,  $0.76$ , and  $0.064$ , respectively. The accuracy of the analyses was also supported by the consensus sites predicted by more than three of the four methods, and regions with residues close to two of the sites on the trimeric structure models were determined as conformational epitopes. Subsequently, the linear epitopes were analysed using LBtope (Singh et al., 2013) and BECEPS (Ras Carmona et al., 2021), BepiPred (version 2.0) (Galgonek et al., 2017) and ABCpred (Saha and Raghava, 2006). Cut-off values were set as 80%

(LBtope),  $0.5$  (BECEPS),  $0.5$  (BepiPred 2.0), and  $0.51$  (ABCpred), respectively.

Regions that had more than 10 continuous amino acids and were estimated in common by at least three of the four methods were regarded as linear epitopes. Finally, the predicted and previously identified epitopes were mapped onto the constructed, pre-fusion F protein models using PyMOL (version 2.3) (WL, 2002.).

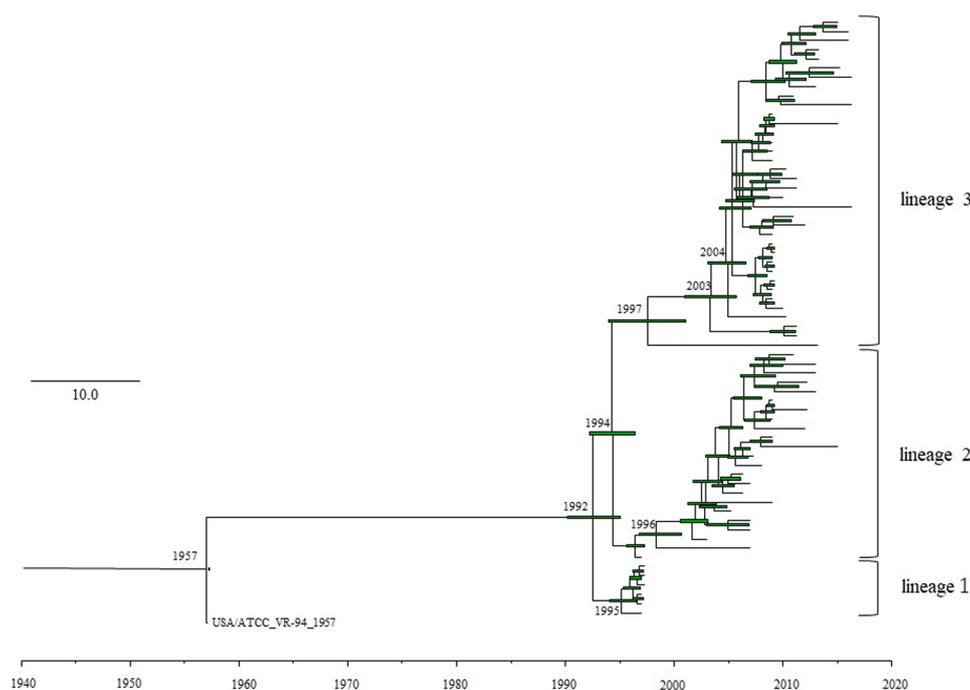
## 3. Results

### 3.1. Time-Scaled phylogenetic analysis and phylodynamic analysis of the HRV 1 F gene using the BMCMC method

To estimate the time-scaled evolution of the HRV1 F gene, a phylogenetic tree was constructed using the BMCMC method. In this study, we used only the sequences from HRV1 strains (66 strains) that were detected in humans, because sequence data from bovine respiratory virus (BRV) type 1, which may be a common ancestor of both BRV and HRV, were not available. Before constructing the BMCMC tree, the temporal signal of the dataset was estimated using TempEst (version 1.5.3). The plots of root-to-tip genetic distance against sampling time exhibited a positive correlation between genetic divergence and sampling time, and the R square value was calculated as  $0.87$  (Figure S1). These results suggest that the dataset of the 66 HRV1 strains was adequate for molecular clock analysis. Hence, we used this dataset to carry out the BMCMC method.

As shown in Fig. 1, a common ancestor of the HRV1 prototype strain (hPIV1/USA/ATCC\_VR-94\_1957; GenBank accession No. JQ901971) and other existing HRV1 strains diverged in 1957 (95% HPD, 1956–1957), resulting ultimately in the formation of three major lineages 1–3. After the first divergence in 1957, strains belonging to lineage 1 further diverged from a common ancestor of strains belonging to the three lineages in 1992 (95% HPD, 1989–1994), and the opposite side of lineage 1 diverged into lineages 2 and 3 in 1994 (95% HPD, 1991–1996). Currently, strains belonging to lineage 3 are widespread and form several clusters.

Next, the evolutionary rate of HRV1 F gene was estimated (Table 1).



**Fig. 1.** Time-scaled evolutionary tree of the full length Human respirovirus 1 (HRV1) fusion gene constructed by the Bayesian Markov chain Monte Carlo (BMCMC) method. The scale bar represents time (years). Green bars indicate the 95% highest posterior density (HPD) for each branch year.

**Table 1**  
Evolutionary rates of all HRV1 strains and each lineage.

	Evolutionary rates (95% HPD) (substitutions/site/year)	Effective sample size
All strains (66 strains)	$8.504 \times 10^{-4}$ ( $7.003 \times 10^{-4}$ to $1.0008 \times 10^{-3}$ )	220
Lineage 1 (6 strains)	–	–
Lineage 2 (23 strains)	$6.580 \times 10^{-4}$ ( $4.784 \times 10^{-4}$ to $8.4595 \times 10^{-4}$ )	4053
Lineage 3 (36 strains)	$1.205 \times 10^{-3}$ ( $7.159 \times 10^{-4}$ to $1.6866 \times 10^{-3}$ )	954

The evolutionary rate of all strains was estimated to be  $8.504 \times 10^{-4}$  substitutions/site/year (s/s/y) (95% HPD,  $7.003 \times 10^{-4}$  to  $1.0008 \times 10^{-3}$  s/s/y). The calculations for each of the above lineages showed that the evolutionary rate of strains belonging to lineage 2 was  $6.580 \times 10^{-4}$  s/s/y (95% HPD,  $4.784 \times 10^{-4}$  to  $8.4595 \times 10^{-4}$  s/s/y), and that of strains belonging to lineage 3 was  $1.205 \times 10^{-3}$  s/s/y (95% HPD,  $7.159 \times 10^{-4}$  to  $1.6866 \times 10^{-3}$  s/s/y). The evolutionary rate of the strains in lineage 1 with the same detection year (1997) was not calculated. The evolutionary rate of strains belonging to lineage 3 was significantly higher than that of strains belonging to lineage 2 ( $p < 2^{-16}$ ), which may indicate that strains belonging to lineage 3 are more adapted to humans, although the mechanisms underlying the significance of these values are not known.

### 3.2. Phylodynamics of the HRV1 F gene using the bayesian skyline plot (BSP) analysis method

As shown in Fig. 2, the phylodynamics of the F gene in HRV1 strains were analysed using the BSP analysis method to detect fluctuations in effective population size. The genome population size of all the strains doubled between 1995 and 2008 (Fig. 2A). Similarly, strains belonging to lineage 2 showed a two-fold increase in genome population around 2003 and 2008 (Fig. 2B). In contrast, in lineage 3, a steep increase in genome population size was observed, even though it occurred only once around 2008 (Fig. 2C). Because the detection year of the strains belonging to lineage 1 was the same (1997), we could not calculate the genome population size of this lineage. To summarise the results of these BSP analyses, the rapid increase in genome population size around 2008 for all strains was speculated to be mainly due to an increase in the genome population size of lineage 3.

### 3.3. Phylogenetic distances calculation of the HRV1 F gene

The phylogenetic distance and distribution between strains were evaluated based on their nucleotide sequences. A histogram of the distances between the sequence pairs of all the strains revealed a bimodal distribution (Fig. 3). Furthermore, histograms of lineages 1 and 2 showed bimodal distributions, although the apparent phylogenetic

distances of lineage 1 may not represent the phylogenetic distances of the actual lineage, owing to the small sample size (Fig. 3B and 3C). In contrast, the histogram of lineage 3 showed a unimodal pattern (Fig. 3D). The mean distance ( $\pm$  SD) between each pair of F gene sequence in the 66 HRV1 strains examined in this study was  $0.018575 \pm 0.01227$ . The results of the study showed that lineages 1, 2 and 3 had phylogenetic distances of  $0.0022 \pm 0.0012$ ,  $0.0073 \pm 0.0030$ , and  $0.0092 \pm 0.0058$ , respectively. Thus, the phylogenetic distance for each of the lineage was less than 0.02, suggesting conservation of the F gene sequence.

### 3.4. Homology modelling

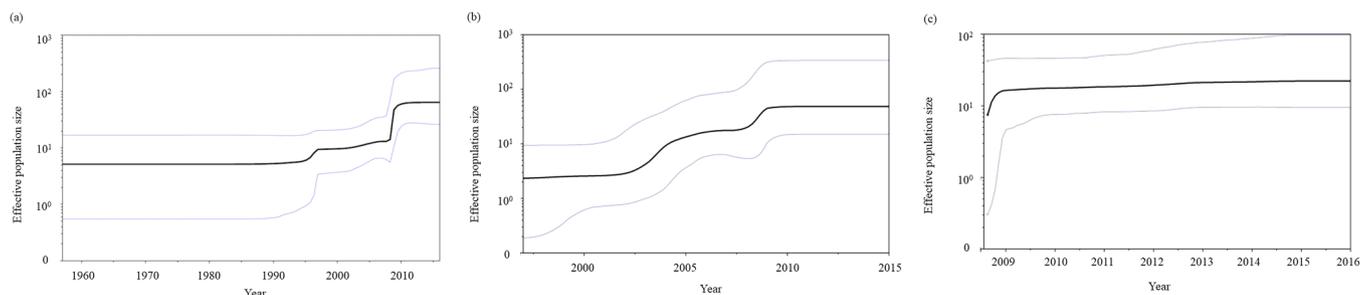
To visualise the relationship between NT-Ab binding sites and predicted B-cell conformational epitopes, we constructed the homotrimer (chains A, B, and C) of the HRV1 pre-fusion protein structure (Fig. 4). The amino acid sequence of the template covered amino acids 24–98 and 126–550 in each strain (Fig. 5). In this range, the amino acid residues on the protein surface were the same between representative strains of lineages 1–3. Moreover, from homologous analysis using Clustal Omega, the percentage sequence identity value of the prototype strain against the representative strains was high (96.8%). Hence, we presented the prototype structural model alone and showed the sites where amino acid substitutions occurred in representative strains from lineages 1 to 3 (Figs. 4 and 5). Both the prototype and lineage 1 representative strains had the same sequence identity (44.3%) as the template.

### 3.5. Selective pressure analyses of HRV1 F protein

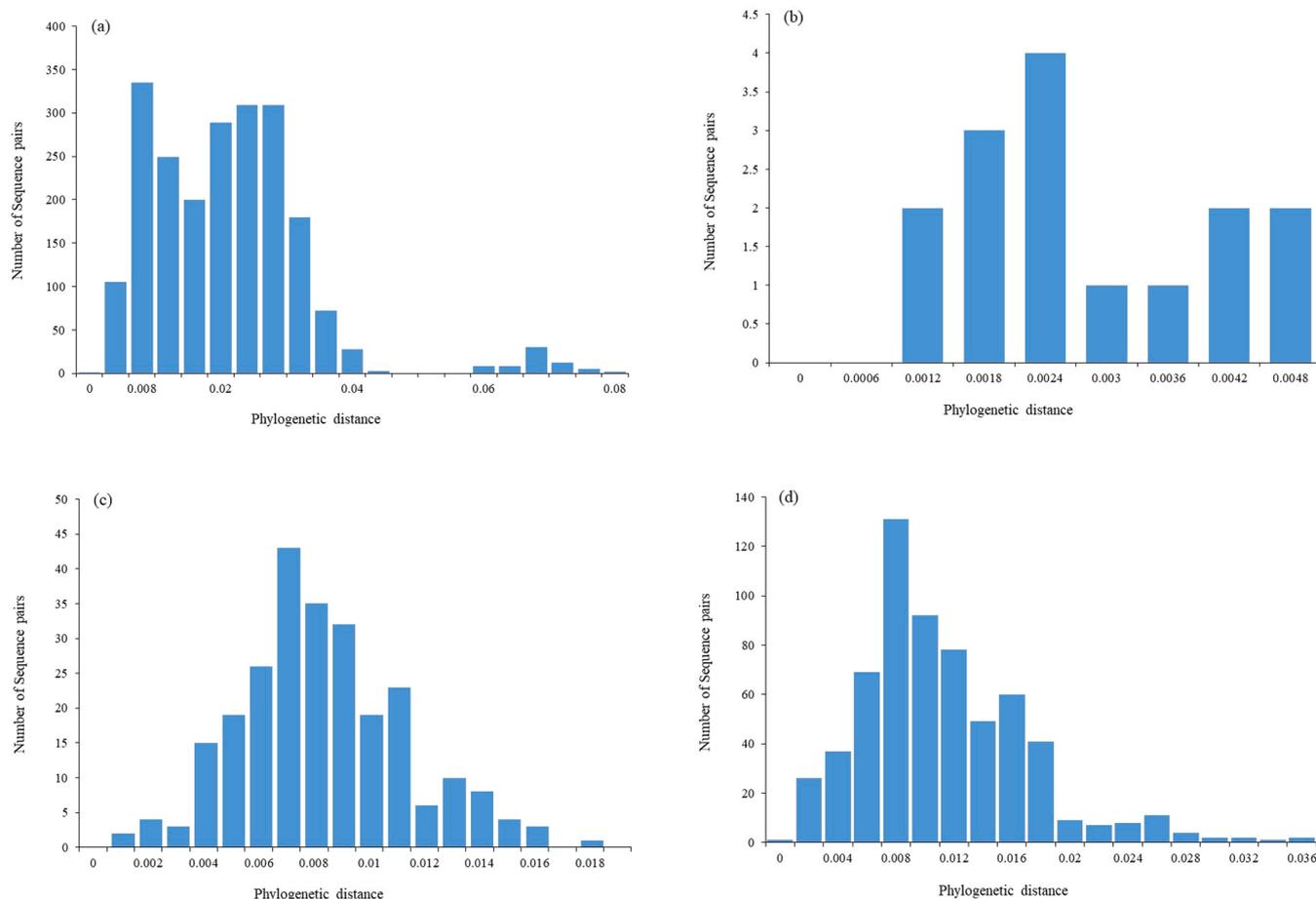
The rates of dS and dN substitutions were estimated using the DataMonkey web server to identify the positive and negative selection sites of F proteins in all 66 strains (Table S7). Only one method (FUBAR) predicted a positive selection site (amino acid residue 5), and the other four methods identified no positive selection sites. Thus, a positive selection site of the F protein is absent. In contrast, many negative selection sites were identified (Table S7). Among them, four negative selection sites (amino acids 150, 382, 460, and 473) were detected using all methods employed (Fig. 5).

### 3.6. Analyses of B-Cell epitopes and amino acid substitution sites

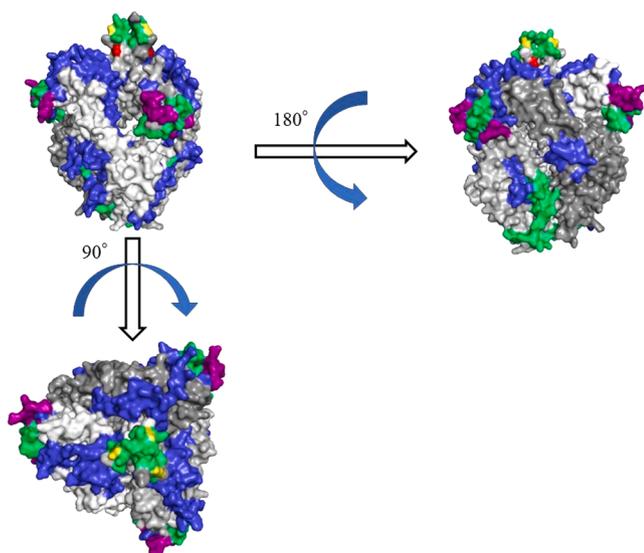
The amino acid substitution sites, NT-Ab binding sites, and predicted epitopes are shown in the HRV1 F chain A amino acid sequences and the trimeric structural model of the prototype (Figs. 4 and 5). First, the amino acid substitution sites in the F protein chain A among the prototype strain and the representative strains of lineages 1, 2, and 3 were compared. Seventeen amino acid substitutions were common in lineages 1, 2, and 3 (Fig. 5 and Table S8). An amino acid substitution unique to lineage 1 is present in Glu5Lys. Moreover, four amino acid residues



**Fig. 2.** Bayesian skyline plot for the Human respirovirus 1 (HRV1) fusion gene. Each panel illustrates the phylodynamics of all 66 strains (a), lineage 2 (b), and lineage 3 (c). Y and x-axes indicate the effective population size and time in years, respectively. Thick black lines show the median values over time; thin blue lines represent the 95% highest posterior density (HPD) intervals.



**Fig. 3.** Distribution of phylogenetic distances between the full-length sequences of the *fusion* gene of all Human respirovirus 1 (HRV1) strains. Each panel illustrates the histogram of all 66 strains (a), lineage 1 (b), lineage 2 (c), and lineage 3 (d). The y-axis and x-axis indicate the number of sequence pairs and phylogenetic distances, respectively.



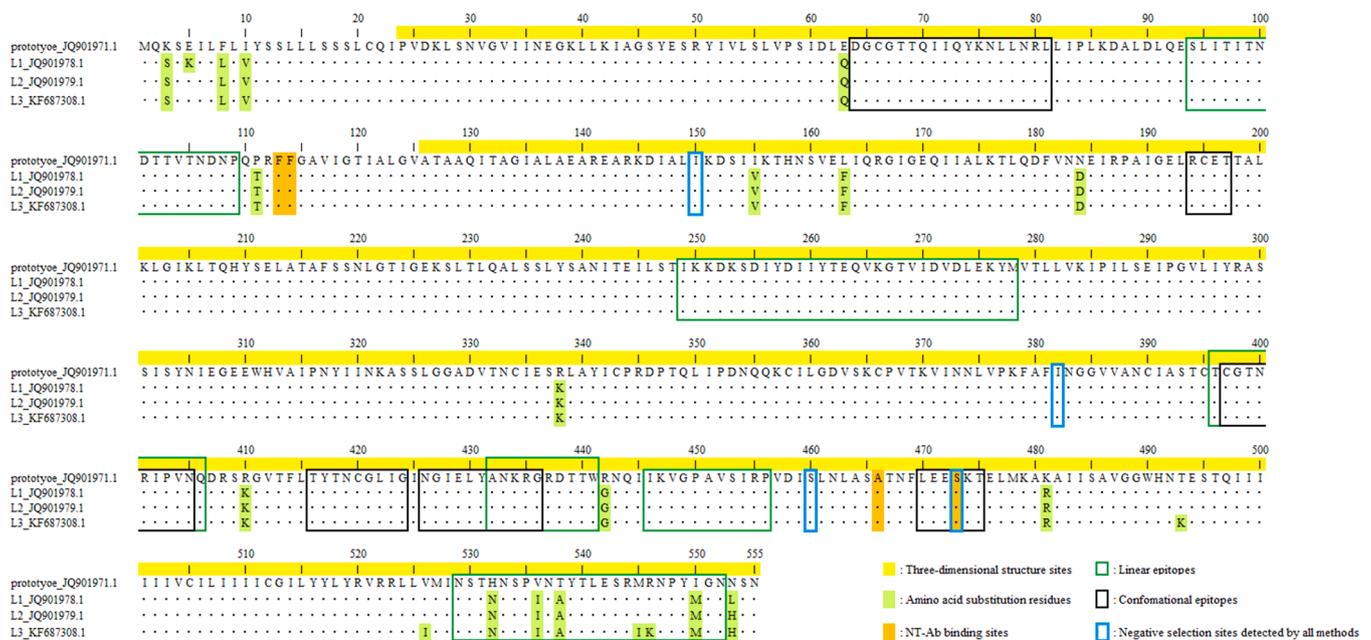
**Fig. 4.** Structural models of the prefusion protein of USA/1957 strain. Chains of the trimeric structures are given in white (chain A), light grey (chain B), and dark grey (chain C). The conformational and linear epitopes have been indicated in green and blue, respectively. Areas where the conformational and linear epitopes overlap are shown in purple. Experimentally identified epitopes (neutralising antibody binding sites) are indicated in red, and those overlapping with the conformational epitope are coloured yellow.

(Thr493Lys, Val526Thr, Met545Ile, and Arg546Lys) showed substitutions that were unique to lineage 3. However, some of the common substitution regions of these amino acid substitution sites are not located on the surface of the 3D structure. Similarly, uncommon substitution residues between lineages 1 and 3 were not present in the 3D structural model. Thus, only seven residues (Glu63Gln, Ile155Val, Leu163Phe, Asn184Asp, Arg338Lys, Arg410Lys, and Arg442Gly) of the common substitution regions in each lineage were located on the surface of the 3D structure model.

Next, conformational and linear B-cell epitopes on HRV1 F protein were analysed. Six conformational epitope sites and seven linear epitope sites were identified for the prototype HRV1 F protein chain A (18 conformational epitopes and 21 linear epitopes in the trimeric structure) (Figs. 4 and 5 and Table S9). No amino acid substitutions were found at these sites of strains in lineages 1, 2, or 3, whereas only one residue substitution (Glu63Gln) was found near one of the predicted conformational epitope sites (Fig. 5). Notably, in the HRV1 F protein chain A, five of the six conformational epitope sites and all the linear epitope sites failed to coincide with the experimentally determined NT-Ab binding sites, whereas only one residue of the conformational epitope (aa 473) coincided (Fig. 5). This mismatch may be a possible mechanism by which HRV1 can reinfect humans.

#### 4. Discussion

Evolutionary studies of HRV have been reported (Bose et al., 2019; Mao et al., 2012; Mizuta et al., 2014), but most of these focus on HRV3 (Mao et al., 2012; Mizuta et al., 2014). A few reports regarding the HRV1



**Fig. 5.** The Human respirovirus 1 (HRV1) fusion (F) protein chain A amino acid sequences investigated in this study. The amino acid residue numbers used for constructing HRV1 F protein three-dimensional (3D) structure are highlighted in yellow. The amino acid residues of neutralising antibodies (NT-Ab) binding sites and mutation are highlighted in orange and light green, respectively. The black and green line boxes in the sequences are the conformational epitope and linear epitope sites, respectively. Blue line boxes in the sequence indicate negative selection sites detected by all four methods (single-likelihood ancestor counting, fixed effects likelihood, internal fixed-effects likelihood, and fast unconstrained Bayesian approximation).

*F* gene have been published involving domestic or partial *F* gene analyses (Ambrose et al., 1995; Aso et al., 2020). To study the detailed molecular evolution of the full-length *F* gene in HRV1 strains from various countries, we performed time-scaled phylogenetic, genome population size, and selective pressure analyses on the gene, as well as antigenicity analysis of the F protein. From the time-scaled phylogenetic tree, constructed using the BMC MC method, it was estimated that the common ancestor of the HRV1 *F* gene diverged in 1957 and that their progenies continuously evolved and formed three lineages (lineages 1–3, Fig. 1). Strains belonging to lineage 3 predominate in various countries. Second, phylodynamic analyses using the BSP method showed that the genome population size of the *F* gene doubled over approximately 80 years. Third, phylogenetic distances among the strains were short ( $< 0.02$ ; Fig. 3). Finally, no positive selection sites were detected in the F protein, whereas many sites were identified as negative selection sites. Moreover, five sites of the six conformational epitopes and all linear epitopes in each chain of the F protein lacked correspondence to the NT-Ab binding sites (Figs. 4 and 5). These results suggest that despite the apparent conservation, the HRV1 *F* gene has evolved over many years. Yet, the conformational and linear epitopes did not correspond to the NT-Ab binding sites in either the pre or postfusion forms of the protein. This mismatch may be partially responsible for HRV1 reinfection and may extend to related viruses, such as HRV3 and RSV.

A phylogenetic analysis of HRV1 *F* gene was performed using the BMC MC method. It revealed that this gene continuously evolved and formed three lineages with many clusters (Fig. 1). Our previous report showed full-length F protein genes in HRV1 among patients with acute respiratory infections in Eastern Japan during 2011–2015 (Tsutsui et al., 2017). Phylogenetic analyses using the ML method showed that HRV1 strains formed three lineages and that the lineage 3 strains were dominant during the investigation period (2011–2015). This finding is consistent with the results of the present study. However, the time-scaled phylogeny of the HRV1 *F* gene was not assessed in the previous study (Tsutsui et al., 2017). Here, time-scaled phylogenetic analyses were done using the BMC MC method. As a result, the

divergence year of a common ancestor and each lineage was estimated (Fig. 1). Although the analysed gene was distinct, our previous report suggested that the HRV1 haemagglutinin-neuraminidase (HN) glycoprotein gene (full-length) isolated from Yamagata prefecture, in northern Japan, was classified into two lineages and formed many clusters using different phylogenetic analysis methods, including neighbour-joining and ML methods (Mizuta et al., 2011, 2014). Thus, to the best of our knowledge, the present study may be the first time-scaled phylogenetic analysis of the HRV1 *F* gene based on full-length sequences from globally collected strains. However, the present study has some limitations, including, the relatively small number of strains used. This is due to the paucity of studies on HRV1 molecular epidemiology. Another limitation is selection bias owing to the limited number of countries studying HRV1 and HRV3 (Aso et al., 2020).

The evolutionary rate of the HRV1 *F* gene has also been estimated. The mean evolutionary rate was  $8.504 \times 10^{-4}$  s/s/y. This is similar to the rates reported for the *F* genes of HRV3 and RSV (Aso et al., 2020). Furthermore, the evolutionary rate of HRV1 strains belonging to lineage 3 was found to be faster than that of lineage 2, whereas a previous evolutionary study on the HRV3 *F* gene did not find this difference (Aso et al., 2020). Moreover, these findings were not found for the RSV *F* gene, a virus belonging to a different genus and species (Saito et al., 2021). Thus, these findings were only observed for HRV1 *F* gene, which to the best of our knowledge, is the first report of lineage differences in evolutionary rate. In addition, the rapid evolutionary rate reflects short generation times and/or strong positive selection, which may generate a phenotype that is more adapted to the host (Collins and Karron, 2013). Together, the strains belonging to lineage 3 were more adaptive to humans and could become dominant strains, although our study did not address the mechanisms underlying the difference in the evolutionary rate.

The mean phylogenetic distance of the *F* gene HRV1 strains was approximately 0.02 (Fig. 3). This agrees with our previous study of Japanese strains, which reported a phylogenetic distance for the HRV1 *F* gene of 0.026 (Tsutsui et al., 2017). Moreover, the distribution of distances in our study was similar to that in previous reports on the HRV3 *F*

gene (Aso et al., 2020) as well as the HRV3 *HN* gene (Mao et al., 2012; Takahashi et al., 2018). These data suggest that the diversity of various viruses carrying the *F* gene may be similar and restricted within each species. With its high conservation and pivotal role in entry, the HRV1 *F* protein can be an attractive target for prophylaxis therapy, as it does for RSV *F* protein (Battles and McLellan, 2019).

Phylogenetic analyses of HRV1 *F* gene (Fig. 2) showed that the genome population of the gene has doubled over approximately 80 years. These fluctuations corresponded to the emergence of strains belonging to lineages 2 and 3 (Figs. 1 and 2). Our previous report showed that the genome population size of HRV3 *F* gene increased only once between 2000 and 2010 (Aso et al., 2020). Thus, genome fluctuations between HRV1 and 3 were different.

The selective pressure analyses of the HRV1 *F* gene did not reveal any positive selection sites for the present strains, whereas many negative selection sites were identified. In general, positive selection sites reflect escape from host defence mechanisms, such as cellular or humoral immunity (Barreiro and Quintana-Murci, 2010). Thus, HRV1 *F* protein may not be affected by such defence mechanisms. Conversely, negative selection sites may act to prevent deterioration of antigenicity (Holmes, 2013; Loewe, 2008). These findings may reflect the essential role the HRV1 *F* protein plays in host cell infection. Similar findings have been reported for the HRV3 *F* protein (Henrickson, 2003; Tsutsui et al., 2017). The negative selection sites of the HRV1 *F* protein were clustered near predicted epitopes, based on the 3D structural modelling. This indicates that these sites play important roles, for example, in the cellular receptor binding domain.

Finally, we analysed the amino acid substitutions and conformational and linear epitopes in the HRV1 *F* protein and evaluated their relationship with the NT-Ab binding sites (Figs. 4 and 5). Notably, amino acid substitutions were not estimated for computationally predicted epitopes or NT-Ab binding sites. Furthermore, almost all experimentally determined NT-Ab binding sites were incompatible with the computationally estimated conformational epitopes and linear epitopes. Antibody responses play a pivotal role in virus neutralisation or elimination, and antigenicity and immunogenicity differ explicitly (Collins and Karron, 2013). Conformational and linear epitopes may stimulate the production of antiviral antibodies (Lo et al., 2021; Sharon et al., 2014). In contrast, predicted epitope sites on antigenic proteins may not be adequately recognised by NT-Abs, which might mean that these predicted epitopes have weak potential for producing NT-Abs (Collins and Karron, 2013; Lo et al., 2021; Sharon et al., 2014). Thus, incompatibilities between NT-Ab binding sites and predicted epitopes may indicate low immunogenicity of the *F* protein and may be partially responsible for HRV1 reinfection, as has been reported for reinfections with HRV3 and RSV (Aso et al., 2020; Saito et al., 2021). However, the paucity of antigenic/antibody complex structures may lead to a mismatch between the NT-Ab binding sites and the predicted epitopes. Hence, the interpretation of the computationally conducted epitope analyses in this study may be limited, although conformational and linear epitopes were investigated using multiple computational methods for increased accuracy.

## 5. Conclusions

In this study, molecular evolutionary analyses of HRV1 *F* gene were performed based on full-length sequences collected globally. The time-scaled phylogenetic tree generated by the BMCME method estimated that the common ancestor of the HRV1 *F* gene diverged in 1957, and that their progenies have continuously evolved and formed three lineages. The phylogenetic analyses using the BSP method showed that the genome population size of the *F* gene doubled over approximately 80 years. The phylogenetic distances among the strains were short with no positive selection sites. Almost all conformational and linear epitopes in the *F* protein did not correspond to NT-Ab binding sites. These results showed that the HRV1 *F* gene has evolved over many years, although the

gene may be relatively conserved. Moreover, incompatibility between predicted epitopes and the NT-Ab binding sites in both the pre and postfusion forms of the protein may be responsible for HRV1 virus reinfection, as well as reinfections with HRV3 and RSV.

## Funding

This work was supported by a commissioned project for Research on Emerging and Reemerging Infectious Diseases from the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED; grant number JP23fk0108661).

## Data availability statement

The data sets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## CRediT authorship contribution statement

**Tomoko Takahashi:** Methodology, Data curation, Writing – original draft. **Mao Akagawa:** Methodology, Visualization. **Ryusuke Kimura:** Methodology, Visualization. **Mitsuru Sada:** Methodology, Writing – original draft, Visualization. **Tatsuya Shirai:** Writing – original draft. **Kaori Okayama:** Writing – original draft. **Yuriko Hayashi:** Writing – original draft. **Mayumi Kondo:** Methodology. **Makoto Takeda:** Writing – review & editing. **Akihito Ryo:** Writing – review & editing. **Hirokazu Kimura:** Conceptualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgments

We thank Ms. Miki Kawaji for the skilful support in figure preparation.

## Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.virusres.2023.199142](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199142).

## References

- Ambrose, M., Hetherington, S., Watson, A., Scroggs, R., Portner, A., 1995. Molecular evolution of the F glycoprotein of human parainfluenza virus type 1. *J. Infect. Diseases* 171 (4), 851–856.
- Aso, J., Kimura, H., Ishii, H., Saraya, T., Kurai, D., Matsushima, Y., Nagasawa, K., Ryo, A., Takizawa, H., 2020. Molecular evolution of the fusion protein (F) gene in human respirovirus 3. *Front. Microbiol.* 10, 3054.
- Barreiro, L.B., Quintana-Murci, L., 2010. From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defence genes. *Nat. Rev. Genet.* 11 (1), 17–30.
- Battles, M.B., McLellan, J.S., 2019. Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 233–245.
- Bose, M.E., Shrivastava, S., He, J., Nelson, M.I., Bera, J., Fedorova, N., Halpin, R., Town, C.D., Lorenzi, H.A., Amedeo, P., Gupta, N., Noyola, D.E., Videla, C., Kok, T., Buys, A., Venter, M., Vabret, A., Cordey, S., Henrickson, K.J., 2019. Sequencing and analysis of globally obtained human parainfluenza viruses 1 and 3 genomes. *PLoS ONE* 14 (7), e0220057.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.-H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A., Drummond, A.J., 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 10 (4), e1003537.
- Collins, P.L., Karron, R.A., 2013. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In: Knipe, D.M., Howley, P. (Eds.), *Fields Virology*, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1086–1123.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9 (8), 772–772.

- Denny, F.W., Murphy, T.F., Clyde Jr, W.A., Collier, A.M., Henderson, F.W., Senior, R., Sheaffer, C., Conley III, W., Christian, R., 1983. Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics* 71 (6), 871–876.
- Fourment, M., Gibbs, M.J., 2006. PATRISTIC: a program for calculating patristic distances and graphically comparing the components of genetic change. *BMC. Evol. Biol.* 6 (1), 1–5.
- Galgonek, J., Vymetal, J., Jakubec, D., Vondrášek, J., 2017. Amino Acid Interaction (INTAA) web server. *Nucl. Acids. Res.* 45 (W1), W388–W392.
- Guex, N., Peitsch, M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18 (15), 2714–2723.
- Henrickson, K.J., 2003. Parainfluenza viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (2), 242–264.
- Holmes, E.C., 2013. Virus evolution. In: Knipe, D.M., Howley, P. (Eds.), *Fields Virology*, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 286–313.
- Kanda, Y., 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transpl.* 48 (3), 452–458.
- Karron, R.A., 2007. Parainfluenza viruses. *Fields Virol.* 1497–1526.
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30 (4), 772–780.
- Kringelum, J.V., Lundegaard, C., Lund, O., Nielsen, M., 2012. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS. Comput. Biol.* 8 (12), e1002829.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33 (7), 1870–1874.
- Lo, Y.-T., Shih, T.-C., Pai, T.-W., Ho, L.-P., Wu, J.-L., Chou, H.-Y., 2021. Conformational epitope matching and prediction based on protein surface spiral features. *BMC. Genomics* 22 (Suppl.2), 116–116.
- Loewe, L., 2008. Negative Selection. *Nat. Educ.* 1 (1), 59.
- Mao, N., Ji, Y., Xie, Z., Wang, H., Wang, H., An, J., Zhang, X., Zhang, Y., Zhu, Z., Cui, A., Xu, S., Shen, K., Liu, C., Yang, W., Xu, W., 2012. Human parainfluenza virus-associated respiratory tract infection among children and genetic analysis of HPIV-3 strains in Beijing, China. *PLoS. ONE* 7 (8), e43893.
- Mizuta, K., Saitoh, M., Kobayashi, M., Tsukagoshi, H., Aoki, Y., Ikeda, T., Abiko, C., Katsushima, N., Itagaki, T., Noda, M., Kozawa, K., Ahiko, T., Kimura, H., 2011. Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. *Virol. J.* 8, 533–533.
- Mizuta, K., Tsukagoshi, H., Ikeda, T., Aoki, Y., Abiko, C., Itagaki, T., Nagano, M., Noda, M., Kimura, H., 2014. Molecular evolution of the haemagglutinin-neuraminidase gene in human parainfluenza virus type 3 isolates from children with acute respiratory illness in Yamagata prefecture. *Japan. J. Med. Microbiol* 63 (Pt 4), 570–577.
- Murrell, B., Moola, S., Mabona, A., Weighill, T., Sheward, D., Kosakovsky Pond, S.L., Scheffler, K., 2013. FUBAR: a fast, unconstrained bayesian approximation for inferring selection. *Mol. Biol. Evol.* 30 (5), 1196–1205.
- Murrell, B., Wertheim, J.O., Moola, S., Weighill, T., Scheffler, K., Kosakovsky Pond, S.L., 2012. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS. Genet.* 8 (7), e1002764.
- Ponomarenko, J., Bui, H.-H., Li, W., Füsseder, N., Bourne, P.E., Sette, A., Peters, B., 2008. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC. Bioinformatics* 9 (1), 1–8.
- Rambaut, A., Lam, T.T., Max Carvalho, L., Pybus, O.G., 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus. Evol.* 2 (1) vew007-vew007.
- Ras Carmona, A., Pelaez Prestel, H.F., Lafuente, E.M., Reche, P.A., 2021. BCEPS: a Web Server to Predict Linear B Cell Epitopes with Enhanced Immunogenicity and Cross-Reactivity. *Cells* 10 (10).
- Saha, S., Raghava, G.P.S., 2006. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins* 65 (1), 40–48.
- Saito, M., Tsukagoshi, H., Sada, M., Sunagawa, S., Shirai, T., Okayama, K., Sugai, T., Tsugawa, T., Hayashi, Y., Ryo, A., 2021. Detailed evolutionary analyses of the F gene in the respiratory syncytial virus subgroup A. *Viruses* 13 (12), 2525.
- Shao, N., Liu, B., Xiao, Y., Wang, X., Ren, L., Dong, J., Sun, L., Zhu, Y., Zhang, T., Yang, F., 2021. Genetic characteristics of human parainfluenza virus types 1–4 from patients with clinical respiratory tract infection in China. *Front. Microbiol.* 12.
- Sharon, J., Rynkiewicz, M.J., Lu, Z., Yang, C.Y., 2014. Discovery of protective B-cell epitopes for development of antimicrobial vaccines and antibody therapeutics. *Immunology* 142 (1), 1–23.
- Shashkova, T.I., Umerenkov, D., Salnikov, M., Strashnov, P.V., Konstantinova, A.V., Lebed, I., Shcherbinin, D.N., Asatryan, M.N., Kardymon, O.L., Ivanisenko, N.V., 2022. SEMA: antigen B-cell conformational epitope prediction using deep transfer learning. *bioRxiv*.
- Sievers, F., Higgins, D.G., 2021. The Clustal Omega Multiple Alignment Package. Vol. 2231. *Humana Press*, pp. 3–16.
- Singh, H., Ansari, H.R., Raghava, G.P.S., 2013. Improved method for linear B-cell epitope prediction using antigen's primary sequence. *PLoS. ONE* 8 (5) e62216-e62216.
- Takahashi, M., Nagasawa, K., Saito, K., Maisawa, S.-i., Fujita, K., Murakami, K., Kuroda, M., Ryo, A., Kimura, H., 2018. Detailed genetic analyses of the HN gene in human respirovirus 3 detected in children with acute respiratory illness in the Iwate Prefecture. *Japan. Infection, Genetics. and Evolution* 59, 155–162.
- Tsutsui, R., Tsukagoshi, H., Nagasawa, K., Takahashi, M., Matsushima, Y., Ryo, A., Kuroda, M., Takami, H., Kimura, H., 2017. Genetic analyses of the fusion protein genes in human parainfluenza virus types 1 and 3 among patients with acute respiratory infections in Eastern Japan from 2011 to 2015. *J. Med. Microbiol* 66 (2), 160–168.
- Van Regenmortel, M.H., 2001. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals* 29, 209–213.
- Weaver, S., Shank, S.D., Spielman, S.J., Li, M., Muse, S.V., Kosakovsky Pond, S.L., 2018. Datamonkey 2.0: a modern web application for characterizing selective and other evolutionary processes. *Mol. Biol. Evol.* 35 (3), 773–777.
- WL, D., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA.
- Yin, H.-S., Wen, X., Paterson, R.G., Lamb, R.A., Jardetzky, T.S., 2006. Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature* 439 (7072), 38–44.
- Zhou, C., Chen, Z., Zhang, L., Yan, D., Mao, T., Tang, K., Qiu, T., Cao, Z., 2019. SEPPA 3.0—enhanced spatial epitope prediction enabling glycoprotein antigens. *Nucleic. Acids. Res.* 47 (W1), W388–W394.

## Article

# Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase (*RdRp*) Region and *VP1* Gene in Human Norovirus Genotypes GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6

Tomoko Takahashi <sup>1,2</sup>, Ryusuke Kimura <sup>3,4</sup>, Tatsuya Shirai <sup>3,5</sup>, Mitsuru Sada <sup>3,5</sup>, Toshiyuki Sugai <sup>6</sup> , Kosuke Murakami <sup>7</sup>, Kazuhiko Harada <sup>3</sup>, Kazuto Ito <sup>3</sup> , Yuki Matsushima <sup>8</sup>, Fuminori Mizukoshi <sup>9</sup>, Kaori Okayama <sup>1</sup>, Yuriko Hayashi <sup>1</sup>, Mayumi Kondo <sup>10</sup>, Tsutomu Kageyama <sup>11</sup>, Yoshiyuki Suzuki <sup>12</sup>, Haruyuki Ishii <sup>5</sup>, Akihideo Ryo <sup>13</sup>, Kazuhiko Katayama <sup>14</sup> , Kiyotaka Fujita <sup>1</sup> and Hirokazu Kimura <sup>1,3,10,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Health Science, Graduate School of Health Sciences, Gunma Paz University, Takasaki-shi, Gunma 370-0006, Japan; tomo-takahashi@pref.iwate.jp (T.T.); okayama@paz.ac.jp (K.O.); hayashi@paz.ac.jp (Y.H.); fujita@paz.ac.jp (K.F.)
- <sup>2</sup> Iwate Prefectural Research Institute for Environmental Science and Public Health, Morioka-shi, Iwate 020-0857, Japan
- <sup>3</sup> Advanced Medical Science Research Center, Gunma Paz University Research Institute, Shibukawa-shi, Gunma 377-0008, Japan; m2220015@gunma-u.ac.jp (R.K.); shirait28@gmail.com (T.S.); rainbow\_orchestra716@yahoo.co.jp (M.S.); k\_harada@bishinkai.or.jp (K.H.); kzito@gunma-u.ac.jp (K.I.)
- <sup>4</sup> Department of Bacteriology, Graduate School of Medicine, Gunma University, Maebashi-shi, Gunma 371-8514, Japan
- <sup>5</sup> Department of Respiratory Medicine, School of Medicine, Kyorin University, Mitaka-shi, Tokyo 181-8611, Japan; h141@ks.kyorin-u.ac.jp
- <sup>6</sup> Department of Nursing Science, Graduate School of Health Science, Hiroshima University, Hiroshima-shi, Hiroshima 734-8551, Japan; tsugai@hiroshima-u.ac.jp
- <sup>7</sup> Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan; ko-mura@niid.go.jp
- <sup>8</sup> Caliciviruses Section, Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA; yuki4649m780@gmail.com
- <sup>9</sup> Department of Microbiology, Tochigi Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Utsunomiya-shi, Tochigi 329-1196, Japan; mizukoshif01@pref.tochigi.lg.jp
- <sup>10</sup> Department of Clinical Engineering, Faculty of Medical Technology, Gunma Paz University, Takasaki-shi, Gunma 370-0006, Japan; kondo@paz.ac.jp
- <sup>11</sup> Center for Emergency Preparedness and Response, National Institute of Infectious Diseases, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan; tkage@niid.go.jp
- <sup>12</sup> Division of Biological Science, Department of Information and Basic Science, Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University, Nagoya-shi, Aichi 467-8501, Japan; yossuzuk@nsc.nagoya-cu.ac.jp
- <sup>13</sup> Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan; aryo@niid.go.jp
- <sup>14</sup> Laboratory of Viral Infection Control, Graduate School of Infection Control Sciences, Ōmura Satoshi Memorial Institute, Kitasato University, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan; katayama@lisci.kitasato-u.ac.jp
- \* Correspondence: kimhiro@nih.gov.jp; Tel.: +81-27-386-5648; Fax: +81-27-386-8594



**Citation:** Takahashi, T.; Kimura, R.; Shirai, T.; Sada, M.; Sugai, T.; Murakami, K.; Harada, K.; Ito, K.; Matsushima, Y.; Mizukoshi, F.; et al. Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase (*RdRp*) Region and *VP1* Gene in Human Norovirus Genotypes GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6. *Viruses* **2023**, *15*, 1497. <https://doi.org/10.3390/v15071497>

Academic Editor: Volker Lohmann

Received: 2 May 2023

Revised: 24 June 2023

Accepted: 29 June 2023

Published: 1 July 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** To understand the evolution of GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 strains, the prevalent human norovirus genotypes, we analysed both the *RdRp* region and *VP1* gene in globally collected strains using authentic bioinformatics technologies. A common ancestor of the P6- and P7-type *RdRp* region emerged approximately 50 years ago and a common ancestor of the P6- and P7-type *VP1* gene emerged approximately 110 years ago. Subsequently, the *RdRp* region and *VP1* gene evolved. Moreover, the evolutionary rates were significantly faster for the P6-type *RdRp* region and *VP1* gene than for the P7-type *RdRp* region and *VP1* genes. Large genetic divergence was observed in the P7-type *RdRp* region and *VP1* gene compared with the P6-type *RdRp* region and *VP1* gene. The phylodynamics of the *RdRp* region and *VP1* gene fluctuated after the year 2000. Positive selection sites in *VP1* proteins were located in the antigenicity-related protruding 2 domain, and these sites overlapped with conformational epitopes. These results suggest that the GII.6 *VP1* gene and *VP1* proteins evolved uniquely due to recombination between the P6- and P7-type *RdRp* regions in the HuNoV GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 virus strains.

**Keywords:** human norovirus; RNA-dependent RNA polymerase (*RdRp*) region; *VP1* gene; epitope mapping; molecular evolution

## 1. Introduction

Human norovirus (HuNoV) is a major causative agent of acute gastroenteritis in humans of all ages [1,2]. Previous epidemiological data suggest that HuNoV may be associated with 30–60% of patients with gastroenteritis [3–5]. Moreover, this agent has caused large outbreaks of food poisoning worldwide [6,7]. However, effective vaccines and antiviral agents are not available at present [7]. Therefore, this agent may be a public health concern [8].

The HuNoV genome is a single-stranded plus-sense RNA with an approximately 7.5 kb nucleotide sequence [9]. The genome contains three open reading frames (ORFs): ORF1, ORF2, and ORF3 [9]. ORF1 encodes six nonstructural proteins designated as nonstructural proteins (NS) 1/2–7 [9]. Of these, the NS7 region encodes the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) protein, while ORF2 and ORF3 encode structural proteins, such as viral protein (VP) 1 and VP2, respectively [7,9]. The VP1 protein acts as an antigen and also shows large antigenic variations [6], although it is not exactly known.

Previous genetic and molecular epidemiological studies have suggested that the HuNoV genome shows large genetic divergence [8]. Currently, HuNoV is classified into three genogroups: genogroup I (GI), genogroup II (GII), and genogroup IV (GIV), with many genotypes based on the genetic divergence of *VP1* [10]. Due to the relatively frequent recombination between ORF1 and ORF2 [11,12], dual nomenclatures such as GII.P6 (*RdRp* genotype)-GII.6 (*VP1* genotype) have been used, utilizing both the *RdRp* region and *VP1* gene for genotyping [10,13]. To date, 60 and 49 types of *RdRp* (P-types) and *VP1* genotypes have been identified, respectively [10]. Moreover, genogroups and genotypes may be associated with disease severity [14]. Furthermore, recombination between ORF1 and ORF2 has resulted in many chimeric viruses [12]. However, the role of these chimeric viruses remains unknown.

Molecular epidemiological data on HuNoV infections in humans suggest that certain GI and GII genotypes are prevalent [15]. These reports also show that GII HuNoV is more dominant than GI HuNoV [15]. Of these, some GII genotypes corresponding to *VP1* genotypes, such as GII.2, GII.3, GII.4, GII.6, and GII.17, are prevalent types [16–19]. However, these epidemiological data may not explain the reasons for the HuNoV epidemics.

Recently, authentic bioinformatic technologies have been used in population genetics, including the study of the evolution of various viruses [20]. Indeed, these methods may allow us to estimate the phylogeny, genome population, and antigenicity using three-dimensional antigen structures. Information that reflects viral evolution may contribute to a better response to these questions. We studied the molecular evolution of chimeric HuNoV, such as GII.P17-GII.17, GII.P2-GII.2, and GII.P16-GII.2, which have caused major outbreaks in many countries [21–23]. However, such studies have not been performed on other GII genotypes to better understand GII HuNoV. In norovirus infections, GII.4 is the predominant genotype worldwide. However, recombinant GII.6 strains have been circulating since the 1970s, with outbreaks reported in Japan in 2008–2009 and in the United States and Italy in 2014–2015, with an overall prevalence second only to GII.4 [18,24,25]. Although this genotype has been reported to play an important epidemiological role in norovirus outbreaks, the molecular epidemiological mechanism underlying these outbreaks has not been studied in detail. Moreover, GII.6 almost always displays P6- or P7-type *RdRp* genotypes [26]. Therefore, in this study, we performed a comprehensive molecular analysis of globally collected HuNoV GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 strains.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Strains Used in This Study

To analyse the molecular evolution of HuNoV GII.6, the complete genome sequences of HuNoV were downloaded from GenBank (last accessed on 28 December 2022). In total, 11,810 strains were collected. They were classified into genotypes using the Norovirus Typing Tool (Ver.2.0), and GII.6 strains were selected [10]. HuNoV GII.6 data collected from each local government public health institution were added to the dataset because the number of GII.6 strains available for analysis, especially GII.P6-GII.6 strains, was small. Strains with an uncertain sequence or an unclear year of collection or area were excluded. Finally, 141 strains belonging to GII.6 remained and were used to analyse the molecular evolution of VP1. Similarly, 141 strains belonging to HuNoV GII.6 were obtained and used to analyse the molecular evolution of *RdRp* region. Details of the strains used in this study are presented in Supplementary Table S1.

### 2.2. Time-Scaled Phylogenetic Analyses

To evaluate the molecular evolution of the present strains, phylogenetic trees of the HuNoV *RdRp* region (1530 bp, excluding the stop codon) and the *VP1* gene (1641–1650 bp, excluding the stop codon) were constructed using the Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) method in the BEAST package (v.2.6.7), as previously described [27,28]. First, the jModelTest2 program was used to determine the suitable substitution models [29]. Second, the path-sampling/stepping-stone sampling marginal likelihood estimation method was used to evaluate the best of the four clock models (strict clock, relaxed clock exponential, relaxed clock log normal, and random local clock) and the two prior tree models (coalescent constant population and coalescent exponential population). Although these were performed independently for *VP1* gene and *RdRp* region analyses, SYM-Γ-I, relaxed clock exponential, and coalescent exponential population were selected for the molecular evolutionary analysis of *VP1* gene. However, SYM-Γ, relaxed clock exponential, and coalescent exponential population were adopted for the molecular evolutionary analysis of *RdRp*. The lengths of the Bayesian MCMC chains and samples are listed in Table S2. Effective sample sizes (ESS) were calculated using Tracer and the convergence of all parameters was confirmed if the ESS was greater than 200. After a 10% burn-in, phylogenetic trees were generated using TreeAnnotator (v.2.6.7) and rendered using FigTree (v.1.4.0). Representative strains of each cluster were selected based on the most recent age of detection within the cluster. In addition, to compare the amino acid sequences of these representative strains, the GII.6 strain (AB039777) prototype was determined based on a previous report [10]. Molecular evolutionary rates were estimated using suitable models selected for each dataset, as described above. Statistical analyses were performed using the Kruskal–Wallis *t*-test for EZR [30].

### 2.3. Phylogenetic Distance Analyses

To calculate the phylogenetic distances among the strains, we used MEGA7 software [31]. The best substitution models were estimated using the jModelTest2 program. The phylogenetic distances between the present GII.6 strains were calculated from the pairwise maximum likelihood (ML) tree of the ML tree using the Patristic program [32].

### 2.4. Phylodynamic Analyses

To assess the phylodynamics of the GII.6 strains, the effective population sizes of the *RdRp* region and *VP1* gene were calculated using Bayesian skyline plot (BSP) analysis implemented in the BEAST package [27]. Similar to the Bayesian MCMC method, the best substitution and clock models were selected. A Bayesian skyline plot and the 95% highest probability density (HPD) were visualized using Tracer [33].

### 2.5. Selective Pressure Analyses

The non-synonymous ( $dN$ ) and synonymous ( $dS$ ) substitution rates at each amino acid site were calculated to identify the selective pressure sites for the *RdRp* region and *VP1* gene using the Datamonkey server (<https://www.datamonkey.org/> accessed on 8 October 2022) [34]. Five algorithms—single likelihood ancestor counting (SLAC), fixed-effects likelihood (FEL), internal fixed-effects likelihood (IFEL), the mixed-effects model of evolution (MEME) method, and the fast, unconstrained Bayesian approximation (FUBAR) method—were used to identify positively selected sites, and all of them except FUBAR were used to detect negatively selected sites. The significance level was set at  $p < 0.05$  for SLAC, FEL, IFEL, and MEME. Evidence of selective pressure for FUBAR was supported by a posterior probability  $> 0.9$ . In the positive selection analysis, sites common to more than four methods were regarded as positive selection sites, whereas in the negative selection analysis, sites common to more than three methods were considered negative selection sites.

### 2.6. Construction of the 3D Structure of *RdRp* and *VP1* Proteins

To compare the *VP1* and *RdRp* protein structures among genotypes, three-dimensional (3D) structural models of *VP1* and *RdRp* proteins were constructed for each genotype using homology modeling. First, 3D structural models of *VP1* in representative strains of each genotype (AB039777, LC122916, MH791993, MK956199, and JX989075) were generated using Protein Data Bank (PDB) ID: 6OTF as a template. Then, five models for each *VP1* genotype were generated using Modellar software (version 9.23) [35]. These models were evaluated by Ramachandran plot analysis using WinCoot implemented in the CCP4 package [36] and the best-scoring models were chosen. Finally, the energy of the selected models for each strain was minimized using GROMOS96 implemented in the Swiss PDB viewer (ver4.1.0) [37]. Using a similar procedure, the models of *RdRp* protein in each representative strain (AB039777, LC122916, LC760173, MK956199, and JX989075) (Table S1) were constructed using the crystal structure of *RdRp* (PDB ID:1SH0) as a template.

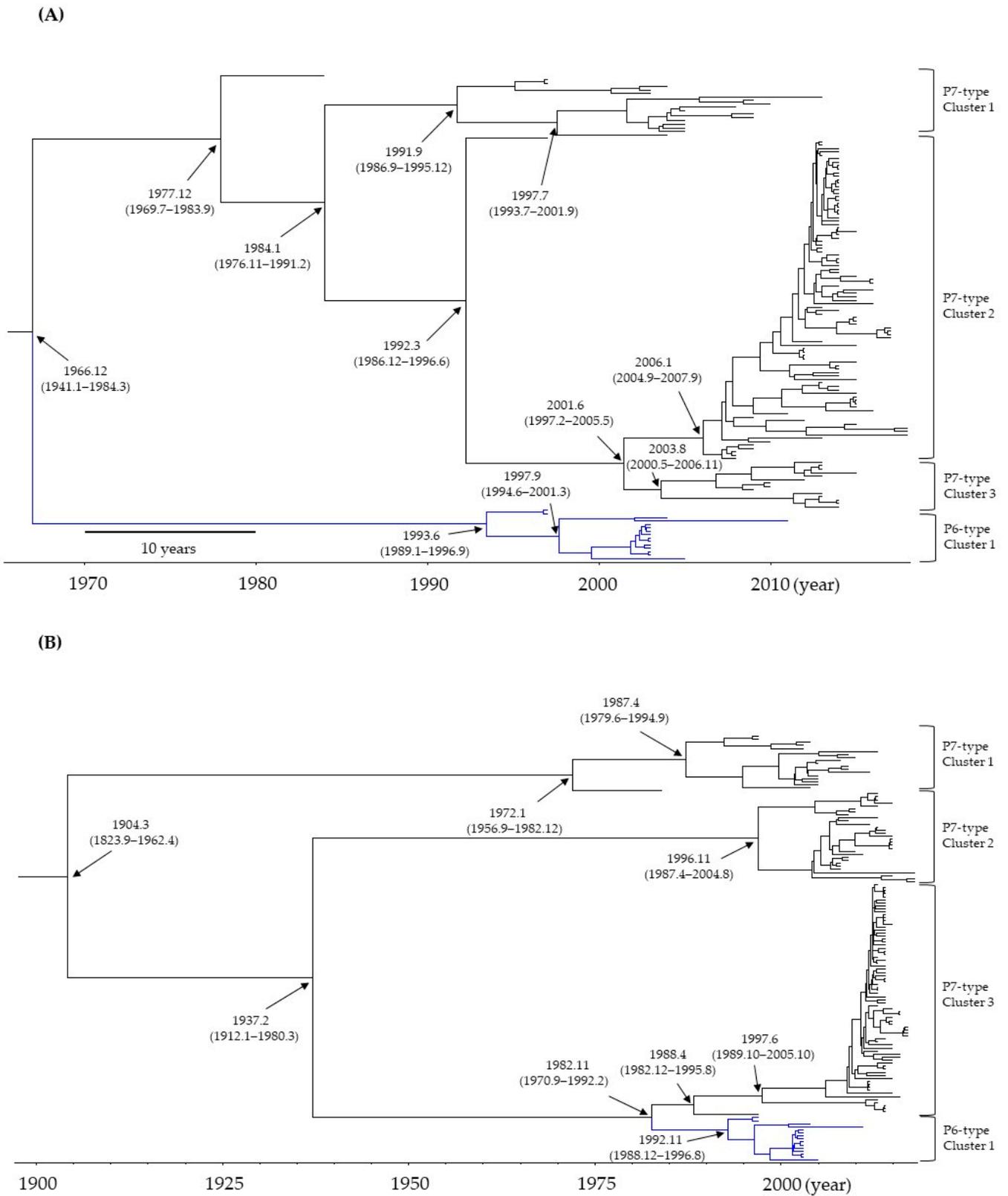
### 2.7. Conformational B-Cell Epitope Prediction

PDB files of the crystal structures of the GII.2 *VP1* protein (PDB ID:6OTF) and FASTA files of their amino acid sequences were downloaded from PDB (<https://pdj.org/?lang=ja> accessed on 30 August 2022) to use as templates in the homology modeling method. To assess the conformational B-cell epitopes of the constructed *VP1* protein models, four methods, DiscoTope 2.0 [38], ElliPro [39], SEMA [40], and SEPPA [41], were used, with cutoff values of  $-3.7$ ,  $0.5$ ,  $0.76$ , and  $0.064$ , respectively. Regions with amino acid sequences predicted by three or more of these methods and those contiguous with three or more residues were regarded as conformational epitopes. Furthermore, conformational epitopes were mapped onto the *VP1* protein models constructed above.

## 3. Results

### 3.1. Time-Scaled Phylogeny of the *RdRp* Region and *VP1* Gene in HuNoV GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6

Time-scale phylogenetic trees were constructed based on the full-length nucleotides of the *RdRp* region and *VP1* gene using the Bayesian MCMC method. First, as shown in Figure 1A, a common ancestor of the P6- and P7-type *RdRp* regions diverged around December 1966 (mean; 95% HPDs, January 1941–March 1984). Subsequently, the P6- or P7-type *RdRp* regions further diverged and formed clusters 1 and 3, respectively. The main divergence times are shown in Figure 1A. The results suggested that a common ancestor of the P6- and P7-type *RdRp* region diverged approximately 50 years ago and evolved.



**Figure 1.** Time-scaled phylogenetic tree of the (A) *RdRp* region and (B) *VP1* gene in GII.P6-GII.6 (15 strains) and GII.P7-GII.6 strains (126 strains) of the human norovirus (HuNoV) constructed using the Bayesian MCMC method. The divergence times with 95% highest probability densities (HPDs) are indicated on the phylogenetic tree.

Next, as shown in Figure 1B, a common ancestor of the GII.6 VP1 gene diverged around March 1904 (mean; 95% HPDs, September 1823–April 1962). Thereafter, the genes diverged to form four clusters. The main divergence times are shown in Figure 1B. Finally, the GII.6 strains with the P6-type formed only one cluster, while the GII.6 strains with the P7-type formed three independent clusters. Furthermore, this phylogenetic tree estimated that a common ancestor of the P6- and P7-type VP1 genes diverged around November 1982 (mean; 95% HPDs, September 1970–February 1992). Thus, this time may be estimated as a recombination event between the GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 genomes in the present strains.

### 3.2. Evolutionary Rates of the RdRp Region and VP1 Gene in HuNoV GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6

We also calculated the evolutionary rates using the Bayesian MCMC method. As shown in Table 1, the evolutionary rate was higher for GII.6 VP1 than the RdRp region, including P6- and P7-types (141 strains). The evolutionary rate was higher for the P6-type RdRp region than the P7-type RdRp. The evolutionary rate was higher for the P6-type GII.6 VP1 than the P7-type GII.6 VP1. These results suggest that the RdRp region and VP1 gene in the present strains evolved independently, and the evolutionary rates were significantly distinct.

**Table 1.** Evolutionary rates of the present GII.6 strains.

Region/Gene	Evolutionary Rates (95% HPDs) (Substitutions/Site/Year)	Compared Groups and Statistical Values
All RdRp region (141 strains) P6-type 15 strains; P7-type 126 strains	$3.287 \times 10^{-3}$ ( $2.489 \times 10^{-3}$ – $4.098 \times 10^{-3}$ )	All RdRp region vs.
All GII.6 VP1 gene (141 strains) P6-type 15 strains; P7-type 126 strains	$3.345 \times 10^{-3}$ ( $2.295 \times 10^{-3}$ – $4.419 \times 10^{-3}$ )	All GII.6 VP1 gene $p < 0.001$
P6-type RdRp region (15 strains)	$5.063 \times 10^{-3}$ ( $3.525 \times 10^{-3}$ – $6.595 \times 10^{-3}$ )	P6-type RdRp region vs.
P7-type RdRp region (126 strains)	$3.022 \times 10^{-3}$ ( $2.268 \times 10^{-3}$ – $3.775 \times 10^{-3}$ )	P7-type RdRp region $p < 0.001$
GII.P6-GII.6 VP1 gene (15 strains)	$3.725 \times 10^{-3}$ ( $1.843 \times 10^{-3}$ – $5.549 \times 10^{-3}$ )	GII.P6-GII.6 VP1 gene vs.
GII.P7-GII.6 VP1 gene (126 strains)	$3.482 \times 10^{-3}$ ( $2.419 \times 10^{-3}$ – $4.568 \times 10^{-3}$ )	GII. P7-GII.6 VP1 gene $p < 0.001$

### 3.3. Phylogenetic Distances among the Present Strains

To assess the genetic divergence of the RdRp region and VP1 gene in the present strains, we calculated their phylogenetic distances. The phylogenetic distances of the P6- and P7-type RdRp regions and the GII.6 VP1 gene were  $0.112 \pm 0.098$  (mean  $\pm$  1 standard deviation [SD]) and  $0.317 \pm 0.259$  (mean  $\pm$  1 SD). As shown in Figure 2A, the VP1 gene showed statistically greater genetic divergence than the RdRp region (unpaired *t*-test,  $p < 0.001$ ). Moreover, the genetic divergence was greater for the P7-type RdRp region than the P6-type RdRp region (unpaired *t*-test,  $p < 0.001$ ). The detailed statistical data are shown in Table 2.

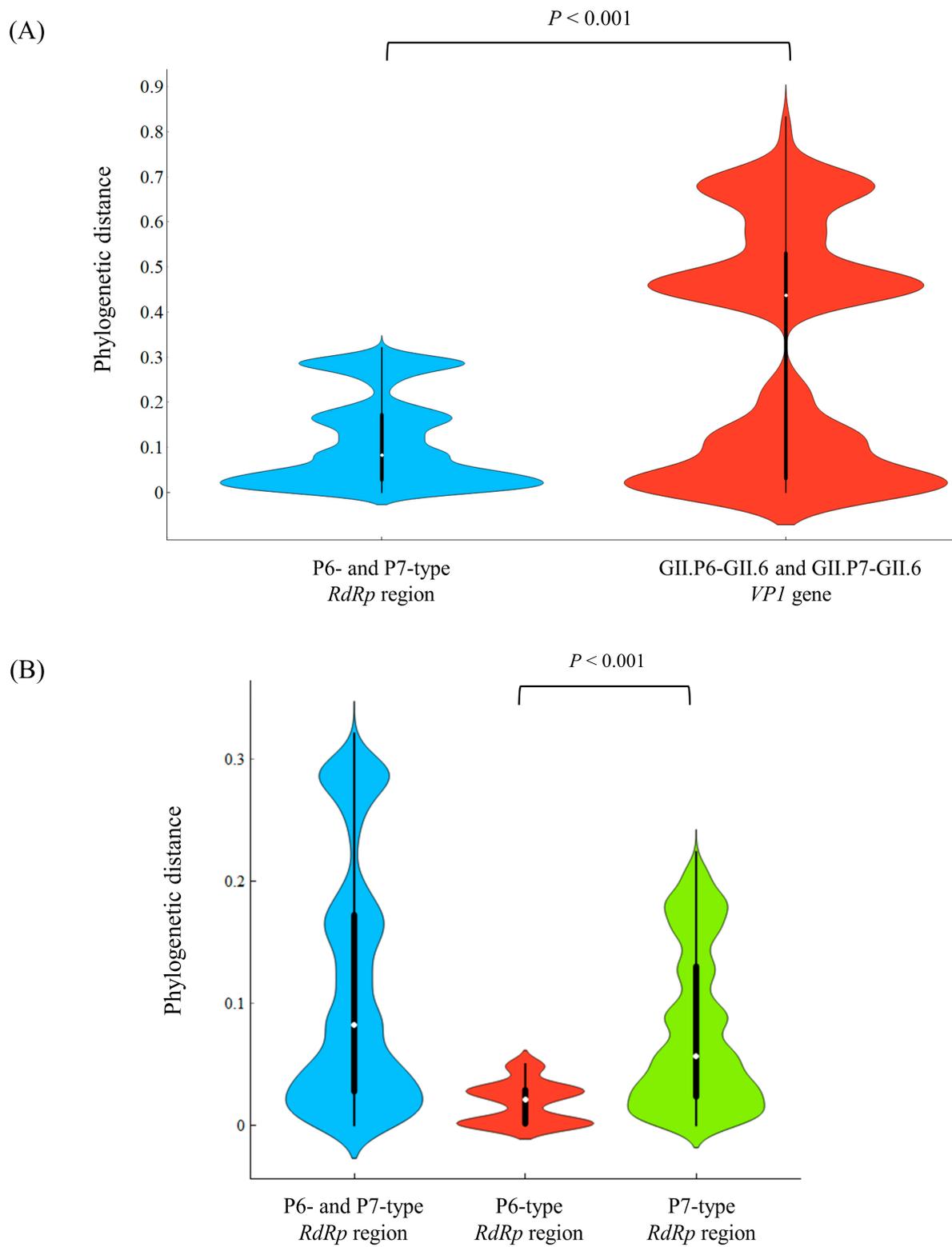
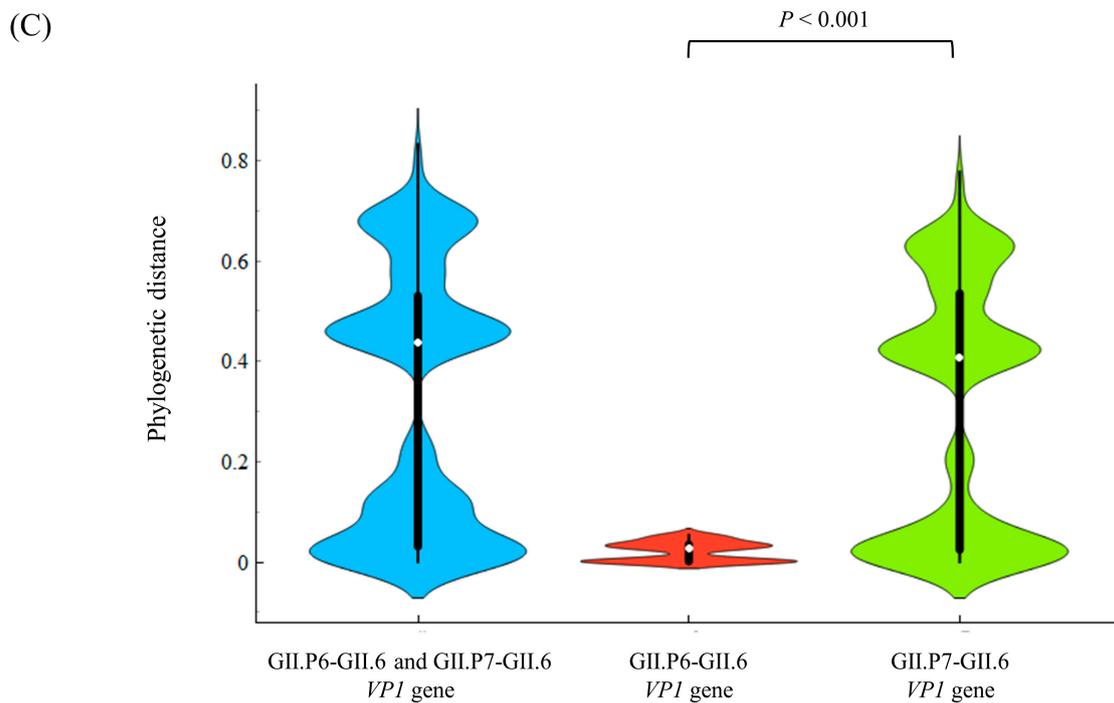


Figure 2. Cont.



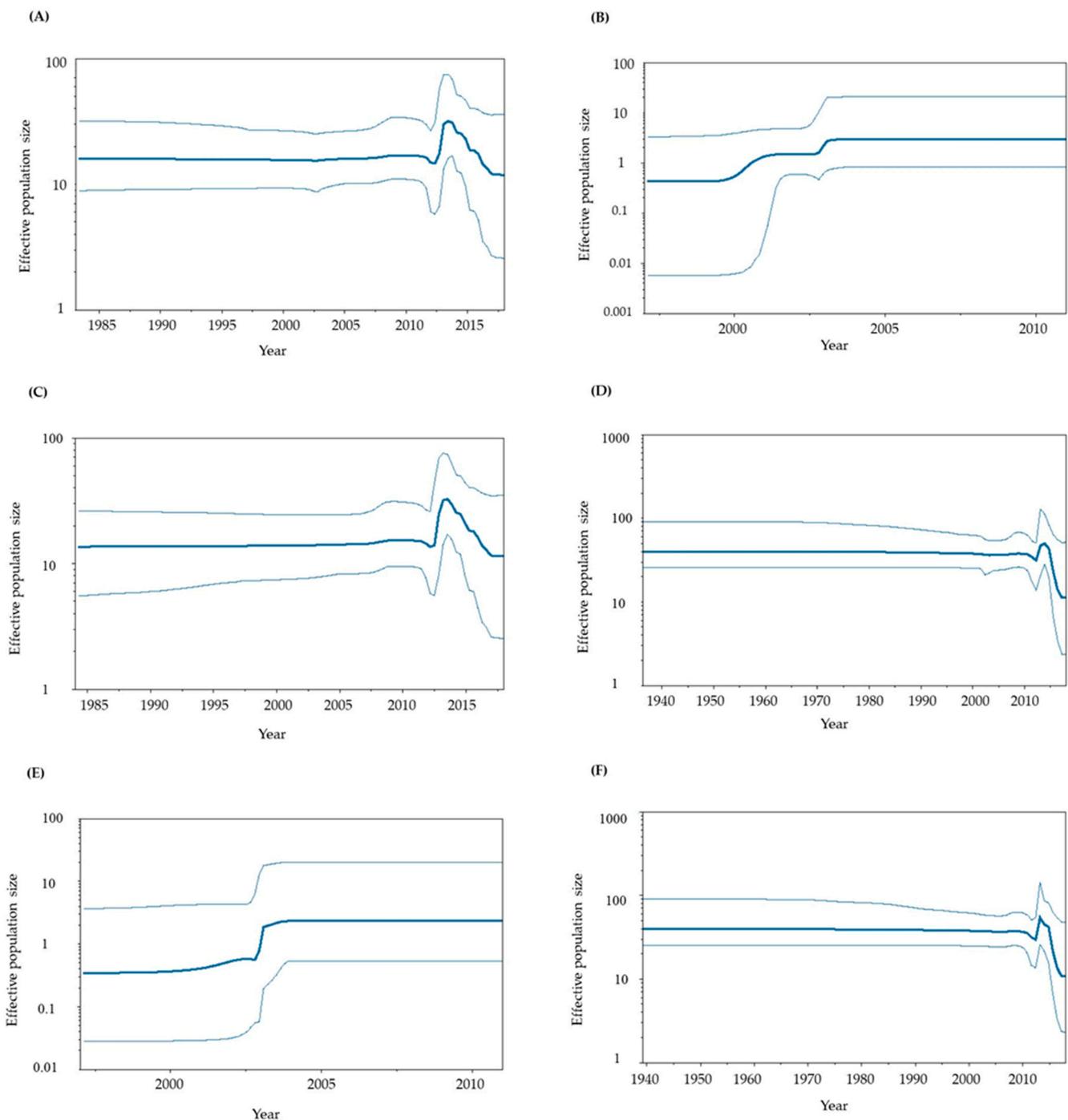
**Figure 2.** Phylogenetic distances of the (A) *RdRp* and *VP1* regions, (B) *RdRp* region, and (C) *VP1* gene in HuNoV GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6, represented as violin plots. The width of the violin represents kernel density, indicating the distribution shape of the data. The central thick black bar and thin black line show the interquartile range and all data intervals, respectively. The white dot represents the median.

**Table 2.** Phylogenetic distance of the present strains.

Region/Gene	Phylogenetic Distance (Mean $\pm$ SD)	Phylogenetic Distance (Median [IQR])
All <i>RdRp</i> region (141 strains)	0.112 $\pm$ 0.098	0.082 (0.028–0.172)
All GII.6 <i>VP1</i> gene (141 strains)	0.317 $\pm$ 0.259	0.437 (0.031–0.530)
P6-type <i>RdRp</i> region (15 strains)	0.018 $\pm$ 0.017	0.021 (0.001–0.029)
P7-type <i>RdRp</i> region (126 strains)	0.078 $\pm$ 0.064	0.057 (0.023–0.130)
GII.P6-GII.6 <i>VP1</i> gene (15 strains)	0.021 $\pm$ 0.019	0.027 (0.001–0.035)
GII.P7-GII.6 <i>VP1</i> gene (126 strains)	0.305 $\pm$ 0.249	0.408 (0.024–0.535)

### 3.4. Phylodynamics of GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6

To assess the phylodynamics of the present GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 strains, we calculated time-scaled genome population sizes using the BSP method (Figure 3A–F). Until approximately 2010, the genome population sizes of both the *RdRp* region and *VP1* gene remained constant. However, significant fluctuations in genome population sizes were observed at around 2010–2018.



**Figure 3.** Phylodynamics of the present HuNoV GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 strains determined using Bayesian skyline plot analysis. (A) Phylodynamics of the P6-type and P7-type *RdRp* regions; (B) P6-type *RdRp* region; (C) P7-type *RdRp* region; (D) P6- and P7-type *VP1* genes; (E) P6-type *VP1* gene alone; (F) P7-type *VP1* gene alone. The *y*-axis shows the effective population size for each distance, and the *x*-axis represents time (years). The thick line in the centre shows the median effective population sizes, and the thin lines at the top and bottom indicate the 95% HPDs.

### 3.5. Positive Selection Sites in the *RdRp* and *VP1* Proteins

We analysed the positive selection sites in the *RdRp* and *VP1* proteins to estimate selective pressure against the host. No positive selection site was detected in the *RdRp* protein. In contrast, a few positively selected sites were identified in *VP1*. Of these, only Lys386His was predicted in the P6-type *VP1* protein, whereas Pro354Thr, Pro354Ser, Pro354Gln,

Asn390Thr, and Asn390Asp were predicted in the P7-type VP1 protein. These sites were located in the protruding 2 (P2) domain of the protein (Table S4). These results suggest that the GII.P7-GII.6 strains may receive stronger selection pressure from the host than the GII.P6-GII.6 strains. Amino acid substitutions were also observed in sites other than the P2 domain, but no positive selection sites were identified.

### 3.6. Negative Selection Sites in RdRp and VP1 Proteins

In general, negative selection sites may prevent the deterioration of protein function. Therefore, we calculated the number of negative-selection sites in these strains. Many negative selection sites were estimated for the P7-type RdRp protein (205 sites) and P7-type VP1 protein (274 sites). However, a small number of negative selection sites were estimated in the P6-type RdRp protein (3 sites) and P6-type VP1 protein (8 sites) (Table 3). A few irregularly positioned negative selection sites in the P6-type RdRp and VP1 proteins were identified. Details of these negative selection sites are shown in Supplementary Table S3A,B. In both the RdRp and VP1 proteins, amino acid variations in the negative selection sites were often located in non-overlapping positions.

### 3.7. 3D Mapping Relationships between Amino Acid Substitutions and Active Sites of the RdRp Dimer Proteins

To better assess the relationships between amino acid substitutions and the active sites of RdRp proteins, we constructed 3D RdRp dimers and mapped them. Within RdRp, there were few amino acid substitutions in both the P6 and P7 types, but none were observed in the RdRp active sites (aa182, aa242, aa243, aa300, aa309, aa343, and aa344) (Figure 4A–E).

#### (A) Prototype: P7-type RdRp Protein (AB039777)

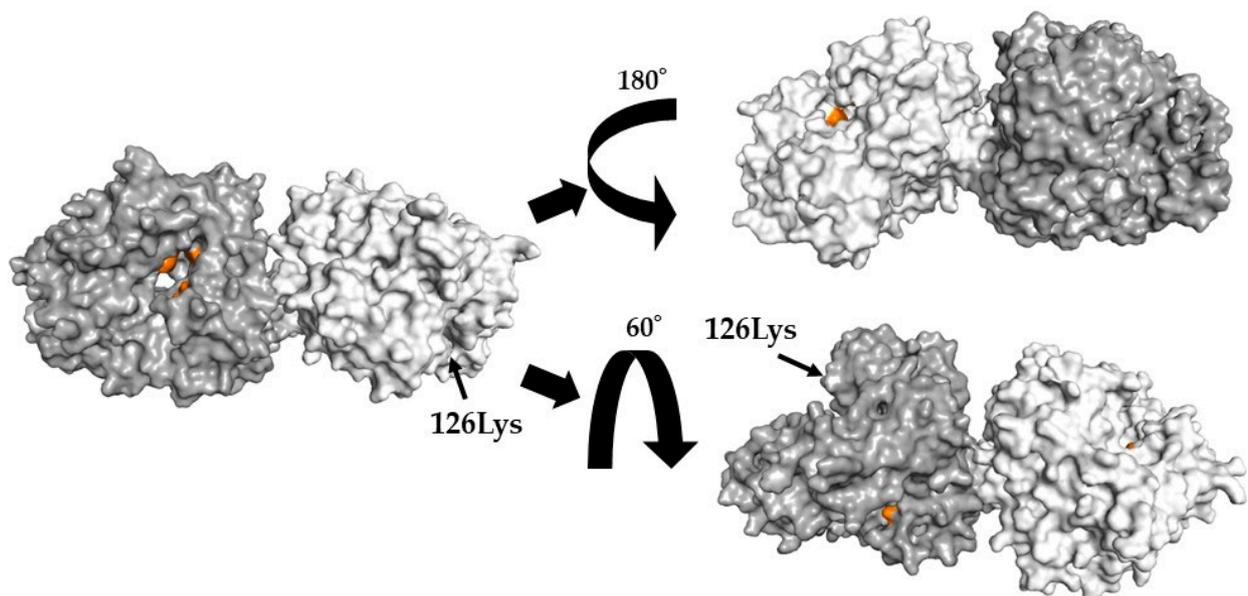
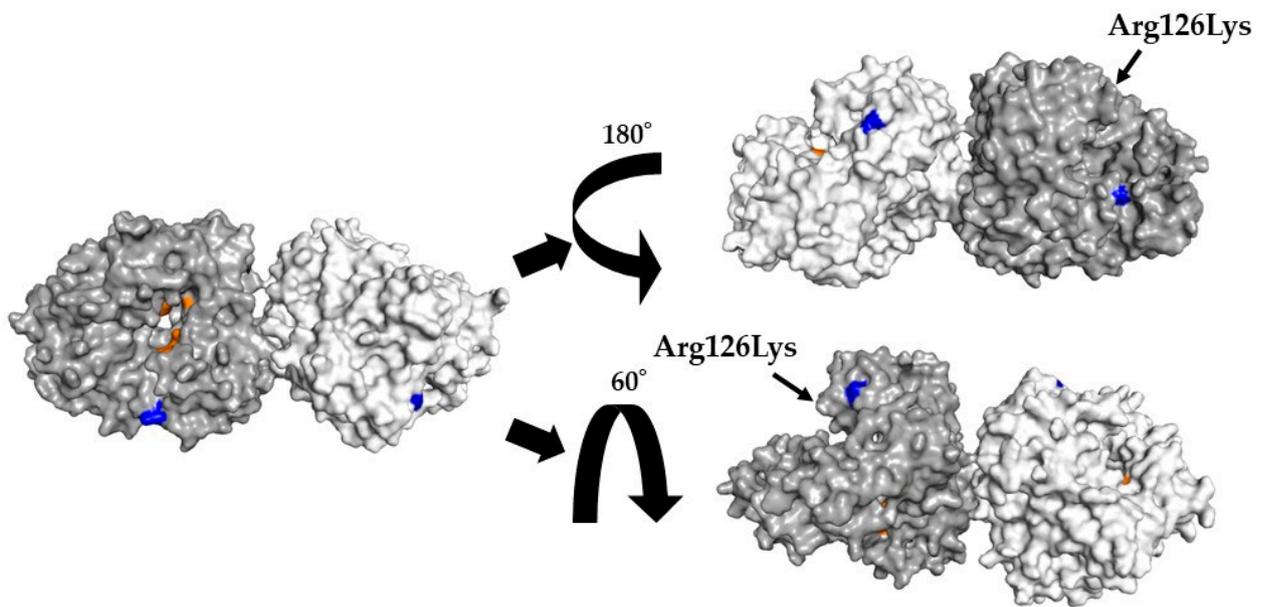
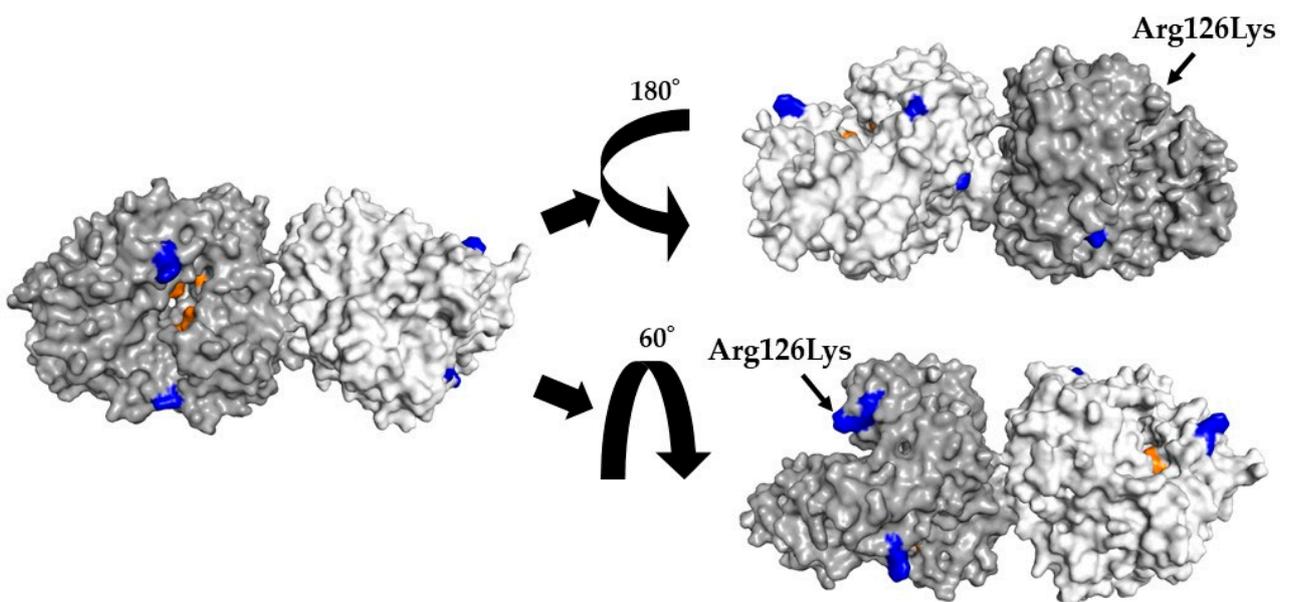
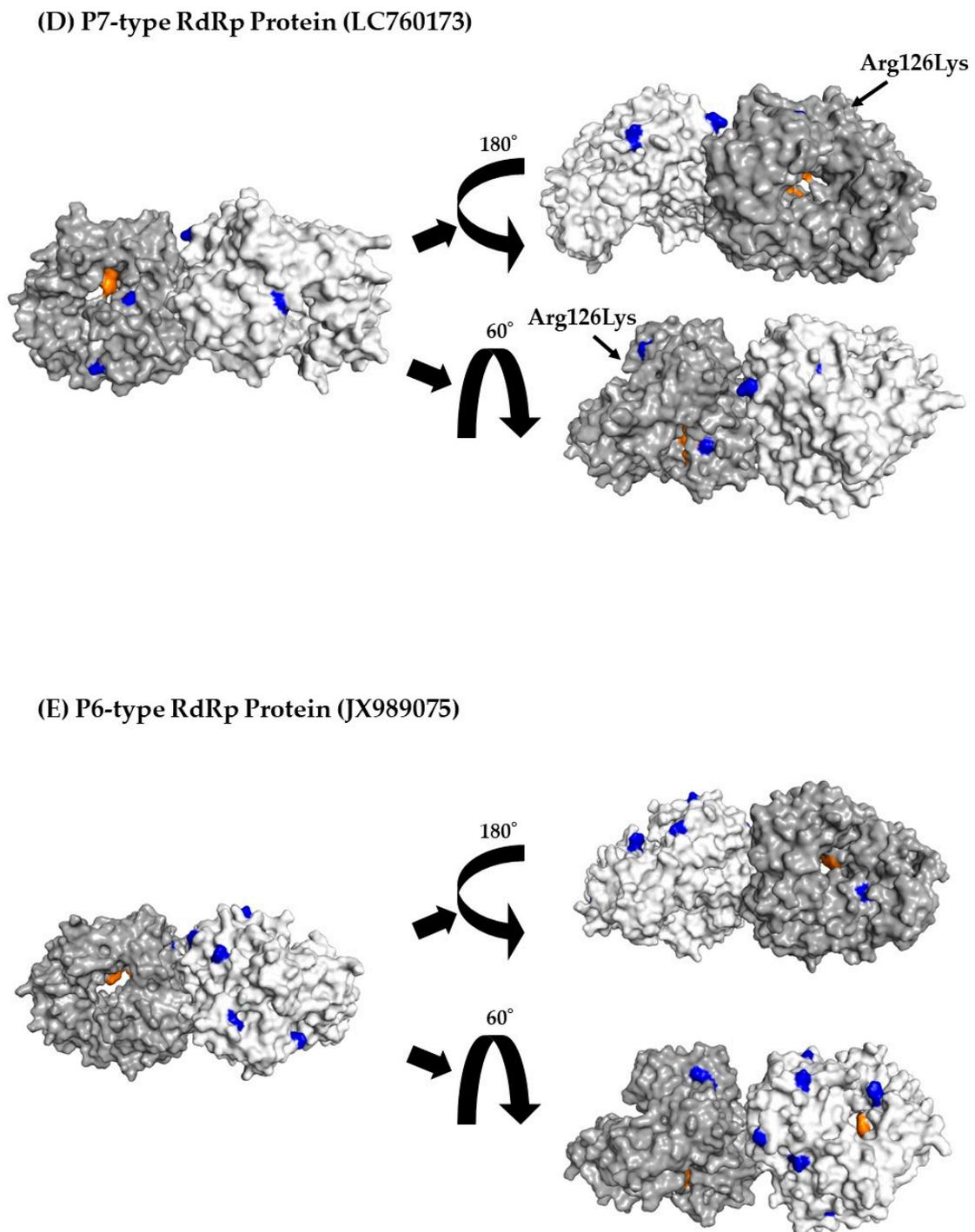


Figure 4. Cont.

**(B) P7-type RdRp Protein (LC122916)****(C) P7-type RdRp Protein (MK956199)**Figure 4. *Cont.*



**Figure 4.** Three-dimensional (3D) RdRp protein (dimer) structure and mapping of amino acid substitutions and active sites. Illustration shows the 3D structures of RdRp protein in the prototype and the most recent strain for each cluster. The strains in each figure are as follows: (A) a P7-type prototype strain (AB039777); (B) a P7-type strain (LC122916) in cluster 1; (C) a P7-type strain (MK956199) in cluster 2; (D) a P7-type strain (LC760173) in cluster 3; (E) a P6-type strain (JX989075) in cluster 1. The chains of the dimer structure are coloured dark grey (chain A) and light grey (chain B). Amino acid substitutions in each variant strain relative to the prototype strain are shown in blue, and the active sites are shown in orange.

### 3.8. 3D Mapping of the Positive Selection Sites and Conformational Epitopes in the VP1 Trimer Proteins

Furthermore, to better evaluate the locations of positive selection sites and conformational epitopes on the VP1 protein, we constructed and mapped 3D VP1 trimer proteins. First, as shown in Figure 5A–E and Table 3, and Section 3.5, positive selection sites for both P6- and P7-type VP1 proteins were located in the P2 domain. Of these, the positive selection sites in the P7-type VP1 proteins (Pro354Thr, Pro354Ser, Pro354Gln, Asn390Thr, and Asn390Asp) overlapped with some conformational epitopes (Tables 3 and S4), whereas a positive selection site (Lys386His) in P6-type VP1 proteins did not. These results suggest that the positive selection sites in P7-type GII.6 VP1 proteins escaped amino acid mutations. In addition, in both representative strains, amino acid mutations overlapped with the conformational epitope at many sites.

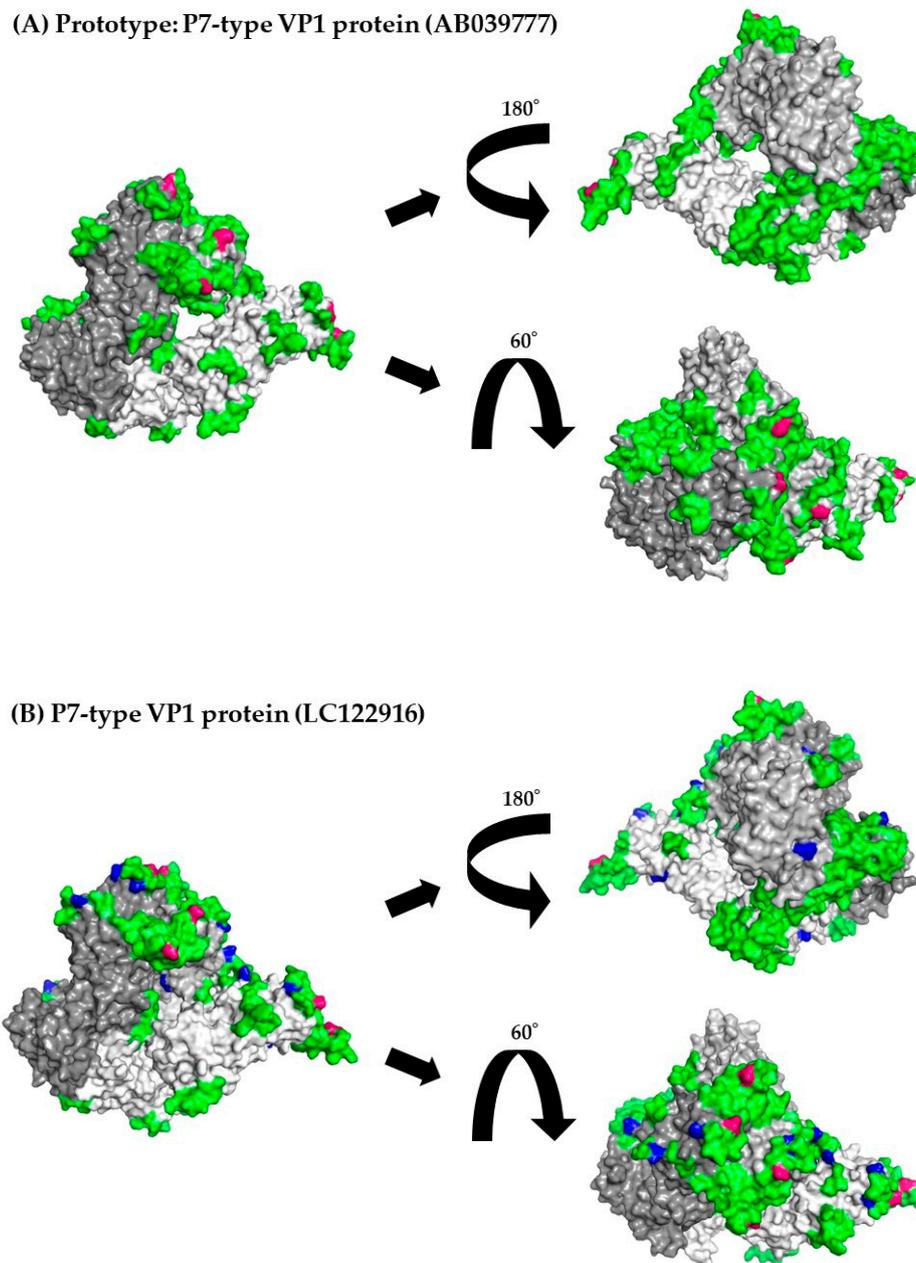


Figure 5. Cont.

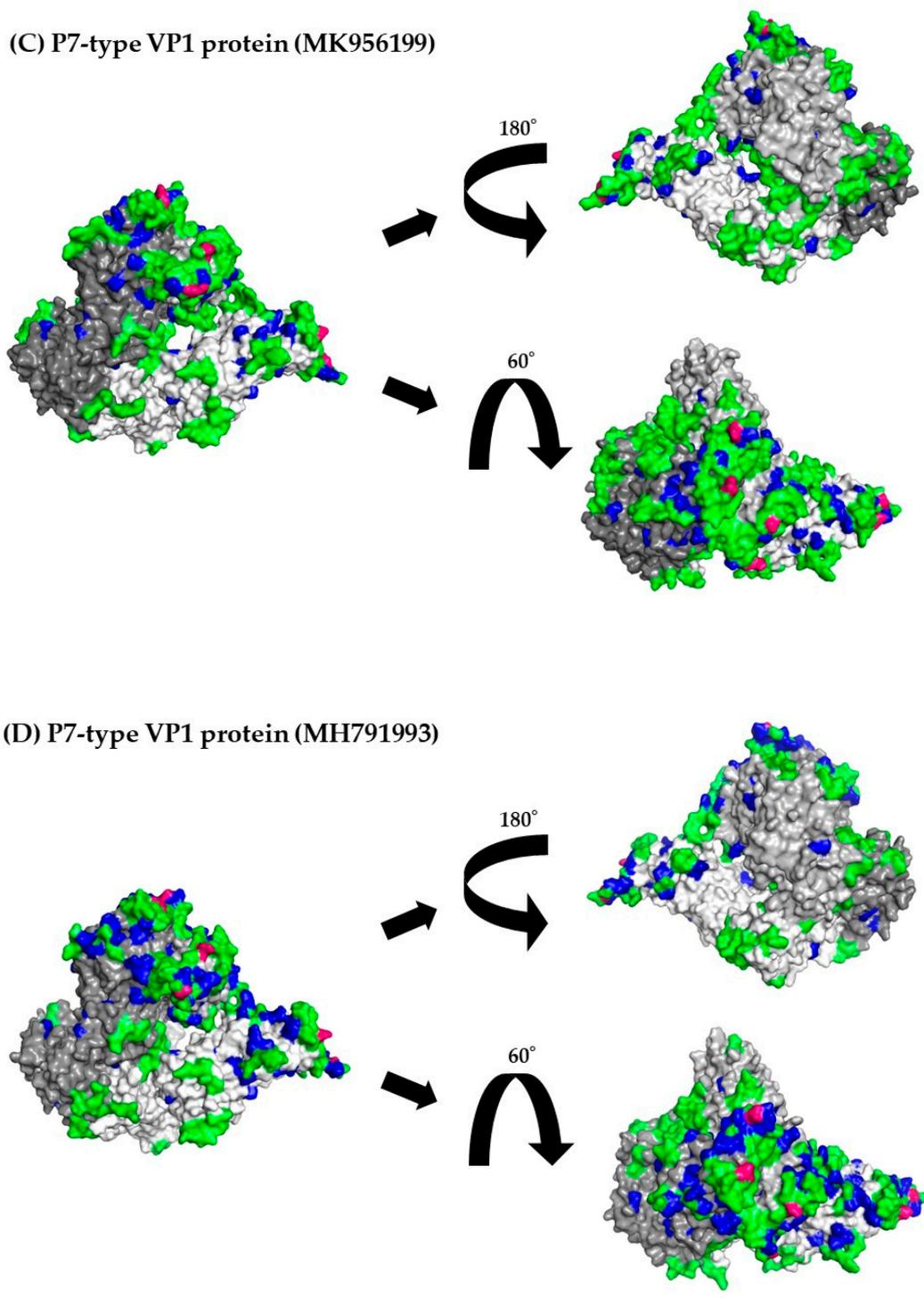
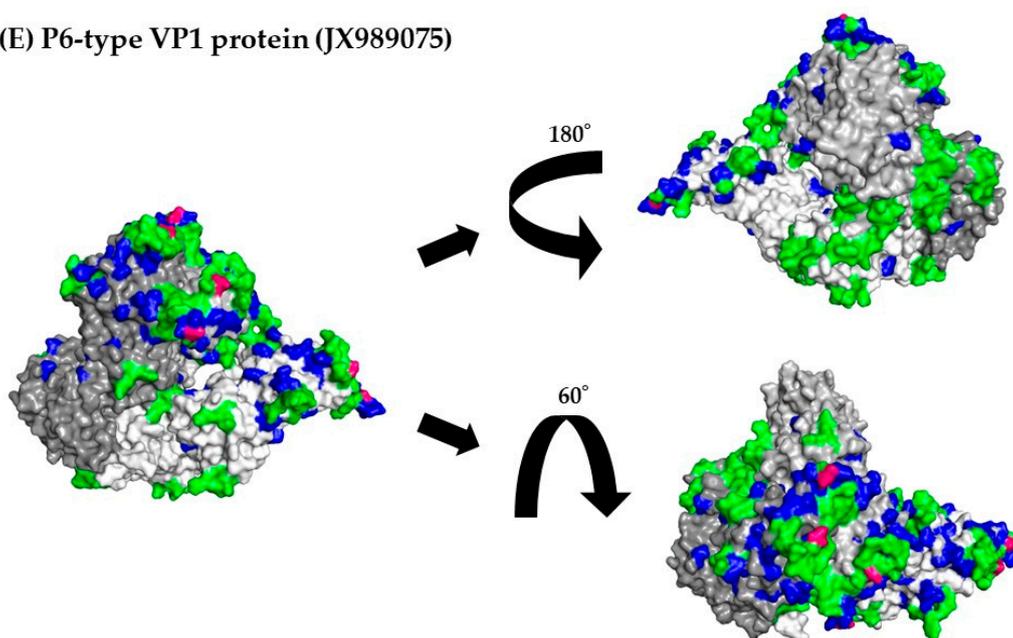


Figure 5. Cont.

## (E) P6-type VP1 protein (JX989075)



**Figure 5.** 3D mapping of the positive selection sites and conformational epitopes in the VP1 protein (trimer). Illustration shows the 3D structure of the VP1 protein in the prototype and the most recent strain for each cluster. The strains in each figure are as follows: (A) a P7-type prototype strain (AB039777); (B) a P7-type strain (LC122916) in cluster 1; (C) a P7-type strain (MK956199) in cluster 2; (D) a P7-type strain (MH791993) in cluster 3; (E) a P6-type strain (JX989075) in cluster 1. Chains of the trimeric structures are coloured in dark grey (chain A), light grey (chain B), and white (chain C). Conformational epitopes of each strain are indicated in green. Amino acid substitutions of each strain are indicated in blue. Positive selection sites are coloured red. When amino acid substitutions overlapped with conformational epitopes, the amino acid substitutions were given priority and coloured blue. The amino acid sequences and details are provided in Supplementary Table S4.

**Table 3.** Number of amino acid residues of predicted positive and negative selection sites in HuNoVGII.6.

Region/Gene	Number of Negative Selection Sites	Number of Positive Selection Sites	Estimated as Positive Selective Sites
P6 type and P7 type <i>RdRp</i> region	258	0	—
P6 type <i>RdRp</i> region	3	0	—
P7 type <i>RdRp</i> region	205	1	126Lys, Lys126Arg
GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 <i>VP1</i> gene	298	2	354Pro, 390Asn
GII.P6-GII.6 <i>VP1</i> gene	8	1	Lys386His
GII.P7-GII.6 <i>VP1</i> gene	274	2	Pro354Thr, Ser and Gln, Asn390Thr and Asp

#### 4. Discussion

To better understand the evolution of HuNoV GII.6 strains with different *RdRp* types (P6 and P7), we analyzed both the *RdRp* region and *VP1* gene using various authentic bioinformatics technologies. First, a time-scaled phylogenetic tree showed that a common ancestor of the P6- and P7-type *RdRp* region emerged approximately 50 years ago and uniquely evolved and formed clusters. A common ancestor of P6- and P7-type GII.6 *VP1* gene emerged approximately 110 years ago and formed clusters. The dominant type for both the *RdRp* region and *VP1* gene was P7-type (Figure 1A,B). Secondly, the evolutionary

rates of both the P6-type *RdRp* region and *VP1* gene were faster than those of the P7-type *RdRp* region and *VP1* gene (Table 1). Next, the phylogenetic distances of the P7-type *RdRp* region and *VP1* gene were wider than those of the P6-type *RdRp* region and *VP1* gene. Furthermore, phylodynamic data showed that the *RdRp* region and *VP1* gene population sizes fluctuated after 2000 (Figure 3A–F). Some positive selection sites in the *VP1* proteins were estimated, and these were located in the antigenicity-related P2 domain. Among these, the positive selection sites in the P7-type *VP1* protein overlapped with the conformational epitopes (Figure 5A–D and Table S4). These data imply that the GII.6 *VP1* gene and *VP1* protein uniquely evolved because of recombination between the P6- and P7-type *RdRp* regions in the HuNoV GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 genomes.

A previous report regarding the evolutionary analyses of the *RdRp* region of various HuNoV genotypes showed that the P6- and P7-type *RdRp* region diverged from a common ancestor of other *RdRp* genotypes, including P18, P15, and P20 [42]. This report also estimated that the divergence year of the P6- and P7-types of the *RdRp* region was in the 1960s [42]. This may be compatible with the present data (December 1966). Moreover, the topologies of the previous time-scaled evolutionary tree and our tree were similar [42]. Although this and other reports did not show the evolutionary rates of each *RdRp* genotype, the evolutionary rates of various *RdRp* genotypes were estimated as  $2.52 \times 10^{-3}$  s/s/y to  $3.12 \times 10^{-3}$  s/s/y. The present data are also compatible with the data from a previous report [42]. These results suggested that the P6- and P7-type *RdRp* regions are genetically related.

Next, the HuNoV *RdRp* region/*RdRp* protein may have affected the evolution of the *VP1* gene/*VP1* protein [22,23]. As shown in Figure 1, the phylogeny of the *VP1* gene in GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 was clearly divided and evolved uniquely. In contrast, in the present study, the topology of the evolutionary tree of the *RdRp* region was similar to that of the *VP1* gene. Notably, the phylogeny of ORF1 and ORF2 was topologically similar in other genogroups and genotypes [43]. Previous reports have also suggested that recombination between the HuNoV genome ORF1, incorporating the *RdRp* region and ORF2, incorporating *VP1* gene, affects *VP1* gene/*VP1* protein evolution and HuNoV antigenicity [8,22,23]. For example, during the 2016/2017 season, recombination between different lineages of the P16-type *RdRp* region in the GII.P16-GII.2 strains occurred, and the recombinant caused large outbreaks of acute gastroenteritis in various countries [44–46]. Moreover, the GII.4 genotype caused a gastroenteritis pandemic between 2006 and 2012 [43,47]. Outbreaks may also be associated with recombination between ORF1 and ORF2 in GII.4 strains [48]. Based on previous and the present results, the prevalence of GII.P7-GII.2 strains was due to the recombination of P6- and P7-type *RdRp* regions. Moreover, the acquisition of new polymerases in recombinant strains may alter the evolution rate of the *VP1* gene [49]. Among Kawasaki 2014 type-detected cases, a norovirus GII.17 variant that was predominant in Hong Kong from 2014 to 2015 was significantly more common than GII.4 in elderly cases. GII.17 *VP1* protein evolution is estimated to be faster (by an order of magnitude) than *VP1* gene evolution in GII.4 [50]. This suggests that recombination may alter the susceptibility and evolutionary rate of the *VP1* protein in GII.17. Although we did not analyse *VP1* functional changes pre- and post-recombination between GII.P6 and GII.P7 in this study, a similar effect may have occurred in the GII.P7-GII.6 and GII.P6-GII.6 strains. Furthermore, the evolutionary rates of the *VP1* gene combined with P6- and P7-type *RdRp* regions were estimated as  $5.063 \times 10^{-3}$  s/s/y and  $3.022 \times 10^{-3}$  s/s/y, respectively. Previous data estimated the mean rates of various GII.2 genotype strains (GII.1 to GII.22) as  $3.21 \times 10^{-3}$  to  $4.30 \times 10^{-3}$  s/s/y [51]. Thus, these values and the present data may be similar [52]. Taken together, these findings provide information on the evolutionary history of these viral strains and suggest that recombination events may have played a pivotal role in their evolution.

We estimated the genetic divergence of the P6- and P7-type *RdRp* regions and P6- and P7-type *VP1* genes in the present strains. First, a larger divergence of P7-type *RdRp* regions and P7-type *VP1* genes was estimated compared to that of the P6-type *VP1* gene. In the

present study, the number of P6-type strains was relatively small (15 strains), although statistical analyses were performed.

We also analyzed the phylodynamics of the *RdRp* region and *VP1* gene. The results showed that the genome population size of GII.P6-GII.6 increased around 2000–2003, while the genome population size of GII.P7-GII.6 increased after 2010 and peaked around 2014. Previous epidemiological studies conducted in Shanghai, China and East Java, Indonesia showed that the detection of the P7-type in HuNoV cases peaked in 2014–2015, although the sample size was small [53,54]. Moreover, another molecular epidemiological study suggested that GII.6 had a biphasic prevalence between 2000 and 2005 and 2007 and 2010. Thus, the present phylodynamic data may reflect the prevalence of GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6, although we could not determine the factors underlying these changes.

To evaluate the functional and evolutionary characteristics of the P6- and P7-type *RdRp* proteins, we constructed 3D dimeric *RdRp* proteins and mapped them with amino acid substitutions (Figure 4). Several amino acid substitutions were also identified. Previous reports have suggested that some amino acid substitutions are associated with replication efficacy [8,48]. For example, the efficacy of HuNoV genome replication is increased by amino acid substitutions (291Thr or 291Val) in various *RdRp* proteins [52]. However, no substitutions in the active sites were found in the P6- and P7-type *RdRp* proteins. Furthermore, both GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 *RdRp* proteins had a relatively small number of amino acid substitutions and no identifiable positive selection site. These results are compatible with previous reports investigating other genogroups (GI) and genotypes [42,55]. This is partly because *RdRp*, which is not a target of neutralising antibodies, undergoes less selective pressure from host immune systems than *VP1*.

We also constructed P6- and P7-type 3D trimeric *VP1* proteins (Figure 5). Previous reports have shown that the P2 domain may act not only as a host cell-binding site, but also as a major part of the HuNoV antigen [56,57]. Therefore, amino acid substitutions in this domain may be associated with infectivity and antigenicity [56,57]. Moreover, positively selected sites may function as escape mutations in the host [58]. In the present study, some conformational epitopes were identified in both *RdRp*-type *VP1* proteins. Some of these were located in the P2 domain. Positively selected sites were also identified. Moreover, the amino acid positions of the conformational epitopes and positive selections between the P6- and P7-type *VP1* proteins were distinct. These results suggested that the P6- and P7-type *VP1* proteins have distinct antigenicity, and both may undergo distinct selective pressure from host defence systems (i.e., host immunity). To our knowledge, the present study is the first to analyse the differences in antigenicity between GII.P7-GII.6 and GII.P6-GII.6, although we did not examine this *in vitro*.

Next, we evaluated negative selection sites for the *RdRp* and *VP1* proteins (Tables 3 and S3). Many negative selection sites in P7-type *RdRp* (205 sites) and *VP1* proteins (274 sites) were estimated, while P6-type *RdRp* and *VP1* proteins were small. In general, negative selection sites play a role in preventing the deterioration of viral protein function [46]. Thus, the present negative selection data may indicate the maintenance of *RdRp* and *VP1* protein function. Furthermore, a small number of negative selection sites in P6-type *RdRp* and *VP1* proteins were estimated. This may be because of the relatively small number of strains used in this study (15 strains).

The present study has some limitations. First, it lacks *in vitro* and *in vivo* approaches. Bioinformatics techniques are crucial in molecular evolution analyses, but they do not always reflect actual evolutionary trajectories. Our antigenicity analyses should be validated using *in vitro* and *in vivo* approaches in the future. Second, the study included a relatively small number of GII.P6-GII.6 strains. Despite collecting additional HuNoV GII.6 data from each local government public health institution, the number of P6- and P7-type *RdRp* strains that we collected and analysed was 15 and 126, respectively. Therefore, our results regarding the P6-type may be biased. Considering this limitation, further evolutionary analyses should be conducted after additional P6-type strains are detected.

## 5. Conclusions

In this study, to better understand the evolution of the HuNoV GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 strains, we performed a detailed analysis of both the *RdRp* region and *VP1* gene in these viruses using various bioinformatics methods. A common ancestor of the P6- and P7-type *RdRp* region emerged approximately 50 years ago and formed clusters. A common ancestor of the P6- and P7-type *VP1* gene emerged approximately 110 years ago. Moreover, both *RdRp* region and *VP1* gene have evolved uniquely. The evolutionary rates of the P6-type *RdRp* region and P6-type *VP1* gene were faster than the evolutionary rates of the P7-type *RdRp* region and *VP1* genes. More genetic divergence was observed in the P7-type *RdRp* region and *VP1* gene than in the P6-type *RdRp* region and *VP1* gene. The phylodynamics of the *RdRp* region and *VP1* fluctuated after 2000. Some positive selection sites in the *VP1* proteins were located in the antigenicity-related P2 domain, and these sites in the P7-type *VP1* protein overlapped with the conformational epitopes. Taken together, the GII.6 *VP1* and *VP1* proteins evolved uniquely due to recombination between the P6- and P7-type *RdRp* regions in the HuNoV GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 strains.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded from: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15071497/s1>, Table S1. List of GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 strains used in this study. Table S2. Parameters used in Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) analyses. Table S3a. Details of P6- and P7-type *RdRp* region negative selection sites in comparing with each genotype. Table S3b. Details of GII.P6-GII.6 and GII.P7-GII.6 *VP1* gene negative selection sites in comparison with each genotype. Table S4. Detailed amino acid sequences of the *VP1* gene for representative and prototype strains of each cluster used in this study.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.K., T.T. and K.K.; methodology, T.T., R.K., T.S. (Tatsuya Shirai), M.S., T.S. (Toshiyuki Sugai), K.H., F.M., K.O., Y.H. and M.K.; writing—original draft preparation, T.K., Y.S., K.K. and H.K.; review and editing, K.M., K.I., H.I., A.R., K.F., K.K. and H.K.; visualization, T.T., R.K. and Y.M.; funding acquisition, H.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by the Japan Agency for Medical Research and Development, AMED (<https://www.amed.go.jp/>, accessed on 1 April 2023), under Grant Number JP23fk0108667. The funders played no role in the study design, data collection, analysis, decision to publish, or manuscript preparation.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The datasets generated and/or analyzed in the present study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Acknowledgments:** We thank Miki Kawaji for skillful supports in data processing.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Robilotti, E.; Deresinski, S.; Pinsky, B.A. Norovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 134–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mans, J. Norovirus Infections and disease in lower-middle and low-income countries, 1997–2018. *Viruses* **2019**, *11*, 341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chan-It, W.; Thongprachum, A.; Khamrin, P.; Kobayashi, M.; Okitsu, S.; Mizuguchi, M.; Ushijima, H. Emergence of a new norovirus GII.6 variant in Japan, 2008–2009. *J. Med. Virol.* **2012**, *84*, 1089–1096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Patel, M.M.; Hall, A.J.; Vinjé, J.; Parashar, U.D. Noroviruses: A comprehensive review. *J. Clin. Virol.* **2009**, *44*, 1–8. [[CrossRef](#)]
5. Patel, M.M.; Widdowson, M.A.; Glass, R.I.; Akazawa, K.; Vinjé, J.; Parashar, U.D. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 1224–1231. [[CrossRef](#)]
6. Parrón, I.; Álvarez, J.; Jané, M.; Cornejo Sánchez, T.; Razquin, E.; Guix, S.; Camps, G.; Pérez, C.; Domínguez, À.; The Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia. A foodborne norovirus outbreak in a nursing home and spread to staff and their household contacts. *Epidemiol. Infect.* **2019**, *147*, e225. [[CrossRef](#)]
7. Winder, N.; Gohar, S.; Muthana, M. Norovirus: An overview of virology and preventative measures. *Viruses* **2022**, *14*, 2811. [[CrossRef](#)]

8. de Graaf, M.; van Beek, J.; Koopmans, M.P. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 421–433. [[CrossRef](#)]
9. Jiang, X.; Wang, M.; Wang, K.; Estes, M.K. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* **1993**, *195*, 51–61. [[CrossRef](#)]
10. Chhabra, P.; de Graaf, M.; Parra, G.I.; Chan, M.C.; Green, K.; Martella, V.; Wang, Q.; White, P.A.; Katayama, K.; Vennema, H.; et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 1393–1406. [[CrossRef](#)]
11. Jiang, X.; Espul, C.; Zhong, W.M.; Cuello, H.; Matson, D.O. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch. Virol.* **1999**, *144*, 2377–2387. [[CrossRef](#)]
12. Ludwig-Begall, L.F.; Mauroy, A.; Thiry, E. Norovirus recombinants: Recurrent in the field, recalcitrant in the lab—A scoping review of recombination and recombinant types of noroviruses. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 970–988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kroneman, A.; Vega, E.; Vennema, H.; Vinjé, J.; White, P.A.; Hansman, G.; Green, K.; Martella, V.; Katayama, K.; Koopmans, M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* **2013**, *158*, 2059–2068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bhavanam; Freedman, S.; Lee, S.B.; Zhuo, B.E.; Qiu, R.; Chui, Y.; Xie, L.; Ali, J.; Vanderkooi, S.; Pang, O.G.; et al. Differences in Illness Severity among Circulating Norovirus Genotypes in a Large Pediatric Cohort with Acute Gastroenteritis. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. van Beek, J.; de Graaf, M.; Al-Hello, H.; Allen, D.J.; Ambert-Balay, K.; Botteldoorn, N.; Brytting, M.; Buesa, J.; Cabrerizo, M.; Chan, M.; et al. Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: An epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 545–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Khamrin, P.; Kumthip, K.; Yodmeeklin, A.; Jampanil, N.; Phengma, P.; Yamsakul, P.; Okitsu, S.; Kobayashi, T.; Ushijima, H.; Maneekarn, N. Changing Predominance of Norovirus Recombinant Strains GII.2[P16] to GII.4[P16] and GII.4[P31] in Thailand, 2017 to 2018. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e0044822. [[CrossRef](#)]
17. Vega, E.; Barclay, L.; Gregoricus, N.; Shirley, S.H.; Lee, D.; Vinj, J. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 147–155. [[CrossRef](#)]
18. Cannon, J.L.; Bonifacio, J.; Bucardo, F.; Buesa, J.; Bruggink, L.; Chan, M.C.-W.; Fumian, T.M.; Giri, S.; Gonzalez, M.D.; Hewitt, J.; et al. Global Trends in Norovirus Genotype Distribution among Children with Acute Gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 1438–1445. [[CrossRef](#)]
19. Li, J.; Zhang, L.; Zou, W.; Yang, Z.; Zhan, J.; Cheng, J. Epidemiology and genetic diversity of norovirus GII genogroups among children in Hubei, China, 2017–2019. *Virol. Sin.* **2023**, *38*, 351–362. [[CrossRef](#)]
20. Pybus, O.G.; Rambaut, A. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 540–550. [[CrossRef](#)]
21. Matsushima, Y.; Mizukoshi, F.; Sakon, N.; Doan, Y.H.; Ueki, Y.; Ogawa, Y.; Motoya, T.; Tsukagoshi, H.; Nakamura, N.; Shigemoto, N.; et al. Evolutionary Analysis of the VP1 and RNA-dependent RNA polymerase regions of human norovirus GII.P17-GII.17 in 2013–2017. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2189. [[CrossRef](#)]
22. Mizukoshi, F.; Nagasawa, K.; Doan, Y.H.; Haga, K.; Yoshizumi, S.; Ueki, Y.; Shinohara, M.; Ishikawa, M.; Sakon, N.; Shigemoto, N.; et al. Molecular Evolution of the RNA-Dependent RNA Polymerase and Capsid Genes of Human Norovirus Genotype GII.2 in Japan during 2004–2015. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 705. [[CrossRef](#)]
23. Nagasawa, K.; Matsushima, Y.; Motoya, T.; Mizukoshi, F.; Ueki, Y.; Sakon, N.; Murakami, K.; Shimizu, T.; Okabe, N.; Nagata, N.; et al. Phylogeny and Immunoreactivity of Norovirus GII.P16-GII.2, Japan, Winter 2016–17. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 144–148. [[CrossRef](#)]
24. Diakoudi, G.; Lanave, G.; Catella, C.; Medici, M.C.; De Conto, F.; Calderaro, A.; Loconsole, D.; Chironna, M.; Bonura, F.; Giammanco, G.M.; et al. Analysis of GII.P7 and GII.6 noroviruses circulating in Italy during 2011–2016 reveals a replacement of lineages and complex recombination history. *Infect. Genet. Evol.* **2019**, *75*, 103991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yang, Z.; Vinj, J.; Elkins, C.A.; Kulka, M. Complete Genome Sequence of Human Norovirus Strain GII.P7-GII.6 Detected in a Patient in the United States in 2014. *Genome Announc.* **2016**, *4*, e01211-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zhou, N.; Li, M.; Zhou, L.U.; Huang, Y. Genetic characterizations and molecular evolution of human norovirus GII.6 genotype during the past five decades. *J. Med. Virol.* **2023**, *95*, e28876. [[CrossRef](#)]
27. Bouckaert, R.; Heled, J.; Kühnert, D.; Vaughan, T.; Wu, C.-H.; Xie, D.; Suchard, M.A.; Rambaut, A.; Drummond, A.J. BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comp. Biol.* **2014**, *10*, e1003537. [[CrossRef](#)]
28. Saito, M.; Tsukagoshi, H.; Sada, M.; Sunagawa, S.; Shirai, T.; Okayama, K.; Sugai, T.; Tsugawa, T.; Hayashi, Y.; Ryo, A.; et al. Detailed Evolutionary Analyses of the F gene in the respiratory syncytial virus subgroup A. *Viruses* **2021**, *13*, 2525. [[CrossRef](#)]
29. Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transpl.* **2013**, *48*, 452–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Fourment, M.; Gibbs, M.J. PATRISTIC: A program for calculating patristic distances and graphically comparing the components of genetic change. *BMC Evol. Biol.* **2006**, *6*, 1. [[CrossRef](#)]

33. Rambaut, A.; Drummond, A.J.; Xie, D.; Baele, G.; Suchard, M.A. Posterior Summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* **2018**, *67*, 901–904. [[CrossRef](#)]
34. Weaver, S.; Shank, S.D.; Spielman, S.J.; Li, M.; Muse, S.V.; Kosakovsky Pond, S.L. Datamonkey 2.0: A modern web application for characterizing selective and other evolutionary processes. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 773–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Webb, B.; Sali, A. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1137*, 1–15. [[CrossRef](#)]
36. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W.G.; Cowtan, K. Features and development of coot. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Guex, N.; Peitsch, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2714–2723. [[CrossRef](#)]
38. Kringelum, J.V.; Lundegaard, C.; Lund, O.; Nielsen, M. Reliable B cell epitope predictions: Impacts of method development and improved benchmarking. *PLOS Comput. Biol.* **2012**, *8*, e1002829. [[CrossRef](#)]
39. Ponomarenko, J.; Bui, H.H.; Li, W.; Füsseder, N.; Bourne, P.E.; Sette, A.; Peters, B. ElliPro: A new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinform.* **2008**, *9*, 514. [[CrossRef](#)]
40. Shashkova, T.I.; Umerenkov, D.; Salnikov, M.; Strashnov, P.V.; Konstantinova, A.V.; Lebed, I.; Shcherbinin, D.N.; Asatryan, M.N.; Kardymon, O.L.; Ivanisenko, N.V. SEMA: Antigen B-cell conformational epitope prediction using deep transfer learning. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 960985. [[CrossRef](#)]
41. Zhou, C.; Chen, Z.; Zhang, L.; Yan, D.; Mao, T.; Tang, K.; Qiu, T.; Cao, Z. SEPPA 3.0-enhanced spatial epitope prediction enabling glycoprotein antigens. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W388–W394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ozaki, K.; Matsushima, Y.; Nagasawa, K.; Motoya, T.; Ryo, A.; Kuroda, M.; Katayama, K.; Kimura, H. Molecular evolutionary analyses of the RNA-dependent RNA polymerase region in norovirus genogroup II. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 3070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Vinjé, J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 373–381. [[CrossRef](#)]
44. Bidalot, M.; Théry, L.; Kaplon, J.; De Rougemont, A.; Ambert-Balay, K. Emergence of new recombinant noroviruses GII.p16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, 30508. [[CrossRef](#)]
45. Ao, Y.; Wang, J.; Ling, H.; He, Y.; Dong, X.; Wang, X.; Peng, J.; Zhang, H.; Jin, M.; Duan, Z. Norovirus GII.P16/GII.2-Associated Gastroenteritis, China, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1172–1175. [[CrossRef](#)]
46. Liu, L.T.; Kuo, T.Y.; Wu, C.Y.; Liao, W.T.; Hall, A.J.; Wu, F.T. Recombinant GII.P16-GII.2 Norovirus, Taiwan, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1180–1183. [[CrossRef](#)]
47. Siebenga, J.J.; Vennema, H.; Zheng, D.P.; Vinjé, J.; Lee, B.E.; Pang, X.L.; Ho, E.C.; Lim, W.; Choudekar, A.; Broor, S.; et al. Norovirus illness is a global problem: Emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007. *J. Infect. Dis.* **2009**, *200*, 802–812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Eden, J.S.; Tanaka, M.M.; Boni, M.F.; Rawlinson, W.D.; White, P.A. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J. Virol.* **2013**, *87*, 6270–6282. [[CrossRef](#)]
49. Smertina, E.; Urakova, N.; Strive, T.; Frese, M. Calicivirus RNA-Dependent RNA Polymerases: Evolution, Structure, Protein Dynamics, and Function. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1280. [[CrossRef](#)]
50. Chan, M.C.W.; Lee, N.; Hung, T.-N.; Kwok, K.; Cheung, K.; Tin, E.K.Y.; Lai, R.W.M.; Nelson, E.A.S.; Leung, T.F. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 10061. [[CrossRef](#)]
51. Kobayashi, M.; Matsushima, Y.; Motoya, T.; Sakon, N.; Shigemoto, N.; Okamoto-Nakagawa, R.; Nishimura, K.; Yamashita, Y.; Kuroda, M.; Saruki, N.; et al. Molecular evolution of the capsid gene in human norovirus genogroup II. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29400. [[CrossRef](#)]
52. Bull, R.A.; Eden, J.S.; Rawlinson, W.D.; White, P.A. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000831. [[CrossRef](#)]
53. Lu, L.; Zhong, H.; Xu, M.; Su, L.; Cao, L.; Jia, R.; Xu, J. Genetic diversity and epidemiology of Genogroup II noroviruses in children with acute sporadic gastroenteritis in Shanghai, China, 2012–2017. *Bmc Infect. Dis.* **2019**, *19*, 736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Utsumi; Lusida; Dinana, T.; Wahyuni, M.I.; Soegijanto, Z.; Soetjijto, R.M.; Athiyyah, S.; Sudarmo, A.F.; Ranuh, S.M.; Darma, R.G.; et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of norovirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in East Java, Indonesia in 2015–2019. *Infect. Genet. Evol.* **2021**, *88*, 104703. [[CrossRef](#)]
55. Zhou, N.; Huang, Y.; Zhou, L.U.; Li, M.; Jin, H. Molecular Evolution of RNA-Dependent RNA Polymerase Region in Norovirus Genogroup I. *Viruses* **2023**, *15*, 166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Hutson, A.M.; Atmar, R.L.; Marcus, D.M.; Estes, M.K. Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens. *J. Virol.* **2003**, *77*, 405–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Schroten, H.; Hanisch, F.G.; Hansman, G.S. Human norovirus interactions with histo-blood group antigens and human milk oligosaccharides. *J. Virol.* **2016**, *90*, 5855–5859. [[CrossRef](#)]
58. Holmes, E.C. Virus evolution. In *Fields Virology*, 6th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Cohen, J.I., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Racaniello, V.D., Roizman, B., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; Volume 1, pp. 286–313.

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 6 研究発表抄録



## ユニークイオンに着目した下水処理水中マクロライド系抗菌薬及びその類縁体の検索とゼオライトによる除去

## Search for macrolide antibacterial agents and their analogues in sewage treatment water focusing on unique ions and their removal by zeolite

○伊藤朋子<sup>1</sup>, 菊池一馬<sup>2</sup>, 岩渕勝己<sup>2</sup>, 石川奈緒<sup>3</sup>, 伊藤歩<sup>3</sup>( <sup>1</sup> 岩手県環境研セ, <sup>2</sup> 岩手県環境生活部, <sup>3</sup> 岩手大理工)

○ ITO Tomoko (Res. Inst. Env. Sci. Pub. Health Iwate Pref.), KIKUCHI Kazuma, IWABUCHI Katsumi (Department of Environ. and Residential Life, Iwate Pref. Gov.), ISHIKAWA Nao, ITO Ayumi (Iwate University)

<sup>1</sup>e-mail : tm-itou@pref.iwate.jp

## 【はじめに】

マクロライド系抗菌薬（以後、マクロライドという。）は比較的処方量が多く、河川水においても数種の未変化体や活性代謝物が検出されている<sup>1)</sup>。マクロライドの基本構造は大員環ラクトンにデオキシ糖が結合したもので、MS/MS スペクトルには糖由来の特徴的なピーク（ユニークイオン）が観察される。本検討では、このユニークイオンに着目し、下水処理水中のマクロライド及びその類縁体の検索を行うとともに、抗菌薬の環境負荷低減を目的として、ゼオライトによる除去試験を行った。

## 【方法】

## (1) 供試試料

県内に所在する A 浄化センターの下水処理水（消毒前のもの）を採取し、試料とした。

## (2) LC-QTOFMS による分析

前処理を含む測定条件は、門上らの AIQS-LC の方法<sup>2)</sup>に準拠し、水質試料をタンデム固相（Waters HLB・AC-2）で抽出後、LC-QTOFMS(SCIEX X500R SWATH ESI-Positive)で測定した。取得データ中のマクロライド及びその類縁体は、AIQS-LC、SCIEX OS 及び MS-DIAL により検索した。

## (3) ゼオライトによる除去試験

(1)の水質試料 100 mL あたり 1 g のモルデナイト型ゼオライトを添加し、一時間振とう接触後のろ液を(2)の方法で測定し、マクロライド及びその類縁体の除去率を確認した。

## 【結果と考察】

## (1) 下水処理水中のマクロライド及びその類縁体の検索

AIQS-LC によるマクロライドのターゲットスクリーニング結果と、岩手県における処方量（厚生労働省 第 5 回 NDB オープンデータより算出）を表 1 に示す。AIQS-LC には Clarithromycin(CAM), Azithromycin(AZM), Roxithromycin(RXM) 及び Erythromycin(EM)が登録されており、処方量の多い CAM が最も高濃度に検出された。

表 1 下水処理水中のマクロライド

Compound	下水処理水 (ng/L)	岩手県処方量 (kg/year)
CAM	420	385
AZM	180	78
RXM	42	36
EM	38	112

マクロライドは、経口投与後の代謝経路でジメチルアミノ糖の脱メチル化、クラジノースの脱離、また、CAM ではラクトン環 14 位の水酸化が起こることなどが知られている（図 1）<sup>3)</sup>。マクロライド未変化体の MS/MS スペクトルには、Precursor ion からクラジノースが Neutral loss として脱離したイオン、ジメチルアミノ糖及びジメチルアミノ糖から C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O が脱離したイオンが特徴的に観察される（図 2）。代謝物や類縁体においても、同様のフラグメンテーションが起こることが予想され、これらのユニークイオンをマーカーとして、mass tolerance 0.02 Da でマクロライド及びその類縁体と思われるピークを検索した。結果を図 3 に示す。

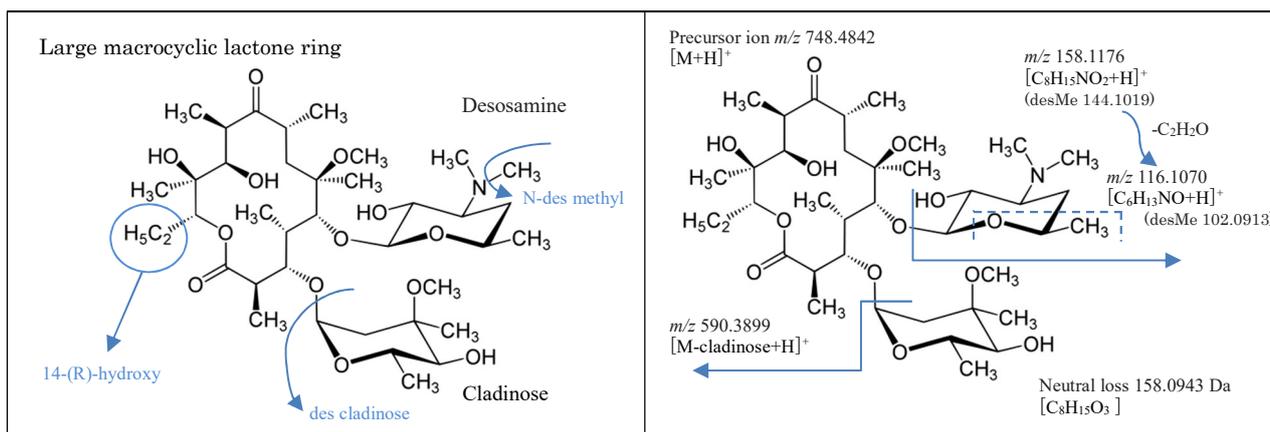


図1 Clarithromycin の代謝経路

図2 Clarithromycin のフラグメント

MS-DIAL によるピークピッキング結果をユニークイオンでフィルタリングしたところ、各々数個のピークスポットが抽出された。AIQS-LC の結果と合わせ、4, 7, 8 は AZM,CAM,RXM であると同定した。その他については、CAM の MS/MS スペクトルと 40%以上の類似度を持つものについて、ライブラリー一致率やユニークイオンの種類などから考察し、5つのマクロライド類縁体を推定した(表2)。

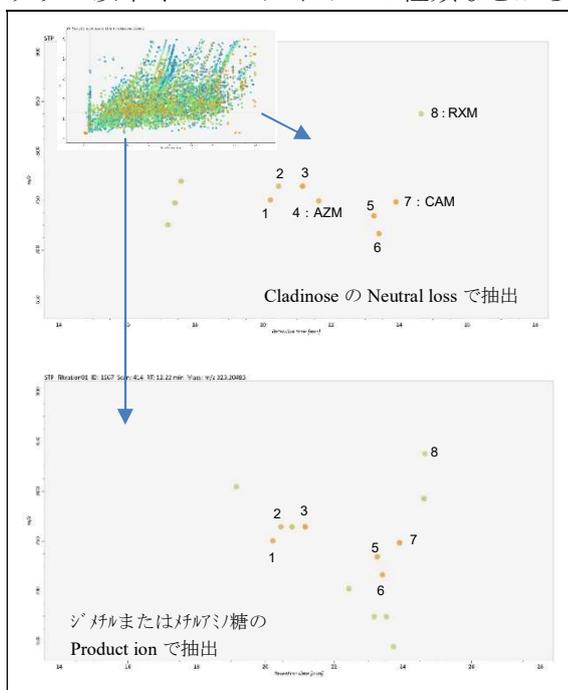


図3 ユニークイオンによるピークの抽出  
(縦軸:  $m/z$ 、横軸: RT(min))

表2 抽出ピークの精密質量と推定物質名

No.	Precursor ion (accurate mass)	推定組成式	Product ion (accurate mass)
7	748.4851 (1.3 ppm)* RT 23.90 min Clarithromycin	C38H70NO13+	590.3907(1.4ppm)
			158.1167(-5.4ppm)
			116.1074(3.5ppm)
1	750.4669 (4.6 ppm) RT 20.20 min N-Desmethyl 14-Hydroxyclearithromycin	C37H68NO14+	592.3695(0.6ppm)
			144.1020(0.7ppm)
			102.0910(-3.3ppm)
3 (2)	764.4797(0.8 ppm) RT 21.16 (20.45) min 14(or16)-Hydroxyclearithromycin	C38H70NO14+	606.3855(1.2ppm)
			158.1170(-3.5ppm)
			116.1070(0.1ppm)
5	734.4657(-3.8ppm) RT 23.24 min N-Desmethyl Clarithromycin	C37H68NO13+	576.3755(2.2ppm)
			144.1007(-8.3ppm)
			102.0910(-3.3ppm)
-	734.4681(-0.5ppm) RT 21.98 min Erythromycin**	C37H68NO13+	589.3483 (-0.5ppm)
			158.1177 (0.9ppm)
			116.1078 (6.9ppm)
6	716.4615(5.0ppm) RT 23.39 min Erythromycin A enol ether***	C38H70NO14+	558.3629(-1.3ppm)
			540.3602 (13ppm)
			522.3446(3.9ppm)
			158.1177(0.9ppm)

\*カッコ内は推定組成式に対する検出イオンの mass error

\*\*AIQS-LC ターゲットスクリーニング結果

\*\*\*  $m/z$  540,522 は  $m/z$  558 から  $H_2O$  が 1 または 2 個脱離

## (2) ゼオライトによる除去試験

ゼオライト処理後の下水処理水のピークスポット 1~8 及び EM の面積値を処理前のものと比較したところ、処理後の水質ではピークがほぼ消失していた。ゼオライトはアルミノシリケートが網目状に連なった構造を持ち、Al 近傍がマイナスチャージを帯びる。マクロライド及びその類縁体は、アミノ糖の窒素がプロトン化されやすく、電気的に吸着しているものと推察された。

**【謝辞】** 本研究の一部は公益財団法人日立財団 倉田奨励金 (1442) で実施したものです。

### 【参考文献】

- 1) 西野ら:環境研究総合推進費終了研究成果報告書,5-1954,令和4年5月
- 2) Kadokami, K.,Ueno.D.: Anal. Chem.2019, 91(12), 7749-7755.
- 3) Suzuki, A. et al.:Drug Metab Pharmacokin. 2003,18(2),104-113.

## 化学物質分析法開発に関する基礎的研究 (8)

## Fundamental studies on the development of chemical analysis (8)

○深渡 柚<sup>1</sup>, ○長谷川瞳<sup>2</sup>, ○平生進吾<sup>2</sup>, 小野純子<sup>3</sup>, 吉野共広<sup>4</sup>, 飛石和夫<sup>5</sup>

(1 岩手県環境研セ, 2 名古屋市環科セ, 3 大阪府環農水研, 4 神戸市健科研, 5 福岡県保環研)

FUKAWATARI Yu (Res. Inst. Env. Sci. Pub. Health Iwate Pref.), HASEGAWA Hitomi, HIRAO Shingo (Nagoya City Env. Sci. Res. Inst.)

e-mail: yu-fukawatari@pref.iwate.jp, hitomi@ncies.net, hirao@ncies.net

## 【はじめに】

確立した測定法が無い環境中化学物質について、LC/MS 及び GC/MS 等の適用可能性を検討した。本報は環境省委託化学物質分析法開発における検討等で得られた主な知見を取りまとめたものである。

## 【方法】

水質試料中の(1)ミコナゾール及びフルコナゾール、(2)N-フェニルマレイミド、(3)ジアクリル酸ヘキサメチレンの分析法を検討した。

## 【結果と考察】

## (1)水質試料中のミコナゾール及びフルコナゾールの分析 (岩手県環境保健研究センター)

[概要]抗真菌薬であるミコナゾール及びフルコナゾールの水質試料中における同時分析法を検討した。

[方法]水質試料にメタノールを添加し、HCl で pH3 に調整した後、サロゲート内標準物質を添加する。調整した水質試料を固相カートリッジ (Waters 製 Oasis HLB Plus 225 mg) に通水後、ブランク水で洗浄する。HLB の後段にイオン交換固相 (Waters 製 oasis MCX Plus 225 mg) を取り付け、ギ酸メタノール溶液を通液し、対象物質を HLB から MCX に吸着させる。HLB を取り除き、対象物質を MCX からアンモニアメタノール溶液で溶出したものを試験液とし、LC-MS/MS(ESI-Positive)で定量する。

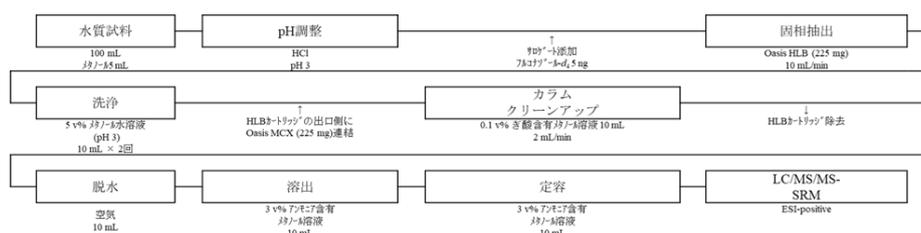


Fig. 1 分析法のフローチャート

[結果]本法の MDL 及び MQL はそれぞれ、ミコナゾールが 0.00046  $\mu\text{g/L}$  及び 0.0012  $\mu\text{g/L}$ 、フルコナゾールが 0.00090  $\mu\text{g/L}$  及び 0.0023  $\mu\text{g/L}$  であった。河川水を用いた添加回収試験 (添加量: ミコナゾール硝酸塩 0.15 ng、フルコナゾール 0.30 ng, n=7) の回収率は、ミコナゾールが 100% (変動係数 7.5%)、フルコナゾールが 103% (サロゲート回収率 93%、変動係数 7.5%) であった。海水を用いた添加回収試験 (添加量: ミコナゾール硝酸塩 1.0 ng、フルコナゾール 2.0 ng, n=5) の回収率は、ミコナゾールが 105% (変動係数 5.7%)、フルコナゾールが 115% (サロゲート回収率 97%、変動係数 1.2%) であった。本法を用いて岩手県内の環境試料を測定した結果、一部の河川水からミコナゾールが MDL 以上の濃度で検出された。特に下水処理場の放流水が流入した後の河川水からは、0.014  $\mu\text{g/L}$  のミコナゾール及び 0.017  $\mu\text{g/L}$  のフルコナゾールが検出された。

## (2)水質試料中のN-フェニルマレイミドの分析 (名古屋市環境科学調査センター)

[概要] N-フェニルマレイミドは、耐熱性樹脂原料、ゴム加硫性改質剤、殺菌剤、医薬、農薬及び染料の中間体としての用途がある物質で、化管法の第1種指定化学物質に指定されている。本研究では、環境水中に存在するN-フェニルマレイミドをLC/MSで定量する方法を検討した。

[方法] 水質試料100 mLをフラスコに取り、6 mol/L塩酸100  $\mu$ Lを加えて混和した後、固相カートリッジで抽出する。精製水で洗浄後、窒素ガスにて乾燥し、メタノール5 mLで溶出する。精製水を添加して10 mLに定容したものを試験液とし、LC/MSで測定する。

[結果] 本法によるIDLは1.16 pg (試料換算濃度は0.058  $\mu$ g/L)であり、2~1000 ng/mLの範囲で検量線の直線性が確認された。また、本法のMDLは0.13  $\mu$ g/L、MQLは0.35  $\mu$ g/Lであった。N-フェニルマレイミドを海水に100 ng添加した時の回収率は97% (CV値3.6%)であった。本法により、名古屋市の河川水及び海水を測定したところ、いずれの地点も不検出であった。以上の結果から、本法は水質試料中に含まれる0.1  $\mu$ g/L程度のN-フェニルマレイミドを検出できるものと判断される。また、本物質は非常に加水分解が進みやすく、試料採取後は速やかに塩酸を添加し、保存の際は-30 $^{\circ}$ Cの冷凍庫内で十分に保冷をする等、注意が必要である。

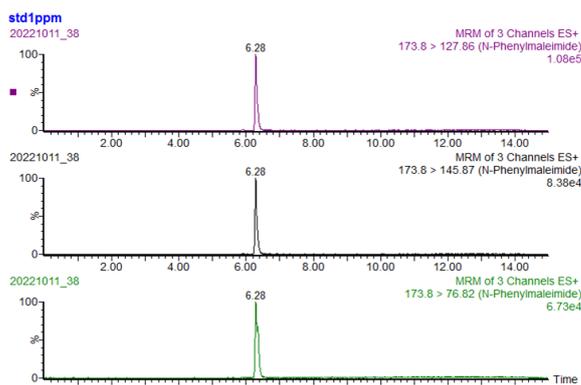


Fig. 2 1  $\mu$ g/mL標準溶液のクロマトグラム

## (3)水質試料中のジアクリル酸ヘキサメチレンの分析 (名古屋市環境科学調査センター)

[概要] ジアクリル酸ヘキサメチレンは、アクリル樹脂のモノマーや高分子改質剤として使用されている。化審法届出公表値では、2012年から2019年まで「1,000トン未満」の製造・輸入量であると示されている。この物質が環境中に排出された場合、23%程度が水質に、0.1%程度が底質に、76%程度が土壌に存在すると分配予測されている。但し、それぞれの環境中における存在量は、現在不明である。このように、この物質が底質や土壌へ吸着し、継続的に水質へと移行することで環境中に残留する可能性がある。そこで、水質中のジアクリル酸ヘキサメチレンをLC/MS/MSで定量する方法を検討した。

[方法] 水質試料1~100 mLを分取し、超純水で希釈して200 mLに定容する。さらに、ヒドロキノン-アセトニトリル溶液(100 mg/L)を添加した。このヒドロキノンは、重合禁止剤として使用されているものである。試料水を、Oasis HLB Plusで固相抽出してからヒドロキノン-アセトニトリル溶液(0.5 mg/L)で溶出した。得られた試験液をヒドロキノン-アセトニトリル溶液(0.5 mg/L)を用いて10 mLに定容し、LC/MS/MSで定量を行った。

[結果] 水質試料が100 mLの場合、添加回収率が50%程度となった。さらに、水質試料が10 mLの場合、回収率は70%程度となった。一方、水質試料が1 mLの場合では、良好な結果が得られた。これは、試料水中のマトリックス成分によるイオン化抑制(イオンサプレッション)の可能性が示唆された。そこで、確認試験を実施した結果、イオン化抑制が確認された。また、3日間程度の試料の保存性試験を実施した結果、重合禁止剤としてヒドロキノンを添加することである程度重合を抑制して損失を抑えることができることも分かった。

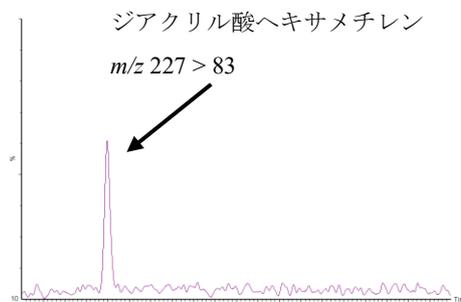


Fig.3 0.05 ng/mL標準液のクロマトグラム

## 残留農薬検査における前処理方法の検討

岩手県環境保健研究センター 衛生科学部 ○川村あさひ 後藤吉乃

### 1 はじめに

当センターの食品中の残留農薬検査における前処理方法は、厚生労働省が定める通知試験法<sup>1)</sup>により実施していたが、株式会社アイスティサイエンスが開発したSTQ法(Solid Phase Extraction Technique with QuEChERS method)への移行を検討することとした。

STQ法は、簡便で迅速性等に優れた手法であるため、この試験法を採用することにより、有機溶媒使用量の削減や分析時間の短縮による業務の効率化を図ることができる。

STQ法を採用するためには、「妥当性評価ガイドライン<sup>2)</sup>」に基づき、適正な結果を出せる試験法であるのか、妥当性を評価する必要がある。当センターの残留農薬検査は、GC-MS/MS及びLC-MS/MSで測定をしていることから、STQ法の妥当性を評価するには、GC-MS/MSで測定するSTQ GC-B法及びLC-MS/MSで測定するSTQ LC法の両方を評価する必要がある。今般、STQ GC-B法の妥当性評価が完了したので、その概要を報告する。

### 2 方法

#### (1) 妥当性評価及び添加回収試験の方法

試験対象の農薬は、現在収去で検査している60項目の他に、96項目を追加し、合計156項目とした。

代表的な食品として10品目を選定し、妥当性評価を実施し、それ以外の品目(これまでに検査対象としてこなかった品目を含む)については、添加回収試験を行った(表1)。

品目毎に、試験対象である農薬を含まない試料(ブランク試料)に試験対象の農薬を添加した試料(添加試料)を調製し、STQ GC-B法に従い試験を行った。

妥当性評価は1日1回(2併行)、5日間の試験を、添加回収試験は1日1回(5併行)の試験を実施し、その結果から、選択性、真度(回収率)、精度及び定量限界の性能パラメータを求め、それぞれの目標値に適合しているかを確認した。

表1 試験別の対象品目

	対象品目数	対象品目
妥当性評価	代表食品 10品目	ほうれんそう、きゃべつ、えだまめ、きゅうり、じゃがいも、トマト、なす、ピーマン、りんご、オレンジ
添加回収試験	収去対象 12品目	レタス、アスパラガス、はくさい、しゅんぎく、さやいんげん、さやえんどう、こまつな、ぶどう、なし、バナナ、グレープフルーツ、パイナップル
	収去対象外 5品目	だいこん、にんじん、とうもろこし、かぼちゃ、かき

#### (2) 試験方法

STQ法の検査フローを図1に示す。

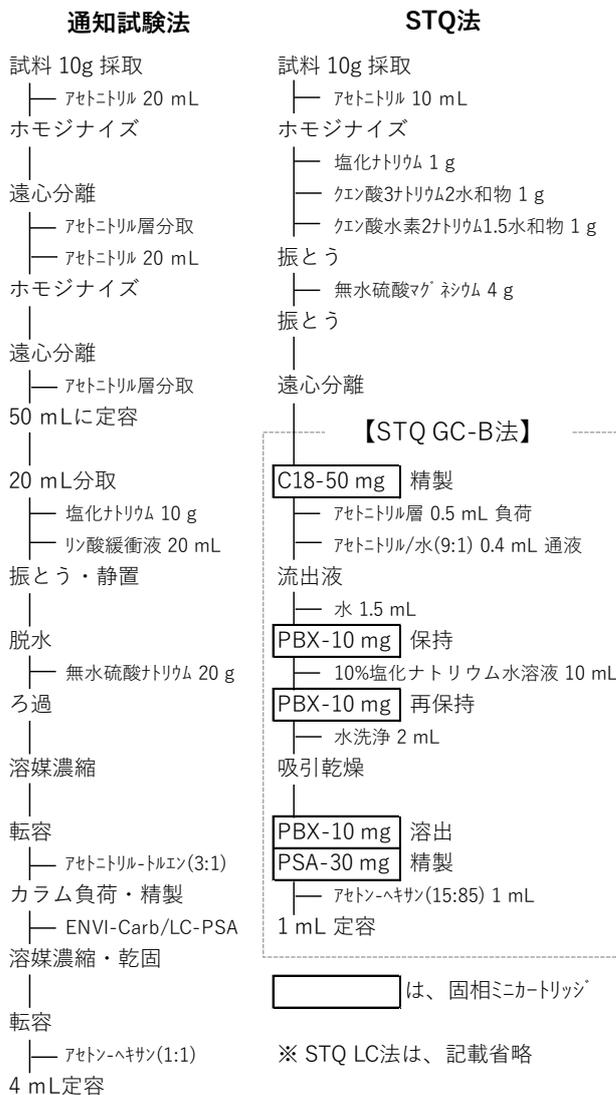


図1 試験法別の検査フロー

### (3) GC-MS/MS 測定条件

GC-MS/MS の測定条件を表 2 に示す。

表 2 GC-MS/MS 測定条件

機 器	GC : Agilent社製 7890B MS/MS : Agilent社製 7000D
キャリアガス	ヘリウム
注入口温度	270℃
オープン温度	80℃ (1 min) - 20℃/min - 140℃ - 4℃/min - 200℃ - 8℃/min - 300℃ - 20℃/min - 310℃ (5.5 min) → 310℃ (ポストラン5 min)
トランスファーライン温度	290℃
カラム	Agilent社製 VF-5MS (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)
注入モード	スプリットレス
試料注入量	2 μL
イオン化方式	EI (70 eV)
イオン源温度	320℃
測定モード	MRM

## 3 結果

### (1) 妥当性評価

妥当性評価の結果を図 2 に示す。

代表的な食品として選定した 10 品目の妥当性が確認された農薬は 94/156 項目で、その内訳は、収去項目 40/60 項目、収去項目以外 54/96 項目となった。

オレンジは他の品目と比べて不適合となる項目が多くなった。

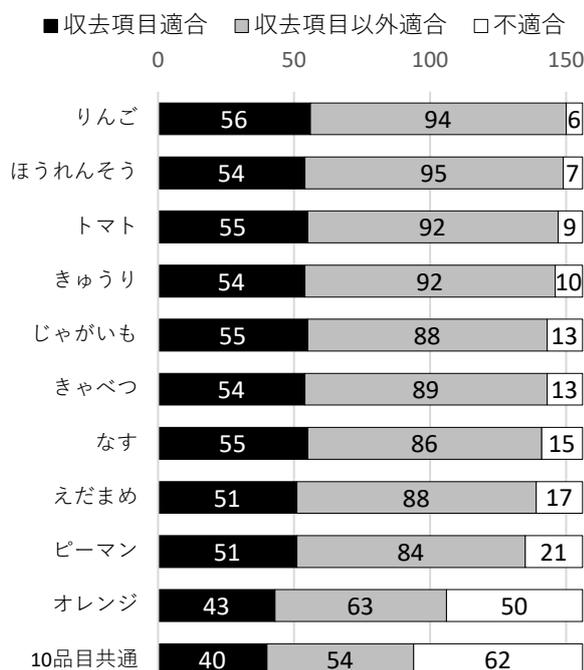


図 2 妥当性評価結果

### (2) 添加回収試験

添加回収試験を行った 17 品目について、3(1)で妥当性が確認された農薬 94 項目のうち、不適合となった項目数を表 3 に示す。

グレープフルーツ以外の 16 品目（収去対象外の 5 品目を含む。）については、不適合となる項目が少なく良好な結果が得られた。

グレープフルーツは、妥当性評価を行ったオレンジ同様、不適合となる項目が多くなった。

表 3 添加回収試験結果

品目	不適合項目数
レタス、はくさい、しゅんぎく、こまつな、パイナップル、だいこん、にんじん、とうもろこし、かぼちゃ、かき	0
アスパラガス、さやいんげん、さやえんどう、ぶどう、なし、バナナ	1
グレープフルーツ	6

## 4 まとめ

本研究の結果、STQ 法でも、多くの農薬成分の定量が可能であることが示された。

オレンジとグレープフルーツは他の品目と比べて不適合となる項目が多かったが、これは柑橘類に含まれるフラボノイド類などの夾雑成分の影響と推定される。STQ 法の特徴として、このような成分を取り除くための固相ミニカートリッジを追加して試験を行うこともできるため、今後その実施も検討していきたい。

本県では、令和 5 年度から食品中の残留農薬検査に STQ 法を採用し、残る STQ LC 法の妥当性評価を併行して進めながら対応している。

また、ヘリウムの不安定供給及び価格高騰の問題により、GC-MS/MS 分析のキャリアガスをヘリウムから変更せざるを得なくなったため、本県では代替ガスとして水素を採用することとした。これにより、STQ GC-B 法の妥当性評価をやりなおす必要があり、これについても対応しているところである。

今後、妥当性評価を完了した後は、さらに検査対象品目の拡充を進め、本県の食の安全を支えるために必要な試験検査体制の充実強化を図っていくこととする。

(参考文献)

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全全部長通知「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号)

## 岩手県におけるニホンジカの生息密度指標の傾向と地域間差

## Trend and differ between regions of sika deer density index in Iwate Prefecture,2019-2022

○鞍懸重和<sup>1</sup>・千崎則正<sup>1</sup>・山内貴義<sup>2</sup><sup>1</sup>岩手県環境保健研究センター・<sup>2</sup>岩手大学農学部

岩手県では、2020年度以降にニホンジカ(*Cervus nippon*)を2万頭以上を捕獲している。そのためシカの個体群動態に影響している可能性があるが、生息密度指標の傾向について検証されていない。そこで、生息密度指標である糞塊密度が、捕獲圧を高めた前年の2019年以降において減少傾向が見られるか調査した。また、管理ユニットである奥羽山脈地域(OU)と北上山地北部地域(KN)、また北上山地南部地域を五葉山周辺(G)とそれを除いた五葉山南部地域(KS)に分割した4地域における、糞塊密度の地域間差を明らかにすることを目的とした。解析は、2019年から2022年の糞塊密度を目的変数、管理ユニット及び2019年を基点とした経過年数を説明変数、誤差分布をポワソン分布、調査地点をランダム変数とした一般化線形混合モデルにより行った。その結果、経過年で有意に負の効果が認められた。また地域ごとの糞塊密度はG、KS、KN、OUの順に有意に高かった。これらのことから2019年以降岩手県ではニホンジカの減少傾向が見られること、また分布に地域差が認められることが示唆された。減少傾向は2020年以降の捕獲数の上昇、OUの糞塊密度の低さは多雪地域であること、またG、KS、KN順での糞塊密度の高さは、分布拡大の変遷を表すものと推察された。今後は捕獲数を維持しつつ、生息密度が高い地域を重点的に捕獲することが望まれる。

(599文字)

## 2023 年日本鳥学会 発表要旨

## 北上高地におけるイヌワシの巣の特徴と繁殖成績

前田 琢 (岩手県環境保健研究センター)

岩手県北上高地では、これまでに計 34 つがいのイヌワシの生息が確認され、107 個の巣の存在が明らかになっている。このうち 67 個は岩棚に、40 個は樹上に造られている。また、標高が明らかな 92 巣についてみると、179～844m の範囲に分布し、平均値は 532m であった。こうした巣の形態や標高の違いによって、抱卵期以降の繁殖成績（産卵が確認された事例における雛の巣立ち成否）がどの程度予測可能か検討した。2002～2022 年に確認された 242 件の産卵（抱卵開始）事例のうち、雛が巣立ちに至ったのは 73 件だった。これらの記録を応答変数、巣の形態と標高を説明変数、つがい差をランダム効果として、一般化線形混合モデルによるロジスティック回帰を行なった結果、標高のみを用いたモデルが最も予測が良く、巣の形態を含めると予測が悪くなった。標高の低い巣ほど繁殖に有利である一方、岩棚か樹上かの違いは繁殖成績に影響していない傾向が示された。しかし、前期（2002～11 年）と後期（2012～22 年）に事例を分けると、後期には標高による有意な予測はできなかった。

演 題： ゆでたまごの製造に指定外添加物 (DDAC) を使用した事例の対応について

所属 氏名：岩手県環境保健研究センター 後藤 吉乃

(発表要旨)

四級アンモニウムの陽イオン性界面活性剤であるジデシルジメチルアンモニウムクロリド (以下、「DDAC」という。) は、動物用医薬品として鶏体や鶏舎、機械器具などの消毒等のほか、食品製造加工施設内の殺菌消毒等に広く使用される殺菌消毒剤である。

当該成分は、食品添加物としての指定はなく、食品の製造加工工程での使用が認められていない。しかし、平成25年度に県内で、惣菜製造業者が味付けゆでたまご表面へのかびの発生を防ぐことを目的に、茹で汁にDDACを添加しゆでたまごを製造するという指定外添加物使用違反の事例が発生した。当時、保健所からの検査依頼があったが、当所ではDDAC分析法を確立していなかったため、試験実施を断念した経緯がある。

令和4年度、保健所から平成25年度と同様の違反事例疑いによる試験実施の要請があったことから、ゆでたまごに含まれるDDACの検査法を検討し、妥当性評価試験を行ったので、その概要を報告する。

## NGS（次世代シーケンサー）を用いた食中毒原因キノコの特定向けて

○宮手 公輔

(岩手県環境保健研究センター)

### 〔目的〕

当センターでは、植物性自然毒を起因とする食中毒の原因究明体制の構築を目指して検討を進めており、これまでに LC-MS/MS による植物毒・キノコ毒 29 成分の一斉分析法や PCR 法によるキノコ種特定法について検討してきた。

PCR 法では、未調理の生鮮キノコであればユニバーサルプライマーを用いて増幅した DNA をサンガーシーケンス法で配列特定できるが、複数のキノコが混在した調理品等のキノコ混合物では、キノコ種を特定する際にキノコ種毎に特有のプライマーを準備する必要があり、これを整備することは現実的ではない。

今般、キノコ混合物に含まれるキノコの判別手法として、NGS（次世代シーケンサー）を用いた分析手法を試みたのでその概要を報告する。

### 〔方法〕

#### 1. 試料調製

小売店で購入したエノキ、エリンギ、シイタケ、ヒラタケ、ブナシメジ及びマイタケの6種のキノコを用い、以下により試料を準備した。

- ①各キノコを細切し約 100 mg を別々に分取しバイオマッシャー II (Nippo 社製) を用いて摩砕した。(各キノコ試料)
- ②1.5 mL のエッペンチューブに細切した6種のキノコを約 20 mg ずつ分取しバイオマッシャー II を用いて摩砕した。(混合試料)
- ③自家製のシイタケ入り味噌汁の汁を 1.5 mL のエッペンチューブに 100  $\mu$ L 分取した。(味噌汁試料)

#### 2. DNA の抽出・精製

各試料は、Qiagen 社製 DNeasy Plant Mini Kit

を用いてプロトコールに従い DNA の抽出精製を行った。

#### 3. PCR 増幅

PCR マスターミックスに Invitrogen Platinum II Hot-Start PCR Master Mix(2X) (サーモフィッシャー社製) を用い、Fig. 1 により増幅反応液を調製し増幅反応を行った。プライマーはユニバーサルプライマーとして報告されているものとして F-Primer (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3')、R-Primer (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') を用い、5.8S 領域を含む ITS 領域を増幅した。

#### 4. NGS によるデータ採取

NGS 分析は、機器に Nanopore 社製 MinION Mk1C、シーケンシングキットに SQK-LSK109 を用いて行った。3 で得られた各試料について End Prep 処理のちバーコーディング処理を行い、全試料を混合した。混合液を Adapter 結合処理したのち MinION Mk1C のフローセルにアプライし、run 時間を 4 時間として分析した。

#### 5. データ解析

データ解析は、プログラミング言語 Python を用いて行った。4 の分析において得られたデータのうち、ベースコーリング後の fastq.gz ファイルを構築したプログラムに読み込み、得られたシーケンスデータの数 (Count 数)、塩基長の最大値、最小値及び平均値を確認した。各試料のシーケンスデータは Count 数が 1000 以上のものはランダムに 1000 個抽出し、PairwiseAlignment ツールを用いて類似度をもとにクラスタリング (分類) を行った。得られたクラスタのうち構成する Count 数が 5 個以上の各クラスタから得た代表配列について BLAST 検索を行った。

**[結果]**

NGS 分析で得られたシーケンスデータの個数、最大塩基長、最小塩基長、平均塩基長、得られたクラスターの個数及びBLAST 検索結果として相同性や Taxonomy から判定された種を Table 1 に、シーケンスで得られた塩基長分布の例として②の混合キノコ試料の分布を Fig. 2 に示す。

味噌汁を除く試料では 5964~19431 個のシーケンスデータが得られ、ユニバーサルプライマーで増幅したと推測できる 600~1000 bp の塩基長のデータが多く得られていることを確認した。①の各キノコ試料ではそれぞれ 5~6 のクラスターが得られ、いずれも BLAST 検索により試料としたキノコであると判定できた。また、②の混合キノコ試料においてもキノコ 6 種を結果として得ることができた。③味噌汁試料ではシイタケの他、カワラタケやトルラ酵母のクラスターが得られた。

**[考察]**

今回、市販のキノコ 6 種を混合した試料から DNA を抽出・精製しユニバーサルプライマーを用いて増幅した反応液の NGS 分析により、含まれるキノコを特定できる可能性が示された。また味噌汁試料からシイタケの他に得られたトルラ酵母データは出汁調味料の原材料の酵母エキス由来のものと考えられたが、カワラタケは不明であった。

本検討での最大の難点として挙げられたのが NGS から得られるデータの解析手法であった。NGS メーカーが提供している解析ツールではキノコがデータベースに搭載されていなかったため

Python を用いて解析を行ったが、Python では遺伝子解析用のライブラリや手法が数多くあり、どの手法を選択するかについて試行錯誤を重ねた。今般、当センターで採用した手法以外にも適切な解析手法がある可能性があり、今後も検討を要すると考えている。

**[まとめ]**

キノコ混合物試料から DNA を抽出・精製し、ユニバーサルプライマーを用いて増幅したのち NGS 分析することにより、含まれる複数のキノコ種を特定できることが示唆された。今後、毒キノコや調理食品を用いて検証を行い、食中毒発生時のスクリーニング手法として適用できるか検討する。

○ 増幅反応液	
Platinum II Hot-Start PCR Master Mix(2X)	12.5 μL
100 μM F-Primer	0.25 μL
100 μM R-Primer	0.25 μL
Template DNA	2.0 μL
DW	10.0 μL
	計 25 μL
○ 増幅温度	
94°C, 2min	
→ [94°C,15sec → 60°C,15sec → 68°C,30sec]×30cycles	
→ 4°C,∞	

Fig. 1 PCR 増幅条件

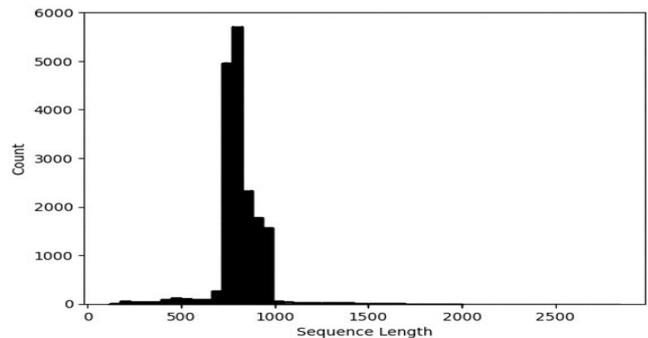


Fig. 2 混合キノコ試料の塩基長分布

Table 1. 混合キノコ試料の塩基長分布

sample	シーケンスデータの概要				得られた		BLAST検索結果 <sup>1)</sup>
	Sequence count	Max Length	Min Length	Average Length	クラスター数		
エノキ	15375	3278	180	903.3	5	Flammulina velutipes(Flammulina filiformis) [5]	
エリンギ	11094	2651	145	804.9	6	Pleurotus eryngii [6]	
① シイタケ	8115	3055	150	914.5	5	Lentinula edodes [5]	
ナメコ	15405	2778	140	809.6	6	Pholiota nameko(Pholiota microspora) [6]	
ブナシメジ	19431	2774	139	791.8	6	Hypsizygus marmoreus [6]	
マイタケ	5964	3140	131	784.4	6	Grifola frondosa [6]	
② 混合キノコ	17692	2845	119	810.7	20	Flammulina velutipes(Flammulina filiformis) [5], Pleurotus eryngii [4], Lentinula edodes [1], Pholiota nameko(Pholiota microspora) [1], Hypsizygus marmoreus [3], Grifola frondosa [6]	
③ 味噌汁	417	1512	204	754.1	8	Lentinula edodes [4], Trametes versicolor [2], Cyberlindnera jadinii [2]	

1) 【 】内は、分類されたクラスターの数

# 地下水中の鉛起源推定手法の確立について

岩手県環境保健研究センター 長澤敦・伊藤朋子

## 1. はじめに

岩手県の地下水概況調査において、鉛はヒ素と並んで検出頻度が高い元素であり、報告下限値 (0.002 mg/L) を超えて検出した地点について、毎年数件の汚染井戸周辺地区調査を実施している。

汚染井戸周辺地区調査は、汚染の範囲や汚染原因の推定を目的としているが、周辺井戸の調査だけでは鉛の発生源を究明するのは難しい。このため、汚染原因不明のまま、継続監視調査を長期間実施している地点が複数存在している。

地下水は、通常、井戸所有者宅で地下水層から給水装置を介して採水している。地下水中の鉛の発生源はいくつか想定されるが、過去の調査において、給水経路内での汚染が疑われる事例があった。

このことから、本研究では、主に給水経路内での鉛の溶出影響に着目して、地下水中の鉛の起源推定方法を検討したので、これを報告する。

## 2. 調査方法

### 2.1 試料

【地下水】**初流試料**: 地下水調査地点において、蛇口の開栓直後に採取した配管滞留水を含む試料。**通常試料**: 上記地点で配管滞留水を十分通水した後、採取した試料。**通水量毎の地下水試料**: 蛇口の開栓直後から一定の通水量毎に250 mL ずつ採取した試料。

【坑廃水】県内に所在するA休廃止鉱山の坑道から湧出する処理前の廃水 (自然由来鉛を含む)。

【給水用具浸漬液】ホームセンター等で市販されている黄銅または青銅製の給水用具 (継手、バルブ等) を精製水に一晩浸漬して作成した試料。

### 2.2 測定方法

#### 【鉛及び共存元素濃度の測定】

鉛及び共存元素の濃度測定はICP-MS (Agilent 7700) で行い、試薬は硝酸 1.38 電子工業用、塩酸Ultrapure (関東化学)、元素類の測定用標準液はXSTC-469 (SPEX)、すず標準液1000及び陽イオン混合標準液Ⅲ (関東化学) を使用した。前処理を含む測定の詳細はJIS K 0102の各項に準じた。

#### 【鉛同位体比の測定】

鉛同位体比の測定は、座間味ら<sup>1)</sup>の方法に準じ、上記ICP-MSで積算時間を<sup>206</sup>Pb、<sup>207</sup>Pbは10秒、<sup>208</sup>Pbは1秒、スイープ回数1000回、繰り返して10回で測定した。

同位体比の補正は、鉛同位体標準液 NMIJ CRM 3681-a (産業技術総合研究所) を用いて比較標準化法で行い、野々瀬ら<sup>2)</sup>の方法を参考に、試料3検体を測定するごとに標準試料を

測定し、補正係数の校正を行った。また、測定時の質量差別効果を一定とするため、標準試料と各種試料の鉛濃度は $1.0 \pm 0.1 \mu\text{g/L}$  (1%硝酸溶液) に調製した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 初流試料と通常試料の鉛濃度比較

地下水が給水経路で鉛の溶出影響を受けなければ、初流試料と通常試料の鉛濃度は等しくなるはずである。しかし、初流試料の鉛濃度の方が有意に高値となり ( $p < 0.05$ ,  $n=64$ )、多くの地点で給水用具の溶出影響を受けていることが示唆された。

### 3.2 地下水通水量に伴う元素濃度の変化

給水経路内の溶出影響が、地下水の通水量とともにどのように変化するか確認を行った。例を図1に示す。

給水用具に関連する鉛、銅、亜鉛等の元素が0~10 L通水時まで濃度が高く、20~40 L程度通水後に一定となった。一方、給水用具に関連のないヒ素やほう素では、通水直後からほぼ一定の濃度で推移した。

100 L通水時に検出される鉛が、給水用具の溶出影響のみなのか、地質など他の発生源も関与しているのかについては、濃度変化だけでは判断できない。このため、別の指標による検討が必要であると考えた。

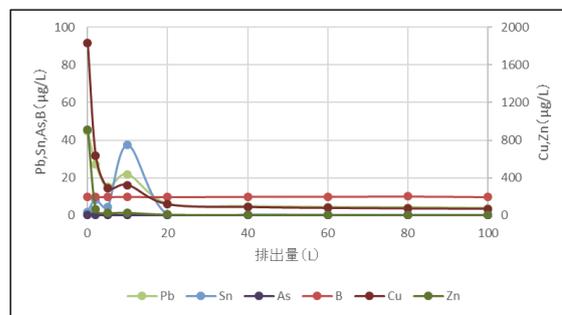


図1 通水に伴う地下水中の元素濃度変化

### 3.3 鉛同位体比による発生源推定

100 L通水時点で検出される鉛が、地下水そのものに含まれるのか、給水用具の溶出影響が続いているのかを判別するため、鉛同位体比を用いて、より詳細な発生源推定ができないか、検討を行うこととした。

発生源による鉛同位体比の違いを調べるため、地下水や給水用具の浸漬液、休廃止鉱山の坑廃水など、各種試料の鉛同位体比を測定した。結果を図2に示す。

今回の検討では、給水経路での溶出影響を強く受けている初流地下水と、鉛を検出した地点の100 L通水時点の鉛同位体比は、ほぼ同じ比率で比較的狭い範囲に集中し、国内非

汚染土壌や国内鉱床鉛、県内の休廃止鉱山坑廃水など、日本固有の鉛同位体比を持つ試料とは明らかに異なる分布を示した。

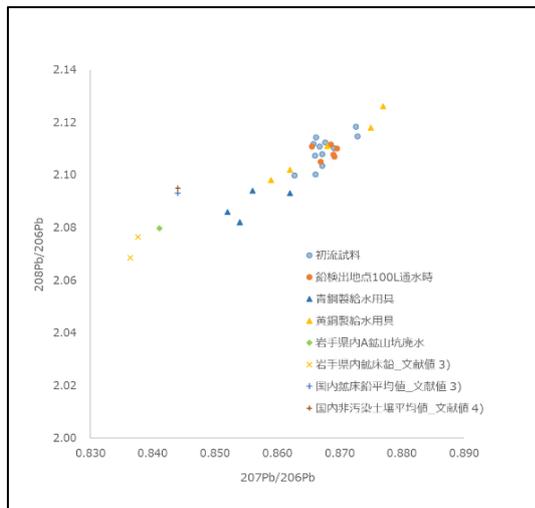


図2 各種試料の鉛同位体比

海外の鉱床鉛は国内の鉛と異なる同位体比を持ち、海外産鉱石が使用される工業製品では、日本固有の鉛同位体比と異なる比率を示す。このため、100 L通水時においても、鉛の検出には給水用具の溶出影響が大きいことが示唆された。

### 3.4 鉛起源推定フロー構築

3.1から3.3の結果に加え、共存元素濃度による給水用具溶出影響の評価や、複数の鉛の発生源があった場合の寄与率算定等について検討を行い、その結果から、地下水中の鉛起源推定フローを図3のとおりまとめた。今回、給水用具の溶出影響と自然由来鉛の推定が可能になったことで、井戸所有者への地下水使用方法の指導等、適切な行政措置に繋げることができると考えている。

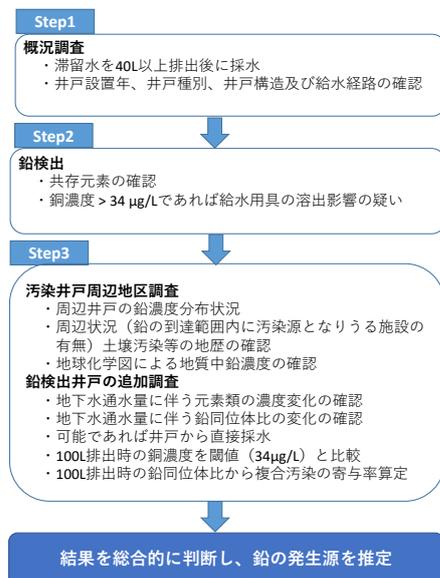


図3 地下水中の鉛起源推定フロー

## 4. まとめ

地下水概況調査で鉛が検出された際に、通水に伴う給水用具由来の元素濃度変化や、同位体比等を用いて、鉛の起源推定を行った。調査の結果、すべての地点が給水用具由来で鉛を検出したものと推察された。また、検討結果をもとに、地下水中の鉛起源推定フローを構築し、給水経路の溶出影響と自然・地質由来の鉛について、発生源や寄与率の推定が可能となった。

岩手県では、鉛の発生源が給水経路由来と判断された場合は継続監視調査の対象から除外できるよう、地下水質常時監視実施細目を今年度改正したところであるが、給水用具由来の判断基準は定めていない。今後は、井戸所有者の同意の取れた県内全ての鉛の継続監視調査地点を対象に本推定フローによる鉛起源の調査を実施し、本フローを判断基準として適用可能か検証し、給水用具由来の判断基準の策定につなげていく。（本稿には掲載していないが、推定フローの検証に係る調査データについて発表予定である。）

## 5. 引用文献

- 1) 座間味佳孝：ICP-MSによる地下水中の鉛同位体比分析法の検討，沖縄県衛生環境研究所報，52，62-67，2018
- 2) 野々瀬奈穂子，日置明治，倉橋正保，久保田正明：同位体希釈/誘導結合プラズマ質量分析法による金属イオン濃度測定の国際比較．分析化学，47，4，239-247，1998
- 3) 佐々木昭，佐藤和郎，G.L. カミング：日本列島の鉱床鉛同位体比，鉱山地質，32，(6)，457-474，1982
- 4) 丸茂克美，江橋俊臣，氏家亨：日本各地の土壌中の重金属含有量と鉛同位体組成，資源地質，53(2)，125-146，2003

## 自然毒による食中毒の検査体制について

○宮手 公輔

(岩手県環境保健研究センター)

### 【目的】

国内では、例年、自然毒に起因する食中毒が多く発生しており、2018年から2022年までの5年間だけでも全国で321件(患者757名、うち死者14名)、本県では12件(患者31名)が報告されている。

細菌やウイルス等を含む全食中毒事案のうち、植物性又は動物性自然毒によるものは、事件数が全体の約7%、患者数は約1%と少ない。一方、死者数の約80%は自然毒によるものであり、他の食中毒と比較してその致死率の高さが特徴として挙げられる。そのため、事案発生時には早期に原因物質を特定し、適切な治療へと繋げることが重要となる。

しかし、自然毒の分析には公定法がなく、各地方衛生研究所等は独自に試験法を検討し、原因究明を行っている状況である。当センターでも、令和3年度から、自然毒による食中毒の早期原因究明に向けた体制の構築を目指し、検討を進めてきた。

今般、これまでの検討結果を取りまとめ、当センターにおける健康危機管理事案を想定したマニュアル(案)を作成したので、その概要を報告する。

### 【方法・結果】

#### 1. LC-MS/MSを用いた毒成分分析方法の検討

毒成分の分析はLC-MS/MSを用いることとし、試験条件は毒成分の性質から植物性自然毒(キノコ毒を含む)と動物性自然毒に分けて設定した。また、植物性自然毒については既報<sup>2)</sup>により、動物性自然毒については鈴木らの方法<sup>3)</sup>により添加回収試験等を実施した。

その結果、Table 1に示す成分について標準品等を整備するとともに、これらの成分については分析が可能であることを確認した。

#### 2. PCR法によるキノコ種の特定制法の検討

毒キノコのなかには、それ自体が毒を持つことは知られているが、毒成分の特定ができていないため、LC-MS/MSによる原因究明が困難なものがある。このことから、LC-MS/MSによる成分分析と並行してDNA解析による種の特定制法を行うこととし、その方法を検討した。

まず、キノコ6種を試料としDNAを抽出・精製を行い、次に、キノコDNAのITS領域を増幅するユニバーサルプライマーを用い、PCRで一定領域を増幅させ、その後、サンガーシーケンス法又はNGS(次世代シーケンス)法により、塩基配列の解析を行った。

その結果、サンガーシーケンス法及びNGS法のいずれにおいても、試料としたキノコ6種を検出することが可能であった。

#### 3. 理化学検査における生体試料取扱規程の整備

自然毒による食中毒が発生した場合、主な検体は調理品や食材であるが、稀に患者の尿、血液、吐しゃ物等の生体試料が搬入されることがある。

生体試料は、微生物部門の試験検査では感染性試料として取り扱うため、安全キャビネット等の設備を用いて検査を行っている。これに対し、理化学検査部門では、感染性試料の取扱いについての基準等が無く、課題となっていたところである。

そこで今後、作業者の安全と設備の汚染防止を図ることを目的に、理化学検査部門における生体試料等の取扱い要領等を策定した。

#### 4. 試験検査等対応マニュアル案の作成

自然毒による食中毒は、発生頻度が細菌やウイルス等に比べて少ないうえに、本県では発生しない年度もある。そのため、人事異動により、事案発生時に対応すべき担当者が自然毒分析の未経験者である状況も考えられ、技術継承が課題となっている。

このことから、これまで行ってきた各分析法の検討結果を踏まえ、試験検査等対応マニュアル案を作成した。これには、食中毒が発生した際の検査方法のほか、検体受入や連絡調整の手順に加え、実際に行った添加回収試験の結果等も明記した。

本マニュアル案作成にあたっては、検査方法において、理化学試験担当者が通常行っていない方法も含まれることから、操作手順に画像を多く掲載した。また、本マニュアルをそのまま試験記録として活用できる形式とした。

##### [考察]

これまで、当センターでは、自然毒食中毒が発生してから試験法を確認していたため、対応が遅れが生じていた。併せて、技術継承が困難であったり、生体試料の取扱い・管理方法が不明確であったりと課題が複数散見された。

今般、理化学検査における生体試料の取扱いを規定するとともに、試験検査等対応マニュアル案を作成した。これらが、従前の課題解決に寄与すると考える。

##### [まとめ]

自然毒による食中毒の原因究明体制の構築に向け、当センターにおける健康危機管理発生時のマニュアル案を策定した。今後は、今年度中にマニュアルの試験運用を行う予定である。併せて内容の精査を行った後、正式な運用を開始することとする。

- 1) 厚生労働省ホームページ：食中毒統計資料
- 2) 宮手，岩手県環境保健研究センター年報第 21 号令和 3 年度
- 3) 第 58 回全国衛生化学技術協議会年会

Table 1. LC-MS/MS 分析対象成分

区分	成分	含有生物種等	
植物性	α-ソラニン α-チャコニン	ジャガイモ	
	アトロピン スコポラミン	チョウセンアサガオ、 エンジェルトランペット など	
	アコニチン メサコニチン ヒパコニチン ジェサコニチン	トリカブト	
	ニコチン	タバコ	
	アミグダリン	アンズ、アーモンド、 梅などの種子	
	ククルビタシン B	ゴーヤ、ユウガオ、 ズッキーニ など	
	ジギトキシン ジゴキシン	ジギタリス	
	グラヤノトキシン I	レンゲツツジ	
	ジオスゲニン ジオスシン	カエデドコロ など	
	リコリン ガラントミン ガラントミノン	スイセン、 タマスダレ など	
	コルヒチン デメコルシン	イヌサフラン、 グロリオサ など	
	ジェルピン シクロパミン	バイケイソウ など	
	フェブリフジン	アジサイ、アマチャ	
	α-アマニチン β-アマニチン ファロイジン	シロタマゴテング、 テングタケ など	
	イルジン S	ツキヨタケ	
	ムスカリン	テングタケ など	
	動物性	テトラミン	ツブ貝
		Cトキシン群 ゴニオトキシン群	麻痺性貝毒 (ホタテガイ等)
		テトロドトキシン	フグ

## 陽イオン性界面活性剤の分析法の検討

岩手県環境保健研究センター ○後藤吉乃、宮手公輔

### 【目的】

令和4年度、県内のそうざい製造業者が、指定外食品添加物である陽イオン性界面活性剤のジデシルジメチルアンモニウムクロリド（以下、「DDAC」という。）を味付き卵の製造に使用し、行政処分を受けた。当該事例は本県で2度目であり、今後も類似事例の発生が懸念される。

そこで、昨年度開発したゆで卵中のDDAC分析法を用いて、DDACと同様に広く消毒剤として使用されている陽イオン性界面活性剤の塩化ベンザルコニウムも分析できないかを検討した。

また、類似事例発生の際に、陽イオン性界面活性剤の故意の使用を判断する材料となるよう、通常市場に流通している鶏の生卵及び卵加工品のDDAC及び塩化ベンザルコニウムによる汚染実態を調査したので、併せて報告する。

### 【方法】

#### 1. LC-MS/MSを用いた塩化ベンザルコニウムの分析

塩化ベンザルコニウムの構造式はFig.1のとおりであり、アルキル基がC<sub>8</sub>からC<sub>18</sub>の混合物として存在する。主成分はアルキル基がC<sub>12</sub>、C<sub>14</sub>及びC<sub>16</sub>と言われているため<sup>1)</sup>、分析対象成分をこれら3成分（それぞれBAC12、BAC14及びBAC16と呼ぶ。）とした。

ゆで卵中の塩化ベンザルコニウムの分析は、昨年度開発したDDAC分析法に則った。前処理方法をFig.2に、測定装置及び測定条件をTable.1に示す。

妥当性評価試験は、厚生労働省通知「妥当性評価ガイドライン」<sup>2)</sup>に従い試験を実施した。すなわち、1試験当たり非添加試料(n=1)、定量下限値相当添加試料(0.01 ppm, n=2)及び鶏卵(可食部)におけるDDACの残留基準値相当添加試料(0.05 ppm, n=2)の試験を行い、これを5回繰り返した。そこで得られた結果から、選択性、真度(回収率)、併行精度、室内精度により妥当性を評価した。

なお、試料は県内で購入した鶏卵を沸騰水浴中で10分間茹で、殻を剥いて粉碎均一化したものを用いた。試料5gを分取し、標準溶液を添加して30分間

放置したものを添加試料とした。検量線用標準溶液は、2%ギ酸含有メタノールを用いて0.5~20 ppb標準溶液の6点を調製した。

#### 2. 市場流通する生卵及び卵加工品の汚染実態調査

令和5年7月、盛岡市内の複数のスーパーマーケットから、鶏の生卵を8種類、温泉卵や味付き卵等の卵加工品を8種類購入し、可食部及び殻におけるDDAC及び塩化ベンザルコニウムを測定した。

### 【結果及び考察】

#### 1. LC-MS/MSを用いた塩化ベンザルコニウムの定量

非添加試料については、妨害ピークは認められなかった。また、添加試料のピークはS/N $\geq$ 10であることを確認した。真度(回収率)、併行精度、室内精度の結果はTable.2に示すとおりで、いずれも妥当性評価ガイドラインの判定基準を満たした。

#### 2. 市場流通する生卵及び卵加工品の汚染実態調査

生卵及び卵加工品の可食部では、測定対象成分はすべて0.01 ppm未満であった。

一方、殻では、Table.3及びTable.4に示すとおり、多くの製品では測定対象成分は0.01 ppm未満であったが、一部の製品では0.01~0.05 ppm検出されるものもあった。

なお、令和4年度の事例では、原料由来のもので殻から0.01~0.02 ppm程度だったのに対し、DDACを防カビ目的で添加した際、殻から1~10 ppmというオーダーでDDACが検出されている。

以上のことから、今後同様の事例が発生した際、生卵及び卵加工品から検出された陽イオン性界面活性剤が、原料由来なのか、故意に添加されたものなのか判断する材料として、本結果が参考となりうると思われる。

### 【まとめ】

昨年度開発したゆで卵中のDDAC分析法を用いて、塩化ベンザルコニウムの主成分も定量可能であることがわかった。

市場流通する生卵及び卵加工品におけるDDAC及び塩化ベンザルコニウムの汚染実態調査では、可食部で

はいずれの成分も 0.01 ppm 未満であることがわかった。殻では、多くが 0.01 ppm 未満であり、検出されたとしても 0.01~0.05 ppm 程度であることがわかった。

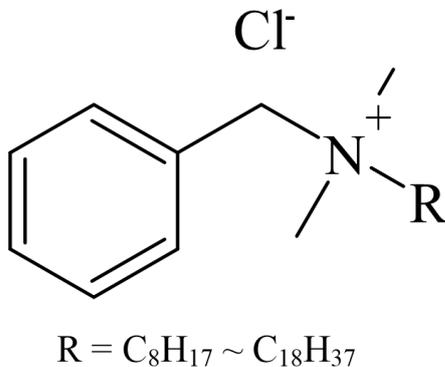


Fig. 1 塩化ベンザルコニウムの構造式

<b>【抽出】</b>	
試料	5 g (50 mL容PP製遠沈管) + 0.2%アンモニア含有メタノール 20 mL ホモジナイズ (11,000rpm, 1min) 0.2%アンモニア含有メタノールで25 mLにメスアップ 遠心分離 (3,000rpm, 5min)
上清	【抽出液】
<b>【精製】</b>	
固相カラム	OASIS WCX (150 mg/6 cc) <コンディショニング> メタノール 3 mL 水 3 mL 0.2%アンモニア含有メタノール 3 mL
抽出液	5 mL負荷 (流出液は廃棄) <洗浄 (流出液は廃棄)> 5%アンモニア水 4 mL (流出液は廃棄) メタノール 4 mL (流出液は廃棄) <溶出 (流出液を採取)> 2%ギ酸含有メタノール 4 mL (流出液を採取) 2%ギ酸含有メタノールで 5 mLに定容
試験溶液	【LC-MS/MS測定液】

Fig. 2 抽出及び精製方法

Table.1 LC-MS/MS測定条件

装置	LC : Shimadzu LC-20AD MS : Sciex Triple Quad 5500
カラム	Imtakt scherzo SM-C18 (2 mm×150 mm, 3 μm)
移動相	A液…20 mMギ酸アンモニウム水溶液 B液…20 mMギ酸アンモニウム含有80%アセトニトリル
グラジエント条件(B液%)	0 min(5%) → 7 min(100%) → 15min(100%) → 16 min(5%) → 20 min(5%)
カラム温度	40℃
流速	0.4 mL/min
注入量	5 μL
イオン化モード	ESI (+)
Spray voltage(V)	4500 (V)
SRM条件	DDAC …326.4 > 186.2 BAC12 …304.0 > 91.2 BAC14 …332.1 > 90.9 BAC16 …360.0 > 90.9

Table. 2 妥当性評価確認結果

成分名	試料中濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
BAC12	0.01	88.5	18.7	19.7
	0.05	92.5	5.1	8.4
BAC14	0.01	87.6	13.9	16.6
	0.05	87.3	5.3	8.9
BAC16	0.01	80.8	9.1	14.1
	0.05	79.1	5.4	11.0

Table. 3 陽イオン性界面活性剤の検出結果 (生卵の殻)

生卵	DDAC	塩化ベンザルコニウム		
		BAC12	BAC14	BAC16
A	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
B	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
C	<0.01	0.05	0.02	<0.01
D	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
E	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
F	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
G	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
H	0.03	<0.01	<0.01	<0.01

単位 : ppm

Table. 4 陽イオン性界面活性剤の検出結果 (卵加工品の殻)

卵加工品	DDAC	塩化ベンザルコニウム			備考
		BAC12	BAC14	BAC16	
A	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	半熟卵
B	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	半熟卵
C	<0.01	0.01	0.02	0.01	半熟卵
D	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	半熟卵
E	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	ゆで卵
F	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	ゆで卵
G	—	—	—	—	ゆで卵(殻無し)
H	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	ゆで卵

単位 : ppm

【参考文献】

- 1) 株式会社島津製作所 アプリケーションニュース  
「消毒剤中ベンザルコニウムの高速分析」  
[https://www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/pim/pim\\_document\\_file/an\\_jp/applications/application\\_note/17752/an\\_01-00249-jp.pdf](https://www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/pim/pim_document_file/an_jp/applications/application_note/17752/an_01-00249-jp.pdf)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(平成 22 年 12 月 24 日食安発 1224 第 1 号)

# 岩手県における海浜性希少植物の消失リスクの推移と 生育域外保全に関する取り組み — 絶滅する前にできること —

○小山田智彰・鞍懸重和・千崎則正（岩手県環境保健研究センター）

## 1. はじめに

本県は 624 種の希少植物が絶滅危惧種として「いわてレッドデータブック (IRDB) <sup>1)</sup>」に記載されており、岩手県環境保健研究センターは、絶滅危惧種の保護及び監視に向け、現地確認や臨時的保護作業、関係機関が行う保護措置への技術指導の役割を担っている。

東日本大震災津波が発生した 2011 年に行った調査では、津波によって消失した「海浜性希少植物 (以下、希少植物)」は、砂浜・礫浜を自生地とするものが多く、消失した希少植物の生育基盤の改変の大きさと個体数の減少には正の相関がみられた <sup>2)</sup>。

2022 年までに行った希少植物の残存調査及び消失リスク評価 <sup>3)</sup> では、全体の消失リスクが減少傾向である中、7 地点で希少植物の自生地点の消失が確認され、「エゾノコウボウムギ」、「エヅツルキンバイ」及び「オオアカバナ」について消失が予測された <sup>4)</sup>。

これらのことから震災後においても依然として希少植物の自生地点の消失が継続しており、消失の危惧される自生地点が散見される状況にあるが、その消失要因については報告されていない。

そこで本発表では、2016 年から継続的に実施している IRDB に記載されている希少植物を対象とした希少植物の残存調査と消失リスク評価の結果を報告するとともに、この間に消失した消失地点の消失要因を報告する。

また、消失リスク評価により抽出された希少植物において、県内に残存する自生地が 1 ヶ所となり、自生地に 5 個体のみとなったオオアカバナに

ついては、生息域外保全の措置として自生地で採種・保存していた種子を用いて明所暗所による発芽試験及び育苗試験を実施後、「自生地播種」を行うとともに、試験地内で発芽させた苗の移植 (以下、「野生復帰 <sup>5)</sup>」) を行った。

## 2. 方法

### 1) 消失リスク評価による希少植物の評価

2016 年及び 2019～2023 年の 5 月から 9 月に、IRDB 記載植物を対象とした希少植物について調査した (図 1)。調査は、希少植物の有無、個体数を記録した。消失した地点については周囲の状況から消失した要因を判断した後に記録し、要因を人為・自然に区分し集計した。さらに、これまで

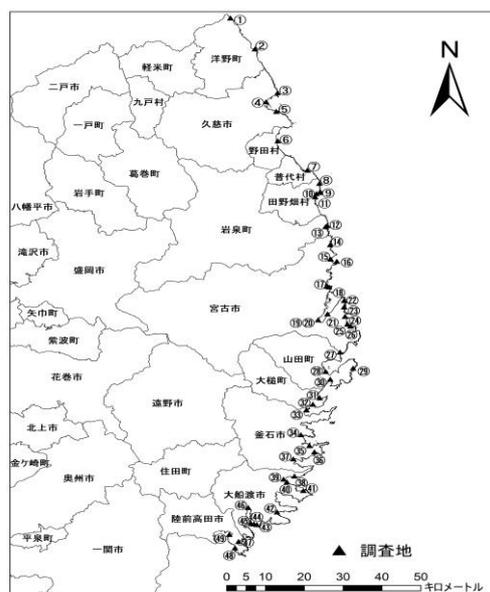


図 1 希少植物の調査地点 (2023 年 49 地点)

の調査から消失に関係する項目、つまり、「繁殖」・「立地」・「採集」・「個体数」・「自然災害の影響」・「生育基盤の変化」の6項目を5段階で評価した消失リスク評価を実施し、得点が高いほど消失リスクが高い種として評価した<sup>4)</sup>。尚、得られた消失リスク得点は、全調査地点及び2016年から同一の調査地を継続してモニタリングしている長期観測地点について、年ごとに合計得点の平均値を算出した<sup>4)</sup>。

## 2) オオアカバナの野生復帰試験

東日本大震災が発生した2011年の調査で、本県では過去に記録のなかったオオアカバナを確認したが、2023年の調査では「角の浜漁港」のオオアカバナが消失していた。また、県内唯一の自生地となった「久慈川河口」のオオアカバナも残存5本中開花1個体であることから、県内絶滅の回避の取り組みとして保存種子を用いた自生地播種を行い、あわせて同種子から発芽させた苗の移植を行った。

オオアカバナの種子については、消失リスク評価によって消失が予測されたことから、久慈川河口の自生地から2021年10月に採種し、また、角の浜漁港の自生地から2022年11月に採種している。種子は、研究室内で、環境省新宿御苑管理事務所が実施している種子保存の方法に沿って調整と乾燥処理を行い、種子保管庫に保存した<sup>6)</sup>。この種子を20粒ずつ用いて、明所と暗所の条件に分けて発芽試験に取り組み、発芽した苗を栽培試験地で育苗した。

自生地保全の措置として、2023年10月25日に角の浜の自生地において、保存種子200個をペーパーシートに付着させて播種した。久慈川河口においても保存種子200個を播種した。さらに、発芽試験で発芽・育苗していた苗を野生復帰として移植した。

## 3. 結果

### 1) 消失リスク評価による希少植物の評価

消失リスク評価では、6項目の合計得点が15点以上に達すると消失する可能性が高まる<sup>4)</sup>。

2023年の消失リスク評価は、全体及び長期観測地点の消失リスクの平均点が12.4及び11.8であった(図2)。

2023年の残存調査により新たに消失した自生地点は、織笠川のエゾツルキンバイ、角の浜のオオアカバナを含めた4地点であった(表1)。

全体の消失リスク評価を開始した2016年から2019年、2022年、2023年の調査で消失した希少植物と要因をまとめた結果、11地点において希少植物が消失し、そのうち54.5%が人為的な要因(開発行為)による消失であった(表1)。その具体的な事例として、「道路工事による土地改変」、「河川の河道掘削による水量変化」、「護岸工事による土地改変」、「資材設置による植物体への被圧」などが確認された。

表1 消失した希少植物と消失の要因

地名	種名	県内の残存自生地数	2016年	2019年	2020年	2021年	2022年	2023年	消失要因	区分
角の浜	オオアカバナ	1	10	9	9	18	18	消失	虫による食害	自然
久慈川	ハマボウフク	8	18		24	消失			復興道路に改変	人為
小本海岸南側	ハマボウフク	8	18	消失					自然消失	自然
太田浜	エゾオグルマ	0	20	21	消失				台風19号による浸食	自然
重茂漁港	エゾオオハコ	9			12	16	消失		復興道路に改変	人為
織笠川	エゾツルキンバイ	1	20	14	20	16	20	消失	河川改変による水量の変化	人為
大畑川	カラヂシャ	2	17	19	消失				護岸工事	人為
甲子川	カラヂシャ	2	21	16	17		15	消失	河川改変による水量の変化	人為
小壺崎	ハマハタザオ	10				14	12	消失	自然消失	自然
盛川	カラヂシャ	2	20	17	消失				自然消失	自然
浜漁港トイレの横	ハマナシコ	2	24	21	消失				漁具の設置	人為

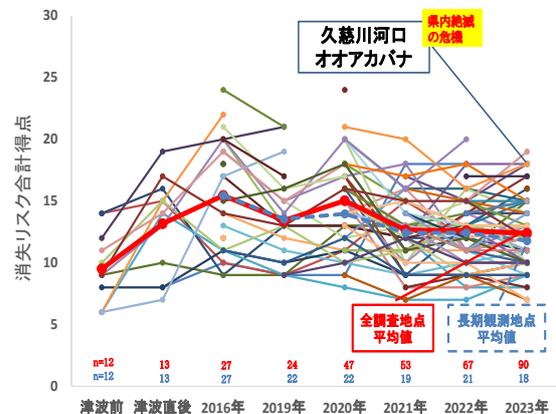


図2 2023年オオアカバナの消失リスク評価

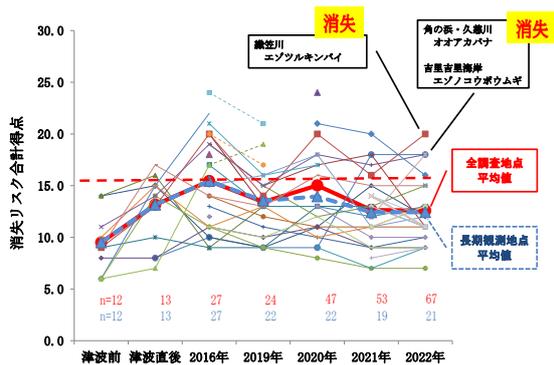


図3 2022年の消失リスク評価から消失が予測された希少植物

消失した希少植物（表 1）のうち、織笠川のエゾツルキンバイと角の浜のオオアカバナは 2022 年の消失リスク得点から消失する可能性が高いと予想していた（図 3）。特にオオアカバナについては、県内唯一の自生地となった久慈川河口の消失リスク評価の合計得点が 18 点と高いことから、県内絶滅に直面している（図 2）。

## 2) オオアカバナの野生復帰試験

保存していた種子を利用して発芽試験に取り組んだ。自生地の照度測定と土壌含水率測定より、オオアカバナは明るく土壌水分の多い環境を好む傾向が見られた。また、種子の顕微鏡観察より種子表面に小さな突起（図 4）が多く観察されたことから土壌表面に付着する性質を持った光発芽性種子<sup>7)</sup>であると推察した。これらの結果を参考に保存種子を用いて明所と暗所による発芽試験を行った結果、光を当てた条件においてのみ 20%の発芽が認められ、4 個体の苗を生産することができた。

本試験に用いた種子は、令和 6 年 2 月 17 日に環境省新宿御苑管理事務所に提出することにしており、同事務所の協力をいただきながら、種子保存を進めることにしている。

## 4. 考察

### 1) 消失リスク評価による希少植物の評価

本研究は、大震災の発生前から岩手県沿岸部で

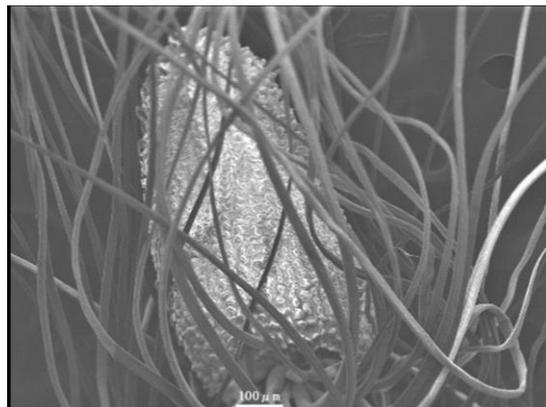


図 4 オオアカバナの種子（角の浜漁港より採種）

確認していた希少植物の被害状況を把握するために始めたものである。その中で取り組んだ「消失リスク評価」は、調査地点において確認された希少植物の現状と減少要因の把握、さらに、消失する可能性が高まっている希少植物の把握にも役立てられることを確認した。

今年度の調査でも、全体の平均点が 12.4 と多くの自生地点で 15 点を下回り、安定した自生地点が多数確認された（図 2）。一方で、15 点を超える希少植物の自生地は複数地点存在しており、今後も消失リスク評価の結果に注視しながら対象となる希少植物の消失リスクの要因を把握し、保護対策を進めることが重要となる。

## 2) オオアカバナの野生復帰試験

自生地の環境調査、自生地からの採種、種子の調整と保存、明所条件下における発芽の確認により、オオアカバナの種子保存と苗生産が可能であることを立証できたことは、オオアカバナの生息域外保全の手法確立の一助となるものと思われる。一方で、発芽率が 20%であることは安定した苗供給の点で課題になる。オオアカバナの生息域外保全を確実なものにするためにも、発芽法の再確認や発芽率の向上が望まれる。

今後は、自生地播種後の発芽確認や、移植した苗の生存と成長の確認を行って、絶滅回避の取り組み（「岩手方式」；図 5）の有効性を検証しなければならない。

## 5. 最後に

本研究によって、東日本大震災の発生から12年が経過しても希少植物の消失が散見していることが明らかになった。特に自生地が少なく個体数の減少が顕著な希少植物については、リストアップを行いながら保護措置を検討する必要がある。そのためにも、生息域内保全として、対象となる植物の消失リスクの要因に応じた保全措置の検討を行うことや、生息域外保全としての自生地で採種された種子の保存と苗生産の技術開発を確保しておく必要があるだろう。

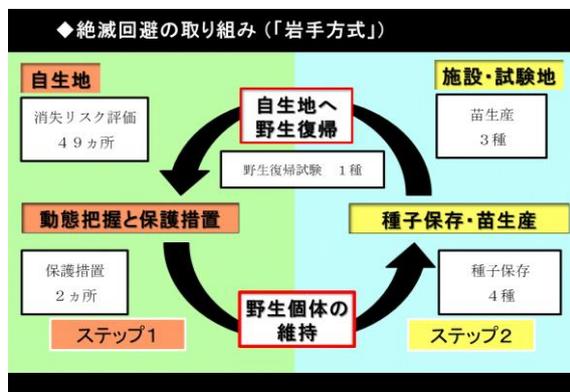


図5 絶滅回避の取り組み（「岩手方式」）

## 謝辞

2011年のオオアカバナ確認について、片山千賀志氏より協力をいただいた。希少植物の種子保存について、環境省新宿御苑管理事務所の温室第一科長・保護増殖専門官の関勝雄氏より協力をいただいた。ここに記して感謝を申し上げます。

## 引用文献

- 1) 岩手県環境生活部自然保護課（2014）いわてレッドデータブック。
- 2) 小山田智彰，鞍懸重和，新井隆介，山内貴義，片山千賀志（2012）東日本大震災の津波による岩手県における海浜性植物の消滅。薬用植物研究 34（1），37-48。

- 3) 小山田智彰，鞍懸重和，千崎則正（2020）岩手県における東日本大震災津波の影響調査：海浜性希少植物の動態。全国環境研会誌 45（4），33-38。
- 4) 小山田智彰，鞍懸重和，千崎則正（2023）東日本大震災後の岩手県における海浜性希少植物の消失リスクの推移。第23回自然環境復元学会全国大会要旨，23-24。
- 5) 環境省（2009）絶滅のおそれのある野生動植物種の生息域外保全に関する基本方針。
- 6) 環境省（2009）絶滅危惧植物種子の収集・保存等に関するマニュアル。
- 7) 松本正雄・大垣智昭・大川清（1998）園芸辞典。165-167。朝倉書店。東京。

## N-alkylpyridinium sulfonates RI による LC-QTOFMS 用自動同定・定量システムの RT 標準化

岩手県環境保健研究センター ○今野博貴\*, 伊藤朋子

大阪市立環境科学研究センター 大方正倫, 市原真紀子

北九州市立大学 宮脇崇, 国立環境研究所 米山美幸, 中島大介

\* hiroki-k@pref.iwate.jp

RT Standardization of an Automated Identification and Quantification System for LC-QTOFMS (AIQS-LC) using N-alkylpyridinium sulfonates RI, by Hiroki KONNO, Tomoko ITO (Iwate Prefectural Research Inst. Environ. Sci. and Pub. Health), Masanori OKATA, Makiko ICHIHARA (Osaka City Research Center of Environmental Science), Takashi MIYAWAKI (The University of Kitakyushu), Miyuki YONEYAMA, Daisuke NAKAJIMA (National Institute for Environmental Studies)

### 1. はじめに

近年開発された LC-QTOFMS 用自動同定・定量システム (AIQS-LC)<sup>1)</sup>は, QTOFMS による精密質量分析とデータベースに登録された MS スペクトル及び保持時間 (RT)を参照して, 標準品を用いることなく多成分一斉分析を行うことが可能なシステムである。このシステムにおいて, MS スペクトルは精密質量測定により選択性が高いものの, RT は使用する装置の差異から生じる室間誤差を補正する機能が無く, 物質の誤同定や誤検出を生じさせる場合があった。本検討ではこの問題を解決するため, N-alkylpyridinium sulfonates (NAPS)を保持指標 (RI)として使い, AIQS-LC の RT を標準化する方法について検討を行った。

### 2. 実験方法

NAPS 標準品 (図 1) 及び AIQS-LC 用内部標準 Mix (IS) を分取・混合し, メタノールで定容した vial 1 と, NAPS, IS 及び農薬混合標準 (Pest) を分取・混合し, メタノールで定容した vial 2 を用意した。

調製した vial 1 及び 2 を, 国立環境研究所, 北九州市立大学, 大阪市立環境科学研究センター, 岩手県環境保健研究センターの 4 機関で門上らの方法<sup>1)</sup>に準拠して測定し, それぞれの RT を取得した。なお, 測定に用いた LC は機関によって型番, ミキシングコイル容量等が異なる。

対象物質の RI は, 下記の式を用いて計算した<sup>2)</sup>。

$$RI = RI_0 + (RI_1 - RI_0) \frac{RT - RT_0}{RT_1 - RT_0} \quad (1)$$

RI, RT は対象物質の保持指標と保持時間。

RI<sub>0</sub>, RT<sub>0</sub> は対象物質の直前に溶出する NAPS の RI 及び RT。

RI<sub>1</sub>, RT<sub>1</sub> は対象物質の直後に溶出する NAPS の RI 及び RT。

### 3. 実験結果と考察

NAPS のクロマトグラムは, 各機関ともグラジエント範囲内にて, アルキル鎖長の増加に伴い一定の間隔で RT が大きくなる再現性の高いパターンを示した。また, vial 1 及び 2 を合計 9 回測定したが, 各測定で RT のばらつきはほとんど見られなかった。このことから, NAPS は各機関で

問題なく測定可能であることが分かった。

次に, AIQS-LC のデータベースを構築した装置を使用している北九大の測定結果を用いて, 大阪市, 国環研, 岩手県における Pest の RT 補正値を計算し, その補正値が実測値とどの程度の差があるか比較を行った。

まず, 式(1)を用いて, 北九大の実測 RT から Pest の RI を計算した。次に, 式(1)中の RI を北九大の計算値, RT<sub>0</sub>, RT<sub>1</sub> に各機関で測定した NAPS の数値を代入し, Pest の RT 補正値を算出した。図 2 に Pest 実測 RT とデータベース登録 RT の差 (補正無し), 及び実測 RT と RT 補正値との差 (NAPS 補正有) を

示す。また, 表 1 にそれぞれの二乗平均平方根誤差 (RMSE) を示す。NAPS による補正を行わなかった場合, いずれの機関も平均してデータベース上の RT より 0.3 min 以上のずれが見られるが, RT 補正値は全ての機関で実測値との差の平均が 0.3 min 以下となり, 測定値のばらつき及び RMSE も小さくなった。このことから, NAPS を用いて, RT を標準化可能であることが示唆された。

### 【謝辞】

本研究は, 環境研究総合推進費 JPMEERF20235002 により実施しました。ここに記して, 感謝申し上げます。

### 【参考文献】

- 1) Kadokami and Ueno, 2019, Anal. Chem. 91 (12), 7749–7755
- 2) Rainer Stoffel et al., 2022, Anal. Bioanal. Chem. 414, 7387–7398

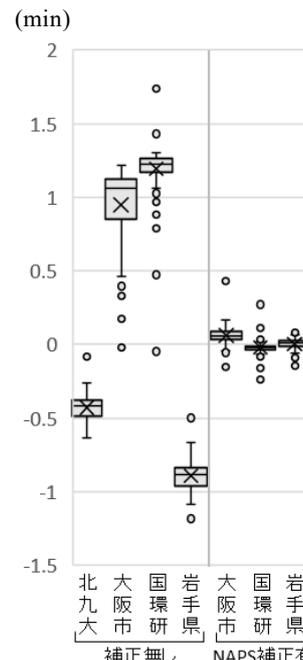


図 2 Pest (113 物質) の RT 残差の BoxPlot

表 1 各機関の RMSE

	RMSE(min)	補正無し	NAPS補正有
北九大	0.44	-	-
大阪市	0.98	0.09	0.09
国環研	1.20	0.05	0.05
岩手県	0.90	0.03	0.03

## 第4章

# 研究発表目録



## 岩手県環境保健研究センター研究発表目録（令和5年度）

### 1 学術雑誌掲載論文

著者	発表年	題目	掲載紙	巻(号)	掲載頁
前田 琢	2023	繁殖期に魚類を利用するイヌワシ	山階鳥類学雑誌	55(1)	1-12
小山田智彰、鞍懸重和、千崎則正	2024	生息域外保全を目的にした絶滅危惧種 チョウセンキバナアツモリソウの 発芽法の開発と保存種子を用いた苗生 産	自然環境復元 研究	14(1)	3-16
Tomoko Takahashi, Mao Akagawa, Ryusuke Kimura, Mitsuru Sada, Tatsuya Shirai, Kaori Okayama, Yuriko Hayashi, Mayumi Kondo, Makoto Takeda, Akihideo Ryo, Hirokazu Kimura	2023	Molecular evolutionary analyses of the fusion protein gene in human respirovirus 1	Virus Research	333	
Tomoko Takahashi, Ryusuke Kimura, Tatsuya Shirai, Mitsuru Sada, Toshiyuki Sugai, Kosuke Murakami, Kazuhiko Harada, Kazuto Ito, Yuki Matsushima, Fuminori Mizukoshi, Kaori Okayama, Yuriko Hayashi, Mayumi Kondo, Tsutomu Kageyama, Yoshiyuki Suzuki, Haruyuki Ishii, Akihideo Ryo, Kazuhiko Katayama, Kiyotake Fujita and Hirokazu Kimura	2023	Molecular Evolutionary Analyses of the RNA-Dependent RNA Polymerase ( <i>RdRp</i> ) Region and <i>VP1</i> Gene in Human Norovirus Genotypes GII.P6- GII.6 and GII.P7-GII.6	Viruses	15	

### 2 総説・報告等

著者	発表年	題目	掲載紙	巻(号)	掲載頁
佐藤匠、鞍懸重和、山内貴義	2024	低密度下でのニホンジカの生息密度モニ タリングにおける自動撮影カメラによる Random Encounter and Staying Time model法の可能性	岩手大学農学部 演習林報告	第55号	43-54

### 3 学会等での口頭発表

発表者	発表年	題 目	学会等名称	開催都市等	年月日
○伊藤朋子、菊池一馬、岩淵勝己、石川奈緒、伊藤歩	2023	ユニークイオンに着目した下水処理水中マクロライド系抗菌薬及びその類縁体の検索とゼオライトによる除去	第31回環境化学討論会	徳島市	2023. 5. 30-6. 2
○深渡柚、長谷川瞳、平生進吾、小野純子、吉野共広、飛石和大	2023	化学物質分析法開発に関する基礎的研究 (8)	第31回環境化学討論会	徳島市	2023. 5. 30-6. 2
○川村あさひ、後藤吉乃	2023	残留農薬検査における前処理方法の検討	第63回東北ブロック食品衛生・環境衛生監視員研修会	青森市	2023. 9. 4-5
○鞍懸重和、千崎則正、山内貴義	2023	岩手県におけるニホンジカの生息密度指標の傾向と地域間差	日本哺乳類学会2023年度大会	沖縄県	2023. 9. 7-10
○前田 琢	2023	北上高地におけるイヌワシの巣の特徴と繁殖成績	2023年度日本鳥学会大会	金沢市	2023. 9. 17
○新井沙倉、溝腰朗人、佐伯美由紀、木全恵子、柳本恵太、原田誠也、山谷聡子、土屋彰彦、床井由紀、福留智子、長岡宏美、山田香織、瀧 夏樹、山中拓哉、小西典子、土井りえ、廣瀬昌平、工藤由起子	2023	食品および環境等における <i>Escherichia albertii</i> の汚染実態調査	日本食品衛生学会第119回学術講演会	東京都	2023. 10. 12-13
○後藤吉乃	2023	ゆでたまごの製造に指定外添加物 (DDAC) を使用した事例の対応について	令和5年度地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部衛生化学研究部会総会	盛岡市	2023. 10. 26-27
○宮手公輔	2023	NGS (次世代シーケンサー) を用いた食中毒原因キノコの特定に向けて	第60回全国衛生化学技術協議会年会	福島市	2023. 11. 9-10
○長澤敦、伊藤朋子	2023	地下水中の鉛起源推定手法の確立について	第49回全国環境研協議会北海道・東北支部研究連絡会議	オンライン開催	2023. 12. 15
○伊藤朋子	2024	災害時の化学物質漏洩と自動同定定量システムによる環境モニタリング	II 型共同研究「災害時等における化学物質の網羅的簡易迅速測定法を活用した緊急調査プロトコルの開発」全体会合	つくば市	2024. 1. 16-17
○深渡柚	2024	化学物質環境実態調査 分析法開発について～ミコナゾール及びフルコナゾール (水質) ～	令和5年度化学物質環境実態調査 環境科学セミナー	東京都	2024. 1. 29-30
○宮手公輔	2024	自然毒による食中毒の検査体制について	令和5年度食の安全安心担当業務研究発表会	盛岡市	2024. 2. 9
○後藤吉乃、宮手公輔	2024	陽イオン性界面活性剤の分析法の検討	令和5年度食の安全安心担当業務研究発表会	盛岡市	2024. 2. 9
○小山田智彰・鞍懸重和・千崎則正	2024	岩手県における海浜性希少植物の消失リスクの推移と生息域外保全に関する取り組み ～絶滅する前にできること～	第24回自然環境復元学会研究発表会	東京都	2024. 2. 16
○今野博貴、伊藤朋子、大方正倫、市原真紀子、米山美幸、中島大介	2024	N-alkylpyridinium sulfonates RI によるLC-QTOFMS用自動同定・定量システムのRT標準化	第58回日本水環境学会年会	福岡市	2024. 3. 6-8

#### 4 県民等に対する啓発活動の状況

担当者	年月日	会場等	主催者	テーマ	対象者	参集人員
三浦 紀恵	2023. 6. 21	岩手医科大学	岩手医科大学	地域診断に基づく保健活動の展開	看護学部 4 年生保健師選択者	20
	2023. 8. 8	オンライン開催	岩手県環境保健研究センター	(特定健診・特定保健指導従事者研修) 岩手県の健康課題等について	特定健診・特定保健指導従事者	51
	2024. 1. 29	オンライン開催	岩手県環境保健研究センター	(特定健診・特定保健指導従事者研修) NDBオープンデータ等からみる岩手県の健康状況について	特定健診・特定保健指導従事者	93
平野 春菜	2023. 10. 5	オンライン開催	釜石保健所	統計データからみる岩手県・沿岸圏域の健康課題	沿岸圏域の市町及び保健所の新任 任期保健師・栄養士等	22
	2023. 10. 19	岩手県環境保健研究センター	岩手県環境保健研究センター	(新人保健師研修) 環境保健研究センターが提供する保健情報について	市町村及び保健所の新任 任期保健師	24
並岡 亜希子	2023. 5. 12	盛岡大学	盛岡大学	いわて健康データウェアハウスの概要と地域保健の現状と課題	栄養科学部 栄養科学科 4 年生等	41
	2023. 8. 8	オンライン開催	岩手県環境保健研究センター	(特定健診・特定保健指導従事者研修) 県民の栄養・運動の現状に関する情報提供	特定健診・特定保健指導従事者	51
	2023. 11. 10	エスポワールいわて及びオンライン配信	公益社団法人岩手県栄養士会	事業計画のための地域診断	市町村及び保健所の管理栄養士・栄養士	23
	2023. 12. 13	オンライン開催	青森県立保健大学	いわて健康データウェアハウスの概要と地域保健の現状と課題	健康科学部 栄養学科 2 年生等	30
小山田智彰・鞍懸重和・千崎則正	2024. 3. 29	オンライン開催	環境省新宿御苑管理事務所	岩手県における海浜性希少植物の消失リスクの推移と生息域外保全に関する取り組みから～絶滅する前にできること～	第 1 回東日本地域植物多様性保全拠点ネットワーク会議参加者	40



岩手県環境保健研究センター年報 第23号  
令和5年度（2023）

---

---

令和7年1月8日

編集発行 岩手県環境保健研究センター  
〒020-0857 盛岡市北飯岡1-11-16  
電話 019-656-5666(代表)  
019-656-5668(企画情報部)  
019-656-5669(保健科学部)  
019-656-5670(衛生科学部、環境科学部、  
地球科学部)  
019-656-5672(地球科学部(自然環境担当))  
019-656-5673(検査部)  
FAX 019-656-5667  
E-mail CC0019@pref.iwate.jp

---

---