

青森県環境保健センター一年報

Annual Report
of
Aomori Prefectural Public Health and Environment Center

No.33 2022

青森県環境保健センター

目 次

I 環境保健センターの概要

1 沿 革	1
2 組織、所掌事務及び職員の状態	2

II 業務の概要（令和3年度実績）

1 総務室	4
2 微生物部	5
3 理化学部	9
4 公害部	13
5 研修等業務（所内研修会）	16
6 年間動向	16
1) 講師等派遣	16
2) 委員会、協議会等の委員	17
3) 令和3年度青森県環境生活部出先機関等職員研究発表会「あすをひらく」	17
4) 会議・学会・研修会等出席状況	18

III 研究報告

1 報 文

青森県内で検出された結核菌の VNTR 分析及びゲノム比較による分子疫学解析の検討 高橋 洋平 山上 剛志 武差 愛美 長内 志保美	21
青森県でヒトから分離された感染性胃腸炎起因菌の病原体サーベイランスの検討 高橋 洋平 山上 剛志 武差 愛美 橋本 恭奈	30
2017/18シーズン～2020/21シーズンに発生した集団胃腸炎事例におけるノロウイルスの 遺伝子解析 坂 恭平 鈴木 敬 小川 裕貴 二本柳 朋子	41
東日本海域における簡易分析キットを使用したホタテガイの麻痺性貝毒スクリーニング 法の検討 山本 明美 五十嵐 飛鳥 田中 綾乃 岩館 樹里 柴田 めぐみ	50
青森県における酸性雨の pH 経時変化解析：季節変動とトレンドの分離・抽出 花石 竜治 菩提寺 誉子 神 毅統	61
青森県における酸性雨のイオン組成及び当量沈着量の調査地点比較 菩提寺 誉子 花石 竜治 神 毅統	68

2 ノート

青森県近海におけるホタテガイ及び魚類中の PAH4 測定結果 五十嵐 飛鳥 岩館 樹里 山本 明美	78
フグ毒（テトロドトキシン）による食中毒事例紹介 —LC-MS/MS による試験法の構築— 田中 綾乃 山本 明美	82

ベイズ統計手法に基づきケミカルマスバランス計算を行う表計算マクロの作成 : 時系列データ処理	
花石 竜治	86
PM _{2.5} センサーを活用した稲わら焼却による大気汚染状況調査	
内海 宣俊	94

IV 他誌投稿抄録	105
------------------------	-----

Table of Contents

1. Reports

Molecular epidemiological Analysis of Mycobacterium tuberculosis in Aomori Prefecture by VNTR analysis and by genomic comparison Yohei Takahashi, Takeshi Yamagami, Manami Musashi, Shihomi Osanai	21
Evaluation of pathogen surveillance of infectious gastroenteritis causative bacteria isolated from humans in Aomori Prefecture Yohei Takahashi, Takeshi Yamagami, Manami Musashi, Yukina Hashimoto	30
Genetic analysis of norovirus in mass gastroenteritis cases in the 2017/18 to 2020/21 seasons Kyohei Saka, Takashi Suzuki, Yuki Ogawa, Tomoko Nihonyanagi	41
Evaluation of a paralytic shellfish toxins screening method for scallops using a simple assay kit around the eastern Japan waters Akemi Yamamoto, Asuka Igarashi, Ayano Tanaka, Juri Iwadate, Megumi Shibata	50
Analysis of temporal changes in pH of acid rain in Aomori Prefecture: separation and extraction of seasonal changes and trends Ryuji Hanaishi, Motoko Bodaiji, Taketo Jin	61
Comparison of ionic composition and equivalent deposition of acid rain in Aomori Prefecture at investigation sites Motoko Bodaiji, Ryuji Hanaishi, Taketo Jin	68

2. Notes

Measurement results of PAH4 in scallops and fish, around Aomori Prefecture waters Asuka Igarashi, Juri Iwadate, Akemi Yamamoto	78
Introduction of a food poisoning case caused by puffer fish poison (tetrodotoxin) -Development of a test method using LC-MS/MS- Ayano Tanaka, Akemi Yamamoto	82
Development of a spreadsheet macro for chemical mass balance calculations based on the Bayesian statistical method: processing of time series data Ryuji Hanaishi	86
Investigation of air pollution caused by rice straw incineration using PM _{2.5} sensors Nobutoshi Utsumi	94

I 環境保健センターの概要

1 沿革

(1) 設置の目的

青森県環境保健センターは、環境保全及び保健衛生に対する県民のニーズに的確に対応するため、平成2年に衛生研究所、公害センター及び公害調査事務所を統合し、公衆衛生、公害等に関する試験検査、指導及び研究並びに情報の提供を総合的に推進するための機関として設置された。

(2) 沿革

【環境保健センター】

年 月 日	概 要
平成2年4月1日	青森県環境保健センター、青森県環境保健センター八戸公害事務所、青森県環境保健センター六ヶ所放射線監視局設置
平成12年4月1日	センター内に環境管理部新設、弘前市・八戸市・むつ市に環境管理事務所新設(八戸公害事務所廃止)
平成13年4月1日	センター内に青森県感染症情報センター設置
平成15年4月1日	組織改正により、環境管理部が青森環境管理事務所に、放射能部及び六ヶ所放射線監視局が青森県原子力センターに移行
平成19年4月1日	組織改正により、青森・弘前・八戸・むつ環境管理事務所が地域県民局に移行

【旧衛生研究所】

年 月 日	概 要
昭和24年6月1日	庶務係、細菌検査係、化学試験係、病理臨床試験係、食品検査係の5係制で発足
昭和29年7月1日	血液銀行係を加え6係制となる
昭和31年1月25日	青森県衛生研究所弘前出張所を設置する
昭和32年6月1日	青森県血液銀行設置に伴い衛生研究所弘前出張所及び血液銀行係を廃止する
昭和33年5月1日	処務規程の全面改正により、庶務係、試験検査係となる
昭和34年3月3日	試験検査係を細菌病理臨床試験係、化学食品検査係に改め3係制となる
昭和39年4月1日	庶務室、微生物科、理化学科の1室2科となる
昭和43年3月25日	青森県保健衛生センター合同庁舎完成し移転
昭和44年4月1日	公害科が新設され1室3科となる
昭和48年4月1日	室及び科制を課制に改める
昭和49年4月1日	公害調査事務所設置に伴い公害課は廃止される

【旧公害センター】

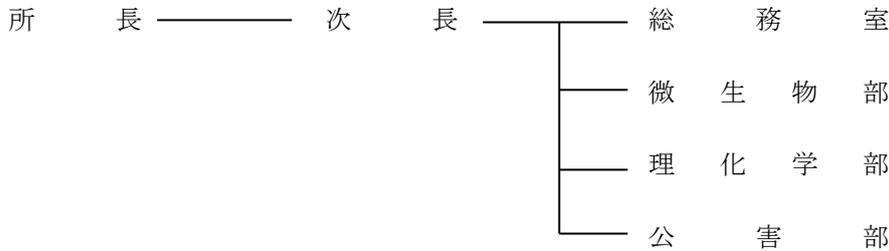
年 月 日	概 要
昭和46年4月1日	青森県公害センター開設

【旧公害調査事務所】

年 月 日	概 要
昭和49年 4月 1日	青森公害調査事務所開設 庶務課及び調査規制課の2課制が設けられ、調査規制課に大気係及び水質係が置かれる
昭和55年 4月 1日	組織改正により調査規制課が廃止され、大気課及び水質課が設けられ3課制となる
昭和56年 4月 1日	青森県公害調査事務所に名称変更となる
昭和57年10月 1日	旧血液センターの庁舎を全面改修し、公害調査事務所の検査及び管理部門を移設した

2 組織、所掌事務及び職員の状況

(1) 組織



(2) 所掌事務

- ① 公害の防止その他の環境の保全（放射性物質に係るものを除く。）上必要な調査及び試験研究に関すること。
- ② 保健衛生上必要な試験研究に関すること。
- ③ 保健衛生に係る技術指導に関すること。

(3) 分掌事務

総務室

- ① 所の予算及び決算に関すること。
- ② 庁舎、公有財産及び備品等の管理並びにその他の庶務に関すること。
- ③ 所内各部の所管に属しない事務に関すること。

微生物部

- ① 病原微生物等の試験検査及び調査研究に関すること。
- ② 微生物学的健康危機に関すること。
- ③ 微生物学的試験及び検査の技術指導に関すること。
- ④ 感染症等に係る情報の収集、解析及び提供に関すること。
- ⑤ その他必要な試験検査及び調査研究に関すること。

理化学部

- ① 食品中の残留農薬、動物用医薬品、その他の化学物質等の試験検査及び調査研究に関すること。
- ② 毒劇物、医薬品、家庭用品等の試験検査及び調査研究に関すること。
- ③ 温泉、飲料水等の試験検査及び調査研究に関すること。
- ④ 理化学的試験の技術指導に関すること。
- ⑤ 毒劇物及び医薬品等の化学物質による健康危機に関すること。

⑥ その他必要な試験検査及び調査研究に関すること。

公害部

- ① 大気汚染、水質汚濁、土壌汚染、騒音、振動及び悪臭の防止に係る試験検査並びに調査研究に関すること。
- ② 微小粒子状物質（PM_{2.5}）及び有害化学物質等の試験検査並びに調査研究に関すること。
- ③ 廃棄物の処理に係る試験検査及び調査研究に関すること。
- ④ その他必要な試験検査及び調査研究に関すること。

(4) 職員の状況

(令和4年4月1日現在)

区分	課長級	副参事級	総括主幹級	主幹級	主査級	主技事師	技能技師	非常勤事務員	非常勤技術員	非常勤労務員	計
所長	1										1
次長		1									1
総務室			1	1	1	1	1	1			6
微生物部			1	1	4	2			3		11
理化学部			1	1	3	1			3		9
公害部			1	1	3	2			1		8
計	1	1	4	4	11	6	1	1	7		36

Ⅱ 業務の概要(令和3年度実績)

1 総務室

1.1 職場見学者の受入れ

平成24年度から、試験・検査、研究等に興味を抱き、将来の職業選択の一助となることを目的として中学生などの見学の受入れを行っている。

生徒等には、当センターの概要の説明並びに各試験室等の見学及び検査体験を実施している。

令和3年度は受入実績はなかった。

区 分	H29年度	H30年度	R元年度	R2年度	R3年度
見学者(人)	3	4	2	—	—

1.2 センター内ベンチャー制度

環境保全上及び保健衛生上の試験研究に対する職員の意欲及び研究能力の一層の向上を図るため、職員が自ら研究を企画し、実施することを支援することを目的に、平成28年度からセンター内ベンチャー制度を実施している。

令和2年度～3年度は、次の研究を実施した。

研 究 名	研 究 期 間
県内で生産された日本酒中に含まれる微量金属の実態調査研究	令和2年度～令和3年度

2 微生物部

2.1 調査研究

(1) 感染症流行予測調査事業

厚生労働省感染症流行予測調査事業の一環として、環境水からのウイルス分離によるポリオ感染源調査及びブタにおける HI 抗体調査による日本脳炎感染源調査を実施しているが、令和3年度は新型コロナウイルス感染症検査対応に係る大幅な業務量の増加により、検体の採取のみ実施した。

ア ポリオ感染源調査

令和3年度は、4月から12月にかけて、青森市内下水処理施設から下水処理前水54検体を採取した。

イ 日本脳炎感染源調査

令和3年度は、7月から9月にかけて、十和田食肉衛生検査所及び田舎館食肉衛生検査所でブタの血液70検体を採取した。

(2) 感染症発生動向調査事業（ウイルス等・細菌等）

平成11年度から感染症法に基づき、県内の細菌・ウイルス・リケッチア・クラミジア等の病原体を把握するために感染症発生動向調査の一環として病原体検査を実施しており、令和3年度においては次のとおり行った。

ア ウイルス・リケッチア・クラミジア

県内（青森市及び八戸市を除く。）の医療機関が採取した材料18,749検体（糞便（直腸ぬぐい液・腸内容物）7検体、咽頭ぬぐい液（鼻咽頭ぬぐい液・鼻腔ぬぐい液・鼻汁）16,636検体、唾液2,100検体、髄液4検体、血液・血清2検体）からウイルス分離及び遺伝子検出を実施した結果は、次のとおりであった。

ウイルス等の検出状況

疾患等	検出されたウイルス等	検出数
インフルエンザ	ヒトコロナウイルス NL63	1
水痘関連	水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)	2
感染性胃腸炎関連	アストロウイルス	2
感染性胃腸炎関連	ヒトボカウイルス	1
無菌性髄膜炎関連	ヒトヘルペスウイルス 6B (HHV6B)	1
つつが虫病	<i>Orientia tsutsugamushi</i> (Karp 株)	2
新型コロナウイルス感染症	新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)	3,273

イ 細菌等

県内（青森市及び八戸市を除く。）の医療機関等で、腸管出血性大腸菌感染症患者及び保菌者から採取された検体由来の菌株計17株の性状確認及び遺伝子検査を実施した結果、Og26:Hg11 VT1が2株、Og91:Hg14 VT1が2株、Og103:Hg2 VT1が3株、Og111:Hg8 VT1VT2が1株、Og145:Hg28 VT2が6株、Og157:Hg7 VT1VT2が2株、Og157:Hg7 VT2が1株であった。

薬剤耐性菌について、県内（青森市及び八戸市を除く。）の医療機関で、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症患者から採取された検体由来の菌株計13株の性状確認及び遺伝子検査を実施した結果、カルバペネマーゼを産生する菌株が1株認められた。また、レプトスピラ症疑い患者から採取された計4検体の遺伝子検査を実施した結果、いずれもレプトスピラ遺伝子は検出されなかった。このほか、A群溶血性レンサ球菌咽頭炎患者から採取された検体由来の菌株1株の遺伝子検査及び型別試験を実施した結果、A群溶血性レンサ球菌遺伝子を検出した。

(3) 結核菌の遺伝子解析

平成24年度から、県の結核対策の一つとして、VNTR法による結核菌の遺伝子型別解析を行っており、令和3年度は、40株（青森市及び八戸市を除く。）について遺伝子解析を行った。

(4) 青森県病原微生物検出情報

平成11年度から3病原体（サルモネラ属菌、腸炎ビブリオ、カンピロバクター属菌）の発生状況の把握を目的として県内の細菌検査を実施している医療機関及び臨床検査センター10施設から菌株及び検出情報を収集している。

平成26年7月からは、11施設、6菌種（サルモネラ属菌、カンピロバクター属菌、ビブリオ属菌、エルシニア属菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、基質拡張型β-ラクタマーゼ産生菌）で実施しており、令和4年1月から医療機関1施設が辞退したため、計10施設にて実施している。

ア 令和3年度は、提供を受けた検出情報及び気温等の環境情報を解析し、環境保健センターのホームページに週報として53回掲載した。

イ 収集した病原性菌株について生化学的試験、血清学的試験、PCR及び薬剤感受性試験等を実施し、その結果を関係機関に提供している。令和3年度は95株について試験を実施した。

(5) 厚生労働科学研究事業

令和3年度に研究事業として厚生労働科学研究班等に参加した事業は、以下のとおりである。

ア 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）「食品由来感染症の病原体解析の手法及び病原体情報の共有に関する研究」分担研究「北海道・東北・新潟ブロックの腸管出血性大腸菌株解析及び精度管理に関する研究」

イ 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）「ワンヘルスに基づく食品由来薬剤耐性菌のサーベイランス体制強化のための研究」分担研究「全国地研ネットワークに基づく食品およびヒトから分離されるサルモネラ、大腸菌、カンピロバクター等の薬剤耐性の動向調査」

ウ 日本医療研究開発機構（AMED）委託研究開発費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）「薬剤耐性菌のサーベイランス強化および薬剤耐性菌の総合的な対策に資する研究」分担研究「CRE感染症の臨床的疫学的解析」

エ 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）「環境中における薬剤耐性菌及び抗微生物剤の調査法等の確立のための研究」

オ 厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制を構築するための研究」

カ 厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「地方衛生研究所における感染症等による健康危機の対応体制強化に向けた研究」

(6) 菌株の収集事業

県内で発生した食中毒事例等及び感染症事例から分離された菌株について、生化学的試験、血清学的試験、PCR及び薬剤感受性試験等を行い、県、青森市、八戸市及び関係機関に対して情報提供を行っている。

(7) 感染症発生動向調査事業に係る青森県感染症発生情報

平成13年度から感染症患者の把握と予防啓発を目的に実施している。

令和3年度は、県内の感染症患者情報及び病原体検出情報を収集・分析し、その結果を週報として53回（インフルエンザ情報を適時掲載）、月報として12回、環境保健センターのホームページに掲載した。また、令和2年の感染症発生動向調査事業報告書を作成し、ホームページに掲載するとともに関係機関に配付した。

2.2 試験検査

(1) ウイルス性食中毒等関連検査

ウイルス性食中毒及び感染症の拡大防止並びに衛生指導を行うことを目的として県保健所及び保健衛生課からの依頼により実施している。

令和3年度は、ウイルス性食中毒（疑いを含む。）及び感染症集団胃腸炎事例が5事例あり、糞便57検体、食品35検体、ふき取り38検体、計130検体についてRT-PCR法、リアルタイムPCR法及びダイレクトシーケンス法により原因ウイルスの検索及び遺伝子解析を行った。

その結果、糞便57検体中30検体からノロウイルス Genogroup II（GII型）が検出された。

(2) 細菌等による食中毒等関連検査

細菌等による食中毒及び感染症の拡大防止並びに衛生指導を行うことを目的として県保健所及び保健衛生課からの依頼により実施している。

令和3年度は、事例がなかった。

2.3 青森市及び八戸市に対する技術協力

青森市及び八戸市に対し、病原体等の試験研究等業務に対する県の技術的協力に関する協定に基づき、技術協力を行った。

(1) 食中毒等関連検査（ウイルス等・細菌等）

ア ウイルス等

令和3年度は、八戸市で発生したウイルス性食中毒（疑いを含む。）2事例について、RT-PCR法及びリアルタイムPCR法により、糞便16検体、ふき取り6検体、計22検体について原因ウイルスの検索を行った。

イ 細菌等（3月末終了分）

令和3年度は、事例がなかった。

(2) 感染症発生動向調査事業（ウイルス等・細菌等）

ア ウイルス・リケッチア・クラミジア

青森市内の医療機関が採取した材料は、207検体（糞便（直腸ぬぐい液・腸内容物）4検体、咽頭ぬぐい液（鼻咽頭ぬぐい液・鼻腔ぬぐい液・鼻汁）191検体、髄液3検体、血液・血清5検体、尿1検体、痂皮3検体）であった。

八戸市内の医療機関が採取した材料は、2,071検体（咽頭ぬぐい液（鼻咽頭ぬぐい液・鼻腔ぬぐい液・鼻汁）2,054検体、唾液16検体、痂皮1検体）であった。

イ 細菌等（3月末終了分）

青森市内の医療機関が採取した材料は、31検体（菌株31検体）であった。

八戸市内の医療機関が採取した材料は、29検体（菌株29検体）であった。

2.4 精度管理

(1) ウイルス等

令和3年度は、厚生労働省健康局結核感染症課が感染症法に基づき実施している新型コロナウイルスに関する外部精度管理事業に参加し、検査技能は適正であると判定された。

(2) 細菌等

令和3年度は、一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所が実施しているサルモネラ属菌及び大腸菌に関する食品衛生外部精度管理、厚生労働省健康局結核感染症課が感染症法に基づき実施しているチフス菌・パラチフス菌に関する外部精度管理及び公益財団法人結核予防会結核研究所で実施している結核菌遺伝子型別外部精度評価に参加し、検査技能は適正であると判定された。

2.5 教育・指導

(1) 病原体等の包装・運搬に係る研修

保健衛生課からの依頼により、包装・運搬責任者育成を目的に研修を実施しており、ゆうパックにより臨床検体等を送付する際の遵守事項について講義と実演を行っている。

令和3年度においては、依頼がなかった。

(2) 衛生検査所に対する外部精度管理

医療薬務課からの依頼により、衛生検査所における精度管理の質的向上を図ることを目的に立入検査を実施し、指導監督及び助言を行っている。

令和3年度においては、依頼がなかった。

(3) 新型コロナウイルス検査技術研修

県内の医療機関等からの依頼により、新型コロナウイルス検査の検査技術の向上を図ることを目的

に研修を実施しており、全自動PCR検査装置の取扱いや結果判定等について説明と実演を行っている。

令和3年度においては、依頼がなかった。

2.6 健康危機管理

新型コロナウイルス（変異株を含む。）や、高病原性鳥インフルエンザがヒトに感染することによる新型インフルエンザの発生に備え、検査技術の導入及び検査体制の整備を行っている。

試験検査総括表（令和3年度）

分類	部 門	件数	検査 項目数	検査総数
(1) ウイルス (行政検査)	① 感染症発生動向調査（ウイルス等）			
	・インフルエンザウイルス	1	7	7
	・突発性発しん関連ウイルス	3	6	18
	・咽頭結膜熱関連ウイルス	1	3	3
	・感染性胃腸炎関連ウイルス	11	8	88
	・無菌性髄膜炎関連ウイルス	7	10	70
	・麻しん・風しん関連ウイルス	3	2	6
	・E型肝炎ウイルス	1	1	1
	・新型コロナウイルス	20,981	1	20,981
	・その他のウイルス等	19	1	19
	② ウイルス性食中毒等関連検査	152	5	760
	小 計	21,179		21,953
(2) 細菌等 (行政検査)	① 感染症発生動向調査（細菌等）			
	・腸管出血性大腸菌	31	3	93
	・カルバペネム耐性腸内細菌科細菌	51	3	153
	・レプトスピラ	4	1	4
	・A群溶血性レンサ球菌咽頭炎	1	3	3
	② 結核菌の遺伝子解析	40	1	40
③ 病原微生物検出情報に基づく収集菌株	95	3	285	
	小 計	222		578
	合 計	21,401		22,531

3 理化学部

3.1 試験検査

(1) 有害物質等検査

ア 県産農産物の残留農薬検査

平成18年5月から、食品中に残留する農薬等へのポジティブリスト制度（農薬等が残留する食品の販売等を規制する制度）が施行され、農薬残留基準が定められていないものには一律基準（0.01ppm）が適用されることとなった。令和3年度からは精密分析機器であるGC-MS/MS及びLC-MS/MSを用いて分析を実施している。

令和3年度は、次の6種33検体、1検体当たり約250項目について検査を実施した。トマト7検体（239項目）、人参5検体（179項目）、大根5検体（192項目）、ごぼう5検体（236項目）、メロン3検体（237項目）及びりんご8検体（231項目）。（（ ）内の項目数は試験法の妥当性が確認された項目数）

その結果、トマト、メロン及びりんごからは下表に示す農薬が検出されたが、いずれも基準値未満であった。

人参、大根及びごぼうについては、全ての項目について定量下限未満であった。

なお、予定していたにんにく、とうもろこし、長いも及びほうれんそうは、新型コロナウイルス対応のため取去が中止となった。

令和4年度においても引き続き実施する。

検出農薬

作物名	検出農薬名（検出検体数）
トマト	イミダクロプリド（1）、エトフェンプロックス（1）、ペルメトリン（1）
メロン	チアクロプリド（1）
りんご	クレソキシムメチル（1）、シペルメトリン（5）、シフルトリン（1）、スピロジクロフェン（3）、チアクロプリド（3）、テブフェンピラド（1）、フェントロチオン（1）、プロパルギット（5）

イ 輸入農産物の残留農薬検査

令和3年度は、県内に流通している輸入農産物としてバナナの残留農薬検査を予定していたが、新型コロナウイルス対応のため取去が中止となった。

ウ 流通貝の貝毒検査

貝毒による食中毒を未然に防止するため、流通貝について貝毒検査を継続的に実施している。平成28年度より下痢性貝毒についてはLC/MS/MSを用いた機器分析による検査となった。令和3年度は、ホタテガイ6検体について下痢性貝毒検査を実施した結果、ジノフィシストキシン-1が3検体から検出されたが、すべて規制値未満であった。

エ りんごジュースのカビ毒検査

県産りんごジュースの安全性を確保するため、平成17年度から、カビ毒（パツリン）の検査を実施している。令和3年度は、新型コロナウイルス対応のため取去が中止となった。

オ アレルギー物質検査

令和3年度は、39検体（菓子類24検体、めん・パン類10検体、調理食品1検体、穀類加工品1検体、調味料及びスープ1検体、加工魚介類1検体、その他の農産加工品1検体）の特定原材料5品目（小麦・そば・落花生・卵・乳）について、それぞれ2種類の検査キットで検査を実施した。

その結果、小麦で1検体が基準値を超過したが、取去先を調査した結果、工場内での小麦の使用はなく、原材料としての「こうせん（原材料：大麦）」による疑陽性であった。

カ 魚類加工品のヒスタミン検査

ヒスタミンによる食中毒を未然に防止するため、令和3年度から魚類加工品のヒスタミン検査を実施している。令和3年度は、さば水煮缶等5検体について検査した結果、すべて定量下限未満であった。

(2) 畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査

畜水産食品の安全性を図るため、合成抗菌剤、抗生物質及び寄生虫駆除剤についての動物用医薬品検査を実施している。令和3年度は、県内で収去された鶏卵11検体(30品目)、牛乳7検体(41品目)について検査を実施した結果、全て定量下限未満であった。

(3) 対EU輸出ホタテガイ生産海域のモニタリング検査

「英国、欧州連合、スイス及びノルウェー向け輸出水産食品の取扱要綱」(「農林水産物及び食品の輸出証明書発行に係る手続規程」(令和2年4月1日財務大臣・厚生労働大臣・農林水産大臣決定)別紙EU-S1)に基づき生産海域の監視を目的に、環境汚染物質について、陸奥湾産ホタテガイのモニタリング検査を実施している。

令和3年度は、1検体(野辺地1定点・年1回(11月))について、7項目(総水銀、カドミウム、鉛、ベンゾ[a]ピレン、ベンゾ[a]アントラセン、ベンゾ[b]フルオランテン、クリセン)の検査を実施した結果、総水銀、カドミウム、ベンゾ[b]フルオランテンが検出されたがいずれもEU向けホタテガイに係る基準値未満であった。その他の項目については定量下限未満であった。

(4) 家庭用品の試買検査

昭和55年度から、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」に基づく家庭用品の試買検査を実施している。令和3年度は、家庭用洗剤10検体について容器試験、塩酸消費量等(合計4項目)の検査を、繊維製品10検体についてはホルムアルデヒドの検査を実施した結果、全て規格に適合していた。

(5) 医薬品の収去検査

不良医薬品の製造及び流通を防止するため、医薬品等一斉監視指導において収去した医薬品の検査を実施している。令和3年度は、2検体についてプロブコールの定量試験を実施した結果、全て規格に適合していた。

(6) その他の行政検査(食中毒疑い(スイセン誤食)に係る検査)

令和3年4月に県南地方で探知した食中毒疑い事例について、中毒症状を呈した患者が摂取した植物に隣接して混生しているスイセン1検体、ニラ1検体及び調理品残渣1検体の計3検体について、スイセンの毒成分であるリコリン及びガラントミンの検査を実施した。その結果、スイセン及び調理品残渣からリコリンとガラントミンが検出された。

3.2 精度管理調査

(1) 食品薬品安全センター秦野研究所による外部精度管理調査

平成11年度から一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所による食品衛生外部精度管理調査に参加している。

令和3年度は、重金属(玄米のカドミウム)、残留農薬(にんじんペーストのアトラジン、ダイアジノン、クロルピリホス、フルトラニル、フェントエート、マラチオンの6種のうち3種)、残留動物用医薬品(鶏肉(むね)ペーストのスルファジミジン)、麻痺性貝毒(ホタテガイペースト)、アレルギー物質(卵(こしあん)及びアレルギー物質(牛乳)(とうもろこしペースト、イチゴジャム、各1検体)の6項目について実施した。残留農薬調査については、検出された3項目ともXbar評価が不満足、zスコアが疑わしい、1項目はR評価も不満足であったため、改善のための検証を行ったところ、分析カラムの劣化によるものであった。その他の項目については、いずれも結果は良好であった。

(2) 水道水質検査の外部精度管理調査

水道水質検査における分析精度及びデータの正確さを確保し、分析結果の信頼性を高めることを目的として保健衛生課の依頼により平成11年度から実施している。

令和3年度は、水質検査に従事する県内4施設を対象に、カドミウム及びその化合物並びに銅及びその化合物について外部精度管理調査を実施した。各施設のデータをXbar-R管理図により解析した結果、全施設で全項目について管理限界内であった。zスコアによる評価も全て良好であった。

(3) 医薬品の外部精度管理調査

各都道府県において医薬品等の試験検査を受託する衛生検査所等の試験検査機関を対象として、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性を確保することを目的に実施されている国立医薬品食品衛生研究所薬品部第三室による外部精度管理調査に平成27年度から参加している。

令和3年度は、クロラムフェニコール定量法(UV)について実施した。

(4) 地域保健総合推進事業(北海道・東北・新潟ブロック) 精度管理事業

地方衛生研究所の連携事業として、健康危機事例への対応能力の向上のため、地域ブロックごとに模擬訓練又は精度管理事業を行っている。

令和3年度は、ヒスタミンによる食中毒を想定した精度管理(模擬試料(魚肉製品を主としたペースト))を実施した。結果は良好であり、地域ブロック内での情報共有が図られた。

(5) AOAC日本主催による食品の技能比較試験

AOAC日本主催による技能試験(理化学試験:ヒスタミン)に参加した。

サバしょう油煮缶中のヒスタミンについて分析したところ、結果は良好であった。

業務実績総括表（令和3年度）

分類	部門	事業	検体数	項目数 /1検体	総項目数 ^{※2}	
試験検査	(1)有害物質検査	①県産農産物の残留農薬検査 ^{※1}	33	179~239	7,267	
		②輸入農産物の残留農薬検査 ^{※1}	0	0	0	
		③流通貝の貝毒検査	6	1	6	
		④りんごジュースのカビ毒検査	0	0	0	
		⑤アレルギー物質検査	39	2	78	
		⑥魚類加工品のヒスタミン検査	5	1	5	
		小計	83		7,356	
	(2)畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査	①動物用医薬品検査（鶏卵）	11	30	330	
		②動物用医薬品検査（牛乳）	7	41	287	
		小計	18		617	
	(3)対EU輸出ホタテガイ生産海域のモニタリング検査	環境汚染物質検査	1	7	7	
		小計	1		7	
	(4)家庭用品の試買検査	①家庭用洗剤の検査	10	4	40	
		②繊維製品の検査	10	1	10	
		小計	20		50	
	(5)医薬品の収去検査		2	1	2	
	(6)その他の行政検査		3	2	6	
	合計			127		8,038
	精度管理	(1)外部精度管理調査（食品薬品安全センター）		7	1~6	19
(2)水道水質検査の外部精度管理調査			4	2	8	
(3)医薬品の外部精度管理			1	1	1	
(4)地域保健総合推進事業（北海道・東北・新潟ブロック）精度管理事業			1	1	1	
(5)技能比較試験（AOAC日本）			1	1	1	
合計			14		30	
総数			141		8,068	

※1 1検体当たり約250項目について検査を実施したが、各農産物について試験法の妥当性が確認された項目についてのみ項目数に計上した。

※2 検体数×項目数の総和

4 公害部

4.1 大気関係

(1) 環境大気監視

弘前市2地点、黒石市1地点、五所川原市1地点、十和田市1地点、三沢市1地点、むつ市1地点、六ヶ所村1地点及び鱒ヶ沢町1地点の計9地点で大気中の二酸化硫黄(SO₂)、窒素酸化物(NO_x)、一酸化炭素(CO)、光化学オキシダント(O_x)、浮遊粒子状物質(SPM)、微小粒子状物質(PM_{2.5})、炭化水素(HC)について常時監視を実施した。これらのうち、環境基準が定められている6測定項目についての環境基準の達成状況は、下表のとおりであった。

測定項目	二酸化硫黄(SO ₂)				二酸化窒素(NO ₂)			一酸化炭素(CO)					
	有効測定	短期的評価		長期的評価		有効測定	適	否	有効測定	短期的評価		長期的評価	
適		否	適	否	適					否	適	否	
測定局数	1	1	0	1	0	8	8	0	1	1	0	1	0

測定項目	光化学オキシダント(O _x)		浮遊粒子状物質(SPM)				微小粒子状物質(PM _{2.5})					
	適	否	有効測定	短期的評価		長期的評価		有効測定	短期基準に関する評価		長期基準に関する評価	
適				否	適	否	適		否	適	否	
測定局数	0	4	8	8	0	8	0	2	2	0	2	0

(2) 稲わら焼却による大気汚染状況調査

つがる市2地点において、稲わら焼却時のベンゾ[a]ピレン、アルデヒド類及び粉じんについて調査を実施した。

(3) 酸性雨実態調査

降水成分の地域特性を明らかにし、今後の酸性雨対策に資することを目的として、青森市・鱒ヶ沢町各1地点において降水量、水素イオン濃度(pH)、電気伝導度(EC)及びイオン成分8項目の測定を実施した。

(4) 有害大気汚染物質等モニタリング調査

有害大気汚染物質等による大気汚染の状況を把握するため、弘前市1地点において、ベンゼン等優先取組物質20物質並びに水銀及びその化合物について毎月1回の調査を実施した結果、環境基準が設定されているベンゼン等4物質及び指針値が設定されているアクリロニトリル等9物質については、いずれも基準値及び指針値を下回っていた。

(5) 微小粒子状物質(PM_{2.5})成分測定調査

県内における微小粒子状物質(PM_{2.5})の成分組成の割合や発生源の寄与割合などを把握するため、弘前市1地点において、質量濃度、イオン成分8項目、無機元素成分29項目、炭素成分3項目について4季節各季2週間の調査を実施した。

(6) アスベスト調査

弘前市1地点において一般環境大気中のアスベスト濃度の測定を実施した。また、建築物解体現場等周辺地域21地点においてアスベスト濃度の測定を実施した。なお、試料採取は各環境管理部が実施した。

4.2 水質関係

(1) 公共用水域・地下水の水質測定及びクロスチェック

公共用水域及び地下水の水質測定については外部分析機関に委託していることから、分析に関する精度を確保するため、外部分析機関とクロスチェックを実施した。

(2) 水浴場水質調査

県内7水浴場における水質調査(化学的酸素要求量(COD)、ふん便性大腸菌群数等)を外部分析機関に委託して実施していることから、分析に関する精度を確保するため試料分割法によるクロスチェックを実施した。

(3) 十和田湖水質保全事業

十和田湖の水質保全に資するため、秋田県と共同で十和田湖の湖心における水質調査を実施した。また、十和田湖に流入する2河川の水質調査を実施した。

(4) 排水基準監視クロスチェック

特定事業場排水の水質測定を外部分析機関に委託していることから、分析に関する精度を確保するため外部分析機関とクロスチェックを実施した。

4.3 騒音、振動関係

(1) 航空機騒音調査

八戸飛行場及び三沢飛行場周辺地域の航空機騒音の環境基準達成状況を把握するため、三沢市、七戸町、東北町、おいらせ町及び六ヶ所村の各1地点で騒音調査を実施した結果、全ての地点で環境基準値を達成した。

(2) 新幹線騒音調査

新幹線騒音の環境基準達成状況を把握するため、おいらせ町及び南部町の各1地点で調査を実施した結果、両地点とも環境基準を超過した。

4.4 その他

(1) 精度管理

環境省が実施する統一精度管理調査に参加し、模擬排水試料1検体(COD、BOD、全磷、ほう素)及び模擬大気試料1検体(詳細項目:ニッケル、亜鉛、鉄、鉛、アルミニウム、カルシウム、参照項目:マンガン、銅、ナトリウム、カリウム)について分析した。Zスコアによる評価は、いずれの項目も満足できる結果であった。

また、全国環境研協議会酸性雨広域大気汚染調査研究部会が実施する酸性雨分析精度管理調査に参加し、模擬水質試料2検体(対象項目:水素イオン濃度(pH)、電気伝導度(EC)、硫酸イオン(SO_4^{2-})、硝酸イオン(NO_3^-)、塩化物イオン(Cl^-)、アンモニウムイオン(NH_4^+)、ナトリウムイオン(Na^+)、カリウムイオン(K^+)、カルシウムイオン(Ca^{2+})、マグネシウムイオン(Mg^{2+}))について分析した。

(2) 行政依頼検査等

関係課からの緊急の依頼を受けた水質事故、魚類へい死等に係る分析を実施した。

業務実績総括表（令和3年度）

分類	事業	業務	地点数	検体数	分析項目数
大気	環境監視・調査	環境大気常時監視	9	—	36
		稲わら焼却による大気汚染調査	2	2	8
		酸性雨実態調査	2	68	748
		有害大気汚染物質等モニタリング調査【検体採取】	1	12	(156)
		有害大気汚染物質等モニタリング調査	1	12	96
		微小粒子状物質（PM _{2.5} ）成分測定調査【検体採取】	1	56	(168)
		微小粒子状物質（PM _{2.5} ）成分測定調査	1	56	2,128
		アスベスト調査	22	48	48
水質	水質保全	公共用水域、地下水等クロスチェック分析	—	2	6
		水浴場水質調査クロスチェック分析	—	1	1
		十和田湖水質保全事業調査	4	19	285
		排水基準監視クロスチェック分析	—	2	2
騒音	騒音防止対策	航空機騒音調査	5	—	5
		新幹線騒音調査	2	—	4
その他	精度管理	統一精度管理調査	—	2	14
		酸性雨分析精度管理調査	—	2	20
	行政依頼検査等	魚類へい死・水質事故等	12	75	169

5 研修等業務（所内研修会）

研修名	研修内容	実施日	対象者	受講者数	開催部名
ISO 信頼性確保部門研修 (WEB 開催)	微生物に関する知識・技術の習得	2021/10/18	微生物試験研究担当者	1	微生物部
GLP 食品検査の基礎	食品衛生検査施設等における業務管理についての知識習得	2021/4/8	食品検査新規試験検査担当者	4	理化学部
GLP 食品検査受付の基礎	食品衛生検査における受付業務の習得	2021/5/12	食品検査新規受付担当者	2	理化学部
GMP 医薬品検査の基礎	日本薬局方・分析法のバリデーション・関係法令等についての知識習得	2021/10/7	医薬品検査新規試験検査担当者	3	理化学部
令和3年度青森県環境生活部出先機関等職員研究発表会「あすをひらく」 (書面開催)	環境、公衆衛生、原子力関係の知見の習得	2022/1/28	環境生活部、健康福祉部、危機管理局、各地域県民局職員	25	理化学部
実験動物管理者等研修会 (WEB 開催)	動物実験に係る検査員	2022/2/2	動物実験に係る検査員	6	理化学部

6 年間動向

(1) 講師等派遣

研修等の名称	内容 (対象者)	実施日	講師派遣部 (職員氏名)
出前トーク ウイルスってなに？細菌ってなに？	ウイルスと細菌の違いの説明 (平川市立竹館小学校PTA研修委員会)	令和3年7月7日	微生物部 (高橋 洋平)
出前トーク ウイルスってなに？細菌ってなに？	ウイルスと細菌の違いの説明 (青森県難聴者・中途失聴者協会)	令和3年8月22日	微生物部 (高橋 洋平)
出前トーク (1)ウイルスってなに？細菌ってなに？ (2)薬の効かない細菌の話	ウイルスと細菌の違い、薬の効かない細菌について説明 (みちのく青年教室)	令和3年8月24日	微生物部 (高橋 洋平)
出前トーク ウイルスってなに？細菌ってなに？	ウイルスと細菌の違いの説明 (若草幼稚園)	令和3年9月6日	微生物部 (高橋 洋平)
出前トーク ウイルスってなに？細菌ってなに？	ウイルスと細菌の違いについての説明 (東地区老人クラブ連合会)	令和3年12月10日	微生物部 (高橋 洋平)

出前トーク ウイルスってなに？細菌ってなに？	ウイルスと細菌の違いについての説明 (尾上在宅介護支援センター)	令和3年12月15日	微生物部 (高橋 洋平)
---------------------------	-------------------------------------	------------	-----------------

(2) 委員会、協議会等の委員

委嘱団体等の名称	委員の名称	任 期	委員派遣部 (職員氏名)
青森県 (保健衛生課)	青森県感染症発生動向調査 委員会委員	令和3年2月1日 ～令和5年1月31日	所 長 (長谷川 寿夫)
青森県 (医療薬務課)	青森県精度管理専門委員	令和2年8月31日 ～令和5年8月30日	微生物部 (山上 剛志)
青森市	青森市精度管理専門委員	令和2年4月1日 ～令和4年3月31日	理化学部 (山本 明美)
八戸市	八戸市衛生検査所精度管理専門委員	令和3年10月1日 ～令和5年9月30日	理化学部 (山本 明美)

(3) 令和3年度青森県環境生活部出先機関等職員研究発表会「あすをひらく」

開催日時：令和4年1月28日（金）【要旨集による書面開催】

発 表 者		演 題 名
所 属	氏 名	
微生物部	高橋 洋平	マルチプレックスPCR及びキャピラリーシークエンサーを用いた結核菌VNTR分析について
微生物部	菩提寺 誉子	新型コロナウイルス陽性検体の全ゲノム解析
理化学部	福士 貴史	汎用マトリックス添加標準溶液を活用したGC-MS/MSを用いた農産物中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価
理化学部	田中 綾乃	LC-MS/MSによる食肉中のβ-ラクタム系抗生物質の一斉試験法及び検査依頼体制の構築
理化学部	五十嵐飛鳥	ELISA法を用いた流通食品における特定原材料（えび・かに）の実態調査について
公害部	佐々木 守	学術論文で見る環境キーワードの推移
原子力センター	工藤 翔	環境試料中のトリチウム、炭素-14及びヨウ素-129・131調査
原子力センター	檜山 宝孝	DGAレジンをを用いた固相抽出法による農畜産物及び指標植物中の ⁹⁰ Sr迅速分析法の検討
公害部	内海 宣俊	県内で生産された日本酒中に含まれる微量元素の実態調査研究

※ 所属に微生物部、理化学部、公害部と記載されている発表者は、青森県環境保健センター職員

(4) 会議・学会・研修会等出席状況

ア 会議・検討会等出席

名 称	開催地	開催月日	出席者	出席者数
環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究 令和3年度第1回班会議(WEB開催)	—	2021/5/31	微生物部	1
環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究 令和3年度第2回班会議(WEB開催)	—	2021/8/3	微生物部員	1
環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究 令和3年度第3回班会議(WEB開催)	—	2021/10/15	微生物部員	1
令和3年度地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部公衆衛生情報研究会総会・研修会(WEB開催)	—	2021/10/27	微生物部員	1
令和3年度「地域保健総合事業」全国疫学情報ネットワーク構築会議(録画配信講演)(WEB開催)	—	2021/11/8	微生物部員	3
アデノウイルスレファレンスセンター会議(WEB開催)	—	2021/12/2	微生物部員	1
環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究 令和3年度第4回班会議(WEB開催)	—	2021/12/17	微生物部員	1
令和3年度地方感染症情報センター担当者会議(録画配信)(WEB開催)	—	配信期間 2022/1/21~2/3 のうち、いずれ か1日	微生物部員	1
環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究 令和3年度第5回班会議(WEB開催)	—	2022/3/10	微生物部員	1
令和3年度地衛研全国協議会北海道・東北・新潟支部衛生化学研究会総会(書面開催)	—	2021/10/1	理化学部員	1
令和3年度産業廃棄物不適正処理事案検討会	青森市	2022/3/4	公害部員	1

イ 学会・研究会等出席

名 称	開催地	開催月日	出席者	出席者数
第30回感染研シンポジウム(COVID-19との戦い)(WEB開催)	—	2021/5/21	微生物部員	3
衛生微生物技術協議会第41回研究会(WEB開催)	—	2021/6/9~10	微生物部員	3
アルボウイルス・リケッチアレファレンスセンター等関連合同会議(WEB開催)	—	2021/7/9	微生物部員	2
COVID特別シンポジウム(基礎研究編)(WEB開催)	—	2021/8/20	微生物部員	1
COVID特別シンポジウム(ワクチン/治療薬研究開発編)(WEB開催)	—	2021/8/27	微生物部員	3
COVID特別シンポジウム(有効性/安全性評価系編)(WEB開催)	—	2021/9/3	微生物部員	1
新型コロナウイルス感染症拡大防止に向けた地域プラットフォーム形成シンポジウム第2回ワークショップ(ZOOM)「新型コロナウイルス感染者最前線の動きと感染防止に向けた新たなPCR検査体制」(WEB開催)	—	2021/9/24	微生物部員	1

第35回公衆衛生情報研究協議会総会・研究会 (WEB開催)	—	2022/1/27～28	微生物部員	1
第37回宮城県保健環境センター研究発表会 (WEB開催)	—	2022/3/4	微生物部員 理化学部員	7
日本食品衛生学会令和3年度公開講演会 (WEB開催)	—	2021/6/7	理化学部員	5
日本食品衛生学会第117回学術講演会 (WEB開催)	—	2021/10/26～27	理化学部員	4
第44回農薬残留分析研究会 (WEB開催)	—	2021/11/17～18	理化学部員	6
令和3年度漁場環境保全関係研究開発推進会議赤潮・ 貝毒部会 東日本貝毒分科会 (WEB開催)	—	2021/11/24～25	理化学部員	2
令和3年度地衛研全国協議会近畿支部自然毒部会研究 発表会 (WEB開催)	—	2021/11/25	理化学部員	4
第58回全国衛生化学技術協議会年会 (WEB開催)	—	2021/11/25～26	理化学部員	6
日本水環境学会シンポジウム (WEB開催)	—	2021/9/14-15	公害部員	1
青森県産業技術センター 工業部門研究成果発表会 (WEB開催)	—	2021/9/28	公害部員	3

ウ 研修会・講習会等出席

名 称	開催地	開催月日	出席者	出席者数
新型コロナウイルスゲノム技術研修会 ナノポア Mk1c 実演 (視聴のみ) (WEB開催)	—	2021/4/27	微生物部員	3
新型コロナウイルスゲノム技術研修会 ナノポア Zoom 研修 (WEB開催)	—	2021/5/17, 19	微生物部員	4
新型コロナウイルスゲノム技術研修会 イルミナ iSeq Zoom 研修 (視聴のみ) (WEB開催)	—	2021/7/6, 7	微生物部員	5
下水から新型コロナウイルスがわかる～オンライン講 演会 (WEB開催)	—	2021/7/21	微生物部員	2
次世代シーケンス新型コロナウイルスゲノム解析セミ ナー (WEB開催)	—	2021/7/27	微生物部員	1
地全協中国・四国支部会議 特別講演「新型コロナウ イルス感染症とワクチン」 (録画配信) (WEB開催)	—	配信期間 7/27～ 8/13のうち、いず れか1日	微生物部員	1
もっと基礎からわかるリアルタイム PCR セミナー (WEB開催)	—	2021/8/12	微生物部員	2
第6回コロナゲノム研修会 (WEB開催)	—	2021/8/19	微生物部員	5
さらに活用するリアルタイム PCR セミナー (WEB開催)	—	2021/8/25	微生物部員	2
カンピロバクター食中毒 コロナ禍の状況と検査法 (WEB開催)	—	2021/8/26	微生物部員	4
動物由来感染症レファレンス Web セミナー (WEB開催)	—	2021/9/6	微生物部員	2
初めての次世代シーケンスセミナー ～基本的なワーク フローやデータ解析と最新情報を知る～ (WEB開催)	—	2021/9/16	微生物部員	1

第7回コロナゲノム技術研修会 (WEB 開催)	—	2021/10/6	微生物部員	3
令和3年度地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部微生物研究部会総会・研修会 (WEB 開催)	—	2021/10/12～13	微生物部員	7
薬剤耐性菌の検査に関する研修 (基本コース) (WEB 開催)	—	2021/10/21～22	微生物部員	3
令和3年度動物由来感染症対策技術研修会 (WEB 開催)	—	2021/11/2	微生物部員	1
地研 NGS 情報交換会 (WEB 開催)		2021/11/12	微生物部員	4
ウイルス検出における環境構築とリアルタイム PCR のポイント (WEB 開催)		2021/11/16	微生物部員	2
第155回管理・監督者研修 (危機管理コース) (WEB 開催)	—	2021/11/25～26	微生物部員	1
令和3年度アニサキスを中心とした寄生虫性食中毒に関する技術講習会 (WEB 開催)		2021/11/26	微生物部員	2
テクニカルセミナー「これから始める人は必見！細胞培養のキホンのキ～必要なものからやり方まで～」 (WEB 開催)		2022/1/6, 3/28	微生物部員	3
令和3年度北海道・東北・新潟ブロック腸管出血性大腸菌検査担当者研修会 (WEB 開催)	—	2022/1/13	微生物部員	1
検査機関に対する検査能力・精度管理等の向上を目的とした講習会 (WEB 開催)		2022/1/24～25	微生物部員	1
青森港検疫感染症措置机上訓練 (WEB 開催)	—	2022/2/9	微生物部員	1
令和3年度希少感染症診断技術研修会 (WEB 開催)	—	2022/2/17～18	微生物部員	2
令和3年度衛生理化学分野研修会 (WEB 開催)	—	2022/1/21	理化学部員	6
日本食品衛生学会西日本ブロック公開セミナー「食品に関するリスクコミュニケーション」 (WEB 開催)	—	2022/2/18	理化学部員	4
令和3年度環境関係法に関する新任者研修会	青森市	2022/4/16	公害部員	2
フジフィルム・和光純薬 (株) 環境分析セミナー (WEB 開催)	—	2021/4/22～23	公害部員	6
サーモフィッシャー (株) IC 技術説明会 (WEB 開催)	—	2021/5/21	公害部員	1
マイルストーンゼネラル (株) マイクロ波で出来る！無機材料分析のためのアルカリ溶解法の活用事例 (WEB 開催)	—	2021/9/14	公害部員	1
日本音響エンジニアリング (株) 第2回音環境セミナー航空機騒音・応用編 (WEB 開催)	—	2021/9/24	公害部員	2
環境調査研究所 機器分析研修 (WEB 開催)	—	2021/10/4～10/29 の間	公害部員	2
環境調査研究所 令和3年度国際環境協力基本研修代替措置 (WEB 開催)	—	2021/12/13～12/14 の間	公害部員	1

III 研究報告

1 報 文

青森県内で検出された結核菌の VNTR 分析及びゲノム比較による 分子疫学解析の検討

高橋洋平 山上剛志 武差愛美¹ 長内志保美

マルチプレックス PCR 及びキャピラリー電気泳動シーケンサーを用い、2012 年度以降に当センターに搬入された結核菌のうち 336 株に対し VNTR の再分析を実施し、このうち 334 株で全 24 領域の反復数を取得した。新たに取得した VNTR パターンをもとに比較解析を実施し、同一又は近縁型となった一部の菌株に対し、次世代シーケンサーによる比較ゲノム解析を試行した。その結果、VNTR 型が完全一致であっても直接的な伝播を示唆しない例や、VNTR が 23 領域の一致にとどまった疫学的関連株の SNV が 0 となる例など、VNTR 分析よりもさらに高精度の結果が得られることが分かった。今回の一連の解析から、VNTR 分析と比較ゲノム解析を組み合わせた分子疫学解析が、入念な疫学調査を進める上で非常に有用な補完ツールとなり得ることが示唆された。

Key words : *M. tuberculosis*, VNTR, NGS, TGS-TB, SNVs

1. はじめに

結核は、感染症法で二類感染症に分類され、全国で毎年 1 万人以上の患者が報告されている我が国の主要な感染症である。青森県における 2021 年の新登録結核患者数は 105 人、罹患率（人口 10 万人に対する新登録結核患者数）は 8.6 で、全国の罹患率 9.2 より低いものの、青森県を除く東北 5 県での罹患率が 5 前後の中、依然東北では最も高い状態が続いている¹⁾。

結核菌の分子疫学解析手法として、日本では Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) による型別分析が進められており、当センターでは、2012 年度より Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA) -VNTR 法による 12 領域での分析を開始した。その後、段階的に分析領域数を増やし、2017 年度からは、より菌株識別能の高い 24 領域分析法 (24^{Beijing}-VNTR) により株間比較を行っている。また、2021 年度からは、これまでのアガロースゲルによる分析からキャピラリー電気泳動シーケンサー (Capillary Electrophoresis Sequencer; CES) による分析へと切り替えるとともに、マルチプレックス PCR の検討を併せて行い、良好な結果を得たことを報告済みである²⁾。

今回、既報の方法²⁾に従い、2012 年度以降に当

センターに搬入された結核菌の VNTR 分析を再実施するとともに、同一又は近縁型のデータベースを再構築した。併せて、同一又は類似の VNTR 型を持つ株の一部に対し、次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer; NGS) で取得したデータを用いたゲノム解析を実施したので報告する。

2. 方法

2.1 VNTR 分析

(1) 対象菌株

2012 年 4 月から 2022 年 12 月までの間に県内各保健所より検査依頼があった全 341 株のうち、DNA 未保存の 4 株及び非結核性抗酸菌 1 株を除く計 336 株を対象とした。

2012 年度から 2020 年度までの DNA 溶液は、当センターに搬入された菌株から熱抽出 (200 μ L の滅菌水に少量の菌体を懸濁させ、95 $^{\circ}$ C ~ 100 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱後、13,000 rpm で 10 分間遠心分離した上清) し、アガロースゲルによる VNTR 分析を実施した後の残液を凍結保存していたものを用いた。2021 年度以降の菌株は、CES によるデータをそのまま用いた。

なお、2012 年度から 2016 年度に依頼のあった 99 株は、死菌の状態でご当センターに搬入されており、

2017年度の4株及び2018年度の2株を含め、計105株の菌株が保存されていなかった。

(2) PCR 及び反復数の判定

既報²⁾に従い、PCR 試薬には Platinum Multiplex PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用い、GC enhancer の添加比率を 20% とした。片側蛍光プライマーの配列及び濃度は、平成 28 年度結核菌 VNTR 技術研修会³⁾及び既報²⁾のとおりとした(表 1)。反応条件は、初期熱変性 95 °C 5 分の後、95 °C で 30 秒、アニーリングを 60 °C で 90 秒、72 °C で 60 秒の工程を 35 サイクル繰り返し、最終伸長反応を 60 °C で 30 分とした。

反復数の算定は次のとおり行った。PCR 産物を TE で一律 10 倍に希釈し、PCR 産物の TE 希釈液のうち 1 µL を、GeneScan 1200 LIZ dye Size Standard 0.25 µL 及び Hi-Di Formamide 10 µL (いずれも Thermo Fisher Scientific) と混合し、99 °C で 3 分間熱変性処理した。処理後のサンプルを、3500 Genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用い Long Fragment Analysis モードで分析した。得られたデータは GeneMapper Software 5 (Thermo Fisher Scientific) にて解析した。GeneMapper の設定ファイル (Panel, bin セット) は、前述の研修会³⁾で配付されたものをインポートし、既報²⁾に示すとおり bin の位置を調整して使用した。

反復数の読み取りにおいて、20 を超えた場合には一律に「>20」とした。CES でピークが観測されなかった領域については、アガロースゲルによる過去の分析結果の再確認又はアガロースゲルによる再分析を行い、それでもなおバンドが観測できなかった場合には「-2」、1500 bp 以上にバンドが観測された場合には「>20」とした。アガロースゲルと CES の反復数が異なった場合には、アガロースゲルからの反復数の算定に誤りがないか再確認し、誤りが認められた場合は CES で算定した反復数に修正した。CES においてピークが複数検出された場合や判断に迷うピークが検出された場合には、被検株の該当領域に注釈を付し、条件付きで反復数を決定していることを判別できるようにした。

(3) 比較解析及びデータベース再構築

取得した反復数を MLVA-mate⁴⁾にて比較解析し、各 VNTR パターンに VNTR 型名 (例: Mt-00v00) を付した。MLVA-mate での解析にあたっては、近縁型判定不一致領域数を 1 に設定し、同一又は近縁型が 2 株出現した時点で、これらの株を新たに Complex としてまとめ、同一の Complex 型名 (例: Mt-00c00, Mt-00a00) を付した。さらに、各株対

し、発生届及び検査依頼時の疫学調査の状況等を紐づけ、分子疫学解析と実地疫学調査を関連づけるとともに、瀬戸らの報告⁵⁾に基づき、VNTR パターンをもとにした系統推定を実施した。

2.2 比較ゲノム解析

(1) 対象菌株

VNTR 分析で形成された Complex のうち、NGS による解析が可能な株が各々 2 株ずつ属している Mt-14c14, Mt-15c06, Mt-18c14, Mt-19c28, Mt-21c33 の 5 つの Complex に加え、感染歴のある患者の再排菌事例として Complex にまとめた Mt-19a31 の計 6 つの Complex を対象とした。これらの Complex のうち 9 株の NGS データは、結核研究所との研究協力⁶⁾において取得済のものを用い、残る 3 株は新規にデータを取得した。

(2) DNA 抽出

新たにデータを取得した 3 株の DNA は、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。この際、病原体不活化のため、抽出工程で 95 °C、10 分の加熱処理を行い、抽出操作は全て安全キャビネット内で行った。最終溶出には Monarch gDNA Elution Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA; New England Biolab) を用い、溶出液を Agencourt AMPure XP (ベックマン・コールター) で精製してライブラリー作製に用いた。

(3) NGS によるデータ取得及び解析

ライブラリー作製には、Nextera DNA Flex (Illumina) を用い、50x の Coverage depth を目標に iSeq100 (Illumina) でデータを取得した。NGS データの解析には、国立感染症研究所で開発した結核菌 NGS 解析用パイプラインである TGS-TB⁷⁾を用いた。

比較ゲノム解析においては、各株に SNV 型名 (例: Mt-00s00) を付し、0 SNV となった株は同じ SNV 型とした。また、5 SNVs^{6,8,9)}以内になった株を、直接の伝播の可能性がある株同士として同一クラスターにまとめ、同一の管理番号 (例: Mt-00g00) を付番した。Median-Joining Network¹⁰⁾による作図には PopART¹¹⁾を使用し、外群には、全ての解析において試験的に H37Rv を置いた。

3. 結果

3.1 VNTR 分析

対象とした 336 株のうち、334 株で全 24 領域のデータを取得することができた。残る 2 株は保存 DNA 溶液の質が悪く、CES でもアガロースゲルでも反復数の判定が困難な領域が多数認められた。菌株も未保存であり、DNA の再抽出も不可能であっ

たことから、これらの株は解析の対象から除外した。

得られた 334 株の VNTR データを MLVA-mate で比較解析したところ、計 39 の Complex が形成され、何らかの Complex に含まれた株は計 139 株であった。得られた Complex のうち、10 株以上の菌株が含まれる Complex を図 1 に示した。

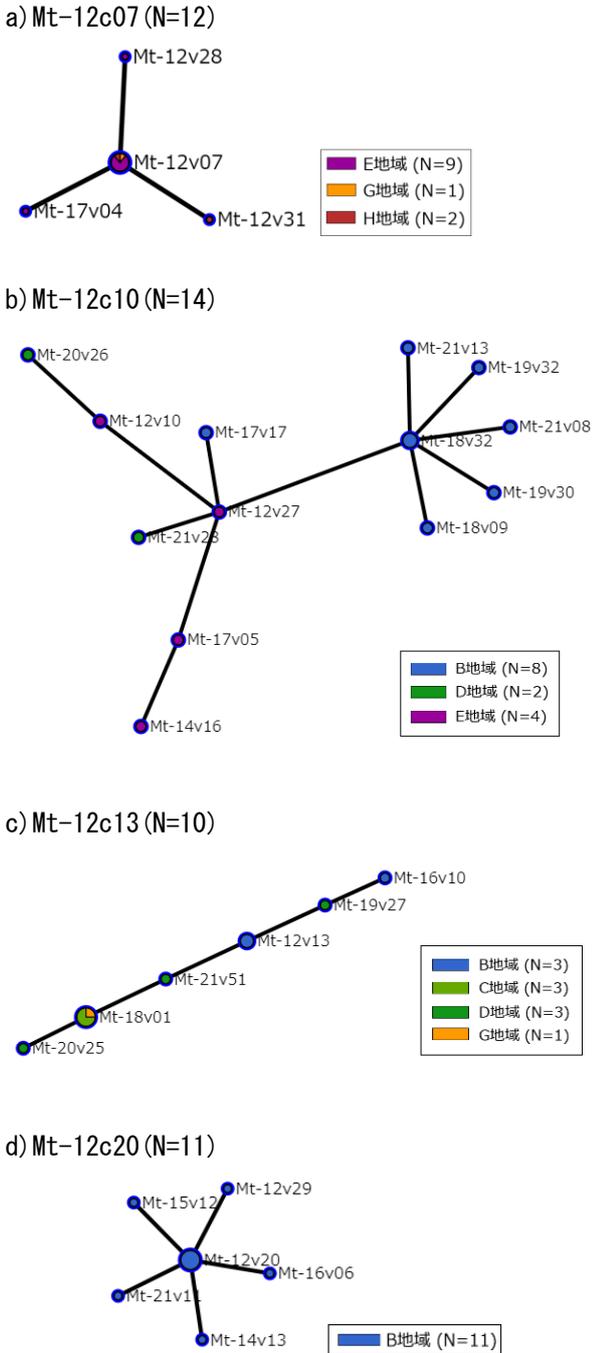


図 1 10 株以上の菌株が含まれる Complex

3.2 比較ゲノム解析

対象とした 6 つの Complex の解析結果を、(1)から(6)及び表 2 に示した。

(1)Mt-14c14 : 疫学的に関連がなく、地理的にも離れた 2 地域で VNTR が 23 領域一致した事例

SNV 数は 44 となり、これらの 2 株に関しては、直接的な伝播の可能性は否定的と推察された。

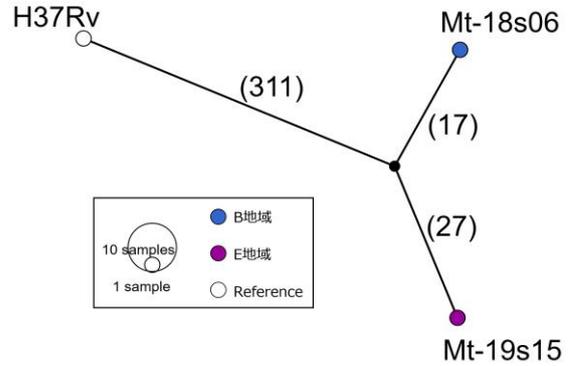


図 2 Mt-14c14 のネットワーク図

(2)Mt-15c06 : 疫学的に関連がなく、地理的にもやや近い 2 地域で VNTR が 24 領域一致した事例

地理的には(1)よりもやや近い地域間の事例であったが、比較の結果 7 SNVs の違いとなった。目安とした 5 SNVs に近いものの、直接的な伝播の可能性は否定的であることが示唆された。ただ、近縁株を分類する際に、患者間に関連性が見出された場合の SNV 数の基準を 6 から 12 としている例^{6,8,9)}があることに加え、これら 2 株の分離年は約 2 年間離れていることから、間接的なリンクがある可能性も否定できないものと推察された。

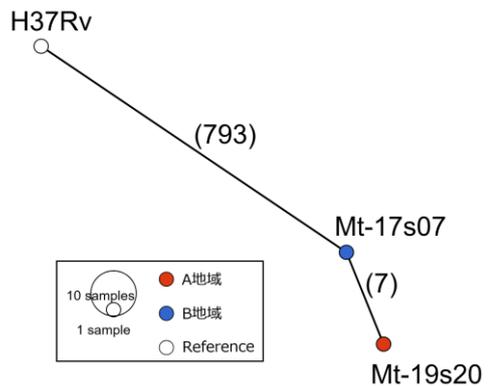


図 3 Mt-15c06 のネットワーク図

(3)Mt-18c14 : 疫学的に関連がなく、地理的にも離れている 2 地域で VNTR が 24 領域一致した事例

両株の VNTR パターンは完全に一致した一方、比較ゲノム解析では SNV 数が 255 となり、直接的な伝播の可能性は否定的と推察された。

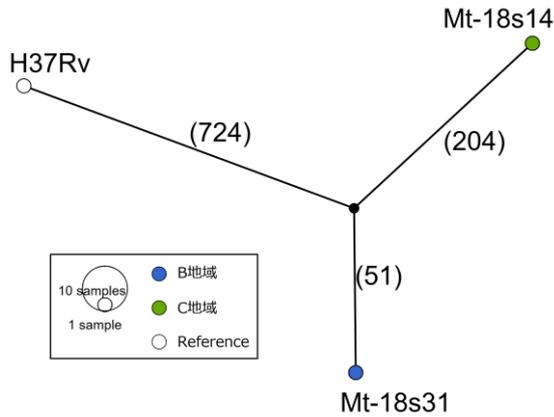


図 4 Mt-18c14 のネットワーク図

(4) Mt-19c28: 調査資料上接触の可能性があり、VNTR が 24 領域一致した事例

疫学調査時点における患者相互の接触に関する言及はなかったが、各患者の個別の調査資料を比較したところ、両者とも同時期に同じ病院で治療歴があり、この間に接触があった可能性も否定できない事例であった。分離株の比較ゲノム解析の結果は 0 SNV となり、直接的な伝播の可能性を示唆する結果となった。

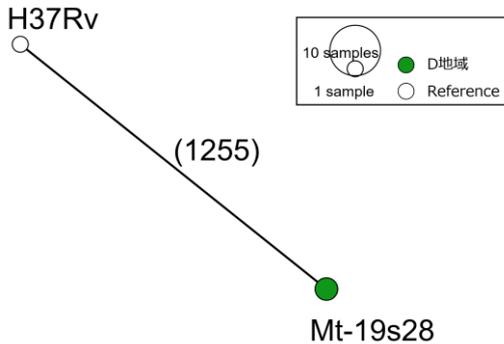


図 5 Mt-19c28 のネットワーク図

(5) Mt-21c33: 疫学的に関連が認められた一方で、VNTR が 23 領域の一致にとどまった事例

2 株とも集団感染事例由来の分離菌株ではあったが、VNTR は 23 領域の一致にとどまった事例であった。比較ゲノム解析では 0 SNV となり、VNTR 分析よりも疫学調査を明確に支持する結果が得られた。

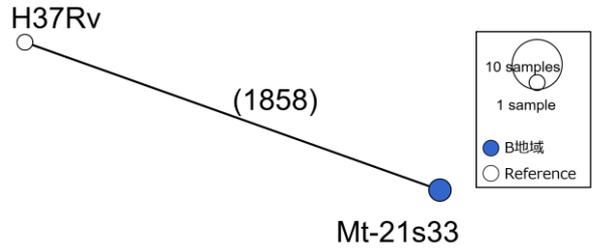


図 6 Mt-21c33 のネットワーク図

(6) Mt-19a31: 過去に排菌歴のある患者の再排菌事例

初回排菌時の分離株と再排菌時の分離株では、VNTR パターンは 20 領域の一致となったが、その差異は、再排菌時の分離株における、JATA5, JATA14, JATA15 の欠損と、超可変領域 1 領域の違いであった。この 2 株を TGS-TB に付したところ、比較解析では 0 SNV となり、薬剤耐性を獲得した菌が生き残って再排菌となった可能性が否定できないものと推察された。また、VNTR 分析依頼時の保健所からの資料では、再排菌時の分離株で INH が耐性となっていたが、TGS-TB の薬剤耐性予測においても、当該菌株で INH 活性化に関与する *katG* が欠損となっており、表現型とゲノム解析の結果が一致していることが分かった。

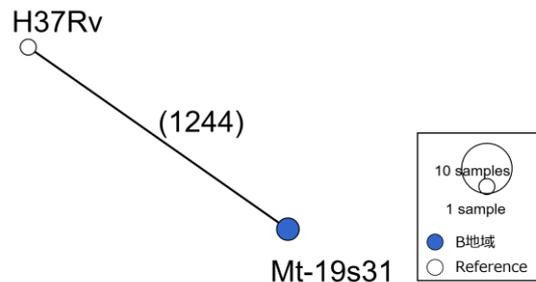


図 7 Mt-19a31 のネットワーク図

4. 考察

4.1 VNTR 分析

搬入された結核菌のうち 334 株で全 24 領域の VNTR データを取得できたことにより、これまでデータ不足が原因で解析対象に含めることができていなかった株を新たに解析対象に含めることができた。その結果、全体の約 4 割に当たる 139 株が何らかの Complex を形成することが明らかとなった。この中には、比較的最近になって分離された菌株が数年前の搬入株と Complex を形成した事例もあったことから、結核対策には継続してデータを蓄積していくことが重要である。また、新たに取得した

VNTR パターンの比較分析から形成された Complex 数は 39 であったが、この中には、これまで別々の Complex であった集団同士が、新たに解析対象に含めた菌株を介して一つの大きな Complex にまとまる事例もあった。このことから、分析方法や取得するデータを更新した場合には、可能な限り過去の保存株に対しても分析を再実施し、比較するデータを揃えておくべきと考えられる。

また、VNTR 分析等の型別分析では、同一型の菌株を速やかに検索できるよう、データ管理にも工夫が必要である。実際に、今回データベースを再構築したところ、NGS による分子疫学解析を実施する菌株の選択が非常に効率的となった。VNTR パターンや、そのパターンから導かれる集団に対してもそれぞれ付番し、疫学情報等のメタデータも併せて管理することで、今後搬入される菌株に対しても効率的に比較分析を進めることができると考えられる。

4.2 比較ゲノム解析

NGS によるゲノム解析の結果、同一の Complex に含まれる株であっても、地理的に離れた地域由来の株で、かつ疫学調査や発生届上での関連が見られない場合は、直接の伝播の可能性を示唆しない結果が導かれることが分かった。一方、疫学上明らかに関連がある場合には、VNTR 型が完全に一致しなくても、比較ゲノム解析では疫学調査を支持する結果となる可能性が示唆された。

今回の試行結果のように、VNTR 分析では、疫学上関連がないにもかかわらず、偶然に同じ型を示す菌株が出現する可能性がある。このため、VNTR 型の一致のみを根拠として疫学調査を実施すると、実際には全く関連がない事例までもが調査対象となってしまう可能性が否定できない。しかし、瀬戸らの報告⁹⁾でも述べられているように、比較ゲノム解析による結果をさらなる根拠として疫学調査につなげることにより、貴重な人的資源や時間を重要な調査のみに集中させることができ、より効率的な結核対策につながるものと考えられる。

4.3 結核菌の分子疫学解析

今回、NGS データの解析には感染研で開発された結核菌ゲノム解析用パイプラインである TGS-TB を用いた。TGS-TB は、NGS で取得したデータをアップロードすることで解析が可能のため、良質な NGS データさえ取得できれば非常に簡単に解析することができる。このため、本パイプラインが使用できる限りは、高精度の分子疫学解析を継続して実施することができる。また、比較ゲノム解析以外にも、系統や薬剤感受性予測に関するデータも

得られるため、結核菌のゲノム解析に非常に有用といえる。

しかし、比較ゲノム解析を主体とする分子疫学解析は、非常に高精度で有用な一方、全株を NGS 解析に付した場合は、データ取得までのコストが現状では非常に高額となってしまうことが課題である。このため、現段階では、VNTR 分析に基づく比較解析を実施し、同一の Complex に含まれる菌株が出現した場合に NGS 解析へと進み、疫学調査へとつなげるのが現実的かつ効率的と考えられる。

なお、前述のとおり、今回対象とした菌株のうち計 105 株は菌株が保存されていなかったため、NGS 解析に付するための良質な DNA を得るのが不可能であった。NGS 解析不能となった株の中には、VNTR 分析で Complex を形成した菌株も多く含まれていたことを踏まえると、新たな分析法が開発された時に備え、菌株は可能な限り凍結保存しておくことが重要と考えられる。

5. まとめ

マルチプレックス PCR 及び CES を用いて、2012 年度以降に搬入された結核菌のうち 334 株で全 24 領域の反復数を取得し、データベースを再構築した。比較解析により形成された Complex のうちの 6 つについて、TGS-TB による NGS 解析を試行した結果、VNTR よりも疫学調査を大幅に補完し得る高精度の分子疫学解析が可能となることが分かった。

今後は、図 1 に示したような多くの株で形成される Complex を中心に NGS による比較解析を進め、疫学調査に効率的につなげることで、県内の結核対策に貢献していきたい。

謝 辞

研究協力⁶⁾により NGS データを提供し、また、中間報告会を開催いただいた、公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部 御手洗聡先生、村瀬良朗先生に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 青森県結核の概要 2021.
<https://www.pref.aomori.lg.jp/soshiki/kenko/hoken/files/2021tbgaiyou.pdf> 令和 5 年 1 月 23 日閲覧。
- 2) 高橋洋平ほか：キャピラリー電気泳動シークエンサー及びマルチプレックス PCR による結核菌 VNTR 分析. 青森県環境保健センター年報, 32, 20-30, 2021
- 3) 地域保健総合推進事業「地域における健康危機

管理体制確保のための地方衛生研究所の連携協力の推進並びに検査精度の向上及び疫学情報機能の強化」:平成28年度結核菌 VNTR 技術研修会資料,平成28年度

4) 地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学学会 マニュアル作成ワーキンググループ編:腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック (O157, O26, O111 編) 第1版 (Ver.1.2), 2018年11月

5) Seto, J. et al.: Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation. *Infect. Genet. Evol.*, **35**, 82-88, 2015.

6) 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「オミックス情報に基づく結核感染制御技術の開発研究」(主任研究者:御手洗 聡) 「東北地区における結核菌ゲノム分子疫学調査研究」:研究成果報告会・技術研修会資料, 2021年3月19日

7) Sekizuka T. et al: TGS-TB: Total Genotyping Solution for *Mycobacterium tuberculosis* Using Short-Read Whole-Genome Sequencing. *PLoS One*, **10**, e0142951, 2015

8) 瀧井 猛将: 結核分子疫学研究における全ゲノム解析の役割. *結核*, **94**, 547-552, 2019.

9) 瀬戸順次ほか: 山形県における結核菌ゲノム解析を用いた結核分子疫学調査. *感染症学雑誌*, **97**, 6-17, 2023.

10) Bandelt, H. et al.: Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, **16**, 37-48, 1999.

11) Leigh, J. W. et al.: PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.*, **6**, 1110-1116, 2015; <https://popart.maths.otago.ac.nz/>

表1 プライマー配列とマルチプレックスPCRにおける終濃度

Mix	#	領域名	配列		濃度 (μ M)
1	21	miru4	FAM-GTCAAACAGGTCACAACGAGAGGAA	CCTCCACAATCAACACACTGGTCAT	0.1
	2	miru10	VIC-ACCGTCTTATCGGACTGCACTATCAA	CACCTGGTGATCAGCTACCTCGAT	0.05
	23	miru16	NED-CGGGTCCAGTCCAAGTACCTCAAT	GATCCTCCTGATTGCCCTGACCTA	0.05
	7	miru26	PET-GCGGATAGGTCTACCGTCGAAATC	TCCGGGTCATACAGCATGATCA	0.1
2	9	miru31	FAM-CGTGCAAGAGAGCCTCATCAATCAT	AACCTGCTGACCGATGGCAATATC	0.05
	20	miru40	VIC-GATTCCAACAAGACGCAGATCAAGA	TCAGGTCTTTCTCTCACGCTCTCG	0.025
	15	ETR-A	NED-CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT	0.1
	24	ETR-C	PET-GTGAGTCGCTGCAGAACCTGCAG	GGCGTCTTGACCTCCACGAGTG	0.2
3	1	Mtub04	FAM-GTCCAGGTTGCAAGAGATGG	GGCATCCTCAACAACGGTAG	0.05
	3	Mtub21	VIC-AGATCCCAGTTGTCGTCGTC	CAACATCGCCTGGTTCTGTA	0.025
	22	Mtub30	NED-AGTCACCTTTCCTACCACTCGTAAC	ATTAGTAGGGCACTAGCACCTCAAG	0.025
	19	Mtub39	PET-AATCACGGTAACTTGGGTTGTTT	GATGCATGTTTCGACCCGTAG	0.1
4	5	QUB11b	FAM-CCGATCTAGCCCGTGAAGA	AGGGTCTGATTGGCTACTCA	0.2
	11	QUB26	VIC-GAGCCAAATCAGGTCCGG	GAGGTATCAACGGGCTTGT	0.2
	12	QUB4156	NED-TGGTCGCTACGCATCGTGTGGCCCGT	TACCACCCGGGCAGTTTAC	0.1
	4	Mtub24	PET-CACTAGCTGCGTCACTGG	GCTGATTCCCGACGAAAG	0.05
5	14	QUB11a	FAM-CGTGATGTTGATCGGGATGT	ACCCTGGAGTCTGGCATC	0.1
	8	QUB15	VIC-TACATTCGCGCCAAAGG	AGGGGTTCTCGGTCACCC	0.025
	13	QUB18	NED-ATCGTCAGCTGCGGAATAGT	AATACCGGGGATATCGGTTC	0.2
	16	QUB3232	PET-CAGACCCGGCGTCATCAAC	CCAAGGGCGGCATTGTGTT	0.1
6	10	QUB3336	FAM-ATCCCCGCGGTACCCATC	GCCAGCGGTGTCGACTATCC	0.2
	17	VNTR3820	VIC-TGCGCGGTGAATGAGACG	ACCTTCATCCTTGCGGAC	0.05
	18	VNTR4120	NED-GTTCACCGGAGCCAACC	GAGGTGGTTTCGTGGTTCG	0.05
	6	VNTR2372	PET-ACCTCCGTTCCGATAATC	CAGCTTTCAGCCTCCACA	0.2

#: JATANo.

表 2 VNTR 分析及び NGS 解析で得られた系統・薬剤耐性・分子疫学解析の結果

Complex 菌株番号	VNTR			NGS				
	VNTR 型	推定遺伝系統		系統・AMR		SNV 型		
		VNTR 型	推定系統	亜系統	Lineage	AMR	SNVs	SNP 型
Mt-14c14								
Mt-18006	Mt-18v06	非北京型	-	4.9	-	base*	Mt-18s06	-
Mt-19015	Mt-14v14	非北京型	-	4.9	-	44	Mt-19s15	-
Mt-15c06								
Mt-17007	Mt-15v06	非北京型	-	4.5	INH, ETH	base	Mt-17s07	-
Mt-19020	Mt-15v06	非北京型	-	4.5	INH, ETH	7	Mt-19s20	-
Mt-18c14								
Mt-18014	Mt-18v14	非北京型	-	4.3.3	INH	base	Mt-18s14	-
Mt-18031	Mt-18v14	非北京型	-	4.3.3	INH	255	Mt-18s31	-
Mt-19c28								
Mt-19028	Mt-19v28	北京型	ST3	2.2.1	-	base	Mt-19s28	Mt-19g28
Mt-19039	Mt-19v28	北京型	ST3	2.2.1	-	0	Mt-19s28	Mt-19g28
Mt-21c33								
Mt-21033	Mt-21v33	非北京型	-	1.1.1	PZA	base	Mt-21s33	Mt-21g33
Mt-21043	Mt-21v43	非北京型	-	1.1.1	PZA	0	Mt-21s33	Mt-21g33
Mt-19a31								
Mt-19031	Mt-19v31	北京型	Modern	2.2.1	SM	base	Mt-19s31	Mt-19g31
Mt-21035	Mt-21v35	北京型	Modern	2.2.1	INH, SM	0	Mt-19s31	Mt-19g31

*: base; SNVs の計数において基準とした菌株

Molecular epidemiological Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Aomori Prefecture by VNTR analysis and by genomic comparison

Yohei Takahashi, Takeshi Yamagami, Manami Musashi , Shihomi Osanai

Of the *M. tuberculosis* strains shipped to Aomori Prefecture Public Health and Environment Center from fiscal year 2012 onwards, VNTR analyses were performed on 336 strains were reanalyzed for VNTR using multiplex PCR and a capillary electrophoresis sequencer, and VNTR profiles of all 24 loci were obtained for 334/336 strains. A comparative analysis was performed based on newly obtained VNTR patterns, and a comparative genomic analysis was attempted with a next-generation sequencer for some strains that were the same or closely related VNTR profiles. The results of comparative genomic analysis were more precise than the VNTR analysis, such as instances wherein VNTR types exactly matched but did not suggest direct transmission, and instances in which the SNV was 0 for epidemiologically related strains but the VNTR only matched in 23 loci. This set of analyses suggests that a molecular epidemiology analysis combining VNTR analysis and comparative genomic analysis can be a very useful complementary tool to advance diligent epidemiological investigations.

Key words: *M. tuberculosis*, VNTR, NGS, TGS-TB, SNVs

青森県でヒトから分離された感染性胃腸炎起因菌の病原体サーベイランスの検討

高橋洋平 山上剛志 武差愛美¹ 橋本恭奈²

県内 11 の定点機関から収集したサルモネラ属菌 (2021 年分離株)、ビブリオ属菌 (2016 年～2021 年分離株)、エルシニア属菌 (2019 年～2021 年分離株) 及びエシェリキア属菌 (*E. coli* 及び *E. albertii*) (2020 年搬入株及び 2021 年分離株) の 4 属の感染性胃腸炎起因菌を対象として、生化学的試験、血清学的試験、PCR、薬剤感受性試験を実施した。その結果、特定の血清型・抗原遺伝子型の集積や、血清型・抗原遺伝子型間における表現型や保有病原遺伝子の違い、一般の性状を示さない特異な株や、病原性に注意を要すると考えられる株の存在等の特徴が認められ、さらに、ビブリオ属菌及びエルシニア属菌については、検出地域における分離数や分離される菌種、血清型・抗原遺伝子型の違い、病原体保有者の年齢階層の違いも明らかとなった。

Key words : *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Escherichia*, surveillance

1. はじめに

青森県環境保健センターでは、飲食起因感染症の早期発見と予防を目的に、県内の 11 定点機関 (2022 年末時点では 10 定点) における感染性胃腸炎起因菌 (サルモネラ属菌 *Salmonella* spp.、カンピロバクター属菌 *Campylobacter* spp.、ビブリオ属菌 *Vibrio* spp. 及びエルシニア属菌 *Yersinia* spp.) の検出状況を収集し、青森県病原微生物検出情報として週単位で取りまとめ公表している¹⁾。このうち、サルモネラ属菌及びビブリオ属菌については、定点機関からの検出報告をもとに菌株も併せて収集し、性状解析を実施している。

これまで、サルモネラ属菌については、収集菌株の血清型及び薬剤感受性を 1 年単位で取りまとめ報告してきた²⁾。一方、ビブリオ属菌については、2000 年代まで検出数の大部分を占めていた腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) の報告が大幅に減少し、それ以外のビブリオ属菌の検出割合が相対的に上昇したことから、これまで腸炎ビブリオに特化していた試験項目を見直し、2020 年からは新たな項目で試験を実施している。また、エルシニア属菌については、積極的な菌株収集を行っていなかったが、2017 年から試験的に収集を開始し、収集体制の確

立及び予備試験の過程を経て、2019 年からは継続して性状解析を進めている。さらに、2018 年 4 月からは、11 定点機関のうち 1 機関から協力を得て、病原遺伝子を保有する大腸菌 (*Escherichia coli*) の菌株を収集し、性状解析を実施している^{3,4)}。これまでの解析の結果、収集した菌株の中に新興感染症原因菌として知られるようになった⁵⁾ *E. albertii* が一定数含まれていることや、同一抗原遺伝子型を持つ菌株の集積が認められること等の知見が得られたことから、継続して収集及び解析を実施している。

今回、サルモネラ属菌、ビブリオ属菌、エルシニア属菌及びエシェリキア属菌 (*E. coli* 及び *E. albertii*) の 4 属の感染性胃腸炎起因菌を対象として、生化学的試験、血清学的試験、PCR、薬剤感受性試験を実施し、一定の知見を得たので報告する。

2. 調査方法

2.1 サルモネラ属菌

(1) 材料

2021 年 1 月から同年 12 月の 1 年の間に、11 定点機関からの検出報告をもとに収集した菌株を用いた。

(2) 生化学的試験

各種分離培地及び確認培地 (栄研化学又は日水製薬) を用いて、定法に従い菌種及び亜種を確認した。

1 東青地域県民局環境管理部

2 令和 3 年度で退職

必要に応じて、同定キット api20E 又は ID32E (いずれもバイオメリュー) を用いた。

(3) 血清型別試験

既報²⁾と同様に、免疫血清 (デンカ) を用いて定法に従い血清型を確認した。

(4) PCR

既報^{2,6)}と同様の方法で、*fliB* の検出及び亜種推定を実施するとともに、同一の反応条件の下、既報^{7,9)}のプライマーを用いた multiplex PCR により、複相の発現に関与する *hin* の検出及びプラスミド性病原遺伝子である *spvRBC* の保有状況を調べた。PCR 試薬は EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (タカラバイオ) を用い、得られた増幅産物は 3% アガロースゲルで電気泳動した。

(5) 薬剤感受性試験

既報²⁾と同様に、KB ディスク (栄研化学) を用い、1 濃度ディスク拡散法により行った。McFarland 濃度 0.5 に調製した菌液をミュラーヒントン II 寒天培地 (BD) に塗布し、ディスク配置後、35 °C、好氣的条件下で 16~18 時間培養後判定した。使用薬剤は、β-ラクタム系薬剤 11 剤 (ABPC, PIPC, CEZ, CTM, CTX, CAZ, CFPM, CMZ, IPM, MEPM, AZT) 及びそれ以外の薬剤 13 (FOM, GM, KM, AMK, TC, DOXY, MINO, NA, CPMX, LVFX, ST, CP, CL) の計 24 薬剤とした。

2.2 ビブリオ属菌

(1) 材料

2016 年 1 月から 2021 年 12 月の 6 年の間に、11 定点機関の検出報告をもとに収集した菌株を用いた。

(2) 生化学的試験

各種分離培地 (栄研化学又は日水製薬)、NaCl (0%、3%、8% 及び 10%) 加ペプトン (BD) 及び api20E (バイオメリュー) により、定法に従い菌種を確認した。

(3) 血清学的試験

菌種が *V. cholerae* と確認された菌株に対してはコレラ菌免疫血清「生研」(デンカ) を、*V. parahaemolyticus* と確認された菌株に対しては腸炎ビブリオ型別用免疫血清「生研」(デンカ) を用い、定法に従って血清型を確認した。

(4) PCR

既報¹⁰⁻¹³⁾を参考に PCR から菌種を確認し、*V. cholerae* と確認された菌株に対しては、既報¹⁴⁻¹⁶⁾のプライマーを用いた PCR により抗原遺伝子型の確認及び病原遺伝子の検索を、*V. parahaemolyticus* と確認された菌株に対しては、既報¹⁷⁾のプライマ

ーを用いて毒素遺伝子の保有状況を確認した。PCR 試薬は EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (タカラバイオ) を用い、得られた増幅産物は 3% アガロースゲルで電気泳動した。反応条件は、熱変性 94 °C 5 分の後、94 °C で 30 秒、アニーリングを 55 °C 又は 60 °C で 30 秒、72 °C で 1 分の工程を 25 サイクル繰り返し、最終伸長反応を 72 °C で 7 分とした。得られた増幅産物は 2% アガロースゲルで電気泳動した。

(5) 薬剤感受性試験

サルモネラ属菌と同様に実施し、使用薬剤は、*V. cholerae* 以外の菌種に対しては 12 剤 (ABPC, CTX, CAZ, CFPM, CFX, IPM, MEPM, GM, AMK, TC, CPMX, ST)、*V. cholerae* に対しては CP を加えた 13 剤とした。

2.3 エルシニア属菌

(1) 材料

2019 年 1 月から 2021 年 12 月の 3 年の間に、11 定点機関からの検出報告をもとに収集した菌株を用いた。

(2) 生化学的確認

各種糖分解培地を含む確認培地、リパーゼ・レシチナーゼ反応、β-グルコシダーゼ・β-ガラクトシダーゼ検出試験により、菌種及び生物型を確認した^{18,19)}。併せて、低温 (22 °C) 及び高温 (37 °C) 培養における運動性及び自己凝集反応の確認を実施した^{18,19)}。

(3) 血清学的試験

搬入株が *Yersinia enterocolitica* と同定された場合、エルシニア・エンテロコリチカ O 群別用免疫血清「生研」(デンカ) を用い、定法に従って血清型を確認した。

(4) PCR

既報のプライマー¹⁹⁻²²⁾を用いて、PCR による菌種・抗原遺伝子型の確認及び病原遺伝子の検索を行った。このうち、*yadA*²¹⁾、*virF*²¹⁾、*ystA*²²⁾ の検出は multiplex PCR に変更して実施した。PCR 試薬は EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (タカラバイオ) を用い、反応条件は、熱変性 94 °C 5 分の後、94 °C で 30 秒、アニーリングを 58 °C で 30 秒、72 °C で 1 分の工程を 25 サイクル繰り返し、最終伸長反応を 72 °C で 7 分とした。得られた増幅産物は 2~3% アガロースゲルで電気泳動した。

(5) 薬剤感受性試験

スクリーニングを目的とし、サルモネラ属菌と同様の方法で実施した。ただし、培養時間は 24 時間とした。使用薬剤は、サルモネラ属菌と同一の計 24 薬剤とした。

2.4 エシエリキア属菌 (*E. coli*, *E. albertii*)

(1) 材料

検査機関で PCR により病原遺伝子を保有する *Escherichia* spp. と判定された中南地域由来の菌株のうち、当センターに搬入された株を用いた。対象期間は、2020 年 1 年間に搬入された株及び 2021 年 1 年間に検出された菌株とし、1 年ごとに集計した。

(2) 生化学的試験

各種分離培地及び確認培地(栄研化学又は日水製薬)により、定法に従い菌種を確認した。

(3) PCR

PCR は、アルカリ熱抽出法により抽出した DNA を鋳型とし、既報のプライマー²³⁻³⁰を用いた病原遺伝子の検索、*E. albertii* の判別、抗原遺伝子型の確認を実施した。PCR 試薬には、TaKaRa EXTaq のほか、EmeraldAmp MAX PCR Master Mix、TaKaRa Z-Taq、MightyAmp DNA Polymerase Ver.2、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (いずれもタカラバイオ) KOD -Multi & Epi- (東洋紡) 又は AmpliTaq GoldDNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) を用いた。ETEC と分類された菌株又は *stx1/2* が検出された菌株については、既報の方法³¹⁻³²)により毒素遺伝子の型別を行い、EPEC については *bfpA*²⁹)の保有状況を確認した。得られた増幅産物は、いずれも 3 %アガロースゲル又は自動キャピラリー電気泳動装置 QIAxcel DNA Screening Kit (QIAGEN 社) で電気泳動した。

(4) 薬剤感受性試験

サルモネラ属菌と同様の方法で行った。また、薬剤感受性パターンから AmpC β-ラクタマーゼの産生が疑われた株については、国立感染症研究所で示している方法³³)に従い、阻害剤を用いたディスク拡散法によるスクリーニング及び PCR による保有薬剤耐性遺伝子の検索を行った。また、一部のテトラサイクリン系薬剤 (TC, DOXY, MINO) 耐性株に対しては、PCR³⁴)によるテトラサイクリン耐性遺伝子を検索した。試薬には EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (タカラバイオ) を用い、反応条件は、熱変性 94°C 5 分の後、94°C で 30 秒、アニーリングを 55°C で 30 秒、72°C で 1 分の工程を 25 サイクル繰り返し、最終伸長反応を 72°C で 7 分とした。得られた増幅産物は 2%アガロースゲルで電気泳動した。

3. 結果と考察

3.1 サルモネラ属菌

2021 年の病原微生物検出情報では 52 例の報告が

あり、このうち 41 株を収集することができた。収集した株のうち、同一患者から一定期間にわたり複数回分離された同一株 5 株を除いた 36 株の試験結果は表 1 のとおりであった。

表 1 2021 年に分離されたサルモネラ属菌株の血清型及び耐性薬剤

血清型名	耐性薬剤	計
Anatum	-	1
Bareilly	-	1
Brandenburg	-	2
	ABPC, PIPC, TC, DOXY, ST, CP	1
Infantis	-	3
	TC, NA	1
Litchfield	-	1
Manhattan	TC	2
Newport	-	1
Reading	-	1
Saintpaul	-	1
Schwarzengrund	-	1
	KM, ST	1
Singapore	-	1
Thompson	-	1
Typhimurium	-	1
	ABPC, PIPC, TC, CP	1
O4:i:-	ABPC	1
	ABPC, KM, TC, MINO, DOXY	3
	ABPC, PIPC	1
	ABPC, PIPC, TC, MINO, DOXY	3
	ABPC, TC, MINO, DOXY	3
O4:NM:NM	-	1
O16:a:UT	-	1
OUT:l,v:1,2	TC, DOXY, NA, ST	1
OUT:UT:UT*	-	1
		36

NM: no motile.

- : 全ての試験に対し感性又は中間

*: *S. enterica* subsp. *diarizonae*

血清型では O4:i:- が 11 株と最も多く、次いで、Infantis が 4 株、Brandenburg が 3 株と続いた。このほか、*S. enterica* subsp. *diarizonae* と同定された株が 1 株、*S. enterica* subsp. *enterica* と同定されたものの型別不能の株が 3 株認められ、このうち 1 株は運動性陰性の株であった。

PCR では、複相菌のうち Manhattan では *fljB* が増幅されず、Brandenburg、Reading、Schwarzengrund では *hin* が増幅されなかった。いずれも特定の血清型に対してプライマー配列にミスマッチがあるためと推察され、*fljB* は H 抗原の多様性に由来し、*hin* は、用いたプライマーの配列が本来 O4:i:- の精査を目的として設計されていることに由来するものと考えられる。一方、*spvRBC* は Typhimurium のみから検出され、O4:i:- では検出されなかった。

薬剤感受性試験の結果では、O4:i:- は 11 株全てが 1 剤以上の薬剤に耐性を示し、このうち 6 株は 5 剤

に耐性を示した。また、Brandenburg のうち 1 株が 6 剤に耐性を示した。なお、今回の調査対象株では、第3世代以上のセフェム系薬剤 (CTX, CAZ, CFPM)、セファマイシン系薬剤 (CMZ)、カルバペネム系薬剤 (IPM, MEPM) 又はモノバクタム系薬剤 (AZT) に耐性を示す株は確認されなかった。

3.2 ビブリオ属菌

2016 年から 2021 年の病原微生物検出情報では、計 18 例 (2016 年 7 例、2017 年 3 例、2018 年 4 例、2019 年 2 例、2020 年 2 例、2021 年 0 例) の報告があり、このうち 16 株 (2016 年 5 株、2017 年 3 株、2018 年 4 株、2019 年 2 株、2020 年 2 株、2021 年 0 株) を収集することができた。このうち、2016 年に収集した 1 検体には、性状の異なる *V. parahaemolyticus* が 2 株含まれていたため、各々を分離し、計 17 株を調査に用いた。試験結果は表 2 のとおりであった。

表 2 2016 年から 2021 年の間に収集したビブリオ属菌株の菌種、血清型、保有遺伝子及び耐性薬剤

分離年	血清型	保有遺伝子	耐性薬剤
<i>V. alginolyticus</i> (3)			
2017	(nt)	(nt)	ABPC
2018	(nt)	(nt)	ABPC
2019	(nt)	(nt)	ABPC
<i>V. cholerae</i> (4)			
2016	OUT*	<i>ompU, toxR, hlyA_{ET}</i>	-
2018	OUT*	<i>toxR, hlyA_{ET}</i>	ST
2019	OUT*	<i>toxR, hlyA_{ET}</i>	-
2020	OUT*	<i>toxR, hlyA_{ET}</i>	-
<i>V. fluvialis</i> (2)			
2016	(nt)	(nt)	ABPC
2017	(nt)	(nt)	ABPC
<i>V. parahaemolyticus</i> (8)			
2016	O1:K56	<i>tlh, tdh, trh</i>	-
2016	O3:K6	<i>tlh, tdh</i>	ABPC
2016	O4:KUT	<i>tlh, tdh</i>	ABPC
2016	O4:K10	<i>tlh</i>	-
2017	O1:KUT	<i>tlh</i>	-
2018	O3:K20	<i>tlh</i>	ABPC
2018	O3:K6	<i>tlh, tdh</i>	ABPC
2020	O1:K58	<i>tlh, trh</i>	ABPC

(nt): not tested.

*: non-O1, non-O139

V. cholerae は 4 株全てが non-O1, non-O139 であり、コレラ毒素遺伝子 *ctxA* も検出されなかった。試験的に実施した *V. cholerae* の病原遺伝子の検索では、4 株全てから *toxR* 及びエルトール型の *hlyA* (*hlyA_{ET}* と表記) が検出され、1 株からは *ompU* も検出された。

V. parahaemolyticus において、*tlh* は 8 株全てから検出された一方、主要な毒素遺伝子である *tdh* 及び *trh* の検出状況に着目すると、*tdh* のみが検出された株が 3 株、*trh* のみが検出された株が 1 株、*tdh* と *trh* の両方が検出された株が 1 株、*tdh* と *trh* のいずれも不検出の株が 3 株であった。この中で、*tdh* のみが検出された 3 株のうち 2 株の血清型は、1990 年代から 2000 年代に食中毒の原因として多数分離された O3:K6 であった。なお、2018 年分離株において、血清型が O 群と K 型の組み合わせとして非定型の O3:K20 となった株が認められたが、その原因は不明である。

薬剤感受性試験では、*V. alginolyticus*、*V. fluvialis* の全株及び *V. parahaemolyticus* の 5 株が ABPC に、*V. cholerae* の 1 株が ST に耐性を示した。

このほか、分離されたビブリオ属菌の菌種と、地域間差及び保菌者の年齢階層における関係性に着目し、搬入されたビブリオ属菌の由来地域と菌株数・菌種の内訳を図 1 に、保菌者の年齢階層と菌株数・菌種の内訳を図 2 に示した。由来地域別では、中南地域由来の株が 6 株と最も多く、このうち 4 株が *V. parahaemolyticus* であった。次いで多かったのは三八地域の 4 株で、このうち 2 株が *V. alginolyticus* であった。*V. alginolyticus* が津軽地方 (東青・中南・西北地域) から搬入されていないほかは、特筆すべき偏りは見られなかった。保菌者の年齢階層では、年齢情報が得られている全ての株が 20 歳以上の保菌者から分離されており、さらに、*V. parahaemolyticus* の 1 株を除き 8 月から 11 月に集中して検出されていることが特徴的であった。

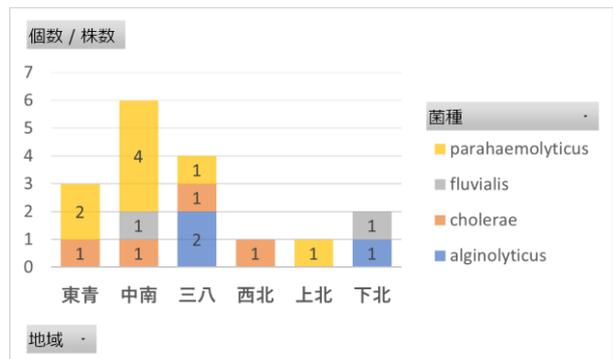


図 1 各地域からのビブリオ属菌の搬入数及び菌種の内訳

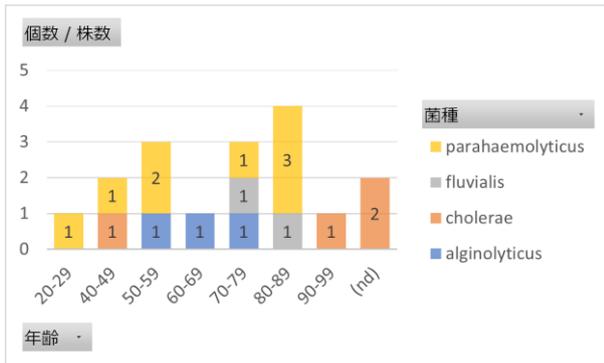


図 2 搬入されたビブリオ属菌における保菌者の年齢階層及び菌種の内訳

*(nd): no data

3.3 エルシニア属菌

2019 年から 2021 年にかけて、病原微生物検出情報では計 83 例 (2019 年 26 例、2020 年 26 例、2021 年 31 例) のエルシニア属菌の検出報告があり、このうち、2019 年 21 株、2020 年 25 株、2021 年 28 株の計 74 株を収集することができた。各年の抗原遺伝子型・生物型及び病原性プラスミド (pYV) 保有株の内訳等を表 3 に示した。なお、菌種は全て *Y. enterocolitica* であり、血清学的試験と抗原遺伝子型 (Og と表記) の結果は 1 株 (OUT/Og8、生物型別不能) を除いて一致していた。本報告では、表記を全て Og で統一している。

表 3 2019 年から 2021 年の間に収集したエルシニア属菌の抗原遺伝子型・生物型、プラスミド保有状況及び特徴

年	Og/生物型	計	pYV+	特徴 (株数)
2019	Og:3/3	4	4	
	Og:3/4	6	6	TC 耐性 (1)
	Og:5,27/2	1	1	ST 耐性
	Og:8/-	1	0	ystB ⁺
	Og:8/1A	1	0	ystB ⁺
	Og:8/1B	6	4	
	Og:9/2	2	2	
		21	17	
2020	Og:3/3	9	9	
	Og:3/4	5	5	CP 耐性 (1)
	Og:8/1B	11	5	
	25	19		
2021	Og:3/3	7	6	ST 耐性 (2)
	Og:3/4	10	10	TC 耐性 (4)
	Og:8/1B	10	6	
	Og:9/2	1	1	
	28	23		
総計		74	59	

抗原遺伝子型・生物型及び表現型に着目すると、2019 年は非病原性 *Y. enterocolitica* (エスクリン分解陽性、*ystB* 保有) を含む多様な抗原遺伝子型が検出されていた一方、2020 年、2021 年の搬入株は、その大部分が Og:3/3、Og:3/4、Og:8/1B の 3 種類であった。また、*Y. enterocolitica* は低温培養することで運動性を示すことが知られているが、今回の調査では、特に Og:3 のほぼ全ての株で 22 °C 培養での運動性が陰性であった。一方、Og:8 では 22 °C 培養による運動性は陽性であり、抗原遺伝子型により低温培養時の運動性に違いが認められた。この傾向はいずれの年でも同様であった。

病原性プラスミド (pYV) の保持状況について、プラスミド性病原遺伝子である *yadA* 及び *virF* の保有状況及び 37 °C における MR-VP プロセス中の培養で生じる自己凝集反応を指標に調べたところ、Og:8/1B 以外の抗原遺伝子型では大部分が pYV を保持していたのに対し、Og:8/1B では試験の時点で pYV を保有していない株が多かった。このことから、抗原遺伝子型によりプラスミドの脱落頻度にも違いがある可能性が示唆された。

薬剤感受性試験では、生来耐性傾向を示す ABPC、CEZ、CMZ に加え、TC、ST 又は CP に対して耐性を示す株がいずれの年でも認められた。特に 2021 年搬入株では、Og:3/4 の 10 株中、TC に耐性かつ MINO、DOXY に感性を示す株が 4 株検出され、このうち 2 株について PCR³⁴⁾によるテトラサイクリン耐性遺伝子を検索したところ、*tet(C)*が検出された。

Y. enterocolitica についても、ビブリオ属菌と同様、分離された株の抗原遺伝子型・生物型と、地域間差及び保菌者の年齢階層における関係性に注目した。搬入された *Y. enterocolitica* の由来地域と菌株数・菌種の内訳を図 3 に、保菌者の年齢階層と菌株数・菌種の内訳を図 4 に示した。地域別にみると、東青地域及び中南地域由来の株がともに 30 株と最も多かった。この 2 地域由来の株の抗原遺伝子型に着目すると、東青地域由来の株では Og:8/1B が多かったのに対し、中南地域由来の株では Og:3/3 及び Og:3/4 が多いことが分かり、この 2 地域以外を由来とする株は少なかった。保菌者の年齢階層では、19 歳以下が突出して多く、低年齢層における感染性胃腸炎の起因菌として注意が必要な病原菌である可能性が推察された。20 歳以上の階層に由来する株は、各階層とも 1~3 株と少なかった一方で、Og:8 は Og:3 に比べ幅広い年齢階層から分離されており、Og:8 は、Og:3 等の他の抗原遺伝子型に比べ、病原

性の観点から、より注意が必要な抗原遺伝子型である可能性が示唆された。

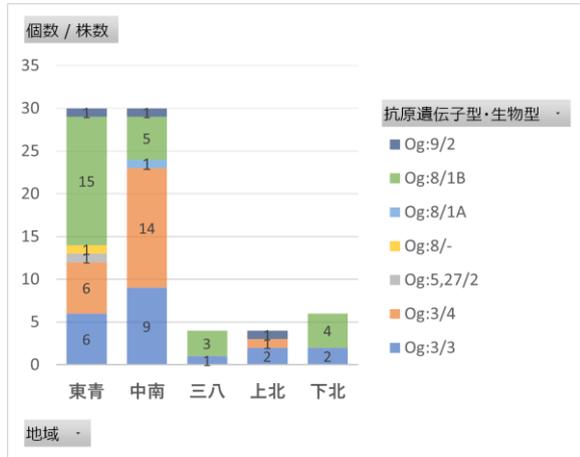


図 3 各地域からの *Y. enterocolitica* の搬入数及び抗原遺伝子型・生物型の内訳

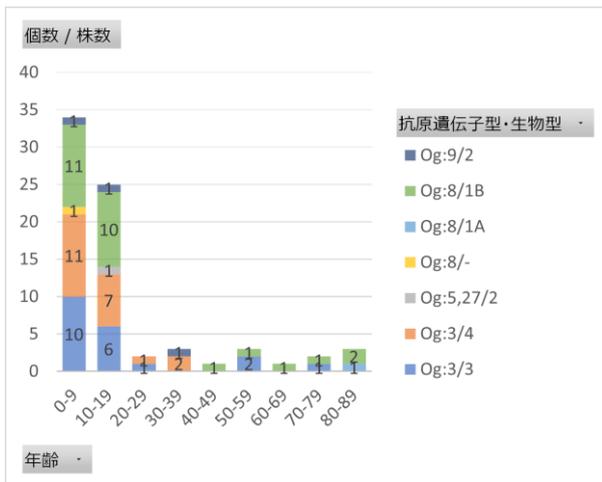


図 4 搬入された *Y. enterocolitica* における保菌者の年齢階層及び抗原遺伝子型・生物型の内訳

3.1 エシエリキア属 (*E. coli*, *E. albertii*)

病原遺伝子を保有する *E. coli* (腸管出血性大腸菌として搬入された菌株を除く) 又は *E. albertii* 疑いとして、2020 年に 76 株、2021 年に 40 株の計 116 株を収集することができた。2020 年搬入株の試験結果を表 4 に、2021 年分離株の試験結果を表 5 に示した。

(1) ETEC (enterotoxigenic *E. coli*; 腸管毒素原性大腸菌)

病原遺伝子として ST 遺伝子又は LT 遺伝子を保有していた *E. coli* は、2020 年 7 株、2021 年は 0 株であり、2020 年の 7 株は、いずれも 2020 年 3 月までに搬入された株であった。ETEC は旅行者下痢症の原因菌として知られている³⁵⁾が、2020 年以降、

新型コロナウイルス感染症の流行による渡航制限が検出状況に影響を与えた可能性が考えられる。

2020 年に搬入された 7 株のうち、LT 遺伝子及び ST 遺伝子の保有状況の内訳は、LT 遺伝子のみが 2 株、STh 遺伝子のみが 2 株、LT 遺伝子と STh 遺伝子を併せ持つ株が 2 株であり、このうち、*astA* も併せ持つ株が 2 株確認された。また、STp 遺伝子を保有する株は 1 株であったが、この株からはさらに *stx2e* も検出された。過去にも同様の菌株が認められている⁴⁾ため、STp 遺伝子を保有する株では、その病原性に注意を要すると考えられる。

薬剤感受性試験の結果では、7 株中 5 株で 1 剤以上の薬剤に耐性を示し、既報^{3,4)}と同様に、ETEC では薬剤耐性株の割合が高い傾向となった。

(2) EPEC (enteropathogenic *E. coli*; 腸管病原性大腸菌)

病原遺伝子として *eae* を保有していた *E. coli* は、2020 年 47 株、2021 年 31 株であった。2020 年搬入株で、検査機関では *eae* 保有株として搬入されたものの、当センターでの試験では *eae* を含む病原遺伝子が検出されなかった株が 1 株認められ、この株は EPEC から除外している。

既報^{3,4)}と同様に、各年とも多様な抗原遺伝子型が確認された。このうち、2020 年には Og145:Hg28 が 9 株検出され、このうち 4 株が 1 剤以上の薬剤に耐性を示した。次いで多かったのは Og109:Hg21 の 6 株で、このうち 1 株は *cdt* を、1 株は *astA* 及び *cdt* を保有していた。一方、2020 年で *bfpA* を保有していた株は、Og115:Hg25 の 1 株のみであった。

2021 年には、2020 年と同じく Og109:Hg21 が 3 株確認され、その全てが *cdt* を保有していた。また、Og128:Hg2 及び OgUT:Hg6 も同じく 3 株ずつ認められ、このうち Og128:Hg2 は 3 株全てから *astA* が検出された。一方、2020 年に最も多く検出された Og145:Hg28 は、2021 年では 1 株のみであった。*bfpA* が検出された株は 2020 年同様 1 株のみで、抗原遺伝子型は Og156:Hg1/12 であった。なお、2021 年分離株では、耐性薬剤が目立って多い株は確認されなかった。

(3) EAggEC (enteroaggregative *E. coli*; 腸管凝集附着性大腸菌)

病原遺伝子として *aggR* を保有していた *E. coli* は、2020 年 17 株、2021 年 4 株であり、*aggR* 以外の病原遺伝子が検出された株はなかった。2020 年では、17 株のうち 16 株の抗原遺伝子型が Og92:Hg33 であり、2021 年分離株でも 4 株中 2 株が Og92:Hg33 であった。これまでの報告⁴⁾を含め Og92:Hg33 は

EAggEC で多く検出される抗原遺伝子型であり、これらの関連性に興味を持たれる。

また、2021 年分離株のうち、薬剤感受性パターンから AmpC β-ラクタマーゼの産生が示唆される株が 1 株認められたため、耐性機構の確認試験を実施した。その結果、表現型からは AmpC β-ラクタマーゼの産生によるものと推定されたが、PCR では TEM 型の class A β-ラクタマーゼのみが検出され、プラスミド性 AmpC β-ラクタマーゼは検出さ

れなかった。

(4) *E. albertii*

既報^{23,24)}の PCR により *E. albertii* と同定された菌株は、2020 年搬入株では 76 株中 4 株、2021 年分離株では 40 株中 5 株であった。同定された 9 株全てで *eae* 及び *cdt* が検出され、*stx2f* が検出された株はなかった。また、供試薬剤に対し耐性を示した菌株も認められなかった。

表 4 2020 年に搬入された *Escherichia* 属菌の分類、抗原遺伝子型、病原遺伝子、保有遺伝子及び耐性薬剤

分類 (株数)	抗原遺伝子型	病原遺伝子*	耐性薬剤	薬剤耐性遺伝子	計	
ETEC (7)	Og6:Hg16	LT,STh	ABPC,PIPC,CEZ		1	
		LT,STh, <i>astA</i>	NA	-	1	
	Og15:Hg18	STh	TC, ST	<i>tet(A)</i>	1	
	Og88:Hg38	LT, <i>astA</i>	-	-	1	
	Og128:Hg45	STh	ABPC, PIPC	-	1	
	Og141:HgUT	LT	-	-	1	
	OgUT:Hg21	STp, <i>stx2e</i>	ABPC, PIPC, TC, DOXY, ST	<i>tet(A)</i>	1	
EPEC (47)	Og8:Hg14		-	-	1	
	Og15:Hg2		-	-	1	
	Og15:Hg21	<i>cdt</i>	-	-	1	
	Og21:Hg21		NA	-	1	
	Og26:Hg11		TC, DOXY, CP	<i>tet(A), tet(M)</i>	1	
	Og33:Hg6		-	-	1	
	Og49:Hg10	<i>astA</i>	ABPC, PIPC, TC, DOXY, ST	<i>tet(A)</i>	1	
			TC, MINO, DOXY	<i>tet(B)</i>	1	
	Og49:Hg46		NA	-	1	
	Og51:Hg49		-	-	1	
	Og55:Hg7		-	-	2	
	Og71:Hg40		-	-	1	
	Og76:Hg7		ABPC, PIPC, TC, DOXY	(nt)	1	
	Og88:Hg25		TC	<i>tet(A)</i>	1	
	Og103:Hg2		-	-	1	
	Og109:Hg21	<i>astA</i> (1), <i>cdt</i> (2)	-	-	6	
	Og111:Hg8		-	-	1	
	Og115:Hg25	<i>bfpA</i>	-	-	1	
	Og131:Hg21		ABPC, PIPC, KM	-	1	
	Og131:Hg6		-	-	1	
	Og145:Hg28		-	-	-	5
			ABPC, PIPC, ST	-	1	
			GM, KM, TC, DOXY, ST, CP	<i>tet(A)</i>	1	
			TC, ST, CP	<i>tet(A)</i>	2	
			-	-	1	
			-	-	1	
			-	-	1	
-			-	1		
-			-	1		
-			-	1		
-			-	1		
-			-	1		
Og145:Hg34				-	-	1
Og173:Hg6		-	-	1		
OgGP1:Hg6		-	-	1		
OgGP5:Hg32	<i>cdt</i>	GM, ST	-	1		
OgUT:Hg1/12		-	-	1		
OgUT:Hg6		-	-	2		
OgUT:Hg14		-	-	1		
OgUT:Hg16		CP	-	1		
OgUT:Hg30		-	-	3		
EAggEC (17)	Og92:Hg33	-	-	-	15	
		ABPC, PIPC	-	1		
	Og99:Hg10		ABPC, NA	-	1	
<i>E. coli</i> (1)	OgGP10:Hg4		NA	-	1	
<i>E. albertii</i> (4)	(nt)	<i>eae, cdt</i>	-	-	4	
					総計 76	

(nt): not tested.

*: EPEC が有する *eae* 及び EAggEC が保有する *aggR* は記載していない。

表5 2021年に分離された *Escherichia* 属菌の分類、抗原遺伝子型、保有遺伝子及び耐性薬剤

分類 (株数)	抗原遺伝子型	病原遺伝子*	耐性薬剤	薬剤耐性遺伝子	計
EPEC (31)	Og10:Hg2		TC	<i>tet(A)</i>	1
	Og21:Hg39		-	-	1
	Og33:Hg6		-	-	1
	Og51:Hg49		-	-	1
	Og55:Hg6		-	-	1
	Og56:Hg6	<i>astA</i>	-	-	1
	Og58:Hg51		-	-	1
	Og71:Hg6		-	-	1
	Og88:Hg25		-	-	1
	Og88:Hg45		-	-	1
	Og108:Hg21		-	-	1
	Og109:Hg21	<i>cdt</i>	-	-	3
	Og115:Hg10		TC, MINO, DOXY	(nt)	1
	Og125:Hg49		-	-	1
	Og128:Hg2	<i>astA</i>	-	-	3
	Og145:Hg28		TC	<i>tet(A)</i>	1
	Og156:Hg1/12	<i>bfpA, astA</i>	-	-	1
	Og156:Hg8		-	-	1
	Og167:Hg9		-	-	1
	Og167:HgUT		-	-	1
	Og170:Hg49		-	-	1
	OgGP9:Hg18	<i>astA</i>	-	-	1
	OgUT:Hg6		-	-	3
OgUT:Hg30		-	-	1	
OgUT:Hg49		-	-	1	
EAggEC (4)	Og86:Hg27		ABPC, CEZ	TEM 型, (AmpC)	1
	Og92:Hg33		-	-	2
	Og176:Hg34		ABPC, TC, DOXY, NA	(nt)	1
<i>E. albertii</i> (5)	(nt)	<i>eae, cdt</i>	-	-	5
(nt): not tested.					総計 40

*: EPEC が有する *eae* 及び EAggEC が保有する *aggR* は記載していない。

4. まとめ

サルモネラ属菌、ビブリオ属菌、エルシニア属菌及びエシェリキア属菌の4属の感染性胃腸炎起因菌について、生化学的試験、血清学的試験、PCR法及び薬剤感受性試験を実施した。その結果、特定の血清型・抗原遺伝子型の集積や、血清型・抗原遺伝子型間の表現型や保有病原遺伝子の違い、一般の性状を示さない特異な株や、病原性に注意を要すると考えられる株の存在等の特徴が認められ、さらに、ビブリオ属菌及びエルシニア属菌については、検出地域における分離数や分離される菌種、血清型・抗原遺伝子型の違い、病原体保有者の年齢階層の違いも明らかとなった。今後も、病原体の性状を解析し、公衆衛生の質を向上させていくため、サーベイランスを継続していく必要がある。

謝 辞

菌株収集に御協力いただいた、青森県立中央病院、青森市医師会臨床検査センター、青森市民病院、弘前市医師会健診センター、弘前市立病院(2022年3月31日で閉院)、八戸市医師会臨床検査センター、

八戸市立市民病院、つがる西北五広域連合つがる総合病院、十和田市立中央病院、一部事務組合下北医療センターむつ総合病院、公立野辺地病院の検査担当の方々に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) https://www.pref.aomori.lg.jp/soshiki/kankyo/kankyosenta/byougenbiseibutu_top.html
- 2) 橋本恭奈ほか：青森県内でヒトから分離されたサルモネラ属菌の血清型と薬剤感受性(2020年)．青森県環境保健センター年報，**32**，101-103，2021
- 3) 高橋洋平ほか：中南地域でヒトから分離された下痢原性大腸菌等の性状解析(2018年4月～12月)．青森県環境保健センター年報，**31**，33-39，2020
- 4) 高橋洋平ほか：中南地域でヒトから分離された下痢原性大腸菌等の性状解析(2019年1月～12月)．青森県環境保健センター年報，**32**，97-101，2021
- 5) 村上光一ほか：Vero毒素産生株が散見される新興感染症原因菌 *Escherichia albertii* について．IASR，**37**，98-100，2016
- 6) Lee, K. et al.: A novel multiplex PCR assay for

- Salmonella* subspecies identification. *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 805-811, 2009
- 7) Soyer, Y. et al.: *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 3546-3556, 2009.
- 8) Smith, K. P. et al.: Elucidation of antimicrobial susceptibility profiles and genotyping of *Salmonella enterica* isolates from clinical cases of Salmonellosis in New Mexico in 2008. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 1025-1031, 2010.
- 9) Bertelloni, F. et al.: Some pathogenic characters of paratyphoid *Salmonella enterica* strains isolated from poultry. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **10**, 1161-1166, 2017.
- 10) Kim, H.-J. et al.: Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomes. *BMC Microbiol.*, **15**, 239, 2015.
- 11) Tarr, C. L. et al.: Identification of *Vibrio* Isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 134-140, 2007.
- 12) di Pinto, A. et al.: A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Prot.*, **68**, 150-153, 2005.
- 13) Chakraborty, R. et al.: Species-specific identification of *Vibrio fluvialis* by PCR targeted to the conserved transcriptional activation and variable membrane tether regions of the *toxR* gene. *J. Med. Microbiol.*, **55**, 805-808, 2006.
- 14) Hoshino, K. et al.: Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **20**, 201-207, 1998.
- 15) Singh, D. V. et al.: Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 4321-4324, 2002.
- 16) Rivera, I. N. G. et al.: Genotypes and associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2421-2429, 2001.
- 17) Bej, A. K. et al.: Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods*, **36**, 215-225, 1999.
- 18) 公益社団法人日本食品衛生協会：食品衛生検査指針 微生物編 2015, 284-292.
- 19) Weagant, S. D. et al.: Bacteriological Analytical Manual. Chapter 8, *Yersinia enterocolitica*. January 2001; updated August 2007.
<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072633.htm> (2018年7月22日閲覧)
- 20) Garzetti, D. et al.: A molecular scheme for *Yersinia enterocolitica* patho-serotyping derived from genome-wide analysis. *Int. J. Med. Microbiol.*, **301**, 275-283, 2014.
- 21) Thoerner, P. et al.: PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1810-1816, 2003.
- 22) Ibrahim, A. et al.: Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of the *Yersinia* heat-stable enterotoxin gene (*yst*). *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1636-1638, 1997.
- 23) Hyma, K. E. et al. : Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and *Shigella boydii* strains. *J. Bacteriol.*, **187**, 619-628, 2005.
- 24) Oaks, J. L. et al. : *Escherichia albertii* in wild and domestic birds. *Emerg. Infect. Dis.*, **16**, 638-646, 2010.
- 25) 国立感染症研究所：腸管出血性大腸菌（EHEC）検査・診断マニュアル, 2021年9月.
- 26) Iguchi, K. et al. : *Escherichia coli* O-genotyping PCR; a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping. *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 2427-2432, 2015.
- 27) 井口純他：腸管出血性大腸菌の主要な O 血清群と病原性遺伝子を判定する One-shot マルチプレックス PCR 法の開発と評価, 日本食品微生物学会雑誌, **32**, 215-218, 2015.
- 28) Banjo, M. et al. : *Escherichia coli* H-genotyping PCR; a complete and practical platform for molecular H-typing. *J. Clin. Microbiol.*, **56**, e00190-18, 2018.
- 29) 国立保健医療科学院、国立感染症研究所：平成29年度短期研修細菌研修資料, 2017年11月.
- 30) Tóth, I. et al.: Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4285-4291, 2003.
- 31) タカラバイオ株式会社：毒素原性大腸菌エンテ

ロトキシン遺伝子の検出, 参考資料 特殊細菌検出用 Primer Set Application 2, 4-5, 2017年6月.

32) Scheutz, F. et al. : Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.*, **50**, 2951-2963, 2012.

33) 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター: 薬剤耐性菌研修会資料, 2017年9月

34) Ng, L.-K. et al.: Multiplex PCR for the detection of

tetracycline resistant genes. *Mol. Cell. Probes*, **15**, 209-215, 2001.

35) 吉田真一他編: 戸田新細菌学改訂34版. 317-327, 南山堂, 東京, 2013.

Evaluation of pathogen surveillance of infectious gastroenteritis causative bacteria isolated from humans in Aomori Prefecture

Yohei Takahashi, Takeshi Yamagami, Manami Musashi, Yukina Hashimoto

Biochemical tests, serological tests, PCR, and drug susceptibility tests were performed on 4 genera of infectious gastroenteritis causative bacteria, *Salmonella* spp.(2021 isolates), *Vibrio* spp.(2016 to 2021 isolates), *Yersinia* spp.(2019 to 2021 isolates), and *Escherichia* spp(*E. coli* and *E. albertii*) (2020 imported strains and 2021 isolates), which were collected from 11 fixed institutions in the prefecture. The results showed characteristics such as the accumulation of specific serotypes/genotypes, differences in phenotypes and virulence genes among serotypes/genotypes, the presence of specific strains that do not show general properties, and strains for which attention should be paid to pathogenicity. Moreover, for *Vibrio* spp.and *Yersinia* spp., difference in the number of isolates, bacterial species isolated and serotypes/genotypes in detected areas, and differences in age groups of pathogen carriers were also revealed.

Key words: *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Escherichia*, surveillance

2017/18 シーズン～2020/21 シーズンに発生した集団胃腸炎事例における ノロウイルスの遺伝子解析

坂 恭平 鈴木 敬 小川裕貴 二本柳朋子

2017年9月～2021年8月(2017/18シーズン～2020/21シーズン)に発生した青森県内における集団胃腸炎事例のうち、2017/18シーズン13事例、2018/19シーズン16事例、2019/20シーズン19事例、2020/21シーズン13事例の計61事例から検出されたノロウイルス(Norovirus、以下「NoV」と言う。)の遺伝子解析を行った。その結果、最も多く検出されたのがGII.2(27事例)であり、次いでGII.4(24事例)であった。2019/20シーズン以降は、ポリメラーゼ領域の一部も含む分子疫学解析を行ったところ、GII.4はGII.4 Sydney_2012[P16]とGII.4 Sydney_2012[P31]の2つに分類された。

Key words : Norovirus, GII.2, GII.4, Dual typing, Molecular epidemiology

1. はじめに

NoVは、カリシウイルス科ノロウイルス属に属する約7,500塩基のプラス1本鎖RNAをゲノムに持つウイルスである。NoVに感染すると、1～2日の潜伏期間の後、嘔気、嘔吐、下痢を主とした症状を引き起こす。一般に症状は軽症で、特別な治療は必要とせず軽快するが、まれに重症化する例もあり、老人や免疫力の低下した乳児では死亡例も報告されている¹⁾。また、症状が消失した後も感染者の便中に排出され、発症後約6ヶ月にわたりNoV遺伝子が検出された例もある²⁾。そのため、症状が消失しても引き続き二次感染に注意が必要である。

NoVの培養については、Ettayebiら³⁾によって報告されたが、未だ一般的に確立されていないため、検出や分類の方法は、検体に含まれる遺伝子の検出によるものがメインである。NoV遺伝子は、配列によって大きくGIからGXの遺伝子群(Genogroup)に分類され、ヒトに感染するもので主流となっているのはGIとGIIである。カプシド領域の配列によって、GIは9種類(GI.1～9)、GIIは26種類(GII.1～14、16～27)の遺伝子型(Genotype)に細分化される⁴⁾。さらに、NoVのORF1とORF2のジャンクション領域において遺伝子組換えが起こることが判明している⁵⁾。

今回、2017/18シーズン～2020/21シーズンに発

生した青森県内におけるNoVによる集団胃腸炎事例(県外感染を含む。)について、遺伝子型を同定し、2019/20シーズン以降はポリメラーゼ領域の一部も含む分子疫学解析を行ったので報告する。

2. 材料と方法

2.1 検査材料

2017/18シーズン13事例、2018/19シーズン16事例、2019/20シーズン19事例、2020/21シーズン13事例の計61事例の検体(便、食品、施設拭き取り)から検出されたNoV検体を用いた。なお、中核市である青森市で発生した事例については、検査を行った青森市保健所から陽性検体のcDNAの分与を得て解析に用いた。同じく中核市である八戸市で発生した事例については、すべて当センターに検査依頼があり、搬入された検体を用いた。

2.2 検査方法

1) ウイルスRNAの抽出・cDNA合成・NoV遺伝子の検出(リアルタイムPCR)

「ノロウイルスの検出法について」(平成15年11月5日付食安監発第1105001号)に準じて行った。

2) 遺伝子解析

2018/19シーズンまでは、石川ら⁶⁾の方法に準じたダイレクトシーケンシング法によりNoVのカプシド領域の塩基配列を決定した。2019/20シーズン以

降は、1) で得られた cDNA を鋳型に、病原体検出マニュアル⁷⁾ に準じた Dual typing 法による PCR を行い、ダイレクトシーケンス法により、カプシド領域に加え、ポリメラーゼ領域の一部も含む塩基配列を決定した (GI : 540 塩基、GII : 527 塩基)。ポリメラーゼ領域も含む遺伝子型の表記については、Chhabra ら⁴⁾ が発表しているとおおり、カプシド領域による型別の後に [] でポリメラーゼ領域による型別を記載することとした。得られた塩基配列を NoroNet の NoV 遺伝子型分類ツール (Norovirus Genotyping Tool Version 2.0) を用いて遺伝子型分類を行った。また、Kimura 2-parameter model を用いた最尤法 (Maximum-likelihood (ML) 法) で系統樹を作成した。系統樹の信頼性の評価には bootstrap 法 (反復回数 1000) を用いた。標準株は、Chhabra ら⁴⁾ に記載され、Norovirus Genotyping Tool Version 2.0 でも採用されている株を使用した。

3. 結果

3.1 各シーズンに検出された遺伝子型

2017/18 シーズン～2020/21 シーズンに発生した青森県内における NoV による集団胃腸炎事例 (県外感染を含む。) について、NoV の遺伝子型を表 1 に示した。

2017/18 シーズン 13 事例においては、GI.1 が 1 事例、GII.2 が 7 事例、GII.4 が 5 事例、GII.14 が 1 事例、GII.17 が 4 事例 (同一事例内の複数遺伝子型の検出を含む。) から検出された。事例 3 においては、NoV だけでなく、サポウイルスも検出され、その遺伝子型は GII.5 であった。事例 6 においては、2 種類の遺伝子型が検出され、発症者から検出されたのは GII.17 だったが、調理従事者から検出されたのは GII.14 であった。

2018/19 シーズン 16 事例においては、GI.3 が 1 事例、GI.4 が 1 事例、GI.9 が 1 事例、GII.2 が 6 事例、GII.3 が 3 事例、GII.4 が 6 事例、GII.6 が 1 事例、GII.17 が 1 事例、GII.22 が 1 事例から検出された。

2019/20 シーズン 19 事例においては、GI.3 が 1 事例、GII.2 が 7 事例、GII.3 が 3 事例、GII.4 が 10 事例、GII.17 が 1 事例から検出された。

2020/21 シーズン 13 事例においては、GI.2 が 1 事例、GI.6 が 3 事例、GII.2 が 7 事例、GII.4 が 3 事例、GII.6 が 2 事例、GII.17 が 1 事例から検出された。事例 2 においては、2 種類の遺伝子型が検出され、発症者から検出されたのは GII.2 だったが、施設拭き取りから検出されたのは GII.6 であり、また、

調理従事者から NoV は検出されなかった。

なお、各事例から検出された GII.4 は、すべて Sydney_2012 に分類された。

3.2 青森県内の過去 4 シーズンの NoV の動向

2017/18 シーズン～2020/21 シーズンに発生した青森県内における NoV による集団胃腸炎事例 (県外感染を含む。) について、遺伝子型ごとの事例数を図 1 に、各シーズンの事例数の割合を図 2 に示した。

既報⁸⁾ にて、2016/17 シーズンは GII.2 が流行し、過半数を占めていたことを報告したが、2017/18 シーズン以降も大きな増減は無く、過去 4 シーズンの計 61 事例中 27 事例から検出され、主要流行株の 1 つであった。

2014/15 シーズン～2016/17 シーズンにかけて検出数が年々減少していた GII.4 は、2017/18 シーズンに増加に転じると、2019/20 シーズンまで年々増加し、過去 4 シーズンの計 61 事例中 24 事例から検出され、GII.2 とともに主要流行株の 1 つとなったが、2020/21 シーズンは減少に転じている。

2014/15 シーズン～2015/16 シーズンにかけて全国的に流行していた GII.17 は、2018/19 シーズン以降、1 シーズンにつき 1 事例ずつしか検出されていない。

3.3 ポリメラーゼ領域の一部も含む遺伝子解析

NoV の ORF1 と ORF2 のジャンクション領域において遺伝子組換えが起こることが判明しており、カプシド領域だけでなく、ポリメラーゼ領域も含む遺伝子解析が求められている。Cannon ら⁹⁾ が報告した Dual typing 法は、病原体検出マニュアル⁷⁾ において採用され (図 3)、当センターでも 2019/20 シーズン以降 (検証も兼ねて実施した 2018/19 シーズンの 3 事例も含む。) は、原則として本法にて実施している。その結果、GI においては、GI.2[P2]、GI.6[P11] が検出され、GII においては、GII.2[P16]、GII.3[P12]、GII.4 Sydney_2012[P16]、GII.4 Sydney_2012[P31]、GII.6[P7]、GII.17[P17] が検出された (表 1)。

計 61 事例から検出された遺伝子型ごとの塩基配列を用いて、GI 及び GII それぞれの系統樹を作成した (図 4、図 5)。同一事例内で同一遺伝子型であったものは、より多数の検体から検出された配列 1 つを事例代表株とした。配列名は、(シーズン名) _ (表 1 の事例番号) _ (カプシド領域による遺伝子型) とした。系統樹を確認したところ、2019/20 シーズンのみに検出された GII.4 Sydney_2012[P16] は、6 事例すべて塩基配列が一致していた。一方、

毎シーズン検出された GII.4 Sydney_2012[P31]は、
塩基配列が異なるものがあり、シーズンごとの傾向

表1 青森県内における集団胃腸炎事例（県外感染を含む）から検出された NoV の遺伝子型
(2017/18 シーズン～2020/21 シーズン)

シーズン	番号	管轄保健所	遺伝子型		年度
			GI	GII	
2017/18	1	青森市		GII.4 Sydney_2012	H29
	2	青森市		GII.4 Sydney_2012	
	3	上十三	GI.1	GII.2	
	4	青森市		GII.4 Sydney_2012、GII.17	
	5	青森市		GII.4 Sydney_2012	
	6	弘前		GII.14、GII.17	
	7	三戸地方、八戸市		GII.2、GII.4 Sydney_2012、GII.17	
	8	上十三		GII.17	
	9	青森市		GII.2	
	10	青森市		GII.2	
	11	弘前		GII.2	
	12	弘前		GII.2	
	13	青森市		GII.2	
2018/19	1	八戸市		GII.2	H30
	2	弘前、八戸市		GII.2	
	3	八戸市		GII.6	
	4	弘前		GII.3	
	5	弘前、八戸市		GII.4 Sydney_2012	
	6	上十三		GII.4 Sydney_2012	
	7	青森市		GII.4 Sydney_2012	H31
	8	弘前		GII.2	
	9	青森市		GII.4 Sydney_2012	
	10	むつ		GII.4 Sydney_2012	
	11	青森市		GII.3	
	12	青森市		GII.2[P16]	
	13	青森市		GII.2[P16]	
	14	五所川原（県外）		GII.2	
	15	青森市		GII.4 Sydney_2012[P31]	
16	弘前、八戸市	GI.3、GI.4、GI.9	GII.3、GII.17、GII.22		
2019/20	1	青森市		GII.4 Sydney_2012[P16]	R1
	2	青森市		GII.4 Sydney_2012[P16]	
	3	五所川原		GII.4 Sydney_2012[P16]	
	4	青森市		GII.4 Sydney_2012[P16]	
	5	青森市		GII.4 Sydney_2012[P16]	
	6	八戸市		GII.2[P16]	
	7	弘前		GII.2、GII.3[P12]、GII.4 Sydney_2012	
	8	青森市		GII.4 Sydney_2012[P31]	
	9	八戸市		GII.2[P16]	
	10	青森市		GII.3[P12]	
	11	八戸市		GII.2[P16]	
	12	弘前		GII.4 Sydney_2012[P16]	
	13	むつ		GII.2[P16]	
	14	青森市		GII.3[P12]	
	15	むつ		GII.4 Sydney_2012[P31]	
	16	青森市		GII.4 Sydney_2012[P31]	
	17	青森市	GI.3	GII.17[P17]	
	18	八戸市		GII.2[P16]	
	19	八戸市		GII.2[P16]	
2020/21	1	むつ		GII.4 Sydney_2012[P31]	R2
	2	弘前		GII.2[P16]、GII.6	
	3	八戸市	GI.6[P11]		
	4	五所川原		GII.2[P16]	
	5	五所川原	GI.6[P11]	GII.2[P16]	
	6	五所川原		GII.2[P16]	
	7	青森市、八戸市、弘前、五所川原	GI.2[P2]、GI.6[P11]	GII.17[P17]	R3
	8	青森市		GII.2[P16]	
	9	青森市		GII.6[P7]	
	10	八戸市		GII.4 Sydney_2012[P31]	
	11	五所川原		GII.2[P16]	
	12	弘前		GII.2[P16]	
	13	八戸市		GII.4 Sydney_2012[P31]	

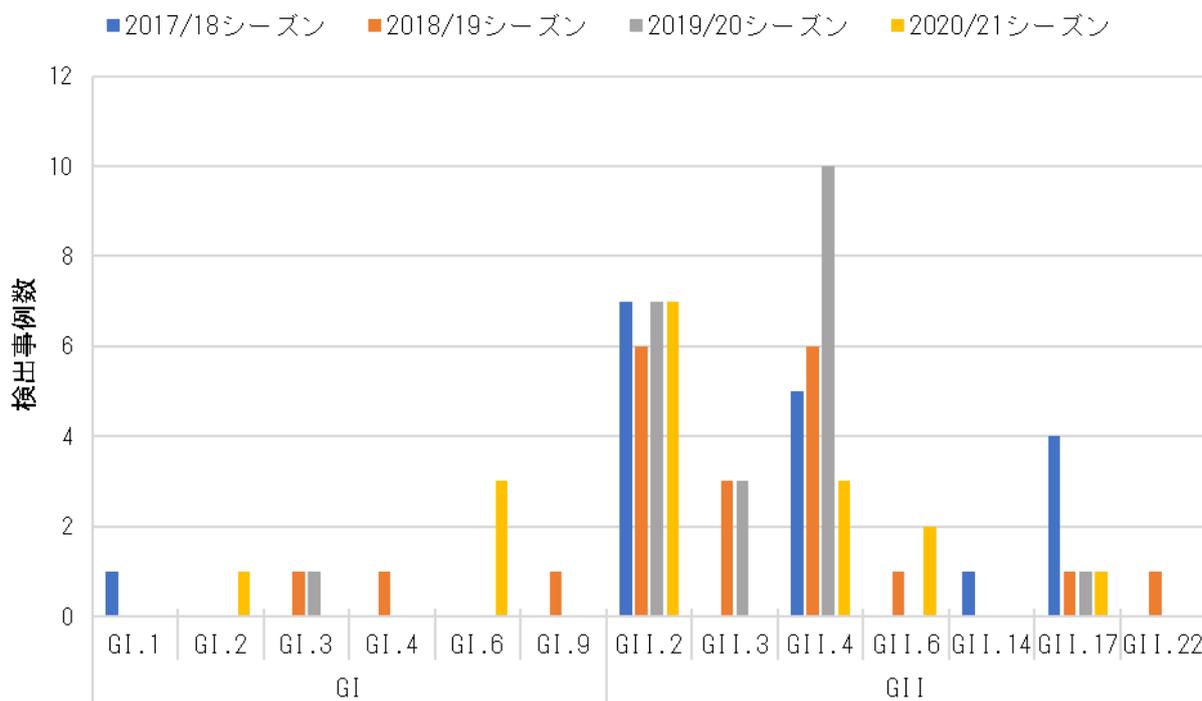


図1 青森県内のNoVによる集団胃腸炎事例（県外感染を含む）の遺伝子型ごとの事例数（2017/18シーズン～2020/21シーズン）

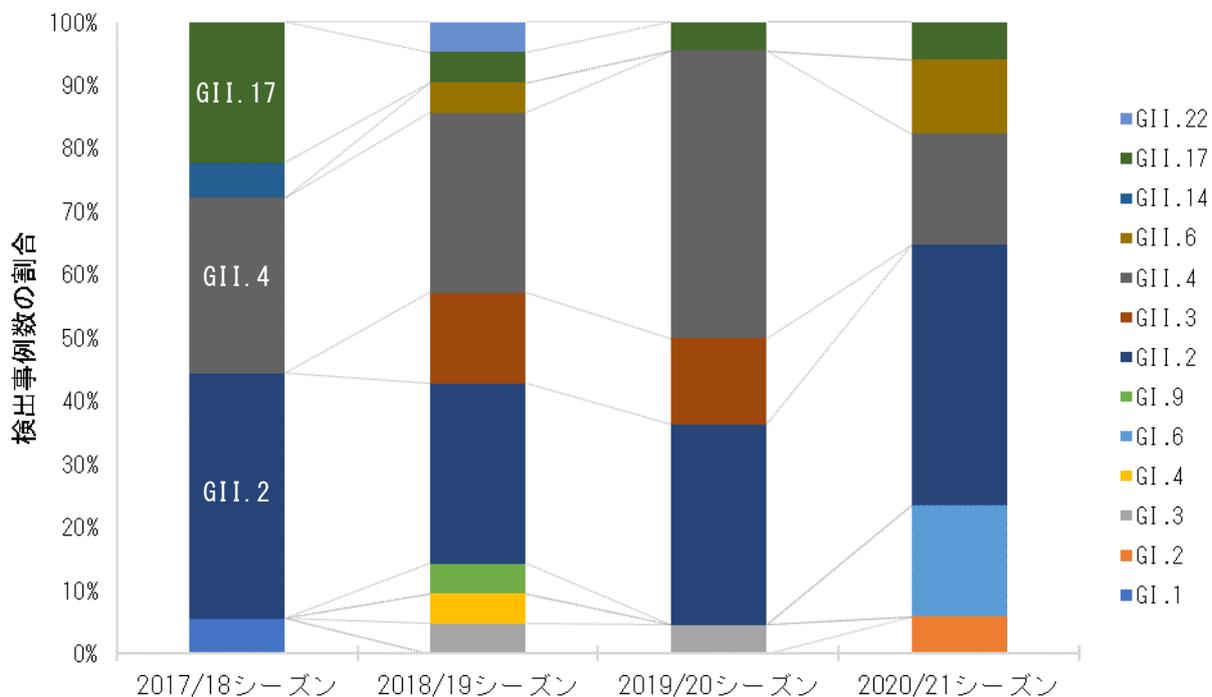


図2 青森県内のNoVによる集団胃腸炎事例（県外感染を含む）の各シーズンの事例数の割合（2017/18シーズン～2020/21シーズン）

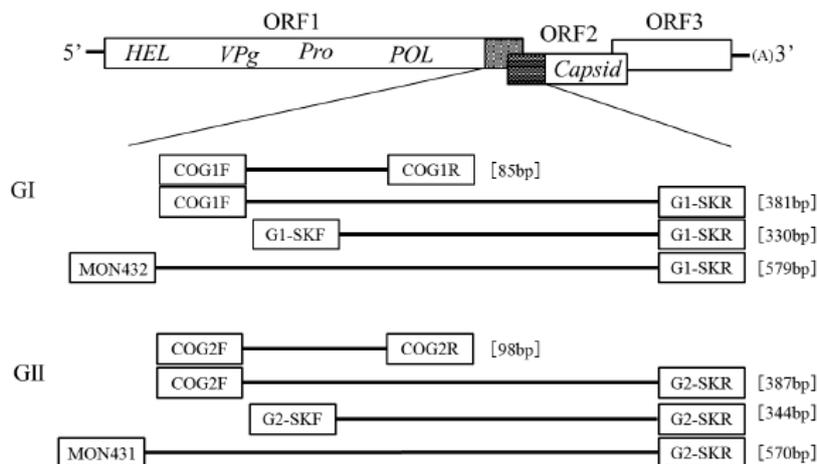


図 3 NoV の遺伝子構造とプライマーの位置
(病原体検出マニュアル⁶⁾ から抜粋)

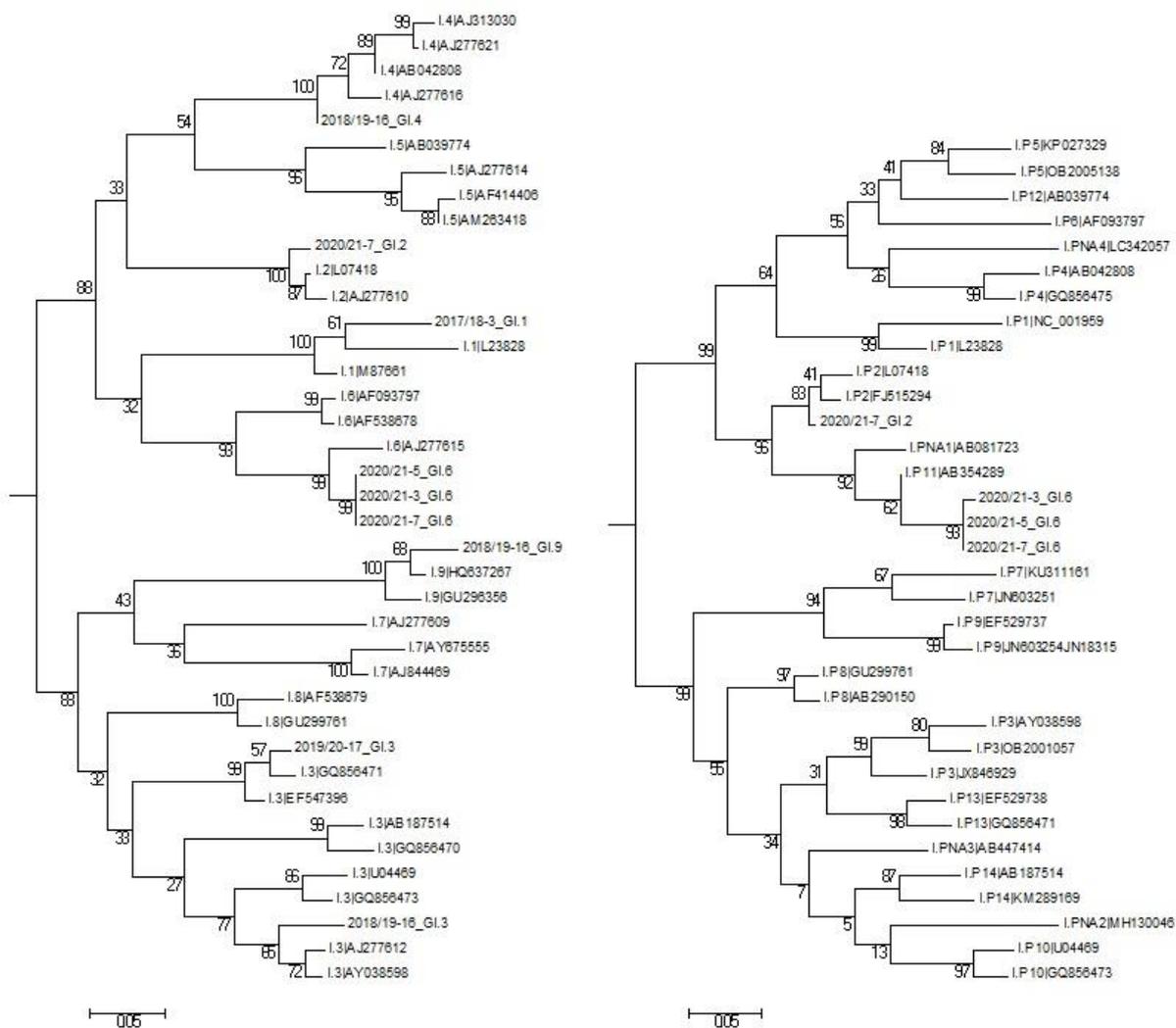


図 4 2017/18 シーズン～2020/21 シーズンに集団胃腸炎事例から検出された NoV GI の系統樹
左：カプシド領域 (298 塩基) 右：ポリメラーゼ領域 (244 塩基)

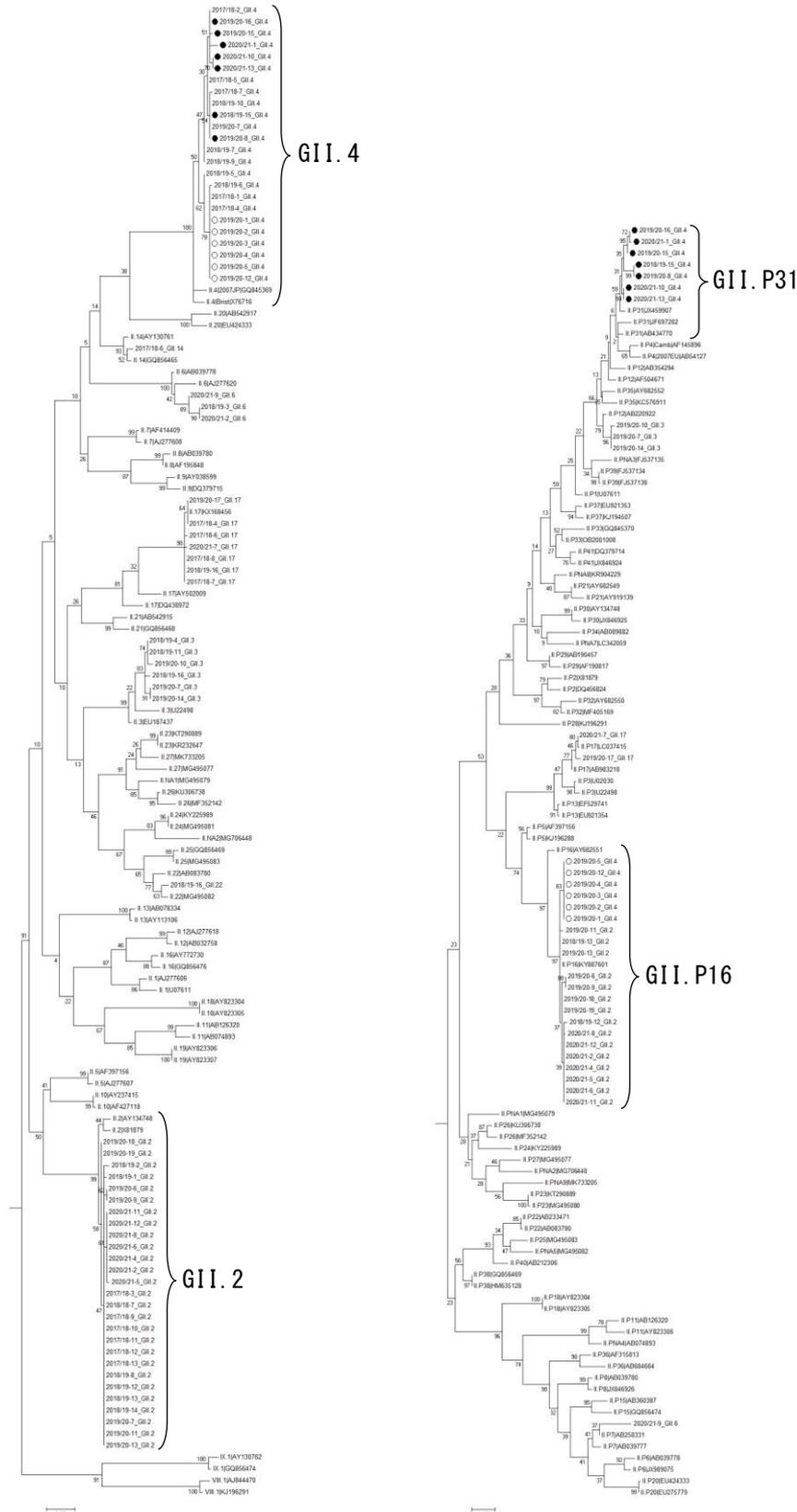


図5 2017/18シーズン～2020/21シーズンに集団胃腸炎事例から検出されたNoV GII.4の系統樹
 左： capsid領域 (280塩基) 右： polymerase領域 (243塩基)
 ○： GII.4 Sydney_2012[P16]
 ●： GII.4 Sydney_2012[P31]

4. 考察

4.1 過去4シーズンのNoVの動向

過去4シーズンを通して、GII.2の検出数及び割合が多く、27/61と多数を占めていた(図1、図2)。また、ポリメラーゼ領域も解析できたものは、すべてGII.2[P16]に分類された。GII.2の検出は、保育園での事例が多く、GII.2に対する免疫を持たない小児等による感染・流行の拡大があったことなどが考えられる。引き続き、今後の動向に注意が必要である。

一方、GII.2は、2016/17シーズンのように、全体の過半数を占めているわけではなかった。要因の一つとして、それまで減少していたGII.4の再流行が挙げられる。特に2019/20シーズンにおける検出が多く、同一塩基配列のGII.4 Sydney_2012[P16]が流行していた(図5)。GII.4 Sydney_2012[P16]は、6事例中4事例が青森市保健所管内で検出され、特定の地域及び時期に集中して感染・流行の拡大があった可能性がある。また、GII.4 Sydney_2012[P31]は、青森市、八戸市及びむつ保健所管内から、各シーズンに渡って検出された(表1)。⁹⁾ [P16]と[P31]における特性の違いは定かではないが、今後もデータを蓄積していく必要がある。なお、2020/21シーズンにGII.4の検出数は減少したが、当該期間は新型コロナウイルスの流行により、社会全体で衛生観念が向上し、その行動変容が影響している可能性がある。そのため、検出数の減少のみでGII.4の流行が縮小傾向にあるとは一概に判断できない。

2015/16シーズンにおける主要流行株であったGII.17については、検出数は減少傾向を示した一方(図1、図2)、複数の遺伝子型が検出された事例での検出が多かった(表1)。複数の遺伝子型が検出される事例については、遺伝子組換えを起こして新たな変異株が生じる可能性もあるため、動向を注視する必要がある。

4.2 集団事例における遺伝子解析の重要性

集団事例において、検出されたNoVの遺伝子解析を迅速に行うことは、保健所における行政指導や二次感染の防止の観点からも重要である。また、発症者由来NoVと調理従事者由来NoVの比較は、食中毒の判断や原因究明の正しい判断材料にもなる。2017/18シーズンの事例6において、発症者と調理従事者からNoV GIIが検出されたが、迅速に遺伝子解析を行い、それぞれで遺伝子型が異なっていることを確認した(表1)。その結果をもって、保健所は、調理従事者を介した食中毒ではないと判断した。また、2020/21シーズンの事例2において、発

症者と施設拭き取りからNoV GIIが検出されたが、それぞれで遺伝子型が異なっていた(表1)。これにより、発症グループとは別経路で、施設にNoVが持ち込まれたものと考えられる。保健所における食中毒か否かの判断は、疫学調査に加え、病原体の検出結果を根拠とする場合が多いが、集団事例の正しい原因究明のため、NoVの遺伝子群の検出のみではなく、遺伝子型の同定まで迅速に行うことが重要である。

Cannonら⁹⁾によって報告されたDual typing法が病原体検出マニュアル⁷⁾に採用され、全国の地方衛生研究所で一般的になりつつある。Dual typing法は、ポリメラーゼ領域の一部からカプシド領域の一部までの領域について、一度のPCRで増幅できる。これまで、ポリメラーゼ領域の解析には、カプシド領域とは別にPCRを実施しなければならなかったが、Dual typing法は、短時間で簡便に広い領域を解析できるため、集団事例における迅速で正しい原因究明のためにも非常に有用と考える。また、過去2シーズンにおいて、GII.4 Sydney_2012は、[P16]と[P31]に分類されたが、同一事例内で[P16]と[P31]が同時に検出されたことはなかった(表1、図5)。しかし、今後、同一事例内でこの2つが同時に検出されるような場合であっても、Dual typing法では正しく解析できると考える。さらに、GII.4のほかには、GII.2[P16]やGII.17[P17]が確認された(表1、図5)。これらは、全国でも確認されている型であるが、県外では、これまでに集団事例として報告例のない遺伝子型(GII.4 Sydney_2012[P12])も検出されており¹⁰⁾、新たな流行の原因を早期に探知する意味でも、Dual typing法は有用と考える。一方、Dual typing法は、検出感度がやや劣っていることが指摘されており¹¹⁾、当センターにおける調査でも一部の検体で解析ができなかった(表1)。また、Dual typing法で標的としているポリメラーゼ領域は、3'末端側の240塩基程度である(図3)。GII.2[P16]は、2011年頃にも流行があり、2016/17シーズン以降現在も流行している株とは系統が異なることが報告されているが^{8), 12), 13)}、より詳細な分子疫学解析のためには、より幅広い領域の遺伝子解析が必要と考えられる。ポリメラーゼ領域約500塩基について、カプシド領域と同時に一度のPCRで解析できる方法も報告されているが¹⁴⁾、最終的には次世代シーケンサーによる全ゲノム解析が必要と考えられる。

5. まとめ

- 1) 2017/18 シーズン～2020/21 シーズンに発生した青森県内における NoV による集団胃腸炎事例は、計 61 事例で、GII.2 が 27 事例から、GII.4 が 24 事例から検出された。
- 2) GII.2 は、検出事例数に大きな増減はなく、各シーズンとも主要流行株の 1 つとなった。GII.4 は、2017/18 シーズン以降に再流行し、主要流行株の 1 つとなった。
- 3) Dual typing 法により、ポリメラーゼ領域の一部も含む遺伝子解析を行ったところ、GII.4 は GII.4 Sydney_2012[P16]と GII.4 Sydney_2012[P31]の 2 つに分類された。
- 4) NoV による集団事例の対応にあたっては、より幅広い領域の遺伝子解析をより迅速に実施(遺伝子型まで同定)することが重要である。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症疫学センター：感染症発生動向調査週報ノロウイルス感染症 2004 年第 11 号
- 2) 国立感染症研究所：感染後のノロウイルス排出期間および排出コピー数. 病原微生物検出情報, **28**(10), 286-288, 2007
- 3) Ettayebi K. et al. : Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*, **353**(6306), 1387-1393, 2015
- 4) Chhabra P. et al. : Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology*, **100**(10), 1393-1406, 2019
- 5) Bull R A. et al. : Norovirus Recombination in ORF1/ORF2 Overlap. *Emerging Infectious Diseases*, **11**(7), 1079-1085, 2005
- 6) 石川和子他：ノロウイルス分子疫学解析 (2006～2008). 青森県環境保健センター研究報告, **19**, 8-14, 2008
- 7) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアルノロウイルス (第 1 版) 令和元年 6 月. 2019
- 8) 坂恭平他：2016/17 シーズンに発生したノロウイルスによる集団胃腸炎の遺伝子解析. 青森県環境保健センター年報, **28**, 37-44, 2017
- 9) Cannon J L. et al. : Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States from 2013 to 2016 Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, **55**(7), 2208-2221, 2017
- 10) 世田谷区世田谷保健所生活保健課他：都内で発生したノロウイルス GII.P12-GII.4 Sydney_2012 による食中毒事例について. 病原微生物検出情報, **39**(8), 146-147, 2018
- 11) 豊嶋千俊他：愛媛県の急性胃腸炎事例における Dual Typing 法によるノロウイルス遺伝子型別の検討. 愛媛県立衛生環境研究所年報, **21**, 8-11, 2018
- 12) 松島勇紀他：茨城県と川崎市における 2016/17 シーズンに検出されたヒトノロウイルス GII.P16-GII.2 の分子疫学. 病原微生物検出情報, **38**(1), 19-20, 2017
- 13) 藤井慶樹他：広島市で検出されたノロウイルス GII.P16-GII.2 の遺伝学的解析. 病原微生物検出情報, **38**(2), 38-39, 2017
- 14) Nakamura K. et al. : Detection of a novel recombinant norovirus from sewage water in toyama prefecture, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **62**(5), 394-398, 2009

Genetic analysis of norovirus in mass gastroenteritis cases in the 2017/18 to 2020/21 seasons

Kyohei Saka, Takashi Suzuki, Yuki Ogawa, Tomoko Nihonyanagi

Genetic analyses were performed for norovirus (NoV) detected in a total of 61 cases of mass gastroenteritis, including 13 cases in the 2017/18 season, 16 cases in the 2018/19 season, 19 cases in the 2019/20 season, and 13 cases in the 2020/21 season, occurred in Aomori Prefecture between September 2017 and August 2021 (the 2017/18 to 2020/21 seasons). The results showed that the most common detected was GII.2 (27 cases), followed by GII.4 (24 cases). Based on the results of molecular epidemiological analyses including part of the polymerase region from the 2019/20 season onwards, GII.4 was classified into 2 types, GII.4 Sydney_2012[P16] and GII.4 Sydney_2012[P31].

Key words: Norovirus, GII.2, GII.4, Dual typing, Molecular epidemiology

東日本海域における簡易分析キットを使用した ホタテガイの麻痺性貝毒スクリーニング法の検討

山本明美 五十嵐飛鳥 田中綾乃 岩館樹里 柴田めぐみ¹

ホタテガイ生産海域における麻痺性貝毒モニタリング検査のスクリーニング法として、イムノクロマト法を原理とした簡易分析キットの検討を実施した。判定方法は目視によらず、キット反応後にソフトウェア ImageJ で解析したクロマトグラムの試験部ラインと対照部ラインの面積比 (T/C 値) を用いた。東日本の海域で毒化したホタテガイを用いて検討した結果、キットの希釈倍率 40 倍で、日本における規制値の 1/2 である 2 MU/g のスクリーニングレベルで偽陰性判定なく分析可能であった。また、キットの反応性は塩酸抽出液と酢酸抽出液で差はなかった。キットで疑陽性又は陽性と判定された試料については、LC-MS/MS 法により確認検査を実施することで、モニタリング検査に使用可能と考えられた。

Key words : paralytic shellfish toxins , lateral flow immunoassay kit , scallop , screening , LC-MS/MS

1. はじめに

麻痺性貝毒 (paralytic shellfish toxins ; PSTs) は死亡率の高い貝毒であり、日本のみならず海外でも重要視されている。PSTs による食中毒を防止するため日本では規制値 4MU/g を設け、「貝毒の検査方法等について」(昭和 55 年 7 月 1 日付環乳第 30 号厚生省環境衛生局乳肉衛生科長通知) により動物実験であるマウス毒性試験 (mouse bioassay ; MBA) を公定法と定め、市場に流通した二枚貝の監視を行っている。

一方、わが国の二枚貝生産地では「生産海域における貝毒の監視及び管理措置について」(平成 27 年 3 月 6 日付農林水産省消費・安全局長通知) により生産海域を設定し、PSTs 及び下痢性貝毒について定期的に貝毒のモニタリング検査を行い安全な二枚貝の安定供給に努めている。この際の PSTs 検査法は、公定法又はそれと同等以上の方法とされており、また、これらの方法のほか、規制値より確実に毒量の低い検体を判別できるスクリーニング法も使用することが出来るとされている。このスクリーニング法としては、令和 4 年 3 月に見直された「二枚貝等の貝毒のリスク管理に関するガイドライン (以下「ガイドライン」という。)」¹⁾にイムノクロマト法を原理とした簡易分析キット等が記載されている。

近年、動物愛護等の観点から MBA は世界的に代替法への変更が求められており、EU では 2021 年 9 月に動物を使用しない方法で PSTs 検査を実施することとした法律²⁾が施行された。この法律では PSTs 検査は Standard EN 14526 (プレカラム蛍光 HPLC 法) 又は他の国際的に妥当性評価された方法で実施することとされており、ガイドラインで紹介されている Boundy らの LC-MS/MS 法による方法³⁾もこれに該当するが、この「麻痺性貝毒とテトロドトキシン測定のための超高速液体クロマトグラフィー質量分析法 (UPLC/MS/MS) マニュアル」⁴⁾は、国立研究開発法人水産研究・教育機構のホームページで公開されている。

青森県の陸奥湾ではホタテガイの養殖が盛んであり、生産海域モニタリングにおける PSTs 検査は公定法である MBA により実施してきた。これまで陸奥湾内の二枚貝で PSTs が検出された報告はない。これは、陸奥湾の形状に由来するものと考えられ、津軽半島と下北半島に囲まれた湾内は対馬暖流からの大きな潮の流れにより親潮等の寒流の流入を受けにくく⁵⁾、原因プランクトンの流入がないためと考えられる。北海道及び三陸沿岸で毒化したホタテガイは確認されているが、近年の北海道及び三陸における PSTs の原因プランクトンは主に *Alexandrium. catenella* (Group 1) ; A.

tamarense (旧)による^{5,6)}と考えられており、また、北海道及び三陸沿岸で秋季に *A. alexandrium pacificum* (Group IV) ; *A. catenella* (旧) が認められそれによる毒化も報告されている^{5,7,8,9)}。陸奥湾内のサンプリング定点では *A. tamarense* (旧) 及び *A. catenella* (旧) についてのプランクトン調査を実施しているが、これらがこれまでに観測されたことはない。

規制値を超過したか否かの検査は、国内ではマウスによる公定法、EUでは Standard EN 14526 又は国際的に妥当性が確認された機器分析で実施することとされている。このような規制値超過の確認検査とは別に、食品中の放射性物質の検査においては、NaI (TI) シンチレーションスペクトロメータを使用した放射性セシウムスクリーニング法¹⁰⁾が認められている。イムノクロマト法を利用した PSTs の簡易分析キット¹¹⁾は、EU が求める動物を使用しない方法であり、目視での判定が可能で簡便なスクリーニングに使用できる方法ではあるが、目視判定には個人差があり数値化できない。これを食品中の放射性物質検査と同様に、スクリーニングレベルを規制値の 1/2 以上、測定下限値が規制値の 1/4 以下に設定できることを数値化したもので表すことができ、スクリーニングレベルを超えた陽性試料で偽陰性判定がなければ、日本のみならず、EU の許可が得られた場合、将来的には対 EU 向け生産海域検査で本キットをスクリーニング検査法として使用できると筆者らは考えた。

麻痺性貝毒簡易分析キットによるスクリーニング法導入マニュアル¹²⁾では本キットの反応性は各毒成分及び二枚貝の種類によって異なるとされ、貝毒抽出液をキット付属の検体希釈液を用いて適正な希釈濃度とすることが重要とされている。西日本と東日本では PSTs の原因プランクトンが異なることが報告^{9,13,14)}されており、また、同じプランクトンで毒化しても貝の種類によって毒成分の代謝が異なる^{14,15)}ため、貝の種類及び毒化の時期により抽出液の毒組成は異なる。このことから、どの地域のどの貝を検査対象とするかで検体毎に適正な希釈濃度とスクリーニングレベルを設定する必要がある。

これまで PSTs による毒化が無い陸奥湾だが、毒化が起ると仮定した場合、問題となるのは主として東日本で問題とされている *A. tamarense* (旧) 及び *A. catenella* (旧) によるものと考えられる。そこで、本研究では、東日本の別の湾で毒

化したホタテガイを使用して、東日本の海域における麻痺性貝毒簡易分析キットを使用したホタテガイのスクリーニング法について検討した。

また、公定法における試料の抽出液は 0.1 mol/L 塩酸であるが、Standard EN 14526 を始めとする PSTs の機器分析^{3,16,17)}における抽出液は 1 %酢酸であるため、今後機器分析に移行した場合も考慮し、二種類の酸抽出による試験溶液で検討を行った。判定方法は目視によらず、スクリーニングレベル及び測定下限値を数値化したもので出せるか検討した。

毒力及び毒成分を確認するため、簡易分析キットによる方法と併行して MBA 及び LC-MS/MS 法を実施したので併せて報告する。

2. 材料及び方法

2.1 材料

イムノクロマト法を利用した簡易分析キットは農林水産省「安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業」で開発され、日水製薬株式会社より市販されている MT テスト イムノクロマト-PSP「ニッスイ」を使用した。

キットの適正な希釈濃度を検討するためには、毒化した試料を用いる必要があるが、陸奥湾では PSTs による毒化の発生がこれまで確認されていない。そこで、想定される毒化試料として北海道及び東北太平洋側で毒化があった際の A 湾 (2015 年採捕) 及び B 湾 (2018 年採捕) の有毒ホタテガイのホールボディを用いた。この有毒ホタテガイは MBA の際の陽性検体としているもので、毒化試料を MBA により無毒を確認した陸奥湾産のホタテガイ試料で均一化し、毒量を約 3.5 MU/g に調製したものを約 100 g ずつ小分けして冷凍保存した自家標準物質 (House Reference Material ; HRM) である。以下、A 湾由来の HRM を HRM-A、B 湾由来の HRM を HRM-B とする。

事前検討のための無毒のホタテガイ試料は 2020 年 1 月から 3 月に対 EU 陸奥湾生産海域モニタリング検査で採捕され MBA で無毒であった 55 試料でいずれもホールボディを用いた。

希釈倍率検討後の検証には、2019 年 5 月から 2022 年 7 月に陸奥湾内で採捕されたホタテガイ (陸奥湾生産海域モニタリング検体、食品衛生監視指導計画に基づく収去検体及び買い上げ品 : N-1~N-13) を用いた。また、有毒ホタテガイとして、北海道及び東北太平洋側で毒化があった際

のホールボディ試料 (P-1~P-8) を入手し、これらについても簡易分析キットによる測定を行った。

LC-MS/MS 法で使用する標準品は、STX-2HCl は FDA から供与された標準品、dcSTX 及び neoSTX (以下、NEO) は水産研究・教育機構より提供された標準品を用い、それ以外はカナダ NRC の認証標準物質を用いた。

2.2 PSTs 試験原液の調製方法

試料は二種類の酸による抽出を行った。

塩酸抽出による試験原液は、試料と当量の 0.1 mol/L 塩酸溶液を加えてホモジナイズした液を pH 3.0 に調整後 5 分間煮沸した上清を試験原液とした。

酢酸抽出による試験原液は、試料と当量の 1% 酢酸溶液を加えてホモジナイズした液を pH 調整はせず、5 分間煮沸した上清を試験原液とした。

2.3 簡易分析キット測定のための事前検討

(1) 無毒試料の簡易分析キット結果と MBA 結果の比較

MBA で無毒を確認した試料については、塩酸抽出試験原液を最低希釈倍率 (食品の場合は 20 倍) で希釈し測定した。マトリクス妨害により簡易分析キットの結果と MBA の結果に齟齬がないかを確認した。

(2) スクリーニングレベルの設定と試験原液の希釈倍率の設定

スクリーニングレベルを食品衛生法規制値の 4 MU/g の 1/2 である 2 MU/g とするため、A 湾及び B 湾由来の HRM (HRM-A 及び HRM-B) の塩酸抽出試験原液を無毒ホタテガイの塩酸抽出試験原液で希釈し、1 及び 2 MU/g 相当の毒量の試験原液を調製した。調製した 1、2、3.5 MU/g 相当の試験原液及び無毒の試験原液をキット付属の希釈液で 20 から 100 倍に希釈して測定し、適切な希釈倍率

を検討した。

(3) 簡易分析キットの判定方法

キット添付文書に従い、付属の希釈液で試験原液を希釈後、100µL を検体添加部に添加し、室温で 20 分静置すると、本キットは競合法の原理により試験原液中の PSTs 濃度が高いほど試験部である T ラインが薄くなる。目視では T ラインの色が濃い順に 4 段階 (++, +, ±, -) で判定した (図 1)。最も T ラインが濃い ++ が陰性 (negative) となる。目視は 3 名で行い、多数となった結果を目視の判定結果とした。

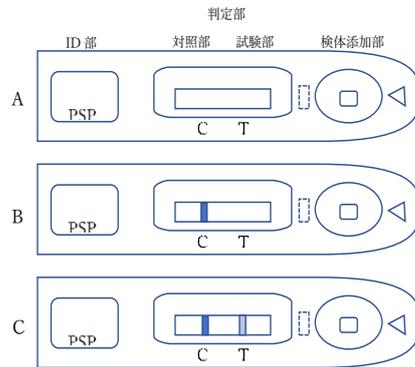


図 1 MT テスト イムノクロマト-PSP「ニッスイ」の判定結果

A : 使用前, B : 陽性 (positive -),
C : 陰性 (negative ++)

目視判定後、テストプレートをスキャナー (EPSON,PX-M380F) により 700pdi の解像度でカラー画像として取り込み、この画像をフリーの画像解析ソフト ImageJ で解析した (図 2)。対照部 C の面積値と試験部 T の面積値からその比 (T/C 値) を求め、判定材料とした。

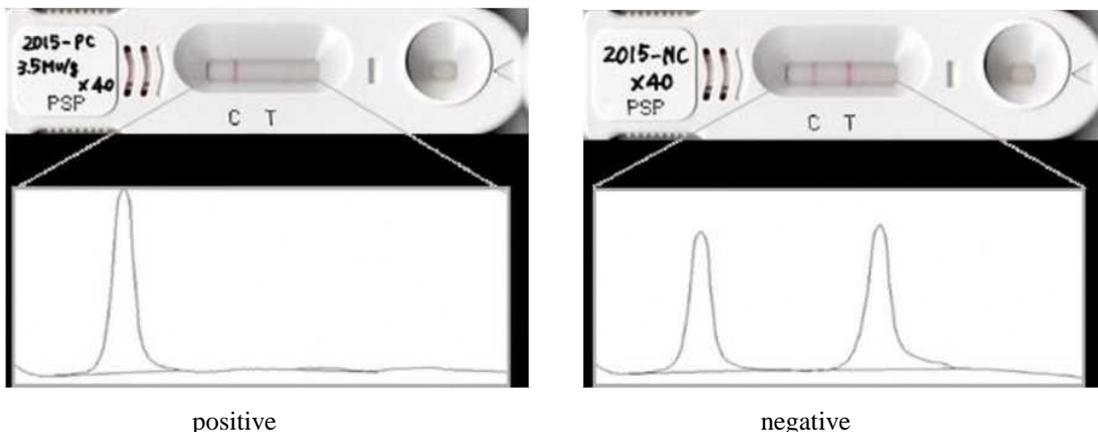


図 2 MT テスト イムノクロマト-PSP「ニッスイ」の ImageJ による解析結果
発色ライン強度がクロマトグラムとして表示される

2.4 PSTs の測定

(1) 簡易分析キットによる測定

検討で得られた希釈倍率により 2019 年 5 月～2022 年 7 月に陸奥湾内で採捕されたホタテガイ及び入手できた有毒ホタテガイを試料として簡易分析キットによる分析を実施した。また、同一陽性検体での分析精度の検証として、B 湾由来の HRM-B についても日を変えて同様に分析し、T/C 値の変動を見た。

簡易分析キットによる分析フローを図 3 に示す。

- PSTs 試験原液(塩酸又は酢酸抽出液)の希釈 (40 倍)
 - 1.5mL マイクロチューブに試験原液 20μL を取る
 - キット付属の希釈液 780μL を加える
- ポルテックス 30 秒
- 100μL をマイクロピペットでキットに添加
- 20 分間静置
- 判定(判定者 3 名で目視、T/C 値測定)
 - 判定部の試験部 T ラインの発色強度で判定する
 - ++: ラインが完全に形成(nega)
 - +: やや弱いラインは明確に形成(posi)
 - ±: 弱いラインが形成(posi)
 - : ラインの形成なし(posi)

図 3 簡易分析キットの分析フロー

(2) MBA による測定

2.4(1)と同様の試料の塩酸抽出試験原液について、公定法に従い MBA を実施した。ICR 系雄マウスを使用し、19～21g の個体を使用した。

(3) LC-MS/MS 法による測定

2.4(1)と同様の試料の塩酸及び酢酸抽出試験原液について、ガイドラインで紹介されている Boundy らの方法³⁾を「麻痺性貝毒とテトロドトキシン測定のための超高速液体クロマトフィー質量分析(UHPLC/MS/MS)マニュアル」⁴⁾に従い分析した。測定した毒素は C1/2、GTx1/4、GTx2/3、GTx5、GTx6、dcGTx2/3、STx2HCl、dcSTx、neoSTx である。

各成分の測定濃度(nmol/kg)に Oshima の比毒性を乗じてマウス毒力(MU/g)を、EFSA の毒性等価係数(TEF)及び STx-2HCl の分子量(372.2)を乗じて STx-2HCl 当量(μg STx eq/kg)を求めた。

3. 結果および考察

3.1 簡易分析キット実施のための事前検討結果

(1) 無毒試料での簡易分析キット結果

2020 年 1 月から 3 月に対 EU 陸奥湾生産海域モニタリング検査で採捕され MBA で無毒であった 55 試料の塩酸抽出試験原液をキット付属の希釈液で 20 倍に希釈し、簡易分析キットによる測定を行った。得られた T/C 値の結果を図 4 に示す。



図 4 MBA で無毒を確認した陸奥湾産ホタテガイの T/C 値 (20 倍希釈)

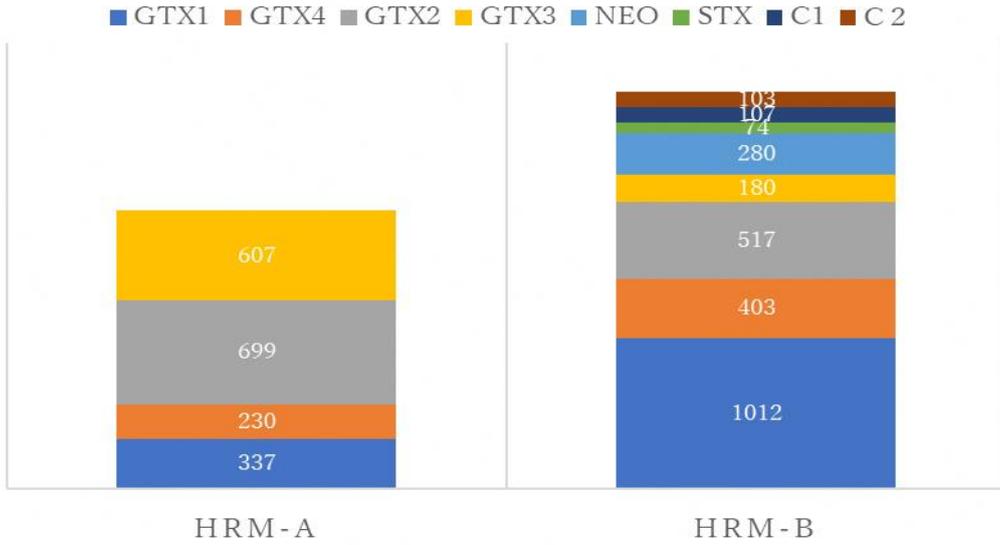


図 5 自家標準物質の毒成分組成 (塩酸抽出 試料中濃度 : nmol/kg) および MBA による付与値
 HRM-A : 3.47 MU/g HRM-B : 3.54 MU/g

目視の結果は、55 例中 47 例は ++、8 例が + の判定であった。++ は T ラインが明瞭に確認でき、発色が強い場合で陰性 (negative)、+ は ++ に比べて発色が弱い場合で陽性 (positive) とされているが、目視判定には T ラインの色の濃さの比較対照がないための結果と考えられた。画像解析による T/C 値は 54 例が 0.2 以上だった。1 例だけ 0.13 であったが、食品における最低希釈倍率の 20 倍希釈でもマトリクスによる妨害はないものと考えられた。

(2) HRM-A および HRM-B の毒成分組成

本キットの各毒成分に対する反応性は、C1/2、GTX2/3、dcGTX2/3、GTX5 の順に高く、GTX1/4、GTX6 では低いとされている。有毒ホタテガイである HRM-A と HRM-B は、ともに 3.5 MU/g 程度に毒力を調整し MBA による付与値を付けたものであるが、採取場所も採取時期も異なるため、毒成分の組成は異なっていると考えられた。そのため、あらかじめ機器分析により毒成分を確認した。

HRM-A および HRM-B の毒成分組成および MBA による付与値を図 5 に示す。HRM-A はポストカラム HPLC-FL 法により GTX1~4 のみを測定した結果であり、HRM-B は 2.4(3) の LC-MS/MS 法により毒成分を求めた結果である。

GTX1~4 の各毒成分の試料中濃度 (nmol/kg) に比毒性を乗じてマウス毒力を求めた結果は、MBA で求めた毒力の 80 % 以上であり、A 湾、B 湾とも毒成分の主体は GTX 群と考えられた。また、HRM-A は本キットで反応性の高い GTX2/3 の割合

が高く、HRM-B は反応性の低いとされる GTX1/4 の割合が高い試料であった。

(3) 簡易分析キットの希釈倍率および判定方法の決定

各 HRM の塩酸抽出原液を用いて作成した 1、2、3.5 MU/g 及び無毒 (0 MU/g) ホタテガイの塩酸抽出

表 1 ホタテガイの希釈倍率の検討

HRM-A 毒値	×20	希釈倍率			
		×40	×60	×80	×100
0 MU/g 相当	++ 0.934	++ 1.173	++ 0.839	++ 1.261	++ 1.006
1 MU/g 相当	- 0.032	± 0.056	+ 0.128	+ 0.142	++ 0.216
2 MU/g 相当	- 0.024	- 0.039	± 0.059	± 0.051	+ 0.110
3.5 MU/g 相当	- 0.020	- 0.022	- 0.031	- 0.050	± 0.065

HRM-B 毒値	×20	希釈倍率			
		×40	×60	×80	×100
0 MU/g 相当	++ 0.856	++ 0.672	++ 0.727	++ 0.849	++ 0.790
1 MU/g 相当	- 0.046	+ 0.125	+ 0.232	+ 0.258	++ 0.285
2 MU/g 相当	- 0.020	- 0.041	± 0.071	+ 0.102	+ 0.230
3.5 MU/g 相当	- 0.013	- 0.025	- 0.044	± 0.051	± 0.049

上段 : 目視による判定結果
 下段 : T/C 値

表 2 陸奥湾産ホタテガイの塩酸及び酢酸抽出におけるキット測定結果及び MBA・LC-MS/MS 結果

検体番号	塩酸抽出液				酢酸抽出液								
	MBA結果	キット測定結果	LC-MS/MS検出項目 (nmol/kg)			キット測定結果	LC-MS/MS検出項目 (nmol/kg)						
	MU/g	T/C値	目視	C1	C2	GTX5	GTX6	T/C値	目視	C1	C2	GTX5	GTX6
N-1	N.D.	0.144	++		2.0		5.3	0.225	++			2.1	8.5
N-2	N.D.	0.230	++			25.2	5.2	0.226	++	9.2	2.5	6.4	12.8
N-3	N.D.	0.208	++	26.6				0.127	++	23.3	9.4	1.6	33.8
N-4	N.D.	0.425	++	11.6	7.0			0.281	++				
N-5	N.D.	0.427	++		6.7			0.268	++				12.7
N-6	N.D.	0.256	++					0.273	++				
N-7	N.D.	0.293	++	13.8				0.236	++	14.2			
N-8	N.D.	0.388	++	16.1				0.491	++	15.6			
N-9	N.D.	0.276	++	15.2		6.7		0.512	++	15.3		5.3	
N-10	N.D.	0.270	++	21.6	0.1			0.478	++	17.1		6.9	
N-11	N.D.	0.263	++	22.8		7.0		0.349	++	17.0		5.4	
N-12	N.D.	0.346	++	28.7				0.376	++	25.9	2.9	22.9	7.6
N-13	N.D.	0.266	++			20.2		0.422	++	25.9			

N.D. : 無毒

出原液をキット付属の希釈液で 20、40、60、80、100 倍に希釈し、簡易分析キットによる測定を行い、ホタテガイの希釈倍率を検討した結果を表 1 に示す。以下、セルの色を T/C 値が 0.1 未満を無色、0.1 以上 0.2 未満を黄、0.2 以上を水色で示す。

T/C 値は HRM-A と HRM-B で異なり、T/C 値 0.2 以上を陰性とした場合、GTX1/4 を多く含みキットに対する反応性が低いと考えられる HRM-B のような試料では、60 倍以上の希釈倍率で 1 MU/g 相当が陰性と判定される事が示唆された。

以上のことから、2 MU/g をスクリーニングレベルとするため、目視判定で 2 MU/g で試験部 T にラインが現れず、1 MU/g では T ラインが確認できるが陰性判定とならない 40 倍を、検証における希釈倍率とした。また、T/C 値で判定することとし、0.1 未満を陽性、0.1 以上 0.2 未満を疑陽性、0.2 以上を陰性とした。

3.2 簡易分析キットによる PSTs 測定結果

(1) 陸奥湾産ホタテガイでの検証結果

2019 年 5 月から 2022 年 7 月に陸奥湾内で採捕されたホタテガイ (N-1~N-13) について、塩酸抽出及び酢酸抽出を行い、図 3 に示したフローに従い測定した。得られた結果を表 2 に示す。N-3 は、3.1(1)で T/C 値が 0.13 となった検体である。LC-MS/MS 法により測定し検出された毒成分についても併せて示す。

塩酸抽出原液は公定法により MBA を行ったところ、すべて無毒であった。

目視判定は塩酸及び酢酸の両試験原液ともすべての試料で++の陰性判定であり、T/C 値は概

ね 0.2 以上の陰性であった。塩酸抽出原液 N-1 が 0.144、酢酸抽出原液 N-3 が 0.127 の疑陽性であった。

LC-MS/MS 法により C1、C2、GTX5、GTX6 が検出されたが、T/C 値が 0.2 以上で陰性となった検体でも本キットで反応性が高いとされる C1、GTX5 が多い検体があり、毒成分の検出濃度と T/C 値との関係性は確認できなかった。

(2) 有毒ホタテガイ HRM-B での検証結果

同一陽性検体での検査結果のばらつきを確認するため、GTX1/4 が多くキットの反応性が低かった HRM-B (B-1~B-10) について、日を変えて塩酸抽出及び酢酸抽出を行い、図 3 に示したフローに従い測定した。結果を表 3 に示す。各抽出原液を付与値である 3.54 MU/g とみなし、無毒ホタテガイの各抽出液で希釈し 2 及び 1 MU/g 相当としたものについても上記と同様に測定した。

各抽出液は LC-MS/MS 法により分析し、検出された各成分の測定濃度 (nmol/kg) に Oshima の比毒性を乗じてマウス毒力 (MU/g) を、EFSA の毒性等価係数 (TEF) 及び STX-2HCl の分子量 (372.2) を乗じて STX-2HCl 当量 ($\mu\text{g STX eq/kg}$) を求めた。また、塩酸抽出液については、MBA を実施しその毒力 (MU/g) を求めたので、表 3 に併せて示す。

塩酸抽出原液の MBA 結果は、2.85~3.60 MU/g (平均 3.25 ± 0.22 MU/g) であった。両抽出原液ともキットにおける目視判定は-~+とばらついたが、T/C 値は概ね 0.05 以下の陽性判定であり偽陰性判定はなかった。T/C 値の平均は塩酸抽出で

0.037±0.013、酢酸抽出で 0.035±0.021 であった。

2 MU/g とした 5 例では、MBA 結果は 2.25~2.53 MU/g (平均 2.43±0.11 MU/g)、キットにおける目視判定は±又は+、T/C 値は各 1 例ずつ 0.1 を超えたが他は 0.1 未満の陽性判定であった。T/C 値の平均は塩酸抽出で 0.060±0.029、酢酸抽出で 0.070±0.032 であった。

1 MU/g とした 3 例では、MBA 結果は 1.95~2.07 MU/g (平均 2.00±0.06 MU/g)、キットにおける目視判定はほぼ+、T/C 値は塩酸抽出で 1 例が 0.102 であった他は 0.1 未満の陽性であった。T/C 値の平均は塩酸抽出で 0.082±0.018、酢酸抽出で 0.066±0.034 であった。

以上より、簡易分析キットではばらつきなく判定可能であると示唆され、スクリーニングレベルでは偽陰性判定がでないことを確認した。また、MBA によるマウス毒力と LC-MS/MS 法により得られたマウス毒力を比較すると、2MU/g 超の試料では LC-MS/MS 法で得られた結果が若干高い傾向が見られ、それ以下では LC-MS/MS 法により得られた値の方が同程度又は低く見積られるものの理論値とは近い傾向が見られた。LC-MS/MS 法により得られた計算値で 2MU/g の試料も本キットで陽性と判定されることが示唆された。

表3 有毒ホタテガイ HRM-B の塩酸及び酢酸抽出におけるキット測定結果及び MBA・LC-MS/MS 結果

検体番号	塩酸抽出液					酢酸抽出液			
	MBA結果	キット測定結果	目視	LC-MS/MS結果より計算値	LC-MS/MS結果より計算値	キット測定結果	目視	MU/g	µgSTXeq/kg
	MU/g	T/C値		MU/g	µgSTXeq/kg	T/C値			
B-1	3.36	0.051	—	4.82	735	0.043	—	4.67	711
B-2	3.34	0.028	+	5.39	819	0.000	—	5.26	805
B-3	3.49	0.056	±	5.68	850	0.036	±	4.99	749
B-4	3.60	0.022	±	5.19	787	0.019	±	4.54	692
B-5	3.19	0.029	±	4.87	738	0.020	±	5.12	780
B-6	2.85	0.035	±	5.64	856	0.025	±	4.79	733
B-7	3.02	0.032	±	5.80	884	0.080	+	5.25	787
B-8	3.26	0.042	—	5.37	816	0.036	—	5.09	777
B-9	3.19	0.050	±	6.14	910	0.046	±	5.11	779
B-10	3.19	0.019	—	4.80	728	0.040	±	4.48	681
B-1	2.53	0.102	+	2.66	406	0.122	+	2.68	409
B-2	2.52	0.019	±	2.69	412	0.041	+	3.06	467
B-3	2.25	0.061	+	2.72	413	0.073	+	2.91	446
B-8	2.46	0.053	±	3.10	472	0.053	±	2.48	378
B-9	2.41	0.065	±	3.02	455	0.059	±	2.73	416
B-3	1.95	0.066	+	1.23	188	0.028	±	1.26	181
B-8	1.98	0.080	+	1.50	227	0.082	+	1.41	214
B-9	2.07	0.102	+	1.52	232	0.089	+	1.52	232

表4 有毒ホタテガイ (P-1~P-8) の塩酸及び酢酸抽出におけるキット測定結果及び MBA・LC-MS/MS 結果

(2) 有毒ホタテガイ (P-1~P-8) での検証結果

北海道及び東北太平洋側で毒化した有毒ホタテガイホールボディ試料 (P-1~P-8) について、HRM-B と同様の操作で簡易分析キットによる測定を実施した。結果を MBA 及び LC-MS/MS 法により求めたマウス毒力等の結果と併せて表 4 に示す。P-1~P-4 については、各塩酸抽出原液の MBA の結果を基に、無毒ホタテガイの各抽出液で希釈したものについても上記と同様に本キットで測定した。P-5~P-8 は試料量の関係で酢酸抽出のみを実施した。

両抽出原液ともキットにおける目視判定は—~+とばらついたが、T/C 値は概ね 0.1 未満の陽

性判定であった。P-1 原液を希釈し 2MU/g とした塩酸溶液のみ T/C 値が 0.110 であったが、LC-MS/MS 法により得られた毒力が 2MU/g 未満の試料でも T/C 値は 0.1 未満であり、陰性と判定されたものはなかった。

酢酸抽出原液を LC-MS/MS 法で測定した試料中の毒成分組成を図 6 に示す。HRM-A 及び HRM-B と同様に毒成分の主体は GTX 群であり、GTX1~4 で毒組成の 60 %以上を占めていた。また、簡易分析キットで反応性が低いとされる GTX1/4 のみの毒組成となるものはなかった。

検体番号		塩酸抽出液					酢酸抽出液			
		MBA結果	キット測定結果		LC-MS/MS結果より計算値		キット測定結果		LC-MS/MS結果より計算値	
		MU/g	T/C値	目視	MU/g	μgSTXeq/kg	T/C値	目視	MU/g	μgSTXeq/kg
P-1	原液	2.82	0.042	—	3.30	507	0.052	—	3.54	547
	2MU/g相当	2.35	0.110	+	1.80	279	0.075	±	2.32	359
P-2	原液	2.94	0.017	±	4.10	630	0.036	+	5.01	775
	2MU/g相当	2.54	0.000	—	2.60	402	0.017	±	3.08	480
P-3	原液	3.06	0.009	—	2.99	454	0.039	±	3.11	477
	2MU/g相当	2.79	0.043	±	2.10	322	0.045	±	2.27	348
	1MU/g相当	2.06	0.041	±	0.80	123	0.065	+	0.98	152
P-4	原液	7.68 (2倍希釈)	0.000	—	6.65	1044	0.034	±	7.40	1156
	4MU/g相当	N.T.	0.027	—	4.37	676	0.021	—	4.69	714
	2MU/g相当	2.63	0.073	±	2.38	356	0.015	—	2.37	364
	1MU/g相当	1.97	0.084	+	1.10	157	0.046	—	1.23	186
P-5	原液						0.000	—	3.67	562
P-6	原液	N.T.					0.000	—	5.27	816
P-7	原液	N.T.	N.T.				0.021	±	3.57	544
P-8	原液						0.027	±	2.53	382

N.T.: 試験実施なし

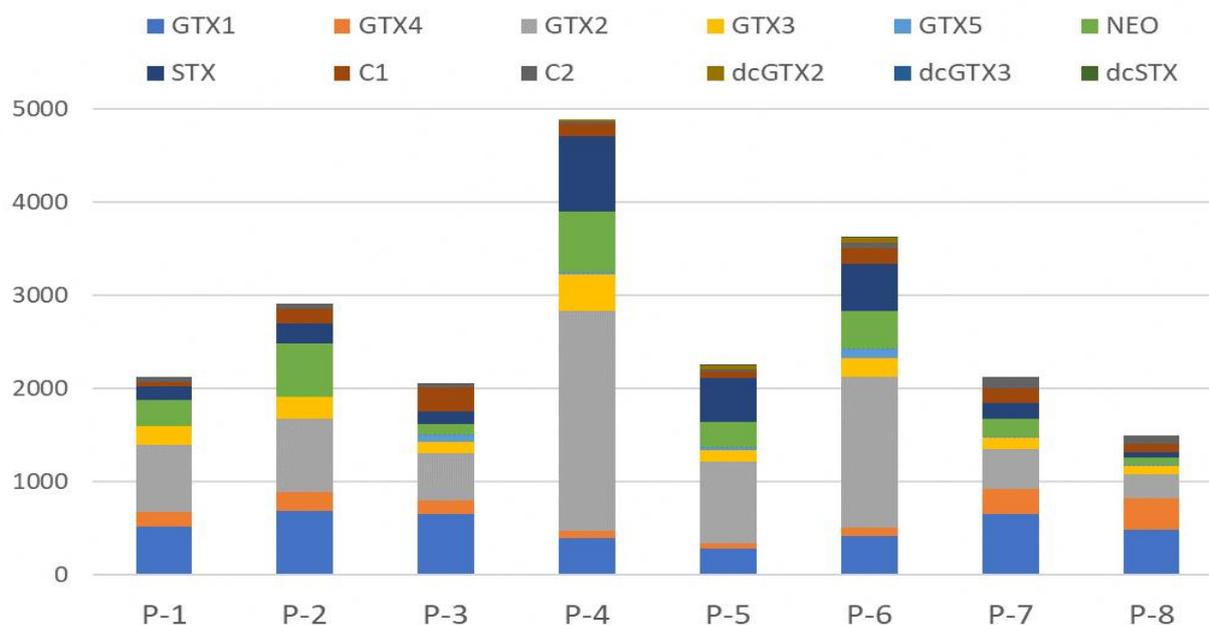


図6 東日本海域で採捕された有毒ホタテガイの毒成分組成 (酢酸抽出 試料中濃度: nmol/kg)

※ P-1及びP-2はGTX5及びGTX6を測定していない
 ※ P-3~P-8はGTX6を測定したが検出されなかった

5. まとめ

簡易分析キットを使用してホタテガイにおける麻痺性貝毒のスクリーニング検査を検討した。陸奥湾では麻痺性貝毒による毒化がこれまで確認されていないため、他の東日本海域で毒化したホタテガイを試料として検討した結果、キットの希釈倍率を40倍とすると、スクリーニングレベル2

MU/g (規制値の1/2)で陰性判定なく分析可能であった。この判定には目視ではなくT/C値を用いることで数値化でき、T/C値0.2以上では陰性(MBAで無毒)、0.1未満で陽性(MBAで毒性あり)であった。また、規制値の1/4相当である1MU/gでも検出可能であった。MBAで2MU/g以下の試料または無毒の試料でT/C値が0.1以上0.2

未満となるものが散見され、これを疑陽性とする
と、キットで疑陽性又は陽性判定の場合に
LC-MS/MS 法による確認試験を行うこととすれば、
本キットは日本のみならず対 EU 向けのモニタリ
ング検査においても使用可能と考えられた。

国立研究開発法人水産研究・教育機構のホーム
ページで公開されている「麻痺性貝毒簡易分析キ
ットによるスクリーニング法導入マニュアル
version 1」¹²⁾には、北海道及び岩手県でのホタテ
ガイによる結果が掲載されている。北海道での希
釈倍率40倍では、2 MU/g 相当での T/C 値は0.073、
1 MU/g 相当では0.155 であり、0.2 を超えてはい
ない。岩手県での希釈倍率40倍では、2 MU/g 相
当での T/C 値は0.149 であり、今回使用したキッ
トのロットとは異なるものを使用したと考えられ
るが、今回の検証結果と一致していた。

また、MBA で主流である塩酸を用いた煮沸に
よる抽出は、貝中の毒成分をより強毒性の毒成分
に変換するため過大評価となっている¹⁸⁾といわ
れている。そのため、国際的に認められた機器分
析法では酢酸による抽出が採用^{3,16,19)}されている。
今回の検証では、簡易分析キットと LC-MS/MS 法
において2つの抽出溶液で差が見られるかを検証
したが、概ね同じ結果となり機器分析に移行して
も本キットが使用可能であると考えられた。

アカガイおよびトリガイでは、毒化初期と終期
で本キットの反応性が異なることが報告^{14,15)}され
ており、これは初期と終期で試料中の毒組成が異
なるためとされている。また、ホタテガイにおい
ても毒化した初期と終期では毒組成は異なること
も報告されているが、毒化の初期から終期までそ
の主な毒成分は GTX1-4 である²⁰⁾。東日本海域
で、毒化の原因プランクトンとされている
A.tamarense (旧) 及び *A.catenella* (旧) を定期的
にモニタリングしており、ホタテガイの毒化の有
無を探るモニタリングについては、本報で検討し
たイムノクロマトキットを使用したスクリーニン
グ検査が有用であると考えられた。

しかし、西日本では麻痺性貝毒の毒化原因プラ
ンクトンが異なることが知られ^{9,13,14)}ており、生成
する毒成分の違いから同じホタテガイでも T/C 値
は異なると考えられる。本キットを使用する際
には、実施前に毒化原因プランクトンと毒組成を把
握することが重要である。また、キットのロット
が変更となった際には、同様の T/C 値が得られて
いるかの確認も必要である。

謝 辞

本稿執筆にあたって、簡易分析キットについて
御指導・御助言頂きました国立研究開発法人水産
研究・教育機構水産技術研究所の及川寛博士、松
嶋良次博士、日水製薬株式会社研究部の柴原裕亮
博士に深謝いたします。また、LC-MS/MS 法実施
に際し、御教授頂きました国立研究開発法人水産
研究・教育機構水産技術研究所の渡邊龍一博士に
心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) 農林水産省：「二枚貝等の貝毒のリスク管理に
関するガイドライン」の見直しについて。令和 4
年 3 月 9 日付け 3 消安第 6681 号、消費・安全局畜
水産安全管理課長通知
- 2) COMMISSION IMPLEMENTING REGULA-
TION (EU) 2012/1709 of 23 September 2012
- 3) Boundy M.J.*et al.* : Development of a sensitive and
selective liquid chromatography-mass spectrometry
method for high throughput analysis of paralytic
shellfish toxins using graphitised carbon solid phase
extraction. *J. Chromatogr. A*, **1387**,1-12,2015
- 4) [http://nrifs.fra.affrc.go.jp/ResearchCenter/4_BFT/m
anual/kaidoku/pdf/UHPLC-MSMS%20PST%20manu
al2.pdf](http://nrifs.fra.affrc.go.jp/ResearchCenter/4_BFT/manual/kaidoku/pdf/UHPLC-MSMS%20PST%20manual2.pdf) (2023/2/24 閲覧)
- 5) 嶋田宏：北海道オホーツク海沿岸における麻痺
性貝毒の発生予測に関する生物海洋学的研究。北
海道水産試験場研究報告, **93**,1-49,2018
- 6) 夏池真史他：近年の噴火湾および日高湾におけ
る麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella*
(Group I) の出現状況。北海道水産試験場研究報
告, **99**,1-7,2021
- 7) 上野健一他：イムノクロマト法による二枚貝の
麻痺性貝毒迅速スクリーニング法の構築。食品衛
生学雑誌, **62**(3),85-93,2021
- 8) 北海道立水産試験場。北海道沿岸における貝毒
の研究。貝毒プロジェクト報告書,1-69,2000
- 9) 村上りつ子他：麻痺性貝毒—最近の知見を中心
に—。食品衛生学雑誌, **41**(1),1-10,2000
- 10) [https://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000002
46ev-att/2r985200000246iu.pdf](https://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r985200000246ev-att/2r985200000246iu.pdf) (2023/2/24 閲覧)
- 11) 及川寛他：麻痺性貝毒簡易検査キットの開発
と普及。日本水産学会誌, **88** (5) ,335-338,2022
- 12) [http://nrifs.fra.affrc.go.jp/ResearchCenter/4_BFT/
manual/kaidoku/pdf/imuno%20manual.pdf](http://nrifs.fra.affrc.go.jp/ResearchCenter/4_BFT/manual/kaidoku/pdf/imuno%20manual.pdf)
(2023/2/24 閲覧)

- 13) Oikawa H. *et al.* : Large-scale cultivation of *Gymnodinium catenatum* for paralytic shellfish poisoning toxin standard. *Food Safety*, **6**(2), 83-87, 2018
- 14) 山本圭吾他：大阪湾で麻痺性貝毒により毒化したアカガイ，トリガイにおける毒量および毒成分の経時変化と種間の差異．日本水産学会誌，**83**(4),589-598,2017
- 15) 山本圭吾他：麻痺性貝毒簡易測定キットを活用した大阪湾におけるアカガイ，トリガイの貝毒モニタリング．日本水産学会誌，**87**(5), 504-510,2021
- 16) AOAC Official Method 2005.06 : Paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish, Prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD,2005
- 17) EURLMB SOP for the analysis of paralytic shellfish toxins (PST) by precolumn HPLC-FLD according to OMA AOAC 2005.06, Version 1, June 2020
- 18) EFSA : Marine biotoxins in shellfish—Summary on regulated marine biotoxins ; Scientific Opinion of Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*,**1306**, 1–23,2009
- 19) EFSA : Marine biotoxins in shellfish—Saxitoxin group; Scientific Opinion of Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*,**1019**, 1–76, 2009
- 20) Numano S.*et al.* : Two new skeletal analogues of saxitoxin found in the scallop, *Patinopecten yessoensis*, as possible metabolites of paralytic shellfish toxins. *Chemosphere*,278,1-9,2021

Evaluation of a paralytic shellfish toxins screening method for scallops using a simple assay kit around the eastern Japan waters

Akemi Yamamoto, Asuka Igarashi, Ayano Tanaka, Juri Iwadate, Megumi Shibata

As a screening method for paralytic shellfish toxins (PST) monitoring in scallop production areas, a simple analytical kit based on oligonucleotide lateral flow immunoassay was evaluated. As a judgment method, the area ratio (T/C value) of the test and control lines of the chromatogram analyzed by ImageJ software after the kit reaction was used without visual observation. Using contaminated scallops from the eastern Japan waters, the assay could be performed without a false-negative result at a screening level of 2 MU/g, which is 1/2 of the regulatory limit of PST in Japan, at a kit dilution factor of 40. Moreover, there were no differences in the reactivity of the kit between hydrochloric acid extract and acetic acid extract. Samples determined to be false-positive or positive based on the kit were considered to be usable for monitoring tests by performing confirmation tests using the LC-MS/MS method.

Key words: paralytic shellfish toxins, lateral flow immunoassay kit, scallop, screening, LC-MS/MS

青森県における酸性雨のpH経時変化解析：季節変動とトレンドの分離・抽出

花石竜治 菩提寺誉子 神 毅統

青森県青森市および鱒ヶ沢町で2007年度から2020年度までに観測された降水のpHから、降水量で加重平均された月ごとのpHを求め、この時系列データを季節変動とトレンドに分離する解析を行った。解析には、状態空間モデルに基づくベイズ統計手法において、マルコフ連鎖モンテカルロ法を用いた。pHのトレンドは、青森市と鱒ヶ沢町でほぼ同じ傾向を示した。一方、その季節変動については、振幅は青森市よりも鱒ヶ沢町で大きく、鱒ヶ沢町でこれが漸増する経年変化を示した。上記二地点でトレンドが同一であったことは、季節変動を除けばpHが概ね同様に変化していることを示すと考えられた。

Key words : Acid rain, pH, Seasonal variation, Trend, State-space model

1. はじめに

我が国における酸性雨は、大気汚染や水質汚濁が顕在化して以来歴史ある環境問題であり¹⁾、国は、1998年に東アジア地域諸国が参画するEANET(東アジア酸性雨モニタリングネットワーク)に参加し、課題の解決に向け取り組んでいる²⁾。また、酸性雨の調査研究は、地方自治体によるものから始まり、その後、環境省(庁)が設営した国設観測所による調査を経て、現在では、地方自治体が測定したデータを全国環境研協議会が収集している。

青森県は、日本海側地域と太平洋側地域の両方を有する地理的条件にあり、降水は、県内の地域ごとに特色ある化学的特性を持つ³⁾⁻⁵⁾。近年の調査地点は青森市および鱒ヶ沢町であり、花石らは昨年度、これらの地点における降水のイオン組成に着目し、人為的起源由来と考えられる非海塩性成分としての濃度をトリリニアダイアグラムによるプロットおよび多変量解析などで考察した⁶⁾。

一般にpH(水素イオン指数)以外のイオン組成は、年度内で桁が変わる程度の季節変動を示す。一方、pHは、イオン組成ほどの大きな季節変動はしないが、降水の酸性度の直接的な指標となっており、これまでの酸性雨研究において主に移動平均を取ることによって議論されてきた⁷⁾。

本研究で著者らは、降水量で加重平均された各月のpHの時系列データから季節変動を抽出する解析を検討した。

時系列データから季節変動を抽出する方法は、経済学の分野ですでに確立されたものとなっており^{8),9)}、著者らの着眼は決して新規なものではない。科学技術計算に用いられるプログラミング言語Rには、時系列データから季節変動を抽出するstlという関数がある。しかし、この関数は定常的な季節変動を与えるもので、季節変動そのものが経時的に変化する場合には適用できない。

本研究では、時系列データ解析法としてより進化した状態空間モデル¹⁰⁾⁻¹²⁾を酸性雨のpHデータ解析に応用した。そして、モデルパラメータを確率変数と考えるベイズ統計手法に基づき、それらを推定した。この方法により、経時変化する季節変動の寄与を抽出でき、季節変動以外の変化をトレンドとして取得できたので報告する。

2. 解析理論

2.1 季節変動を伴う時系列データのモデル化¹⁰⁾

状態空間モデルによるモデル化について記述する。

季節変動が確率的に変化することを予想してモデルを考える。季節変動 γ_i の合計値が正規白色雑音 s_t にしたがうとすれば、

$$\sum_{i=1}^k \gamma_i = s_t \quad (1)$$

$$s_t \sim \text{Normal}(0, \sigma_s^2)$$

ここで、 $\text{Normal}(\mu, \sigma^2)$ は、期待値 μ 、標準偏差 σ の正規分布を表す。 k は季節変動の周期である。

時系列データで、時点 t における季節変動成分を次式で表す。

$$\gamma_t = - \sum_{i=t-(k-1)}^{t-1} \gamma_i + s_t \quad (2)$$

$$s_t \sim \text{Normal}(0, \sigma_s^2)$$

すなわち、時点 t における季節変動成分は、その時点から、 $k-1$ 個の時点まで遡った季節変動の影響を受けるものとして、それに正規白色雑音を加わったものである。

次に、本研究で採用した二次のトレンドモデル（平滑化トレンドモデル）に、周期 k の季節変動が加わったモデル式（状態方程式）を(3)式に、モデル式による観測値 y_t の表現（観測方程式）を(4)式に示す。

$$\mu_t \sim \text{Normal}(2\mu_{t-1} - \mu_{t-2}, \sigma_\xi^2)$$

$$\gamma_t \sim \text{Normal}\left(- \sum_{i=t-(k-1)}^{t-1} \gamma_i, \sigma_s^2\right) \quad (3)$$

$$\alpha_t = \mu_t + \gamma_t$$

$$y_t \sim \text{Normal}(\alpha_t, \sigma_v^2) \quad (4)$$

(4)式で明らかのように、本研究で採用した解析法において、解析する pH がモデル式による再現値（期待値）として正規分布することを仮定している。pH は水素イオン濃度の指数であり、正規分布するものが濃度でなく pH であることが解析上必要である。このことを pH の頻度分布により確認し、また、解析結果の残差の頻度分布から判断して、解析の妥当性を検証する。

2.2 バイズ法とマルコフ連鎖モンテカルロ (MCMC) 法の概要¹³⁾

バイズ法は、バイズの定理に基づき事前確率と尤度(ゆうど)から事後確率を算出する(バイズ更新)方法である。

その計算の実際においては、例えばギブズサンプリングの方法では、確率変数として扱うパラメータの乱数初期値から、設定したモデルが与える遷移核(マルコフ連鎖を与える完全条件付き確率分布)により、次々に乱数のパラメータに変換し、その統計分布を求める。この分布からモンテカルロ積分により、パラメータの期待値の近似値を求める。マルコフ連鎖の初期は、乱数初期値の影響が大きく、burn-in という期間として、モンテカルロ積分には用いない。また、マルコフ連鎖は、直前の値の影響を受けるため、その中で間隔を置いて値を抽出し、モンテカルロ積分に供する。

2.3 MCMC 法による状態空間モデルのモデルパラメータの推定¹¹⁾

状態空間モデルとは、観測される物理量の背後に、状態があることを仮定するモデルで、状態間の遷移を状態方程式で記述し、状態の観測を観測方程式で記述する。

時系列の場合、1 ステップごとの状態の時間発展を状態方程式で表し、各ステップにおける観測量を、状態から観測量を取得する観測方程式で表す。

今回取り上げる数理モデルは、ベイズ統計手法に基づき MCMC 法で解くが、状態方程式や観測方程式で表される状態空間モデルは、この解法の適用を直截的に行えるモデルである。

まず、状態および観測量の同時分布を考える。いま、時刻 $t = 1, \dots, n$ の状態がそれぞれ m 個の要素からなると仮定し、これを m 次元のベクトルと考えて、その次元数の記述を省略し、 $\mathbf{x}_{1:n}$ と表す。同じように、時刻 $t = 1, \dots, n$ で観測量が与えられ、これがスカラーであるとして、 $y_{1:n}$ と表す。また、この数理モデルを表す要素 m' 個のパラメータセットがあるとして、この次元数の記述を省略し、ベクトル量の θ とする。

時系列データが時間発展をするとし、時刻 $t = 1, \dots, n$ の状態および観測量の同時分布を $p(\mathbf{x}_{1:n}, y_{1:n}, \theta)$ の形で記述する。ここで、パラメータセット θ もあわせて記述する。

このとき、確率の乗法定理から、パラメータが $\mathbf{x}_{1:n}, \theta$ のセットである場合に観測値が $y_{1:n}$ である確率 $p(\mathbf{x}_{1:n}, \theta | y_{1:n})$ は、観測値が $y_{1:n}$ である確率 $p(y_{1:n})$ と、同時分布 $p(\mathbf{x}_{1:n}, y_{1:n}, \theta)$ から、

$$p(\mathbf{x}_{1:n}, \theta | y_{1:n}) = \frac{p(\mathbf{x}_{1:n}, y_{1:n}, \theta)}{p(y_{1:n})} \propto p(\mathbf{x}_{1:n}, y_{1:n}, \theta) \quad (5)$$

が成り立つ。よって、同時分布を議論すれば、求める確率分布 $p(\mathbf{x}_{1:n}, \boldsymbol{\theta} | y_{1:n})$ を考えることができる。同時分布について、次式により記述を変える。

$$p(y_{1:n}, \mathbf{x}_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) = p(\mathbf{x}_{1:n}, y_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) \quad (6)$$

これは、時刻 $t = 1, \dots, n-1$ の時間発展とその後 $t = n$ の値の同時分布であるから、次式で表記される。

$$p(y_{1:n}, \mathbf{x}_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) = p(y_n, y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) \quad (7)$$

この同時分布は乗法定理で分解され、次式を得る。

$$\begin{aligned} p(y_n, y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) \\ = p(y_n | y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) p(y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) \end{aligned} \quad (8)$$

さらにこの積の第 2 項目は乗法定理で次式のとおり分解される。

$$\begin{aligned} p(y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) \\ = p(\mathbf{x}_n | y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n-1}, \boldsymbol{\theta}) p(y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n-1}, \boldsymbol{\theta}) \end{aligned} \quad (9)$$

以上から、

$$\begin{aligned} p(y_{1:n}, \mathbf{x}_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) \\ = p(y_n | y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) p(\mathbf{x}_n | y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n-1}, \boldsymbol{\theta}) \\ \times p(y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n-1}, \boldsymbol{\theta}) \end{aligned} \quad (10)$$

が成り立つ。これを繰り返すと、状態とパラメータセットの間の独立性も考慮して、

$$\begin{aligned} p(y_{1:n}, \mathbf{x}_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) \\ = \prod_{t=2}^n (p(y_n | y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) p(\mathbf{x}_n | y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n-1}, \boldsymbol{\theta})) \\ \times p(y_1 | \mathbf{x}_{0:1}, \boldsymbol{\theta}) p(\mathbf{x}_1 | \mathbf{x}_0, \boldsymbol{\theta}) p(\mathbf{x}_0, \boldsymbol{\theta}) \\ = p(\mathbf{x}_0 | \boldsymbol{\theta}) p(\boldsymbol{\theta}) \\ \times \prod_{t=2}^n (p(y_n | y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) p(\mathbf{x}_n | y_{1:n-1}, \mathbf{x}_{1:n-1}, \boldsymbol{\theta})) \\ \times p(y_1 | \mathbf{x}_{0:1}, \boldsymbol{\theta}) p(\mathbf{x}_1 | \mathbf{x}_0, \boldsymbol{\theta}) \end{aligned} \quad (11)$$

となる。

次に、状態空間モデルで仮定する観測の独立性から、

$$p(y_t | y_{1:t-1}, \mathbf{x}_{1:t}, \boldsymbol{\theta}) = p(y_t | \mathbf{x}_t, \boldsymbol{\theta}) \quad (12)$$

また、時系列がマルコフ的（直前の状態にのみ依存し、それより前の過去の記憶がないとする）に時間発展すると仮定するから、

$$p(\mathbf{x}_t | y_{1:t-1}, \mathbf{x}_{1:t-1}, \boldsymbol{\theta}) = p(\mathbf{x}_t | \mathbf{x}_{t-1}, \boldsymbol{\theta}) \quad (13)$$

以上から、

$$\begin{aligned} p(\mathbf{x}_{1:n}, y_{1:n}, \boldsymbol{\theta}) \\ = p(\mathbf{x}_0 | \boldsymbol{\theta}) p(\boldsymbol{\theta}) \prod_{t=2}^n (p(y_t | \mathbf{x}_t, \boldsymbol{\theta}) p(\mathbf{x}_t | \mathbf{x}_{t-1}, \boldsymbol{\theta})) \\ \times p(y_1 | \mathbf{x}_{0:1}, \boldsymbol{\theta}) p(\mathbf{x}_1 | \mathbf{x}_0, \boldsymbol{\theta}) \\ = p(\mathbf{x}_0 | \boldsymbol{\theta}) p(\boldsymbol{\theta}) \prod_{t=1}^n (p(y_t | \mathbf{x}_t, \boldsymbol{\theta}) p(\mathbf{x}_t | \mathbf{x}_{t-1}, \boldsymbol{\theta})) \end{aligned} \quad (14)$$

すなわち、初期条件と時間発展のマルコフ性、および観測の独立性から、すべての確率変数の同時分布が記述される。

MCMC 法を適用する場合、例えばギブズサンプリングを用いる場合を議論する。考える時刻 t を除いたすべての状態を表すために $\mathbf{x}_{-t} = (\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_{t-1}, \mathbf{x}_{t+1}, \dots, \mathbf{x}_n)$ とする。時刻についての更新は、 \mathbf{x}_{-t} と $\boldsymbol{\theta}$ を固定して、 \mathbf{x}_t を更新するが、そのための完全条件付き確率分布は $p(\mathbf{x}_t | \mathbf{x}_{-t}, \boldsymbol{\theta}, y_{1:t})$ である。この条件は、モデルのマルコフ性から、 $t = 2, \dots, n-1$ のとき $p(\mathbf{x}_t | \mathbf{x}_{t-1}, \mathbf{x}_{t+1}, \boldsymbol{\theta}, y_t)$ であり、 $t = 1$ ならば $p(\mathbf{x}_1 | \mathbf{x}_2, \boldsymbol{\theta}, y_1)$ 、 $t = n$ ならば $p(\mathbf{x}_n | \mathbf{x}_{n-1}, \boldsymbol{\theta}, y_n)$ である。これらの確率分布の具体的な形を状態方程式から求めれば、MCMC 計算での乱数の動きを与えることができる。

なお、パラメータセット $\boldsymbol{\theta}$ の確率分布の式の中に複数の正規分布が積の形である場合、これらの積もまた正規分布となるから、これにより乱数の更新を行えばよい¹³⁾。正規分布の期待値を更新する場合の条件付き確率分布は、もとの分布のパラメータから得られる正規分布になり、期待値と分散が指定されるので、もとの乱数を更新できる。また、分散を更新する場合、条件付き確率分布は逆ガンマ分布となり、このパラメータから乱数を更新できる。

以上がギブズサンプリングを用いたベイズ更新の方法である。

3. 材料と方法

図 1 に、調査地点である青森県青森市（県環境保

健センター屋上) および青森県西津軽郡鱒ヶ沢町 (県鱒ヶ沢道路河川事業所屋上) の位置図を示す。

降水採取は、ANEOS 社(旧 小笠原計器株式会社)の自動雨水採水器 US-300HD (青森市) および US-300D (鱒ヶ沢町) を用い、青森市は毎週、鱒ヶ沢町では 2 週間に一度の検体回収を行った。

検体について、湿性沈着モニタリング手引き書 (第 2 版)¹⁴⁾ により、pH、電気伝導度およびイオン成分について分析を行った。

上記の結果のうち、2007 年度から 2020 年度までの降水量で加重平均した月ごとの pH については、下記の解析を行った。

解析は、R の言語環境 (ソフトウェア RStudio) で動作する統計計算パッケージ Stan を用いた¹⁰⁾。ベイズ法による MCMC 法で、繰り返し回数 (単一連鎖法) を 8000 回とし、そのうちの burn-in 回数を 2000 回、チェーン回数 (多重連鎖法) を 4 回、連鎖におけるサンプリング間隔を 6 回とした。その他の設定は、文献¹⁰⁾ によった。

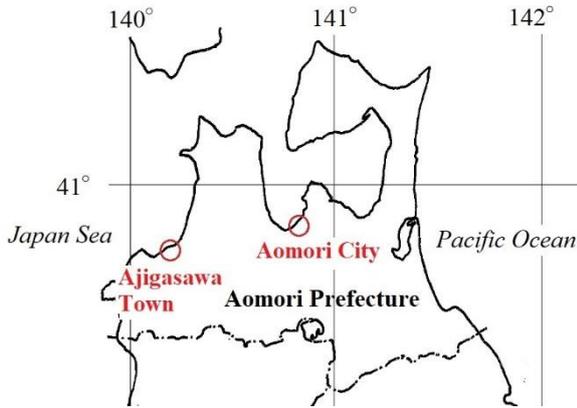


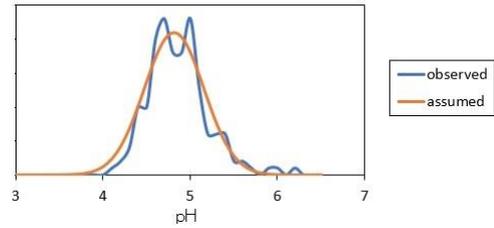
図 1 調査地点位置図

4. 結果

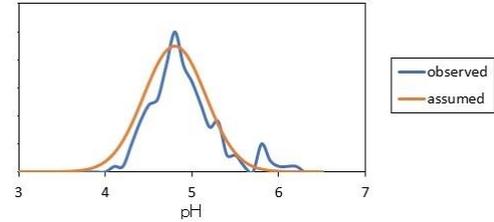
4.1 加重平均された月ごとの降水の pH の正規分布性

図 2 に(a)青森市、(b)鱒ヶ沢町における降水の pH の頻度分布を示す。これらの分布が正規分布であると仮定すると、平均値 μ と標準偏差 σ が求まることから、得られた正規分布曲線を頻度分布に重ね書きした。ここで、正規分布密度関数 $f(x)$ を(15)式で与えた。表 1 にこれらのパラメータを示した。

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left\{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right\} \quad (15)$$



(a) Aomori City



(b) Ajigasawa Town

図 2 (a)青森市および(b)鱒ヶ沢町における加重平均 pH(observed) の頻度分布と正規分布曲線 (assumed)

表 1 二地点の加重平均 pH の統計的パラメータ

Site	μ	σ
Aomori City	4.81	0.342
Ajigasawa Town	4.80	0.357

4.2 pH の経時変化からの季節変動の分離

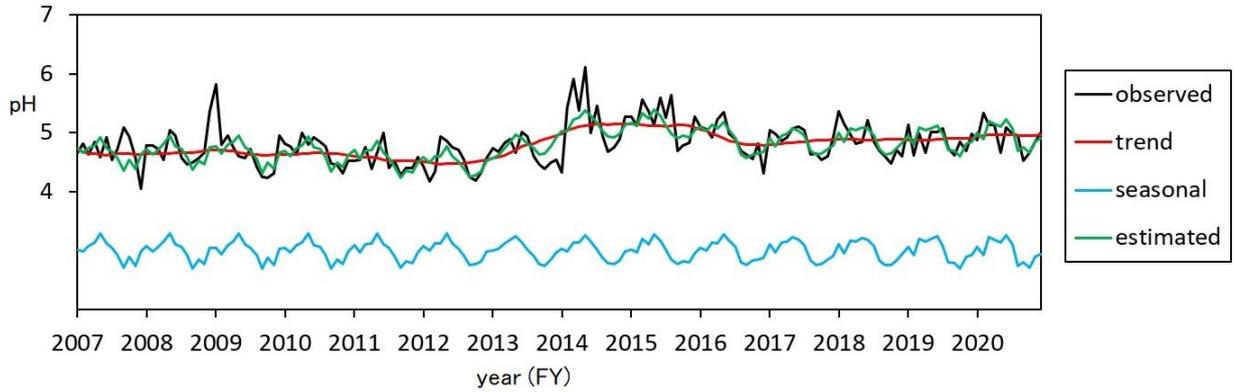
図 3 に(a)青森市、(b)鱒ヶ沢町における加重平均 pH から季節変動分離の解析結果を示す。“observed” は用いたデータ、“trend” および “seasonal” がそれぞれトレンド μ_t および季節変動 γ_t を示す。“estimated” はこれらの和で、 α_t を示す。

また、表 2 にベイズ法により求めたバラツキの標準偏差を示した。

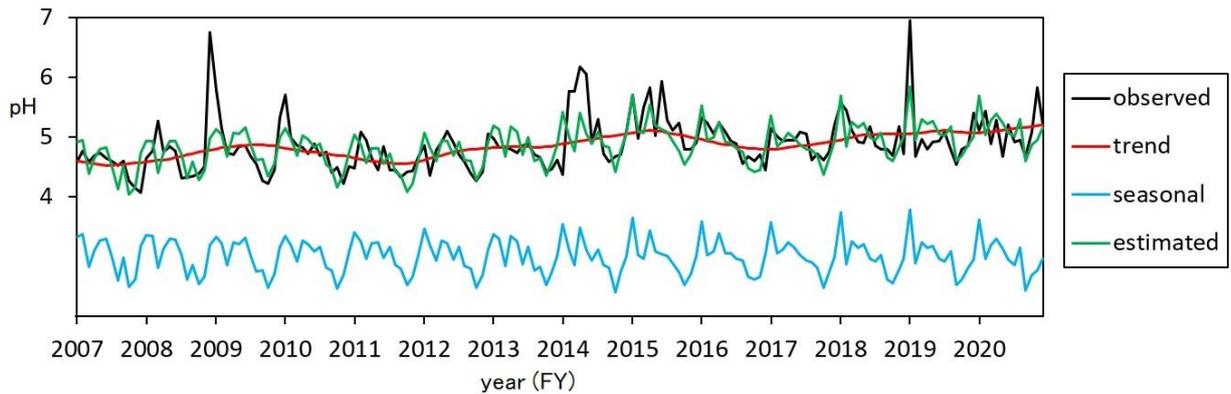
図 4 には、図 3 の観測値 “observed” の “estimated” で示したモデル式による推定値からの偏差を “residue” としてこの分布を示した。ここで、“normal dist.” とは、偏差のバラツキの標準偏差から(15)式で求めた正規分布である。

表 2 ベイズ法により求めた、実測データのモデル式からのバラツキの標準偏差

Site	σ_ζ	σ_s	σ_v
Aomori City	0.00613	0.251	0.0133
Ajigasawa Town	0.00590	0.351	0.0253

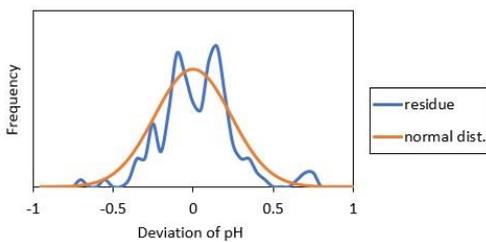


(a) Aomori City

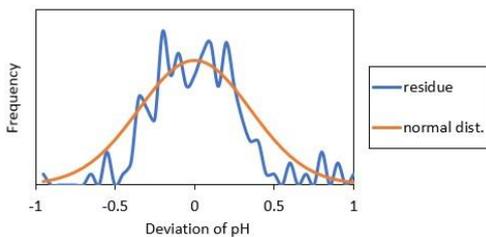


(b) Ajigasawa Town

図3 (a)青森市、(b)鱒ヶ沢町における加重平均 pH からの季節変動の分離結果。年度での表記



(a) Aomori City



(b) Ajigasawa Town

図4 モデル式による pH 経時変化からの季節変動の分離後の偏差の頻度分布

5. 考察

5.1 加重平均 pH の正規分布性

図2からこの pH はほぼ正規分布に近い頻度分布をしていた。この判断は定性的であり、データ全体からの結果を踏まえてのものである。

ベイズ法による解析では、時系列においてモデル式からのバラツキが正規分布をなすことが第一の仮定である。図4に示したモデル式からの偏差の頻度分布はほぼ正規分布に近いと言え、この仮定が概ね正しかったことが示唆された。

5.2 季節変動分離の解析について

(1) 季節変動

図3の(a)と(b)を比較すると、抽出された季節変動“seasonal”は、青森市よりも鱒ヶ沢町で、その振幅が大きいことが分かる。また、青森市における季節変動は、経年的にほとんど同一であるのに対して、鱒ヶ沢町では、振幅が漸増していることが示されている。

この季節変動の振幅の増加が温暖化現象などによるものかどうかの議論は今の段階ではできない

が、解析で示された一つの結論である。

(2)トレンド

図3の(a)と(b)で示した“trend”は青森市と鱒ヶ沢町で概ね同じ傾向であった。このことは、菩提寺ら¹⁵⁾が述べたように、これら二つの観測地点で、降水の化学組成比が、海塩の寄与を除けばほぼ同じとみなせることに対応していると考えられる。

6. 結論

月ごとに降水量で加重平均された降水の時系列データのpHについて、ベイズ法により季節変動の分離を行った。その結果、次のことが示唆された。

1) このモデルによる解析は、解析後の残差の頻度分布が正規分布に近いことから、概ね妥当であったことが示された。

2) 季節変動の寄与は、青森市よりも鱒ヶ沢町で振幅が大きかった。そして鱒ヶ沢町で、この振幅が漸増する経年変化を示した。

3) 観測された時系列pHから季節変動の効果を除いて得られたトレンドは、青森市と鱒ヶ沢町でほぼ同じ傾向を示した。

仮定したモデル式は、時系列の二次の項を含み、トレンドが平滑化されるモデルであり、また季節変動が12か月のスパンでなされるという仮定をした。(1)-(3)の結果から、これらの仮定は概ね妥当であり、青森県の両地点の降水のpHについては、トレンドとしてほぼ同一であるという示唆を与えるものであると考えられた。

文 献

- 1) 玉置元則：日本の酸性雨，東アジアの酸性雨．環境技術,**35**,799,2006
- 2) 佐藤二郎：東アジア酸性雨モニタリングネットワーク(EANET)の活動と包括的大気環境管理の推進．環境技術,**35**,818-823,2006
- 3) 対馬典子ほか：青森県内における酸性沈着による汚染実態—湿性沈着物およびガス状沈着物の調査結果から—．青森県環境保健センター研究報告,**16**,66-73,2005
- 4) 対馬典子ほか：青森県における酸性沈着による汚染実態(II)—平成15～17年度の調査結果より—．青森県環境保健センター研究報告,**18**,26-33,2007
- 5) 対馬典子ほか：青森県内の酸性沈着調査結果～平成3～19年度のとりまとめ～．青森県環境保健センター研究報告,**19**,31-39,2008
- 6) 花石竜治ほか：青森県における酸性雨のイオン

組成の解析．青森県環境保健センター年報,**32**,62-68,2021

7) 辻 昭博ほか：京都府北部の清浄地域における酸性雨の長期的動向．京都府保健環境研究所年報,**53**,41-52,2008

8) 奥本佳伸：季節調整プログラム センサス局法X-12-ARIMAのversion 0.3について．千葉大学経済研究,**24**,99-117,2010

9) Harvey, AC 著, 国友直人, 山本 拓共訳：時系列モデル入門．東京大学出版会,東京,1985

10) 馬場真哉：実践 Data Science シリーズ R と Stan ではじめるベイズ統計モデリングによるデータ分析入門．講談社,東京,2019

11) 萩原淳一郎ほか：基礎からわかる時系列分析—Rで実践するカルマンフィルタ・MCMC・粒子フィルター—．技術評論社,東京,2018

12) 馬場真哉：時系列分析と状態空間モデルの基礎 R と Stan で学ぶ理論と実装．プレアテス出版,安曇野,2018

13) 中妻照雄：入門 ベイズ統計学．朝倉書店,東京,2007

14) 環境省：湿性沈着モニタリング手引き書(第2版),平成13年3月

15) 菩提寺誉子ほか：青森県における酸性雨のイオン組成及び当量沈着量の調査地点間比較．青森県環境保健センター年報,**33**,68-77,2022

Analysis of temporal changes in pH of acid rain in Aomori Prefecture: separation and extraction of seasonal changes and trends

Ryuji Hanaishi, Motoko Bodaiji, Taketo Jin

Based on the observed pH of precipitation in Aomori city and Ajigasawa town in Aomori Prefecture from fiscal year 2007 to 2020, the monthly pH weighted average of precipitation was calculated, and time series data were separated into seasonal variations and trends. The analysis was performed using the Markov chain Monte Carlo method in a Bayesian statistical method based on a state-space model. The trends for pH were almost the same between Aomori city and Ajigasawa town. On the other hand, the amplitude of seasonal changes was larger in Ajigasawa town than in Aomori city, and gradually increased over time in Ajigasawa town. The finding that the trends were the same at the above two locations was considered to indicate that pH changes followed almost the same pattern except for with seasonal variations.

Key words: Acid rain, pH, Seasonal variation, Trend, State-space model

青森県における酸性雨のイオン組成及び当量沈着量の調査地点間比較

菩提寺誉子 花石竜治 神 毅統

青森県内の酸性雨（湿性沈着）の調査地点は青森市及び鯨ヶ沢町の 2 地点であるが、いずれも海岸に近く、降水には海塩起源イオンが多く含まれている。降水中の非海塩起源イオンについて調査地点間での違いの有無を調査するため、2012 年度から 2021 年度までに採取した降水に含まれる非海塩起源イオンの組成比について、トリリニアダイアグラム上での比較及び Hotelling の T^2 検定を実施した。また、非海塩起源イオンの当量沈着量について、無相関検定及び合計量の比較を実施した。

その結果、調査地点間で、①非海塩起源イオンの組成比は各シーズンで同程度であり有意差がないこと、②非海塩起源イオンの当量沈着量の変動に正の相関があること、③過去 10 年間の非海塩起源イオンの合計当量沈着量は同程度だったことがそれぞれ示された。

本研究により、海塩起源イオンの影響を除外した場合、両調査地点の降水はイオンバランスの観点から類似した特徴を持ち、その環境負荷は同程度であることが示唆された。

Key words: Acid rain, Non-sea salt, Tri-linear diagram, Hotelling's T-squared test, Test of no correlation

1. はじめに

酸性雨とは、狭義には、化石燃料が燃焼される際に大気中に放出される硫黄酸化物や窒素酸化物が、光化学反応などにより硫酸や硝酸に変化して降水に溶け込むことにより、降水の酸性化が引き起こされたものである¹⁾。

国内では、1970 年代に関東地方に酸性度の強い雨が降り、多くの人に健康被害が発生した²⁾。この頃から酸性雨問題が表面化し、多くの自治体で酸性雨の調査研究が開始された。その後、1991 年に全国地方自治体の試験研究機関を会員とする全国環境研協議会の部会として、酸性雨広域大気汚染調査研究部会が発足し、全環研酸性雨全国調査が開始された。この調査は、地方自治体での調査方法を統一し、共同で日本全域における酸性雨調査を実施するものである。全国調査の結果、酸性雨について、地域特性や、季節変動、火山・大陸発生源の影響など、多くの知見が得られた。

青森県では、1982 年に県内の酸性雨の調査研究を開始し³⁾、1991 年からは全環研酸性雨全国調査に測定結果を提供している。

現在の青森県内の酸性雨調査地点は、青森市及び鯨ヶ沢町の 2 地点である。これらの調査地点は、海岸に近いことから海水飛沫の影響の指標となる

Na⁺イオン濃度が比較的高く²⁾、降水の酸性化を引き起こす人為起源イオンについて検討するためには、非海塩起源イオンの推定量を算出することが重要となる。

降水に含まれる非海塩起源イオンは、早狩⁴⁾が酸性雨分析のために作成したトリリニアダイアグラムを用いることにより、2 次元的に組成の特徴を捉えることができる。花石ら⁵⁾は、このトリリニアダイアグラム上に、2007 年度から 2018 年度までの降水に含まれる非海塩起源イオンについてプロットし、青森市と鯨ヶ沢町の非海塩起源イオンの組成は概ね似た傾向であり、陽イオンについては季節変動があることが示唆されることを報告している。

本研究では、2012 年度から 2021 年度までに採取した降水に含まれる非海塩起源イオンの組成比について Hotelling の T^2 検定を実施し、調査地点間で有意差があるか検討した。

また、酸性雨による生態や環境などへの影響は、イオン成分の沈着量によって決定されることから、非海塩起源イオンの当量沈着量について、調査地点間の無相関検定を実施し、地理的条件によって当量沈着量の傾向に違いがあるか検討した。

そして最後に、10 年間の非海塩起源イオンの合計当量沈着量を調査地点間で比較し、近年、降水が

調査地点に与えた環境負荷について違いがあるか検討した。

2. 解析理論

2.1 Hotelling の T^2 検定⁶⁾

Hotelling の T^2 検定は、 t 検定を多変量空間に拡張したものである。これを用いることにより、2つ以上の変数が存在する多次元空間(多変量空間)の標本が多変量正規分布していると仮定し、2標本間の有意差検定を実施することができる。

p 次元空間において、母集団から抽出した標本の測定値 \mathbf{X} とその平均値 \mathbf{m} は、次のように行列及びベクトルで表すことができる。

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} x_{11} & \dots & x_{1j} & \dots & x_{1n} \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ x_{i1} & \dots & x_{ij} & \dots & x_{in} \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ x_{p1} & \dots & x_{pj} & \dots & x_{pn} \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{m} = \begin{bmatrix} m_1 \\ \vdots \\ m_i \\ \vdots \\ m_p \end{bmatrix} \quad m_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_{ij}$$

このとき、測定値 \mathbf{X} から平均値 \mathbf{m} を差し引いた行列を \mathbf{Y} とすると、分散共分散行列 \mathbf{S} は、次の式(1)で表される。

$$\mathbf{S} = \mathbf{Y}'\mathbf{Y} \quad ' : \text{転置行列} \quad (1)$$

ここで、

$$\mathbf{Y} = \begin{bmatrix} x_{11} - m_1 & \dots & x_{1j} - m_1 & \dots & x_{1n} - m_1 \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ x_{i1} - m_i & \dots & x_{ij} - m_i & \dots & x_{in} - m_i \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ x_{p1} - m_p & \dots & x_{pj} - m_p & \dots & x_{pn} - m_p \end{bmatrix}$$

である。

2つの母集団からそれぞれ抽出した標本の測定値ベクトル \mathbf{X}_1 (測定値の個数 n)、 \mathbf{X}_2 (測定値の個数 h) について、その不偏分散ベクトル \mathbf{V} は、それぞれの分散共分散行列を \mathbf{S}_1 、 \mathbf{S}_2 とすると、次の式(2)で表される。

$$\mathbf{V} = \frac{\mathbf{S}_1 + \mathbf{S}_2}{(n-1) + (h-1)} \quad (2)$$

母平均間に有意差がないという帰無仮説 $H_0: \mu_1 = \mu_2$ を設定すると、Hotelling の T_0^2 統計量は、次の式(3)で表される。

$$T_0^2 = \frac{nh}{n+h} [\mathbf{m}_1 - \mathbf{m}_2]' \mathbf{V}^{-1} [\mathbf{m}_1 - \mathbf{m}_2] \quad (3)$$

この T_0^2 統計量を使って次の式(4)により得られる F 統計量は、第1自由度 p 、第2自由度 $n+h-1-p$ の F 分布に従う。

$$F_0 = T_0^2 \frac{n+h-1-p}{p(n+h-2)} \quad (4)$$

この検定統計量 F_0 が棄却される有意水準を $100\alpha\%$ と設定すると、比較すべき棄却域の境界値となる F 統計量は、 $F(p, n+h-1-p, \alpha)$ となる。従って、次の式(5)が成立する場合は、帰無仮説が棄却され、2組の測定値に有意差があると判断される。

$$F_0 \geq F(p, n+h-1-p, \alpha) \quad (5)$$

一方、その逆の式(6)が成立する場合は、帰無仮説が棄却されず、2組の測定値に有意差がないと判断される。

$$F_0 < F(p, n+h-1-p, \alpha) \quad (6)$$

2.2 無相関検定⁷⁾

2つの変数 x と y との間に相関関係があるかは、試料相関係数 r を用いて、母集団の真の相関係数(母集団相関係数) ρ について検討することにより示すことができる。

2つの変数 x と y の母集団に相関がないという帰無仮説 $H_0: \rho = 0$ を設定すると、 t 統計量は次の式(7)で表され、自由度 $n-2$ の t 分布に従う。

$$t_0 = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (7)$$

この検定統計量 t_0 が棄却される有意水準を $100\alpha\%$ と設定すると、比較すべき棄却域の境界値は $t(n-2, \alpha)$ となる。

従って、次の式(8)が成立する場合は、帰無仮説が棄却され、2つの変数 x と y の母集団に相関があると判断される。

$$|t_0| \geq t(n-2, a) \quad (8)$$

一方、その逆の式(9)が成立する場合は、帰無仮説が棄却されず、2つの変数 x と y の母集団に相関がないと判断される。

$$|t_0| < t(n-2, a) \quad (9)$$

3. 材料と方法

3.1 材料

2012年4月から2022年3月までに、青森市（県環境保健センター屋上）及び鮭ヶ沢町（県鮭ヶ沢道路河川事業所屋上）で採取した降水を調査材料とした。調査地点の位置図を図1に示す。

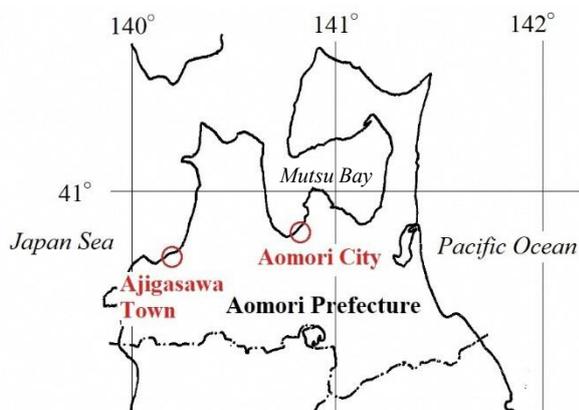


図1 調査地点位置図

降水の捕集装置は、ANEOS社（旧 小笠原計器株式会社）製の自動雨水採水器 US-300HD（青森市）及びUS-300D（鮭ヶ沢町）を用いた。

降水の回収は、青森市では1週間ごと、鮭ヶ沢町では2週間ごとに行った。

3.2 方法

(1) イオンの沈着量の算出

降水に含まれる主なイオン（ SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 Cl^- 、 NH_4^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} ）の濃度について、湿性沈着モニタリング手引書（以下「手引書」という。）⁸⁾に準じて、イオンクロマト法により測定した。また、手引書に準じて、ガラス電極法により降水のpHを測定し、降水に含まれる水素イオン（ H^+ ）の濃度を推定した。更に、各試料の濃度から1か月あたりの平均濃度を算出し、1か月間の降水量及び採取面積を用いて1か月あたりの沈着量に変換した。各月の期間は、酸性雨全国調査実施要領で定められる期間に準じた。

なお、手引書に準じて、降水中のイオンバランスを検討し、イオンバランスの基準範囲を超えた月は異常値として除外した。

(2) 非海塩起源イオンの当量沈着量の推定

降水の海塩起源イオンは、 SO_4^{2-} 、 Cl^- 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} が挙げられるが、岡元らの報告⁹⁾に基づき、 Na^+ については、海水中に多量に存在し、非海塩起源イオンが少ないことから、全て海塩起源（sea salt, ss-）イオンとした。

また、残る SO_4^{2-} 、 Cl^- 、 K^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} については、同報告に基づき、海水中の Na^+ とこれらのイオンの物質比に、降水中の Na^+ の沈着量に乗じることにより、海塩起源イオンの沈着量を推定した。更に、総沈着量から海塩起源イオンの沈着量を差引き、イオンの価数を乗じて非海塩起源（non-sea salt, nss-）イオンの当量沈着量とした。

(3) トリリニアダイアグラムの作成

早狩によるMicrosoft Excelの拡張機能¹⁰⁾を利用して、2012年度から2021年度までの1か月あたりの非海塩起源イオンの当量沈着量を用いて、トリリニアダイアグラムを作成し、各調査地点の組成（プロット位置）の傾向を確認した。

トリリニアダイアグラムの作成にあたっては、花石ら⁵⁾による陽イオンの季節変動に関する報告を考慮し、4シーズン（1～3月、4～6月、7～9月、10～12月）に区分して作成した。

なお、トリリニアダイアグラムとは、地下水や温泉水等に含まれる複数のイオン成分による組成の特徴を2次元的に表現するために広く用いられているグラフである。しかし、一般的なトリリニアダイアグラムは、酸性雨調査では通常測定しない HCO_3^- の項目を含んでいる等の問題があり、利用することができない。

そのため、今回の調査では、早狩ら⁴⁾が考案した、酸性雨非海塩起源イオン分析用のトリリニアダイアグラムを利用した。このトリリニアダイアグラムは、 $\text{H}^+ + \text{nss-K}^+ + \text{nss-Mg}^{2+}$ 、 nss-SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 nss-Cl^- 、 NH_4^+ 及び nss-Ca^{2+} の6項目で構成されており、非海塩起源イオンの当量沈着量又は当量濃度を基に、非海塩起源イオンの組成を表現することができる。このトリリニアダイアグラムの例を図2に示す。

トリリニアダイアグラムは、左側の三角形に陽イオン成分、右側の三角形に陰イオン成分、中央の菱形にそれらの合計成分が配置されている。菱形のプロットの位置は、両三角形のプロットの延長線上の交点となる。

図2の左側の三角形において nss-Ca^{2+} は上の頂点

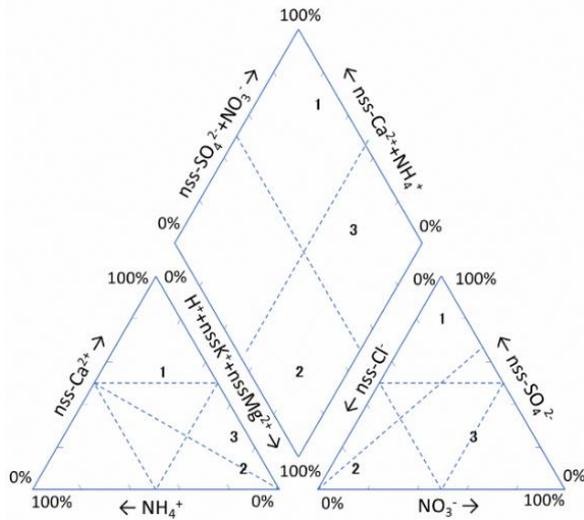


図2 トリリニアダイアグラムの例

が 100%、底辺が 0%となっており、降水試料に含まれる非海塩起源の陽イオン成分の合計を 100%としたとき、1 番は 55%、2 番は 10%、3 番は 25%の nss-Ca²⁺が含まれているということになる。

同様に、図 2 の右側の三角形において NO₃⁻は右側の頂点が 100%、底辺が 0%となっており、降水試料に含まれる非海塩起源の陰イオン成分の合計

を 100%としたとき、1 番及び 2 番は 10%、3 番は 50% の NO₃⁻が含まれているということになる。

(4) 組成比の有意差検定

トリリニアダイアグラムを構成する H⁺+nss-K⁺+nss-Mg²⁺、nss-SO₄²⁻、NO₃⁻、nss-Cl⁻、NH₄⁺及び nss-Ca²⁺の 6 項目の 1 か月あたりの組成割合を、それぞれ正規分布する 6 つの変量とみなし、調査地点間で Hotelling の T²検定を実施した。

(5) 当量沈着量の無相関検定

降水に含まれる各非海塩起源イオンの 1 か月あたりの当量沈着量について、調査地点間で単相関をとり、無相関検定を実施した。

(6) 過去 10 年間の各非海塩起源イオンの合計当量沈着量の比較

各非海塩起源イオンの 2012 年度から 2021 年度までの当量沈着量を合計し、調査地点間で比較した。

4. 結果及び考察

4.1 イオン組成比の調査地点間比較

(1) トリリニアダイアグラム上での比較

1 か月あたりの非海塩起源イオンの組成比を、図 3 のトリリニアダイアグラムにより示す。

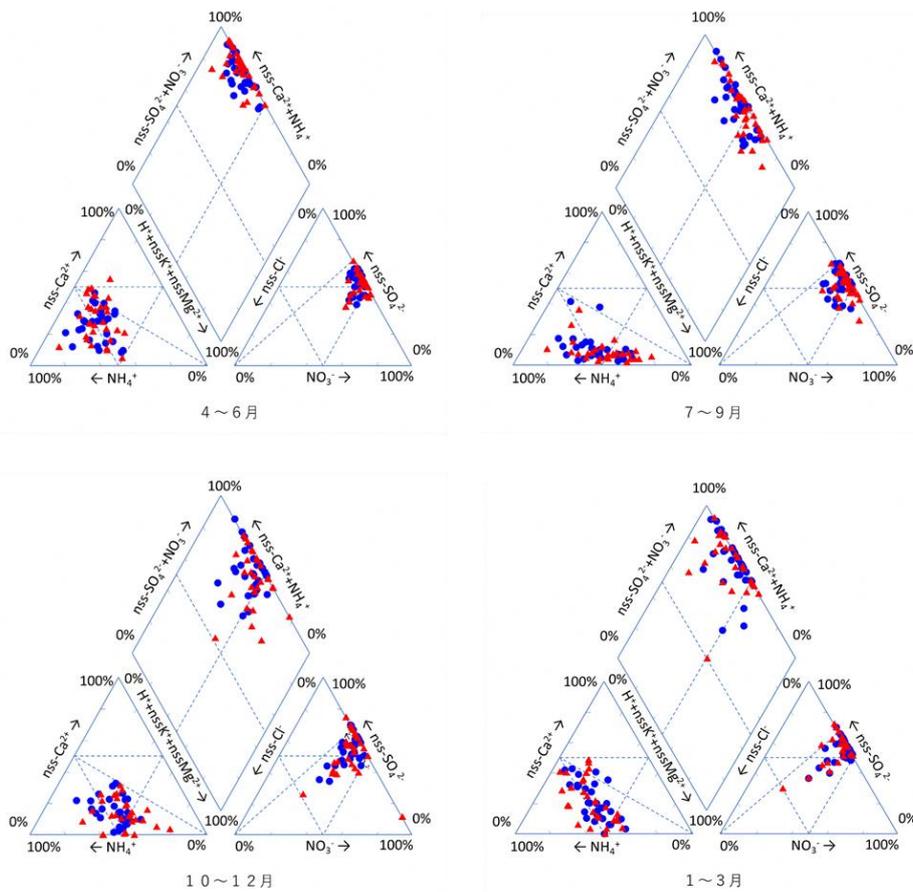


図3 非海塩起源イオンのトリリニアダイアグラム (青：青森市、赤：鱒ヶ沢町)

各シーズンにおいて、青森市と鯨ヶ沢町の組成比を示すプロットは、そのほとんどが概ね同じ範囲に分布していた。

なお、一部のプロットは、他のプロットから離れた位置となった。最も顕著にプロットが離れたのは、10～12月のトリリニアダイアグラムでNO₃⁻の割合が陰イオンの中で約89%となっている鯨ヶ沢町のプロットである。

当該プロットの月の各イオンの当量沈着量について確認したところ、海塩起源イオンの含有割合が高く、海塩起源イオン全体の当量沈着量が非海塩起源イオンの98倍にも及んだ。この倍率は、解析に使用した全236データの中で最も高く、他のデータの倍率(青森市:0.09～16倍、鯨ヶ沢町0.13～34倍)やその平均値(青森市:4倍、鯨ヶ沢町:8倍、全体:6倍)よりも遥かに高い倍率であった。

他に、10～12月及び1～3月のトリリニアダイアグラムにおいて、nss-Cl⁻の割合が約48～49%となっている鯨ヶ沢町のプロットについても同様に調べたところ、海塩起源イオン全体の当量沈着量が非海塩起源イオンの16～18倍となっており、他のデータよりも比較的高い倍率であった。

このことは、海塩起源イオンの当量沈着量自体が持つ誤差が大きく、海塩起源イオンの当量沈着量よりも遥かに微量の非海塩起源イオンの当量沈着量を算出する上で、支障が生じたからであると考えられた。

最も顕著にプロット位置が他から離れた10～12月の鯨ヶ沢町のプロットを例とすると、Na⁺の当量沈着量を基に算出したss-SO₄²⁻やss-Cl⁻の推定量が過大評価され、SO₄²⁻やCl⁻の当量沈着量からss-SO₄²⁻やss-Cl⁻の分を差し引いてnss-SO₄²⁻やnss-Cl⁻の当量沈着量を算出したところ、限りなく0に近い値となってしまう可能性がある。

海塩起源イオンの割合が著しく高い場合に、非海塩起源イオンの量や濃度の推定に影響を及ぼす懸念を考慮すると、非海塩起源イオンに含まれる人為起源イオンについて検討する上では、海塩起源イオンの割合が比較的高い鯨ヶ沢町よりも青森市の方が適していると考えられる。

(2) Hotelling のT²検定による比較

非海塩起源イオンの組成比について、調査地点間で有意差があるか検討するため、Hotelling のT²検定を実施した結果を表1に示す。

検定の結果、非海塩起源イオンの組成比について、5%有意水準で、調査地点間で有意差がないことが示された。

表1 Hotelling のT²検定の結果

期間	検定結果	(参考) p値
全体	有意差がない	0.69
4～6月	有意差がない	0.46
7～9月	有意差がない	0.13
10～12月	有意差がない	0.70
1～3月	有意差がない	0.57

n = 236/年 n = 59/シーズン

なお、Hotelling のT²検定は、通常、データを表現する変数が多くなることから、t検定よりもデータの分布のばらつきが大きくなりやすく、通常は、「有意差がある」という検定結果となることが多い。

しかし、今回の検定では、トリリニアダイアグラムで離れてしまったプロットを検定のデータに含めたにもかかわらず、p値(F₀ = F(p, n + h - 1 - p, a))となる有意水準の設定値)は、表1に示すとおり高い値となった。

このことから、海水飛沫の影響を除いた場合、両調査地点の降水は、イオンバランスの観点から、概ね類似の特徴を持つことが示唆された。

4.2 当量沈着量の調査地点間比較

(1) 経時変化における比較

非海塩起源イオンの当量沈着量の経時変化を図4に示す。青森市と鯨ヶ沢町は、概ね同じ傾向で非海塩起源イオン当量沈着量の変動していた。

なお、nss-Mg²⁺の当量沈着量については、2014年12月の鯨ヶ沢町のみ極端に高い値となった。当該月の各イオンの当量沈着量について確認したところ、海塩起源イオン全体の当量沈着量が非海塩起源イオンの18倍となっており、他のデータよりも比較的高い倍率だった。そのため、4.1(1)でも考察したとおり、海塩起源イオンの当量沈着量自体が持つ誤差が、nss-Mg²⁺の算出に支障を与えた懸念がある。

(2) 相関図による比較

青森市と鯨ヶ沢町が、概ね同じ傾向で非海塩起源イオン当量沈着量の変動していたことから、単相関をとったところ、図5に示すとおりとなり、正の相関があることが示唆された。

なお、nss-Mg²⁺の相関図で1点だけ外れているプロットは、2014年12月のものであり、このプロットを除外した場合のR²値は0.64まで上昇する。

(3) 無相関検定による相関の検討

各非海塩起源イオンの当量沈着量について、エクセル関数から算出した相関係数を用いて、調査地点

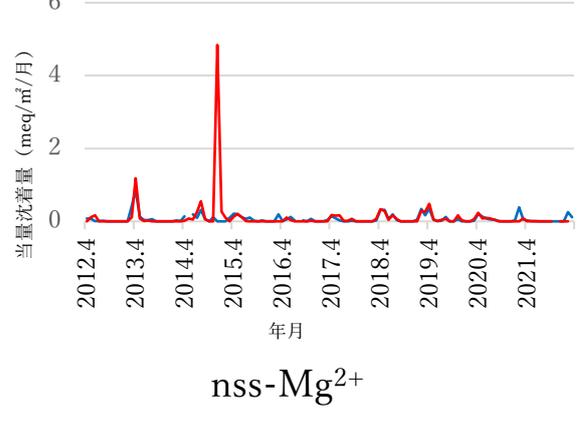
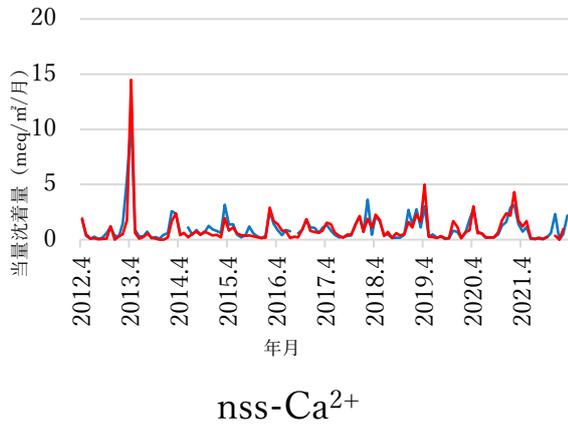
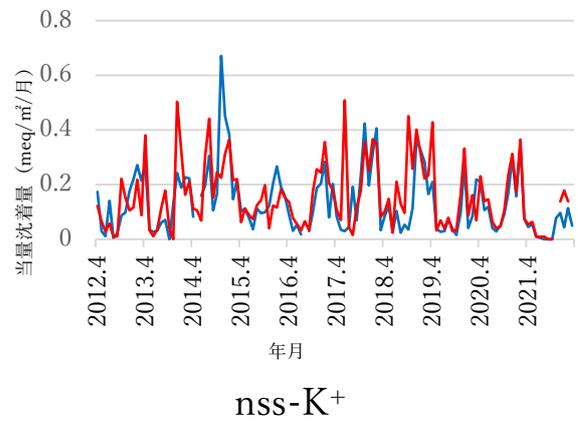
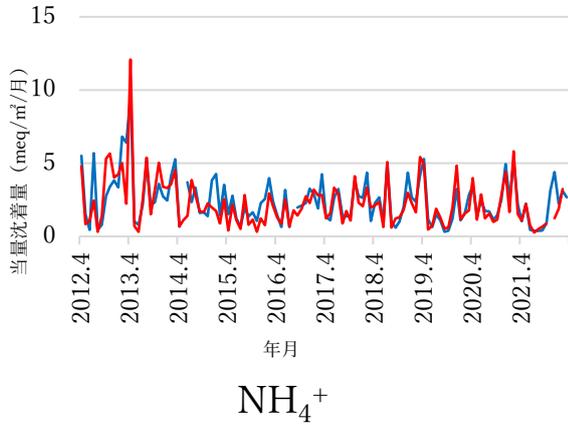
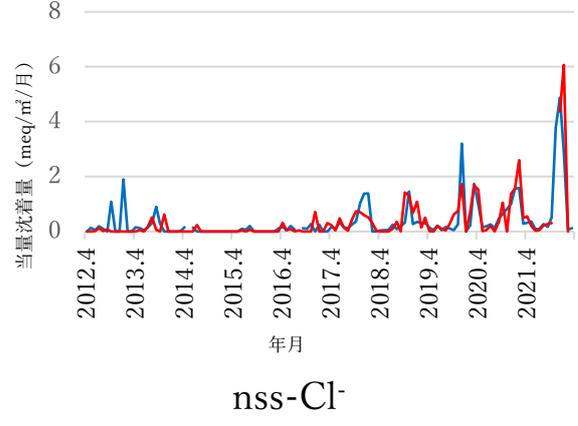
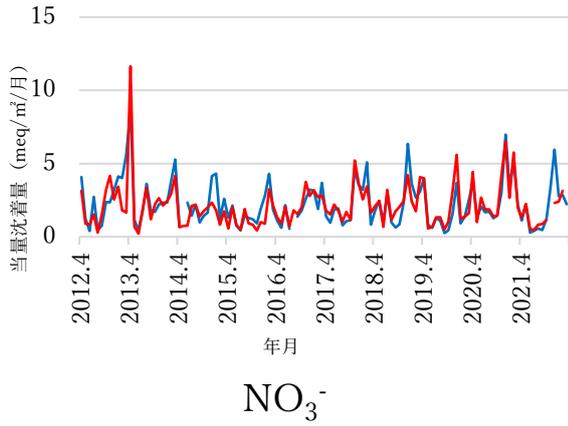
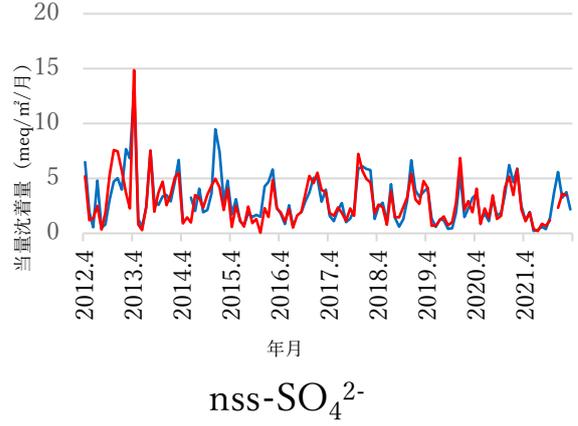
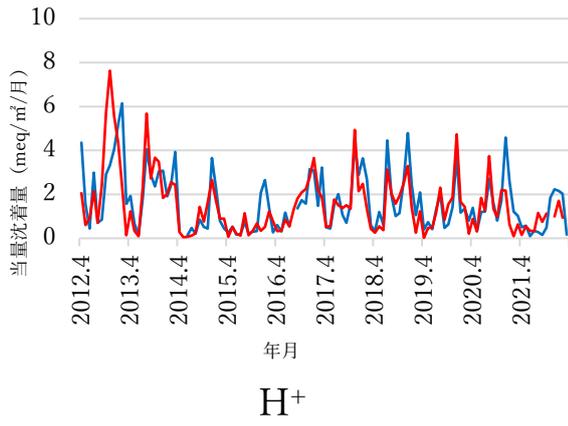


図4 非海塩起源イオンの当量沈着量 (青：青森市、赤：鱒ヶ沢町)

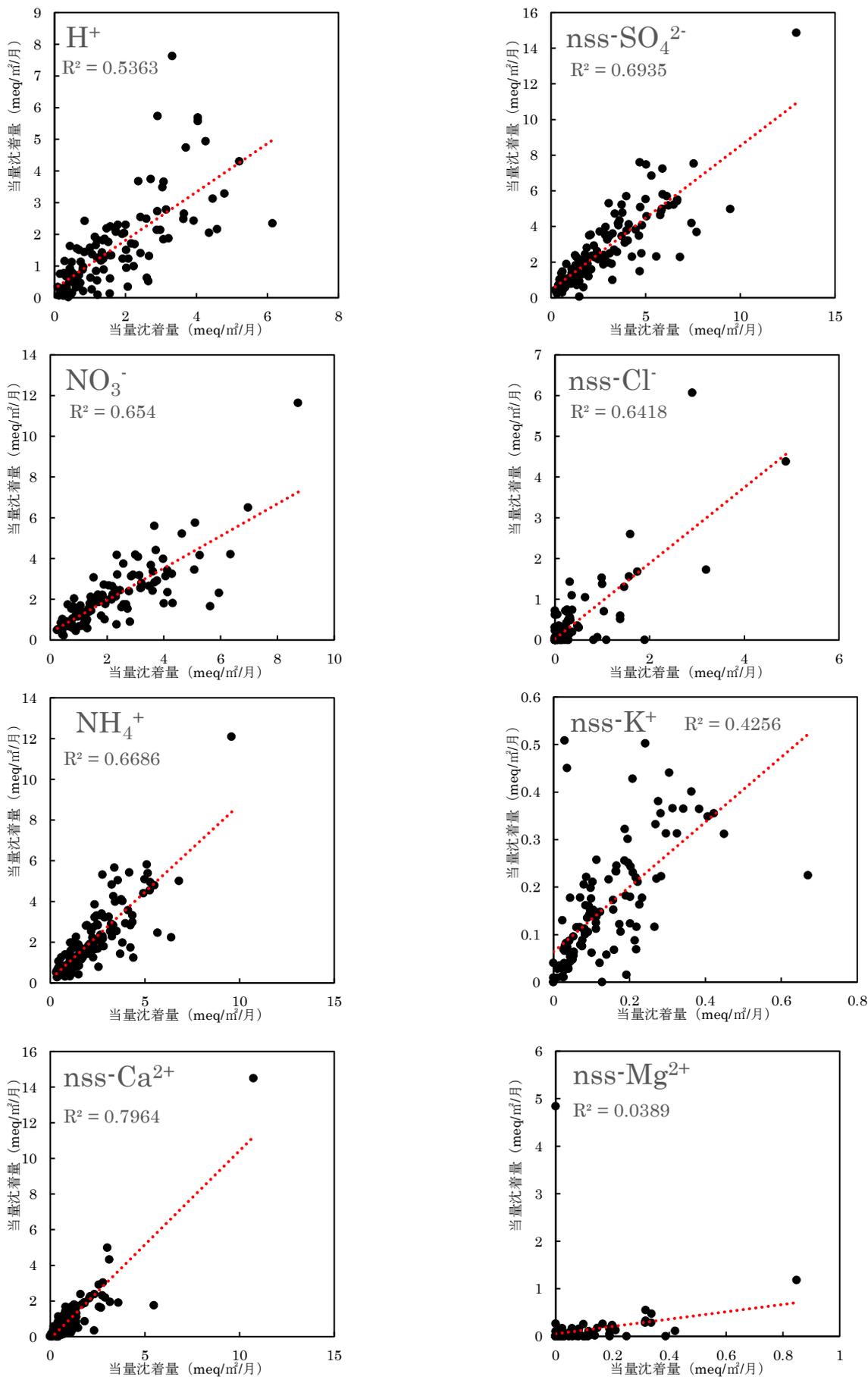


図5 非海塩起源イオンの当量沈着量の相関図 (横軸：青森市、縦軸：鮎ヶ沢町、赤点線：回帰直線)

間で無相関検定を実施した結果を表2に示す。

表2 無相関検定の結果

イオン	検定結果	(参考) 相関係数
H ⁺	正の相関あり**	0.73
nss-SO ₄ ²⁻	正の相関あり**	0.83
NO ₃ ⁻	正の相関あり**	0.81
nss-Cl ⁻	正の相関あり**	0.80
NH ₄ ⁺	正の相関あり**	0.82
nss-K ⁺	正の相関あり**	0.65
nss-Ca ²⁺	正の相関あり**	0.89
nss-Mg ²⁺	正の相関あり*	0.20

** p < 0.01 * p < 0.05 n=116

検定の結果、全ての各非海塩起源イオンについて5%有意水準で青森市と鯺ヶ沢町の試料の母集団には正の相関があること示された。

特に nss-Mg²⁺を除く非海塩起源イオンについては、1%有意水準としても帰無仮説が棄却され、正の相関があることが示された。

このことから、両調査地点の非海塩起源イオンの組成比に有意差がないことを含めて考慮すると、調査地点の季節的な降水量の違いなどによる当量沈着量の変動への影響は低いことが示唆された。

なお、nss-Mg²⁺の相関係数が低いにも関わらず、無相関検定により正の相関があると示されたが、これは、試料数が多いためであり、今回の相関係数の場合は、100試料以上でこの結果が導き出されることを確認した。

(4) 過去10年間の非海塩起源イオンの合計当量沈着量による比較

過去10年間の非海塩起源イオンの合計当量沈着量と調査地点間比を表3に示す。

表3 合計当量沈着量

イオン	青森市 (meq/m ²)	鯺ヶ沢町 (meq/m ²)	調査地点 間比 (%)
H ⁺	191	179	107
nss-SO ₄ ²⁻	359	339	106
NO ₃ ⁻	263	249	106
nss-Cl ⁻	44	41	109
NH ₄ ⁺	286	264	109
nss-K ⁺	16	18	86
nss-Ca ²⁺	120	112	108
nss-Mg ²⁺	7.8	12	64

調査地点間比：青森市/鯺ヶ沢町×100
過去10年間の非海塩起源イオンの当量沈着量の

合計値は、nss-Mg²⁺を除く非海塩起源イオンにおいて、概ね同程度であった。

このことから、過去10年間で降水中の人為的な寄与である非海塩起源イオンが与えた環境負荷は、青森市と鯺ヶ沢町で概ね同程度だったことが示唆された。

なお、2014年12月のデータを除くと、nss-Mg²⁺の当量沈着量の合計値は、青森市が7.8 meq/m²、鯺ヶ沢町が7.3 meq/m²となり、同程度になる。

5. 結論

1) トリリニアダイアグラムのプロットにより、青森市及び鯺ヶ沢町の非海塩起源イオンの組成比は、視覚的に、各シーズンにおいて同程度であることが示された。

また、HotellingのT²検定により、非海塩起源イオンの組成比は、青森市と鯺ヶ沢町で有意差がないことが統計的に示された。

これらのことから、海水飛沫の影響を除いた場合、両調査地点の降水は、イオンバランスの観点から、概ね類似した特徴を持つことが示唆された

2) 無相関検定により、青森市と鯺ヶ沢町の各非海塩起源の当量沈着量の変動には正の相関があることが統計的に示された。

このことから、調査地点の季節的な降水量の違いなどによる当量沈着量の変動への影響は低いことが示唆された。

3) 過去10年間の非海塩起源イオンの合計当量沈着量は、青森市と鯺ヶ沢町でそれぞれ同程度だったことが示された。

このことから、過去10年間で降水が与えた環境負荷は、両調査地点で概ね同程度だったことが示唆された。

4) 非海塩起源の算出に支障が生じた可能性を持つ試料が散見された。非海塩起源イオンに含まれる人為起源イオンについて検討する上では、海塩起源イオンの割合が比較的多い鯺ヶ沢町よりも青森市の方が適していることが示唆された。

文 献

- 1) 気象庁 | 酸性雨の知識
<https://www.data.jma.go.jp/gmd/env/acid/>
(2022年12月1日アクセス可能)
- 2) 国立環境研究所地球環境研究センター | 全国酸性雨データベース
<https://db.cger.nies.go.jp/dataset/acidrain/ja/index.html>
(2022年12月1日アクセス可能)

- 3) 早狩敏男ほか: 青森県南部における雨水 (酸性雨) の実態調査. 青森県公害センター所報, **6**, 90-94, 1983.
- 4) 早狩進: 酸性雨解析におけるイオン組成の表現方法の検討—トリリニア・ダイアグラムの応用—. 青森県環境保健センター研究報告, **6**, 59-64, 1995.
- 5) 花石竜治ほか: 青森県における酸性雨のイオン組成解析. 青森県環境保健センター年報, **32**, 62-68, 2021.
- 6) C. R. Rao: *Linar Statistical Inference and Its Applications*. John Wiley & Sons, Inc., 1973. (奥野忠一ほか (訳): 統計的推測とその応用. 東京出版, 1977.)
- 7) 藤森利美: 分析技術者のための統計的方法. 社団法人日本環境測定分析協会, 1995.
- 8) 環境省「湿性沈着モニタリング手引き書」(第2版) (平成 13 年 3 月) .
- 9) 岡元満美ほか: 酸性雨中の海塩起源イオンに関する研究. 日本海水学会誌, **53**, 364-372, 1999.
- 10) Excel アドイン工房「早狩」
<http://www7b.biglobe.ne.jp/~hayakari/index.html>
(2022 年 12 月 1 日アクセス可能)

Comparison of ionic composition and equivalent deposition of acid rain in Aomori Prefecture at investigation sites

Motoko Bodaiji, Ryuji Hanaishi, Taketo Jin

Two investigation sites for acid rain (wet deposition) in Aomori Prefecture, Aomori city and Ajigasawa town, are close to the coast and the precipitation contains a large amount of sea salt ions. In order to investigate the differences in composition ratio of non-sea salt ions in precipitation between these investigation sites, a comparison of the composition ratio of non-sea salt ions in precipitation collected from fiscal year 2012 to 2021 was performed using tri-linear diagram and Hotelling's T-squared test was also performed. In addition, for equivalent deposition of non-sea salt ions, tests for non-correlation and comparisons of the total amount were performed.

The results showed that, across investigation sites, [1] the composition ratio of non-sea salt ions was similar in each season and there were no significant differences, [2] there was a positive correlation between the variation of equivalent deposition amount of non-sea salt ions, and [3] the total equivalent deposition amount of non-sea salt ions is suggested to be similar in the past 10 years.

This research study suggested that precipitation at the two sites displayed similar characteristics from the perspective of ion balance when the effect of sea salt ions was excluded, and the environmental load was similar.

Key words: Acid rain, Non-sea salt, Tri-linear diagram, Hotelling's T-squared test, Test of no correlation

2 ノ ー ト

青森県近海におけるホタテガイ及び魚類中の PAH4 測定結果

五十嵐飛鳥 岩館樹里 山本明美

対 EU 輸出用ホタテガイ中の環境汚染物質の検査として、2008 年度からベンゾ [a] ピレンの検査を実施してきたが、2020 年度からはベンゾ [a] ピレンに加えてベンゾ [a] アントラセン、ベンゾ [b] フルオランテン、クリセンの 4 種類の多環芳香族炭化水素 (PAH4) の検査を実施している。日本では食品中のベンゾ [a] ピレンの基準値は設定されておらず、実態調査例もほとんど見られないが、EU、中国や韓国では一部の食品に基準値が設定されており、韓国では魚類に対しても基準値が設定されている。

そこで、2008 年度からの対 EU 輸出用ホタテガイ検査結果のとりまとめ及び青森県近海における魚類中の PAH4 の実態調査を実施し、これらについて報告するものである。

Key words : Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), BaP, PAH4, EU

1. はじめに

多環芳香族炭化水素 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons : PAHs) は、主に石炭や石油などの化石燃料に含まれている物質であるが、排気ガスやゴミの燃焼、石油流出によっても生成することが知られている。このため、大気汚染や海洋汚染等の環境汚染の指標ともされている。PAHs の仲間としては、ベンゾ [a] ピレン (BaP) が最もよく知られている。

PAHs は急性毒性がそれほど強くなく、ヒトが摂取する量もあまり多くないことから、日本では基準値が設けられていないが、BaP は国際がん研究機関 (IRAC) による発がん性評価においてグループ 1 (ヒトに対して発がん性がある) と評価されており、他の PAHs も発がんの可能性が示唆²⁾されている。そのため、EU や中国、韓国などでは基準値が設けられている^{1) 3)}。

食品では、食品の加工 (直火加熱、燻製)、調理 (特に肉や魚が直接火と接触するような調理) の過程や、環境由来の汚染により意図せずに食品に含まれ⁴⁾、欧州では鰹節や燻製チーズ、燻製魚から BaP 以外にもベンゾ [a] アントラセン (BaA)、ベンゾ [b] フルオランテン (BbF)、クリセン (CHR) 等が検出されたことが報告されている⁵⁾。また、中国や韓国では一部の食品に BaP の基準値が設けられており、韓国の魚類に対する BaP の基準値は 2.0 µg/kg^{1) 4)} である。EU では従来、BaP のみの基準値

が設けられていたが、現在は BaP 単独の他、BaP、BaA、BbF 及び CHR の総量の 2 種で基準値が設けられている。EU の基準値³⁾を表 1 に示す。

表 1 EU における食品の基準値* (µg/kg)

	食品名	BaP	PAH4 総量
1	食用油脂	2.0	10.0
2	カカオ豆及びその加工食品 (脂肪あたり)	5.0	30.0
3	ココナッツ油	2.0	20.0
4	畜肉の燻製及びその加工品	2.0	12.0
5	魚介類の燻製及びその加工品	2.0	12.0
6	燻製スラット及び缶詰の燻製スラット、 二枚貝、加熱処理肉及びその加工品	5.0	30.0
7	二枚貝 (燻製)	6.0	35.0
8	乳幼児向け加工穀類食品	1.0	1.0
9	乳児向け調製乳及びフォローオン調製乳	1.0	1.0

※2015 年 4 月 1 日以降の基準値

ホタテガイを EU に輸出するためには EU の基準に適合していなければならない。そのため、青森県では 2008 年から「対 EU 輸出水産食品の取扱要領⁶⁾」に従い、EU モニタリング検査としてホタテガイ中の BaP の検査を実施してきた。しかし、前述のとおり、EU は BaP 単独の他、BaP、BaA、BbF 及び CHR の総量についても 2012 年 9 月から基準値を新たに設定³⁾した。

日本では2020年に「EU向け輸出二枚貝の海域指定及び海域モニタリングの手続等の見直しについて」(令和元年12月17日付薬生食監発1217第4号、元消安第4014号、元水漁第1182号)により総合的な見直しが行われ、この際に、これら4つの多環芳香族炭化水素(以下「PAH4」)の検査が必要とした。これを受けて青森県も2020年度から対EU輸出ホタテガイについてPAH4検査を実施することとなった。この際、採捕地点及び採捕回数についても見直されたため、2008年度から2019年度までは年に2回、4地点6検体でBaPのみの検査を実施してきたが、2020年度からは年1回、1地点1検体について、PAH4の検査を実施している。

この検査においてBaPは2008年度の開始時から2017年度の2検体(0.0006 µg/g)を除いては定量下限未満であったが、2020年度から開始したPAH4の調査では2022年度までの3年間の検査結果において、BbFのみすべて有意に検出されており、加工食品以外であってもPAHsが有意に検出される食品があることが示唆された。

また、韓国では魚類に対しBaPの基準値を設けていることもあり、ホタテガイ以外の魚類についても現在の含有状況を把握することを目的として、2022年度に青森県近海で採取された魚類中のPAH4の実態調査を実施した。

今回、過去からの対EUモニタリング検査におけるホタテガイの検査結果及び今年度の魚類中のPAH4の調査結果を取りまとめたので報告する。

2. 検査の概要

2.1 試料

試料は、青森県近海で捕獲された魚を対象とし、採取地点が明記されていた市販の魚(表2)を12検体用いた。検査部位は頭と内臓を除去した可食部のみ(皮は含む)とし、捌いた後にフードプロセッサで細切したものを供試料とした。

なお、ホタテガイはEUの試験法に従い、中腸線等を除去した筋肉部及び生殖巣を対象とした。

2.2 試薬等

(1) PAH4 混合標準溶液の調製及び検量線の作成

標準品は富士フィルム和光純薬株式会社の環境分析用BaP、BaA、BbF、CHR標準品を用いた。

標準品をそれぞれ別の50 mL全量フラスコに25.0 gを精密に量り取り、アセトニトリルを加えて溶かし、50.0 mLとした。(各500 µg/mL)

この溶液を各1.0 mL取り、アセトニトリルで正確に50.0 mLとした(各成分10 µg/mL)。これを混

表2 分析対象

	試料名	捕獲場所
1	マダイ	外ヶ浜
2	ササギ	外ヶ浜
3	ほっけ	深浦
4	ヒラメ	陸奥湾
5	ニシン	深浦
6	マス	外ヶ浜(平館)
7	ミズカサ	外ヶ浜(平館)
8	イワシ	青森・北海道
9	黒メバル	中泊(小泊)
10	サバ	外ヶ浜(平館)
11	アジ	深浦
12	赤メバル	中泊(小泊)

合標準溶液とし、アセトニトリルで段階希釈することにより、0.005~0.1 µg/mLの範囲の検量線用標準溶液を調製した。

得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法にて定量した。

(2) 試薬等

試薬は、アセトニトリルは液体クロマトグラフ用、n-ヘキサン、エタノール及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用、水酸化カリウムは特級を用いた。

シリカゲルカラムはWaters製のSep-Pak Plus Silica Cartridge(690 mg / 1.6 mL)を使用した。

(3) 装置及び測定条件

測定は島津製作所製高速液体クロマトグラフLC-20Aを使用した。測定条件は表3のとおりである。

表3 HPLC 測定条件

分析カラム	Develosil PAHS-5(野村化学(株)製) 内径 4.0mm×150mm, 5 µm	
カラム温度	30 °C	
流速・注入量	1.0 mL/min・10 µL	
検出器	蛍光検出器	
測定波長	BaA, CHR 励起 270 nm, 蛍光 400 nm	
	BbF 励起 256 nm, 蛍光 446 nm	
	BaP 励起 384 nm, 蛍光 406 nm	
移動相	A : アセトニトリル/水=70/30 B : アセトニトリル	
グラジエント条件		
時間(分)	%A	%B
0.00	90	10
5.00	90	10
15.00	10	90
22.00	10	90

2.3 分析方法

分析操作は「衛生試験法・注解 2015 2.4.2 有機化合物 (ベンゾ [a] ピレン)」を一部変更した方法により、図 1 のフロー図のとおり実施した。

アルカリ加熱分解後、ヘキサンで抽出し、シリカゲルミニカラムで精製した。

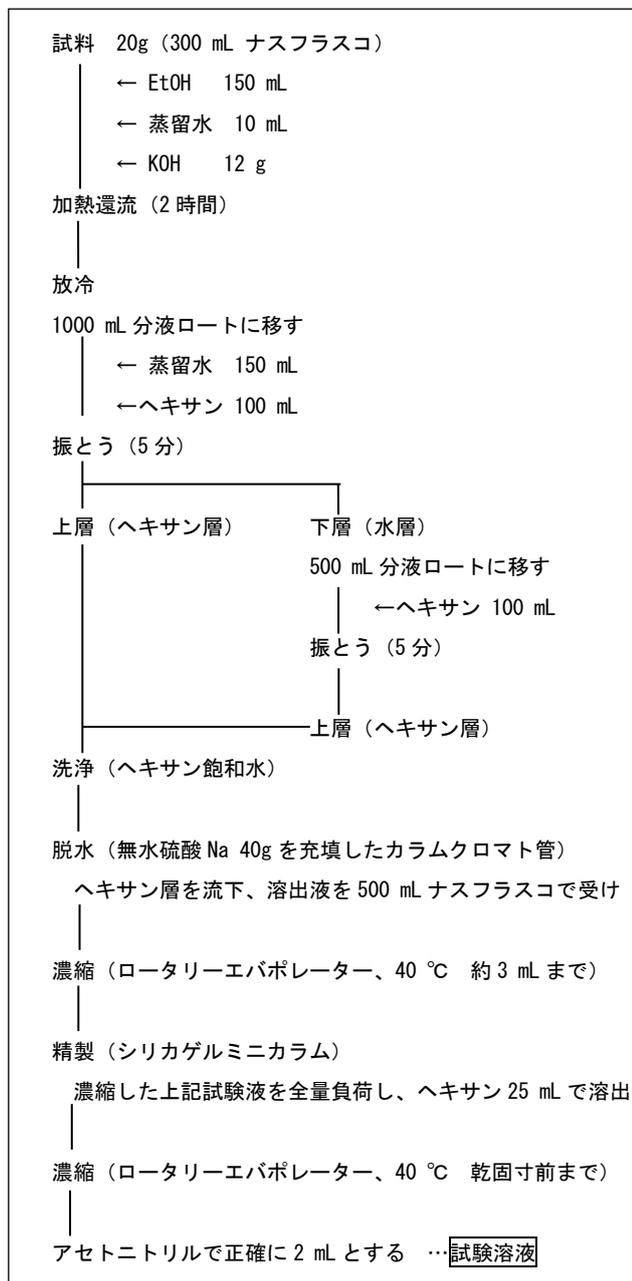


図 1 試験溶液調製方法

2.4 添加回収試験

添加回収試験は、試料の中の赤メバルに可食部中 0.005 µg/g (試験溶液として 0.05 µg/mL) になる

よう、PAH4 混合標準液を添加したものについて実施した。

3. 結果と考察

3.1 魚類中 PAH4 濃度

2022 年度に実施した青森県近海で捕獲された魚類 12 検体からは PAH4 はいずれも検出されなかった。(<0.0005 µg/g)

なお、添加回収試験の結果は、PAH4 の各項目とも 94.0%と良好であった。

3.2 ホタテガイ中 PAH4 及び BaP 濃度

同様の検査方法で、2016 年に実施した 12 検体の結果及び 2020 年度から 2022 年度に実施した対 EU モニタリング検査におけるホタテガイ中の PAH4 の測定結果は表 4、5 のとおりであった。

表 4 ホタテガイ中 PAH4 測定結果 (2016 年度)

(単位 : µg/g)

地点・月\項目	BaP	BaA	BbF	CHR	
野 籠	6	N. D.	N. D.	0.0006	0.0005
	11	N. D.	N. D.	0.0014	0.0006
辺 耳吊	6	N. D.	N. D.	0.0005	N. D.
	11	N. D.	N. D.	0.0015	0.0006
平 籠	6	N. D.	N. D.	0.0006	N. D.
	11	N. D.	N. D.	0.0016	0.0006
内 耳吊	6	N. D.	N. D.	0.0005	N. D.
	11	N. D.	N. D.	0.0020	0.0006
む 籠	6	N. D.	N. D.	0.0006	N. D.
	11	N. D.	N. D.	0.0021	0.0007
川 籠	6	N. D.	N. D.	0.0008	N. D.
	11	N. D.	N. D.	0.0021	0.0008

※N. D. は定量下限未満 (<0.0005 µg/g)

表 5 ホタテガイ中 PAH4 測定結果 (1 地点)

(単位 : µg/g)

年度\項目	BaP	BaA	BbF	CHR
2020	N. D.	N. D.	0.0023	0.0008
2021	N. D.	N. D.	0.0010	N. D.
2022	N. D.	N. D.	0.0009	N. D.

※N. D. は定量下限未満 (<0.0005 µg/g)

参考として、PAH4 及びホタテガイ (添加・無添加) のクロマトグラムを図 2 に示した。

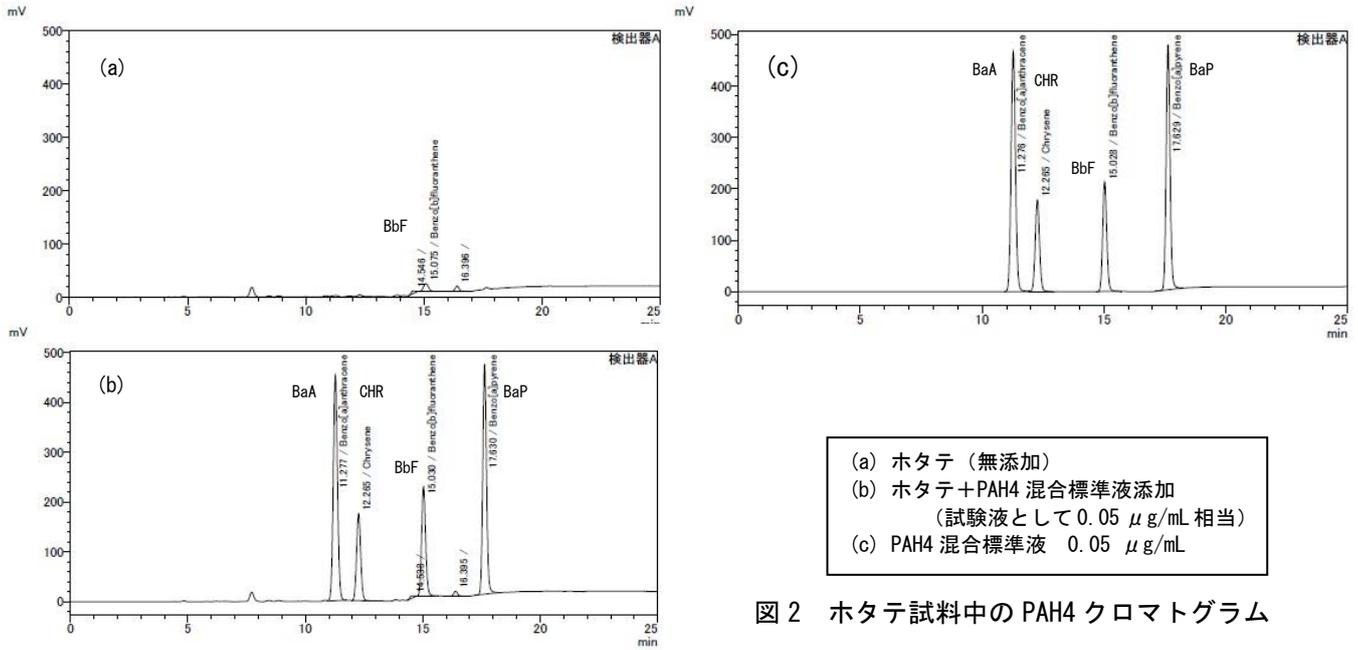


図 2 ホタテ試料中の PAH4 クロマトグラム

2008年度から2019年度に実施した検査におけるホタテガイ中 BaP は 2017 年度の 2 検体 (0.0006 $\mu\text{g/g}$) を除いては検出されておらず、同様に 2020 年度からの検査 (表 5) においてもすべて定量下限未満であった (定量下限:2014 年までは 0.001 $\mu\text{g/g}$ 、それ以降は 0.0005 $\mu\text{g/g}$)。一方、新たに検査を開始した BaP 以外の項目では、BbF が 0.0009 ~ 0.0023 $\mu\text{g/g}$ 、CHR が 0.0008 $\mu\text{g/g}$ 検出された。BaA はいずれの検体においても検出されなかった。

なお、2016 年度に同ホタテガイ中の PAH4 について測定した結果 (表 4) では、BbF が 12 検体中 12 検体から 0.0005~0.0021 $\mu\text{g/g}$ 検出され、CHR が 12 検体中 7 検体から 0.0005~0.0008 $\mu\text{g/g}$ 検出されており、2020 年度から 2022 年度の検査結果と同様の傾向を示していた。

4. まとめ

ホタテガイ中の PAH4 は BbF 及び CHR が有意に検出される傾向があったが、今年度実施した青森県近海で捕獲された魚類 12 検体の可食部からは PAH4 はいずれの項目も検出されなかった。

欧州食品安全機関 (EFSA) が EU 加盟 18 ヶ国からのデータを評価した結果⁵⁾において、鮮魚中の PAH4 濃度は 0.08 ~ 0.48 $\mu\text{g/kg}$ と非常に低い値に対し、二枚貝では 10.68 $\mu\text{g/kg}$ ~ 10.75 $\mu\text{g/kg}$ であったと報告されている。

今回の結果はこの傾向と同様であった。なお、

ホタテガイ中の測定結果は欧州の二枚貝の測定値⁵⁾より十分低い濃度であり、ホタテガイからの検出は環境の汚染によるものではないことが示唆された。また、今回実施した青森県近海の魚類にも PAH4 の汚染がないことが確認された。

文 献

- 1) 内閣府食品安全委員会：食品に含まれる多環芳香族炭化水素 (PAHs) ファクトシート (平成 24 年 6 月 14 日作成)
- 2) JERL ニュース, Vol.4 No.30 Feb.2014
- 3) 欧州委員会 (EU) : COMMISSION REGULATION (EU), No835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EU) No1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs
- 4) 農林水産省：有害化学物質含有実態調査結果データ集 (平成 25~26 年度)
- 5) 欧州食品安全機関(EFSA) : Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food¹ Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, *The EFSA Journal*(2008) 724, 1-114
- 6) 厚生労働省・農林水産省・水産庁：「EU 向け輸出二枚貝の海域指定及び海域モニタリングの手続等の見直しについて」(令和元年 12 月 17 日付薬生食監発 1217 第 4 号、元消安第 4014 号、元水漁第 1182 号)

フグ毒（テトロドトキシン）による食中毒事例紹介 —LC-MS/MS による試験法の構築—

田中綾乃 山本明美

令和 4 年度、県内でフグ毒(テトロドトキシン。以下「TTX」と言う。)による食中毒事案が発生した。患者はフグの肝臓を喫食しており、残品である筋肉、皮及びヒレが確認検査のため当所へ搬入された。前年度構築した、LC-MS/MS による麻痺性貝毒及びテトロドトキシンの一斉分析法の一部を変更した方法にて検査を実施したところ、皮及びヒレから「弱毒」から「強毒」に相当する毒量の TTX が検出され、特に背側の黒色の部位が高い傾向にあった。今回、残置食品を対象とした、マウス毒性試験法に代わる LC-MS/MS を用いた迅速な試験法を構築したので、標準作業書を整備し今後の食中毒事案への迅速な対応に備える。

Key words : pufferfish, tetrodotoxin, food poisoning, LC-MS/MS

1. はじめに

日本では、古くからフグを食べる文化が根付いている一方で、毎年全国で 30 件程度のフグ毒による食中毒が発生している。中毒症状としては、食後 20 分から 3 時間程度の短時間でしびれや麻痺症状が現れ、重症の場合には呼吸困難で死亡することもあり、日本で起こる食中毒死亡者の過半数を占めている¹⁾。このフグ食中毒の主な原因物質である TTX は通常の加熱では壊れず、人の致死量は約 1~2 mg とされ、その強さは青酸カリの 1,000 倍とも言われている^{2,3)}。

フグ毒の検査について、「食品衛生検査指針(理化学編)」⁴⁾には、フグの抽出液をマウスの腹腔内に投与し、致死時間から毒力を量る「マウス毒性試験法」が「参考法」として示されている。この試験法は、毒性を評価する確実な方法であるが、常時対応可能な検査体制を確保するにはマウスの常備が必要であることに加え、動物実験に伴う倫理上の問題やマウス個体差等に由来する分析精度の問題がある。このため、近年、迅速で、高感度かつ高選択性を有する LC-MS/MS を用いた試験法が多く報告されている。

そこで、今年度県内で発生したフグ毒食中毒事案への対応に際し、当所において LC-MS/MS を用いた検査法を構築したので、食中毒事案の紹介と

ともに検査の概要について報告する。

2. 食中毒事案の概要

2022 年 9 月 18 日、県内の A 保健所管内の 70 代男性が自分で調理したフグの肝臓を食べ、その約一時間後にふらつきや言葉のもたつき等の症状が現れ、その後受診した病院で呼吸困難、意識不明となった。患者の臨床症状及び喫食状況から、医師はフグによる食中毒と断定し、9 月 21 日に保健所へ届け出があり、同日、確認検査のため当所へフグの残品が搬入された。

フグは基本的に食べてはいけないものとされ、有毒部位を除去していない釣ったままのフグをそのまま店で販売することは食品衛生法違反となる。そのため、昭和 58 年に発出された厚生労働省の通知「フグの衛生確保について」(環乳第 59 号)⁵⁾では、肝臓や卵巣をはじめ内臓はすべてのフグにおいて食用を禁止した上で、「処理等により人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類及び部位」(以下「別表 1」と言う。)を定め、食用可能なフグの種類と部位を明文化している。

このように、毒の強さは、フグの種類、産地、季節によって異なり、また、同一海域で同時期に捕獲された同一種においても、無毒に近いものから猛毒の個体までその毒性は著しい個体差を示す。また、近年、フグの異種交配により有毒部位が不

明な「雑種フグ」も増加しており^{6,7)}、食中毒を防ぐためには、フグ毒に関する十分な知識と、それに基づく適切な処理が必要とされる。

今回の食中毒事案では、保健所による調査の結果、患者が喫食したのは「マフグ」の肝臓と推定されたが、別表 1 によると「マフグ」で可食部位とされているのは筋肉及び精巢のみである。

3. 検査の概要

3.1 試料

実際に喫食した肝臓は採取できず、残置食品が検体 1(フグの筋肉)、検体 2(フグの皮及びヒレ)として計 2 検体、それぞれ袋にひとまとめになった冷凍状態で搬入された。流水解凍後、各袋ごとにトレイ上で中身を広げて確認したところ、検体 1 の袋には腹膜が付いた状態の三枚おろし後の身 2 枚、検体 2 の袋には半身分の皮 2 枚及びヒレ 5 枚が入っており、その量は合わせて一匹分に相当するものとなっている。

ピークの検出確認用試料として、フグは入手困難であったため、鯛の刺身を筋肉の代用として使用した。

3.2 試料の前処理

(1) 筋肉

解凍により生じた袋に溜まっていたドロップ(検体番号:1-1)、身から剥がした腹膜(1-2)、身については場所によって毒の有無が異なる可能性も考え、2 枚からそれぞれ頭側(1-3)、中央部(1-4)、尾側(1-5)を切り取って合わせたものの 3 つに、計 5 つに細分化した。

(2) 皮及びヒレ

ヒレについては、大きさによる組み合わせで尾ビレ(2-1)、ヒレ中(尻ビレ+背ビレ)(2-2)、ヒレ小(胸ビレ 2 枚)(2-3)の 3 つに、皮については、2 枚からそれぞれ頭側(2-4)と尾側(2-5)、中央部は黒色の背側(2-6)と白色の腹側(2-7)の 4 つに、計 7 つに細分化した。

以上のように、それぞれ切り分けた試料について、筋肉は、ハサミで細切化後に乳鉢ですりつぶしたものを、皮及びヒレは、ハサミで細切化したものを検査に用いた。

3.3 試験溶液の調製

操作の詳細は図 1 に示すとおり、各試料ごとに 2.0 g ずつ採取し、0.1 %酢酸で抽出、希釈及び精製して得られた試料溶液を LC-MS/MS で測定した。TTX は弱酸性溶液中で安定することから、0.1 %酢酸で抽出した。また、皮及びヒレの場合は、含ま

れるゼラチン質等の影響によりゲル化しやすいことから^{8,9)}、とろみが残らない程度まで 0.1 %酢酸で希釈した。最終試験溶液は、LC-MS/MS での測定直前に調製し、0.25 %酢酸含有 80 %アセトニトリルで希釈した。その際に白濁した場合は、10 mL に定容した抽出液を 0.1 %酢酸で追加希釈した後、0.25 %酢酸含有 80 %アセトニトリルで希釈した。

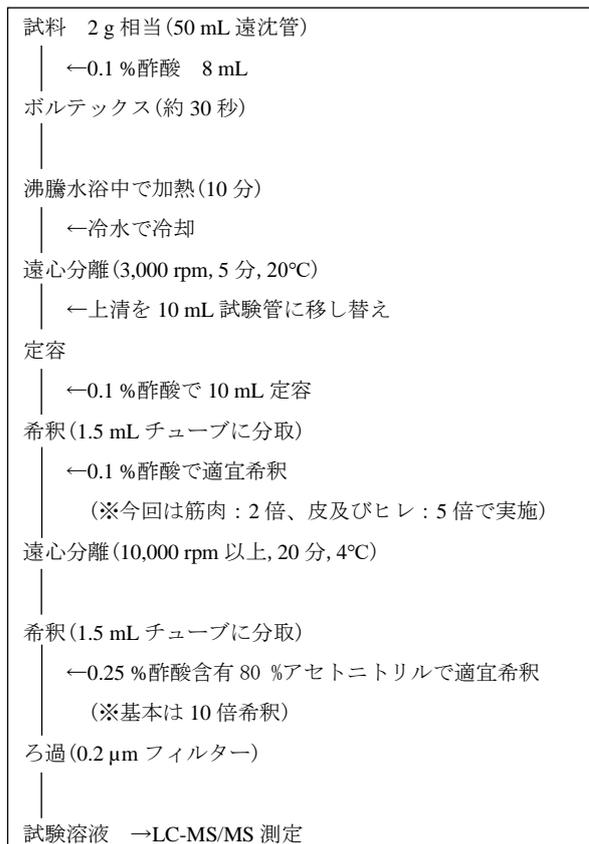


図 1 試験溶液調製方法

3.4 検量線用標準溶液の調製

カナダ NRC 社製の TTX 認証標準物質(認証値:6.74±0.24 μg/mL)を用いた。TTX 認証標準物質を 1 %酢酸で 10 倍希釈したものを標準溶液とし、検量線の直線性が確認できた 2.7 ng/mL~269.6 ng/mL の範囲で、標準溶液を 0.25 %酢酸含有 80 %アセトニトリルにより段階希釈して調製した。

3.5 機器分析

農林水産省の委託事業「令和 3 年度輸出環境整備推進委託事業(EU 向け二枚貝輸出に係る体制整備事業)」に参加し、LC-MS/MS による麻痺性貝毒及び TTX の一斉分析法を構築したことから、機器分析についてはその方法^{10,11)}を用いた(図 2)。

なお、3.3 で示した試験溶液の調製方法は、前述の一斉分析法における方法を元に、より簡便かつ TTX の抽出に適した方法に改良したものである。

3.6 ピークの検出確認

今回用いた TTX 認証標準物質では添加回収試験に必要な濃度の添加用標準溶液の調製が困難であったことから、抽出液に一定量の TTX 標準溶液をスパイクし、ピークの検出確認を行うこととした。検体 1-4(身の中央部)及び鯛の刺身について、10 mL

に定容した後、0.1 %酢酸で 2 倍希釈した抽出液について、TTX 濃度が 6.74 ng/mL になるよう TTX 標準溶液をスパイクし、以降試験溶液と同様に調製した溶液を測定した。その結果、両者とも S/N = 3 以上のピーク検出を確認した。

LC 部					
装置 : Waters ACQUITY UPLC I-Class			流速及びグラジエント条件 :		
分析カラム : Waters ACQUITY UPLC BEH Amide (1.7 μm, 2.1 × 150 mm), ガードカラム付			時間(分)	流速(mL/min)	A(%) B(%)
移動相 : A 0.015 %ギ酸+0.015 %アンモニア水 (pH 9.0~9.4)			初期	0.4	2.0 98.0
B 0.01 %ギ酸含有 70 %メタノール			5.00	0.4	2.0 98.0
測定時間 : 11 分 カラム温度 : 60 °C 注入量 : 2 μL			7.50	0.4	50.0 50.0
			9.00	0.5	50.0 50.0
			9.50	0.5	2.0 98.0
			10.00	0.8	2.0 98.0
※別途作成したメソッド ^{8,9)} にてカラムを十分にコンディショニング後、右記測定用メソッドに切り替え					
MS 部					
装置 : Waters Xevo TQ-S micro イオン化モード : ESI(positive,negative)					
Capillary : 2.5 kV Desolvation Gas : 600 °C, 1000 L/Hr Cone Gas : 100 L/Hr Source Temp : 150 °C					
MRM 条件					
Precursor ion (m/z)	Cone (V)	Product ion (m/z)	Collision (eV)	Product 2 ion (m/z)	Collision (eV)
320.1	20	302.1	22	162.1	36

図 2 LC-MS/MS 測定条件

4. 結果

試験品が有毒であるかどうかは、マウスユニット (MU) という単位を用いて判定した。ここで 1 MU とは、体重 20 g のマウスを 30 分で死亡させる

毒量と定義され、TTX 0.22 μg に相当する⁴⁾ことから、測定結果から換算して求めたマウス毒力を表 1 に示す。なお、10 MU/g を超えると有毒と判定される。

試験品名	検体番号	検査結果		毒力 分類	
		μg/g	MU/g		
検体 1 フグ (筋肉)	1-1 袋に溜まったドロップ	0.30	1.4	無毒	(数字) : 定量下限値未満のため ※定量下限値 筋肉 : 0.27 μg/g, 約 1.2 MU/g 皮及びヒレ : 0.68 μg/g, 約 3.0 MU/g
	1-2 身からはがした腹膜	0.56	2.5	無毒	
	1-3 身 頭側	(0.14)	(0.6)	無毒	
	1-4 身 中央部	(0.11)	(0.5)	無毒	
	1-5 身 尾側	(0.09)	(0.4)	無毒	
検体 2 フグ (ヒレ及び皮)	2-1 尾ヒレ	14.01	63.7	弱毒	【参考】有毒の判定基準 10 MU/g 無毒 : 10 MU/g 未満 弱毒 : 10~100 MU/g 強毒 : 100~1,000 MU/g 猛毒 : 1,000 MU/g 超
	2-2 ヒレ 中(尻ヒレ+背ヒレ)	12.10	55.0	弱毒	
	2-3 ヒレ 小(胸ヒレ)	18.34	83.4	弱毒	
	2-4 皮 頭側(黒色)	27.13	123.3	強毒	
	2-5 皮 尾側(黒色と白色の混合)	12.70	57.7	弱毒	
	2-6 皮 背側(黒色)	34.68	157.6	強毒	
	2-7 皮 頭側(白色)	16.66	75.7	弱毒	

表 1 検査結果

まず、検体 1 については、身から剥がした腹膜から若干検出され、筋肉からも定量下限値未満であるものの検出が確認された。さらに、TTX は水溶性であるためドリップからも検出されたが、いずれも 10 MU/g 以下であり無毒と判定された。このことから、筋肉は腹膜により内臓に含有する TTX から守られていると考えられた。次に、検体 2 の皮及びヒレについては、55.0 MU/g~157.6 MU/g であり、弱毒~強毒に相当すると判定された^{3,12)}。

また、皮の背側と腹側では傾向が異なり、上部の黒色部分のみを採取した頭側 (2-4) 及び背側 (2-6) が強毒に相当する高い毒力であるという結果であった。

5. 考察

当所へ搬入された検体について検査した結果、筋肉は無毒、皮及びヒレは有毒であった。この結果は、推定されたフグの種類「マフグ」の別表 1 と一致した。また、TTX は皮の腺組織等に分布する^{3,12)}ことが知られているが、今回、皮を 4 つに分割して分析した結果、毒力は腹側白色の皮より背側黒色の皮の方が高く、また、頭部に近い方の皮が尾付近より高かった。このことから皮中の TTX の分布には偏りがあることが示唆された。

6. まとめ

フグ毒について、LC-MS/MS 法を用いた、マウス毒性試験法に代わる迅速な定性及び定量法を構築した。この結果を反映させた健康危機管理標準作業書を整備し、今後のフグ毒食中毒事案に備えることとする。

謝 辞

「令和3年度輸出環境整備推進委託事業(EU向け二枚貝輸出に係る体制整備事業)」(農林水産省)に参加し構築した LC-MS/MS による測定条件を用いて本検査を実施した。

検査実施にあたりご助言頂きました、国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所環境・応用部門の渡邊龍一先生に心から感謝申し上げます。

文 献

1)厚生労働省 HP:自然毒のリスクプロファイル:魚類:フグ毒

https://www.mhlw.go.jp/topics/shokuchu/poison/animal_01.html (2023/1/31 閲覧)

2)藤井良昭他:LC-MS/MSによるフグ組織中のTTX分析法の検討.北海道立衛生研究所報, **70**, 45-47, 2020

3)荒川修:フグの毒 TTX 保有生物やフグ食文化との興味深い関わり合い -. 化学と教育, **65** (5), 224-227, 2017

4)食品衛生検査指針(理化学編), 813-820, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京, 2015

5)フグの衛生確保について(昭和58年12月2日環乳第59号)

6)厚生労働省 HP:フグの雑種について <https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000511004.pdf> (2023/2/14 閲覧)

7)水産大学校 HP:雑種について https://www.fish-u.ac.jp/kenkyu/sangakukou/shimonoseki_fukutuushin_0007.pdf (2023/2/14 閲覧)

8)谷口香織他:フグ毒検査法における抽出操作の簡素化と抽出比の検討.日本水産学会誌, **86**, 410-417, 2020

9)本田俊一他:フグ鱸の毒性.食品衛生学雑誌, **48**(5), 159-162, 2007

10)Boundy M.J.et al.:Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction.*J.Chromatography A*, **1387**,1-12,2015

11)渡邊龍一他:麻痺性貝毒と TTX 測定のための超高速液体クロマトグラフィー質量分析法(UHPLC/MS/MS)マニュアル version1, 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所, 2020

12)荒川修:フグ類が保有する毒の分布, 蓄積機構, および生理機能.日本水産学会誌, **79** (3), 311-314, 2013

ベイズ統計手法に基づきケミカルマスバランス計算を行う表計算マクロの作成： 時系列データ処理

花石竜治

筆者は、ベイズ法によりケミカルマスバランス(CMB)計算を行う Microsoft 社 Excel のマクロを 2021 年度に作成した。本報告では、それを時系列データ解析に用いるための時系列データ作成法とマクロの動作、出力値について述べ、出力値に関係する未知発生源の扱いや寄与の比較について報告する。また本研究では、初期値乱数設定および乱数処理法の改良を行い、ベイズ法の応用に用いるマルコフ連鎖モンテカルロ計算の計算条件について知見が得られた。解析例として、従来法で解析が困難だった底質中のダイオキシン類の発生源解析を取り上げ、ベイズ法が安定した寄与率を与えることを示した。以上の検討により、本研究では、ベイズ法による CMB 計算をより精度よく可能にすることができたと考える。

Key words : Bayesian statistics, Chemical mass balance, Time-series data, Dioxins

1. はじめに

微小粒子状物質としての PM2.5 の削減のシナリオは、成分測定の結果から発生源を推定し、対策を行うことである。発生源推定には、元素濃度などの化学的な情報が用いられる。これまで、浮遊粉じんの発生源推定には、リセプターモデルの中で、発生源から観測点まで化学種が組成を変えずに到達するという仮定を用いた Chemical Mass Balance(CMB)¹⁾法や、発生源の情報なしにその化学組成およびその寄与を算出する Positive Matrix Factorization(PMF)¹⁾法が用いられてきた。

CMB 法は発生源情報を必要とするが、この情報が確かな場合には環境汚染の観測濃度があれば、少ない計算機資源で発生源寄与を求められるという長所がある。この方法が提唱²⁾されてから半世紀が経過したが、近年は電子計算機の発達で高度な数値計算が可能となり、古典的・頻度主義的な確率論・統計学に基づいた最小二乗法はもちろん、マルコフ連鎖モンテカルロ (MCMC) 法によるベイズ統計手法も計算手法となっている。

筆者は、2021 年度、柏木らのベイズ統計手法³⁾を用いる CMB 法を簡略化して、演算中心部を C 言語で記述した DLL を用いるマイクロソフト社 Excel の VBA マクロとしてコードし、データ表から直接的に CMB 計算をできる環境を整えた⁴⁾。こ

のマクロは、内海ら⁵⁾により PM2.5 の発生源推定に用いられた。

今回、筆者が作成したマクロのうち、内海らが利用した時系列データへの応用の部分を中心に、その後の改良も含めて報告する。

2. 昨年度開発した Excel マクロについて

計算の流れを以下に簡単に記述する。

発生源寄与および未知発生源の化学種組成をパラメータとし、これが確率変数となるベイズ型モデルとする。柏木は、パラメータが取るベイズ更新についての完全条件付き確率分布である、切断正規分布の期待値と分散の表式を与えた³⁾。

MCMC 法を行うには数種類の方法がある⁶⁾が、ギブズサンプリングの方法では、パラメータの初期値を乱数で与え、パラメータについて順番にこのベイズ更新を行う。すべてのパラメータについて更新が終了したら、また最初のパラメータセットからベイズ更新を行う。これを繰り返して実行すれば、定常的なマルコフ連鎖となる。多数回の実行結果 (マルコフ連鎖を多数回行う単一連鎖法および異なった乱数初期値のセットを用いる多重連鎖法による) の期待値を取り (モンテカルロ積分)、モデルパラメータの推定値とする。

3. 時系列データの設定と解析の概要

図1に示すように、時系列データを、おおもとのCMB計算表の化学種濃度の順にしたがい、記述する。データ名(日付)の列には分析値($\mu\text{g}/\text{m}^3$)、その右の列には標準偏差($\mu\text{g}/\text{m}^3$)を記入する。行による化学種の記述後、一行開けて、質量濃度を記入する。その下には、CMB計算では用いないが、寄与計算には用いる化学種の濃度($\mu\text{g}/\text{m}^3$)を記述する。これを、列を連続として、右に追加し、時系列データとする。空白列があれば、マクロはそこを時系列データの終わりとして認識する。

このワークシートにTimeSeriesDefineという文字列を含む名前をつけ、CMBダイアログを立ち上げると、プログラムが自動認識し、TimeSeriesDefineがワークシート名の先頭につくシート名の一覧を表示する。図2にそのダイアログを示した。

次にこのダイアログで、CMB計算そのものの設定(例えばベイズ法であれば、繰返し回数、burn-in回数、多重連鎖法回数、間引き回数などの設定)をしてから、設定したTimeSeriesDefine*を選択し、「時系列データ解析」をクリックする。マクロは最初に化学種濃度の並びのチェックを行ってから、時系列

データを次々に読み込み、CMB計算を行う。原則として、時系列データ解析では、解析に使用した発生源プロファイルのワークシートの表の下に結果を出力する。

	A	B	C	D	E	F	G
1							
2		2019/5/8		2019/5/9		2019/5/10	
3							
4	Na	0.457	0.0014	0.359	0.0014	0.255	0.0014
5	Al	0.0974	0.00098	0.562	0.00098	0.229	0.00098
6	K	0.0963	0.0002	0.201	0.0002	0.139	0.0002
7	Ca	0.073	0.0013	0.257	0.0013	0.12	0.0013
8	Sc	0.00002	2.2E-06	0.000135	2.2E-06	0.000049	2.2E-06
9	Ti	0.0059	0.000067	0.0265	0.000067	0.0113	0.000067
10	V	0.00107	5.4E-06	0.00224	5.4E-06	0.00188	5.4E-06
11	Cr	0.00031	0.000048	0.00103	0.000048	0.0005	0.000048
12	Mn	0.00308	6.6E-06	0.0105	6.6E-06	0.00538	6.6E-06
13	Fe	0.077	0.0014	0.341	0.0014	0.143	0.0014
14	Co	3.03E-05	1.4E-07	0.000115	1.4E-07	0.0000549	1.4E-07
15	Ni	0.0004	0.00013	0.0011	0.00013	0.0008	0.00013
16	Cu	0.000742	8.1E-06	0.00208	8.1E-06	0.00123	8.1E-06
17	As	0.00195	2.5E-06	0.00266	2.5E-06	0.00222	2.5E-06
18	Se	0.000673	2.2E-06	0.00127	2.2E-06	0.00083	2.2E-06
19	Rb	0.000321	7.1E-07	0.000836	7.1E-07	0.000483	7.1E-07
20	Mo	0.000177	1.2E-06	0.000496	1.2E-06	0.000227	1.2E-06
21	Sb	0.000304	1.2E-06	0.000613	1.2E-06	0.000489	1.2E-06
22	Cs	3.62E-05	2.8E-07	9.23E-05	2.8E-07	0.000048	2.8E-07
23	Ba	0.00116	4.8E-06	0.00378	4.8E-06	0.00233	4.8E-06
24	La	5.64E-05	5.2E-07	0.000221	5.2E-07	0.000105	5.2E-07
25	Ce	0.000107	1.2E-06	0.000488	1.2E-06	0.00021	1.2E-06
26	Sm	7.6E-06	5.2E-07	3.53E-05	5.2E-07	0.0000164	5.2E-07
27	W	0.000044	1.8E-06	0.000358	1.8E-06	0.000071	1.8E-06
28							
29	mass	12.9		29.5		15.7	
30							
31	NH4+	1.08	0.002	1.86	0.002	1.45	0.002
32	NO3-	0.59	0.013	0.64	0.013	0.39	0.013
33	SO42-	3.19	0.0022	5.04	0.0022	3.74	0.0022
34	Cl	0.078	0.0017	0.065	0.0017	0.05	0.0017

図1 時系列データのスプレッドシート表の一部



図2 CMB計算マクロの起動時のダイアログ

4. CMB計算および解析理論の改良

4.1 時系列データ解析における出力

時系列データ解析で出力される量は、発生源寄与、

CMB計算では用いないが寄与の計算を行う化学種の寄与、割り当てられなかった発生源寄与(UK)、不確実さ(UC)である。以下に説明する。

$$\theta'_k = \eta'_k / (1 \text{ g 化学種/g 粉じん}) \quad (9)$$

と取ればよいことが分かる。よって、ベクトル・行列で表した CMB 方程式(4)式は、

$$\begin{pmatrix} \zeta_1 \\ \vdots \\ \zeta_{n_i-1} \\ \eta'_1 \\ \vdots \\ \eta'_{n_k} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \xi_{1,1} & \cdots & \xi_{1,n_j} & & & & \\ \vdots & \ddots & \vdots & & & & \\ \xi_{n_i-1,1} & \cdots & \xi_{n_i-1,n_j} & & & & \\ & & & 1 & 0 & 0 & 0 \\ & & & 0 & 1 & 0 & 0 \\ & & & 0 & 0 & \ddots & 0 \\ & & & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \theta_1 \\ \vdots \\ \theta_{n_j} \\ \theta'_1 \\ \theta'_2 \\ \vdots \\ \theta'_{n_k} \end{pmatrix} \quad (10)$$

となる。

以上から、CMB 計算で考慮しない化学種を含めた場合の未知発生源の寄与 UK は

$$UK = 1 - \left\{ \sum_{j=1}^{n_j} \theta_j + \sum_{k=1}^{n_k} \theta'_k \right\} \quad (11)$$

と定義される。

4.3 発生源寄与の不確かさ

モンテカルロ積分から、 j 番目の発生源寄与の確率分布の期待値の近似値を求めて発生源寄与とするが、この分散を σ_j^2 として算出する。この分散を用いて、次式により発生源寄与の不確かさ UC を定義する。

$$UC = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n_j} \sigma_j^2}{n_j}} \quad (12)$$

4.4 比率モデルの発生源寄与から、比較可能な発生源寄与へ

これについては、内海ら⁵⁾に記述されている。いま、(1)式の右辺第一項を A_i として、既知発生源由来の i 番目の化学種の環境濃度 (計算時の単位: g 化学種/g 粉じん) を表すとする。すなわち、

$$A_i = \sum_{j=1}^{n_j} \xi_{ij} \theta_j \quad (13)$$

となる。

次に次式を考える。

$$\begin{aligned} m_{total} \cdot A_i &= m_{total} \sum_{j=1}^{n_j} \xi_{ij} \cdot \theta_j \\ &= \sum_{j=1}^{n_j} \xi_{ij} \cdot m_{total} \cdot \theta_j \end{aligned} \quad (14)$$

m_{total} は、大気中の単位体積あたりの質量濃度 (単位: μg 粉じん/ m^3) で、 A_i は、その質量を与える粉じん中の i 番目の化学種の濃度 (単位: g 化学種/g 粉じん) であるから、その積 $m_{total} \cdot A_i$ は、大気中の単位体積あたりの化学種の濃度 (単位: μg 化学種/ m^3) となる。

無次元の発生源寄与 θ_j は、質量濃度との積 $m_{total} \cdot \theta_j$ を与えて、この単位は μg 粉じん/ m^3 となり、粉じん濃度と寄与の両方の情報を持つ。

(14)式の CMB 方程式は、大気中の化学種濃度 (単位: μg 化学種/ m^3) を、g 化学種/g 粉じんの次元の発生源プロフィールで CMB 解を求めるものと等価であり、この方程式で得られる寄与は、g 粉じん/ m^3 の次元を持つ。

以上から、 $m_{total} \cdot \theta_j$ は、質量濃度が比率モデルの寄与に乗算された発生源寄与と解釈される。この発生源寄与 $m_{total} \cdot \theta_j$ は、異なる検体間で比較が可能である。

4.5 乱数初期値

次式により初期乱数を設定するよう改良した。ここで、 θ_j^0 は θ_j について、 ω_i^0 は ω_i についての乱数初期値である。

$$\theta_j^0 = \frac{(r_{rand} \% 100) + 1}{101(n_j + 1)} \times 0.01 \quad (15)$$

$$\omega_i^0 = \frac{(r_{rand} \% 100) + 1}{101n_i} \times 0.01 \quad (16)$$

演算子 % は、整数の除算の剰余を表し、 r_{rand} は電子計算機が与える符号なし整数型の乱数を示す。これにより、 N を変数の次元として、区間 $[0, 1/100(N + 1)] \cong [0, 1 \times 10^{-3}]$ の範囲の乱数初

期値を生成した。

この乱数初期値は、パラメータ θ_m で区間内 $[0, 1 - \sum_{j \neq m} \theta_j]$ 、パラメータ ω_m で区間内 $[0, 1 - \sum_{i \neq m} \omega_i]$ にある。

4.6 乱数の更新法

区間 $[0, 1]$ に入る一様乱数 U を、上下端間の区間 $[a, b]$ 、期待値 μ_t 、分散 σ_t^2 の切断正規分布にしたがう乱数 x_t を変換する式として、

$$x_t = \phi^{-1}\{\phi(\alpha) + U(\phi(\beta) - \phi(\alpha))\}\sigma_t + \mu_t \quad (17)$$

ここで、

$$\alpha = \frac{a - \mu_t}{\sigma_t} \quad (18)$$

$$\beta = \frac{b - \mu_t}{\sigma_t} \quad (19)$$

とした⁴⁾。なお、 $\phi(x)$ は標準正規分布の累積関数である。

この式は、入力 U が区間 $[0, 1]$ にある場合には有効であるが、区間が狭い場合に修正が必要である。

その区間を $[a, b]$ とし、特に今回の場合、寄与および未知発生源の化学種濃度の切断正規分布の下端はゼロであるから、 $a = 0$ として、区間 $[0, b]$ を考える。

次に、係数 k_t を仮定し、

$$\psi = \phi(\alpha) + k_t U(\phi(\beta) - \phi(\alpha)) \quad (20)$$

とする。 $U = a = 0$ のとき、および $U = b$ のとき、(20)式から、

$$\psi = \phi(\alpha) \quad (21)$$

$$\psi = \phi(\alpha) + k_t b (\phi(\beta) - \phi(\alpha)) \quad (22)$$

(22)式の右辺が $\phi(\beta)$ に等しい条件を課すと、

$$\phi(\alpha) + k_t b (\phi(\beta) - \phi(\alpha)) = \phi(\beta) \quad (23)$$

(23)式を解くと、

$$(k_t b - 1)\{\phi(\beta) - \phi(\alpha)\} = 0 \quad (24)$$

ここで、

$$\phi(\beta) - \phi(\alpha) > 0 \quad (25)$$

であるから、

$$k_t = \frac{1}{b} \quad (26)$$

よって(17)式は、

$$x_t = \phi^{-1}\left\{\phi(\alpha) + \frac{U}{b}(\phi(\beta) - \phi(\alpha))\right\}\sigma_t + \mu_t \quad (27)$$

となる。(27)式が、区間 $[0, b]$ に入る切断正規分布に従う乱数を入力とした乱数変換の式である。

5. 時系列データ解析における繰返し回数の検討

2019年5月8日から21日において弘前市立文京小学校でサンプリングしたPM2.5測定結果(時系列データ)のCMB計算を、内海ら⁵⁾が用いた発生源プロファイルおよび環境データのもとで多重連鎖法を10回行い、単一連鎖法における繰返し回数を250回、500回、1000回、5000回および10000回として、その回数まで200回のデータを、間引きステップ10回でサンプリングし、得られた200個のデータから寄与の期待値と分散 σ_j^2 を求め、それから(12)式により不確かさUCを計算した。

ここで、繰返し回数は、パラメータセット内におけるギブズサンプリング更新の回数を含まず、このセット内の更新を一巡したときに、繰返し回数が1増えるという意味である。

図3に不確かさUCのプロットを示した。ここで、iterとは繰返し回数を指す。

図3から、不確かさUCが低くなり下げ止まる繰返し回数は、当然、検体にもよるが、概ね5000回であることが分かった。

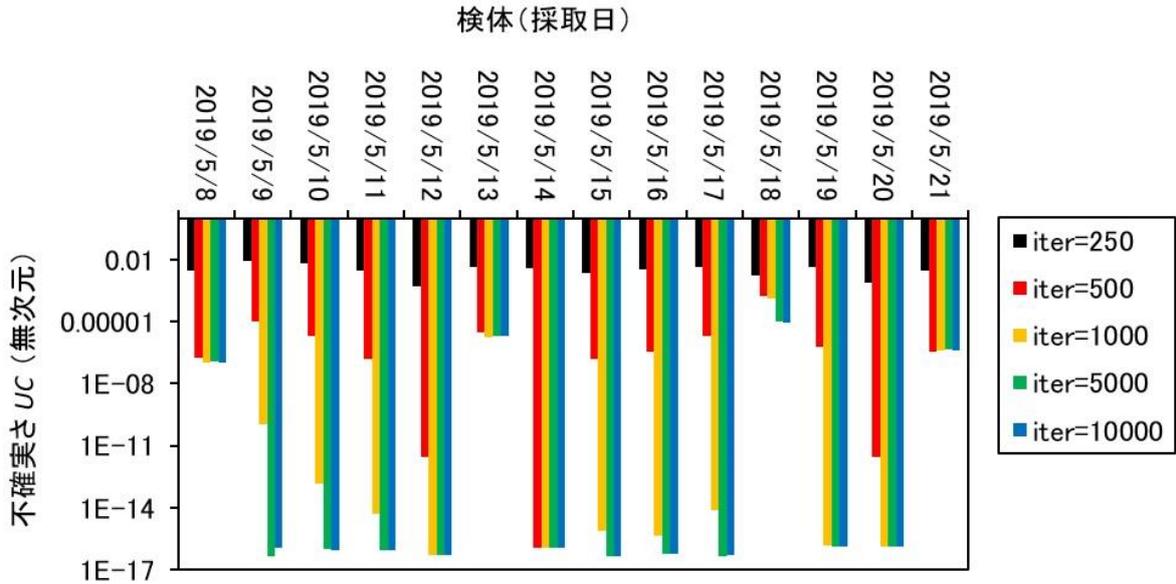


図3 弘前市立文京小学校でサンプリングしたPM2.5解析におけるMCMC計算の繰返し回数と得られた寄与の不確かさとの関係

6. CMB計算について話題としてのダイオキシン類データ解析

ここでは、従来法(有効分散最小二乗法、非負拘束有効分散最小二乗法、非線形計画化法)では発生源寄与の計算が困難であったが、ベイズ法の適用により発生源が推定された一例として、底質のダイオキシン類の例を挙げる。

この事例は、花石ら⁷⁾が非負拘束有効分散最小二乗法の応用例として報告した。ここでは、発生源と仮定するのが過去の農薬で、環境データは2008年の東京湾のst.5における底質中のダイオキシン類⁸⁾である。農薬中のダイオキシン類のうち、ポリ塩素化ジベンゾジオキシン(PCDD)およびポリ塩素化ジベンゾフラン(PCDF)の17種類について、農薬中の含有量⁹⁾を発生源プロファイルとして用いた。また、環境濃度における標準偏差は測定濃度の5%と仮定した。

表1に発生源プロファイルおよび環境データを、表2に各CMB法での寄与率%を示す。ここでは、有効分散最小二乗法(EVLSQ-ALL)、負の寄与の発生源を除去する有効分散最小二乗法(EVLSQ-NE)、非負拘束有効分散最小二乗法(NN-EVLSQ)、非線形最適化法(MLM)、およびベイズ法(Bayesian)を用いた。

ベイズ法では、繰返し回数5000回、burn-in回数

2000回、多重連鎖法回数10回、間引きステップ数10回の条件で計算した。

花石ほか⁷⁾では、CMB計算に比率モデルを用いず、寄与の相対値を計算して議論した。本研究では比率モデルを、ベイズ法はもちろん、ほかの手法でも用いたが、寄与の上限に制限を設けて計算するベイズ法以外では、100%を超える寄与率が与えられており、これらの手法による結果は解釈が困難であった。

一方、ベイズ法では、寄与率は100%を超えずに、解釈可能であった。この結果、未知発生源寄与も11.6%と計算された。ベイズ法により、発生源H(CNP1987)が70.0%、発生源G(CNP1986)が12.6%の寄与率を与え、これらが底質中のダイオキシン類の主な発生源と推定された。ここで、CNPとは、クロルニトロフェンである。

ベイズ法によるダイオキシン類の濃度実測値とCMB推定値を図4aに、発生源寄与率の円グラフを図4bに示した。再現は良好で、また、想定した発生源で環境濃度の約9割が占められた。これらの解析結果はベイズ法以外では得られなかったものである。

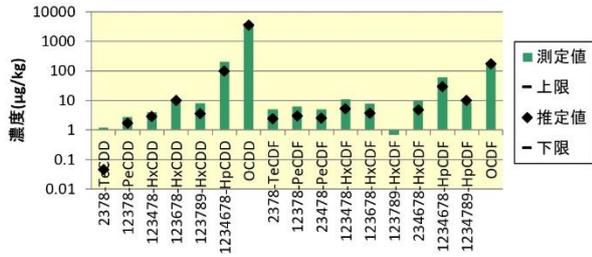
以上から、ベイズ法が、ほかの手法では困難な場合でも、堅牢にCMB結果を与える方法であり、有用なことが示唆されたと考える。

表1 東京湾底質のダイオキシン類起源解析の発生源プロファイルおよび環境データ

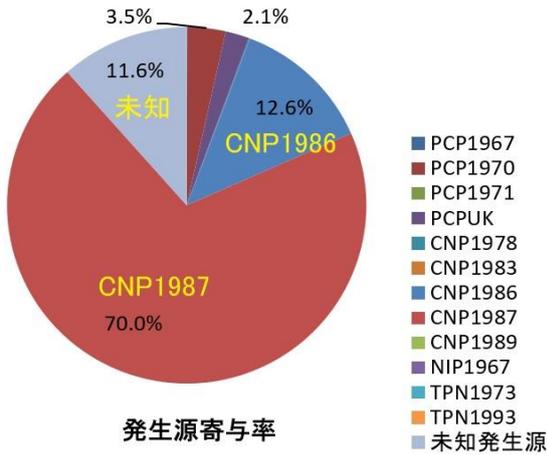
異性体	発生源濃度(mg/kg)												環境濃度 (ng/kg)
	PCP1967	PCP1970	PCP1971	PCPUK	CNP1978	CNP1983	CNP1986	CNP1987	CNP1989	NIP1967	TPN1973	TPN1993	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
2378-TeCDD	0	0	0	0.0019	0.0051	0	0	0	0	0.000083	0	0	1.2
12378-PeCDD	0.0058	0	0	0.011	0.73	0.34	0.0019	0.00062	0.00027	0.000064	0.0000023	0.0000033	2.7
123478-HxCDD	0.0081	0.0022	0.0077	0.13	0.02	0.028	0	0.000023	0	0	0	0	4
123678-HxCDD	0.87	0.0046	0.12	0.0095	0.48	0.3	0.065	0.00054	0.0014	0.000027	0.0000051	0	9.9
123789-HxCDD	0.038	0	0.0046	0.008	0.17	0.13	0.024	0.00023	0.00052	0	0	0	7.9
1234678-HpCDD	58	0.29	3.1	0.38	0.13	0.075	0.0072	0.00019	0.00025	0.00004	0.00003	0.000034	200
OCDD	5800	34	12	1.8	0	0.0016	0.00061	0	0.000083	0.00014	0.00021	0.0002	3700
2378-TeCDF	0.015	0	0	0.0012	0.0048	0	0.0001	0.000015	0.000023	0.00033	0.00001	0.0000042	4.9
12378-PeCDF	0.0039	0.0038	0.0079	0.005	0.012	0	0	0.000038	0.000078	0.000054	0.000011	0.0000053	6.2
23478-PeCDF	0.0014	0.0018	0	0.0028	0.043	0	0	0.00004	0.000029	0.000012	0.000006	0.0000054	5.1
123478-HxCDF	0.2	0.11	0.091	0.011	0.002	0	0	0	0	0	0.00001	0.000006	11
123678-HxCDF	0.031	0.018	0.033	0.004	0.0098	0	0.0055	0.000027	0.00016	0	0.0000071	0.000006	7.7
123789-HxCDF	0	0	0.0026	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7
234678-HxCDF	0.014	0.0085	0.012	0.0061	0.82	0.25	0.0028	0.00027	0.00028	0	0.0000055	0.0000066	9.7
1234678-HpCDF	4.6	0.64	0.96	0.052	0.018	0.0098	0.00042	0	0.000024	0	0.00014	0.000038	61
1234789-HpCDF	0.6	0.28	0.26	0.0053	0	0.0002	0.000024	0	0	0	0.0000075	0	8.5
OCDF	47	4.4	3	0.081	0	0.00063	0.00011	0	0	0	0.024	0.0027	170

表2 表1のCMB計算結果。寄与率(%)で表示。ベイズ法による解析結果を太字で強調した

Method	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
EVLSQ-ALL	0.055	-1.67	5.57	3.00	0.607	-0.932	2.27	-598	834	1080	-11000	94700
EVLSQ-NE	0.048	0	5.10	3.00	0.038	0	0	0	755	1400	0	1490
NN-EVLSQ	0.048	0	5.10	3.00	0.038	0	0	0	757	1400	0	1490
MLM	0.055	0.121	4.17	3.02	0.119	0.045	1.05	75.7	637	1400	72.3	4050
Bayesian	0.040	3.46	0	2.13	0.113	0	12.6	70.0	0	0	0	0



(a) 濃度実測値と CMB 推定値



(b) 寄与率の表示

図4 東京湾底質のダイオキシン類のベイズ法による CMB 計算結果。(a) 濃度実測値と CMB 推定値、(b) 寄与率の表示

7. 結論

時系列データを解析するために、CMB マクロをコードした。この過程で以下の成果が得られた。

- 1) 解析結果の評価に必要な諸量を定義し、これを出力するようにした。併せて、モンテカルロ法で使用する乱数初期値の設定およびそのベイズ更新の式を改良した。
- 2) CMB 計算結果の発生源寄与の不確かさは、本報告で使用した例 (PM2.5 成分測定データ) では、MCMC 計算の繰返し回数を 5000 回以上にするこ
とで減少した。
- 3) これらを受けて、従来法で発生源寄与の計算が困難であった底質中のダイオキシン類の発生源解析をベイズ法により行った結果、このダイオキシン類が 1980 年代後半の CNP 不純物由来と推定された。

以上から、ベイズ法による CMB 法が環境汚染解析に有用であることが確認された。今後もデータ解析事例を積み重ね、正確で堅牢な CMB 解析システムとして、完成度を上げていきたい。

- 1) 橋本俊次ほか：ケミカルマスバランス法による環境汚染物質に対する発生源寄与率の推定. ぶんせき,144-151,2014
- 2) Friedlander, S. K.: Chemical element balances and identification of air pollution sources. *Environmental Science and Technology*,7,235-240,1973
- 3) Kashiwagi, N.: Chemical mass balance when an unknown source exists. *Environmetrics*,15,777-796,2004
- 4) 花石竜治：ベイズ統計手法によりケミカルマスバランス法計算を行う表計算ソフトマクロの作成. 青森県環境保健センター年報,32,69-83,2021
- 5) 内海宣俊ほか：ベイズ統計手法を用いた CMB 法による微小粒子状物質(PM_{2.5})成分の発生源解析. 青森県環境保健センター年報,32,123-144,2021
- 6) 中妻照雄：入門 ベイズ統計学. 朝倉書店,東京,2007
- 7) 花石竜治ほか：非負寄与を与える発生源探索によるケミカルマスバランス法. 青森県環境保健センター年報,27,70-73,2016
- 8) <http://www.kankyo.metro.tokyo.jp/chemical/chemical/dioxin/result/index.html>
(2022年12月26日現在アクセス可能)
- 9) Masunaga, S. et al: Dioxin and dioxin-like PCB impurities in some Japanese agrochemical formulations. *Chemosphere*,44,873-885,2001

PM_{2.5} センサーを活用した稲わら焼却による大気汚染状況調査

内海宣俊

毎年9～10月に稲わら焼却が集中する青森県津軽地方において、比較的安価で、かつ場所を選ばず測定できる可搬型PM_{2.5}センサーにより、稲わら焼却が環境大気へ及ぼす影響を把握できるか確認するため、①大気常時監視用PM_{2.5}自動測定機とPM_{2.5}センサーの並行試験及び②つがる市瑞穂小学校におけるPM_{2.5}センサーを使用した約6週間に渡るPM_{2.5}濃度連続測定の2つの調査により検討した。その結果、①の並行試験では、当該センサーは1ヵ月程度の長期的な調査における評価では問題ないことが分かり、得られた測定値についても適切に補正することでPM_{2.5}自動測定機の測定値とよく一致する結果となった。また、②の瑞穂小学校における連続測定調査では、稲わら焼却期間におけるPM_{2.5}濃度の平均値は12.7 µg/m³、バックグラウンド期間におけるPM_{2.5}濃度の平均値は7.8 µg/m³であり、稲わら焼却期間は通常に比べてPM_{2.5}濃度が約1.6倍程度高いことが分かった。

Key words : PM_{2.5}, rice straw incineration, low cost particulate matter sensors, simple regression analysis

1. はじめに

青森県では、稲わら焼却の環境大気への影響を把握するため、昭和50年度から実施した五所川原市等における粉じん濃度調査等を皮切りに、平成10年度から青森市において有害物質濃度等測定を、平成18年度からは五所川原市立第三中学校局（以下「五三中局」という。）における浮遊粒子状物質（以下「SPM」という。）及び微小粒子状物質（以下「PM_{2.5}」という。）自動測定機での大気汚染常時監視と併せてアルデヒド類、ベンゾピレン及び粉じん（以下「有機化合物等」という。）の濃度測定を、令和元年度からは、有機化合物等の測定地点をより田園地帯に近いつがる市の小学校に移動して実施してきており、北畠ら¹⁾がその結果について報告している。

稲わらの焼却は県全体としては年々減少しており、令和2年度の水稲作付面積に対する焼却面積の割合は1.1%²⁾となっているが、田園地帯が多い津軽地方では、依然として稲わらを焼却している地域もあり、毎年9～10月に集中する稲わら焼却時の煙による健康への影響等が懸念されている。

現在実施している稲わら焼却による大気汚染状況調査（以下「稲わら焼却調査」という。）は、上記でも触れたように、①大気汚染常時監視における粉じん濃度（SPM及びPM_{2.5}）等測定結果による津

軽地域の広域的な評価と、②特定の調査地点におけるサンプリングにより稲わら焼却で発生する有機化合物等の濃度測定によるスポット的な評価（以下「サンプリング調査」という。）からなっている。そのうち、②のサンプリング調査については、稲わら焼却が行われると予測される日に大気採取装置（ハイボリウムエアサンプラ等）を調査地点に設置し、大気を6時間程度吸引し、ろ紙等に吸着される有機化合物等濃度の分析結果により大気への影響を評価している。ただし、この方法では、特定の日のみのデータしか収集できないため、調査地点におけるバックグラウンドのデータと比較することができず、得られたデータの評価が難しいという課題がある。

この課題を解消するには、稲わら焼却期間とバックグラウンドの期間のPM_{2.5}等の濃度データを、一定期間、継続して収集する必要があり、最近では比較的安価で、かつ場所を選ばず測定できる可搬型の大気中濃度測定センサーが販売されていることから、低コストで大気中のデータを継続的に収集することが可能となっている。

そこで、今回、市販されている可搬型PM_{2.5}センサー（以下「センサー」という。）を稲わら焼却調査に活用して継続的にデータを収集し、得られたデ

一タから稲わら焼却が環境大気へ及ぼす影響を把握できるか検討した。その結果、センサーの活用条件や調査地点での連続測定結果から一定の知見が得られたので報告する。

2. 調査概要

2.1 データ収集地点

(1) センサーの評価に係る調査

今回使用するセンサーが、PM_{2.5}が高濃度となる稲わら焼却期間においても性能に問題ないか検証するため、大気常時監視用PM_{2.5}自動測定機が設置されている五三中局にセンサーを設置して並行試験を実施した。

五三中局は津軽地方にある一般環境大気測定局であり、田園地帯とはやや離れた地域に立地しているが、PM_{2.5}自動測定機が設置されている局舎の中では最も田園地帯に近いので、稲わら焼却の影響を比較的良好に把握できる地点である。

(2) PM_{2.5}センサーを活用した稲わら焼却調査

センサーを活用した稲わら焼却調査の実証試験については、今年度のサンプリング調査地点であるつがる市立瑞穂小学校(以下「瑞穂小学校」という。)で実施した。

瑞穂小学校は広範囲にわたる田園地帯に位置し、稲わら焼却期間中は煙により視界不良となる場所もあり、稲わら焼却の影響を把握するには適した地点である。

(3) 他のつがる地域との比較調査

稲わら焼却期間に、瑞穂小学校と他の津軽地域との間でPM_{2.5}濃度の推移の類似性があるか確認するため、大気常時監視用PM_{2.5}自動測定機を設置している測定局のうち、津軽地域にある五三中局及び弘前市立文京小学校局(以下「文京小学校局」という。)の2局と測定値の比較検証を実施した。

ここで、(1)から(3)に挙げた五三中局、文京小学校局及び瑞穂小学校の3地点を図1に示す。

2.2 調査方法

(1) 使用する機器

センサーは、光明理化学工業株式会社製PM_{2.5}センサー「PM_{2.5}テスター」を使用した。この機器は持ち運びサイズのPM_{2.5}測定機器であり、場所を選ばず測定が可能である。また、測定範囲が0～1000μg/m³と広く、PM_{2.5}が高濃度となる稲わら調査において活用可能である。さらに瞬時値の表示だけでなく測定値が記録でき、モバイルバッテリー等の外部電源を使用することで長時間の測定が可能

である。仕様の詳細については表1に示す。



- : PM_{2.5}センサー設置地点
- : 大気常時監視用PM_{2.5}自動測定機設置地点

図1 データ収集地点

PM_{2.5}自動測定機は、五三中局に設置された Thermo Fisher Scientific 製 SHARP monitor 5030iTD 及び文京小学校局に設置された Thermo Fisher Scientific 製 SHARP monitor 5030 を使用した。

表1

メーカー	光明理化学工業株式会社
品名	PM _{2.5} テスター
型式	PMT-2500
測定原理	レーザー光散乱
測定範囲	0 ~ 1000 μg/m ³
ロガー機能	記録間隔： 1秒、10秒、1分、10分、1時間 記録可能件数： 最大131,000件 (PCと接続し記録した結果の出力が可能)
電源	内部電池： 単三アルカリ乾電池3本 外部電源： DC5V(PC、モバイルバッテリー)
使用環境	温度：-10 ~ 50℃ 湿度：0 ~ 95%

(2) センサーの設置方法及び場所

センサーを雨等から保護するために、センサーはハイボリウムエアサンプラー内に格納し(図2)、五三中局及び瑞穂小学校の2地点に設置した。なお、モバイルバッテリーの使用にあたっては、スリープ

防止モジュールを介してセンサーを接続した。これは、モバイルバッテリーがスリープモードになり、センサーへの電源供給が停止することを防ぐためである。



図2 PM_{2.5}センサーの設置方法

(3) 調査期間

各調査地点における調査期間は表2のとおりである。

表2

調査地点	調査期間
五三中局	令和4年10月2日～10月31日
瑞穂小学校	令和4年10月2日～11月11日*

※10月31日から11月4日を除く。

(4) センサーのデータ測定間隔

センサーによる測定は、ロガー間隔を1時間値とし、日平均値は、1時から24時までの1時間値を算術平均して算出した。

2.3 調査項目及び解析対象・期間

調査項目はPM_{2.5}、解析対象はPM_{2.5}自動測定機で収集した大気常時監視用データ及びセンサーで収集したデータの1時間値及び日平均値データとし、解析期間は表3のとおりとした。

なお、稲わら焼却の影響の有無を判断するために、稲わら焼却が盛んにおこなわれる10月期を「稲わら焼却期間」とし、稲わら焼却の影響がない11月期を「バックグラウンド期間」として解析した。

また、瑞穂小学校においては、令和4年10月2日から令和4年11月11日のうち、PM_{2.5}センサーのバッテリー不良によりデータ収集できなかった10月31日から11月4日を除いた期間とした。

表3

調査地点	解析期間
五三中局	令和4年10月2日～10月31日
瑞穂小学校	①稲わら焼却期間 令和4年10月2日～10月30日
	②バックグラウンド期間 令和4年11月5日～11月11日

3. 調査結果と考察

3.1 センサーの評価

(1) 五三中局敷地内におけるPM_{2.5}センサーとPM_{2.5}自動測定機(AP計)の並行試験

センサー及び五三中局PM_{2.5}自動測定機の1時間値、1時間値の差、日平均値及び日平均値の差の推移比較結果を図3及び図4に示す。

1時間値の推移については、センサーの測定値が自動測定機の測定値よりも高めとなるものの、傾向はPM_{2.5}自動測定機と概ね一致していた。

また、日平均値の推移についても、センサーの測定値が自動測定機の測定値よりも高めとなるものの、傾向はPM_{2.5}自動測定機と概ね一致していた。

ただ、稲わら焼却の影響とみられる一時的にPM_{2.5}が高濃度になる場合に、センサーの測定値が自動測定機に比べ非常に高くなる傾向がみられ、その差は最大で224.0 µg/m³(10月16日19時)であった。センサーの製造元である光明理化学工業株式会社にその要因について確認したところ、PM_{2.5}自動測定機の1時間値とは、ろ紙に1時間捕集したPM_{2.5}の質量濃度を測定した値であるのに対し、センサーの1時間値は、1時間ごとの瞬間的な質量濃度を測定した値のため、測定したタイミングで非常に高濃度であった場合、実際の1時間値よりかなり高い値となってしまう可能性があるとの回答があった。

(2) PM_{2.5}センサー測定値の補正の試み

上記(1)で記述したように、センサーの測定値が自動測定機よりも高めの測定値となることから、PM_{2.5}自動測定機の測定値を真値と仮定し、単回帰分析によりセンサーの測定値の補正式を求め、今回測定したデータの補正を試みた。補正式の算出には、早狩³⁾が作成した表計算ソフトの単回帰分析用アドインを使用した。求めた補正式を(1)式に示す。

$$\text{補正值} = 0.469 \times [\text{センサー測定値}] + 2.116 \text{ µg/m}^3 \text{ (1)}$$

(1)式を用いて求めたセンサーの1時間値、1時間値の差、日平均値及び日平均値の差の推移比較結果

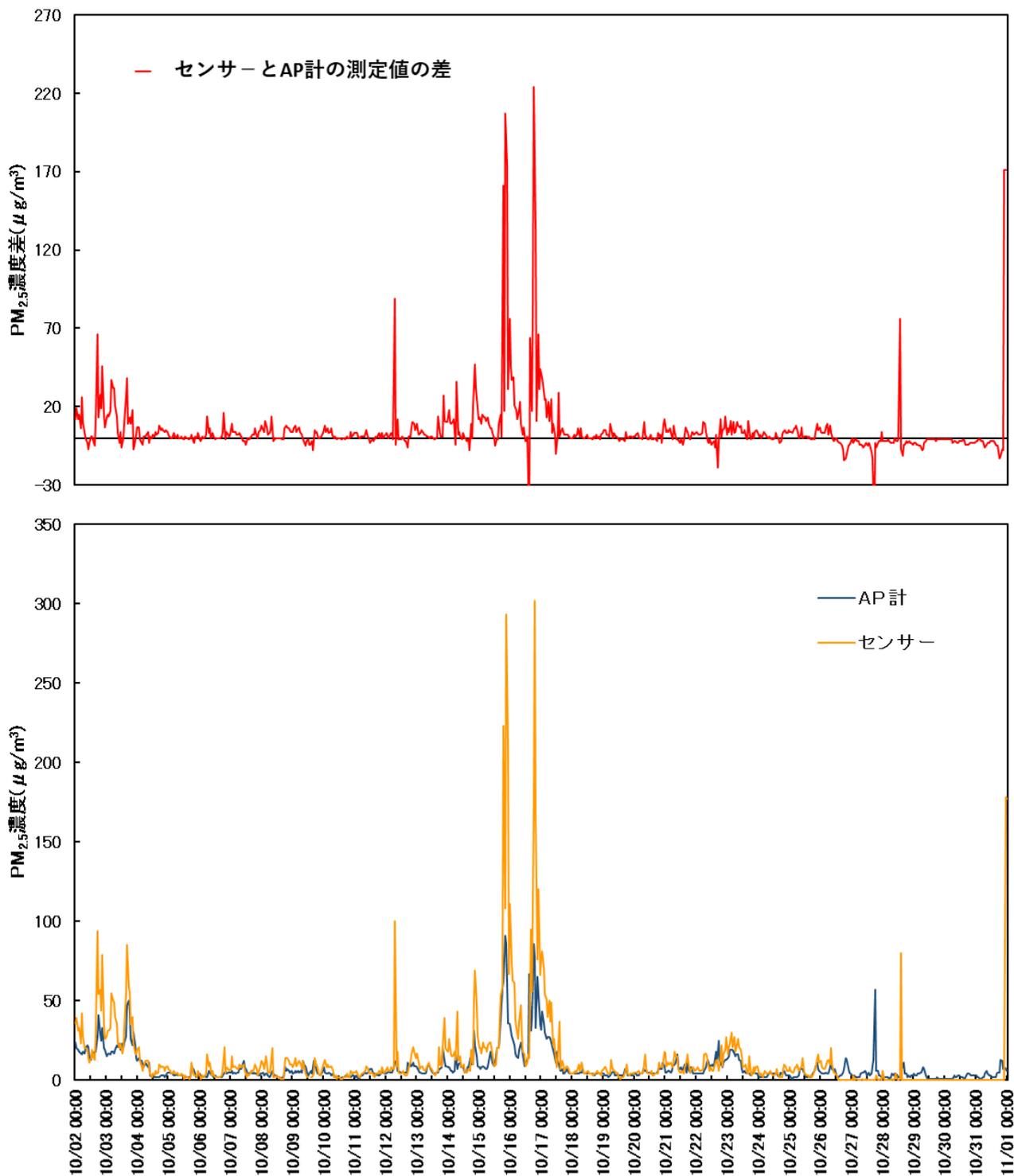


図3 センサー及び五三中局PM_{2.5}自動測定機の1時間値、1時間値の差

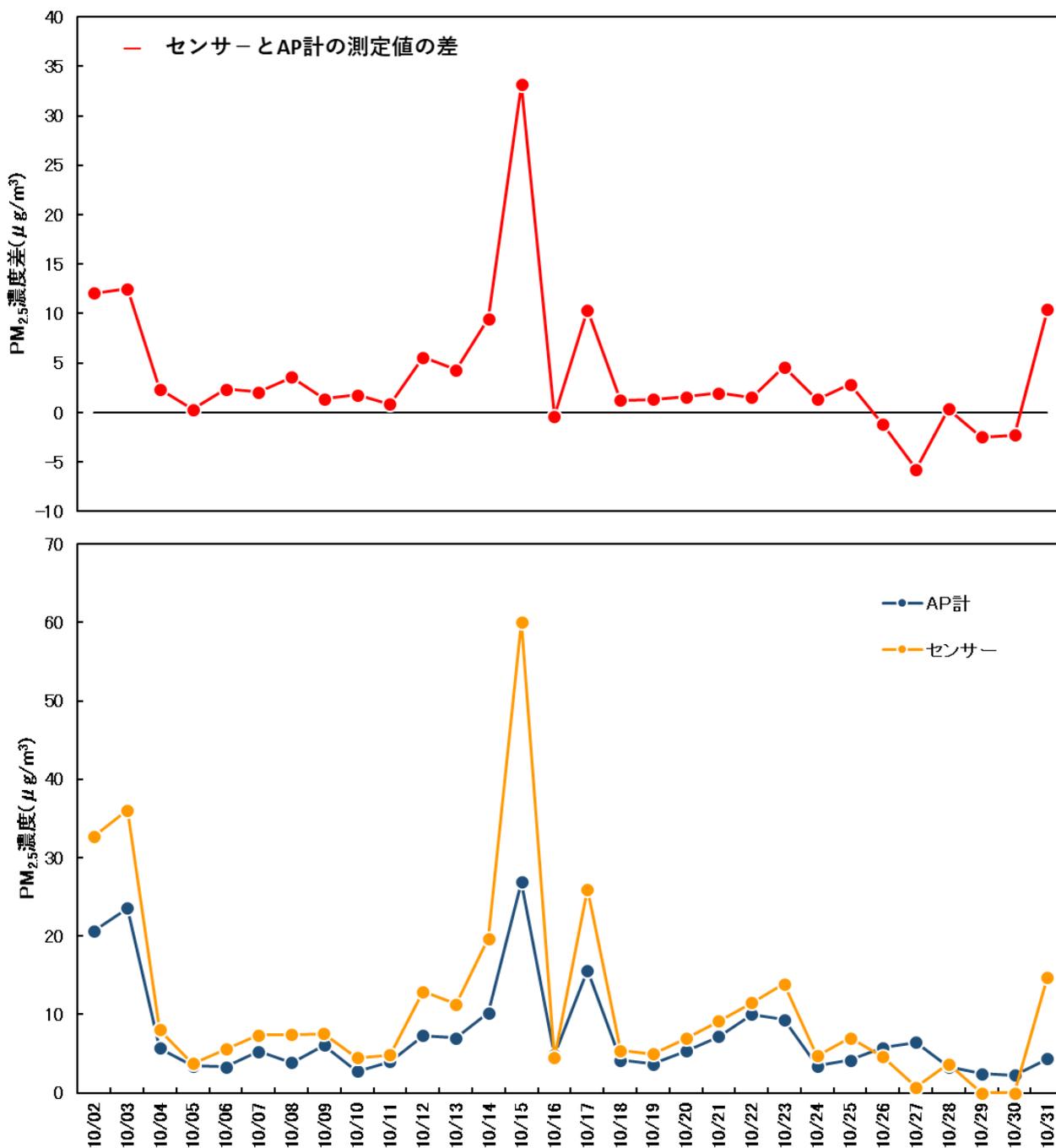


図4 センサー及び五三中局PM_{2.5}自動測定機の日平均値、日平均値の差

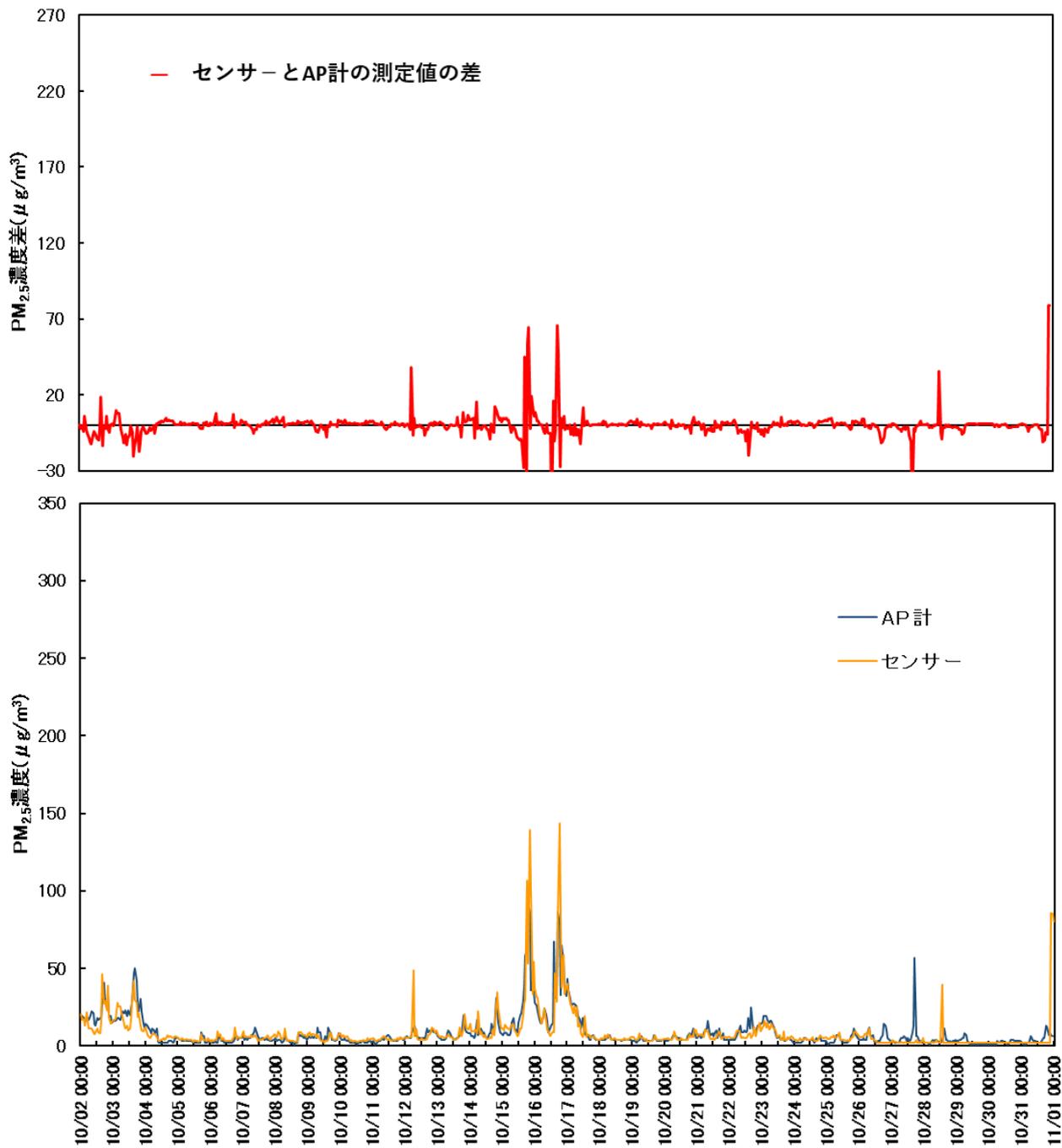


図5 補正後のセンサー及び五三中局PM_{2.5}自動測定機の1時間値、1時間値の差

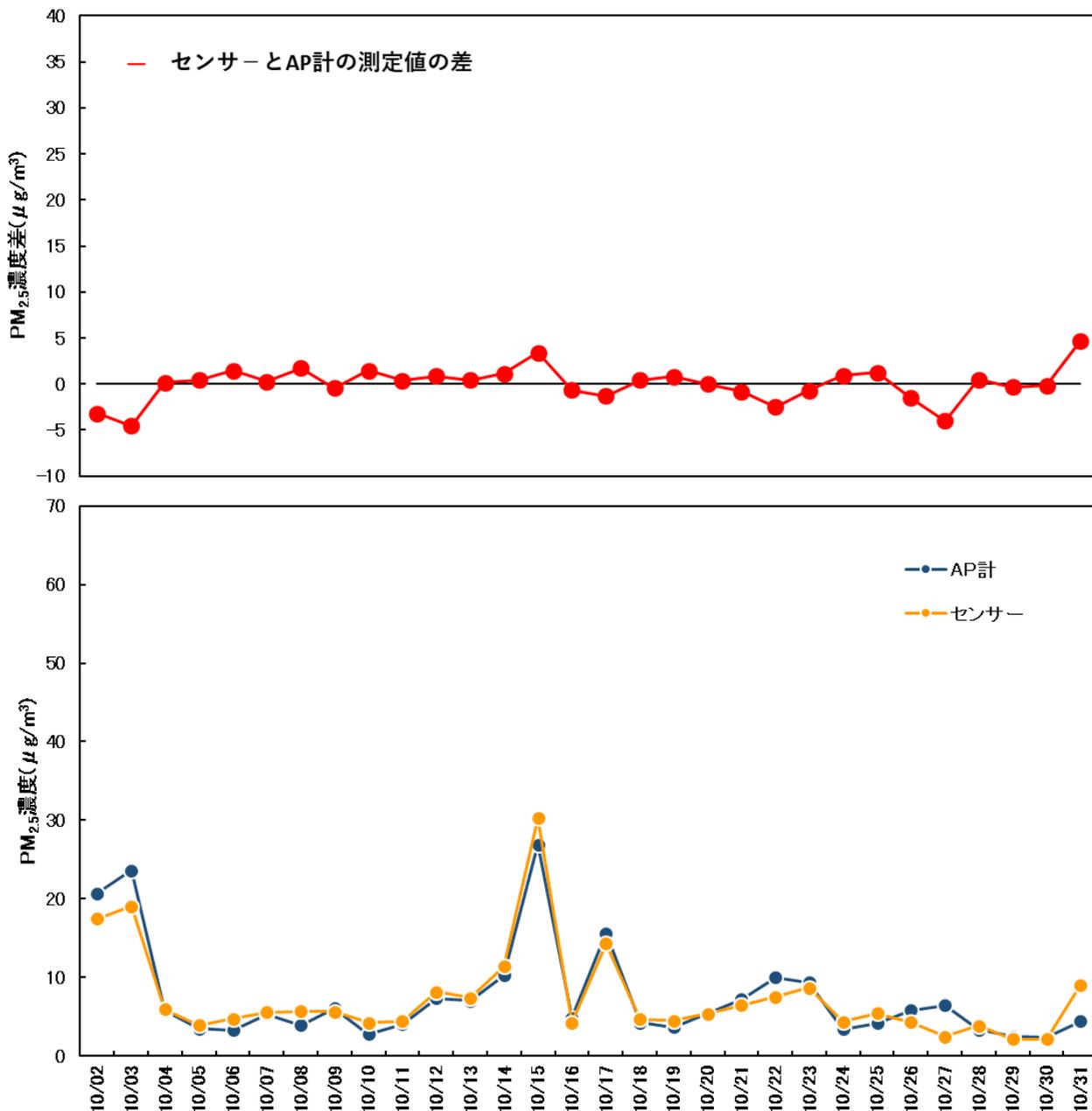


図6 補正後のセンサー及び五三中局PM_{2.5}自動測定機の日平均値、日平均値の差

を図5及び図6に示す。

1時間値の推移については、PM_{2.5}が一時的に高濃度になる時は、補正後もセンサーの測定値が自動測定機の測定値よりも高いものの、補正前に比べてその差が大幅に縮小した。

日平均値の推移についてみると、センサーとPM_{2.5}自動測定機の両者の測定値の差が概ね±5 µg/m³以内に収まり、良く一致する結果となった。

(3) センサーとPM_{2.5}自動測定機の相関

相関について、環境大気常時監視実務推進マニュアル(第3版)⁴⁾(以下「マニュアル」という。)において、PM_{2.5}自動測定機の評価では24時間値(日平均値)を用いるのが一般的であることから、日平均値により求めた。データは上記3.1(2)で得られた補正後のセンサー日平均値と五三中局PM_{2.5}自動測定機の日平均値を用いた。求めた相関結果を図7に示す。

決定係数が0.9063であり、両者の相関は十分に高いと考えられた。

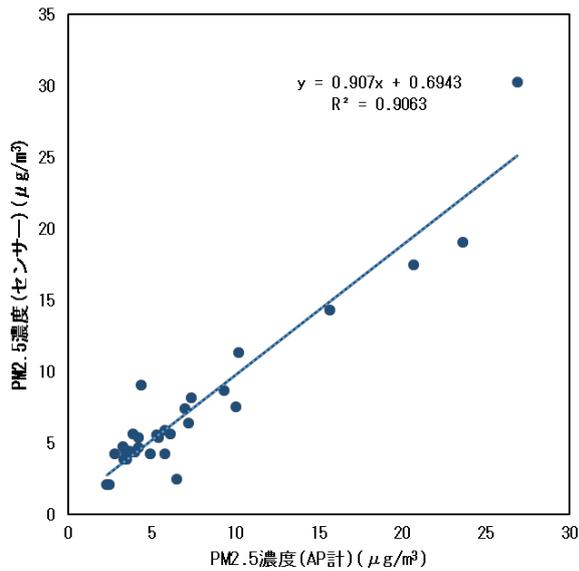


図7 センサーと五三中局PM_{2.5}自動測定機の相関図

(4) 一致性評価

マニュアルに準拠してセンサーと五三中局PM_{2.5}自動測定機に係る一致性の評価を行った。評価には上記3.1(3)で使用したデータを用いた。評価結果を図8に示す。

期間全体の平均値は7.4 µg/m³、日平均値の差の平均値は0.004 µg/m³、日平均値の差の標準偏差は1.92 µg/m³であり、日平均値の差の平均値は一致性の目安の範囲内に収まっていたものの、日平均値の差の平均値±日平均値の差の標準偏差については、一致性の目安の範囲内に収まらなかった。これらの

結果から、一致性評価としては一致性ボーダーラインであるレベル3程度であり、マニュアルによれば、レベル3は光化学オキシダント警報の発令の際の短期的な評価には問題があるが、長期的な測定値には使用可能な場合があるとの記載があることから、当該センサーは短期的な調査の評価は難しいものの、1ヵ月程度の長期的な調査での評価には問題ないと考えられた。

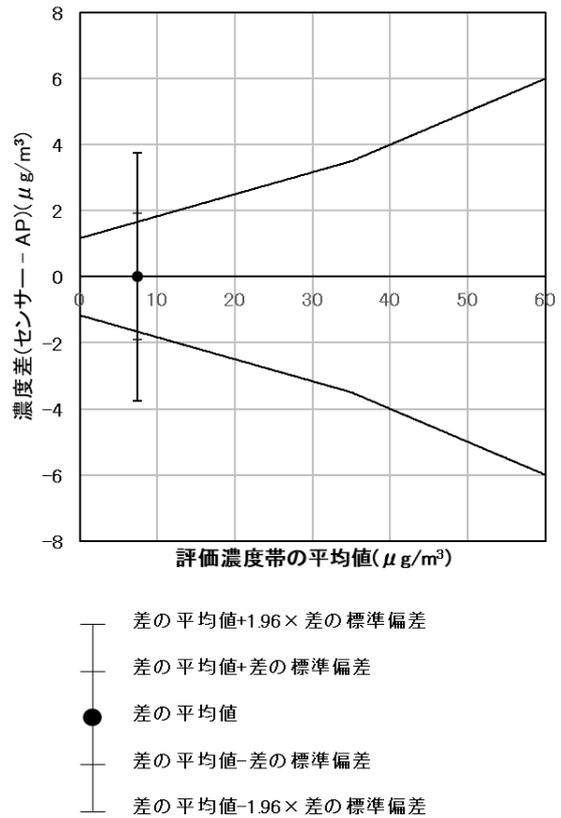


図8 一致性評価

(5) センサーの活用の可否の判断

(1)から(4)の結果から、センサーの測定値は単回帰分析により求めた補正式により適切に補正することで、日平均値ではPM_{2.5}自動測定機の測定結果によく一致した近いデータを得ることが可能であることが分かった。また、センサーと五三中局PM_{2.5}自動測定機との一致性評価からも、1ヵ月程度継続する調査であれば対応可能と考えられた。

3.2 稲わら焼却調査結果

(1) 瑞穂小学校におけるPM_{2.5}濃度について

瑞穂小学校におけるセンサーで測定したデータを(1)式で補正したPM_{2.5}濃度の1時間値及び日平均値の推移を図9及び図10に示す。

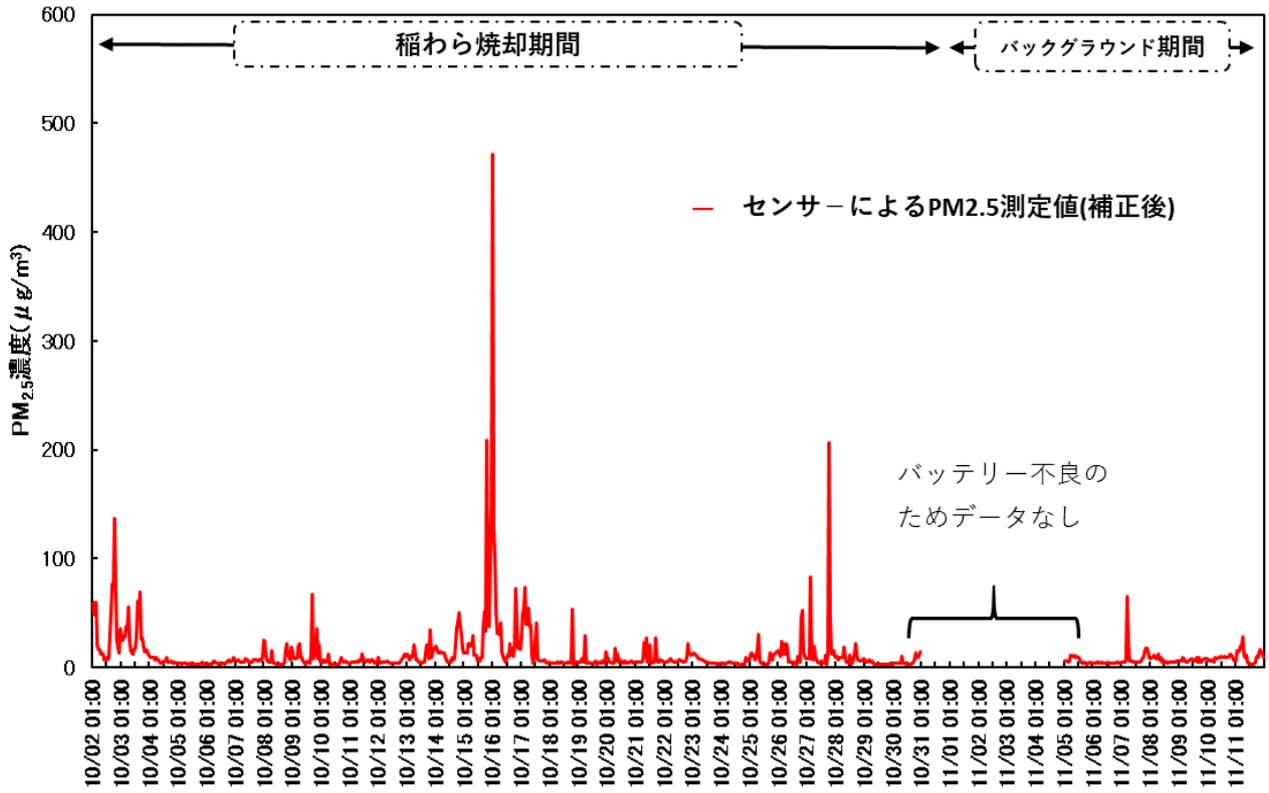


図9 補正後の瑞穂小学校におけるPM_{2.5}濃度の1時間値

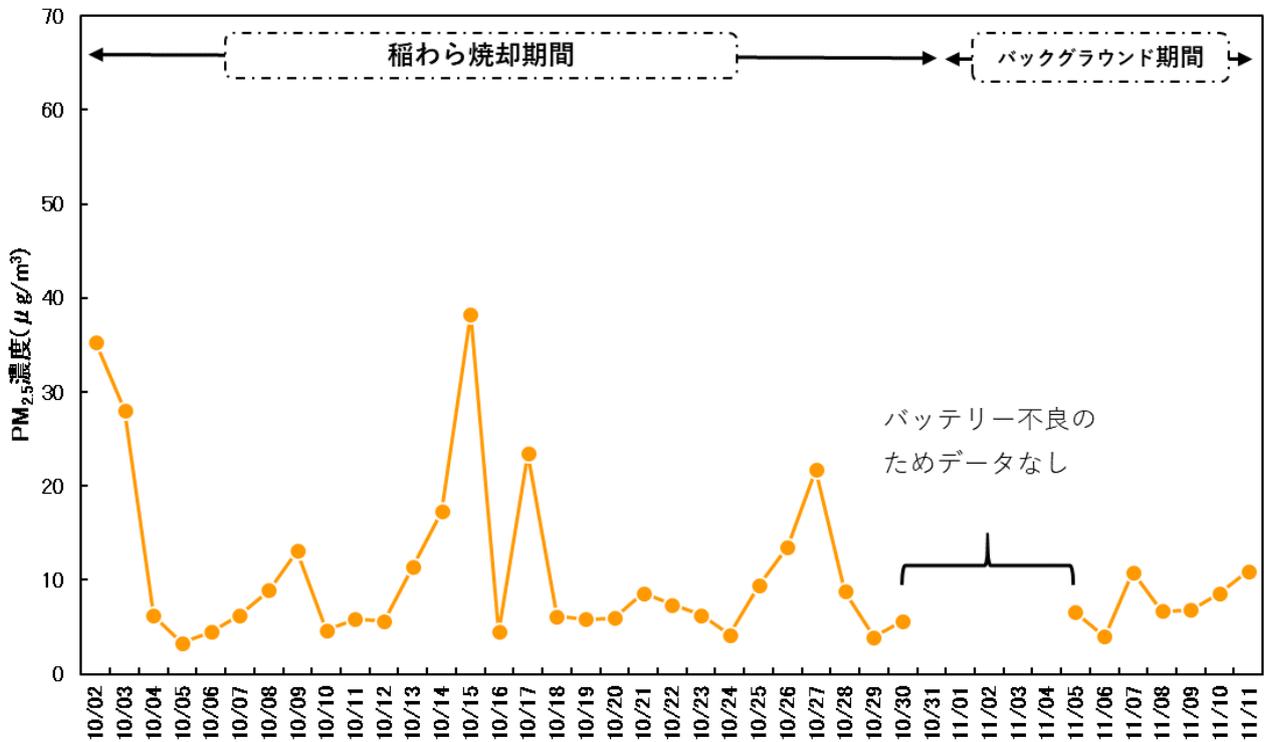


図10 補正後の瑞穂小学校におけるPM_{2.5}濃度の日平均値

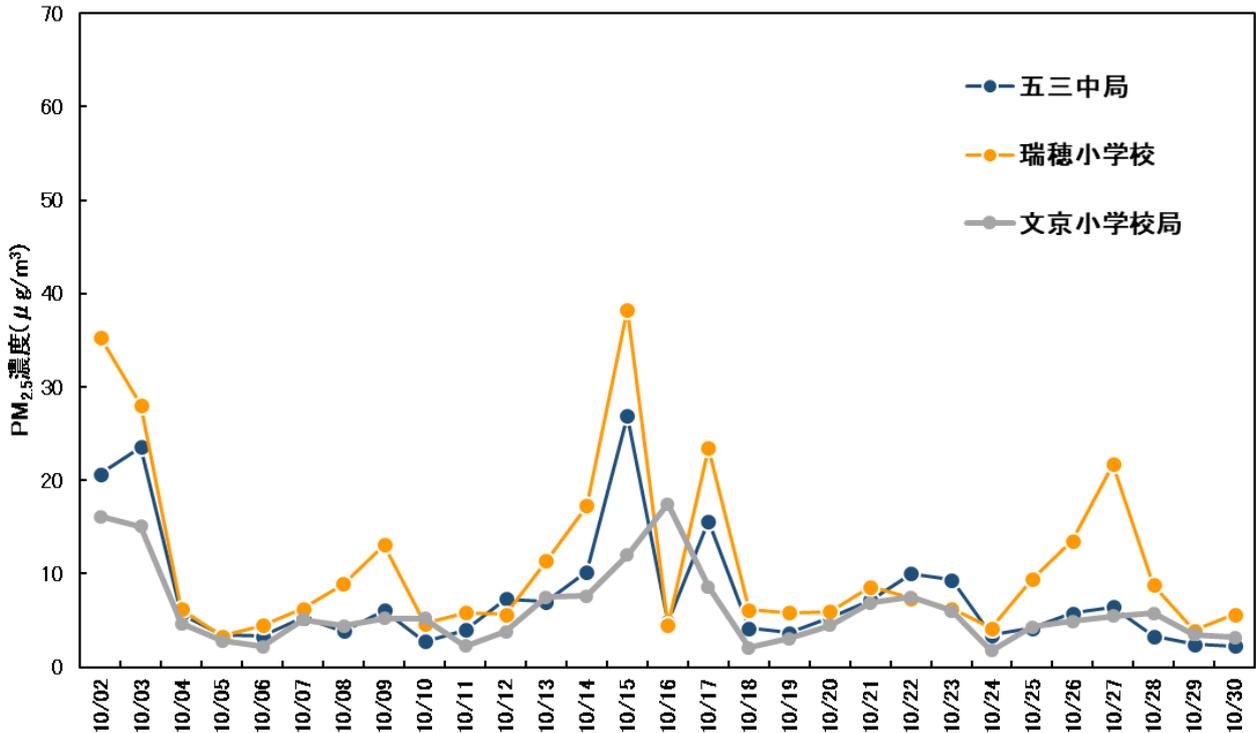


図 11 令和 4 年 10 月における五三中局、瑞穂小学校及び文京小学校局の PM_{2.5} 濃度の日平均値

PM_{2.5}濃度の顕著な濃度上昇が観測されたのは、10月2日から3日、10月14日から15日、10月17日、10月26日から27日であった

稲わら焼却期間における平均値は 12.7 µg/m³、バックグラウンド期間における平均値は 7.8 µg/m³ であり、稲わら焼却期間は通常の時期に比べ PM_{2.5} 濃度が約 1.6 倍程度高かった

(2) 津軽地域における稲わら焼却期の PM_{2.5} 濃度の推移について

令和 4 年 10 月における五三中局、瑞穂小学校及び文京小学校局の PM_{2.5} 濃度の日平均値の推移を図 11 に示す。

3地点を比較すると、距離的に近い五三中局と瑞穂小学校の2地点は推移の傾向が類似しており、PM_{2.5}濃度の顕著な濃度上昇が観測された時期も概ね同じであった。

また、3地点中、最も顕著な濃度上昇が観測されたのは瑞穂小学校であった。これは瑞穂小学校が最も水田に近く、また周辺の水稲の面積が多いから、3地点の中で最も稲わら焼却の影響を反映しやすい地点であるためと考えられる。

よって、上記の結果や 3.2(1)の内容も踏まえると、瑞穂小学校におけるセンサーでの連続測定は、PM_{2.5} 濃度の顕著な濃度上昇やバックグラウンド期間のデータなどを概ね適切に捉えることが出来たと考えられる。

4. 今回の調査で判明した課題について

稲わら焼却の影響とみられる一時的に PM_{2.5} が高濃度になる場合に、センサーの測定値が自動測定機に比べ非常に高くなる傾向がみられ、そのことにデータロガー設定を 1 時間間隔としたことが影響している可能性があることから、今後はセンサーのロガー間隔を 1 分間隔や 10 分間隔に変更し、それらを算術平均して 1 時間値を求め、ロガー間隔が測定値にどのように影響するか検討していく必要がある。

5. まとめ

検討の結果、センサーを活用することで、稲わら焼却調査地点における大気中の PM_{2.5} 濃度データを継続的に収集でき、かつ得られたデータから環境大気中への稲わら焼却の影響を把握し評価できることが分かった。

また、以下の(1)、(2)のとおり一定の知見が得られた。

(1) センサーの評価

五三中局で実施したセンサーと PM_{2.5} 自動測定機の並行試験の結果、センサーの測定値は PM_{2.5} 自動測定機の測定値より高めだが、濃度推移の傾向は概ね一致しており、補正式により PM_{2.5} 自動測定機の測定値とよく一致する測定値を得られることが分かった。

センサーと PM_{2.5} 自動測定機の測定値の相関につ

青森県環境保健センター年報 第33号(2022)

いても決定係数が0.9063と十分に高く、一致性評価においてもボーダーラインであるレベル3程度であり、1ヵ月程度継続する調査であれば対応可能と考えられた。

(2) 稲わら焼却調査結果

瑞穂小学校で実施したセンサーを活用した稲わら焼却調査の実証試験の結果、稲わら焼却の影響と考えられるPM_{2.5}濃度の顕著な濃度上昇が観測された。また、稲わら焼却期間における瑞穂小学校のPM_{2.5}濃度の平均値は12.7 µg/m³、バックグラウンド期間におけるPM_{2.5}濃度の平均値は7.8 µg/m³であり、稲わら焼却期間にはPM_{2.5}濃度が約1.6倍程度高いことが分かった。

謝 辞

本稿作成にあたり、PM_{2.5}テスターの技術的なご助言をいただいた光明理化学工業株式会社の皆様に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 北畠 茂, 他: 青森県内における稲わら焼却による大気汚染状況について. 全国環境研会誌, **44**, 43-48, 2019
- 2) 青森県農林水産部食の安全・安心推進課: 2021年度稲わら有効利用の促進及び焼却防止対策連絡会議資料
- 3) Excelアドイン工房「早狩」
<http://www7b.biglobe.ne.jp/~hayakari/index.html>
(2023.2.6 アクセス)
- 4) 環境省: 環境大気常時監視実務推進マニュアル(第3版)

IV 他誌投稿抄録

青森県におけるつつが虫病の発生状況

鈴木 敬 山上剛志 小川裕貴 坂 恭平 二本柳朋子 菩提寺誉子 小笠原和彦：Infectious Agents Surveillance Report (IASR) Vol.43 No.8 p. 4-5 (2022)

青森県における 2006～2021 年のつつが虫病患者発生状況と、過去 10 年間の診断月別及び性別年齢区別の推移等について取りまとめた。患者報告数は増減を繰り返しているが、2018 年以降は毎年増加していた。診断月別発生状況では 5～6 月に大きなピークが見られ、10～11 月にも小さなピークが見られた。性別では男女の差はみられなかったが、年齢区別では 60 代から 80 代の患者が 79.3%を占めた。感染地域（推定を含む）は、県中部から県南部が比較的多い一方で、県北部が少なかった。症状及び所見では、発熱、発疹、刺し口が 8 割以上認められたほか、頭痛、リンパ節腫脹が 2 割程度認められた。

また、近年検出した *Orientia tsutsugamushi* 4 例の DNA 遺伝子解析を実施したところ、3 例は標的遺伝子領域の塩基配列において国内に分布する Karp 型に分類されたが、1 例は台湾株に近縁であったことが確認された。

イムノクロマト簡易キットによる麻痺性貝毒モニタリング検査の検討

山本明美：令和 4 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，2022.10.13-14（青森市）

二枚貝生産海域における海域モニタリング検査にスクリーニング法としてイムノクロマト簡易キットを用いることができるか検討した。当該キットの最適条件は貝種や毒成分組成で変わるため、ホタテガイで東日本の毒化状況を参考に検討した。

当所で作成したホタテガイ自家標準物質を用いてスクリーニングレベルを 2 MU/g とし、イムノクロマト簡易キットの最適条件を検討したところ、検体希釈率 40 倍で良好な結果が得られた。また、当該キットと公定法であるマウス試験、LC-MS/MS 法による毒成分分析の結果を比較したところ、ホタテガイで GTX 群が主体の有毒試料については再現性が認められた。

LC-MS/MS による麻痺性貝毒試験法の検討及びマウス毒性試験との比較

田中綾乃、柴田めぐみ^{*}、五十嵐飛鳥、岩館樹里、山本明美：第 59 回全国衛生化学技術協議会年会，2022.10.31-11.1（川崎市）

国内の公定法であるマウス毒性試験から機器分析への移行を見据え、国内の規制値濃度付近に調製した自家標準物質を用いて検討を行った。

抽出溶媒の違いにより、毒成分の組成比に若干の違いが見られたが、算出された総量としての「マウス毒量」及び「サキシトキシン当量」はほぼ同等であった。また、国内の規制値濃度付近における、LC-MS/MS 法とマウス毒性試験の結果を比較したところ、前者がやや高い傾向にあるものの、後者とほぼ同等の結果が得られた。

※環境生活部環境保全課

青森県環境保健センター年報

令和4年度
令和5年3月発行

編 集 青森県環境保健センター

発 行 〒030-8566 青森市東造道 1-1-1

電 話(017)736-5411 FAX(017)736-5419

メールアドレス KANKYOSENTA@pref.aomori.lg.jp

ホームページ <http://www.pref.aomori.lg.jp/soshiki/kankyo/kankyosenta/center-home.html>
