

[原著]

兵庫県内の患者から分離された結核菌のRFLP分析に基づいた分子疫学

辻 英高* 西海 弘城
押部 智宏 山岡 政興Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from the Patients in Hyogo Prefecture Based on IS 6110 RFLP Analysis

Hidetaka TSUJI*, Hiroki NISHIUMI, Tomohiro OSHIBE and Masaoki YAMAOKA

Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

Genetic relationships among 273 *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Hyogo Prefecture between April 1998 and March 2005 were investigated using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. The RFLP patterns of the isolates were classified into 197, and 27 of these patterns each contained two or more strains. Clear cases of infection between patients where strains showed an identical PFGE patterns accounted for 14 cases, which occurred such as in the same workplace, facility and household. Cluster analysis demonstrated high similarity among the strains in two groups (A and B), and the frequency of appearance was 32.2% among the strains for which genetic homology was analyzed based on the criterion of $\geq 80\%$ banding pattern similarity. The frequency of resistance to the primary anti-tuberculosis drugs isoniazid, rifampicin, streptomycin and ethambutol among the 140 investigated strains was 8.6%, 15.0%, 5.7% and 11.4%, respectively. Group A, which contained strains showing a high similarity of the RFLP pattern, tended to have a high frequency of resistance to the anti-tuberculosis drugs examined.

I はじめに

わが国における結核の新規登録患者数は毎年3万人¹⁾にのぼっている。最近特に多剤耐性結核菌や、感染伝播力の強い結核菌が国内はもとより国際的に脅威となっている²⁾。兵庫県では結核の罹患率は毎年減少傾向ではあるが、2005年に新規に登録された患者数は1002人であり、その罹患率24.6は、全国平均22.2に比べて高い値を示し

ている¹⁾。結核の罹患率を低減化するためには、患者の早期発見が大切であり、接触者健診の強化などの対策が重要である³⁾。また、接触者健診や集団感染事例では接触者の把握や患者と感染者への対応が必要となるが、患者から分離された菌株の関連性を調べ、それが同じ結核菌による感染か否かを判定することは、予防対策上重要な情報となる。近年、結核の分子疫学調査の重要な手段として、結核菌の挿入因子IS6110を指標としたRestriction fragment length polymorphism(RFLP)分析法が確立され^{4,5)}、国内分離株の亜分類に用いられるようになった⁶⁾。IS6110は結核菌特有の挿入配列であり、染色体DNA上に複数個存在し、菌株ごとにその数、位置が異なる^{7,8)}。また、この形質はある程度安定して遺伝してい

感染症部

*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所
感染症部 辻 英高

く⁹⁾。その結果、菌株によって、RFLPパターンが異なり、由来ごとのグループ分けが可能となる。

我々は1998年4月から2005年3月の期間、結核対策特別促進事業の一環として、県内で結核罹患率が高い淡路地区¹⁰⁾を中心に、接触者検診によって分離された菌株について、県内の健康福祉事務所と共同でRFLP分析による型別を行い、併せて型別と薬剤感受性との関連性を調べたので、それらの結果について報告する。

II 材料と方法

1. 供試菌株

RFLP分析に使用した菌株は1998年4月から2005年3月に淡路地区で分離され、患者の同意の許に研究センターに搬入された194菌株とその他の地区で分離された79菌株の合計273菌株の県内分離株である(Table 1)。

Table 1 The number of samples by year class from Awaji district and others used for IS6110 DNA fingerprints (RFLP) analysis between the 1998 and the 2005 investigation

Region	Year class								Total
	'98	'99	'00	'01	'02	'03	'04	'05	
Awaji district	18	44	23	12	36	27	14	20	194
Other districts	5	11	26	4	17	5	1	10	79
Combined	23	55	49	16	53	32	15	30	273

2. RFLP分析

小川培地等で搬入された菌株は、1%小川培地で再培養後、アイソプラント(日本ジーン)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAは制限酵素PvuIIで消化断片化し、1%アガロースゲル電気泳動で展開した。アガロースゲル上に展開されたDNA断片はメンブレンに転写・固定し、IS6110プローブとのハイブリダイゼーションを行った^{5, 10)}。メンブレン上のDNA断片は、ジゴキシゲニン(DIG)検出試薬(ロシュ・ダイアグノスティックス)でIS6110断片を発色・可視化させ、菌株のRFLPパターンを調べた。なお、IS6110プローブはロシュ・ダイアグノスティックス社の方法に従ってランダムプライム法によりDIGを標識して作成した。

3. クラスタ解析

各菌株間のRFLPパターンはFingerprinting II (日本バイラッド)を用いてクラスタ解析を行った。菌株間の類似度の算出はDiceの方法を用い、その類似度を基に非加重結合法(UPGMA)で系統樹を作成した。

4. 菌株の薬剤感受性

分離菌株の薬剤感受性は健康福祉事務所が調査したものをを使用した。RFLP分析を行った273菌株のうち140菌株について薬剤感受性試験結果の回答が得られた。感受性試験に使用されている薬剤は患者により異なるものの、140菌株のすべてが一次抗結核薬であるイソニアジド(INH)、リファンピシン(RFP)、ストレプトマイシン(SM)、エタンブトール(EB)の4薬剤について試験が実施されていた。患者に共通に使用されているこれらの薬剤について耐性株の発現頻度、およびRFLPパターンとの関連を調べた。

III 結果

1. 患者の年齢構成

RFLP型別に使用した273菌株のうち258菌株について、患者の年齢分布は、Table 2のとおりで、2005年に新規登録された県内患者の分布¹⁾と大きな違いはなかった。

Table 2 Comparison of the number of the patients by the age class between the newly registered patients in Hyogo prefecture and the patients who carried out the study for IS6110 DNA fingerprints (RFLP) analysis

Classification	Age group										Total
	0~19	20~29	30~39	40~49	50~59	60~69	70~79	80~89	>90		
Hyogo prefecture ¹⁾ ; n (%)	9 (0.9)	77 (7.7)	83 (8.3)	69 (6.9)	140 (14.0)	147 (14.7)	239 (23.9)	207 (20.7)	31 (3.1)	1002	
Samples ²⁾ ; n (%)	2 (0.8)	15 (5.8)	16 (6.2)	17 (6.6)	32 (12.4)	47 (18.2)	67 (26.0)	53 (20.5)	9 (3.5)	258	
RFLP group A ³⁾ ; n (%)	0 (0)	5 (10.4)	7 (14.6)	3 (6.3)	8 (16.7)	5 (10.4)	13 (27.1)	5 (10.4)	2 (4.2)	48	
RFLP group B ³⁾ ; n (%)	0 (0)	2 (5.6)	3 (8.3)	5 (13.9)	6 (16.7)	6 (16.7)	8 (22.2)	5 (13.9)	1 (2.8)	36	

*1; Newly registered patients in 2005.

*2; The patient by whom age was investigated among 274 patients who carried out RFLP analysis.

*3; The patient by whom age was investigated among the patients belonging to the group shown in Fig. 3 and Fig. 4.

2. 分離株のIS6110コピー数の分布

県内の患者から分離された結核菌273菌株はすべての株がIS6110を保有しており、ISのコピー数は、12個を中心として1個から20個であった(Fig. 1)。

3. 分離株のRFLPパターンおよび患者の疫学的な関連性

分離株のRFLPパターンは197に分類され、複数の菌株を有するパターンは27種類であった(Table 3, Fig. 2)。

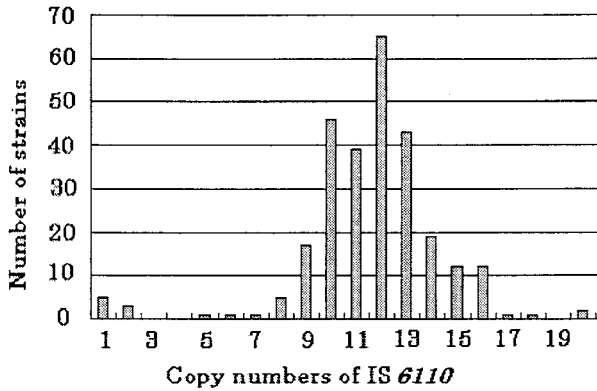


Fig. 1 Distribution of the copy numbers of IS6110 among the *Mycobacterium tuberculosis* strains tested

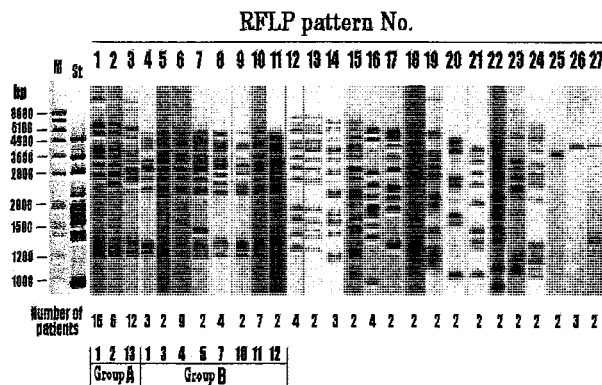


Fig. 2 IS6110-RFLP patterns in which two or more strains showed the same pattern: RFLP pattern No. is the same as the number indicated to Table 3, and the number of Groups A and B is the same as the number of RFLP pattern in each group shown in Fig. 4. M; DNA molecular weight marker VII (Roche Diagnostics GmbH), St.; *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv.

同一のRFLPパターンを示した菌株のうち、疫学的に患者間の関係が明らかであるのは夫婦間の3例、6菌株 (Table 3, Fig. 2; パターン番号1, 12および22)、親子間の4例、8菌株 (パターン番号3, 15, 21および23)、同一職場内の1例、5菌株 (パターン番号6)、同一施設内の2例、4菌株 (パターン番号18と24)、および接触者間4例、8菌株 (パターン番号1, 6, 7および20) の計14例で31菌株であった。また、それぞれのRFLPパターンが一致した他の72菌株については患者間の疫学的な関連性は不明であった。

4. 分離菌株の型別

分離株についてクラスター解析を行い菌株間の相同性を比較すると、RFLPパターンが一致する類似度100%のクラスターは27種類103菌株であり、クラスター形成

Table 3 IS6110 DNA fingerprints (RFLP) patterns with which two or more patients were seen and the epidemiological relations between the patients who showed the same pattern

RFLP pattern No. (group)*	Number of patients	Epidemiological relations (Number of patients)	RFLP pattern No.	Number of patients	Epidemiological relations (Number of patients)
1 (A)	16	Husband and wife(2) Contact person(2) Unknown(12)	14	3	Unknown
			15	2	Parent and child
			16	4	Unknown
2 (A)	6	Unknown	17	2	Unknown
3 (A)	12	Parent and child(2) Unknown(10)	18	2	Same facility
			19	2	Unknown
4 (B)	3	Unknown	20	2	Contact person
5 (B)	2	Unknown	21	2	Parent and child
6 (B)	9	Contact person(2) Same place of work(6) Unknown(2)	22	2	Husband and wife
			23	2	Parent and child
			24	2	Same facility
7 (B)	2	Contact person	25	2	Unknown
8 (B)	4	Unknown	26	3	Unknown
9 (B)	2	Unknown	27	2	Unknown
10 (B)	7	Unknown	Subtotal	103	Husband and wife(6) Parent and child(8) Same place of work(6) Same facility(4) Contact person(8) Unknown(72)
11 (B)	2	Unknown	27		
12	4	Husband and wife(2) Unknown(2)	Other patterns	170	
			13	2	Unknown
			Total	273	
			197		

* The group is the same as show in Fig. 3 and Fig. 4

率は37.7%であった。これら27クラスターの1クラスターあたりの菌株数 (クラスターサイズ) は、2から16であり、クラスターサイズ2が16種類、3が3種類、4が3種類、6が1種類、7が1種類、9が1種類、12が1種類、および16が1種類であった。また、全体をRFLPパターンの類似度80%の基準でグループ分けすると、4菌株以上で構成されるグループが6種類みられ、そのなかで構成菌株数が多い、2種類の主要なグループA、Bが存在した。これら2グループ内には類似度100%の27クラスター103菌株のうち、グループAに3クラスター34菌株 (33%)、およびグループBに8クラスター31菌株 (30%) が含まれていた (Fig. 3)。これら2グループ内の菌株は、いずれもIS6110のバンド数やサイズが1から3本異なるRFLPパターンを示し、グループAは50菌株が19のパターンから、またグループBは38菌株が15のパターンから構成されていた (Fig. 4)。これら2グループ内の患者はいずれも若年層から高齢層まで広く分布し、両者に差はみられなかった (Table 2)。県内の分離株で淡路地区と、それ以外の地区において両グループに相当する分離菌株数を調べたところ、グループAに属する50菌株は淡路地区194菌株中40菌株 (20.6%) で、他の地区79菌株中10菌株 (12.7%) であり、淡路地区でAの割合が多かった。また、グループBに属する38菌株は淡路地区で23菌株 (11.9%)、他の地区で15菌株 (19.0%) が分離されており、Aとは異なる傾向にあったが、淡路地区と他の地区における両グループの菌株の出現頻度は、有意水準5%で有意差はみられなかった。

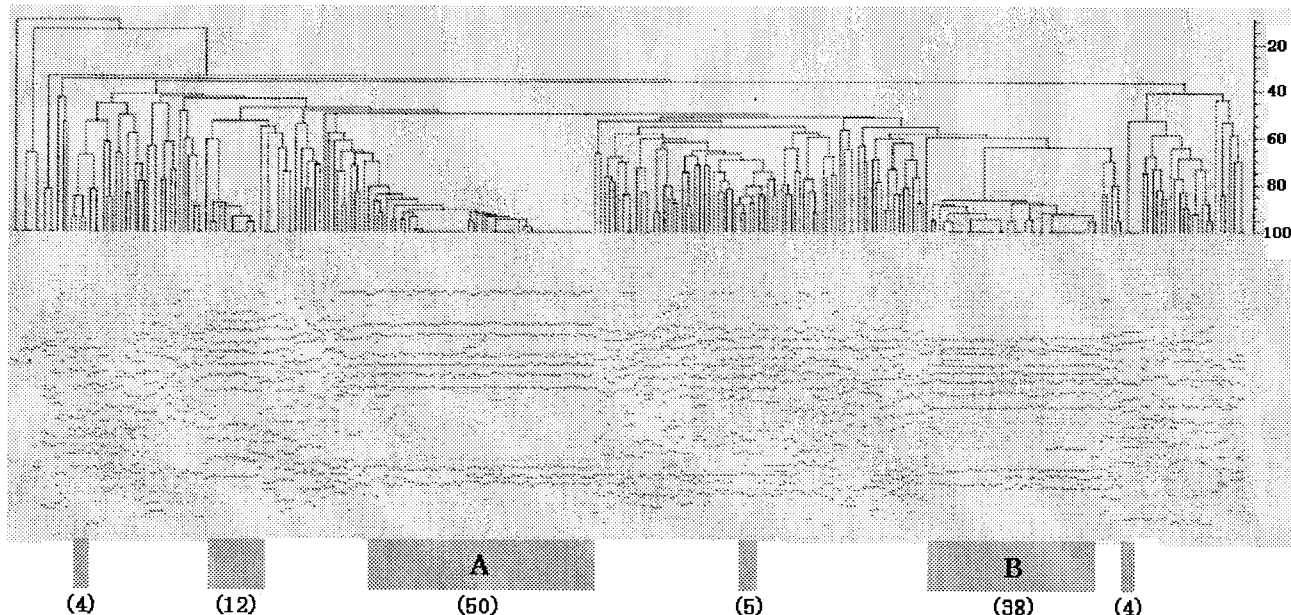


Fig. 3 Dendrogram of IS6110-RFLP of 294 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* based on Dice coefficients and UPGMA clustering : Six kinds of cluster groups defined similarity as 80% similar level were shown under the figure and the inside of parenthesis showed the composition number of strains($n \geq 4$) in the cluster groups. The alphabetic characters (A and B) indicated two large cluster groups shown in Fig. 4.

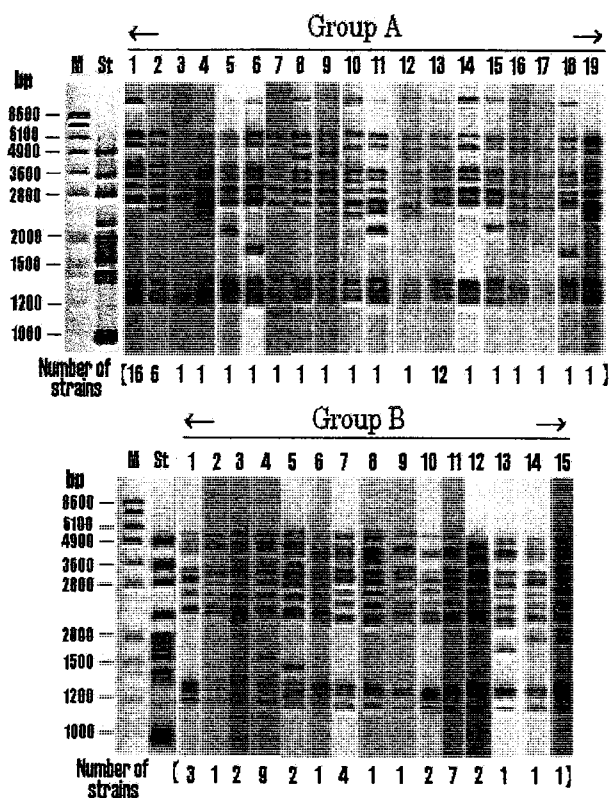


Fig. 4 Strains of the two cluster groups (A, B) to which the genetic homology between strains showed 80% similarity as the result of cluster analysis. M; DNA molecular weight marker VII (Roche Diagnostics GmbH), St.; *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv.

5. 菌株の薬剤感受性とRFLPとの関連性

調査した140菌株の4薬剤INH, RFP, SMおよびEBに対する耐性株の発現頻度は、それぞれ8.6%, 15.0%, 5.7%および11.4%であった。また、これら4薬剤のいずれかに耐性の1剤耐性株は22.9%, 2剤以上の耐性株は5.7%であった。上記A, B両グループ内の菌株については、Aグループ23菌株の4薬剤INH, RFP, SMおよびEBに対する耐性株の発現頻度は、それぞれ17.4%, 21.7%, 8.7%および13.0%であった。Bグループ25菌株の同じ4薬剤に対する耐性株の発現頻度は、それぞれ4.0%, 4.0%, 4.0%および12.0%であった。また、1

Table 4 Proportion of the drug resistant strains about four primary anti-tuberculosis drugs

	Sample* ¹ (n=140) n(%)	RFLP GroupA* ² (n=23) n(%)	RFLP GroupB* ² (n=25) n(%)
Resistance to			
Isoniazid	12(8.6)	4(17.4)	1(4.0)
Rifampin	21(15.0)	5(21.7)	1(4.0)
Streptomycin	8(5.7)	2(8.7)	1(4.0)
Ethambutol	16(11.4)	3(13.0)	3(12.0)
One Drug	32(22.9)	6(26.1)	3(12.0)
Two or more	8(5.7)	3(13.0)	1(4.0)

*1 ; The strain by which drug susceptibility was investigated among 274 strains.

*2 ; The strain by which drug susceptibility was investigated between the strains belonging to the group shown in Fig. 3 and Fig. 4.

剤耐性株はAグループで26.1%, Bグループで12.0%であり, 2剤以上の耐性株はAグループで13.0%, Bグループで4.0%であり, グループAを構成する菌株に薬剤耐性株の発現頻度が高い傾向にあった(Table 4).

IV 考 察

県内の患者から分離された273菌株のRFLP分析の結果, 患者は197の多様なRFLPパターンに分類される菌株によって感染を受けていたことが分かった(Table 3). 一方, 菌株のクラスター解析の結果, 県内の分離株は類似度が高いA, B, 2グループの存在が明らかになった. これら2グループに属する菌株はA, 18.3%, B, 13.9%で全体の32.2%を占めており, 県内に分布する主要な株であると思われる. また, RFLPパターンが一致した27パターンの患者についての疫学調査の結果, 患者間の感染が明らかな事例は, 夫婦間3例6名, 親子間4例8名, 同一職場内1例5名, 同一施設内2例4名, および接触者間4例8名の計14例31名であり, これらの患者はいずれも濃厚接触で感染したものと考えられた. RFLPパターンが一致した患者103名のうち30.1%の患者について疫学的な関連性が証明されたが, 分離株の中で類似度が高い上記2グループ内の患者については, Aグループで18%, Bグループで29%であり, Aグループ内の患者で, 疫学的な関連性が証明されない割合が高かった. 国内の調査においてRFLPパターンが一致した事例から疫学的な調査によって伝播が証明されるのは10%程度であり^{15, 16)}, 海外においても伝播が証明されない事例¹⁷⁾や二次的な調査によって疫学的な関連性が明らかになった事例が報告¹⁸⁾されている. また, 結核の高蔓延地区では分離株のRFLPパターンは同一, あるいは類似したグループを構成し, 結核の罹患が少ない国では分離株のRFLPパターンは類似性のない多様性を示すことが報告されている^{14, 19)}. 国内の分離株にも類似した菌株のグループがみられることが報告されており^{15, 16, 20)}, その理由として過去の結核のまん延時代に感染を受けた世代の高齢化による再燃がRFLPパターンの類似性に表れると考えられている^{15, 16, 20)}. RFLPパターンは過去の流行株による垂直伝播や, 現在の患者間の偶発的な伝播などによって一致する可能性も考えられることから, 類似したグループ内の一致事例については伝播の証明が困難な事例があると推測される¹⁵⁾. しかしながら, 県内の類似度が高い2グループにおいて, いずれも患者の年齢は, 若年から高齢者まで幅広い分布を示しており(Table 2), これらの菌株は現在も県内における感染の有力株である可能性が高いと推測される. また, 類似株によるグループ化の要因

として, 抗結核薬に対する耐性株の増加によって患者が治癒しにくく, 結核が長期化している可能性も考えられることから, 分離株の薬剤耐性について調査したが, 一次抗結核薬の4薬剤について耐性株の発現頻度を県内分離株と全国分離株の成績²⁰⁾を比較すると, 県内分離株はRFPおよびEBの2薬剤に対する耐性株, および4薬剤のいずれかに耐性がある株の発現頻度が有意に(有意水準5%)高かった. また, 県内分離株とグループA, Bに属する分離株の薬剤感受性成績については, いずれも統計的な有意差はみられなかった(有意水準5%)が, グループAに属する患者株の一次抗結核薬に対する耐性株の発現頻度は, すべての薬剤で他の県内分離株の成績よりも高い傾向にあり, このグループ内の菌株に薬剤耐性遺伝子の変異が進行している可能性も考えられた. 一方, グループBに属する患者については, EBを除く3薬剤に対する薬剤耐性株の発現頻度は, 県内分離株のそれよりも低く, 全国の初回治療の患者で分離された耐性株の発現頻度²⁰⁾に近似していることから, 結核の未治療患者を中心としてグループが構成され, 菌株が伝播されている可能性が考えられた.

県内で分離される類似度が高いグループを形成する菌株と薬剤耐性との関連性については, 詳細に調査していく必要があると思われる. そのことによって遺伝子型別に固有の薬剤情報を結びつけることにつながり, 治療に大きく貢献できると考えられる.

V 要 旨

1998年4月から2005年3月の期間において兵庫県内の結核患者から分離された273菌株について, RFLP分析を行った. 分離株のRFLPパターンは197に分かれ, そのうち27パターンに複数の菌株がみられた. パターンが一致した患者間において, 感染が証明された事例は, 同一職場内や同一施設内, および家族内における感染など14例であった. クラスター解析の結果, 分離株には類似性の高い2グループ(A, B)が存在し, これらの菌株は類似度80%の基準で, 解析した分離株全体の32.2%を占めていた. 調査した140菌株の一次抗結核薬(イソニアジド, リファンピシン, ストレプトマイシン, エタンブトール)に対する耐性株の発現頻度は, それぞれ8.6%, 15.0%, 5.7%および11.4%であった. RFLPパターンの類似性が高いグループAは薬剤耐性株の出現頻度が高い傾向にあった.

謝 辞

本稿を終えるにあたり、調査にご協力いただいた兵庫県健康生活部健康局疾病対策課、洲本健康福祉事務所、及び健康福祉事務所の関係者の皆様方、ならびに菌株を提供いただいた医療機関の関係者の皆様方に深謝いたします。

文 献

- 1) 財団法人結核予防会：結核の統計2006，東京(2006)
- 2) CDC：Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs -- Worldwide, 2000--2004. MMWR., 40, 585(1991)
- 3) 森 亨：新たな結核対策の技術と展望. 結核., 79, 587-604(2004)
- 4) van Soolingen, D., Hermans, P. W., de Haas, P. E., Soll, D. R. and van Embden, J. D. : Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains : evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol., 29, 2578-2586 (1991)
- 5) van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R. and Shinnick, T. M. : Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol., 31, 406-409 (1993)
- 6) Takahashi, M., Kazumi, Y., Fukusawa, Y., Hirano, K., Mori, T., Dale, J. W. and Abe, C. : Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Microbiol. Immunol., 37, 289-294 (1993)
- 7) Thierry, D., Cave, M. D., Eisenach, K. D., Crawford, J. T., Bates, J. H., Gicquel, B. and Guesdon, J. L. : IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acids Res., 18, 188 (1990)
- 8) McHugh, T. D. and Gillespie, S. H. : Nonrandom Association of IS6110 and *Mycobacterium tuberculosis* : Implications for Molecular Epidemiological Studies. J. Clin. Microbiol., 36, 1410-1413 (1998)
- 9) Niemann, S., Rusch-Gerdes, S., Richter, E., Thielen, H., Heykes-Uden, H. and Diel, R. : Stability of IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Actual Chains of Transmission. J. Clin. Microbiol., 38, 2563-2567 (2000)
- 10) 兵庫県健康生活部：兵庫の結核統計(平成15年版), (2005)
- 11) van Soolingen, D., Qian, L., de Haas, P. E., Douglas, J. T., Traore, H., Portaels, F., Qing, H. Z., Enkhsaikan, D., Nymadawa, P. and van Embden, J. D. : Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. J. Clin. Microbiol., 33, 3234-3238 (1995)
- 12) 高橋光良, 阿部千代治：ISタイピング法：IS6110をプローブとしたRFLP分析による結核菌の亜分類. 日本細菌学雑誌, 49, 853-857 (1994)
- 13) Mokrousov, I., Jiao, W. W., Valcheva, V., Vyazovaya, A., Otten, T., Ly, H. M., Lan, N. N., Limeschenko, E., Markova, N., Vyshnevskiy, B., Shen, A. D. and Narvskaya, O. : Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR. J. Clin. Microbiol., 44, 2851-2856 (2006)
- 14) Kurepina, N. E., Srevatsan, S., Plikaytis, B. B., Bifani, P. J., Connell, N. D., Donnelly, R. J., van Soolingen, D., Musser, J. M., and Kreiswirth, B. N. : Characterization of the phylogenetic distribution and chromosomal insertion sites of five IS6110 elements in *Mycobacterium tuberculosis* : non-random integration in the *dnaA-dnaN* region. Tuberc. Lung Dis., 79, 31-42 (1998)
- 15) 高橋光良：結核菌DNAのRFLP分析を用いた結核分子疫学の研究と実践. 結核, 78, 641-651(2003)
- 16) 大島律子, 多田敦彦：岡山県内で分離された結核菌DNAのIS6110-RFLPパターン分析. 結核, 77, 629-637 (2002)
- 17) Braden, C. R., Templeton, G. L., Cave, M. D., Valway, S., Onorato, I. M., Castro, K. G., Moers, D., Yang, Z., Stead, W. W. and Bates,

- J. H. : Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J. Infect. Dis.*, **175**, 1446-1452 (1997)
- 18) van Deutekom, H., Hoijsing, S. P., Petra, S. P., de Haas, E. W., Langendam, M.W., Horsman, A., van Soolingen, D. and Coutinho, R. A. : Clustered Tuberculosis Cases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **169**, 806-810 (2004)
- 19) Hermans, P. W., Messadi, F., Guebresabher H., van Soolingen, D., de Haas, P. E., Heersma, H., de Neeling, H., Ayoub, A., Portaels, F. and Frommel, D. : Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands : usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J. Infect. Dis.*, **171**, 1593-1594 (1995)
- 20) 阿野裕美, 森山和郎, 松本智成, 谷川信 : RFLP分析に基づく, 結核感染状況の疫学的検討-当院医療圏である大阪中南部地域の場合-. *結核*, **77**, 783-788 (2002)
- 21) Abe, C., Hirano, K., Wada, M. and Yagi, T. : Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan, 1997. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **5**, 546-556 (2001)

[原著]

動物用抗菌剤の土壌への吸着とその抗菌活性

武 田 信 幸*

Absorption of Antimicrobials to Soils and their Bioavailability

Nobuyuki TAKEDA*

*Life Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health
and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

Three groups of 11 antimicrobials (2 tetracyclines [TCs], 5 quinolones [QLs], 4 sulfa drugs [SDs]) were determined their sorption coefficients K_d (the ratio of the antimicrobial concentrations in the soil phase and in the water) from a batch experiment using a rapid and selective HPLC method developed for this purpose. QLs (oxolinic acid, ciprofloxacin, sarafloxacin, danofloxacin, enrofloxacin) displayed the highest K_d values (range: 26–3385), followed by TCs (oxytetracycline, chlortetracycline. range: 57–729). SDs (sulfadimidine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline. range: 0.4–5.4.) appeared to have little sorption affinity to soil particles. These results show that QLs and TCs can be considered to be immobile, conversely SDs highly mobile in the environment.

Capacity of the soil to absorb the antimicrobials was estimated to be 8 mg/g, suggesting the soil possibly plays as an environmental "reservoir" for antimicrobials. Also the soil/antimicrobial complex was examined on its bioavailability in terms of microbial growing inhibition test with a tester stain *Bacillus subtilis*. A linear relationship has found between the amount of absorbed antimicrobial and the inhibition zone diameter, showing that they are still biologically active and possibly plays as an ecological "reservoir" for antimicrobial resistant bacteria in the environment.

I はじめに

わが国における抗菌剤（抗生物質および合成抗菌剤）の年間生産量は約2000トンと推定され、人用に500トン、動物用に1200トンおよび農業用に300トンと、きわめて大量の抗菌剤が広範囲に使われている¹⁾。人および動物に経口投与された抗菌剤の30–90%は未変化体のまま糞尿として排泄される²⁾。人用の場合は大部分が下水処理施設で除去されて最終的には河川に放流される。また、

牛、豚、鶏など食用動物に治療又は成長促進の目的で用いられたものは、養豚場などに貯留あるいは肥料に転用されるか、もしくは産業廃棄物などとして処理される。一方、鰻などの養殖場では、抗菌剤を含む残余の飼料も魚介類の排泄物もすべてが直接水系へと放出され、農業用では、直接田畑に散布される場合が多い³⁾。いずれにせよ、使用された抗菌剤は環境（水圏・土壌・大気）中に放出される。

サルファ剤など土壌成分との相互作用が少ない抗菌剤は雨水、河川水、湖沼水などの水系を通じて環境を移動すると考えられる。テトラサイクリン類など特有の物理化学的性質を有するものは発生源である家畜場やその周辺土壌あるいは河川流入後では水系底質土壌などに強く保持され、蓄積・残留する可能性がある⁴⁻⁷⁾。

健康科学部

* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究センター
健康科学部 武 田 信 幸

抗菌剤に関して危惧すべき公衆衛生上の問題は、食品に残留することにより引き起こされる人への直接的脅威だけでなく、河川水など環境を通じての間接的な摂取である。さらに、もっとも懸念しなければならないのは抗生物質耐性菌産生との関連性である。例えばバンコマイシン耐性腸球菌などによる院内感染に見られるように、耐性菌産生の一義的原因は人感染症治療における不適切な抗生物質使用といわれる。しかし、いわば“開放系”である農畜水産分野においても、人用の数倍量の抗菌剤が使用されており、食肉からも抗菌剤そのものだけでなく耐性菌も検出されているのが現状である¹⁾。しかし、農畜産分野における抗菌剤使用が、人耐性菌産生にどの程度寄与しているのかは不明なことが多く、またすでに河川水や土壌など環境中に放出されてしまった抗菌剤が、新たな耐性菌産生の原因となるのかなど解明されるべき問題が山積している。

土壌は種々の無機物・有機物を含み、生物作用と化学作用が共生する動的環境である。また、一旦環境中に放出された抗菌剤の移動・蓄積・分解などの挙動を大きく支配すると考えられる。本報では環境中抗菌剤が耐性菌産生におよぼす影響を評価するための基礎資料を得る目的で、食品や河川水などから比較的高頻度で検出されているサルファ剤やテトラサイクリン類、キノロン剤などと土壌との相互作用、およびそれら抗菌剤・土壌複合体の抗菌活性を調べたので報告する。

II 材料と方法

1. 試料

原土は、平成18年度に神戸市内2ヶ所で表層土（表面～約1cm）を採取し、直射日光の当たらない場所で風乾した。大きな土塊は軽く押しつぶして原土全体をふるい分けして礫を除き、粒径2mm以下の細土のみを試料土壌として用いた。生物活性測定用土壌は、オートクレーブ

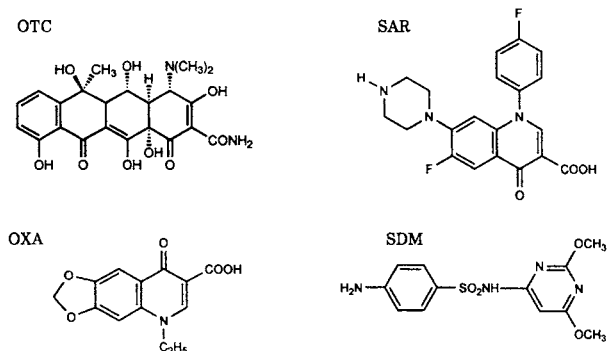


Fig. 1 Structures of the representative antimicrobials investigated.

で滅菌後使用した。

2. 試薬および試液

用いた抗菌剤はテトラサイクリン類 (TCs) 2種類 (オキシテトラサイクリンOTC, クロルテトラサイクリンCTC), キノロン剤 (QLs) 5種類 (フルオロキノロン剤 (FQs): シプロフロキサシンCIP, サラフロキサシンSAR, ダノフロキサシンDAN, エンロフロキサシンENR, 酸性キノロン剤 (AQs): オキシリン酸OXA) およびサルファ剤 (SDs) 4種類 (スルファジミジンSDD, スルファメトキサゾールSMZ, スルファジメトキシシンSDM, スルファキノキサリンSQX) の計11種類で、その分析用標準品は和光純薬工業 (OTC, TC, CIP, OXA), 林純薬 (SAR, DAN) および関東化学 (OFL, ENR) より購入した。標準品はメタノールに溶解して250 μ g/mL溶液とし、適宜混合・希釈して用いた。TCsは不安定なため冷凍庫に、他は冷蔵庫で保存した。

TCs, FQs およびOXAのHPLC移動相に用いるマグネシウムイオン含有緩衝液 (Mg Buff, pH6.0) は、無水酢酸ナトリウム 8.2g, 酢酸マグネシウム 10.7gおよびEDTA \cdot 2Na 0.4gを精製水1Lに溶解した後、酢酸でpHを6.0として調製した。SDsの蛍光誘導体試薬はフルオレスカミン (和光純薬工業社製) を0.001%となるようにアセトンに溶解した。

メタノール (MeOH), アセトニトリル (AcCN) は

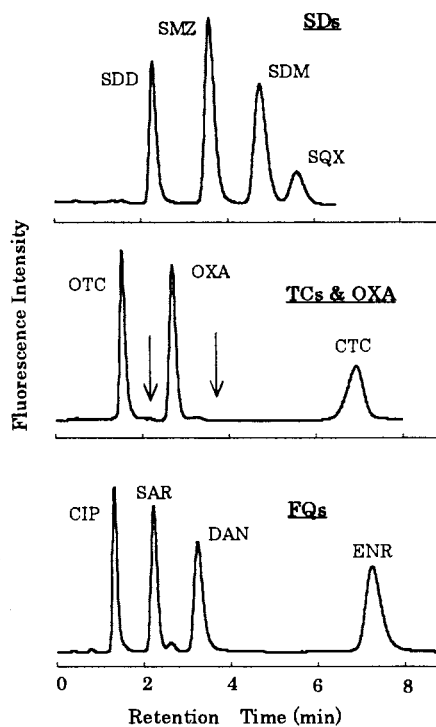


Fig. 2 Separation of the antimicrobials investigated. Arrows indicate times of wavelength and sensitivity changes.

HPLC用(和光純薬社製)を, その他の試薬は市販特級品を用い, 精製水はMilli-Q純水製造装置(ミリポア社製)で調製した。

抗菌剤検出キット・LAST(Live Animal Swab Test)はチッソ(株)から購入した。試験菌芽胞液(*Bacillus subtilis*), 寒天培地(直径6 cm)および菌液塗布用滅菌綿棒などが同梱されている。

3. HPLC装置および測定条件

高速液体クロマトグラフ(HPLC)は(株)島津製作所製LC-10Aシステムを用いた。土壌と抗菌剤の相互作用の検討対象としたのはTCs(OTC, CTC), QLS(FQ: CIP, SAR, DAN, ENR, AQs: OXA)およびSDs(SDD, SMZ, SDM, SQX)の3グループ11抗菌剤である。Fig. 1に各グループ代表例の化学構造を示した。

分析には従来カラム(15cm, 5 μ g)に比較して極めて短く(2 cm)小さな粒子(3 μ m)を充填したAtlantis dC18(内径4.6mm, Waters社製。カラム温度: 40°C)を導入した。その結果, Fig. 2に示したように高流速でも高い分離能を示し, 各抗菌剤が8分以内でベースライン分離し, 効果的に分析時間の短縮ができた。

土壌抽出液は種々の有機物を含んでいるため紫外外部吸収検出法では妨害物の影響が考えられ, 近年よく使用される質量分析(LC/MS)法ではマトリックス効果有無の評価が困難である。そこで, 特異性と感度が高い蛍光検出法を適用した。蛍光を有しないSDsはフルオレスカミンで蛍光化した後, 移動相ACN-MeOH-0.1Mクエン酸(1.5:2.5:6)を用い, 測定波長(励起/蛍光)400nm/495nmで定量した⁸⁾。蛍光強度が小さいTCsは移動相にMg²⁺を添加して蛍光強度を増大させて検出した⁹⁾。また, 測定を迅速に行うためOXAとTCsを同時測定することとしたが, OXAは酸性化合物, TCsは両性化合物であり, OXAの蛍光強度はTCsより10倍程度大きい。そこで, 移動相のパラメーター(pHおよび有機溶媒の種類とその含量)とLCメソッドのタイムプログラムを検討し, 移動相をMg Buff (pH6.0) - MeOH (1:9)とし, 分析途中で波長変更(TCs: 380nm/520nm, OXA: 320nm/365nm)と感度変更を行った。この移動相はFQs(CIP, SAR, DAN, ENR)も良好に分離した。FQsは各ピークがクロマトグラム上で類似の高さとなるように295nm/455nmで測定した。DANのみはなお感度が高いため低濃度の標準溶液を用いた。土壌と反応溶液(CaCl₂)との接触時間が長くなるほど, 注入溶媒の溶出位置に試料由来のピークが大きく認められるようになったが(TCs/OXAグループ), 各抗菌剤の保持時間付近には分析を妨害するピークはなかった。

目的とした11抗菌剤を個別イソクラティックあるいはグラジエント方式で分析する場合, 移動相の交換や再平衡化などに手間と時間を要し, 抗菌剤と土壌の相互作用を検討する目的には適さない。本LC条件を用いた場合, 8分以内にすべての抗菌剤が溶出し, 相互の検出を妨害しない(Fig. 2)。同一移動相がTCs/OXAおよびFQs測定に使用可能であり簡便である。しかも分析用検液は, 一部をSDs誘導体化用, 残余をTCs/AQs/FQs測定用とするため, 1試料溶液だけを調製するだけでよい。その結果, 本LC法で, 土壌と抗菌剤の相互作用を個別ではなく混合状態で検討できる新しい手法を提示することができた。

4. 土壌吸着実験および抗菌活性測定

土壌吸着実験は「OECD Test Guideline 106」⁸⁾に従い, 10mM CaCl₂溶液を用いるバッチ法で行った。3グループ11抗菌剤標準溶液をCaCl₂溶液で希釈して各1 μ g/mLの混合溶液とした。試料土壌100mgを栓付プラスチック製遠沈管(2 mL)に秤取し, 抗菌剤CaCl₂溶液1 mLを加え, 初期濃度が10 μ g/g Soilとなるよう調製した。ただし, HPLC測定が容易になるように, CTCおよびDANはそれぞれ20 μ g/g Soilおよび3 μ g/g Soilとした。遠沈管は栓をしたのち約100回/minの速度で水平方向に一定時間振とうし, 抗菌剤を土壌に吸着させた。10,000 rpmで1分間遠心分離し, 上清をHPLC用検液とした。この操作の前後のピーク高の差から土壌に吸着された抗菌剤の量を算出した。

土壌への最大結合量を求める実験では試料土壌20mgを用い, テトラサイクリン類およびキノロン剤混合溶液(各20 μ g/mL)1 mLを加えて各々1mg/g Soil(但し, CTCおよびDANは10, 1.5mg/g)とし, 50分振とうした。上清をHPLC用検液として採取した後, 新たに抗菌剤混合溶液1 mLを加えて同様に反応させた。これを計5回繰り返す, その都度土壌への吸着量をLCで測定し, 合算して結合量を求めた。

抗菌剤・土壌複合体の生物活性検定は, 抗菌剤の代表例としてOTCを用い, 試験菌を*Bacillus subtilis*とした阻止円形成法で行った。土壌20mgにOTC標準を6段階希釈したCaCl₂溶液1 mLを加えて0.08-3.1mg/g Soilとなるように調製し, 50分振とうしてOTCを土壌に吸着させた。遠心分離して上清を除去した後, 2 mLの10 mM CaCl₂で2回洗浄した。遠沈管器壁や土壌中の残余水分は, 細く切った濾紙を表面に軽く附着させて吸い取り, 吸着されなかった抗菌剤を完全に除去した。次に, 前もって試験菌を塗布した培地にアルミニウム製カップ(内径6.5mm x 高さ5.2mm)を置き, そのカップ内にスパー

テルで試料土壌を移し、寒天培地と十分接触するように軽く押し付けた。さらに、10 μ Lの10mM CaCl₂を加えて冷蔵庫に30分放置し、浸潤させた。30 $^{\circ}$ Cで一晩培養し、阻止円の直径を測定した。陽性対照には同梱のネオマイシン・ディスクを用いた。

III 結果および考察

1. 抗菌剤の土壌への吸着

1.1 土壌吸着係数(Kd)の測定

農薬やPCBなど種々の有害化学物質は、発生源の違いとそれぞれの物理化学的特質に規定されて環境中に分布する。気化を通じて大気中へ散逸し、河川や湖沼などの水系内で希釈・分解する一方、魚介類などの生物や浮遊粒子状物質・底質土壌などに取り込まれて濃縮・蓄積される。この際、土壌は物質の吸着・脱着が行われる“貯蔵庫”として機能し、化学物質の環境内移動で重要な役割をする。有機化合物がどの程度土壌に吸着されるのかを示す指標として、一般に土壌吸着係数(Kd)が用いられる。この値は、有機化合物の水溶液と土壌とを一定時間接触させた後のそれぞれの化合物濃度比として表される($K_d = C_{soil} / C_{aq}$)。小さな値を示す化合物ほど土壌に吸着されにくく、したがって雨水などの作用により土壌表面から地中へ浸透しやすい。逆に大きなKd値を有する物質は土壌中に貯留もしくは濃縮される場合がある。Kd値は、同じ化合物でも土壌の種類によってかなり変動する。有機質や粘土質含量の高い土壌は一般的に大きなKd値を与えるとされるが、化合物自体の化学構造でさらに大きく影響される^{7, 10)}。

今回用いた試料土壌は、畑地や家畜場土ではなく都市部における通常の表層土から採取した粒径2mm以下の細土である。粘土・シルトおよび砂含量の差による土性の分類は行わなかったが、土壌Aは砂の感触が強く、粘り気はわずかしかなことから、粘土含量の低い砂壤土に分類できると思われる。土壌Bも類似の土性であったが外観はやや黒色であることから軽度の腐植質を含んでいると考えられた。化学物質の土壌吸着実験では単独物質で行われることが多いが⁷⁾、現実的には複数(群)の化合物が同時に存在していると思われる。そこで、本報告では3群・11抗菌剤を混合添加して吸着実験を行った。

各抗菌剤群代表例の土壌吸着率の時間変化をFig. 3に示した。酸性キノロン剤(OXA)の土壌Aへの吸着率は60%とやや低いものの、テトラサイクリン類(OTC)およびフルオロキノロン剤(SAR)では共に反応10分で反応溶液の95%に相当する量が土壌に吸着した。一方、サルファ剤は殆ど吸着されず、反応を22時間に延長した後

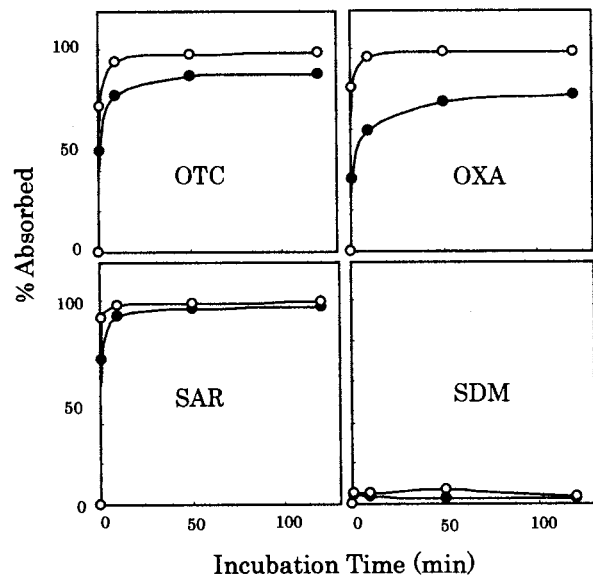


Fig. 3 Antimicrobial sorption on different soils as a function of time Closed circle : Soil A, open circle : Soil B.

も同様であった。このことを他の抗菌剤と共に土壌吸着係数(Kd値)としてTable 1に示した。抗菌剤の土壌への移行がほぼ平衡に達したと考えられる120分でのKd値で比較すると、テトラサイクリン類および酸性・フルオロキノロン剤がそれぞれ57–729 L/kgおよび26–3385 L/kgという値であったが、サルファ剤は0.2–4.1 L/kgという極めて小さな値であった。これは既報値(テトラサイクリン類: 490–1620 L/kg, 酸性キノロン剤: 70–116 L/kg, フルオロキノロン剤: 310–5610 L/kg, サルファ剤: 0.6–4.9 L/kg)とほぼ同様であった⁷⁾。すなわち、サルファ剤はこれら4群の抗菌剤ではもっとも土壌に吸着されにくく、逆にフルオロキノロン剤はもっとも吸着能が大きい。ついで、酸性キノロン剤およびテトラサイクリン類という順序であった。このことから、SDsは環境中で土壌よりもむしろ水系に存在する確率が高く、逆にテトラサイクリン類などは表流水よりもむしろ底質や浮遊粒子状物質に吸着して存在しているのではないかと推察された。Kolpinらによるアメリカ139河川での調査では、表流水中のテトラサイクリン類(OTC)およびフルオロキノロン剤(CIP)検出率は各々1.2%および2.6%であったのに対し、サルファ剤(SMZ)は19%と高い検出率であった⁵⁾。アメリカでの動物用抗菌剤の使用実態調査によると、全抗菌剤に占めるテトラサイクリン類の割合は15.8%であるのに対しサルファ剤は2.3%である²⁾。環境からの検出率と環境への放出量(使用量)が逆転している。抗菌剤の環境内挙動は土壌の影響を大きく受けている可能性が示唆される。

一般的にKd値は化合物の脂溶性と正の相関が、水溶

Table 1. Distribution coefficients, Kd (L kg⁻¹), of antimicrobials for two soils.

Incubation (min)		Soil A					Soil B				
TCs		OTC		CTC			OTC		CTC		
	1	8		32			23		38		
	10	26		88			138		181		
	50	51		153			368		359		
	120	57		336			613		729		
QLs		OXA	CIP	SAR	DAN	ENR	OXA	CIP	SAR	DAN	ENR
	1	4	33	19	57	36	36	213	94	287	180
	10	12	169	91	277	224	208	697	376	857	715
	50	21	371	185	667	560	496	1612	870	2160	1610
	120	26	527	235	867	772	817	2794	1348	3385	2906
SDs		SDD	SMZ	SDM	SQX		SDD	SMZ	SDM	SQX	
	1	0	0.4	0.2	0.4		0.6	0.4	0.9	1.7	
	10	0.3	0.3	0.4	0.7		0.7	0.5	1.1	2.9	
	50	0.3	0.2	0.4	0.6		0.8	0.4	1.3	4.1	
	120	0.3	0.2	0.4	0.7		1	0.7	1.5	4.1	
	22hrs	0.5	0.4	0.6	1.1		1	0.4	1.7	5.4	

Antimicrobial and soil (10 μ g/g except for CTC (20 μ g/g) and DAN (3 μ g/g) were incubated in 10mM CaCl₂ for various length of time. Values are mean of two replicates.

解度（極性の高さ）と負の相関があるとされている¹¹⁾。分子量が大きく脂溶性の高いマクロライド系医薬品のアバメクチンやタイロシン（マクロライド系抗生物質）のKd値は7-130の範囲であり、ジクロロベンゼンでは100-800である^{7, 12)}。テトラサイクリン類およびキノロン剤はその化学構造（Fig. 1）から類推される極性の高さに反して、Kd値は極めて大きい（Table 1）。また、土壌への移行は極めて迅速である（Fig. 3）。これらのことから、両抗菌剤群の土壌への吸着機構は従来考えられていたような化合物の脂溶性に応じた土壌表面の有機質への穏やかな分配ではなく、土壌中の金属成分とのイオン結合やキレート形成による特異的吸着現象と理解すべきであろう。テトラサイクリン類は強いキレート形成能を有していることや¹³⁾、キノロン剤が静電作用により土壌粘土の層間隙へ侵入し成分鋳物と結合することなどが報告されている¹⁴⁾。

土壌の違いで見ると、土壌Bが土壌Aよりすべての抗菌剤において大きなKd値を有している（Table 1）。OTCでは10倍、OXAでは30倍、フルオロキノロン剤では1.5-5倍程度大きい。土壌Bが目視的に有機質をより多く含んでいること以外はこれら大きな差の要因は不明であった。

クロラムフェニコール、オラキンドックス（キノキサリン系抗菌剤）、サルファ剤などは土壌の差異を反映せず、いずれも小さなKd値を示すが、OTC、OXAやENRなどでは本報と同様に、土壌の採取場所によって100倍以上もKd値が異なることが報告されている^{7, 12)}。既述し

たように土壌成分は抗菌剤の環境内移動を規定する大きな要素である。鰻などの養殖池や河川の底質土、畑地や水田土壌、牛・豚・鶏などの家畜場土などではそれぞれ土性も違い、使用されている動物用医薬品の種類も異なる。環境中抗菌剤のリスク評価には、これら要因の詳細な検討が必要である。

1.2 土壌の抗菌剤最大吸着能の測定

では、土壌はどの程度の量の抗菌剤を保持できるのだろうか。Kd値測定や吸着メカニズムの報告は多いが最大結合量についての報告は見当たらない²⁾。そこで、吸着能が大きかった土壌Bを用い、テトラサイクリン類とキノロン剤について結合飽和量を測定した。Fig. 4に示したように、土壌1gは約0.4mgのOTCを吸着し、CTCおよびOXAではそれぞれ約1.2mgが結合飽和量であった。フルオロキノロン剤ではテトラサイクリン類のような飽和に至ることはなかったが、最大結合量はDANが0.7mg/g、ENRとSARが各々1.5mg/g、CIPは最大では2.2mg/g以上に達した。その結果、最大結合した場合を考えると土壌1g当たり約8mgもの抗菌剤が保持されることとなる。この値を、1m四方で深さ10cm（100kg）の仮想の土壌（土性は本報と同一、密度は1g/cm³）が存在するとなると、約800gの抗菌剤がそこに存在することになる。“貯蔵庫”としての土壌の容量はかなり大きいといえる。

2. 抗菌剤・土壌複合体の生物活性

土壌に保持された抗菌剤がなお生物学的に活性か否かは、環境中での耐性菌産生を考える上で最も重要な課題であるが、このことに関してはChanderらが報告しているのみである¹⁹⁾。彼らは、テトラサイクリンまたはタイロシンと土壌の混合物を*Salmonella sp.*または*E. coli*の液体培養液と反応させ、コロニー形成能を指標として抗菌活性を測定し、それらの複合体が活性であることを示した。本報では試験菌・*B. subtilis*を塗布した平板上のカップ内に、6段階の濃度のOTCを吸着させた土壌(0.06–1.4mg OTC/g Soil)を装置し、阻止円が形成されるか否かを検討した。その結果、Fig. 5に示したように、本条件においても土壌に吸着した状態の抗菌剤が生物活性を示しうることが明らかになった。0.06および0.12mg/g Soilでは阻止円は形成されなかったが、0.25mg/g Soilからは吸着したOTC量に比例した大きさの阻止円が形成された。直径10mmの阻止円(アルミカップ外径 + 左右1mm)を検出限界とした場合、Fig. 5の直線回帰式から求めたOTC・土壌複合体の検出限界値は0.15mg/g Soilであった。用いた土壌は20mgであるから、この値はOTC 3 μg/cupに相当する。既報¹⁹⁾から計算した本法のOTC検出限界は0.2μg/cupである。土壌に吸着されていたOTCの約1/15が試験菌に利用されたことになる。

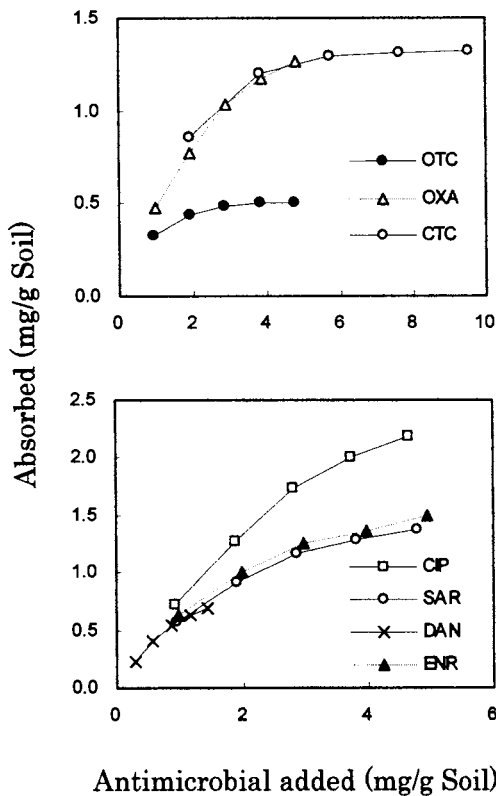


Fig. 4 Maximum sorption capacity of Soil B for TCs, OXA and FQs

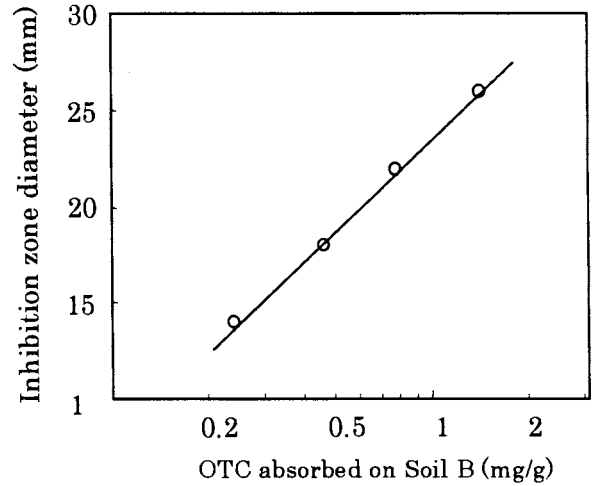


Fig. 5 Antimicrobial activity of OTC/Soil complex.

本法では、試験菌は寒天平板上に、抗菌剤・土壌複合体はアルミカップ内に固定されていて移動できない。従って、阻止円が形成されたのは試験菌が抗菌剤・土壌複合体を体内に取り込んだ結果ではなく、土壌中の抗菌剤が寒天平板内に浸潤・拡散して試験菌に到達したと考えるのが自然である。実際の農土から検出されるレベルはテトラサイクリンで0.1–0.9μg/g Soilであり²¹⁾、実験濃度(mg/gレベル)より極めて低い。しかし、前述のように土壌の抗菌剤吸着容量は非常に大きいので、動物糞尿と直接接触する家畜飼育場や農業用抗菌剤が直接散布される農地などには高濃度蓄積部位があると予想される。そこから降雨や冠水などある種の条件変化により、生物活性を示す程度の量の抗菌剤が溶出してくる可能性は高い。一方、環境中で細菌類が食作用(ファゴサイトーシス)によって抗菌剤・土壌複合体を直接取り込む可能性は、細菌類の大きさが~4 μm、土壌粘土の粒径は2 μm以下であることを考えると、それほど高くはないであろう。しかし、土壌にはミミズなどの生物種が数多く生息しており、それらが複合体を直接摂取した後抗菌剤を土壌から遊離させ、細菌に取り込み易くしていることも考えられる。

抗菌剤・土壌複合体は阻止円を形成し得たが、このことが意味しているのは抗菌剤が土壌に吸着されても間接的に微生物体内に進入可能であるという事実だけである。耐性菌産生に必要な条件がひとつ満足させられただけであり、耐性菌産生を意味しているのではない。耐性菌産生には、一定濃度・一定時間以上の抗菌剤との接触、いわば「選択圧」が必要である。1 μg/L以下程度の低濃度の表流水⁵⁾ではその「圧」は低く、数百μg/kg程度が存在する土壌はその「圧」を保持しているものと思われる。“貯蔵庫”としてかなり大きな容量を有している土

壤は、吸着している抗菌剤が直接的に細菌類に取り込まれるならば強大な「耐性菌工場」となるであろうが、間接的にしか摂取されないのであれば巨大な「倉庫」となるだけである。

人体内で産生される耐性菌は疾病の治療という明確な目的の元に副次的に出現しており、適正な使用がなされれば制御可能となろう。また、成長促進などの目的で投与された結果生み出されている食用動物由来耐性菌も統制可能な範囲かもしれない。しかし、環境中に「選択圧」となる量の抗菌剤が存在するならば、耐性菌産生に関する統御は不可能となろう。土壌・抗菌剤複合体の生物活性は、本報告を含めTC/OTC/タイロシンの3種類しか検討されていない。他の抗菌剤についても同様の検討が必要であり、種々のフィールド土壌の抗菌剤残留調査も必要である。人の健康と環境の保全を考える上で、環境中に放逸された抗菌剤の消長と生物に対する影響の研究が不可欠であると考ええる。

IV 要 旨

環境中での耐性菌産生の可能性を考察するため、簡便で選択性の高いHPLC分析法を開発し、3グループ11種の動物用抗菌剤（テトラサイクリン類[TCs]、キノロン剤[QLs]、サルファ剤[SDs]）について、土壌吸着係数(Kd)を測定した。SDsのKd値は最も小さく(〜5)、次いでTCs(57〜729)、QLs(26〜3385)であった。このことから、SDsは土壌より水系に存在しやすいこと、TCsは土壌に吸着されやすいこと、QLsは土壌に残留されやすいことを明らかにした。また、土壌が結合できる抗菌剤の最大量はおおよそ8 mg/gと試算し、土壌の“貯蔵庫”としての容量がかなり大きいことを示した。さらに、阻止円を測定する微生物試験法を用いて、抗菌剤は土壌に吸着されていてもなお生物学的に活性であることをしめし、土壌に残留したTCsやQLsが環境内で耐性菌を産生する可能性を示唆した。

謝 辞

抗菌剤の生物活性測定法の御指導を頂いた当研究センター感染症部西海弘城主任研究員に深謝いたします。

文 献

- 1) 田村豊：動物用抗菌剤の使用動向と薬剤耐性菌対策。日獣会誌, 56, 685-691(2003)
- 2) Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B. : A

global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. Chemosphere, 65, 725-759 (2006)

- 3) 日本植物防疫協会：農薬要覧2005, p92-93, 東京(2005)
- 4) 清野敦子, 益永茂樹, 中西準子, 古荘早苗：水環境中における医薬品の検出。第37回日本水環境学会講演要旨集, P. 344 (2003), 熊本
- 5) Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Buxtom, H.T., Barber, L.B. and : Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. Environ. Sci. Tech., 36, 1202-1211 (2002)
- 6) Thiele-Bruhn, S. : Pharmaceutical antibiotics in soil: A review. J. Plant Nutr. Soil Sci., 166, 145-167 (2003)
- 7) Tolls, J. : Sorption of veterinary pharmaceutical in soils: a review. Environ. Sci. Tech., 35, 3397-3406 (2001)
- 8) Takeda, N. and Akiyama, Y. : Pre-column derivatization of sulfa drugs with fluorescamine and high-performance liquid chromatographic determination at their residual levels in meat and meat products. J. Chromatogr., 558, 175-180 (1991)
- 9) 武田信幸, 西海弘城：金属キレート樹脂を用いた前処理法による畜水産食品中のオキシテトラサイクリンの分析, 食衛誌, 41, 364-367 (2000)
- 10) OECD, 1997 : OECD guidelines for testing chemicals, test guide line 106: absorption/desorption using a batch equilibrium method. Revised Draft Document OECD, Paris, pp. 1-26
- 11) 金澤純：農薬の環境科学, p.103-123, 合同出版, 東京(1994)
- 12) Kile, D.E., Chiou, C.T. Zhou, H., Li, H. and Xu, O. : Partition of nonpolar pollutants from water to soil and sediment organic matter. Environ. Sci. Tech., 29, 1401-1406 (1995)
- 13) 山辺茂：医薬品分子論, p.9-12, 朝倉書店, 東京(1968)
- 14) Nowara, A., Burhenne, J. and Spittler, M. : Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. J. Agric. Food Chem., 45, 1459-1463 (1997)

15) Chander, Y., Kumar, K., Goyal, S.M. and Gupta, S.C. : Antibacterial activity of soil-bound antibiotics. J. Environ. Qual., **34**, 1952-1957 (2005)

16) 神保勝彦 : 畜水産食品中の残留抗菌性物質の微生物学的検査法, 食衛誌, 40, J-195-J-202 (1999)

Evaluation of Air Temperature measured at the Site established in Rooftop Gardening

Masahide AIKAWA^{1*}, Takatoshi HIRAKI¹, Jiro EIHO¹ and Takeyuki SONODA²

¹ *Atmospheric Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, 654-0037, Japan,*

² *Air Pollution Control Division of Hyogo Prefectural Government,
5-10-1 Shimoyamate St., Chuo-ku Kobe, 650-8567, Japan*

The air temperature was measured to examine the mitigation effects of rooftop gardening on air temperature by using buildings with different surface coatings of rooftops. The air temperature measured at the site with a rooftop garden (Site C) was lower than those measured at other sites where there was no rooftop gardening. Site C showed a lower air temperature than other sites from early-evening to early-morning (15:00 - 6:00) in the summer season and in the afternoon and at night (14:00 - 8:00) in the winter season.

I INTRODUCTION

The urban heat island phenomenon has been intensively studied with the objective of limiting thermal pollution in urban areas all over the world¹⁻⁹⁾. Alteration of the earth's surface property as well as anthropogenic waste heat is the main causes of urban heat island phenomena. Rooftop gardening is considered one of the effective countermeasures to this urban heat island phenomenon. Some examinations of the effects of rooftop gardening have been carried out¹⁰⁻¹²⁾ and heat balance has been also studied^{13,14)}. Furthermore, numerical simulations have been carried out¹⁵⁾. Air temperature was measured to examine the mitigation effects of rooftop gardening on air temperature by using buildings with different surface coatings on the roof in the study.

II MATERIALS AND METHODS

1 Monitoring sites

1.1 Monitoring site

Air temperature was measured at four sites on the roof of three buildings of the Hyogo Prefectural Government: No.1, No.2, and No.3. The distance of each building is as follows: No.1-No.2: 100 m, No.1-No.3: 200 m, and No.2-No.3: 100 m. The conditions of the sites such as the height of the buildings are summarized in Table 1. The flowering grasses were planted on the roof of the No.2 building, and replanted twice a year. A solar photovoltaic system is installed on the roof of the No.1 building; therefore air temperature was measured at two sites on the roof of the No.1 building: near the solar photovoltaic system and 25 m away from the solar photovoltaic system. Air temperature measured on the roof of the No.3 building was used as the control of the other sites. Outlines of the roofs of each building are illustrated in Fig. 1 and summarized in Table 1.

¹ 大気環境部 ² 兵庫県環境管理局大気課

* 別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究センター

大気環境部 藍川昌秀

Table 1 Outline of roof each building

	Elevation above sea level m	Height above ground level m	Total area m ²	Material of foundation bed	Area of solar photovoltaic system m ²	Area of gardening m ²
No.1 building	55	53.6	2032	concrete	81.3	—
No.2 building	55	53.4	1149	concrete	—	260
No.3 building	55	59.9	1578	concrete	—	—

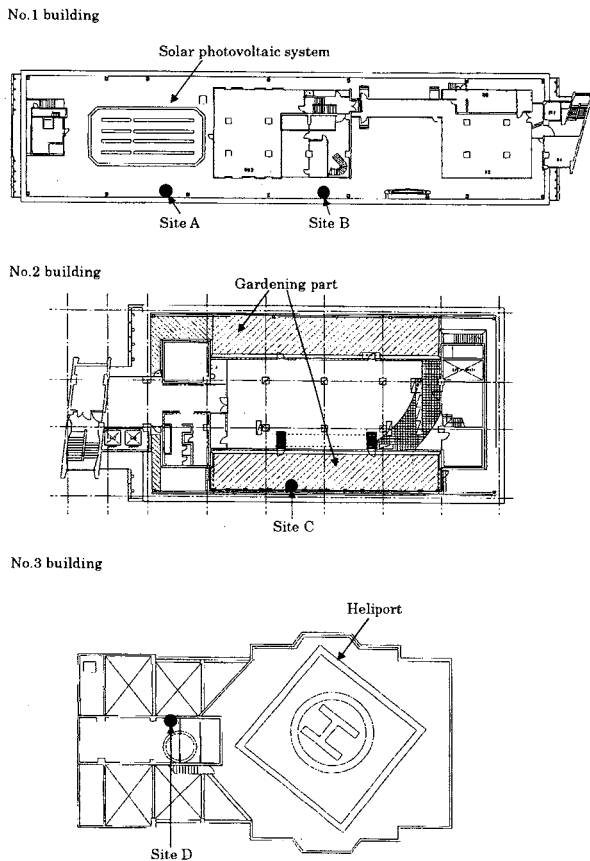


Fig. 1 Outline of roof of each building and monitoring sites.

1.2 Survey area

The buildings of the Hyogo Prefectural Government -- No.1, No.2, and No.3 -- are located in Kobe City, Hyogo Prefecture, Japan (Fig. 2). Population and industrial activities are concentrated in this area, and there are many commercial facilities and roads with heavy traffic, resulting in one of the most urbanized areas in Japan.

2 Data acquisition and data correction

2.1 Data acquisition

Air temperature was measured on a 30-minute basis, and the air temperature measured on the

hour every hour was used for analyses. The 30-minute base air temperature was measured by a thermometer (TR-72U, T&D Corp., Nagano, Japan) calibrated with a thermostat and installed in a simple naturally ventilated thermometer shelter (CO-RS1, CLIMATEC Inc., Tokyo, Japan) positioned about 1.5 m above the rooftop.

Air temperature has been measured since December 2005. The data from December 2005 to January 2007 was analyzed in the present study.

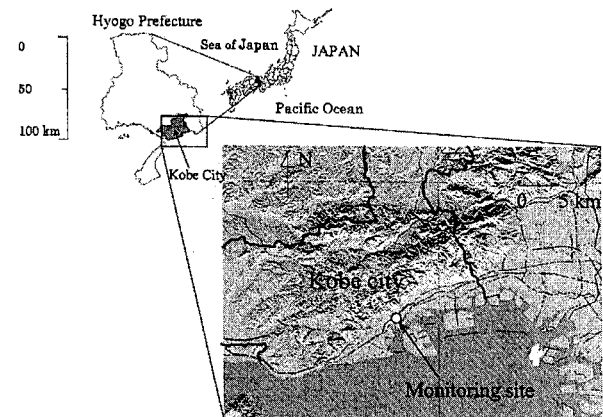


Fig. 2 Location of Kobe City, Hyogo Prefecture, and Japan.

2.2 Data correction

As summarized in Table 1, the elevation of the sites was different, thus the air temperature data was corrected by a moist-adiabatic lapse rate (0.6 °C/100 m) when the data was compared.

3 Rooftop gardening

A brief description of rooftop gardening employing is summarized in Table 2.

III RESULTS AND DISCUSSION

1 Monthly mean air temperature

Fig. 3 shows a time series of the monthly mean

Table 2 Brief description of rooftop gardening

	Vegetation	Depth of growth cm	Method	Condition of watering					
				Frequency			Amount a watering / m ³		
				Summer	Spring, Autumn	Winter	Summer	Spring, Autumn	Winter
South-facing side	Flowering grasses	7	Manual	4 times a week	2 times a week	once every 2 weeks	7-8	4-5	Less than 5
North-facing side	Sedum	2-3	Manual	-	-	-	-	-	-

air temperature at each site. Some differences can be observed in each month although the air temperatures seem to be similar values. In addition, the differences appear to show seasonal variations in that the air temperature at site D was higher than those at other sites in the summer season (June, July and August) and the air temperature at site C was lower than those at other sites in the winter season (December, January and February).

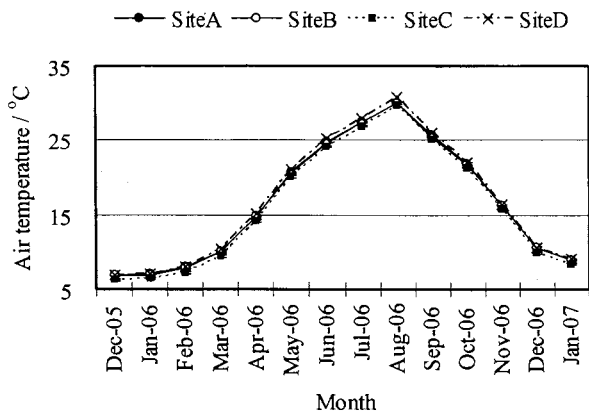


Fig. 3 Time series of the monthly mean air temperature at each site.

2 Difference in air temperature

Fig. 4 shows a time series of the difference in monthly mean air temperature between sites A, B, C and site D. The difference in air temperature showed a negative value, meaning that the air temperature at site D was higher than those at other sites. The reason for the higher air temperature at site D is unidentified. In addition, the difference in air temperature between site A and site D was close to that between site B and site D, furthermore the difference in air temperature between sites A, B and site D was smaller than that between site C and site D, showing that the air temperature at site C was the lowest among the four sites.

The difference in air temperature demonstrated a clear seasonal variation: smaller in the winter

season and larger in the summer season.

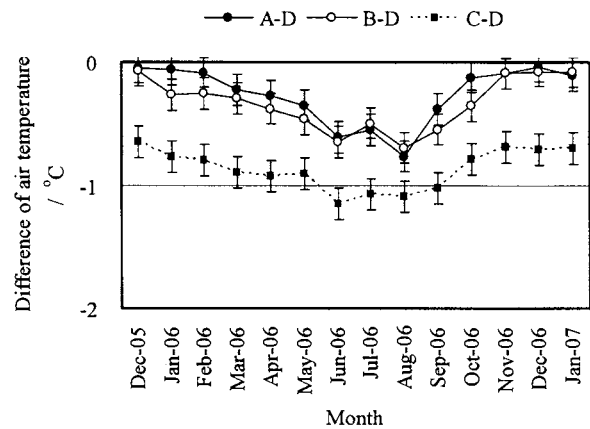


Fig. 4 Time series of the difference of the monthly mean air temperature between the site A, B, C and the site D.

3 Diurnal variation

Fig. 5 shows the diurnal variation in air temperature at each site in August and December 2006.

In the diurnal variation in August, the air temperature at site D was always higher than those at other sites all through the day, particularly in the midday. On the other hand, the air temperatures at sites A, B and C were similar from 7:00 to 14:00, while the air temperature at site C was lower than those at sites A and B from 15:00 to 6:00.

In the diurnal variation in December, the air temperatures at all sites were close to each other from 9:00 to 13:00. Furthermore, the air temperatures at sites A, B and D were similar all through the day. On the other hand, the air temperature at site C was lower than those at other three sites from 14:00 to 8:00.

The diurnal variation can be summarized as follows.

1. Site D showed a higher air temperature all through the day in the summer season.
2. Site C showed a lower air temperature from

early-evening to early-morning (15:00 - 6:00) in the summer season.

3. All sites showed a similar air temperature in the morning (9:00 - 13:00) in the winter season.
4. Site C showed a lower air temperature in the afternoon and at night (14:00 - 8:00) in the winter season.

The summary on the diurnal variation in air temperature likely indicates that the effect of the rooftop gardening easily appeared in the air temperature at night not only in the summer season but also in the winter season.

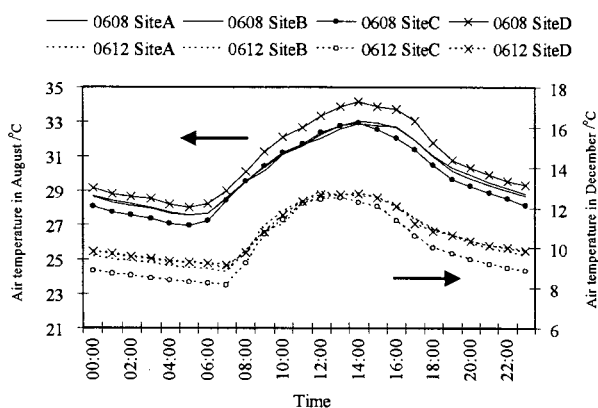


Fig. 5 Diurnal variation of the air temperature at each site in August and December 2006.

IV CONCLUSION

Air temperature was measured to examine the mitigation effects of rooftop gardening on air temperature by using buildings with different surface coatings of the roof. The monthly mean air temperature measured at the site established in the rooftop garden (Site C) was lower than those measured at other sites where there was no rooftop gardening (Sites A, B and D) all through the year. The difference in air temperature between site C and sites A, B, and D was larger at night than in the daytime not only in the summer season but also in the winter season.

V ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Professor Dr. Masakazu Moriyama of Kobe University for his

support with the calibration of the thermometer.

REFERENCES

- 1) Oke, T.R.: City size and the urban heat island. *Atmospheric Environment* **7**, 769-779 (1973)
- 2) Oke, T.R. and Maxwell, G.B.: Urban heat island dynamics in Montreal and Vancouver. *Atmospheric Environment* **9**, 191-200 (1975)
- 3) Jones, P.D., Groisman, P.Ya., Coughlan, M., Plummer, N., Jamason, N., Wang, W.-C. and Karl, T.R.: Assessment of urbanization effects in time series of surface air temperature over land. *Nature* **347**, 169-172 (1990)
- 4) Karl, T.R., Jones, P.D., Knight, R.W., Kukla, G., Plummer, N., Razuvayev, V., Gallo, K.P., Lindseay, J., Charlson, R.J. and Peterson, T.C.: Asymmetric trends of daily maximum and minimum temperature. *Bulletin of the American Meteorological Society* **74**, 1007-1024 (1993)
- 5) Easterling, D.R., Horton, B., Jones, P.D., Peterson, T.C., Karl, T.R., Parker, D.E., Salinger, M.J., Razuvayev, V., Plummer, N., Jamason, P. and Folland, C.K.: Maximum and minimum temperature trends for the globe. *Science* **277**, 364-367 (1997)
- 6) Gallo, K.P., Owen, T.W., Easterling, D.R. and Jamason, P.F.: Temperature trends of the U.S. historical climatology network based on satellite-designated land use/land cover. *Journal of Climate* **12**, 1344-1348 (1999)
- 7) Oke, T.R., Spronken-Smith, R.A., Jauregui, E. and Grimmond, C.S.B.: The energy balance of central Mexico City during the dry season. *Atmospheric Environment* **33**, 3919-3930 (1999)
- 8) Peterson, T.C., Gallo, K.P., Lawrimore, J., Owen, T.W., Huang, A. and McKittrick, D.A.: Global rural temperature trends. *Geophysical Research Letters* **26**, 329-332 (1999)
- 9) Hansen, J., Ruedy, R., Sato, M., Imhoff, M., Lawrence, W., Easterling, D., Peterson, T. and Karl, T.: A closer look at United States and global surface temperature change. *Journal of Geophysical Research* **106**, 23947-23963 (2001)
- 10) Samata, M. and Umeda, T.: An investigation of effects decreased temperatures by a roof

- gardening -Results from May 2000 to April 2001-. *Annual Report of Yokohama Environmental Science Research Institute* 27, 64-68 (2003) (in Japanese)
- 11) Samata, M. and Fukuda, A.: The measurements of temperatures on the roof garden of Kouhoku ward office building at summer in 2004. *Annual report of Yokohama Environmental Science Research Institute* 29, 84-91 (2005) (in Japanese)
- 12) Tsutsui, T., Nakajima, S. and Komatsu, M.: Verification of the heat island control effect by vegetation on the roof. *Annual Report of Kyoto Prefectural Institute of Hygienic and Environmental Sciences* 49, 52-57 (2005) (in Japanese)
- 13) Yamaguchi, T., Yokoyama, H. and Ishii, K.: Mitigating the urban heat island effect by light and thin rooftop gardening. *Journal of The Japanese Institute of Landscape Architecture* 68(5), 509-512 (2005) (in Japanese with English abstract)
- 14) Misaka, I., Ishii, K., Yokoyama, H., Yamaguchi, T. and Narita, K.: Evaluation of effects of light and thin type rooftop greening on mitigating heat island. *AIJ Journal of Technology and Design* 21, 195-198 (2005) (in Japanese with English abstract)
- 15) Yoon, S.-H. and Ashie, Y.: Numerical simulation on the summer thermal environmental alleviation effect by urban planting in a coastal local city -Case study in Zushi city-. *Journal of Environmental Engineering (Transactions of AIJ)* 577, 41-46 (2004) (in Japanese with English abstract)

[原著]

屋上緑化された地点で測定された気温の評価

藍川 昌秀^{1*} 平木 隆年¹ 英保 次郎¹
園田 竹雪²

要 約

屋上緑化による気温低減効果を検証するため、屋上表面被覆の異なる建物で気温を測定した。屋上緑化された地点（地点C）で測定された気温は屋上緑化されていない地点で測定された気温よりも低かった。地点Cでは他の地点よりも、夏季には夕方から早朝（15:00 - 6:00）にかけて、冬季には午後及び夜間（14:00 - 8:00）において気温が低かった。

[ノート]

兵庫県における自殺による死亡の特徴

小笠原 芳 知* 沖 典 男
山口 幹 子 前 田 幹 雄

Characteristics of Deaths from Suicide in Hyogo Prefecture

Yoshitomo OGASAWARA*, Norio OKI, Mikiko YAMAGUCHI and Mikio MAEDA

*Project Planning and Information Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences,
2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

Mortality data of suicide in Hyogo Prefecture were analyzed about both secular distortion and characteristics of the region. The trend of suicide in Hyogo Prefecture was tended almost equal to that in Japan. The number of suicide for the middle age increased after 1998, while that for the elderly decreased. In some age groups less than 40 years old, suicide was the main cause of death. The peaks of mortality rates in urban areas were observed in 1998-2000, while those for other regions were observed in 2001-2003. The decreasing tendencies were not found in any regions. For males, empirical Bayes estimate of standardized mortality ratio (EBSMR) of suicide revealed high tendency in the Shiso region and the Tanba region in 1998-2005. For females, the same tendency was revealed in the southern part of Awaji region. It was thought that these results might have been caused from the level of urbanization.

I はじめに

2006年の日本人の平均寿命¹⁾は、男性で79.00歳（世界第2位）、女性で85.81歳（世界第1位）と、日本は世界有数の長寿国である。前年より男性で0.44歳、女性で0.29歳延びている。これは、がん、心臓病、脳血管疾患の3大疾患での治療成績の向上や、インフルエンザの流行が前年ほど多くなかったことなどによるとみられている。長寿国の日本に暮らしているのに、自ら命を絶つということは実に憂慮すべきことだと著者らは考えている。ただ、数字だけで「日本は長寿国である」とは言っ

も様々な問題もある。例えば「日本の10代後半から30代にかけての死因の第1位が自殺」であり、平成17年都道府県別年齢調整死亡率の概況結果²⁾をみても「主要死因のほとんどが低下傾向にあるなかで、男性の自殺のみ悪化している」のが現状である。

日本における自殺死亡数は、1998年に急増し年間3万人を超え³⁾、以降2005年まで同レベルで推移している。これを受けて、2006年6月に自殺対策基本法が成立、2007年6月には10年以内に自殺者数を20%減らす数値目標を盛り込んだ自殺総合対策大綱が策定された。

兵庫県においても、1997年916人⁴⁾だった自殺死亡数が1998年に1,378人と50%増になり、以降2005年まで減少傾向はみられない。

全国的には、これまで秋田や青森など都市化の進んでいない地域での自殺死亡率が高いという傾向がみられる⁵⁻⁷⁾が、近年は、都市部の中高年男性の自殺死亡率が

企画情報部

*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所センター
企画情報部 小笠原 芳 知

高いという報告^{8,9)}もある。兵庫県は、瀬戸内臨海工業地帯もあれば日本海側など農山部や淡路島もある多種多様な面を持つ県であり、全県を把握するには地域の特徴を掴むことが重要である。ここでは兵庫県における自殺による死亡の経年変化、年齢別・出生年代別特性、地域特性などについて記述疫学的に解析した。

II 材料と方法

1970年～2005年までの人口動態統計の死亡データと国勢調査の市町別・性・年齢階級別人口データを解析用資料とした。対象市町および圏域は、2007年4月1日現在の41市町、10圏域とした。

兵庫県における自殺に関する記述疫学的解析では、最初に、県全体として年代別自殺者数や年齢階級・出生年代別死亡率、年齢階級別死因割合、職業別・動機別割合の特徴について検討した。

次に、圏域別として粗死亡率の経年変化を観察し、市町別として標準化死亡比(SMR)の経験的ベイズ推定値(EBSMR)¹⁰⁾を算出、疾病地図を作成して、地域特性を検討した。地域特性の検討では、SMRの検定結果も参考にした。なお、EBSMRを算出するにあたり、年齢階級別人口や市町別人口は、全国、県とも国勢調査人口を内挿して用いた。算出には、国立保健医療科学院が公開している Empirical Bayes estimator for Poisson-Gamma model¹¹⁾を使用した。

最後に、官庁統計資料で市町別に把握が可能であり、地域特性に影響を与えそうな社会生活指標として一般的に関与が考えられる住環境項目(世帯人数、高齢者人口比率、離婚率など)、経済産業項目(市町民所得、完全失業率など)、保健福祉項目(医師数、精神病床数など)について、地域相関分析により関連性を検討した。分析には、SPSS for Windows Ver12.0Jを使用した。

III 結果および考察

1. 県全体の特性

1.1 年代別自殺者数および年齢階級・出生年代別死亡率の推移

兵庫県全体でみると、自殺者数は1998年に急増するなど、全国値とほぼ同様の変動を示している。

Fig. 1, 2に兵庫県における年代別自殺者数の推移を示す。年代別に見ると、1998年頃の50, 60代男性の増加は大きく、ここ数年50代男性の数が減少している一方、30, 20代男性の数が増加している。女性においては、男性ほどの顕著な傾向はみられない。

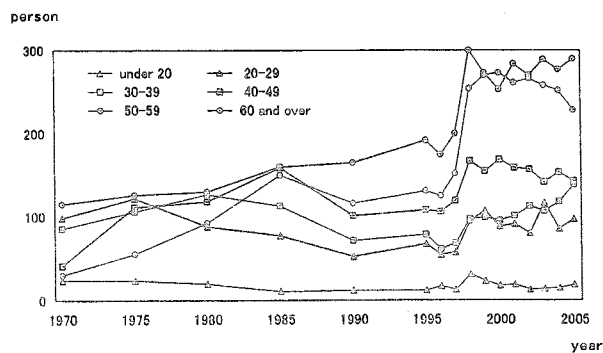


Fig. 1 Time-trends of death number of suicide, male, Hyogo Pref. (1970-2005)

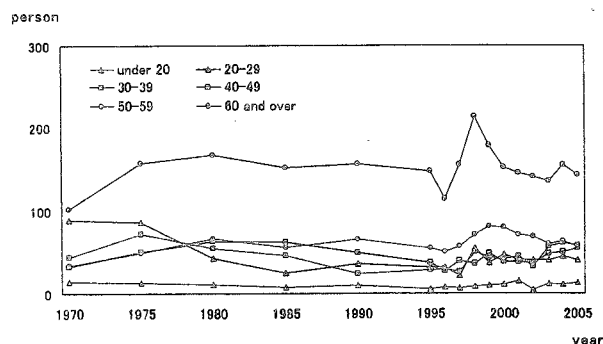


Fig. 2 Time-trends of death number of suicide, female, Hyogo Pref. (1970-2005)

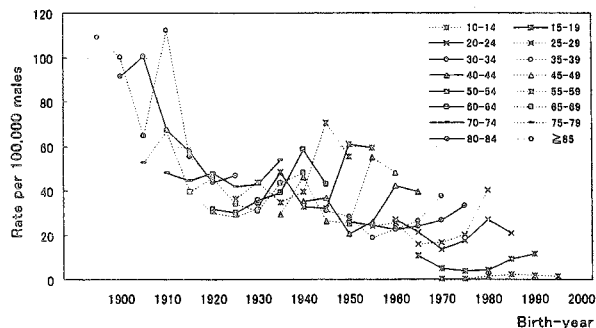


Fig. 3 Age-specific mortality of suicide by birth-year (1895-1995), male, Hyogo Pref.

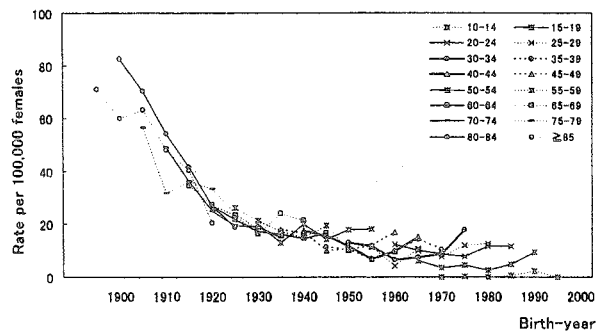


Fig. 4 Age-specific mortality of suicide by birth-year (1895-1995), female, Hyogo Pref.

Fig. 3, 4に年齢階級別・出生年別死亡率を示す。男女とも高齢者で確実に減少している一方、1998年以降、中年男性で増加している。女性においては、男性ほどではないが30, 40代で若干の増加傾向がみられる。

1.2 年齢階級別の死因割合

Fig. 5に2003~2005年の兵庫県における年齢階級別死因割合を示す。男女とも、高齢者では、がん・心疾患・脳血管疾患の3大疾患が主な死因となっているのに対し、40歳未満の世代では、自殺が主な死因である年齢階級が多い。この傾向は、全国的にほぼ同様であることから、この点に重点をおいた対策が求められる。

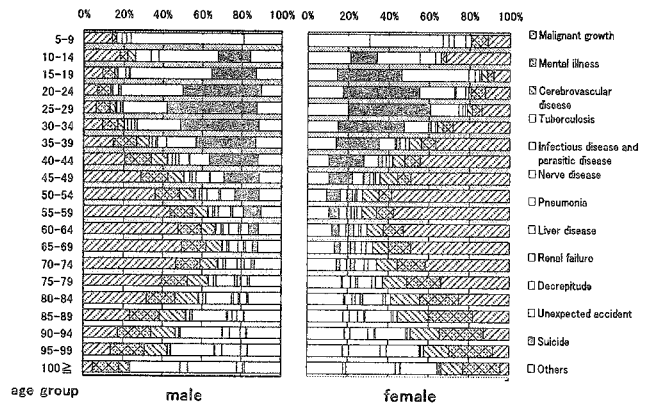


Fig. 5 Proportion of deaths from main causes by age group, Hyogo Pref. (2003-2005)

1.3 職業別、動機別の死亡割合

Fig. 6に職業別の自殺死亡割合を示す。無職者の割合が非常に高いことは、以前から特に変わりなく、全国と比較してもほぼ同様の傾向であった。今後は学生の区分なども含め、もう少し詳細な職業小分類別区分などで解析する必要がある。

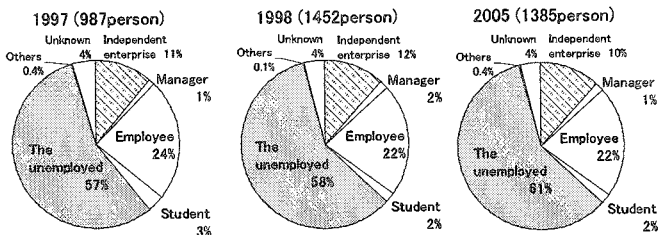


Fig. 6 Proportion of deaths from suicide by occupation, Hyogo Pref. (1997,1998,2005)

Fig. 7に動機別の自殺死亡割合を示す。1998年前後から、自殺動機として最も多い「健康問題」の割合が徐々に減少する一方で「経済・生活問題」が増加しており、2005年には「経済・生活問題」の方が「健康問題」より高くなってきている。その他としては、精神障害やアルコール依存などが考えられる。動機内容にかかるケアやフォローは、自殺防止対策に直接つながるため、その他の内容も含めて十分考慮していく必要がある。

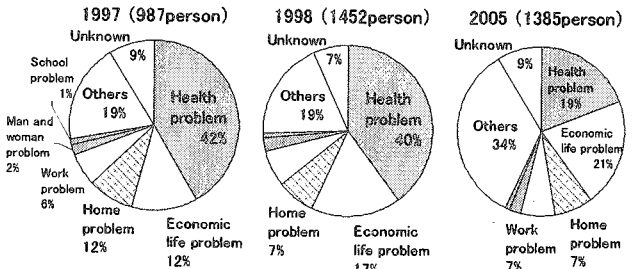


Fig. 7 Proportion of deaths from suicide by motive, Hyogo Pref. (1997,1998,2005)

2. 圏域別・市町別の地域特性

県全体の集計結果は、人口の多い都市部の寄与が大きく、必ずしも県下各地域の傾向を反映しないと考えられる。このため、最初に、圏域（県下10県民局）別で粗死亡率の推移を確認した（Fig. 8）。都市部の地域（瀬戸内臨海工業地帯である神戸、阪神南、阪神北、東播磨、中播磨）では1998~2000年頃ピークを、それ以外の地域（北播磨、西播磨、但馬、丹波、淡路）では都市部より若干遅れて2001~2003年頃ピークを示したが、それ以降、粗死亡率が減少する傾向はみられなかった。

次に、2007年4月1日現在の県下41市町別に、1998~2005年の8年間のデータから、自殺における標準化死亡比（SMR）の経験的ベイズ推定値（EBSMR）を算出し、疾病地図を作成した（Fig. 9）。その結果、1998~2005年の8年間に於いては、男性は宍粟地域および丹波地域に、女性は淡路南部地域に若干高い傾向のある市町がみられた（EBSMR：S市 128.1, T市 127.6, M市 123.7）。

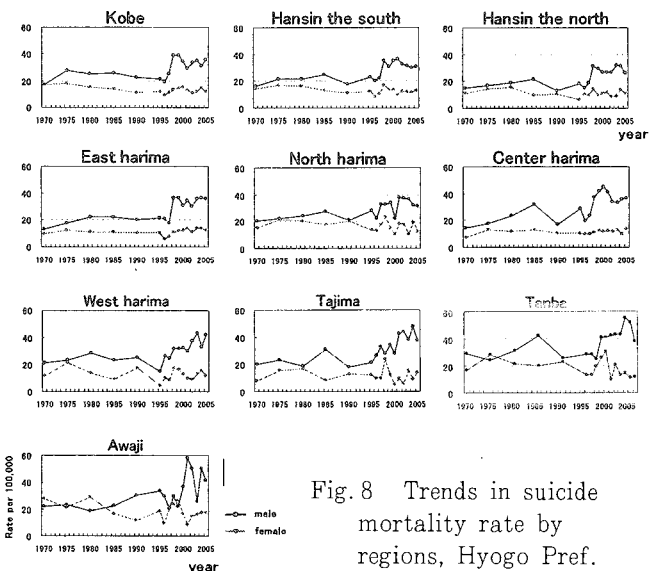


Fig. 8 Trends in suicide mortality rate by regions, Hyogo Pref. (1970-2005)

3. 自殺EBSMRと社会生活指標との関連性

Table 1 に自殺EBSMRと影響を与えそうな社会生活指標との地域相関分析結果を示す。

男性では、1世帯当たりの人数(+)((+)は正の相関、(-)は負の相関を示し、以下(+),(-)と表記する)、高齢者(65歳以上)人口比率(+), 農林業経営体数/人(+), 製造品出荷額/人(-)と有意な相関が認められた。この結果から、男性では都市化の程度(郡部での自殺死亡率が高い)が関連あると考えられた。なお、女性も同様に分析したが、女性は有意な相関が出る項目は、今回検討した項目の中では特に確認されなかった。

Table 1 では男性の「完全失業率」と自殺EBSMRとは無相関という結果が出た。しかし、都市部より完全失業率が低い郡部では、定年のない農業への就業割合が高く、農業従事者割合の地域性が完全失業率と自殺との相関をなくしている可能性が考えられる。地域での農業就業割合を示す農林業経営体数/人と完全失業率が負の相関($r = -0.631, p < 0.001$)にあることから推測される。そこで、農林業経営体数/人を制御変数として、完全失業率と自殺EBSMRを偏相関分析したところ、有意な正の相関が認められた(Table 2)。この結果から「失業と自殺は関連がある」ことが考えられた。

今後は、有意な差がみられた地域について原因を精査する必要がある。また、今回の検討項目の充実だけでなく、うつ病との関連性など多方向からの検討を行うことにより、早急に緊急課題を探究し、効果的な自殺防止対策につなげていく必要があると考えられる。

なお、今回の解析では、ここ数年急速に進んだ市町合併後の41市町区分で検討したため、市町内に混在する過疎地域においては、地域の状況が市町全体の傾向に埋もれてしまっている可能性があることを十分認識しておく必要がある。また、自殺という項目の件数とSMRの性質上、少なくとも5年間以上のデータ数で算出すべきであり、ここ数年間で増加している地域なども全体の傾向に埋もれてしまっている可能性がある。そのためにも、詳細な区分による分析が可能となるような各種情報の蓄積が必要と考える。

IV 要 旨

兵庫県における自殺による死亡の経年変化、地域特性について解析した結果、以下のことが分かった。

1. 県全体の自殺の傾向としては、全国とほぼ同程度である。高齢者で減少している一方、1998年以降、中年層で増加している。また、40歳未満の年齢層では、自殺が主な死因である年齢階級が多い。

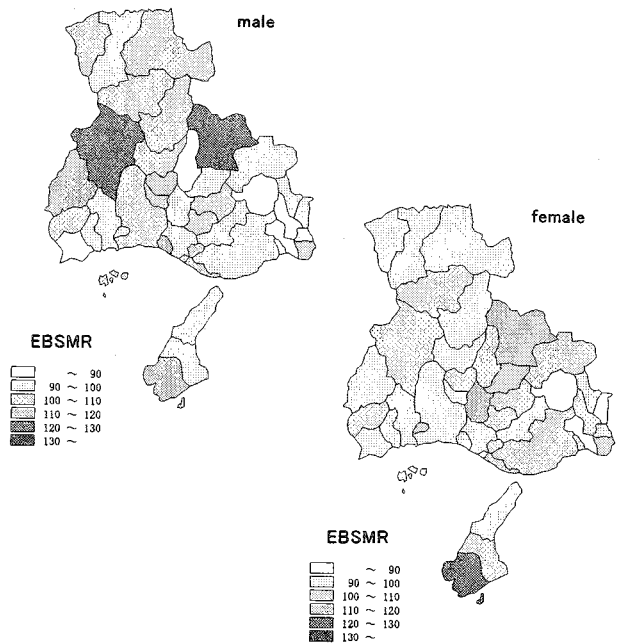


Fig. 9 Map of empirical Bayes estimate of standardized mortality ratio (EBSMR) of suicide, Hyogo Pref. (1998-2005)

Table 1 Relation between EBSMR of suicide and social life index (n=41)

male	Correlation coefficient		Correlation coefficient
Population density	-0.217	Workpiece shipment amount /person	-0.326 *
Number of people a family	0.337 *	Commodity sales amount /person	-0.248
Divorce number /1000 people	-0.290	The number of agriculture and forestry industry management body /person	0.456 **
Single home ratio	-0.228	The number of doctor /100,000person	-0.068
Aged single body home ratio	0.073	The number of hospital /100,000person	0.195
Ratio of population of senior citizen (65 years old or more)	0.350 *	The number of clinic /100,000person	0.049
Ratio of senior citizens of living alone	-0.108	The number of sickbed/100,000person	-0.147
Total city town production (1000 yen)/person	-0.161	The number of clinic sickbed/100,000person	-0.281
City townsman income (1000 yen)/person	-0.294	The number of nantal disease floor /100,000person	-0.076
Ratio of complete unemployment	-0.035		

** p<0.01 * p<0.05

Table 2 Partial correlative analysis result in EBSMR of suicide and ratio of complete unemployment (n=41)

		Ratio of complete unemployment
EBSMR	Correlation	0.399 *
	Significance probability (both sides)	0.011

2. 圏域別に男性の粗死亡率を比較すると、都市部では1998～2000年頃ピークを、都市部以外では若干遅れて2001～2003年頃ピークを示したが、それ以降、粗死亡率が減少する傾向はみられなかった。
3. 1998～2005年の8年間における自殺EBSMRでは、男性は宍粟地域および丹波地域に、女性は淡路南部地域に若干高い傾向のある市町がみられた。
4. 自殺EBSMRと社会生活指標を相関、偏相関分析した結果、経済的なもの、生きがいのものを含め、都市化の程度（郡部での自殺率が高い）が関連あると考えられた。

文 献

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部：日本人の平均余命。平成18年簡易生命表(2007)
- 2) 厚生労働省大臣官房統計情報部：都道府県別に見た死亡の状況。平成17年都道府県別年齢調整死亡率の概況(2007)
- 3) 厚生労働省大臣官房統計情報部：第5回自殺死亡統計人口動態統計特殊報告。厚生統計協会(2005)
- 4) 兵庫県健康生活部：保健統計年報。兵庫県健康生活部生活企画局情報事務センター(1995-2005)
- 5) 本橋豊, 劉揚, 佐々木久長：秋田県の自殺死亡の地域差と社会生活要因に関する研究。厚生指標, 46, 10-15 (1991)
- 6) 田中耕, 森洋隆, 重村克巳, 日置淳巳：岐阜県における自殺死亡の特徴。厚生指標, 49, 14-20 (2002)
- 7) 久保田晃生, 永田順子, 杉山眞澄, 藤田信：静岡県における自殺死亡の地域格差および社会生活指標との関連。厚生指標, 54, 29-36 (2007)
- 8) 藤田利治：大都市部での自殺死亡急増。公衆衛生研究, 52, 295-301 (2003)
- 9) 藤田利治, 谷畑健生, 三浦宜彦：1998年以降の自殺死亡急増の地理的特徴。厚生指標, 50, 27-34 (2003)
- 10) 丹後俊郎：疾病地図と疾病集積性・疾病指標の正しい解釈をめざして。公衆衛生研究, 48, 84-93 (1999)
- 11) 国立保健医療科学院：技術評価部プログラム (http://www.niph.go.jp/soshiki/gijutsu/download/index_j.html)

兵庫県におけるウエストナイルウイルスに関する 蚊のサーベイランス (2006年)

押部 智宏^{1*} 福永 真治^{1*} 稲元 哲朗¹
近平 雅嗣¹ 山岡 政興¹

Field Survey of Mosquitoes Associated with Control Measures to West Nile Fever in Hyogo Prefecture (2006)

Tomohiro OSHIBE^{1*}, Masaharu FUKUNAGA^{1*}, Tetsuro INAMOTO¹,
Masatsugu CHIKAHIRA¹ and Masaoki YAMAOKA¹

¹ *Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

Surveillance for West-Nile Virus (WNV) in mosquitoes was performed from June to September, 2006 in Hyogo prefecture. The mosquitoes were collected by the dry ice trapping method using CDC light traps in this research center (Kobe), Takarazuka, Fukusaki, Yashiro. 3,477 mosquitoes from all fixed trapping points were sampled. These mosquito samples have tested negative for WNV. The species of the collected mosquitoes were *Culex pipiens*, *Aedes albopictus*, *Cx. tritaeniorhynchus*, *Anopheles sinensis*, and *Armigeres subalbatus*. From this result, we supposed that *Cx. pipiens* and *Ae. albopictus* were dominant species in urban area (Kobe, Takarazuka), and *Cx. tritaeniorhynchus* was dominant species in suburban area, especially paddy area (Fukusaki, Yashiro).

I はじめに

ウエストナイル熱の流行は、1999年ニューヨーク市での患者発生を契機に急速に拡大し、2003年にはアラスカを除く北米大陸のほぼ全域に広がった^{1, 2)}。2006年のアメリカ国内における患者数は4,269人、死者数は177人に達し、³⁾ 2007年も依然として深刻な事態が続いている。

感染症部

* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究センター
感染症部 押部 智宏
※ 現 疾病対策課

この病原体であるウエストナイルウイルス (WNV) は、自然界において200種以上の鳥類と40種類以上の蚊の間で感染環が形成されており、多種類の蚊が媒介することが大きな特徴である。このためWNVが侵入した際には、死亡鳥の調査と共に、蚊の調査により感染に関わった可能性のある蚊の種類を速やかに特定し防除対象種を決定する必要がある⁴⁾。今のところ国内の発生はないが、地方自治体における事前対策として蚊のサーベイランスを実施し、地域に分布する蚊の種類、生息状況の把握と併行して、蚊の捕集法やその同定技術に習熟しておくことは重要である。

今回我々は、これらのことを踏まえて兵庫県におけるWNVに関するサーベイランスおよび県内市街地に生息

する蚊の分布を把握することを目的として、2005年に実施した県下14カ所の蚊のサーベイランス⁵⁾において多種類の蚊が捕集された福崎健康福祉事務所(神崎郡福崎町)、社健康福祉事務所(加東市)の敷地内とビルや住宅が密集する宝塚健康福祉事務所検査室(宝塚市)、当研究センター(神戸市)の敷地内の合計4カ所を定点として蚊のサーベイランスを行ったので報告する。

II 材料と方法

1. 実施期間および捕集地点

1.1. 研究センター定点の定期捕集調査

2006年6月1日から10月30日までの合計71回にわたり県立健康環境科学研究所(神戸市兵庫区)敷地内(Fig. 1)の2カ所を定点として実施した。

1.2. 県内4定点の一斉捕集調査

7月から10月までの合計10回(7月4, 10, 24日, 8月1, 7, 21日, 9月4, 11, 25日, 10月2日)にわたり研究センター, 宝塚検査室, 社, 福崎健康福祉事務所の敷地内(Fig. 1)の2カ所ずつを定点として実施した。なお, 研究センターの結果は上記の定期捕集調査の2日分の結果を再掲した。

2. 蚊の捕集方法

蚊の捕集は, CDCライトトラップ(John. W. Hock Company)を使用し, ドライアイス誘引剤として併用した。捕集時間は, 研究センター定点では約24時間とし, 県内3カ所の定点調査では約48時間とした。

3. 蚊の種の同定

捕集した蚊は動物を吸血する雌蚊のみを、弓指ら⁶⁾の



Fig. 1. Map of the 4 fixed trapping points of mosquitoes

簡易同定表に基づいて同定した。また, アカイエカ(*Culex pipiens pallens*)とチカイエカ(*Cx. pipiens molestus*)は外見上区別ができないためすべてアカイエカ(*Cx. pipiens*)として分類した。

4. ウイルス検査

定点毎の捕集蚊を分類した後, 50匹の蚊を1プール(1検体)としてマイクロチューブに入れ, 0.2%ウシ血清アルブミン加リン酸緩衝液を750 μ l加えマルチビーズショッカー(安井器械)で破碎して乳剤とした。乳剤の遠心上清からQIAamp Viral RNA Mini kit(QIAGEN)を用いて抽出したRNAについて, RT-PCR法によりWNVのE領域およびWNV, 日本脳炎ウイルス共通のNS3領域の遺伝子増幅を行った。使用したプライマーは, ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル(国立感染症研究所)⁷⁾に準じた。

III 結果

1. 蚊の捕集成績

1.1. 研究センター定点の定期捕集調査

合計71回の調査で捕集された蚊は3種類1,338匹であった(Table 1)。1調査日当たりの蚊の平均捕集数は前年と同値の18.8匹であった。蚊の構成は, ヒトスジシマカ(*Aedes albopictus*)が63.0%で最も高く, 次いでアカイエカが36.9%, コガタアカイエカ(*Cx. tritaeniorhynchus*)が0.1%の順であった。

1調査日当たりの平均捕集数を前年と比較するとアカイエカが10.8匹であったのに対して, 今回の調査では6.9匹と減少し, 一方, ヒトスジシマカは前年より増加した。

2005年と2006年の月別の捕集数の推移(Fig. 2)を見ると, 2005年はヒトスジシマカが9月, アカイエカが6月にピークを示したのに対し, 2006年はヒトスジシマカが7月にピークとなったが, アカイエカでは明確なピークは見られなかった。ヒトスジシマカ, アカイエカ共に捕集数の推移は前年と大きく異なっていた。

Table 1. Number of collected mosquitoes at the fixed trapping points of this research center (Kobe)

Species	2005 year			2006 year		
	Mosquitoes (No.)	(%)	Mosquitoes(No.) /Collection days	Mosquitoes (No.)	(%)	Mosquitoes(No.) /Collection days
<i>Cx. pipiens</i>	990	(57.1)	10.8	493	(36.9)	6.9
<i>Ae. albopictus</i>	740	(42.7)	8.0	844	(63.0)	11.8
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	4	(0.2)	0.004	1	(0.1)	0.01
Total	1,734		18.8	1,338		18.8

Table 2. Number of collected mosquitoes at the 4 fixed trapping points

	Mosquito species (%)										
	<i>Ae. albopictus</i> (%)		<i>Cx. pipiens</i> (%)		<i>Cx. tritaeniorhynchus</i> (%)		<i>An. sinensis</i> (%)		<i>Ar. subalbatus</i> (%)		Total
Takarazuka	69	(72)	27	(28)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	
Kobe	321	(77)	97	(23)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	418
Yashiro	117	(24)	23	(5)	329	(68)	18	(4)	0	(0)	487
Fukusaki	125	(8)	109	(7)	1,153	(75)	163	(10)	6	(0.3)	1,556
Total	632	(25)	256	(10)	1,482	(58)	181	(7)	6	(0.2)	2,557

1.2. 県内4定点の一斉捕集調査

県内4ヶ所の定点で捕集された蚊の合計は5種類2,557匹であった (Table 2). その種類は多い順にコガタアカイエカ (58%), ヒトスジシマカ (25%), アカイエカ (10%), シナハマダラカ (*Anopheles sinensis*) (7%), オオクロヤブカ (*Armigeres subalbatus*) (0.2%) であった.

定点別に見ると, 宝塚定点では捕集された蚊が96匹と最も少なく, ヒトスジシマカ (72%), アカイエカ (28%) の2種類であった.

研究センター定点では418匹捕集され, 蚊の構成は宝塚の定点と同じくヒトスジシマカ (77%), アカイエカ (23%) の2種類, それらの構成比も類似していた.

社定点では487匹捕集され, 多い順にコガタアカイエカ (68%), ヒトスジシマカ (24%), アカイエカ (5%), シナハマダラカ (4%) の4種類であった.

福崎定点では5種類1,556匹捕集され, ここでの捕集数および種類が最も多かった. 内訳はコガタアカイエカ (75%), シナハマダラカ (10%), ヒトスジシマカ (8%), アカイエカ (7%), オオクロヤブカ (0.3%) であった. 蚊の構成比は, 社定点と同じくコガタアカイエカが最も高く, 水田発生性とされるコガタアカイエカ, シナハマダラカで全体の85%を占めていた.

今回捕集された5種類の蚊のうち, アカイエカ, ヒトスジシマカは全定点で認められ, コガタアカイエカおよびシナハマダラカは福崎および社定点のみ, オオクロヤブカは福崎定点のみで捕集された.

2. 蚊からのWNV検出

捕集されたすべての蚊においてWNV遺伝子およびフラビウイルス遺伝子は検出されなかった.

IV 考 察

研究センター定点での1シーズンを通じた定期捕集調査では, 前年と同様にヒトスジシマカとアカイエカが捕集蚊全体の99.9%を占めており, 極めて単純な蚊の分布相を示した. ヒトスジシマカとアカイエカの構成比は, 前年と比べるとアカイエカが57.1%から36.9%へと減少し, ヒトスジシマカは42.7%から63.0%へと増加したため両者の比率が逆転した. また, 月別の捕集数の推移では, ヒトスジシマカ, アカイエカそれぞれのピークは前年と大きく異なっていた. これは, それぞれの蚊の活動至適温度 (気温) が異なることや蚊の幼虫の発育至適温度 (水温) が異なること, また, 両者の幼虫の発育に不可欠である水の有無 (降水量) などの気候要因により, それぞれの蚊の発生数や活動が大きく変動したことによるものと考えられた.

県内4ヶ所の定点捕集調査では, 全ての定点からアカイエカ, ヒトスジシマカが認められた. 前年の14定点の調査⁵⁾でも同様に全ての定点から捕集され, 兵庫県と隣接する大阪府の調査でも同様の結果が報告⁶⁾されており, これらの蚊が雨水マス, 人工容器, 汚水溜, 下水溝などで多く発生する生態を考慮すると, 県内でもビルや住宅が密集する市街地を中心として優占的に分布していることが考えられた.

一方, 社および福崎定点での蚊の捕集結果から, これらの水田地帯に隣接する市街地では, 水田発生性のコガタアカイエカ, シナハマダラカに加えて, アカイエカ, ヒトスジシマカが混在していることが考えられた. イエカ類, ハマダラカ類の行動範囲は数キロ四方と広い範囲を飛翔すること⁴⁾から, 県内の水田地帯やため池などの発生源を中心として比較的広範囲に分布しているものと推測された.

今回の調査では県内の4定点について捕集調査を行っ

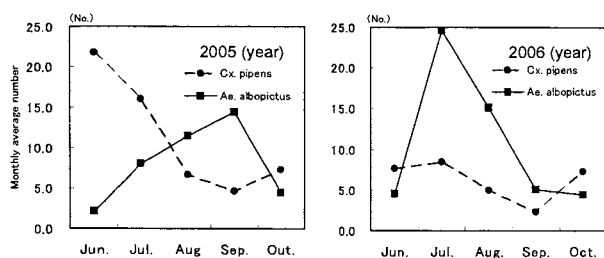


Fig. 2 Monthly collection number of mosquitoes in fixed point of this research center (Kobe)

たが、より全県的な蚊の生息状況を把握するためには、調査の定点数や回数を大幅に増やし、蚊成虫の捕集調査のみならず蚊幼虫生息（発生源）調査も併せて行う必要がある。

今回捕集された5種類の蚊は、何れもWNVの媒介に関与する可能性がある¹⁾とされており、都市部で多く捕集されたアカイエカ、ヒトスジシマカ、あるいは水田地帯近隣の市街地で多かったコガタアカイエカがWNVの伝播に重要であると考えられた。

前年⁵⁾および今回の調査でマラリアを媒介するシナハマダラカが福崎と社定点から捕集された。国内では1947年に約12,000例のマラリア患者が報告された⁶⁾が、その後報告数が急激に減少し、現在は国内の患者発生は報告されていない。しかしながら福崎、社定点で媒介蚊が少なからず認められたことから、今後、マラリアの患者発生動向にも注意する必要がある。

また、福崎および社定点から日本脳炎ウイルス（JEV）を媒介するコガタアカイエカが多く捕集された。我々が行っている日本脳炎流行予測調査では、県内の飼育豚からJEVに対する抗体が毎年検出されている。このことから依然としてJEVが自然界で維持されており、感染蚊の刺咬によりJEVに感染する可能性が少なからず存在していることを示している。2005年以降、日本脳炎ワクチンの積極的勧奨が行われなくなったため3～4歳での日本脳炎ワクチンの接種率が激減しており、日本脳炎患者が増加することも考えられる。今後、ワクチン未接種児を中心とした患者発生動向を注視しなければならない。

蚊および野鳥のWNVのサーベイランスは、全国の自治体で行われているが、今のところWNVが国内に侵入したという報告はない。しかし、依然として北米を中心に流行が続いていることから、今後も引き続きサーベイランスを行い、また県下市街地の蚊の分布状況を把握するため、全県的な捕集調査の充実を図っていく必要があると考えられる。

V ま と め

兵庫県におけるWNVに関するサーベイランスおよび県内市街地に生息する蚊の分布の把握を目的として、福崎、社、宝塚、研究センター（神戸）の4定点で蚊のサーベイランスを行った。その結果、5種類3,477匹の蚊が捕集され、WNV検査を行ったところ検出されなかった。

この5種類の蚊は何れもWNVの媒介に関与する可能性があるとしており、特に都市部で多く捕集されたアカイエカ、ヒトスジシマカや水田地帯近隣の市街地で多かったコガタアカイエカがWNVの伝播に重要であると考えられた。

謝 辞

本調査の遂行に当たり蚊の捕集、同定法、ウイルス検査法等の技術的な研修、指導をしていただきました大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課の弓指孝博先生、青山幾子先生、本調査の企画調整、総括をしていただきました県疾病対策課、県生活衛生課の関係者の方々、本調査にご協力いただきました宝塚、伊丹、社、福崎健康福祉事務所の健康増進課および薬務・生活衛生課の関係者の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) 倉根一郎：ウエストナイル熱、日本ウイルス学会誌、53, 1-6 (2003)
- 2) 今井長兵衛：ウエストナイルウイルスの米国侵入と流行実態、生活衛生、48, 252-260 (2004)
- 3) CDC：2006 West Nile Virus Activity in the United States.
http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&controlCaseCount06_detailed.htm
- 4) 小林睦生他：ウエストナイル熱媒介蚊に関するガイドライン、p1-15、国立感染症研究所、東京（2003）
- 5) 押部智宏、福永真治、廣田義勝、近平雅嗣：兵庫県におけるウエストナイル熱対策の一環として実施した蚊の捕集調査、兵庫県立健康環境科学研究所 第3号、19-24 (2006)
- 6) 弓指孝博、瀧幾子、斎藤浩一、西村平和、石田誠良、大竹徹、奥野良信：大阪府におけるウエストナイル対策に関する蚊のサーベイランス（平成15年度報告）、大阪府公衛研所報、42, 57-63 (2004)
- 7) 高崎智彦、倉根一郎：ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアルVer.4, p.7, 国立感染症研究所、東京（2005）
- 8) 感染症週報、p11-14, 国立感染症研究所、東京（2002）

下痢症患者から分離された stx_2 変異型遺伝子 (stx_{2f}) 保有志賀毒素産生性 (STEC) 大腸菌O128:HNMの性状

押部 智宏^{1*} 福永 真治^{1*} 大町 隆生²
稲元 哲朗¹ 近平 雅嗣¹

Characteristic of *Escherichia coli* O128 : HNM carrying Shiga Toxin 2 Variant (stx_{2f}) Gene from Diarrhea Patients

Tomohiro OSHIBE^{1*}, Masaharu FUKUNAGA^{1*}, Takao OOMACHI²,
Tetsurou INAMOTO¹ and Masatsugu CHIKAHIRA¹

¹ Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

² Kakogawa health and welfare office

We have isolated Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) O128: HNM from the feces of 2-years-old child suffered from mild diarrhea. As a result of PCR and PCR-RFLP method for *stx* genotyping and presence of virulence-related genes, the *stx* genotype of the STEC O128: HNM isolates were Shiga toxin 2 variant f (stx_{2f}). The isolates were positive for *eaeA* gene, intimin type β and negative for *aggR*, *bfpA*, *astA*, *hlyA* gene. Although the Stx production of the isolates weakly reacted with VTEC-RPLA, the Stx induction of them by Mitomycin C (MMC) treatment could get strong reaction with it. It may be one of the rare cases that STEC O128: HNM carrying stx_{2f} gene were isolated from the infant patient.

I はじめに

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 感染症は激しい腹痛、下痢、鮮血便を伴う出血性大腸炎を引き起こし、重症化すると溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症などの合併症を伴う疾患である。国内で分離されるSTECの血清型

は、O157が半数以上で圧倒的に多く、次いでO26、O111の順となっており、これらを合せると全体の9割以上を占めている¹⁾。しかしながら、これら以外の血清型を原因とする症例や stx 変異型遺伝子を保有するSTECの感染例も少なからず報告されている。

2005年11月に兵庫県内で軽度の下痢を呈する幼児から stx_2 変異型遺伝子 (stx_{2f}) を保有するSTEC O128 : HNMが分離された。この変異型遺伝子は日常のPCR検査として当所が採用している市販プライマーには反応せず、またRPLA法では志賀毒素 (Stx) を検出したものの、その力価は1 : 4と検出下限値を示した。

我々はこの分離株の性状について解析し、さらに今回検出した stx_2 変異型遺伝子およびStx変異型に対応し得

感染症部

* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所

感染症部 押部 智宏

※ 現 疾病対策課

Table 1. Oligonucleotides used for PCR amplification

Taget	Primer	Sequences	Lengh of PCR product	Reference
<i>stx</i>	Lin-all	5'-TAA GGA TTT TGG GAC CC-3' 5'-TTT ATT TGC AGC CCC CCA T-3'	~900bp	2)
<i>stx₂</i>	128-1 128-2	5'-AGA TTG GGC GTC ATT CAC TGG TTG-3' 5'-TAC TTT AAT GGC CGC CCT GTC TCC-3'	428bp	3)
<i>eaeA</i>	eaeAF eaeAR	5'-GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC-3' 5'-CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG-3'	384bp	4)
<i>aggR</i>	aggRks1 aggRkas2	5'-GTA TAC ACA AAA GAA GGA AGC-3' 5'-ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC-3'	253bp	5)
<i>bfpA</i>	BFP-1 BFP-2	5'-CGT CTG ATT CCA ATA AGT CGC-3' 5'-GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA-3'	264bp	6)
<i>astA</i>	EAST-1S EAST-1AS	5'-GCC ATC AAC ACA GTA TAT CC-3' 5'-GAG TGA CGG CTT TGT AGT C-3'	106bp	7)
<i>hlyA</i>	hlyA1 hlyA4	5'-GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G-3' 5'-TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A-3'	155bp	8)

る検査法について検討したので併せて報告する。

II 材料と方法

1 発生概要

2005年11月6日、県内在住の2歳男児が軽度の下痢(有形軟便)を呈し医療機関を受診した。民間検査機関において細菌検査を行った結果、11月10日、14日に志賀毒素産生性大腸菌O128が検出され、当センターに両分離株が搬入された。接触者調査では患者以外全て陰性であり、その後の患者の症状は軽く抗生物質を投与することなく治癒した。

2 供試菌株

10日および14日に検出され当センターに搬入された2株(05E058, 05E060)を供試した。また、陽性対照として患者由来株STEC O157:H7株(*stx₂*+*stx_{2c}*遺伝子保有株)を使用した。

3 生化学性状試験および血清型別試験

生化学性状試験はTSI, LIM, VP, LIM, CLIG培地を用いて確認試験を行い、さらにクエン酸塩, アミノ酸脱炭酸, 糖分解等の二次確認試験を行った。血清型別試験は市販の病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)を用いて実施した。

4 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、センシディスク(日本ベクトンディックンソン)を用いて1濃度ディスク法で実施した。試験には ampicillin, gentamaicin, kanamycin, tetracycline, ciprofloxacin, norfloxacin, cefotaxime, cefazolin, chloramphenicol, fosfomycin, nalidixic acid, sulfamethoxazole/trimetoprimの12薬剤を用いた。

5 Stx産生性試験およびmitomycin C (MMC) による毒素産生誘導試験

供試株をMMC(最終濃度50ng/ml)添加あるいは非添加のCAYE培地(デンカ生研)で37°C, 18時間振盪培養し、遠心分離後、上清を被検液とした。毒素の検出は、逆受身ラテックス凝集反応による大腸菌ベロトキシン検出キットVTEC-RPLA(デンカ生研)を用いた。

6 Vero細胞による細胞毒性試験

供試株をCAYE培地で37°C, 18時間振盪培養し、遠心分離後、上清をメンブランフィルター(0.45μm)でろ過滅菌したものを被検液とした。24穴マイクロプレートの各ウェルにVero細胞浮遊液1mlを加えて、37°C, 1日炭酸ガス培養し、被検液を各ウェルに100μl接種した。37°C, 2~4日間炭酸ガス培養を行い細胞変性の有無を顕微鏡下で判定した。

7 *stx*遺伝子の検出、遺伝子型別およびその他の病原遺伝子の検索

供試株を滅菌蒸留水に懸濁後、95°C, 5分加熱し、12,000rpm, 5分間遠心分離した上清をテンプレートとした。*stx*遺伝子の検出は、市販プライマー(EVS1/2;TAKARA), Lin-allプライマー, O128-1/2プライマーの3種類(Table 1)によるPCRを行った。また、Lin-all, O128-1/2プライマーで増幅されたPCR産物について制限酵素HincIIあるいはEcoRVで切断した。

その他の病原遺伝子(*eaeA*, *aggR*, *invE*, *astA*, *bfpA*, *hlyA*遺伝子)は既報のプライマー(Table 1)によるPCRを行った。Intimin型別(α , β , γ , δ 型)は既報の方法⁹⁾に準じた。なお、PCRの反応条件はそれぞれメーカーの添付文書および文献のprotocolに準拠した。増幅DNAおよび制限酵素切断断片は1.5%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い撮影した。

Table 2. Biochemical characteristics of *E. coli* O128 : HNM

Tests	05E058	05E060
Oxidase	-	-
Indol	+	+
Motility	-	-
H ₂ S(TSI)	-	-
Voges-Proskauer	-	-
Simmons citrate	-	-
Christensen citrate	-	-
β -Glucuronidase	-	-
Lysine decarboxylase	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+
Arginine decarboxylase	+	+
Glucose(acid)	+	+
Glucose(gas)	+	+
Lactose	+	+
Sucrose	+	+
Mannitol	+	+
Inositol	-	-
Adonitol	-	-
Dulcitol	-	-
Salicin	-	-
Arabinose	+	+
Xylose	+	+
Rhffinose	-	-
Sorbitol	+	+

III 結 果

1 生化学性状および血清型別試験

供試2株の生化学性状試験結果をTable 2に示した。運動性、リジンデカルボキシラーゼ、 β -glucuronidase試験は陰性であった。その他の生化学性状および血清型別試験により本株を*E. coli* O128:HNMと同定した。

2 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の結果をTable 3に示した。05E058株は12薬剤全てに感受性であった。05E060株はampicillinに対して中等度耐性であったが、その他の薬剤は感受性であった。

3 Stx産生性試験およびVero細胞による細胞毒性試験

Stx産生性試験、MMCによる毒素産生誘導試験、Vero細胞による細胞毒性試験の結果をTable 4に示した。供試2株は共にVTEC-RPLAの力価は1:4と低値であった。一方、MMC添加による毒素産生誘導試験では力価が1:32および1:512まで上昇した。

細胞毒性試験では、被検液を添加したVero細胞とCAYE培地のみを添加した陰性対照のVero細胞を比較した結果、MMC存在下および非存在下の被検液を添加した双方のVero細胞から明瞭な細胞変性が観察された。

4 stx遺伝子の検出および遺伝子型別

各プライマーによるstx遺伝子の検出およびPCR産物の制限酵素切断結果をFig. 1に示した。供試2株は市販プライマーでは陰性であった。Lin-allプライマーで

Table 3. Result of antimicrobial susceptibility of *E. coli* O128:HNM

Antimicrobial agent	05E058	05E060
gentamaicin ; 10 μ g	S	S
ampicillin ; 10 μ g	S	I
kanamycin ; 30 μ g	S	S
tetracycline ; 30 μ g	S	S
ciprofloxacin ; 5 μ g	S	S
norfloxacin ; 10 μ g	S	S
cefotaxime ; 30 μ g	S	S
cefazolin ; 30 μ g	S	S
chloramphenicol ; 30 μ g	S	S
fosfomicin ; 50 μ g	S	S
nalidixic acid ; 30 μ g	S	S
sulfamethoxazole/trimetoprim; 23.75 μ g/1.25 μ g	S	S

S, sensitive ; I, intermediate

は、目的とする900bp付近にDNAの増幅が確認された。さらに制限酵素Hinc IIで切断したところ、目的とする521bpと374bp付近にバンドが認められた。これは陽性対照(stx₂+stx_{2c}遺伝子型株)の556bp, 324bp, 262bp, (62bp), (16bp) 付近の切断パターンと異なるstx_{2f}遺伝子型のパターンであった。

stx_{2f}遺伝子特異(O128-1/2)プライマーでは、供試株は目的とする428bp付近にバンドが認められた。さらにこの増幅産物を制限酵素EcoRVで切断したところ、目的とする283bpと145bpの切断パターンが得られたためstx_{2f}遺伝子型と同定した。

5 病原遺伝子の検索

stx₂遺伝子以外のPCR法による病原遺伝子の検索結果をTable 5に示した。供試2株はeaeA遺伝子の保有が確認され、Intimin型は β であった。その他のaggR, invE, astA, bfpA, hlyA遺伝子は保有していなかった。

IV 考 察

供試株のstx遺伝子の検出を目的としたPCR検査で陰性となった市販プライマーは、その塩基配列が非公開のため詳細な検討はできなかった。このため平成18年11月2日付け(食安監第1102004号)厚生労働省監視安全課長通知による検査法に記載されているLin-allプライマー²⁾およびSchmidtらが報告したstx_{2f}遺伝子特異プライマー(O128-1/2)³⁾に着目してその反応性について検討した。Lin-allプライマーはstx₁, stx₂, stx_{2c}, stx_{2d}, stx_{2e}, stx_{2f}の遺伝子型に反応するとされ、さらにBastianら¹⁰⁾はこのPCR産物を制限酵素Hinc IIで切断したパターンからそれぞれの遺伝子型を型別できることを報告している。このLin-allプライマーを用いて供



Fig.1 PCR products of *stx2* gene obtained with commercialized primers, Lin-all primers, Lin-all primers restricted by *Hinc* II, O128-1/2 primers and O128-1/2 primers restricted by *Eco*RV.

Lane1, 2; *stx2* gene specific commercialized primers (EVS1/2; TAKARA), Lane 3, 4; *stx* gene specific Lin-all primers, Lane 5, 6; PCR products with Lin-all primers restricted by *Hinc* II, Lane 7, 8; *stx2_f* gene specific O128-1/2 primers, Lane 9; PCR products with O128-1/2 primers restricted by *Eco*RV
M;100 bp Marker, Lane 1, 3, 5, 7, 9; 05E058 strain, Lane 2, 4, 6, 8; Positive control (STEC O157:H7; *stx2* + *stx2_c* positive strain)

試2株のPCRを行ったところ増幅が認められ、そのPCR産物を制限酵素*Hinc* IIで切断した結果、対照のパターンとは異なる*stx2_f*遺伝子型のパターンが観察された。さらに、O128-1/2プライマーでも増幅が認められ、制限酵素*Eco*RVによる切断でも目的とするパターンが観察された。このことから*stx2_f*遺伝子の検査についてはLin-allプライマーおよびO128-1/2プライマーによるPCR法およびこれらの増幅産物の各々の制限酵素*Hinc* II, *Eco*RVによるPCR-RFLPにより迅速簡便な同定が可能であると考えられた。

RPLA法によるStxの検出では、供試2株は共に力価が検出下限値である1:4を示した。この試薬の添付文書には、Stx変異型に対する検出感度は通常よりも低く、偽陰性を生じる可能性があるとして記載されており、通常の検出感度はStx1で0.7 ng/ml, Stx2では0.6 ng/mlであるのに対し、Stx2c変異型では17.5ng/mlと報告¹⁰⁾されている。また、Stx2e変異型も同様に報告され¹⁰⁾、Stx2f変異型に関する報告はないが、これらと同じく検出感度が低いことが推察された。近年、Stx産生を誘導する薬剤としてMMCやNorfloxacin等が知られており、Stx2f変異型産生性大腸菌においてもMMC処理により産生が誘導されたことが報告されている^{8), 10)}。供試株の

Table 4. Result of Stx production of *E. coli* O128:HNM by Vero cell assay and commercial RPLA kit

Isolate	not induced		induced with MMC	
	Vero cell assay	VTEC-RPLA	Vero cell assay	VTEC-RPLA
05E058	+	+(1:4)	+	+(1:512)
05E060	+	+(1:4)	+	+(1:32)

Table 5. Detection of virulence-related genes of *E. coli* O128:HNM.

Gene	05E058	05E060
<i>eaeA</i>	+	+
intimin type β	+	+
<i>aggR</i>	-	-
<i>bfpA</i>	-	-
<i>astA</i>	-	-
<i>hlyA</i>	-	-

Stx産生を増強しStxの検出を容易にすることを目的としてMMC処理を行った結果、それぞれ8倍から128倍のRPLA力価の上昇が認められた。Stx産生株の中にはMMC処理により産生が誘導されない株が存在することも考慮する必要があるが、今回の結果からStx変異型株を検査する際にはMMC処理法が有効であると考えられた。Vero細胞による細胞毒性試験法では、MMC処理していない検体でも明瞭な細胞変性が認められたことから、迅速性に乏しいもののStx変異型の検出に極めて有用な方法であると思われた。

今回の分離株をCT-SMAC培地およびDHL寒天培地で再分離したところ、CT-SMAC平板培地上では、赤桃色・スムーズな集落および中心は赤色、辺縁が白濁・ムコイド状の均一な集落の2種類の集落が形成され、DHL平板培地上では、赤色・スムーズな集落および赤色・ラフ様の集落の2種類の集落が形成された。それぞれの分離培地上で色や形態が明らかに異なる集落について生化学性状、血清型、毒素遺伝子および産生性試験、PFGE型別を行った結果、全て分離株と合致したためこれらの集落は同一クローン由来と確認された。2002年の富山県で分離された*stx2_f*遺伝子保有STEC O128:HNM株においても同様に培地上に色や形態の異なる2種類の集落が認められたことが報告されており¹⁰⁾、分離の際に注意すべき性状であると考えられた。

今回報告した*stx2_f*遺伝子保有するヒト由来のSTECは、国内では2001年の長崎県内の2歳児からのSTEC O63:HMNの分離報告¹⁰⁾や2002年の富山県内の1歳および生

後11ヵ月乳幼児からのSTEC O128:HNM 2株の分離報告¹⁰⁾に次ぐ極めて稀な感染例であるが、本事例では感染源を特定することはできなかった。Morabitoら¹⁰⁾はローマでハトの糞便の649検体中30検体(4.6%)から stx_{2f} 遺伝子保有STECを分離し、その血清型の内訳はO45:H-が18株、O18:H-が4株、O75:H-が3株、Rough:H-が2株、その他O15、O25、O152が1株ずつと報告している。このことから血清型O63、O128以外についても stx_{2f} 遺伝子を保有している可能性があり、特にMorabitoらが報告したこれらの血清型に今後注意を払う必要があると思われた。また、ハト等の鳥類が stx_{2f} 遺伝子保有STEC保菌宿主である可能性がある^{3), 10)}ことから、人への感染が認められた場合、感染源として鳥類との接触調査を行う必要があると考えられた。

IV ま と め

軽度の下痢を呈した2歳児の便からSTEC O128:HNMが分離された。Lin-all、O128-1/2プライマーによるPCR、PCR-RFLPを行った結果、 stx 遺伝子型が極めて稀な stx_{2f} 変異型であることが判明した。その他の病原遺伝子では、*eaeA*遺伝子を保有しておりインチミン型は β であった。*aggR*、*invE*、*astA*、*bfpA*、*hlyA*遺伝子は保有していなかった。本株はVero細胞による細胞毒性試験で明瞭な変性像が確認された。また、MMC処理によるStxの産生誘導によりRPLA法で容易にStxを検出することができた。

文 献

- 1) 病原微生物検出情報, 28, p131-132, 国立感染症研究所, 東京 (2007)
- 2) Lin, Z. Kurazono, H. Yamasaki, S. and Takeda, Y.: Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol*, **37**, 543-548 (1993)
- 3) Schmidt, H. Scheef, J. Morabito, S. Caprioli, A. Wieler, L.H. and Karch, H.: A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1205-1208 (2000)
- 4) Paton, A.W. and Paton, J.C.: Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol*, **36**, 598-602 (1998)
- 5) 森屋一雄他: 散発下痢症患者および健常乳幼児由来大腸菌における局在及び凝集性付着大腸菌 (EPEC, EAaggEC) 関連遺伝子, *eaeA*, *aggR*, *astA*の保有状況について. *感染症誌*, **74**, 134-142 (2000)
- 6) 塚本定三: PCR法による腸管出血性大腸菌(局所性付着)および腸管集合性大腸菌の検出. *感染症誌*, **70**, 569-573 (1996)
- 7) 小林一寛: 下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察. *感染症誌*, **76**, 911-920 (2002)
- 8) Schmidt, H. Beutin, L. and Karch, H.: Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun*, **63**, 1055-1061 (1995)
- 9) Adu-Bobie, J. Frankel, G. Bain, C. Goncalves, A.G. Trabulsi, L.R. Douce, G. Knutton, S. and Gan, G.: Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol*, **36**, 662-668 (1998)
- 10) 山口仁孝他: 小児下痢症患者から分離された志賀毒素産生性大腸菌O63の病原解析. 長崎県衛生公害研究所報, **47**, 121-128 (2001)
- 11) 磯部順子他: 下痢症患者からの stx_{2f} 遺伝子保有志賀毒素産生性大腸菌O128:HNMの分離. *感染症誌*, **78**, 1000-1005 (2004)
- 12) Karmali, M.A. Petric, M. and Bielaszewska, M.: Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, **37**, 396-399 (1999)
- 13) 甲斐明美他: ラテックス凝集反応法によるVero毒素産生性大腸菌の同定, 大腸菌ベロトキシン検出用試薬の評価. *感染症誌*, **71**, 248-252 (1997)
- 14) Bastian, S.N. Carle, I. and Grimont, F.: Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of *stx* genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, **149**, 457-472 (1998)
- 15) Morabito, S. Dell'Omo, G. Agrimi, U. Schmidt, H. Karch, H. Cheasty, T. and Caprioli, A.: Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet Microbiol*, **82**, 275-283 (2001)

[ノート]

小児下痢症患者から分離された stx_{2f} 遺伝子保有 志賀毒素産生性大腸菌O63 : H6の性状

西海 弘城* 谷岡 絵理
辻 英高 山岡 政興

Characterization of Shiga Toxin producing *Escherichia coli* O63 :
H6 harboring stx_{2f} Gene Isolated from Infantile Diarrhea

Hiroki NISHIUMI*, Eri TANIOKA, Hidetaka TSUJI and Masaoki YAMAOKA

*Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

Shiga toxin producing *Escherichia coli* O63 : H6 was isolated from feces of 11 years old boy suffered with abdominal pain and muddy diarrhea. This isolate carried stx_{2f} , *eaeA* and *astA* gene, but neither *stx1*, *bfpA*, *aggR* nor *hlyA* gene as pathogenic genes.

I はじめに

志賀毒素産生大腸菌(STEC)は下痢, 血便, 出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群など人に対して重篤な症状を引き起こす病原細菌として知られている。STECは病原因子のひとつとして毒素を産生する。産生する毒素は大きく2種類に分別される。赤痢菌の産生する志賀毒素と免疫学的, 物理化学的及び生物学的性状が同じであるStx1と, Stx1と生物学的性状は似ているが, アミノ酸配列の相同性が約55%で, 免疫学的, 物理化学的性状が異なるStx2である¹⁾。Stx2にはさらに変異型であるStx2c²⁾, Stx2d³⁾, Stx2e⁴⁾, Stx2f⁵⁾等が知られている。Stx2, Stx2c及びStx2dは人分離株が産生する毒素である⁷⁾。一方, Stx2eは主に豚の浮腫病の原因菌が産生す

ると考えられている^{4, 7)}。Stx2fは鳩分離株から検出されており^{6, 7)}, いずれも人分離株から検出されることは稀である。

今回, 我々は人からStx2変異型毒素産生遺伝子の一つである stx_{2f} を保有するSTEC O63 : H6を分離し, その性状を検討したので報告する。

II 材料と方法

1. 事例概要

2007年7月, 兵庫県洲本市在住の11歳の男児が腹痛及び泥状の水様性下痢を主訴として医療機関を受診した。糞便の検査を行ったところ, 大腸菌O63が検出された。患者はオフロキサシンを投与され, 数日後に治癒した。家族は3人で, 家族には下痢等の症状はみられず, 大腸菌O63は検出されなかった。

2. 分離菌株の同定と血清型別

分離菌株は常法に従い, 生化学的性状により同定し,

感染症部

* 別刷請求先 : 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所センター

感染症部 西海 弘城

デンカ生研製のO血清及びH血清を用いて血清型を決定した。

3. 志賀毒素の検出及び志賀毒素の産生誘導

志賀毒素Stx1及びStx2の検出は、VTEC-RPLA(デンカ生研)によりRPLA法で行った。方法はキット付属の説明書に従った。また、mitomycin C (MMC)をTryptic soy brothに最終濃度500ng/mLから10倍段階希釈し、菌培養液を接種後、37°C18時間培養した後、遠心して得られた上清を試料としてStx産生の誘導をRPLA法で確認した。

4. 志賀毒素産生遺伝子の検出

Tryptic soy brothで一晩静置培養した菌液を試料とした。試料を遠心、集菌後、滅菌蒸留水に再度懸濁し、95°C、5分間加熱したものをテンプレートとした。志賀毒素産生遺伝子 stx_1 及び stx_2 の検出は市販のプライマー(Takara: EVT, EVS)及びLinら⁸⁾のプライマー(表1)を使用した。反応条件は市販のプライマーは添付文書、LinらのプライマーはLinらの報告⁸⁾に従った。目的遺伝子の増幅はエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルによる電気泳動で確認した。

5. Stx2変異型毒素産生遺伝子の検出

Stx2変異型については、Stx2d, Stx2e, Stx2fを対象として、その産生遺伝子である stx_{2d} , stx_{2e} 及び stx_{2f} についてPCR法による検出を試みた^{5, 9)}。使用したプライマーは表1に示した。目的遺伝子の増幅はエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルによる電気泳動で

確認した。さらに増幅産物がどの遺伝子であるのかを確認するため、PCR-RFLPを実施した。 stx_{2d} では制限酵素Rsa I, stx_{2e} では制限酵素Taq I, stx_{2f} では制限酵素EcoRVでそれぞれ消化後、エチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルによる電気泳動で確認した。

6. 病原性遺伝子の検出

大腸菌の病原遺伝子として知られるもののうち、腸管付着に關与する遺伝子で作用機序の異なる3種類の付着性關連遺伝子($eaeA$, $bfpA$, $aggR$)と腸管凝集性大腸菌が産生する耐熱性毒素様毒素(EAST1)産生遺伝子($astA$)、及びプラスミド上に存在するenterohaemolysin

Table 2. Biochemical Characteristics of *E.coli* O63:H6 isolated from the patient

test	reaction
TSI: Slant/Upper	A/A
Gas from glucose	+
SIM: H2S	-
Motility	+
IPA	-
LIM: Lysin	+
Indole	+
VP reaction	-
MUG(LIG)	+
Fermentation of:	+
Glucose	+
Lactose	+
Sucrose	+
Mannitol	+
Innositol	-
Salicin	-
Sorbitol	-
Rhamnose	+
Raffinose	+

Table 1. Primers used for amplification in this study

Target gene	primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
stx	up	TTTGATTGTTACAGTCAT	900
	down	GAACGAAATAATTTATATGT	
stx_{2d}	Stx2d-a	GGTAAAATGAGTTCTCTAAGTAT	175
	Stx2d-b	CAGCAAATCCTGAACCTGACG	
stx_{2e}	Stx2e-a	ATGAAGTGTATATTGTTAAAGTGGA	267
	Stx2e-b	AGCCACATATAAAATTATTCGT	
stx_{2f}	128-1	AGATTGGGCGTCATTCAGTGGTTG	428
	128-2	TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC	
$eaeA$	eaek1	GCTTAGTGCTGGTTTAGGAT	591
	EA2	CTCTGCAGATTAACCTCTGC	
$bfpA$	EP1	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326
	EP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	
$aggR$	aggRKs1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254
	aggRKas2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	
$astA$	EAST 1s	GCCATCAACACAGTATATCC	106
	EAST 1As	GAGTGACGGCTTTGTAGTC	
$hlyA$	hlyAF	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534
	hlyAR	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	

Table 3. Result of induction by mitomycin C (MMC)

dilution multiple	MMC (ng/mL)				Polymixin
	500	50	5	0.5	
1 : 2	+	+	+	-	+
1 : 4	+	+	-	-	+
1 : 8	+	+	-	-	-
1 : 16	+	-	-	-	-
1 : 32	+	-	-	-	-
1 : 64	-	-	-	-	-

産生遺伝子 (*hlyA*) をPCR法により検出を試みた。使用したプライマーは表1に示した通りである。*eaeA*, *bfpA*, *aggR*及び*astA*については小林らの方法に従った¹⁰⁾。*hlyA*についてはPatonらの方法に従った¹⁰⁾。

III 結 果

1. 生化学性状

生化学的性状試験の結果は表2に示したとおりである。 β グルクロニダーゼ陽性、ソルビトール非分解で、血清型別試験から患者由来の分離株は、大腸菌O63:H6であると同定された。

2. 志賀毒素の検出

VTEC-RPLAによりStx1及びStx2の検出を行った結果、Stx2のみが検出され、Stx1は検出されなかった。また、MMCによるStx2産生の誘導を試みたところ、MMCの濃度が上昇するに従ってStx2の産生量が上昇した(表3)。

3. 毒素産生遺伝子の検出

VTEC-RPLAではStx2が微量検出された。そこで毒素産生遺伝子の確認のため、市販プライマーを使用した

Table 4. PCR amplification of pathogenic genes

pathogenic gene	amplification
<i>eaeA</i>	+
<i>bfpA</i>	-
<i>aggR</i>	-
<i>astA</i>	+
<i>hlyA</i>	-

PCR法を実施したが、*stx1*, *stx2*共に増幅産物は確認できなかった。一方、Linらのプライマーを使用してPCRを試みた結果、増幅産物が確認された。

Linらのプライマーでのみ増幅産物が検出されたことから、Stx2の変異型が疑われた。そこで変異型志賀毒素の検出をするため、さらに*stx2_d*, *stx2_e*及び*stx2_f*についてPCR法による検出を試みた。その結果、*stx2_d*, *stx2_e*検出用プライマーでは、増幅産物が得られず、*stx2_f*検出用プライマーで428bpの増幅産物が得られた。その増幅産物を制限酵素*EcoRV*で消化後、電気泳動で分離した結果、145bpと283bpのバンドが確認された(図1)。以上のことから患者由来の大腸菌O63:H6は*stx2_f*遺伝子を保有していた。

4. 病原性遺伝子の検出

大腸菌の病原性遺伝子についてPCR法による検出を行った結果は表4のとおりである。STEC分離株から高頻度に検出される腸管粘膜定着に関するインチミン産生遺伝子*eaeA*は検出されたが、溶血毒素産生遺伝子である*hlyA*は検出されなかった。また、EAST1産生遺伝子である*astA*が検出された。病原性大腸菌が保有する束形成性線毛産生遺伝子*bfpA*及び腸管凝集性大腸菌の付着因子産生遺伝子*aggR*は検出されなかった。

IV 考 察

Stx2f産生性大腸菌の人からの報告は少なく、海外ではカナダのGannon¹²⁾らが、国内では長崎県の山口ら¹³⁾がStx2f産生志賀毒素産生性大腸菌O63:HNM、富山県の磯部ら¹⁴⁾がStx2f産生志賀毒素産生性大腸菌O128:HNMの報告をしている。

国立感染症研究所感染症情報センターの報告¹⁵⁾による

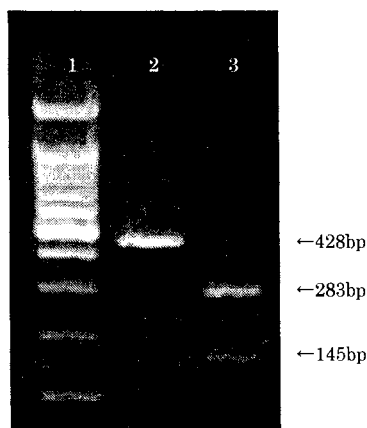


Fig.1 Results of PCR and PCR-RFLP of *stx2_f*
1. Marker, 2. PCR product, 3. PCR product digested with *EcoRV*

と、2001年から2006年の間にO63の分離報告は12件ある。その内訳はO63:H6:stx2が2001年に3件、2004年に2件、2006年に1件、O63:H6:stx othersが2003年に1件、O63:HUT:stx2が2002年に1件、O63:HNT:stx2が2003年に1件、2004年に3件である。しかし、これらのO63の病原性や変異型毒素産生性の有無等の詳細に関しては不明である。

今回分離されたO63は一般の大腸菌と同様β-D-グルクロニダーゼ陽性だったが、ソルビトールはO157と同様に非分解だった。病原性遺伝子として付着に関係するインチミン産生遺伝子である*eaeA*とEAST1産生遺伝子である*astA*を保有していたが、STEC分離株から高頻度に検出される溶血毒素産生遺伝子である*hlyA*は保有していなかった。運動性以外は2002年に長崎で分離されたO63:HMN³⁾に近似していた。今回分離された大腸菌O63:H6も他の血清型のSTECと同様に*eaeA*を持っていたことから、インチミンを産生・分泌し、患者の腸管内に定着し、病原性を発揮したと考えられる。

StxはA-B型毒素に分類され、毒素活性を担っているAサブユニットと受容体への結合に関与しているBサブユニットから構成されている¹⁾。Stx2変異型毒素であるStx2c、Stx2d、Stx2e及びStx2fとStx2の塩基配列の相同性はAサブユニットでそれぞれ99.7%、94.9%、94.0%及び63.4%、Bサブユニットでそれぞれ95.2%、86.6%、79.0%及び75.4%である^{2, 3, 4, 5)}。Stx2fは他の変異型毒素に比べStx2との相同性が低く、RPLAによる毒素の検出値が低かったため、市販プライマーで産生遺伝子を検出できなかったのではないかと考えられる。検査方法によっては、Stx2fを検出することができないため、注意が必要である。

Stx2f産生STECについては鳩からの分離報告がある^{4, 5)}が、今回の事例については、感染源や感染経路を特定するには至らなかった。今後も変異型毒素産生STECの菌株収集及び性状解析を積極的に行い、感染源や感染経路の解明に努めていきたい。

V 要 旨

11歳の男児からStx2変異型毒素産生遺伝子*stx2f*を保有する志賀毒素産生大腸菌O63:H6が分離された。分離菌株は病原性遺伝子として*stx2f*、*eaeA*及び*astA*遺伝子を保有していたが、*stx1*、*bfpA*、*aggR*及び*hlyA*遺伝子は保有していなかった。

- 1) 喜多英二, 杉浦重樹: ペロ毒素, 櫻井純, 本田武司, 小熊恵二編, 細菌毒素ハンドブック, 356 - 365, サイエンスフォーラム, 東京 (2002)
- 2) Schmitt, C. K., McKee, M. L., O'Brien, A. D. : Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect. Immun.*, **59**, 1065-1073 (1991)
- 3) Pierard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D., Lauwers, S. : Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3317-3322 (1998)
- 4) Weinstein, D. L., Jackson, M. P., Samuel, J. E., Holmes, R. K., O'Brien, A. D. : Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.*, **170**, 4223-4230 (1988)
- 5) Schmidt, H., Scheef J., Morabito S., Caprioli A., Wieler, L. H., Karch, H. : A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1205-1208 (2000)
- 6) Kobayashi, H., Pohjanvirta, T., Pelkonen, S. : Prevalence and characteristics of intimin- and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland. *J. Vet. Med. Sci.*, **64**, 1071-1073 (2002)
- 7) Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W. L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon A., Karch H. : *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J. Infect. Dis.*, **185**, 74-84 (2002)
- 8) Lin, Z., Kurazono, H., Yamasaki, S., Takeda, Y. : Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.*, **37**, 543-548 (1993)
- 9) Wang, G., Clark, C. G., Rodgers, F. G. : Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components

- of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3613-3619 (2002)
- 10) 小林一寛, 勢戸和子, 八柳潤, 斉藤志保子, 寺尾通徳, 金子通治, 芹沢俊彦, 倉本早苗, 藤沢倫彦, 鈴木理恵子, 山崎貢, 林賢一, 松根渉, 安岡富久, 堀川和美, 村上光一, 河野喜美子, 山田亨, 伊藤健一郎: 下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査の一考察. *感染症学雑誌*, **76**, 911 - 920 (2002)
- 11) Paton, A. W., Paton, J. C. : Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 598 - 602 (1998)
- 12) Gannon, V. P., Teerling, C., Masri, S. A., Gyles, C. L. : Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 1125-1135 (1990)
- 13) 山口仁孝, 山崎省吾, 野口英太郎: 小児下痢症患者より分離された志賀毒素産生大腸菌O63の病原分子解析. *長崎県衛生公害研究所報*, **47**, 21-28(2001)
- 14) 磯辺順子, 木全恵子, 霜島正浩, 細呂木志保, 田中大祐, 刑部陽宅: 下痢患者からのstx2f遺伝子保有志賀毒素産生大腸菌. *感染症学雑誌*, **78**, 1000-1005 (2002)
- 15) 国立感染症研究所感染症情報センター
<http://idsc.nih.go.jp/index-j.html>

パルスフィールドゲル電気泳動のためのグラム陰性菌からの 非酵素法によるDNA抽出

西海弘城* 山岡政興

Nonenzymatic Protocol for Pulsed Field Gel Electrophoresis of DNA Extraction from Gram-negative Bacteria

Hiroki NISHIUMI* and Masaoki YAMAOKA

*Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

We have applied chromosomal DNA extraction by nonenzymatic protocol with detergent and high concentration urea in substitution for a proteolytic enzyme successfully for *Echerichia coli*, *Shigella sonnei*, *Salmonella* Enteritidis and *Vibrio parahaemolyticus*.

This method was superior in comparison with the conventional method for the reasons of omitting the inactivation of proteinase K and not needing complicated buffers and expensive reagents such as proteinase K, Pefabloc SC.

I はじめに

パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)は分子疫学解析の手段として広く細菌感染症の分野に用いられている。PFGEは2方向から電場を作る専用の泳動装置を用い、幅広い分子量のDNA断片を分析対象とする。そのため、可能な限り物理的な断片化を防いで、できるだけ細菌の細胞内に存在していた時に近い状態で巨大分子の染色体DNAを回収することが必要である。このため、通常アガロースブロック内に菌体を包埋した状態でタンパク分解酵素を使って溶菌し細胞内に存在していた時に近い状態で染色体DNAを抽出する方法がとられる¹⁾。

細菌から染色体DNAを抽出するために、通常は溶菌

酵素やタンパク分解酵素などの酵素類が使われるが、より簡便かつ経済的にPFGE用のDNAを調整する非酵素法が、*Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*及び*Aeromonas*について報告がされている^{2, 3, 4)}。今回、当所に搬入される機会の多い出血性大腸菌O157, 赤痢菌, サルモネラ及び腸炎ビブリオについて、非酵素法によるDNA調整の可否を検討したので報告する。

II 材料と方法

1. 使用菌株

兵庫県下で患者から分離された*Echerichia coli* O157:H7, *Sigella sonnei*, *Salmonella* Enteritidis, *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6を試験に供した。

2. 酵素法によるDNA抽出法

DNAの抽出はPFGE New Protocol-Kinkiの方法⁵⁾に

感染症部

* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究センター

感染症部 西海弘城

Table 1. Comparison between enzymatic protocol and nonenzymatic protocol

	Enzymatic Protocol	Nonenzymatic Protocol
Deproteinization	0.5M EDTA (pH8.0) 1% N-Lauroylsarcosine 1mg/mL Proteinase K	0.1M EDTA (pH8.0) 1% N-Lauroyl sarcosine 1% Triton X-100 5M Urea
Wash	TE buffer with 4mM Pefabloc SC 2 times TE buffer once	TE buffer 2 times and once

従った。すなわち菌液を遠心し集菌後、蒸留水に再懸濁し、等量の1%アガロースを加え、固化させた。固化させたアガロースブロックを1% N-Lauroylsarcosine及び1 mg/mL proteinase Kを含む 0.5M EDTA(pH8.0)に入れ、50℃で一晩溶菌した。溶菌後、4 mM Pefabloc SCを含むTE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)にブロックを移し50℃20分間保温を二度繰り返しproteinase Kを失活した。次にTE bufferにブロックを移し氷上で20分間平衡化した(表1)。

3. 非酵素法によるDNA抽出法

菌をアガロースブロックに包埋するところまでは、酵素法によるDNA抽出と同様に行った。菌を包埋したブロックを5 M 尿素, 1% Triton X-100を含む0.1M EDTA(pH 8.0) 1 mLに入れ、50℃で一晩溶菌した。溶菌後、TE bufferで2回洗浄し、新しいTE buffer置換後、氷上で20分間平衡化した(表1)。

4. 制限酵素による染色体DNAの切断

ブロックを制限酵素bufferに移し氷上で30分間平衡化した後、*E. coli* O157:H7, *S. sonnei*及び*S. Enteritidis*については30Uの*Xba* I, *V. parahaemolyticus* O3 : K6については30Uの*Not* Iで37℃, 2時間処理した。

5. PFGE

電気泳動は、0.5×TBE buffer, 1%アガロースゲル, 電圧6 V/cm, パルスタイム 2.2-54.2秒, 泳動時間19時間でCHEF DRII (BIO-RAD)を用いて行った。泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、切断パターンを比較した。

III 結 果

今回、我々は尿素を用いる非酵素法によるDNA抽出法が、当所に搬入される機会の多い出血性大腸菌O157, 赤痢菌, サルモネラ及び腸炎ビブリオにおけるPFGEに適用可能か否か、酵素を用いたDNA抽出法と比較して検討を行った。結果は図1に示した通りである。

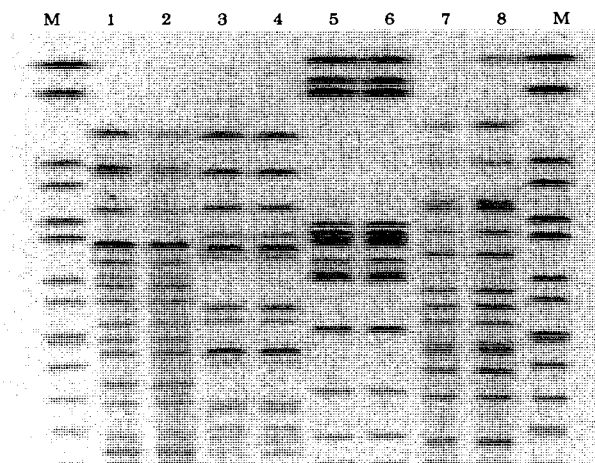


Fig. 1 PFGE of restriction enzyme-digested genomic DNA extracted by enzymatic and nonenzymatic protocol from representative isolates of *E. coli*, *S. sonnei* and *S. Enteritidis* and *V. parahaemolyticus*.

Location of isolates are as follows : Lanes 1 and 2 : *E. coli*, 3 and 4 : *S. sonnei*, 5 and 6 : *S. Enteritidis*, 7 and 8 : *V. parahaemolyticus*, M : *Salmonella* Braenderup *Xba* I digestion
Lane 1, 3, 5 and 7 : enzymatic protocol
Lane 2, 4, 6 and 8 : nonenzymatic protocol

大腸菌では約30~600kbpにかけて20本のバンドがみられた。バンドに多少の濃淡はあるが、いずれの抽出法を用いても明瞭であり、抽出方法によるPFGEパターンの差は認められなかった。また、赤痢菌では約30~500 kbpの間に20本のバンド、サルモネラでは約30~1000kbpの間に13本のバンド、腸炎ビブリオでは約30~1000kbpの間に18本のバンドがあり、いずれの抽出法においても大腸菌と同様に多少の濃淡はあるが、バンドは明瞭であり、泳動位置はすべて一致した。

IV 考 察

McEllistremはlysozymeやmutanolysinといった溶菌酵素やproteinase Kなどのタンパク分解酵素を使わずにEDTAとN-Lauroylsarcosineを含むバッファーで*S. pneumoniae*からPFGE用のDNAを調整する方法を報告している²⁾。また、Lopez-Canovasらは尿素及び2種類

の界面活性剤(N-Lauroylsarcosine及びNonidet P-40)を含むバッファーを用いて1ステップでPFGE用のDNAを調整する方法を*P. aeruginosa*, *V. cholerae*及び*Aeromonas*について報告している^{3, 4)}。今回、我々は出血性大腸菌O157, 赤痢菌, サルモネラ及び腸炎ビブリオについて、新たに開発したTriton X-100と尿素を含むEDTAバッファーを用いたシンプルな非酵素法により従来の酵素法と同等の良好な結果が得られたものと考え、Lopez-Canovasら^{3, 4)}は蛋白質を可溶化させるために2種類の界面活性剤(N-Lauroylsarcosine及びNonidet P-40)を利用している。我々は臨界ミセル濃度が比較的高く、かつ安価なTriton X-100のみで蛋白質の可溶化が十分であることを確認した。

我々の試みた非酵素法は、タンパク分解酵素の代わりに尿素によって蛋白質を変性させた後にTriton X-100で可溶化し、DNAを抽出する方法である。尿素はタンパク変性剤の一つであり、水の網目構造の破壊、蛋白質分子内の側鎖間やペプチド結合間の水素結合の破壊及び蛋白質分子内の疎水結合の破壊が複合的に働くことにより蛋白質を可溶化、変性させる。

一方、*Campylobacter*属^{6, 7)}や*Clostridium*属^{8, 9)}は菌株によっては、DNA抽出中にDNAが内在性DNA分解酵素により分解され、泳動結果がスメアになることが報告されている。そのため、これらの菌を用いてPFGEによる解析を実施する場合、アガロースに菌体を包埋する前に、ホルマリンで前処理することにより内在性DNA分解酵素を不活化する方法が用いられる。Asahidaら¹⁰⁾は尿素が内在性DNA分解酵素を変性させることを利用して、高濃度の尿素を含むTRES-Urea bufferを用いることにより、カレイやヒラメのような内在性DNA分解酵素が豊富な魚類からのDNA抽出を可能にした。今回我々が試みた非酵素法は高濃度の尿素を含有するため、*Campylobacter*属や*Clostridium*属のような内在性DNA分解酵素が豊富な菌でもホルマリンによる前処理なしでDNA抽出が可能であると考えられるため、今後検討したい。

酵素法ではタンパク質をproteinase Kで分解するが、その後にproteinase Kが残存していると制限酵素によるDNA切断の過程で制限酵素が分解されてしまうため、DNAが切断されない。そのため、プロテアーゼインヒビターであるPefabloc SCによるタンパク分解酵素の不活化が必要となる。しかし、今回我々が試みた尿素及び界面活性剤によりタンパクを可溶化し除去する非酵素法の場合、ブロックの洗浄のみで尿素や界面活性剤は除去できるため、Pefabloc SCによるproteinase Kの不活化操作を省くことができる。また、proteinase KやPefabloc

loc SCといった高価な試薬も必要としない利点につながった。

V 要 旨

グラム陰性細菌について、PFGEのためにタンパク分解酵素の代わりに高濃度の尿素を用いて染色体DNAを抽出する非酵素法を開発した。この方法は、大腸菌、赤痢菌、サルモネラ菌及び腸炎ビブリオに適用可能だった。我々の非酵素法はproteinase Kの不活化操作を省略でき、proteinase KやプロテアーゼインヒビターであるPefabloc SCといった高価な試薬を必要とせず、複雑な組成のバッファーを必要としないという点で優れていた。

本研究は厚生労働研究費補助金により実施した。

文 献

- 1) Bohm, H., Karch, H. : DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2169-2172 (1992)
- 2) McEllistrem, M. C., Stout, J. E., and Harrison, L. H. : Simplified protocol for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 351-353 (2000)
- 3) Lopez-Canovas, L., Sanchez-Alonso, A., Higginson, D., Ariosa, C., Clark, H., Riveron, A. M. : Nonenzymatic protocol for *Pseudomonas aeruginosa* DNA preparation and rapid subtyping by mini pulsed-field gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **24**, 1152-1158 (2003)
- 4) Lopez-Canovas, L., Bravo, L., Herrera, J., Riveron, A. M., Javer, E., Sanchez, A., Fando, R., Noa, M. D., Fernandez, A. : DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* species by pulsed-field minigel electrophoresis. *Electrophoresis*, **27**, 2857-2864 (2006)
- 5) 勢戸和子, 石川和彦, 藤原恵子, 竹上修平, 小笠原準, 横田正春, 西海弘城, 黒川学, 川西伸也, 中山章文, 金澤祐子, 田口真澄, 小林一寛: 近畿ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)型別法の施設間変動について—感染研新プロトコルの試用—, 新興・再興感染症研究事業平成15年度総括・分担研究報告書, 95-104 (2003)

- 6) Gibson, J. R., Sutherland, K., Owen, R. J. : Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. Lett. Appl. Microbiol., **19**, 357-358 (1994)
- 7) Owen, R. J., Sutherland, K., Fitzgerald, C., Gibson, J., Borman, P., Stanley, J. : Molecular subtyping scheme for serotypes HS1 and HS4 of *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol., **33**, 872-877 (1995)
- 8) Hielm, S., Bjorkroth, J., Hyytia, E., Korkeala, H. : Genomic analysis of *Clostridium botulinum* group II by pulsed-field gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol., **64**, 703-708 (1998)
- 9) Maslanka, S. E., Kerr, J. G., Williams, G., Barbaree, J. M., Carson, L. A., Miller, J. M., Swaminathan, B. : Molecular subtyping of *Clostridium perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne-disease outbreak investigations. J. Clin. Microbiol., **37**, 2209-2214 (1999)
- 10) Asahida, T., Kobayashi, T., Saitoh, K., Nakayama, I. : Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. Fishers Sci., **62**, 727-730 (1996)

2005年に兵庫県で分離された結核菌のBeijing genotypeと薬剤感受性

辻 英高* 西海弘城 山岡政興

Characterization of *Mycobacterium Tuberculosis* according to Beijing Genotype and the Drug Susceptibility Isolated from the Patients in Hyogo Prefecture in 2005

Hidetaka TSUJI*, Hiroki NISHIUMI and Masaoki YAMAOKA

Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

Genotypic analysis according to the genotype of Beijing lineage was performed on 30 strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from the patients in Hyogo prefecture in 2005. Among them, 24 strains were classified into Beijing genotype and also 21 strains were subdivided into ancient sublineage, and three strains belong to modern sublineage. The strains classified into the modern sublineage showed different IS6110 RFLP patterns. Two of them were drug-resistant strains, one strain showed the resistance to isoniazid and the other was multi-drug resistant strain which showed the resistance to all four primary anti-tuberculosis drugs.

I はじめに

結核の分子疫学解析法として結核菌のIS6110を遺伝子マーカーとしたRFLP分析法が標準化され¹⁾, 国内外において結核感染の疫学的な研究のための強力な手段となっている²⁻³⁾. また, 結核菌遺伝子のDR (direct repeat) 領域を標的とした Spoligotyping (spacer oligo nucleotide typing)法⁴⁻⁶⁾やプラスミド上の繰り返し配列を標的とした PGRS (polymorphic GC-rich repetitive sequence)法⁷⁾などがIS6110-RFLPによる分子疫学解析を補完するための分析法として用いられている⁸⁻⁹⁾. Soolingenら⁹⁾は東アジアから分離された結核

菌についてIS6110-RFLP, 及びSpoligotyping法を用いて解析した結果, 分離株は遺伝学的に類似性が高く, またSpoligotyping法で特徴的なパターンを示すことを明らかにし, これらの菌株についてBeijing familyと命名した. この遺伝子型に属する結核菌は全世界で分離されているが, 特に東アジアを中心に分布している⁹⁻¹⁰⁾ことが知られている. Beijing genotypeはSpoligotyping法によって他の結核菌と区別されるが, 方法が煩雑である. 最近, Mokrousovら¹⁰⁾はPCRに基づいたIS6110 inverse PCR法によってBeijing genotypeの型別が可能であると報告している.

我々は県内における結核菌のBeijing genotypeとの関係を知るために, 2005年に分離された30菌株について, Mokrousovらの行ったPCR法を用いてBeijing genotypeに関する型別を行った. あわせて一次抗結核薬に対する薬剤耐性を調べたので, 報告する.

感染症部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究センター
感染症部 辻 英高

II 材料と方法

1. 供試菌株

分析に使用した菌株は県内で2005年に分離され、患者の同意のもとに研究センターに搬入された30菌株である。

2. 菌株の遺伝子分析

供試菌株について、IS6110 inverse PCR法¹²⁾ および *dnaA-dnaN* 領域におけるIS6110の挿入の有無¹³⁾ をPCR法により調べ、分離株のBeijing genotypeの型別、およびancient sublineage と modern sublineageの亜型別を行った。また、Beijing genotype modern sublineage 株についてはさらに菌株間の関連性を調べるために、RFLP分析¹⁴⁾ を行った。

3. 薬剤感受性

供試菌株について、結核菌検査指針¹⁵⁾ に従って、一次抗結核薬であるイソニアジド(INH)、リファンピシン(RFP)、ストレプトマイシン(SM)、エタンブトール(EB)の4薬剤を対象にして、1%小川培地を用いた比率法により試験した。

III 結果

1. 遺伝子分析

Mokrousovらの方法に準拠して行ったPCR法によるBeijing genotypeの検討結果はTable 1のとおりである。供試した30菌株のうち24菌株(80%)はIS6110 inverse PCRの結果、いずれの菌株も290bp、および470bpに増幅フラグメントが認められ、Beijing genotypeに分類された。このうち、3菌株は260bpにも増幅フラグメントバンドがみられたことから、さらにmodern sublineageに分類され、他の21菌株はancient sublineageに分類された。Beijing genotype分類されたこれらすべての株は*dnaA-dnaN*領域にIS6110を保有していた。また、modern sublineageに分類された3菌株のRFLPパターンはFig. 1のとおりである。NO. 1~3は類似したパターンを示したが、サイズに僅かな違いがみられた。また、約1.4Kb以上のサイズで、NO. 1に比べてNO. 2は3本、NO. 3は2本バンドが多かった。

2. 薬剤感受性と遺伝子型

供試した30菌株のうち28菌株は試験した4薬剤に対して感受性であった。薬剤耐性の2菌株はいずれも遺伝子分析によってBeijing genotype modern sublineageに属した。1株(Fig. 1 ; No. 1)はINH, RFP, SMおよびEBの4薬剤耐性であり、他の1株(Fig. 1 ; No. 2)はINHに耐性であった。

びEBの4薬剤耐性であり、他の1株(Fig. 1 ; No. 2)はINHに耐性であった。

Table 1 Classification of the 30 strains by the characterization according to the Beijing genotype isolated from the patients in 2005

Number of Strains	Size of flagment (bp)	IS6110 in <i>dnaA-dnaN</i>	Classification
21	290, 470	Yes* ¹	Beijing genotype ancient sublineage
3	260, 290, 470	Yes	Beijing genotype modern sublineage
6	Various sizes	No* ²	Non-Beijing strain

* 1 ; Expected size of amplicons which contained the amplification product of the IS6110 DNA (~1350bp) was ~2000 bp

* 2 ; Expected size of amplicons was 640 bp

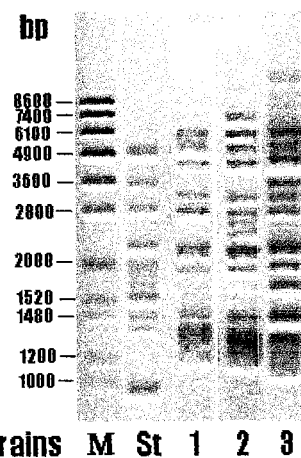


Fig. 1 IS6110-RFLP patterns of the three strains which were classified into the modern Beijing genotype: M; DNA molecular weight marker VII (Roche Diagnostics GmbH), St; *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Strains, No.1; showed the resistance to all four primary anti-tuberculosis drugs., No.2; resistant to INH., No.3; sensitive to all four primary anti-tuberculosis drugs.

IV 考察

結核菌の遺伝子型のなかでBeijing genotype^{9, 16)} と呼ばれる一群の結核菌がアジアに分布している。この遺伝子型の結核菌は全世界で分離されており、特に東アジアを中心に分布していることが知られている⁹⁻¹¹⁾。1990年代にアメリカで院内感染を引き起こした多剤耐性W株もBeijing genotypeに属しており、これらの菌株は感染伝播力が強く、また結核病態も重症であることが報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。Beijing genotypeは結核菌DNAのDR領域でのスペーサ1~34の欠如⁹⁾、*dnaA-dnaN*領域やNTF領域におけるIS6110の挿入の有無などによって他の結核

菌と区別できる^{13,17)}ことが明らかにされている。Beijing genotypeはDR領域を標的とした分析法であるSpoligotyping法によって型別された方法であるが、これらの菌株を迅速に把握する必要性から、Insertion site mapping法などの迅速な分析法が報告されている^{17,20)}。Mokrousovら¹²⁾はPCRに基づいたIS6110 inverse PCR法によって結核菌の型別が可能である²¹⁾ことから、この方法を用いてBeijing genotypeの型別を行い、さらにBeijing genotypeをancient sublineageとmodern sublineageに区別した。我々はこの迅速法を用いて、県内の分離株30菌株についてBeijing genotypeに関する検討を行ったところ、分離株の24菌株(80%)がBeijing genotypeに該当し、他の6菌株(20%)はNon-Beijing strainsであった。さらに、Beijing genotype 24菌株のうち21菌株がancient sublineageに、3菌株がmodern sublineageに分類された。国内の他の研究においてもSpoligotyping法によって、分離株の70%程度がBeijing genotypeであると報告されており^{22,23)}、県内分離株のBeijing genotypeの分布は国内の分布と近似していた。また、分離株の薬剤感受性試験の結果、modern sublineageに分類された3菌株のうち2菌株は薬剤耐性株であり、これら3名の患者のうち2名はいずれも登録から2年以内に中国から来日された方であった。国別の結核菌株の解析で、その国に特異的なRFLPパターンが存在し、外国人結核患者株は在日5年以内のものではその国の特有なパターンを示すという報告²⁴⁾から、これら2名の患者は海外で感染し、発病した可能性が高い。また、他の1名の患者は海外渡航歴がなく、国内での感染の可能性が考えられた。県内や国内の分離株のほとんどの株がBeijing genotypeであることから、ancient sublineageは、県内や日本国内における固有の株と思われるが、modern sublineageは近隣の結核高まん延国での流行株²⁵⁾の可能性が考えられる。また、県内の分離株について行った薬剤感受性試験と遺伝子型別の結果から、Beijing genotypeのうち、modern sublineageに分類される菌株群には薬剤耐性株が多いことも考えられ、今後の分離動向について注意する必要があると思われる。

V 要 旨

兵庫県内の結核患者から分離された30菌株について、Beijing genotypeに関する型別を行った結果、24菌株はBeijing genotypeに該当した。さらに21菌株がancient sublineageに、3菌株がmodern sublineageに分類された。modern sublineageに分類された3菌

株のRFLPパターンはそれぞれ異なり、2菌株は薬剤耐性株であり、1菌株はINH耐性株、他の1菌株は4薬剤すべてに耐性の多剤耐性株であった。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、調査にご協力いただいた兵庫県健康生活部健康局疾病対策課、及び健康福祉事務所の関係者の皆様方、ならびに菌株を提供いただいた医療機関の関係者の皆様方に深謝いたします。

文 献

- 1) van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R. and Shinnick, T. M. : Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 406-409 (1993)
- 2) van Soolingen, D., Hermans, P. W., de Haas, P. E., Soll, D. R. and van Embden, J. D. : Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains : evaluation of an insertion sequence -dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2578-2586 (1991)
- 3) Takahashi, M., Kazumi, Y., Fukusawa, Y., Hirano, K., Mori, T., Dale, J. W. and Abe, C. : Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Microbiol. Immunol.*, **37**, 289-294 (1993)
- 4) Groenen, P. M., Bunschoten, A. E., van Soolingen, D. and van Embden, J. D. : Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.*, **10**, 1057-1065 (1993)
- 5) Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M. and van Embden, J. : Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and

- epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 907-914(1997)
- 6) van Embden, J. D., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., B. A., van Der Zeijstqq, B. A. and Schouls, L. M. : Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J. Bacteriol.*, **182**, 2393-2401 (2000)
- 7) Ross, B. C., Raios, K., Jackson, K. and Dwyer, B. : Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.*, **30** : 942-946 (1992)
- 8) Bifani, P. J., Mathema, B., Liu, Z., Moghazeh, S. L., Shopsis, B., Tempalski, B., Driscoll, J., Frothingham, R., Musser, J. M., Alcabes, P. and Kreiswirth, B. N. : Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population- based molecular epidemiology. *JAMA*, **282**, 2321-2327 (1999)
- 9) van Soolingen, D., Qian, L., de Haas, P. E., Douglas, J. T., Traore, H., Portaels, F., Qing, H. Z., Enkhsaikan, D., Nymadawa, P. and van Embden, J. D. : Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 3234-3238 (1995)
- 10) Bifani, P. J., Mathema, B., Kurepina, N. E. and Kreiswirth, B. N. : Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.*, **10**, 45-52 (2002)
- 11) Glynn, J. R., Whiteley, J., Bifani, P. J., Kremer, K. and van Soolingen, D. : Worldwide occurrence of Beijing / W strains of *Mycobacterium tuberculosis* . : a systematic review. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 843-849 (2002)
- 12) Mokrousov, I., Jiao, W. W., Valcheva, V., Vyazovaya, A., Otten, T., Ly, H. M., Lan, N. N., Limeschenko, E., Markova, N., Vyshnevskiy, B., Shen, A. D. and Narvskaya, O. : Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 2851-2856 (2006)
- 13) Kurepina, N. E., Srevatsan, S., Plikaytis, B. B., Bifani, P. J., Connell, N. D., Donnelly, R. J., van Soolingen, D., Musser, J. M. and Kreiswirth, B. N. : Characterization of the phylogenetic distribution and chromosomal insertion sites of five IS6110 elements in *Mycobacterium tuberculosis* : non-random integration in the dnaA-dnaN region. *Tuber. Lung Dis.*, **79**, 31-42 (1998)
- 14) 高橋光良, 阿部千代治 : ISタイピング法 : IS6110をプローブとしたRFLP分析による結核菌の亜分類. *日本細菌学雑誌*, **49**, 853-857 (1994)
- 15) 財団法人結核予防会 : 新結核菌検査指針2000, 東京 (2000)
- 16) Caminero, J. A., Pena, M. J., Campos-Herrero, M. I., Rodriguez, J. C., Garcia, I., Cabrera, P., Lafoz, C., Samper, S., Takiff, H., Afonso, O., Pavon, J. M., Torres, M. J., van Soolingen, D., Enarson, D. A. and Martin, C. : Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **164**, 1165-1170 (2001)
- 17) Plikaytis, B. B., Marden, J. L., Crawford, J., Woodley, C. L., Butler, W. R. and Shinnick, T. M. : Multiplex PCR assay specific for the multidrug resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1542-1546 (1994)
- 18) Moss, A. R., Alland, D., Telzak, E., Hewlett, Jr. D., Sharp, V., Chiliade, P., LaBombardi, V., Kabus, D., Hanna, B., Palumbo, L., Brudney, K., Weltman, A., Stoeckle, K., Chirgwin, K., Simberkoff, M., Moghazeh, S., Eisner, W., Lutfey, M. and Kreiswirth, B. : A city-wide outbreak of a multiple-drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* in New York. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **1**, 115-121 (1997)
- 19) Zhang, M., Cong, J., Yang, Z., Samten, B. and Barnes, P. F. : Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. *J. Infect. Dis.*, **179**, 1213-1217 (1999).
- 20) Kurepina, N., Likhoshvay, E., Shashkina, E., Mathema, B., Kremer, K., van Soolingen, D., Bifani, P. and Kreiswirth, B. N. : Targeted hybridization of IS6110 fingerprints identifies the W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strains

- among clinical isolates. J. Clin. Microbiol., **43**, 2148-2154 (2005)
- 21) Ross, B. C. and Dwyer, B. : Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., **31**, 329-334 (1993)
- 22) 高橋光良 : 結核菌DNAのRFLP分析を用いた結核分子疫学の研究と実践. 結核, **78**, 641-651 (2003)
- 23) 大畠律子, 多田敦彦 : 岡山地区で分離された結核菌におけるBeijing familyおよび他の遺伝子型. 結核, **79**, 47-53 (2004)
- 24) Jiao, W. W., Mokrousov, I., Sun, G. Z., Li, M., Liu, J. W. and Narvskaya, O. : Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China. Chin. Med. J., **120**, 814-819 (2007)

[ノート]

1992年～2006年の兵庫県における日本脳炎ウイルスの自然生態

山岡政興* 押部智宏

Natural Behavior of Japanese Encephalitis Virus in Hyogo Prefecture
between 1992 and 2006

Masaoki YAMAOKA* and Tomohiro OSHIBE

*Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

Natural behavior of Japanese encephalitis (JE) virus in Hyogo prefecture between 1992 and 2006 was examined for the occurrence of JE patients and the surveillance of antibody in swine sera. Whereas four patients occurred during 1992 and 1994, no patient observed after 1995. The antibody to JE virus was detected every year in swine sera, but the appearance date and prevalence patterns were different considerably. The JE virus has a transmission cycle between amplifier pigs and vector mosquitoes from June to November and the long period of natural cycle gives a chance to transmit JE virus.

I はじめに

日本脳炎（日脳）は、水田などで発生したコガタアカイエカによって媒介されるフラビウイルス科に属する日脳ウイルスによって起こるウイルス感染症である。この蚊は日本全土に生息し、5月頃おもに水田で発生し、発生数は8月ごろ最大となり、しだいに減少して10月ごろからほとんど見られなくなる。したがって日脳はコガタアカイエカが発生してから見られる夏の感染症である。日脳ウイルスが流行閉期にどこに潜んでいるのか明らかではないが、いったん蚊と豚の間に出現すると蚊が豚を吸血する際に豚を感染させる。ウイルスは豚の体内でよく増殖し、次にウイルス血症状態の豚を吸血した蚊によって他の多くの豚に感染が広がる。人はこの豚を吸血した

蚊によって感染することが観察され¹⁾、人感染に先んずる豚の日脳感染を監視することによって人への流行を予測することができ、豚における日脳ウイルス抗体の保有調査が厚労省の流行予測事業として行われてきた^{2, 3)}。

人はほとんどが不顕性感染であるが、脳炎を発症すると3割は死亡し、同じくらいが後遺症を残す。一方、豚は妊娠豚では死産を起こすことが知られているが、一般的には症状を示さない²⁾。わが国では1950～1960年代にかけて毎年数千人の患者発生が報告されていたが、1970～1980年代になると数十人に、1992年以降は毎年一桁まで減少してきた⁴⁾。兵庫県においても日脳患者は大きく減少し、1995年以降患者発生は報告されていない。

ここでは1992年から2006年までの15年間の厚労省の流行予測事業をもとに行った成績をまとめた。われわれは、兵庫県内産の豚が減少する中で毎年の調査が地域差により、流行状況が正確に把握できないことを避けるために出来るだけ飼育場を固定したが、年によっては地域差を確認する調査も入れて行った。また、調査期間もその年の流行状況がとらえられるまで延長して行った。

感染症部

* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所

感染症部 山岡政興

II 材料および方法

1. 被検豚血清

兵庫県内産で6ヶ月齢の豚から血清を採取した。1992年の検体は小規模の飼育農家の豚を集めて屠場に送るシステムで採取された淡路島の豚血清で採取日により飼育場による差が見られた。そこで、1993年から調査期間中は同じ飼育場の豚が供給される北播磨の飼育場を選定した。しかしながら阪神淡路大震災で1995年以後は、それまでの3年間とは異なる西播磨のほぼ中央に位置する飼育場の豚を対象に日脳の自然生態を調査した。ただし近年兵庫県内産の豚の飼育頭数は減少傾向にあり、飼育期間をとおして1つの飼育場の検体を使用することが出来ない場合がある。1999年の10月20日と11月16日は姫路市内の飼育場からの検体で、それ以外の6回は1995年以後の中播磨の豚である。2002年は7月22日の1回目から3回と5回目の4回は1995年以後の従来の飼育場の豚を対象にしたが、この年の地域差を検討するために4回目と6～8回の4回は南に40km離れた飼育場の豚を対象にした。2004年は中播磨の1995年以後の飼育場とは異なる2ヶ所の飼育場の豚を調査ごとに半数づつ供した。2005年は3ヶ所の飼育場の豚を検査対象とした。すなわち7月

14日と9月1日は姫路市内、8月4日と9月15日は中播磨の飼育場で1995年からの9年間とは異なる。8月25日と10月13日は、但馬の同じ飼育場の検体である。2006年8月2日と11日の2回は但馬の飼育豚を対象にし、それ以外は1995年以後の中播磨の飼育場の豚を対象とした。検査頭数は1992～1994年までは毎回20頭を調査した。それ以後は1回あたり15頭を目安とし、10～20頭から採血した。

2. 日脳ウイルスに対するHI抗体の測定

ガチョウ血球を用いた赤血球凝集抑制 (HI) 抗体を測定した。HI試験法は定法に従って行った²⁾。すなわち抗原は市販の日本脳炎CF, HI抗原 (JaGAR #01株) (デンカ生研) を使用した。豚血清中のインヒビターはアセトン処理、非働化およびガチョウ血球で吸収し、処理後は1:10希釈血清となる。HI抗体価は1:10希釈血清から2倍階段希釈し、反応のあった最終の数値で示した。感染の初期状態を示すIgM抗体は、無処理血清でのHI抗体価より2-ME処理した血清での抗体価が3管以上低下したものを陽性と判定した。従って無処理で1:40のHI抗体価以上の血清について感受性の有無を調べ、1:20以下はこの処理でクラス分けは出来ないの、抗

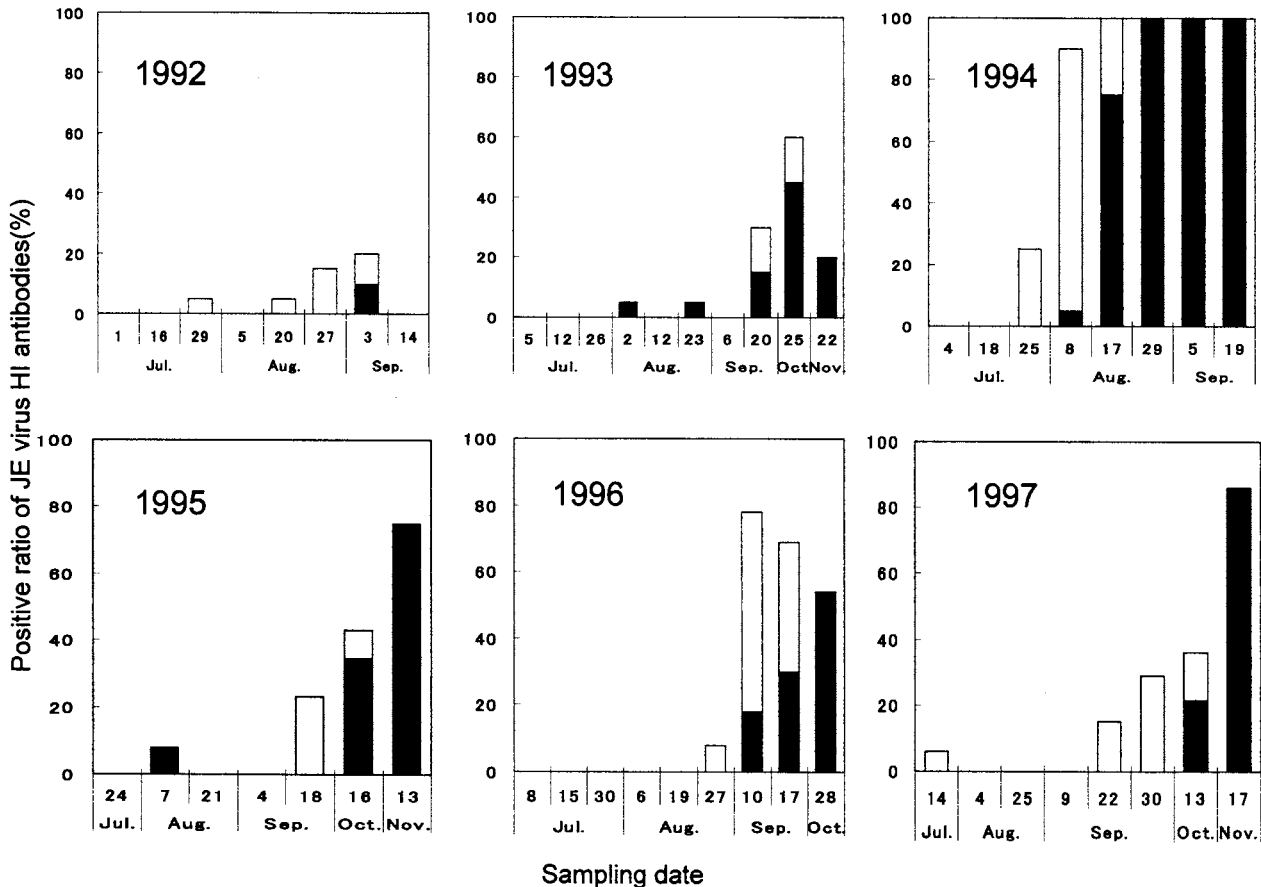


Fig. 1 Time evolution of JE virus antibodies in swine sera in Hyogo prefecture, 1992 to 1997. Abscissa indicate sampling date of swine sera and ordinate indicate positive ratio of JE virus HI antibodies. Closed quadrilateral indicate IgG class antibodies and open quadrilateral indicate IgM class antibodies.

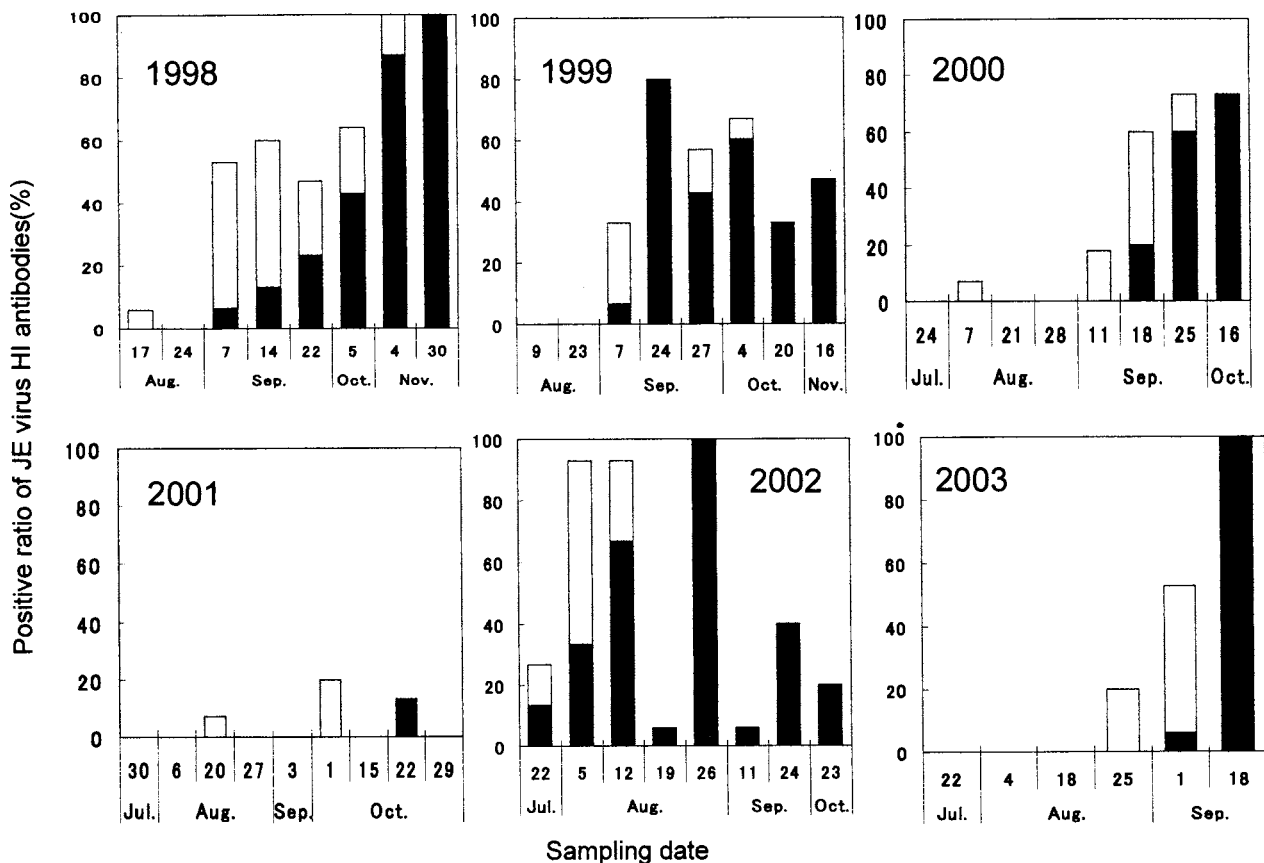


Fig. 2 Time evolution of JE virus antibodies in swine sera in Hyogo prefecture, 1998 to 2003. Other legends are the same as Fig. 1.

体のクラスを問わない日脳HI抗体として示した。

III 結果および考察

1. 1992年から1997年の日脳ウイルス抗体の変動

1992年から2006年まで15年の調査のうち最初の6年間の結果をFig. 1に示す。1992年は7月29日に1頭(5%)で1:80の日脳抗体が検出され、感染初期抗体の2ME感受性抗体であった。8月20日は同じ結果で、以後抗体陽性率は少しずつ上昇し、9月3日には4頭(20%)が陽性であり、そのうち2頭は2ME処理に反応しないIgG抗体であった。しかし、続く9月14日に日脳ウイルス抗体は全く検出されず、飼育場あるいは個体による差が見られた。

飼育場を固定した1993年は8月に入って2日と23日に1:320と1:640以上の抗体価を検出し、いずれもIgG抗体であった。9月に入り20日の6頭に日脳ウイルス抗体が出現し、1:10の2頭以外の4頭はいずれも1:640以上で、そのうち2頭はIgM抗体であった。それから1ヵ月後の10月25日に陽性検体は60%へと上昇し、本格的な流行は9月中旬から始まったことが示された。

1994年はFig. 1のとおり1993年とまったく異なった流

行状況を示した。7月の3回目の25日に5頭に日脳抗体が検出され1:20の1頭を除く4頭はすべて2ME処理に感受性のIgM抗体で、日脳ウイルスが蚊と豚をサイクルし始めた。8月8日に90%、17日には100%に達し、以後9月19日までの3回に検査した60頭はすべて日脳抗体を持っており、すべてがIgG抗体であった。1993年と1994年は同一の飼育場の豚を対象にした。同じ飼育場でも年によって流行の時期と規模が大きく異なっていた。

1995年から1997年の3年間は良く似た流行パターンが見られた。1995年は8月7日に1:80の日脳抗体が検出されたが、本格的な流行は1993年とほぼ同時期の9月から始まり、11月まで調査を継続したが陽性率は100%に達しなかった。本格的な流行が8月終わりから9月半ばの秋口と1994年に比べて遅れて始まったこと、陽性率が100%に達しなかったことは1995年からの3年間に共通して見られた。日脳が大きな問題であった1960年代は7月には蚊と豚の間で日脳ウイルスの感染が見られ豚は100%感染した⁵⁾。そのころに比べると2ヵ月ほど日脳ウイルスの伝播が遅れている。9月にずれこめばそれ以後の媒介蚊の発生は季節とともに減少し、それに従って人が感染する機会が減ることになる。

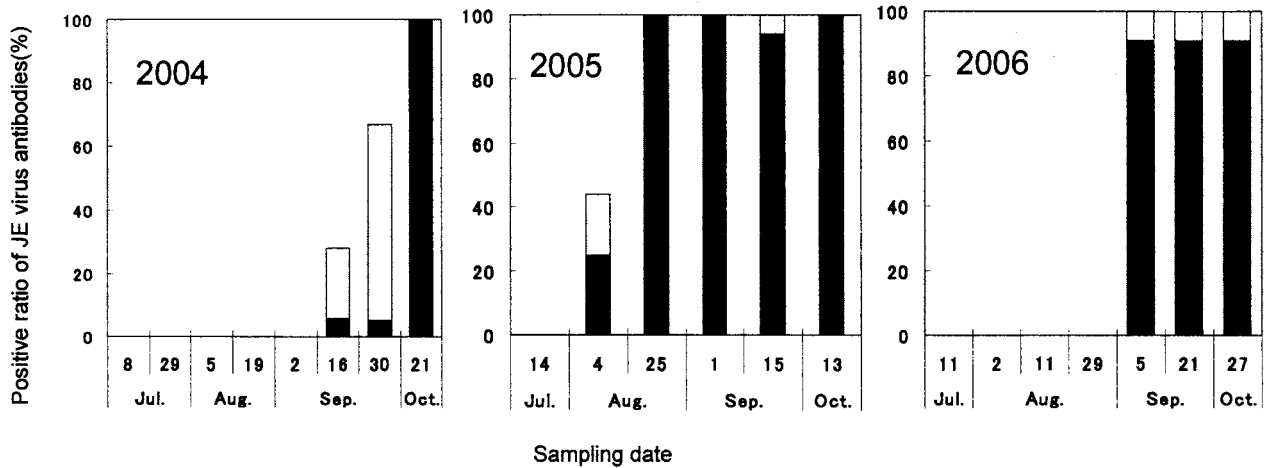


Fig. 3 Time evolution of JE virus antibodies in swine sera in Hyogo prefecture, 2004 to 2006. Other legends are the same as Fig. 1.

2. 1998年から2003年の日脳ウイルス抗体の変動

1998年から2003年の6年間の豚における日脳ウイルス抗体の変動はFig. 2のとおりである。検査対象は1995年から1997年までと同じ中播磨の飼育場の豚である。6年間のうち1998年から2000年までと2003年の4年間は、本格的に豚の間で日脳ウイルスが流行し始めたのは1994年からの3年間とほぼ同様に、つまりこの中播磨の飼育場では9年間のうち7年間は秋口になって日脳ウイルスが蚊と豚の間でサイクルし始めた。2001年は1:10の日脳抗体が8月20日に検出されたものの、日脳ウイルスの活動はさらに遅れ、10月になって3頭に1:160以上で何れもIgMクラスの抗体が検出された。しかし、10月に調査した4回を含めて検出されたのは1回15頭を対象にした9回の調査で6頭(4%)に止まり、調査した15年間で最も日脳ウイルスの活動は弱かった。これに対して2002年は調査を開始した7月22日にすでに15頭中4頭が1:320以上の抗体価を示し、50%はIgG抗体であり、8月26日にはすべての豚が抗体陽性に転じた。同じ飼育場でありながら、調査した年により極端な流行規模の変化は1993年と1994年にも見られた。また2002年は、大流行が見られた中播磨の飼育場から40キロ南の飼育場ではFig. 2のとおり8月19日と9月から10月にかけての4回の抗体保有調査から、小流行であったことを示され、調査地によってかなりばらつきが見られた。

調査した年のすべてで日脳ウイルス抗体の陽性率のピークを捉えたわけではないが、調査した年に100%の抗体保有に達したのは1998年2002年2003年と3回あり、1998年は8月17日にIgM抗体が検出されてから11月4日まで延べ4ヶ月間の長期にわたり、蚊の中で日脳ウイルスが存続し続けた。IgM抗体が長期にわたって検出されることはそれだけウイルスが蚊と豚の間をサイクルすることを示唆している。また、すべての豚が100%陽転しな

Table 1 The number of JE patients and dates of onset of illness from 1992 to 2006

Year	No. of patients	Dates of onset of illness
1992	1	Aug. 27
1993	1	Jun. 28
1994	2	Aug. 13, Sep. 29
1995~2006	0	—

い状態はそのまま感染機会が長期にわたって続くことを意味している。

3. 2004年から2006年の日脳ウイルス抗体の変動

最近3年間の豚血清中の日脳ウイルス抗体の変動はFig. 3のとおりである。本格流行の始まった時期は2004年と2006年は9月で2005年は8月初めと異なるがいずれの年も100%抗体は陽転していた。2005年はほぼ兵庫県全体に分布する3ヶ所の飼育場の豚を対象にした。本格的な流行が8月4日から始まり8月25日以降100%を示し日脳ウイルス抗体はスムーズに変動したことから、地域差は認められずほぼ兵庫県全域で大きな流行があったことを示唆している。この年は全国的にも豚の間で比較的大きな流行が見られた。

4. 日脳患者の発生数の変動

1992年から2006年に兵庫県内で日脳による感染が確認された患者数と発病月日をTable 1に示した。1992年からの3年間で4人の患者が発生したが1995年以降2006年まで報告されなかった。1993年に姫路市で確認された27歳の女性は6月28日に発病した。この年の豚での本格流行は9月の中旬である。本格流行に先立って8月2日と23日に1頭ずつであるが、1:320以上の抗体価を示すIgG抗体が検出されており、1ヶ月以上前に豚の間では

小さな流行があったことが示されており、患者はこの時期に蚊と豚の間の日脳ウイルスのサイクルの中にいた可能性がある。一方、1994年の1人の患者発生は1993年と対照的に9月終わりであった。この年中播磨の飼育場では7月終わりに本格的流行が始まり8月末には100%抗体陽性ですべてIgG抗体であった。この飼育場周辺ではこの時期に保毒蚊はいないことを意味する。9月も終わりに患者が発生したのは、大流行と小流行の顕著な地域差が見られた2002年のような状況が1994年にもあったためと推測される。近年の患者は、大流行した1960年代の傾向とは明らかに異なり、流行時期が遅れていることはIgM抗体検出の遷延化と平行して見られ、1978年から1983年までのELISA抗体による解析の中でも示されていた⁶⁾。1992年から2006年までを1つのパネルとして日脳ウイルスの自然生態を、患者発生の最も早かった1993年の6月と豚集団における1998年11月のIgM抗体の検出までの患者と豚の両方から総合して考えると、日脳ウイルスは6月の初夏から晩秋の11月まで活動していると考えることが合理的に思える。このことは近年のワクチン接種の低下などから日脳に感染する危険性は長期にわたって存在していることを示している。

兵庫県では1995年以降日脳患者は報告されていないが、自然界における蚊と豚のサイクルはこの15年間絶えることはなかった。日脳ウイルスは5つの遺伝子型に分類され、従来わが国ではIII型ウイルスが分離されてきたが、1991年ごろからI型ウイルスが優勢になっていると報告されている⁷⁾。一方、豚から分離される日脳ウイルスの中に、3'-非翻訳領域に9~15塩基欠失しているウイルスがあり、細胞での増殖効率に影響していることが示されている⁸⁾。あるいは自然界における流行型の変化や欠失を伴う変異が人の病原性に関与していて、そのために患者の発生に影響している可能性もある。

IV ま と め

自然界における日本脳炎ウイルスの活動を1992年から2006年まで患者の発生状況および豚血清中の日脳抗体の検出から調べた。1992年からの3年間で4人の日脳患者が発生したが、1995年以降患者の発生は見られなかった。豚では、抗体の出現時期や流行規模は年によりかなり異なり、同じ年でも明確な地域差が見られるが、すべての年で血清中に日脳ウイルス抗体が検出された。15年間の日脳ウイルスの流行状況を1つの時系列に並べると、日

脳ウイルスは6月から晩秋の11月まで蚊と豚の間をサイクルし、感染の危険性は長期にわたって存在することが示された。

謝 辞

長期にわたり、検体採取に協力して下さいました西宮および西播磨食肉衛生検査所および疾病対策課の関係者に深く感謝致します。

文 献

- 1) Konno, J. Endo, K. Agatsuma, H. and Ishida N : Cyclic outbreak of Japanese encephalitis among pigs and humans. *American Journal of Epidemiology* **84**, 292-300 (1966)
- 2) 大谷明, 清水文七: アルボウイルス. 国立予防衛生研究所学友会編, ウイルス実験学各論, 改定二版, p 185-224, 丸善株式会社, 東京 (1982)
- 3) 国立感染症研究所, ウイルス第一部第二室, 感染症情報センター第三室: 日本脳炎, 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所感染症情報センター, 平成17年度 (2005年度) 感染症流行予測調査報告書, p100-112, (平成19年2月)
- 4) 病原微生物検出情報, Vol 24, No7 (2003)
- 5) Konno, J. Endo, K. and Ishida N : The nature of antibody in swine naturally infected with Japanese encephalitis virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **124**, 73-75 (1967)
- 6) Yamaoka, M. and Konishi, E : Recent changes in prevalence pattern of Japanese encephalitis virus in Hyogo prefecture, Japan, using a two-dimensional distribution of IgG and IgM class antibody levels in swine sera. *Journal of Medical Virology* **17**, 1-7 (1985)
- 7) 石川知弘ら: 最近の日本脳炎ウイルス分離株に見られる3'-非翻訳領域の欠失が誘導する培養細胞でのウイルス増殖抑制, 第40回日本脳炎生態学研究会講演要旨集, P12 (2005)
- 8) 原田誠也ら: 熊本県における日本脳炎ウイルスと日本脳炎患者, 第28回衛生微生物技術協議会講演抄録, P 61 (2007), 岡山

A香港型インフルエンザウイルスのキモトリプシン存在下での MDCK細胞による分離について

山岡政興* 押部智宏 稲元哲朗

Relative Efficacy of MDCK Cell Cultures with Chymotrypsin for Isolation of Recent AH3 Influenza Viruses

Masaoki YAMAOKA*, Tomohiro OSHIBE and Tetsuro INAMOTO

*Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

The isolation efficiency of A Hong Kong type influenza virus in MDCK cell cultures with chymotrypsin was examined from 1991/1992 to 1993/1994, and from 2003/2004 to 2005/2006 influenza season. The efficacy of virus isolation under chymotrypsin was better than that of trypsin for 6 influenza seasons examined. Moreover, it is easy to observe the cytopathic effects under the chymotrypsin existence.

I はじめに

インフルエンザウイルスは初期にはもっぱら発育鶏卵を用いて分離されていたが、飛田ら^{1, 2)}がイヌの腎細胞であるMDCK細胞の有用性を報告してから、インフルエンザウイルス分離の標準法として広く用いられてきた。われわれ³⁾は1980年代半ばから発育鶏卵に代えてMDCK細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離を日常検査として行ってきた。B型ウイルスは発育鶏卵での分離効率は高くないこと、および、Aソ連型は、1977年に出現して4回目の流行期にニワトリ赤血球低凝集性に変異し、それに伴って発育鶏卵での分離効率が低下したことなどが細胞での分離を急がせた要因である。

A香港型ウイルスは、1992/1993の流行シーズンにそれまでのウイルスとは大きく抗原性を変異させると共に、

従来のニワトリ赤血球高凝集性株とは別に、Aソ連型にしか見られなかったニワトリ赤血球に対する低凝集性株が出現した。同時に、ふ化鶏卵による分離率はAソ連型で見られたと同様に急激に低下した⁴⁾。続く1993/1994年のA香港型流行株はすべて、ニワトリ赤血球に対して低凝集性を示し⁵⁾、以後2006/2007年の流行期においてもA香港型はニワトリ赤血球低凝集性株が流行を続けている。

ところで、MDCK細胞を用いてA型インフルエンザウイルスを分離する際、ウイルスのHA蛋白をHA1とHA2に開裂することによって非活性型のウイルスを活性化することが必要である。このとき細胞に影響しないようにトリプシンを低濃度で添加する^{1, 2)}。われわれはこのトリプシンに代えてキモトリプシンを用いてもインフルエンザウイルスは効率よく分離されること、現在流行しているA型およびB型を分離する際、それぞれ両プロテアーゼに対して異なる性状を示すことをみた。すなわち、同じ分離条件でAソ連型は、何れの流行期においても、両プロテアーゼ存在下においてほぼ同等の高い分離効率を示すのに対して、B型はプロテアーゼに対する感受性が

感染症部

*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所センター
感染症部 山岡政興

明確に異なる株が一定の割合で存在することがわかった。そこで今回、A香港型ウイルスのキモトリプシン存在下でのMDCK細胞による分離効率を6シーズンについてトリプシンの標準法と比較した。

II 材料および方法

1. インフルエンザウイルス分離材料

感染症発生動向調査で採取されたインフルエンザ様患者のswabを分離材料とした。A香港型は抗原性およびニワトリ赤血球に対する凝集性が変異した1992/93シーズンを中心にした3年間と、2003/2004からの最近の3年間、合計6年間のswabを分離材料とした。Aソ連型の分離材料は1990/1991, 1991/1992, 1995/1996年および1999年から2002年にかけての3回の流行株および2005/2006年のswabを対象にした。B型の分離材料はA香港型を対象とした6シーズンのうち4回のシーズンを対象とした。swabは、トランスワブのちにはバイロカルト(何れもアスカ純薬)を使用して採取した。採取したswabは、分離開始日が1週間程度ならば冷蔵庫で保存し、それ以上の期間保存する場合は冷凍保存した。swabはペニシリン、カナマイシン、ストレプトマイシンを添加したVIB (Difco) 溶液に浸漬後、vortexし、3,000rpm、5分遠心した上清を0.45 μ mのフィルターでろ過滅菌したものを接種材料とした。

2. インフルエンザウイルス分離法

ウイルス分離には6穴細胞培養プレート(コーニング社)を使用した。MDCK細胞継代3日目の単層細胞をPBSで1回洗浄し、ろ過滅菌したswabを1検体あたり2wellに150 μ lづつ接種し、33 $^{\circ}$ Cで1時間吸着させた後、そのまま維持液を2ml/wellづつ加え、33 $^{\circ}$ Cで培養した。このとき一方のwellの維持液は標準法に従って、トリプシン(Sigma, Type II-S)を3 μ g/ml、他方はキモトリプシン(Sigma, Type II)を100 μ g/ml濃度に調整した。swabを接種した細胞は1週間培養し、その間に細胞変性が観察され、迅速診断キットまたはHA反応が示された検体を分離陽性とした。HA反応にはモルモットおよびニワトリ赤血球を使用した。陰性の検体はさらにそれぞれの培養条件で2代まで継代した。2代目の接種材料は初代の分離陰性のwell内容物を遠心せずにそのまま150 μ lを使用した。接種後の培養は初代接種と同様33 $^{\circ}$ Cで行った。

III 結果および考察

1991/1992年のswabからMDCK細胞とトリプシンを用いる標準法の代わりにキモトリプシン存在下でA香港型の分離を試みた⁵⁾。このときトリプシン濃度は、細胞に影響の及ばない3 μ g/ml、キモトリプシンは20 μ g/mlの濃度を用いた。今回予備的な検討の中で、添加するキモトリプシンは濃度依存的に分離率を向上させ、100 μ g/mlの添加濃度が至適であることをみた。われわれはC型インフルエンザウイルスを細胞で分離する際、添加するトリプシン濃度が高いほどウイルス表面のHE糖タンパクの開裂活性化を促進しウイルス量が増大することを報告した⁶⁾。100 μ g/mlの濃度は培養液調整の限界に近いと思われるが、細胞が培養器表面から剥がれてもウイルスは増殖し、分離の妨げにはならないことを示唆している。

大きく抗原性を変異させると共にニワトリ赤血球に対する凝集性、ふ化鶏卵での分離率の低下を伴う変異ウイルスの出現した1992/1993年の検体を挟んだ3年間のswabについて、標準法とキモトリプシン存在下におけるMDCK細胞での2代目までの分離効率、および1992/1993と1993/1994の2年間については両者の間の統計学的な有意差をカイ2乗検定を行って調べた(Table 1)。

ニワトリ赤血球高凝集性であった1991/1992の40検体はキモトリプシンに対しても感受性が高く、トリプシンを添加した標準法と同じ37株(93%)が分離された。特に分離初代ですべてのswabからウイルスが分離され、HA価で見たウイルス産生量もほぼ同程度であった。1992/1993年の16検体はトリプシン存在下で初代から6株(37%)が分離され、継代することによって合計13株(81%)が分離された。これに対してキモトリプシン存在下では16株すべてが初代で分離され、キモトリプシンの方が分離効率は高かった。すべてのA香港型がニワト

Table 1. Efficacy of MDCK cell cultures with trypsin or chymotrypsin for Isolation of influenza AH3 viruses between 1991 and 1994

Year	No. of swabs	Passage history	No. of isolates (%)		Probability (p)
			Trypsin	Chymotrypsin	
1991/1992	40	M1	37(93)	37(93)	—*
		M2	0	0	—
		Total	37(93)	37(93)	—
1992/1993	16	M1	6(37)	16(100)	5.6x10 ⁻³
		M2	7(44)	0	—
		Total	13(81)	16(100)	6.9x10 ⁻³
1993/1994	36	M1	14(39)	30(83)	1.1x10 ⁻⁴
		M2	10(28)	4(11)	—
		Total	24(67)	34(94)	2.9x10 ⁻³

* : not done

リ赤血球低凝集性を示した1993/1994の36検体でのトリプシンによる標準法を用いた初代分離率は前年と同程度の39%で、2代継代後の全分離数は24株(67%)に止まった。これにしてキモトリプシン存在下では初代で30株(83%)が分離され、継代することによってさらに4株が分離され、ニワトリ赤血球低凝集性株が増えるに従ってトリプシン存在下での分離効率が低下する傾向がみられた。これに対してキモトリプシンは1991/1992年のニワトリ赤血球高凝集性株のときとほとんど変わらない分離効率を示した。

ところで、両プロテアーゼ存在下での分離効率に統計学的な有意差の有無について1992/1993からの2年間を調べた結果、Table 1のとおり初代分離においては何れの流行期においても有意水準0.01%以下であった。このことはトリプシンとキモトリプシンの分離効率には有意差が認められたことを示している。

2003/2004年から最近3年間のA香港型のトリプシンとキモトリプシン存在下におけるMDCK細胞での分離効率をTable 2に示した。この3年間はほぼ同じような分離性状を示した。すなわち、トリプシン存在下では初代で73~84%から分離され、継代することによってさらに83~91%が分離された。ニワトリ赤血球低凝集性株が出現した1992/1993および1993/1994年流行期の低い分離効率とは異なっていた。一方、キモトリプシン存在下では初代で87~94%が分離され、継代によって最近の3年間はすべてのスワブからウイルスが分離され、何れの流行期においてもキモトリプシンの方がトリプシン存在下より高い分離効率を示し、2003/2004年から3年間の2代継代におけるトータル分離効率は、9~17%キモトリプシン存在下での分離効率の方が高かった。

両者の分離効率に有意水準0.01%以下で、2005/2006

Table 2. Relative efficacy of MDCK cell cultures with trypsin or chymotrypsin for Isolation of influenza AH3 viruses between 2003 and 2006

Year	No. of swabs	Passage history	No. of isolates (%)		Probability (p)
			Trypsin	Chymotrypsin	
2003/2004	68	M1	57(84)	59(87)	6.3×10^{-1}
		M2	5(7)	9(13)	—*
		Total	62(91)	68(100)	7.6×10^{-2}
2004/2005	34	M1	26(76)	32(94)	5.9×10^{-2}
		M2	4(12)	2(6)	—
		Total	30(88)	34(100)	1.3×10^{-1}
2005/2006	29	M1	21(73)	27(93)	1.3×10^{-7}
		M2	3(10)	2(7)	—
		Total	24(83)	29(100)	1.8×10^{-1}

* : not done

の初代分離以外に有意差は見られなかったが、3年間をトータルしたトリプシン116株に対してキモトリプシン131株の分離数との間の検定値(p)は 6.64×10^{-5} となり、有意水準0.01%以下であったことから両プロテアーゼ存在下での分離効率には有意な差が認められた。

抗原性を大きく変化させると共にニワトリ赤血球低凝集性株が出現した1992/1993年から2年間のトリプシン存在下での分離効率が低下したのに比べ、最近3年間のA香港型の分離効率が高かったのは、HA遺伝子の進化の結果であろうが詳細な機序は不明である。

キモトリプシン存在下での増殖ウイルスの抗原性は、感染研から配布された同定用のフェレット感染血清に対してトリプシン存在下での増殖ウイルスに比べ、1管程度低い場合があることが示された。そこで、トリプシンあるいはキモトリプシン存在下で増殖させたそれぞれのウイルスで作製したマウス免疫血清でお互いの抗原性を交差して比較したが、明確な差は認められなかった。免疫動物の種類あるいは免疫方法による差かも知れない。トリプシンとキモトリプシンのアミノ酸の開裂モチーフは異なる。しかしながら、抗原性に明確な差は見られなかったことから、いずれのプロテアーゼもHA蛋白の開裂部位はほぼ近似していることを示唆している。

Aソ連型は調べた複数の流行期においてもトリプシン、キモトリプシンいずれのプロテアーゼ存在下でもその分離率にほとんど影響を受けず、ウイルスは患者材料から高率に分離された。一方、B型は調べた限り、いずれか一方のプロテアーゼにしか感受性を示さない分離株が一定の割合で存在した。2004/2005の23検体では、両方のプロテアーゼで18株(78%)分離されたが、トリプシンでのみ分離されたのが2株、キモトリプシンでのみ分離されたのは3株であった。

Fig. 1にA香港型ウイルスのキモトリプシン存在下での細胞変性を示した。印象的なのは使用するキモトリプシン濃度が $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ と高いために未感染細胞がウイルス接種後培養3~4日で広い空間を等間隔に空けて小さな細胞塊として集積しだす(Fig. 1 d、矢印で示す細胞変性箇所の外側の細胞塊)。このときA香港型ウイルスが感染していると感染初期から、かなり広い領域で未感染細胞の細胞塊集落とは異なる一見正常な単層細胞域を形成しているのが見られる(Fig. 1 b)。早晩この一見正常な単層細胞域は打上げ花火の大輪の菊のようにその場で壊れていき、最終的にはバラバラな細胞の壊滅像を示す(Fig. 1 c)。Fig. 1のdは1wellに1箇所の細胞変性を見せた検体での培養4日目の像である。細胞変性はトリプシン存在下とは異なる特異的な変性像を示し観察は容易である。

謝 辞

検体採取に協力して下さいました疾病対策課, 発生動向調査における検査定点である岡藤小児科, 県立塚口病院および県立公立豊岡病院の関係者, ならびに県内の保健所関係者に深く感謝致します。

本研究の一部は, 文部科学省「新興・再興感染症研究拠点形成プログラム」による支援を受けた。

文 献

- 1) Tobita, K., Sugiura, A., Enomoto, C. and Furuyama, M.: Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med. Microbiol. Immunol.*, **162**, 9-14 (1975)
- 2) Tobita, K.: Persistent canine kidney (MDCK) cells for isolation and plaque assay of influenza B viruses. *Med. Microbiol. Immunol.*, **162**, 23-27 (1975)
- 3) 山岡政興: MDCK細胞と発育鶏卵によるインフルエンザウイルス分離の比較. *兵庫衛研報*, **18**, 13-17 (1983)
- 4) 山岡政興, 岡藤輝夫, 垣内敏孝, 楠田均: A香港型およびB型が分離された1992-93年流行期の兵庫県におけるインフルエンザについて. *兵庫衛研報*, **28**, 7-12 (1993)
- 5) 山岡政興, 楠田均, 岡藤輝夫, 垣内敏孝: 1993-94年流行期の兵庫県におけるインフルエンザについて. *兵庫衛研報*, **29**, 13-19 (1994)
- 6) Yamaoka, M., Homma, M. and Hotta, H.: MDCK cell cultures supplemented with high concentrations of trypsin exhibit remarkable susceptibility to influenza C virus. *Archives of Virology*, **140**, 937-944 (1995)

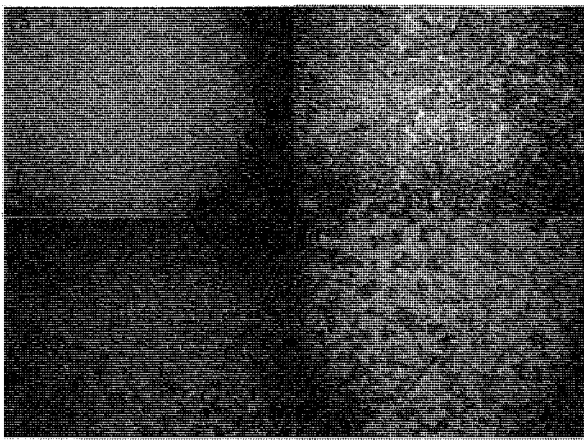


Figure 1. Time course of the cytopathic effects of MDCK cells infected with A Hong Kong type influenza virus. Uninfected cells, x40 (a), 4 days post infection, x40 (b and d), and 7 days post infection, x40 (c). The arrow indicates cytopathic effects.

IV ま と め

MDCK細胞におけるA香港型インフルエンザウイルスのキモトリプシン存在下での分離効率について, 1992/1993年を中心にした3年間と2003/2004年からの3年間を対象に検討した。1991/1992年の株はトリプシンあるいはキモトリプシン存在下の何れでも初代で高率に分離されていたが, 1992/1993年からの2年間はトリプシンにおける分離効率が明らかに低下した。最近3年間のトリプシンによる分離効率は高くなっているが, 検討した6年間では何れもキモトリプシン存在下での分離効率がトリプシンを上回った。分離に用いた同じプロテアーゼ条件下でAソ連型はトリプシンおよびキモトリプシン何れの存在下でもほぼ同一の高い分離効率を示した。一方, B型はプロテアーゼに対する感受性の異なる株が一定の割合で存在した。また, 細胞変性はトリプシン存在下に比べて観察しやすい。

兵庫県における10年間（1998年から2007年）の飛散スギ科花粉調査

後藤 操* 藤田 昌民 市橋 啓子

A Survey of Airborne Japanese Cedar Family Pollen in Hyogo for Ten Years (from 1998 to 2007)

Misao GOTOU*, Masatami FUJITA and Keiko ICHIHASHI

*Life Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health
and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

The results of a survey of airborne Japanese cedar family pollen in Hyogo Prefecture for the last 10 years (1998-2007) were investigated. A periodic biennial pattern was noted in the total pollen count, suggesting an effect from the temperature of the previous summer season and the physiological factors of cedar. Dispersion of cedar pollen appears to start earlier in the southern areas in comparison with the northern areas. In examining day-to-day fluctuations in the pollen count, region-specific variations in the count were noted. The weekly fluctuations were characterized by 1 to 3 peaks.

I はじめに

スギ花粉症は、患者数が人口の16%を超えと言われる¹⁾、飛散期には著しく生活の質が低下することから、住民の関心は非常に高く、予防あるいは症状軽減のための対策が必要となっている。花粉症は、完治が難しいため、抗原となる花粉との接触を避けることが最も重要な予防対策の一つであり、花粉飛散状況などの花粉情報は、効果的な花粉回避のために有用である。これまで当健康環境科学研究センターでは、スギ科花粉飛散数と気象因子との関連性を解析し、飛散数推移に影響を及ぼす特徴的な風向を見出し²⁾、短期予測に活用してきた。また飛散総数あるいは飛散開始日の情報は、花粉の飛散状況を把握するために重要であり、データの蓄積を行ってきた。

現在、兵庫県内の飛散花粉観測は、健康福祉事務所7定点（宝塚、加古川、社、龍野、豊岡、篠山および洲本）と当健康環境科学研究センターで行っている。今回この中で、当健康環境科学研究センターと過去10年間（1998年から2007年）継続観測を行っている健康福祉事務所5定点の観測結果を用い、スギ科花粉の飛散総数、飛散開始日および飛散数推移について検討を行った。その結果、県内の飛散スギ科花粉の年変動および地域差について特徴が明らかとなったので報告する。

II 方法

県内の観測点をFig. 1に示した。このうち対象観測点は、加古川、龍野、豊岡、篠山および洲本の各健康福祉事務所と健康環境科学研究センター（以下、それぞれ加古川、龍野、豊岡、篠山、洲本、神戸とする）とした。

飛散花粉の捕集方法は、ダラム型花粉捕集器を建物の屋上など周囲に障害物の少ない屋外に設置し、白色ワセリンを薄く塗布したスライドガラス上に花粉を捕集し

健康科学部

* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究センター
健康科学部 後藤 操

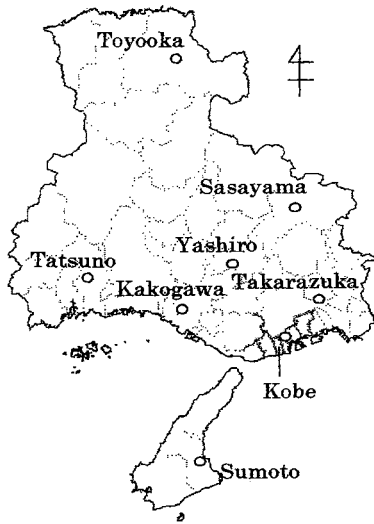


Fig.1 Locations of the observation point of the Public Health Center and Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences(Kobe)

た。スライドグラスは、毎日午前9時に交換したが、2002年以前の加古川、篠山および洲本の各観測点では、土日祝日にはスライドを交換せず連続捕集した。スギ科花粉数の計測は、スライドグラス上の花粉をCarberla液で染色後、3.24cm²(18mm×18mm)の範囲を光学顕微鏡下で判別計数し、1cm²あたりに換算して求めた³⁾。

飛散開始日および飛散終了日は「空中花粉測定と花粉情報標準化委員会」の規定³⁾を基に、次のように定めた。

飛散開始日：1月1日より初めて連続2日以上、1個/cm²以上の花粉が観測された最初の日

飛散終了日：飛散終了期に、降雨の影響無く3日連続して0個/cm²が続いた最初の日の前日

なお週単位に飛散花粉データを集約した場合、月曜日

から日曜日までを一週間とした。

気象データについては、2006年までの兵庫県内地上気象観測所データと平年値データは気象業務支援センター(気象庁提供)から、また2007年の兵庫県内地上気象観測所データは神戸海洋気象台より入手したものをを用いた。

III 結果および考察

1. 飛散総数

1.1 年次別

年次別のスギ科花粉飛散総数および神戸の7月の平均気温と平年値をFig. 2に示した。年推移変動は、各地点ともほぼ同様の傾向を示した。すなわち、2001年、2003年および2005年が他の年に比して多く、1998年および2004年は明瞭に少なく、既報⁴⁾同様、ほぼ一年毎に飛散総数が増減した。花粉は植物の雄性配偶体であることから、雄花の生産量は、花粉の飛散総数に大きく影響する⁵⁻⁷⁾。また雄花の生産量は、スギの雄花芽分化期である夏季の気象に影響を受け、気温が高いと雄花が多くなるとされている^{8, 9)}。神戸において、飛散総数の多かった年の前年7月の平均気温は平年値より高く、逆に飛散総数の少なかった年の前年7月では、2001年を除いて平均気温は平年値より低く、夏季の気温の影響と考えられる推移傾向が認められた。

2001年7月の平均気温は、2000年および2002年と同程度であったが、2002年の飛散総数は、2001年および2003年に比して少なかった。前年に雄花を生産したスギは、雄花の分化する新しい葉の生産量が著しく少なくなるとの報告があり¹⁰⁾、前年の2001年の飛散総数が比較的多かつ

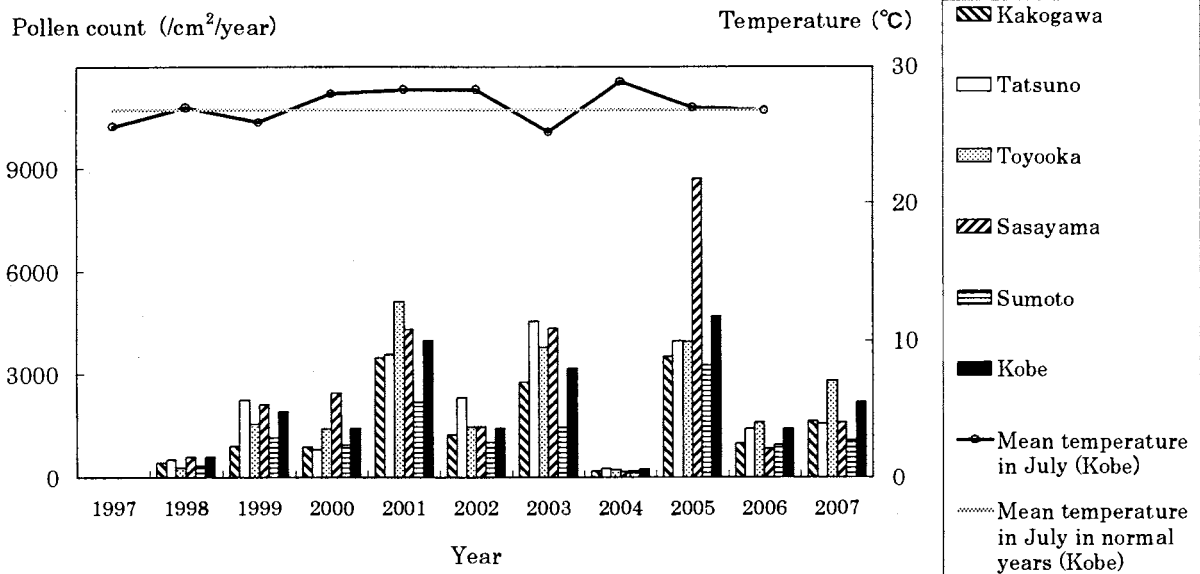


Fig. 2 The annual total airborne Japanese cedar family pollen count and the mean temperature in July in Kobe

たことから、スギの生理による影響と考えられた。

2004年のスギ科花粉は全国的に少数飛散となり、県内でも全ての観測点で10年間の最少飛散数となった。その理由は、前年の2003年7月の平均気温が1997年から2006年の10年間で最も低く、さらに2003年の飛散総数が、龍野で10年間の最多を記録するなど各観測点とも比較的多く、気象状況およびスギの生理状態ともに、雄花の生産されにくい条件が重なったことに因るものと考えられた。

1.2 地点別

飛散総数の多かった2001年、2003年、2005年には、それぞれ豊岡、龍野、篠山が観測点別で最多の飛散総数となった。他の年において、1998年は神戸、1999年は龍野、2000年は篠山、2002年および2004年には龍野、2006年および2007年では豊岡が最多の飛散総数となっており、飛散総数の多い観測点は年により異なっていた。

飛散総数が最少となった観測点については、洲本が2001年から2005年までの5年間と2007年で記録し、他の観測点に比して飛散総数の少ない傾向が認められた。洲本における2月および3月の風向は北西から北方向の風が優勢となっているが、洲本近隣で花粉源となるスギ林は、南部から南西部に広がっており¹³⁾、洲本の北西方向に広いスギ林の無いことが要因の一つと推察された。

2. 飛散開始日

スギ科花粉の飛散開始日、飛散終了日および飛散日数をTable 1に示した。10年間のうちで、最も早い飛散開始日は、2月7日(2002年)で、最も遅い飛散終了日は5月24日(2005年)であった。また2002年の飛散開始日は、全観測点で同日(2月7日)となったが、他の年では観測点間に差が認められた。2002年を除いた各年で、最も早い飛散開始日となった観測点について、観測点別の頻度でみると、神戸および龍野が各4回(重複有り)、洲本が3回、加古川および豊岡が各1回(重複有り)と県南部に位置する観測点が頻度の多い傾向を示した。一方、同じく各年で最も遅い飛散開始日となった観測点についての観測点別頻度は、篠山が7回、豊岡が6回、龍野が2回、加古川が1回(いずれも重複有り)と県の北部に位置する観測点で多い傾向が認められた。

飛散開始日は花粉源の開花状況や花粉源と観測点の位置関係により決まる。つまり、開花状況には休眠打破の時期と雄花生長のための休眠打破後の気温の推移が重要であり、一般的に気温の高い方が早く開花する¹²⁾。神戸の日平均気温の月平均値は、10年間の平均で1月は6.0±0.9℃、2月は6.7±1.1℃であるのに対し、豊岡では1月は3.2±0.9℃、2月は3.7±1.4℃であった。気温の差が飛散開始日の差異の要因の一つと考えられた。

また1999年は観測点間における飛散開始日の差が最も

Table 1 Starting day of pollen dispersion, ending day of pollen dispersion and pollen dispersal period for each year at each observation point

Year		1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Kakogawa	Starting day of pollen dispersion	2/21	2/17	3/5	2/23	2/7	2/11	2/21	3/6	2/13	2/10
	Ending day of pollen dispersion	4/18	4/13	4/25	5/3	4/8	4/25	4/9	5/18	4/27	4/18
	Pollen dispersal period	57	56	52	71	61	74	49	74	74	68
Tatsuno	Starting day of pollen dispersion	2/20	2/9	2/27	2/27	2/7	2/10	2/21	2/22	2/22	2/12
	Ending day of pollen dispersion	4/2	4/14	4/25	5/3	4/7	4/30	4/19	5/7	4/16	4/25
	Pollen dispersal period	42	65	59	66	60	80	58	75	54	73
Toyooka	Starting day of pollen dispersion	2/25	3/1	3/5	3/2	2/7	2/14	2/24	2/22	2/22	2/11
	Ending day of pollen dispersion	4/9	4/28	4/17	5/3	4/2	4/30	4/8	5/24	4/21	4/9
	Pollen dispersal period	44	59	45	63	55	76	45	92	59	58
Sasayama	Starting day of pollen dispersion	2/25	2/26	3/5	3/2	2/7	2/16	2/24	3/7	2/22	2/11
	Ending day of pollen dispersion	4/25	5/9	5/10	5/3	4/17	4/30	4/7	4/26	4/27	5/1
	Pollen dispersal period	60	73	67	73	70	74	44	51	65	56
Sumoto	Starting day of pollen dispersion	2/24	2/16	2/23	2/22	2/7	2/11	2/20	3/1	2/21	2/9
	Ending day of pollen dispersion	4/18	4/2	5/10	4/17	4/7	4/25	4/8	5/7	4/16	4/18
	Pollen dispersal period	54	46	78	55	60	74	49	68	55	68
Kobe	Starting day of pollen dispersion	2/20	2/16	3/1	2/21	2/7	2/10	2/21	2/25	2/13	2/10
	Ending day of pollen dispersion	4/18	4/24	4/25	5/5	4/25	4/26	4/9	5/7	4/27	4/26
	Pollen dispersal period	58	68	55	74	78	76	49	71	74	76
Mean number of days of dispersion for each year		53	61	59	67	64	76	49	72	64	67

大きく、龍野の飛散開始日が豊岡に比して20日早かった。豊岡における1999年の1月から2月にかけての降水量は、10年間の同時期の降水量としては最も多く、特に2月には上旬、中旬、下旬それぞれの時期に約30cm前後の降雪を記録し、2月2日から2月末まで積雪が続いた。一方龍野では、近隣の姫路の気象データから、1999年1月の降水量は平年値より少なく、降雪は無かった。降雨の際、花粉は開花の進んだ雄花から流出し、強い雨の時には、観測点で捕集される花粉の量が減少するなど、一般的に花粉飛散は雨の影響を受けると考えられる^{7),10)}。また積雪のため雄花が雪に被われ、花粉の飛散が妨げられることもあり、豊岡におけるスギ林からの花粉飛散は雨あるいは雪の影響を受け、飛散開始日が遅くなったものと推察された。

全ての観測点で飛散総数が多かった2003年および2005年は、飛散総数が少なかった2004年に比して飛散日数が多かった。しかし、これら3年を除き平均的な飛散総数の年には飛散日数と飛散総数の間にやや相関傾向を認めるのみであった。

3. 飛散数推移

3.1 週別飛散数推移

1週間単位に集約した観測点別飛散数推移は、1峰性、2峰性および3峰性のパターンがあった。なお、1月の第1月曜日(日曜日から日曜日までの1週間を第1週として以降週を数えた。その一例として、1峰性の2007年と3峰性の認められた2003年をFig. 3に示した。2007年では、加古川、龍野、篠山および神戸が第8週、豊岡および洲本が第9週にそれぞれピークを持つ飛散数推移のパターンであった。ここには示していないが、他の年の飛散数推

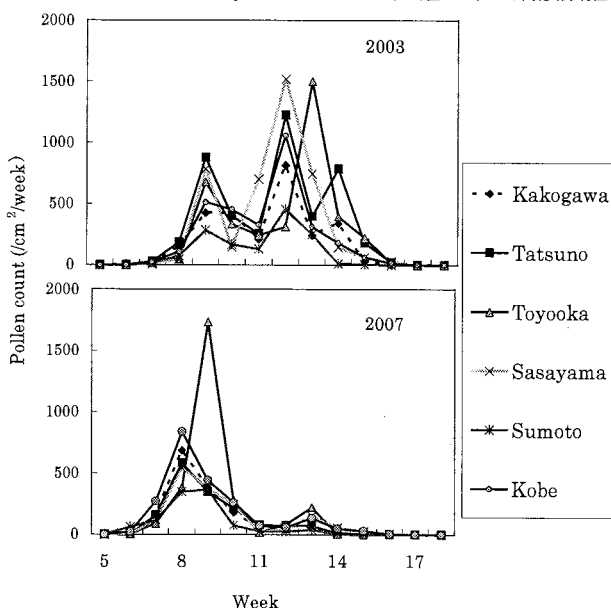


Fig. 3 Changes in weekly count of airborne Japanese cedar family pollen in 2003 and 2007

移のパターンは1峰性が多く認められ、2005年および2006年では飛散数の最大ピークが全観測点で同じ週となったが、他の年では観測点間に差が認められた。観測点別ではFig. 3で明らかのように、豊岡が2003年、2007年で比較的遅い週に飛散数の最大ピークが認められ、他の年では1998年、前述の2005年および2006年を除く年で、同様の傾向であった。

一方2003年において、龍野では明瞭な3峰の飛散数ピークが認められた。近隣の姫路の気象データによると、第10週から第11週に降雨が計5日観測され、第11週には日平均気温が平年値を平均2℃下回った。そのため飛散数が減少したと推測され、結果として飛散最盛期初期の第9週に飛散数のピークが形成された。豊岡を除く観測点で飛散数の最大ピークとなった第12週には、姫路で降雨は観測されず、龍野では5日間連続で100個(/cm³)を超える大量飛散となった。さらに、飛散数の最大ピークの2週間後となる第14週に、龍野では飛散数が急増し、2日連続で飛散数が100個(/cm³)を越えた。この2日間の気象状況は、姫路で日平均気温が連続して平年値を2℃以上超えた時期で、北から北東の風が優勢であった。龍野の北方向には一大花粉源の中国山地が位置しており、龍野における飛散数増加は、連続する北寄りの風で中国山地から大量の花粉が飛散したためと考えられた。

気温、降雨さらには風等の気象状況が飛散数推移に顕著に影響し、年により、また観測点により飛散数推移のパターンは変動することが明らかとなった。

3.2 日別飛散数推移

2007年の花粉飛散数の多い時期(第7週から第10週)における各観測点の日別飛散数をFig. 4に示した。2007年の週別の飛散数推移は、豊岡および洲本を除く観測点で、ほぼ同様の推移パターンを示した。しかし日々の飛散数変動は、次に例示するように観測点間で明らかに異なるケースが認められた。2月22日において、加古川、篠山および神戸の飛散数は増加したが、龍野の飛散数は減少した。22日は東から南寄りの弱風であったことが少なくなった一つの理由としてあげられる。また3月2日では、豊岡および篠山の飛散数は増加したが、他の観測点では減少した。翌3月3日から3月4日にかけて豊岡の飛散数は多く、特に3月4日は豊岡で1000個(/cm³)を超える大量飛散を記録した。また両日、洲本の飛散数は、加古川、龍野、篠山および神戸に比して多く、100個(/cm³)前後の大量飛散が続いた。3月4日は、ほぼ一日南寄りの風が連続したことから、洲本では南方向に位置する花粉源から飛散したものと推測された。

兵庫県の中央部を丹波山地から中国山地にかけて東西

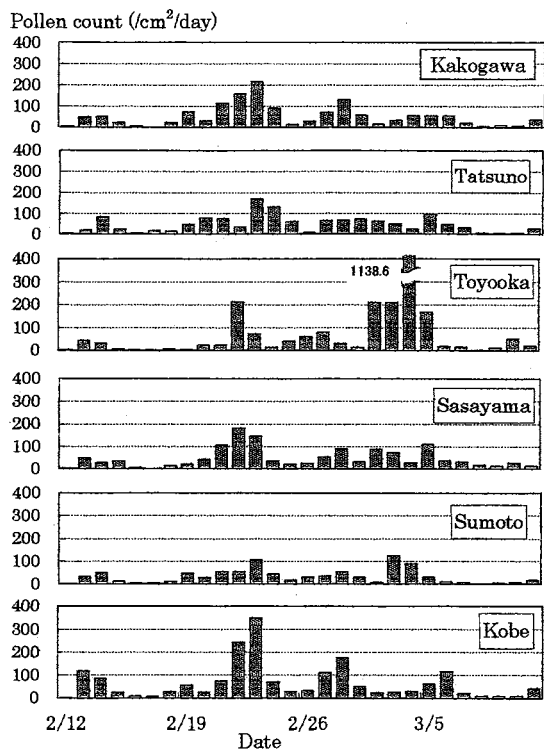


Fig. 4 Daily cedar pollen count in season in 2007

に標高の高い山が連なりスギ科花粉の花粉源となっている。さらに豊岡においては東西に、神戸では北方向、洲本では南方向に比較的距離の近い花粉源が位置している。そのため、県内各地域の日々の花粉飛散数は、気象状況により異なった推移パターンを示すと推察された。一方、季節風など地域に特徴的な気象状況も認められることから、各地域の短期の飛散数推移予測を行うためには、花粉源の位置を考慮して、地域特有の気象と飛散数推移のパターンについて関連性を解析することが必要と考えられる。

IV 要 旨

県内6観測点における10年間のスギ科花粉観測データから、飛散総数、飛散開始日および飛散推移について検討した結果、以下のような特徴が認められた。

1. 飛散総数は隔年周期性が認められ、前年夏季の気温とスギの生理的要因の影響と推察される年推移変動が認められた。また洲本の飛散総数は他地域に比して少ない傾向であることが明らかとなった。

2. 飛散開始日は、県内全域で同時期となる年も認められたが、ほとんどの年で県の南部地域が早い傾向であった。また1999年に龍野の飛散開始日が豊岡に比して20日早かった。降雨および降雪の影響が推察された。

3. 飛散数推移は、週別の飛散数推移では1峰性から3峰性の飛散数ピークが認められ、飛散数の増大する時期における気象状況の影響が推察された。また日別の飛散数推移は南部地域と北部地域の差異のみならず、他の観測点間にも差が認められ、推移変動は一様ではないことが明らかとなった。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、花粉飛散状況調査において、調査並びにデータの集約を担当されました健康生活部健康局疾病対策課および加古川、龍野、豊岡、篠山、洲本健康福祉事務所の各担当職員の方々、並びに調査にご協力いただきました健康福祉事務所の関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 中村昭彦, 浅井忠雄, 吉田博一, 馬場廣太郎, 中江公裕: アレルギー性鼻炎の全国疫学調査—全国耳鼻咽喉科医および家族を対象にして—, 日耳鼻, 105, 215-224 (2002)
- 2) 後藤操, 小笠原寛, 南利幸, 喜多博子: 神戸市における空中スギ花粉飛散数と風向との関連性の解析. 花粉誌, 46, 147-154 (2000)
- 3) 佐橋紀男, 岸川禮子, 西間三馨, 長野準: 日本における空中花粉測定および花粉情報の標準化に関する研究報告. 花粉誌, 39, 129-134 (1993)
- 4) 後藤操, 藤原月美, 深瀬治, 小笠原寛: 兵庫県におけるスギ科花粉の飛散状況. 兵庫衛研年報, 32, 132-139 (1997)
- 5) 斎藤洋三: 花粉と花粉症について. 環境庁環境保健部保健調査室監修, 花粉症の原因となる花粉の形態学的観測法, p.3-6, 公害研究対策センター, 東京 (1993)
- 6) 山崎太: スギ花粉症—その原因と対策—, 増補新版, p.48-70, 株式会社医薬ジャーナル社, 大阪 (1992)
- 7) 金指達郎: スギ林における花粉の発生. Health Sciences, 7, 113-119 (1991)
- 8) 長尾精文: スギの花成におよぼす温度の影響. 日林誌, 62, 280-282 (1980)
- 9) 村山貢司, 斎藤洋三: 気象と花粉症. JOHNS, 11, 995-998 (1995)
- 10) 平英彰, 吉井エリ, 寺西秀豊: スギ雄花の花粉飛散特性. アレルギー, 53, 1187-1194 (2004)
- 11) 環境庁: 第2回自然環境保全基礎調査(植生調査),

- 兵庫県現存植生図, 環境庁, 東京 (1982)
- 12) 金指達郎, 横山敏孝: スギ雄花の休眠打破と開花に要する温度条件. 花粉誌, 48, 95-102 (2002)
- 13) 小笠原寛, 吉村史郎, 後藤操: スギ雄花の水暴露による花粉量減少. 花粉誌, 45, 67-70 (1999)

金属キレート樹脂を用いた前処理法によるウナギ蒲焼き中 エンロフロキサシンの分析法

武田 信幸*

Determination of Enrofloxacin in Eel-Kabayaki using Metal Chelate Resin for Cleanup

Nobuyuki TAKEDA*

*Life Sciences Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29,
Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

A rapid and reliable quantitative screening procedure was developed for analysis of enrofloxacin (ENR) in Unagi kabayaki. The procedure involves clean-up using metal chelate resin preloaded with ferric ion (Fe^{3+} cartridge). Kabayaki sample was extracted with acetonitrile and applied on the cartridge. After wash with acetonitrile and water, ENR was eluted with EDTA/McIlvaine buffer for a direct injection on HPLC system with fluorescence detection at ex 280nm/em 440nm. The procedure effectively removed coextractive peaks and gave no interfering peaks for the determination of ENR in kabayaki. Recoveries at 0.05 $\mu\text{g/g}$ fortification level were $81.8 \pm 6.7\%$ (CV% 8.2) and the quantification limit was 0.004 $\mu\text{g/g}$.

I はじめに

近年、動物用医薬品が家畜や養殖魚介類の疾病予防と成長促進に使用されるようになり、畜水産食品の生産性が大きく向上した。その反面、種々の理由でこれら医薬品が食品に残留することがあり、食品衛生上の問題となる場合がある。とくに中国からの輸入ウナギ蒲焼きからはフルオロキノロン系合成抗菌剤であるエンロフロキサシン (ENR) が比較的高頻度に検出されるため、厚生労働省 (厚労省) による命令検査の対象となっており、用いる試料としては、たれのしみ込んでいない内部のみを採取しなければならないと指定されている¹⁾。しかし、

この作業は必要部分を器具で掻き取る必要があるため、多数検体を処理する場合は多大の手間と時間を要する。また、試料ごとに個別操作が必要なヘキサソンの脱脂操作およびエバポレータを用いた濃縮操作も煩雑である。検査の効率化を図るには、たれを含有したままの検体に適用でき、しかも多数検体を同時処理できる前処理法が必要である。著者らは、既にウナギ蒲焼き中オキシテトラサイクリン (OTC) およびオキシリン酸 (OXA) の測定にMCAC法 (Metal Chelate Affinity Chromatography) を適用して、妨害物の影響を除去した効果的な前処理法を報告した^{2, 3)}。ENR (Fig. 1) は、OTCおよびOXAと同様に分子内にキレート形成能を有する β -ジケトン構造 (隣接するカルボキシル基およびオキソ基) を含んでいるため、同法の適用が可能と考えられた。そこで、用いる金属イオン種や溶出条件、HPLCでの検出条件などを検討し、たれがしみ込んだままの蒲焼き試料にも適用できる迅速・簡便で選択性の高い分析法を確立したの

健康科学部

* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究センター
健康科学部 武田 信幸

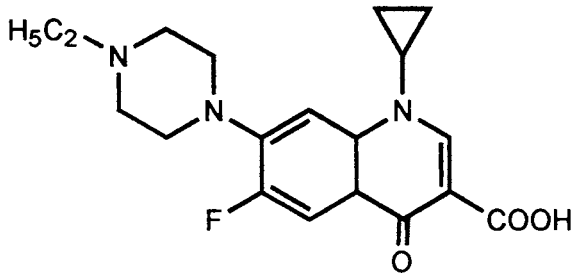


Fig. 1 Structures of enrofloxacin (ENR)

で報告する。

II 材料および方法

1. 試料及び試薬

試料は兵庫県内で市販されていたウナギ蒲焼きを用いた。

標準原液：ENR（関東化学製）の25mgを精秤し、メタノール（MeOH）100mLに溶解して標準原液とした。

MEN緩衝液は、クエン酸一水和物12.9g、リン酸水素二ナトリウム 10.9g、EDTA・2Na 37.2g及びNaCl 29.2gを水に溶解して1Lとした²⁾。

100mmol/L金属イオン溶液は、硫酸銅（CuSO₄・5H₂O）2.5gおよび硝酸第二鉄(Fe(NO₃)₃・9H₂O) 4.0gをそれぞれ水100mLに溶解して調製した。

鉄イオンキレートカートリッジ(Fe³⁺カートリッジ)：金属キレート(Amersham Biosciences社製Chelating Sepharose Fast Flow)を20%エタノールに懸濁してスラリー(1:1, v/v)とした。その0.5mLをカートリッジ(内径5.6mm x 65mm)に注入し、樹脂を沈降させた後ポリエチレン製フリットを装填して水洗した(ベッド容量0.25mL)。100mmol/L硝酸鉄溶液(Fe³⁺) 100μLを負荷し、水1mLで洗浄後使用した(Fe³⁺カートリッジ)。使用後はMEN緩衝液及び水で洗浄し、20%エタノールを充填して冷蔵庫保存した。再使用が可能である。

2. 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフは島津製作所製LC-10Aを用いた。検出は蛍光検出器(RF-10A)を用い、励起波長280nm/蛍光波長440nmで測定した。分析はカラムにInertsil ODS3(15cm x 4.6mm, 5μm, GL Science), 移動相に(85:15)アセトニトリル-マキルベン緩衝液(pH 3.0)混液を用い、カラム温度40℃, 流速1mL/minで行った。試験溶液は25μLをHPLC装置に注入した。LC定量用標準溶液は標準原液を鉄イオン溶液とMEN緩衝液の(1:9)混液で希釈して調製した。

3. 試験溶液の調製

ウナギ蒲焼き(約100g)に付着しているたれを水道水で洗い流してガーゼなどで水分を除去し、フードプロセッサ(National製:MK-K58型)で均一化して供試した。その5gを採り、無水硫酸ナトリウム10gとアセトニトリル50mLを加えてホモジナイズし(Janke & Kunkel製:Ultra-TURRAX), 5Aろ紙でろ過する。ろ液1mLをFe³⁺カートリッジに負荷した後、アセトニトリルおよび水の各1mLで洗浄し、MEN緩衝液0.5mLで溶出して試験溶液とした。

III 結果および考察

1. HPLC条件の検討

移動相組成は、通知法に準じて(15:85)アセトニトリル-マキルベン緩衝液(pH3.0)混液を用いた¹⁾。1mL/minの流速で分析した場合、ENRの保持時間は11.8分で、その他のフルオロキノロン剤7種と保持時間は重なることなく測定可能であった(Fig. 2)。これら抗菌剤はノフロキサシン及びオフロキサシンがほぼ同一時間(7.4分)に溶出した以外は全てベースライン分離し、その保持時間はダノフロキサシン10.1分、オルビフロキサシン13.0分、サラフロキサシン18.2分、ジフロキサシン19.4分であった。

測定波長は、通知法では励起285nm/蛍光460nmであるが、本法では蛍光検出器のオンライン・スペクトル機能で測定したλ_{max}(280nm/440nm)を用いて測定した。その結果、検出感度が約1.4倍向上した。

2. 抽出法の検討

通知法では試料の3倍量(v/w)のアセトニトリルによる抽出を2回行っている。本法では、操作の簡略化を図る目的で、10倍容量で1回抽出とした。その際、試料の

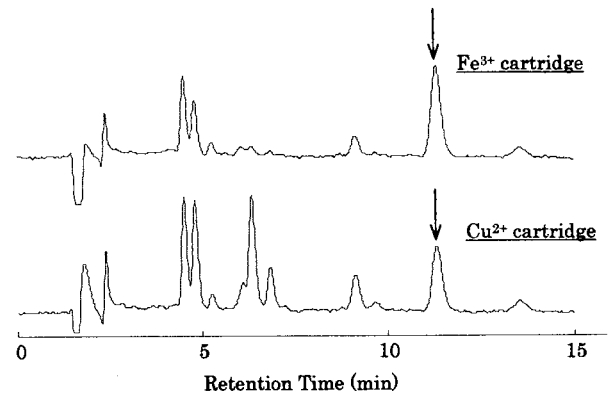


Fig. 2 Chromatograms of Unagi kabayaki extracts cleaned-up by Fe³⁺/Cu²⁺ cartridge. Arrows indicate the peak of ENR.

大部分がホモジナイザー・シャフトに付着して十分に分散せず、実分析時には測定値の変動をもたらす可能性が考えられた。そこで、試料の2倍量(w/v)の無水硫酸ナトリウムを加えて操作し、シャフトへの付着を防止して均一分散化を可能とした。

3. MCAC法による前処理法の検討

キレート樹脂に負荷する金属イオンとして、 Cu^{2+} および Fe^{3+} を検討した³⁾。 Cu^{2+} は樹脂を青色に、 Fe^{3+} は黄色に着色する。そのため、イオンの負荷量や溶出状況、樹脂の劣化程度などの目視に適している。また、これらのイオンはOTC及びOXAを効果的に樹脂上に捕捉することが分かっている。そこで、『試験溶液の調製』の項に従って得た蒲焼きのアセトニトリル抽出液に0.05ng/g濃度となるようにENRを添加して試料溶液を調製し、その1mLを $\text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ カートリッジに負荷し、洗浄後MEN緩衝液1mLで溶出し、ENR捕捉効率および夾雑ピーク除去効果を比較検討した。Fig. 2に示したように、 Fe^{3+} カートリッジは負荷したENRの約88%を捕捉したが、 Cu^{2+} では約60%であり、また精製効果も Fe^{3+} が優れていた。従って、キレート樹脂に用いる金属イオンとして Fe^{3+} を採用することとした。

つぎに、 Fe^{3+} カートリッジへの負荷可能試料量を検討した。カートリッジに5ngのENRを添加した抽出液0.5mL~5mLを負荷し、ピーク高を測定した。負荷量3mLを超えると捕捉率が低下してくることが判明したため、抽出液添加容量は1mLとした。抽出液1mLにENRを5~50ng添加した場合は、捕捉率は低下することなく、添加量とピーク高との間に良好な直線性($r=0.999$)が得られた。また、カートリッジからのENR溶出位置を確認したところ、500 μL までに全て溶出していることが分かった。試料溶液1mLを負荷して、最終検液0.5mlとし、2倍濃縮を行った。

4. 添加回収実験及び定量下限値

蒲焼き5gに、ENRを0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ の濃度に添加し、『試験溶液の調製』の項に従って操作した。この5回試行の平均回収率 $\pm\text{SD}$ は $81.8\pm 6.7\%$ (CV%8.2)であった。また、ENRを0.0125~0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ の範囲で添加したところ、用量-反応関係は良好な直線性($r=0.998$)を示し、本法が広い濃度範囲で適用可能であることがわかった(Fig. 2)。このときの5段階濃度での回収率は83.2~95.5%の範囲で、平均値 $\pm\text{SD}$ は $88.9\pm 5.2\%$ (CV%5.9)であった。定量下限値を「ブランクの平均値+10×ブランク測定値のSD」とすれば、本法では0.004 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。

Table 1. Double blind test on ENR in Unagi Kabayaki

No	Added ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Found ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Recovery (%)
1	0.05	0.043	86.0
2	none	—	—
3	none	—	—
4	none	—	—
5	0.12	0.106	88.3
6	none	—	—
7	none	—	—
8	none	—	—
9	none	—	—
10	0.005	0.0034	68.0

最後に、二重盲検試験を行って本法の有効性を確かめた。即ち、試験法作製実施者以外の第三者に盲検試験用試料作製を依頼し、標準品添加の有無および添加の際の量を知らせず、回収率など分析法評価に必要なパラメータ類の測定に実施者の予断を与えないようにして試験を行い、終了後に分析値を照合した。その結果を、Table 1に示した。10試料のうち3試料からENRを検出した。測定値は、0.043 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、0.106 $\mu\text{g}/\text{g}$ 及び0.0034 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、添加濃度はそれぞれ、0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、0.12 $\mu\text{g}/\text{g}$ 及び0.005 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。0.0034 $\mu\text{g}/\text{g}$ の濃度を示した試料は、本法の定量下限値以下であるが、ENRの保持時間周辺には夾雑ピークは存在せず、痕跡程度の濃度でもENRピークの存在が確認可能であった。検出濃度はいずれも添加量とよく近似した値であり、回収率として計算すると86%および88.3%と良好な結果が得られた。以上のように、本法では検出の精度及び分析値の正確性において、誤りの確率は十分に許容範囲内にあり、ウナギ蒲焼き中ENR測定に適合していると結論した。

本法では10試料の前処理(抽出及び Fe^{3+} MCAC)は約1時間程度で終了する。たれ部分を除去する通知法が要した多大の時間と手間を省略できるようになり、多数検体分析時の労力が大幅に削減できるものと思われる。

また、 Fe^{3+} カートリッジは再使用が可能である。今回、すでに10回以上使用したカートリッジを用いたが、回収率低下や他試料からのクロスコンタミネーションなどは観察されていない。極めて堅牢・安価で、操作しやすく、20%エタノール中冷蔵庫保存すれば通年使用が可能である。使用していると流速が低下することがある。試料中の不溶性物質またはゲル状粒子に固着したタンパク質による目詰まりと考えられる。このような場合は、説明書に従って、1N-NaOH(タンパク質の可溶化)、2M食塩水(イオン結合性物質の溶出)、70%エタノール(脂溶性物質の溶出)で洗浄すれば性能は回復する。

5. 残留実態調査

本法を用いて市販ウナギ蒲焼き5検体を分析したが、ENRは検出しなかった。

IV 要 旨

現行のウナギ蒲焼き中エンロフロキサシン (ENR) 分析法は、たれのしみ込んでいない部分のみを採取しなければならぬため、試料の前処理に多大の時間と労力を要する。そこで、簡便かつ効率的に測定できる分析法に改善した。試料をアセトニトリル抽出し、鉄イオンを結合させたキレート樹脂に負荷し、EDTA含有緩衝液で溶出後、蛍光検出/HPLC分析する。本法はENRが金属イオンとキレート形成する特性を利用しているため、選択性が極めて高い。そのため、夾雑物の多いたれを含有したままの蒲焼き試料にも適用可能である。添加濃度0.05 μ g/gでの回収率は81.8 \pm 6.7% (CV%8.2)、定量下限値は0.004 μ g/gであった。

謝 辞

二重盲検試験実施に御協力を頂いた当研究センター健康科学部吉岡直樹主任研究員に深謝いたします。

文 献

- 1) 食安監発第0703005号 平成15年7月3日厚生労働省医薬品局食品安全部監視安全課 うなぎにおけるエンロフロキサシン分析法について
- 2) 武田信幸, 西海弘城: 金属キレート樹脂を用いた前処理法による畜水産食品中のオキシテトラサイクリンの分析, 食衛誌, **41**, 364-367 (2000)
- 3) 武田信幸: 金属キレート樹脂を用いた水産食品中のオキシテトラサイクリンおよびオキソリン酸の同時定量法, 兵庫衛研報, **34**, 91-95 (1999)

河川水の農薬分析におけるELISA法の適用

吉田 光方子* 北本 寛明 古武家 善成

Application of ELISA for the Analysis of Pesticide in River Waters

Mihoko YOSHIDA*, Hiroaki KITAMOTO and Yoshinari KOBUKE

*Environmental Safety Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihira-cho,
Suma-ku, Kobe 654-0037, Japan*

The application of commercially available ELISA kit was studied for the measurements of insecticide Isoxathion and fungicide Isoprothiolane. Non-pretreated river waters were easily analyzed by ELISA method for the both pesticides, however, its sensitivity was low. Therefore, the concentration process with SPE cartridge was introduced as pre-treatment. For Isoprothiolane, there was a significant correlation between ELISA and GC/MS methods with the correlation coefficient of $r=0.979^{**}$, even though the values measured by ELISA were 2.6 to 4.3 times higher than those by GC/MS. On the other hand, for Isoxathion, ELISA method received positive interference because of some concentrated substances. These results suggested that previously consideration for concentration and purification was necessary in the application of ELISA method.

I はじめに

近年、機器分析にかわる新たな分析手法として酵素標識免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (以下、ELISA法とする) が実用可能な一手法となり¹⁾、ダイオキシン類の環境測定法の一部に生物検定法²⁾が導入されるなどELISA法が脚光を浴びつつある。ELISA法は安価で簡便な手法であることから、その他のPOPsや環境ホルモン、合成界面活性剤などに加え、農薬測定に関しても、環境測定用のキットが4社から約50農薬成分について販売されている³⁾。

そこで本研究では、ELISA法が環境濃度レベルの農薬に関する有効な分析手法となりうるかを検討するために、

水質要監視項目で指針値が定められている殺虫剤のイソキサチオン及び殺菌剤のイソプロチオランを対象として、市販キットと機器分析 (GC/MS) による測定を行い、結果を比較検討した。

II 方 法

1. 試料及び試薬

ELISAキット及びGC/MSの分析には、夏季に兵庫県内で採取した河川水を使用した。精製水は、Elix純水装置システム (ミリポア社) で製造した。試料の固相抽出には、Sep-Pak PS-2 (以下、PS-2と示す) 及びSep-Pak AC-2 (以下、AC-2と示す) (ともにWaters社) 及びENVI18 (スベルコ社) を使用した。

農薬標準品は、和光純薬工業製を使用し、ELISA分析用にはメタノール、GC/MS分析用にはジクロロメタンで溶解し分析に供した。これらの有機溶媒は残留農薬・PCB試験用を使用した。

安全科学部

* 別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27
兵庫県立健康環境科学研究センター
安全科学部 吉田 光方子

ELISA分析キットは、殺虫剤のイソキサチオン及び殺菌剤のイソプロチオランとともに、ホリバ・バイオテクノロジー製の測定キットE（環境測定用）を用いた。

イソキサチオンELISA分析における妨害物質除去法の検討のための限外ろ過フィルターは、ミリポア社製のマイクロコン-3, -10, -30を用い、遠心機はトミー精工製の微量高速冷却遠心機を用いた。またpH調整には、塩酸、水酸化カリウム（いずれも特級）を用い、ろ過にはADVANTEC社製のガラス繊維ろ紙GS25（径55mm、厚さ0.22mm）を使用した。

2. 分析手法及び前処理法

2.1 ELISAキット分析

殺虫剤のイソキサチオン及び殺菌剤のイソプロチオランのELISA分析は、キット付属のマニュアルに従い使用した。両分析キットは環境省の実証試験⁴⁾⁵⁾を受け、製品性能の信頼性において、概ね妥当であると評価されている。キットの測定濃度範囲などの特性をTable 1に示す。分析に際しては三重測定を行い、変動係数（C.V）値が10%以下の結果のみを解析に用いた。

Table 1 Properties of the tested kits

	Isoxathion	Isoprothiolane
Measurement range	1~20 μ g/L	6~100 μ g/L
Detection limit	0.24 μ g/L	1.2 μ g/L
Determination limit	0.80 μ g/L	4.0 μ g/L
Cross-reactivity (%)	Isoxathion-oxon(4.5%) Chlorothalonil(<0.1%)	Diazinon(<0.1%) Iprobenfos(<0.1%)
Recovery(%) (Influence of humic acid)	82~95%	90~109%
Recovery rate(%)	111~160%	102~116%

2.2 GC/MS分析

GCはHP5890 II（Agilent Technologies社）、MSはJME-AM150（JEOL社）の装置を使用した。カラムはAgilent社のULTRA2（長さ20m、内径0.2mm、厚さ0.33 μ m）を用いた。詳細は既報⁶⁾に記した。

2.3 試料の前処理法

ELISAキットのマニュアルには試料水の濃縮操作は記載されていないが、河川水中に存在する微量濃度レベルを測定し、機器分析の結果と比較するには感度が不十分であることから、当センターで、農薬分析に使用している前処理法をELISA分析にも用いることにした。

あらかじめジクロロメタン5 mL、メタノール5 mL、精製水5 mLの順でコンディショニングを行ったPS-2及びAC-2を連結後、水質試料500mLまたは200mLを流速10mL/minで通水させた。カートリッジを精製水で洗浄、乾燥後、PS-2、AC-2別々にジクロロメタン5 mLで溶出

を行った。得られた溶出液に窒素を吹きつけジクロロメタンを完全に乾燥させた後、メタノール0.1mLに再溶解し、精製水0.9mLを加え、ELISA法の分析に用いた。

GC/MS法では、ジクロロメタン溶出液を窒素吹きつけて約1 mLに濃縮後、フルオランテン-d₁₀を内部標準として100ng添加し、分析に供した。詳細は既報⁷⁾に記した。

2.4 試料の前処理法の検討

前処理法として、固相抽出法では、PS-2とAC-2を連結した固相カートリッジ及びENVI18、液々抽出法ではジクロロメタンによる振とう抽出の3手法を検討した。

固相抽出法では、精製水500mLを前述の前処理法で処理後、溶出液に農薬標準溶液をイソキサチオン3 ng/mL、イソプロチオラン15ng/mLとなるように添加した試料、及び無添加の試料をそれぞれELISA法に供した。

液々抽出法では、分液ロートに精製水500mLを入れ塩化ナトリウム15gを溶解後、ジクロロメタン100mLを入れ、10分振とうした後ジクロロメタンを分取した。同様の操作を再度繰り返した後、分取したジクロロメタンを先のジクロロメタンにあわせ、窒素を吹きつけてジクロロメタンを完全に乾燥させた。その後、メタノール0.1mLに再溶解後、精製水0.9mLを加えた溶液について、固相抽出と同様に標準溶液添加及び無添加の試料を作成しELISA法に供した。

3. イソキサチオンELISA分析における妨害物質除去法の検討

イソキサチオンELISA分析において、高濃縮の河川水試料で擬陽性がみられたことから、妨害物質除去のために以下2法を検討した。

3.1 限外ろ過膜による精製

II-2.3で得られたELISA分析用試料500 μ Lをマイクロコン-3, -10, -30に分取し、微量高速冷却遠心機(12,000 rpm, 30分間)で限外ろ過⁸⁾⁹⁾を行い、ろ過液をELISA法に供した。それぞれの限外ろ過膜の分画分子量は、3,000, 10,000, 30,000である¹⁰⁾。

3.2 pH調整及びガラス繊維ろ紙による精製

河川水500mLを1 N塩酸で酸性（約pH 3）に下げ、ガラス繊維ろ紙GS25でろ過し、ろ液を1 N水酸化カリウムで中性にした¹¹⁾¹²⁾。その後、II-2.3の前処理を行いELISA法に供した。

III 結果および考察

1. ELISA法における前処理法の検討

試料の前処理法として、PS-2とAC-2を連結した固相

カートリッジ, ENVI18, 及びジクロロメタンによる液々抽出の3法を検討した. その結果をFig. 1に示す.

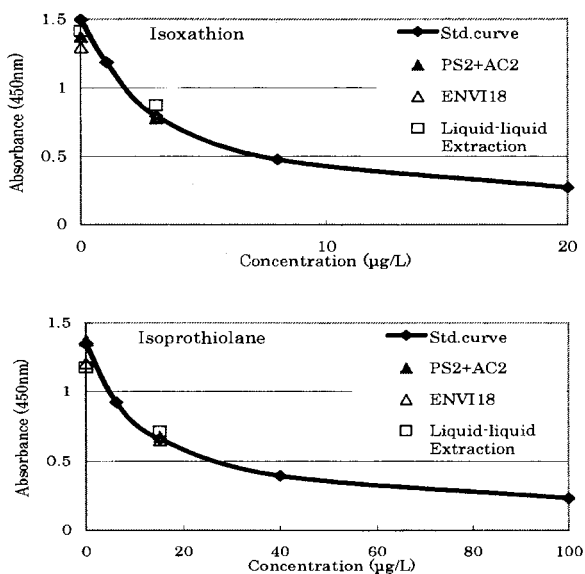


Fig.1 Comparison of the pretreatment techniques

いずれの前処理法においてもイソキサチオン, イソプロチオランともに, 標準検量線と標準農薬添加試料の吸光度は概ね一致し, 前処理操作が原因となる影響はみられなかった.

この結果から, 前処理法として, 従来よりGC/MS分析法で用いているPS-2とAC-2を連結した固相カートリッジ法を使用することにした.

2. 河川水への標準液添加試験

河川原水, 濃縮した河川水それぞれに対象農薬を添加し, ELISA法の分析を行った. 河川水は, GC/MS分析で対象農薬が不検出と確認されたものを使用した. また, 対象農薬の添加濃度は, 各ELISA分析キットの説明書に記載されている検量線作成濃度と同様とした. 結果をFig. 2に示す.

河川原水の場合は, 2種の農薬とも, 検量線(図中太実線)と標準物質を添加した試料(図中細実線)の吸光度は概ね一致しており, 無濃縮の河川水では妨害物質の影響が表れないことが確認された.

一方, 濃縮した河川水の場合は, 2種の農薬で異なる結果となった. イソプロチオランでは, 検量線(図中太実線)と標準物質を添加した試料(図中点線)の吸光度は概ね一致していたのに対し, イソキサチオンにおいては, 標準物質を添加した試料(図中点線)の吸光度は, 検量線(図中太実線)の吸光度と大きく乖離しており, 濃縮した河川水試料では擬陽性になる可能性が高いことが推察された. また, 検量線からの乖離の程度は, 高倍

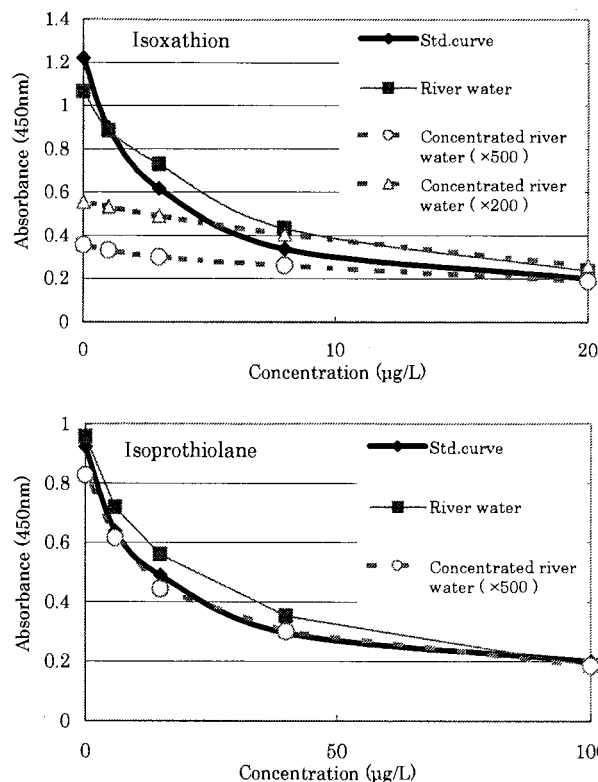


Fig. 2 Comparison of standard curve with standard addition into river water and concentrated river water

率濃縮するほど大きくなることが確認された.

この結果から, イソプロチオランでは河川水濃縮によるELISA法での定量が可能であるが, イソキサチオンでは定量が困難であると推察された.

3. イソキサチオン分析の精製に関する検討

2の結果から, イソキサチオンのELISA分析では, 河川水の濃縮により何らかの含有物質が正の妨害を生じさせ, 擬陽性に傾く要因になると推察された. そこで, II-3. に記述した「限外ろ過」及び「pH調整後のガラス

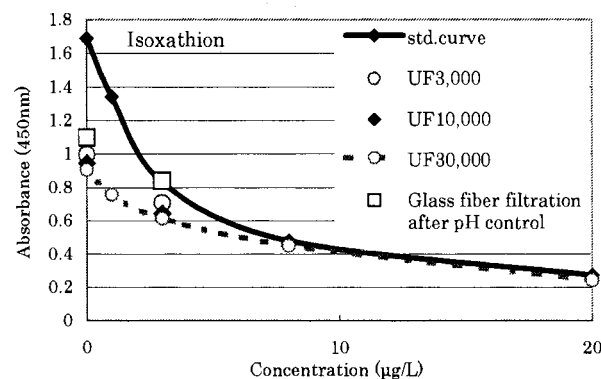


Fig. 3 Comparison of purification method for Isoxathion

* UF; Ultrafiltration molecular weight limit

繊維ろ紙によるろ過」の2種類の精製法により、正の妨害を生じさせる原因物質の除去が可能であるか検討を行った。結果をFig. 3に示す。

「限外ろ過」では、分画分子量が30,000, 10,000, 3,000と小さくなるにつれ擬陽性への影響は多少低減したが、大きな改善はみられず、また「pH調整後のガラス繊維ろ紙によるろ過」でも同様に大きな改善がみられなかった。したがって、原因物質は、いずれの精製法においても十分除去されない物質と判断された。

4. 河川試料におけるELISA法とGC/MS法との分析結果の比較

河川試料8サンプルについて、ELISA法とGC/MS法で定量を行った。いずれも、河川水を500倍濃縮して得られた測定値を濃縮倍率で割り戻し、河川水中濃度として示した。分析結果及び定量下限値をTable 2に示す。

Table 2 Concentrations of Isoxathion and Isoprothiolane with ELISA and GC/MS methods

River water sample No.	Isoxathion		Isoprothiolane	
	ELISA method	GC/MS method	ELISA method	GC/MS method
1	0.0085	N.D.	0.025	0.0097
2	0.0095	N.D.	0.10	0.024
3	0.010	N.D.	0.064	0.017
4	0.010	N.D.	0.039	0.0099
5	0.0091	N.D.	0.040	0.011
6	0.0071	N.D.	0.040	0.012
7	0.019	N.D.	0.037	0.013
8	0.014	N.D.	0.052	0.014
Blank	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Detection Limit	0.002	0.003	0.008	0.004

N.D.; not detected

4.1 イソキサチオンの測定結果

イソキサチオンは、ELISA法では、0.0071~0.019µg/Lの範囲ですべての河川水から検出されたのに対し、GC/MS法ではすべて不検出 (<0.003µg/L) となり、2つの分析手法での結果は合致しなかった。ELISA法でイソキサチオンと交差反応性があるとされているイソキサチオンのオキソソ体¹³⁾も、GC/MS法では不検出であることが確認された。この結果及び前述2. 河川水への添加試験結果から、濃縮河川水には、ELISA法で擬陽性の原因となる妨害物質が含まれていると推察される。

4.2 イソプロチオランの測定結果

イソプロチオランの濃度は、ELISA法では0.025~0.10µg/L, GC/MS法では0.009~0.024µg/Lとなり、いずれの分析法においてもすべての河川水から検出された。GC/MS法での濃度に対するELISA法での濃度の関係を

Fig. 4に示す。ELISA法での測定値は、GC/MS法の測定値の2.6~4.3倍ではあるが、 $r=0.979^{**}$ で高度に有意な正の相関関係が得られた。

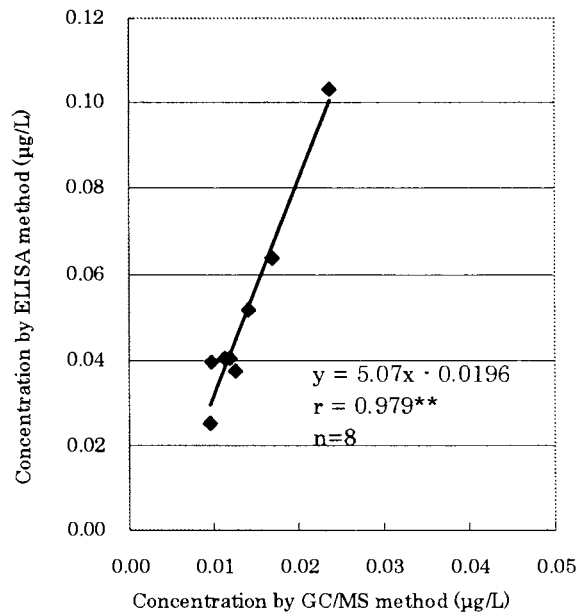


Fig. 4 Concentration of Isoprothiolane with ELISA and GC/MS

5. ELISA法の環境試料への適用可能性

本結果から、イソキサチオンについては、擬陽性の原因となる妨害物質の除去法を確立することができなかった。機器分析と同程度の感度での環境試料測定を、濃縮法導入で実現することは困難であると考えられる。この原因としては、従来から指摘されているように、フミン酸やフルボ酸に代表されるフミン質の妨害が考えられる¹³⁾。フミン質は疎水性を有することから、一般的に非イオン性樹脂に吸着される^{10) 14) 15)}。この性質から、本研究において用いた河川水の濃縮方法は、対象農薬のみならずフミン質も同様に濃縮している可能性が大きいと推察される。鎌迫¹³⁾は、フミン質の一成分であるフミン酸の影響をフミン酸ナトリウム添加試験において検討しており、妨害の程度はフミン酸量に依存すると報告している。本研究のイソキサチオンのELISA分析の結果においても、III-2で論述したように、標準物質を添加した試料の吸光度は、検量線の吸光度と大きく乖離し、その乖離の程度は、濃縮倍率に依存していることが確認された。

感度向上のために実施した濃縮操作が、妨害成分となる可能性の高いフミン質も同時に濃縮したと推察される。

また、筒木によれば、フミン質の一成分であるフルボ酸は、疎水性化合物に親和性を持つ樹脂処理により平均分子量が減少するとされている¹⁶⁾。すなわち、樹脂で処理する前のフルボ酸は、主に多糖類からなる平均分子量

2～3万の高分子成分を含むが、処理後は平均分子量が数千～1万程度に著しく減少する。一般的にフルボ酸の構造は不均一であり、水中のフルボ酸の分子量は500～2000とも800とも言われており¹⁰⁾、正確な分子量は定められていない。

Ⅲ-3.において、分画分子量3,000, 10,000, 30,000の3種類の限外ろ過膜では妨害物質を十分除去できない結果が得られた。この結果は、高分子のフミン質は多少除去されるものの、河川水に含有されるフミン質は90%以上が分子量の小さいフルボ酸から構成されている¹¹⁾ことから、限外ろ過では除去しきれず、試料中に妨害物質として残存したと推察される。

一方、イソプロチオランに関しては、ELISA法での測定値はGC/MS法の測定値と相関が得られたが、定量値自体には2.6～4.3倍の差が認められた。しかし、農産物でのELISA試験において、妨害物の無除去試料では3倍を超える値が得られた報告¹²⁾や、一般的にELISA法では統計学上の擬陽性が多いとの報告¹³⁾がある。したがって、イソプロチオランの分析に関しては、GC/MS法の定量値と概ね同レベルであったことから、環境試料への適用が可能であると推察される。

本結果は、市販のELISAキットを環境試料に適用する際には、濃縮操作や精製過程の事前検討が重要であることをあらためて示している。

IV 要 旨

本報において、殺虫剤のイソキサチオン及び殺菌剤のイソプロチオランの市販キットとGC/MSでの機器分析による測定結果の比較を行った。

固相抽出による濃縮操作を前処理法として用い、河川水を500倍濃縮してELISA法に適用したところ、殺虫剤のイソキサチオンに関しては擬陽性になることが確認された。この原因は明確ではないが、河川水中に存在する妨害物質が一因であると推察された。妨害物質の除去に分画分子量3,000, 10,000, 30,000の限外ろ過及びpH調整後のガラス繊維ろ紙によるろ過を行ったが、いずれの精製方法でも擬陽性に傾く状況は改善されず、環境試料への適用は困難であると考えられた。

殺菌剤のイソプロチオランでは、ELISA法での測定値は、GC/MS法の測定値と相関が得られた。ELISA法の定量値はGC/MS法と比較し、2.6～4.3倍高濃度であったが、一般的なELISA法の結果¹³⁾と同様であり、本研究の前処理法を使用したELISA法が、環境試料の分析に適用可能だと示唆された。

本研究は、環境省の「平成17年度化学物質環境実態調査における農薬調査-同一試料を用いた簡易分析手法(ELISA法)と機器分析手法による同一施設内での分析調査-」の委託事業の一環として行われた結果をまとめたものである。

文 献

- 1) 古武家善成：化学物質環境モニタリングの新展開 - 環境省ELISA実証事業の意義 -。環境技術, 35, 644-650 (2006)
- 2) 環境省水・大気環境局総務課ダイオキシン対策室：ダイオキシンに係る生物検定法マニュアル(排出ガス、ばいじん及び燃え殻), (2006)
- 3) 宮本信一, 有蘭幸司：ELISAによる環境汚染物質の測定。水環境学会誌, 29, 2-8 (2006)
- 4) 山口県：環境省技術実証事業 化学物質に関する簡易モニタリング技術実証試験結果報告(イソキサチオン), (2005)
- 5) 山口県：環境省技術実証事業 化学物質に関する簡易モニタリング技術実証試験結果報告(イソプロチオラン), (2005)
- 6) 吉田光方子, 鄭小萍, 藤森一男：加古川下流域における農薬の濃度変動。兵庫県立健康環境科学研究所年報, 2, 162-167 (2003)
- 7) 吉田光方子, 北本寛明, 古武家善成：ELISA法を用いた河川中イソプロチオラン, イソキサチオンの分析。第15回環境化学討論会講演要旨集, 572-573 (2006)
- 8) 成田伊都美, 森谷和幸, 小林由美, 佐藤賢一, 中村幸二：農作物におけるイムノアッセイによる出荷前の残留農薬分析。第15回環境化学討論会講演要旨集, 742-743 (2006)
- 9) 畠山えり子, 阿久津千寿子, 梶田弘子, 高橋悟：ELISA法による農作物中の残留農薬分析(イミダクロプリド)。第15回環境化学討論会講演要旨集, 744-745 (2006)
- 10) 米林甲陽：生態系における腐食生成と脂肪族成分の変動。土壌の物理性, 65, 35-41 (1992)
- 11) 筒木潔：フミン物質とその水環境へのかかわり。水環境学会誌, 18, 252-256 (1995)
- 12) 米林甲陽：フミン物質の分離とそのキャラクターゼーション。水環境学会誌, 18, 257-260 (1995)
- 13) 鎌迫典久：環境のバイオモニタリング-免疫化学測定法の環境への適用-環境バイオモニタリングの実際-免疫化学測定法を中心として-。環境技術, 35, No.9, 639-643 (2006)

- 14) Carter, C.W. and Suffet, I.H. : Binding of DDT to dissolved humic materials, Environ. Sci. Technol., **16**, 735-740 (1982)
- 15) Chiou, C.T., Kile, D.E., Brinton, T.I., Malcolm, R.L., Leenheer, J.A. and MacCarthy, P. : A comparison of water solubility enhancements of organic solutes by aquatic humic materials and commercial humic acids. Environ. Sci. Technol., **21**, 1231-1234 (1987)
- 16) Thurmann, E.M., Wershaw, R.L., Malcolm, R.L. and Pinckney, D.J. : Molecular size of aquatic humic substances, Org.Geochem., **4**, 27-35 (1982)
- 17) 天野昭子, 須賀しのぶ, 澤野定憲 : ELISA 法を用いた残留農薬簡易分析におけるハウレンソウの測定妨害について. 日本農薬学会大会講演要旨集, **32**, 99 (2007)

温泉の保護対策及び適正利用に関する研究
—モニタリング調査に基づく自噴泉の枯渇防止に関する一考察—

矢野美穂* 川元達彦 英保次郎

Studies on Preservative Promotion and Appropriate Usage for Hot Springs
—Consideration for Prevention of Depletion of Self Flowing Springs
by the Mid/Long-term Monitoring—

Miho YANO*, Tatsuhiko KAWAMOTO and Jiro EIHO

*Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health
and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

From the viewpoint of preservative promotion and appropriate usage for the hot springs, the mid/long-term monitoring at 3 self flowing springs have been examined to understand the factors and its characteristics as symptoms of depletion and changes of states of gushing out. As the results, the correlations were admitted among temperature, self flowing volume, and amount of usage of spring. Interferences were admitted at two springs drawing up from the same aquifer. These results suggested that is useful for the prevention of depletion of self flowing springs.

I はじめに

温泉法の中核をなす温泉の保護及び利用の適正化を推進するためには、温泉の衰退等の兆候や湧出状況の変化を把握する因子とその特徴を明らかにすることが重要である。このために、兵庫県では1999年から県内の数ヶ所の自噴泉を対象とした中長期的なモニタリング調査を実施¹⁾してきた。その間には、温泉への入浴剤の添加事例を初めとして、全国各地で温泉の虚偽表示（温泉法上「温泉」でないものを「温泉」と表示）が発覚し、利用者の誤解を招く温泉表示の実態も明らかとなり、揭示内容の在り方について社会的にも大きな問題となった。こ

の背景には意図的なケースも認められたが、一方では源泉の衰退等による泉質の変化を原因とするケースがあり、温泉の保護や適正利用に関する深刻な課題が顕在化した。

そこで、環境省は、このような実態に対して適正な指導を行うために、2007年4月に温泉法の改正²⁾を行った。改正点は、温泉の成分等についての情報提供の充実を図るための10年ごとの定期的な成分分析及び揭示の義務付けと、限りある温泉資源の持続可能な利用の推進を図るための温泉の掘削・利用等の許可に係る条件付与の規定の新設等である。本研究では、これらの法改正も考慮しながら、モニタリング調査結果をもとに温泉保護と適正利用の観点から自噴泉の中長期的な泉質把握のための考察を試みた。

水質環境部

* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所センター

水質環境部 矢野美穂

II 試料及び方法

1. 調査対象源泉

調査対象源泉は、県北部に位置する自噴泉K泉及びH3号泉（いずれもナトリウム・カルシウム-塩化物泉）と県南部に位置するS泉（ナトリウム-塩化物強塩泉）の3源泉である。ただし、K泉及びH3号泉は、利用時にはポンプを稼働させ自噴量以上の湧出量で動力揚湯されている。またS泉は、海岸近くに位置する岩石を穿った楕円形の井戸（1.3m×1.1m×深さ3m）であり、井戸底部の岩盤の亀裂から温泉水が自然湧出している。このため、湧出口から直接サンプリングすることは容易でないため、井戸内に貯留している温泉水を調査の対象試料とした。その他の概要（掘削深度、柱状図等）については既報¹⁾に示した。

モニタリングの期間は源泉により若干異なるが、K泉の泉温及び自噴量は1997年9月～2005年2月までの7年5ヶ月間、泉質は1998年～2007年5月までの9年間の値を用いた。H3号泉については、現場調査の継続が困難であったことから他の源泉よりも短く、泉温は2001年12月～2004年2月までの2年3ヶ月間、自噴量は2001年12月～2002年12月までの1年1ヶ月間、泉質は1999年9月～2004年2月までの4年5ヶ月間のものを利用した。また、S泉の泉温及び自噴量は1997年9月～2005年2月までの7年5ヶ月間、泉質は1999年9月～2007年10月までの8年2ヶ月間のものである。さらに、H3号泉は100m西南西にH2号泉（掘削深度200m、動力揚湯、所有者は同一）が存在することから、枯渇防止対策の一環としてH3号泉についてのみ2源泉間の湧出に伴う干渉（影響）調査を実施した。

2. 方法

上記3源泉の調査（泉温、自噴量、泉質、電気伝導率）及びサンプリング方法等については既報¹⁾と同様である。H3号泉とH2号泉の間の干渉調査は、実験①～③を経時的に順に実施した。それぞれの実験方法は、実験①：H3号泉のポンプを稼働状態（400L/分）から停止させる、実験②：続いてH2号泉のポンプを稼働（360L/分）させる、実験③：続いてH2号泉のポンプを停止させH3号泉のポンプを稼働（400L/分）させる、それぞれの状態を開始時としてH3号泉の自噴量及びH2号泉の水位（構造上の理由から湧出量の測定が不可能なため）について60分後もしくは90分後までの経時変化を測定した。

III 結果および考察

1. K泉

1.1 泉温及び自噴量

K泉の泉温及び自噴量について毎月のデータを経年変化としてFig. 1に示す。両者の変化の傾向は泉温と自噴量が同じ挙動を示す併行型であり、夏季に高く冬季に低いという1年間のサイクルを持つ変動を示した。この変動については、本源泉（掘削深度：500m）の場合は気温等の季節変動の影響ではなく、温泉水の利用量の変動（夏季に少なく、冬季（観光シーズン）に多い）によるものである¹⁾。モニタリング期間中の泉温の最高値は84.5℃、最低値は67.1℃、年間の変動幅は8～14℃であった。自噴量の最高値は172L/分、最低値は124L/分で、年間の変動幅は17～25L/分であった。また、一時的に泉温及び自噴量の変動的な変動が認められた（Fig. 1中に破線で図示）が、中長期的には回復可能な範囲内で推移していることが分かった。

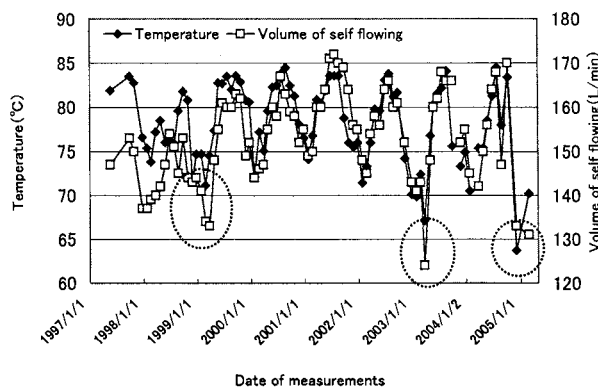


Fig.1 Annual variation in temperature and volume of self flowing of the hot spring K

次に、自噴量と泉温の関係を明らかにするためにFig. 1の全データから両者の相関関係を求めた。その結果、両者の間には高い相関関係（相関係数 r : 0.779 ($p < 0.001$)) が認められた。このことから、自噴量の増減と泉温の上下変動が密接に関係していることが明らかとなった。すなわち、泉温や自噴量をマーカーとして、これらが変化しない範囲内で維持・使用することが、枯渇防止対策として重要であることが考えられる。さらに、前述したように自噴量と泉温の変動は共に1年間のサイクルを持つことから、両者の相関性を詳細に解析するためにFig. 1の毎月のデータを年毎にまとめてプロットを行った（Fig. 2）。その結果、全データを用いた場合よりも高い相関関係が認められた（相関係数 r : 0.804～1.000 ($p < 0.002$)). 一方、これらの相関関係を維持しつつ2001年頃まで近似曲線（直線）が右側へシフトする

傾向も認められ、このシフトには泉質が関与する可能性が考えられた。

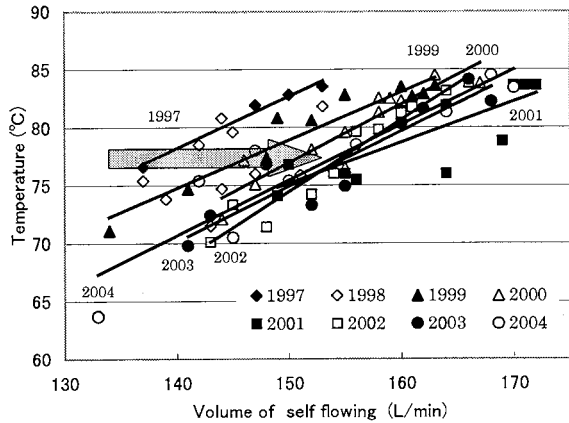


Fig. 2 Relationship between volume of self flowing and temperature of the hot spring K (Results of 1998 is excluded from the analysis, because of the form of use was different from other years.)

1.2 自噴量に影響を及ぼす要因

本源泉の自噴量に影響を及ぼす要因は平均揚湯量であることを既報¹⁾で明らかにしたが、その後の調査結果(2002年~2004年)においても、Fig. 3に示すように月毎の平均揚湯量と自噴量との間には高い負の相関関係($p < 0.02$)が認められた。

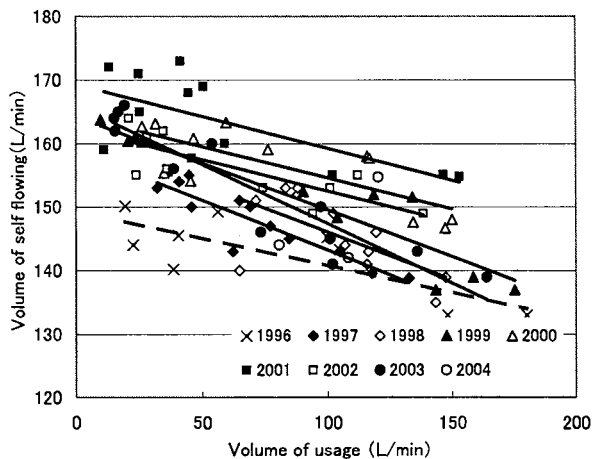


Fig. 3 Relationship between volume of usage and self flowing of the hot spring K

また、各年度の回帰式から求められる切片の値は平均揚湯量が0、すなわち動力揚湯しない場合の自然な状態での自噴量を示すが、この値は1996年(図中の破線)を除くと159L/分~169L/分の間でほとんど変動が認められなかったことから、自噴量に大きな変動はないことも明らかとなった。

1.3 泉質

主成分である陽イオン(Na^+ , K^+ 及び Ca^{2+})と陰イオン(Cl^- , SO_4^{2-} 及び HCO_3^-)濃度の経年変化をFig. 4に示した。

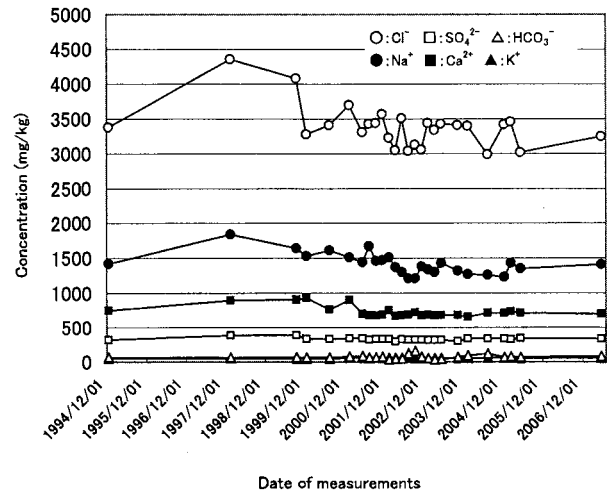


Fig. 4 Annual variation in the concentration of main components of the hot spring K

調査開始から2000年にかけて Cl^- , Na^+ , Ca^{2+} の濃度に若干(20~30%)の減少傾向が認められたが、その後は一定の値を示した。この減少傾向の理由については明確でないが、Fig. 2で示す年毎の近似曲線が右側にシフトしている時期と概ね一致していた。一方、K泉を含む同一温泉地内にある掘削深度が異なる6源泉(どれもナトリウム・カルシウム-塩化物泉)についての我々の調査結果から、掘削深度の増加に伴い泉温及び溶存物質質量が増大する傾向が認められること(Fig. 5), 溶存物質質量は異なるがヘキサダイアグラム(Fig. 6)が相似していることから、主成分の組成が類似していることが分かっている。これら2つの結果から、主成分濃度が減少傾向を示した時期の湧出状況として、深度の浅い地下水が混

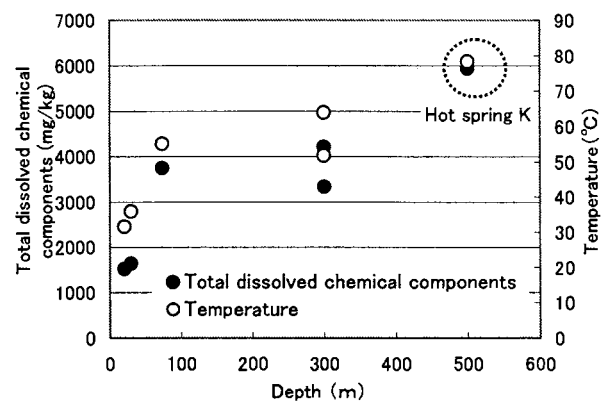


Fig. 5 Relationships between depth of well and total dissolved chemical components or temperature (for 4 hot springs of different depth in area of hot spring K)

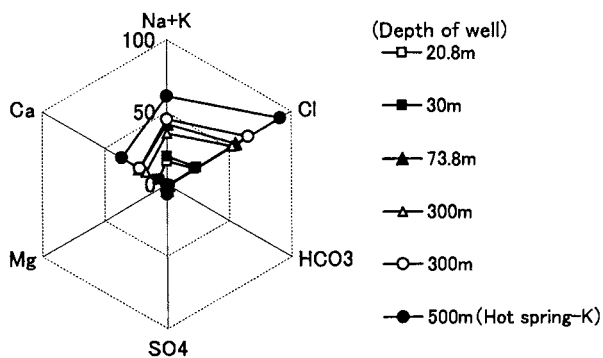


Fig. 6 Hexa diagram of main components of 6 hot springs of different depth in area of hot spring K

入した結果、溶存物質量が僅かに減少し、自噴量は増加し、泉温は低下したことが推測された。しかしながら、2001年以降は大きな濃度変動は認められず（15%以下）、泉質の変動がない状況であることが認められた。また、泉温及び自噴量が安定して推移していることも判明した。

2 H3号泉

2.1 泉温及び自噴量

泉温及び自噴量の経年変化についてFig. 7に示した。

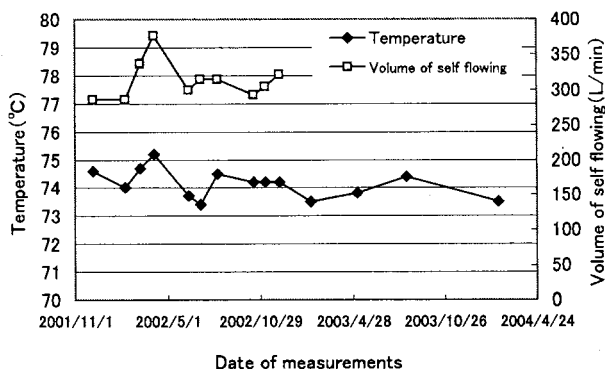


Fig. 7 Annual variation in the temperature and volume of self flowing of the hot spring H3

泉温については最高値75.2℃、最低値73.4℃であり、年間を通して変動は認められず一定していた。また、自噴量については、2002年4月に一過性に高い値（377L/分）を示したが、現時点ではその理由について明らかでなく、その他の結果として変化は殆ど認められず一定して推移していた。また、本源泉の利用形態は、町事業の一環として全戸に配湯するものであり、利用量が1年間を通して一定していることから、K泉で認められたような泉温や自噴量の年間の上下変動は認められなかったものと考えられた。

2.2 泉質

主成分（陽、陰イオン）濃度の経年変化をFig. 8に示す。4年5ヶ月間にわたり、いずれの成分もほとんど変動はなく、泉質としての変化は全く認められなかった。

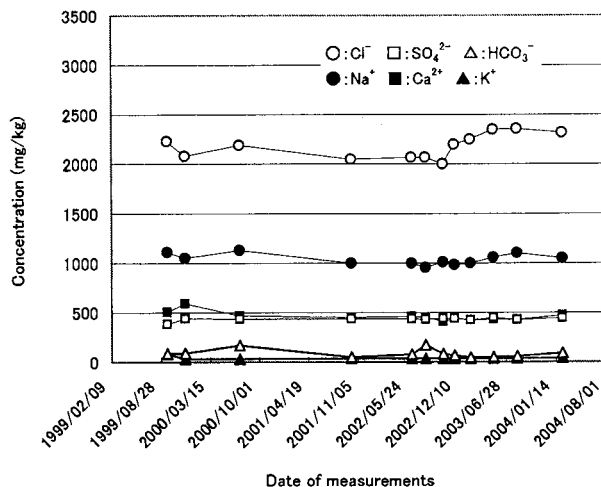


Fig. 8 Annual variation in the concentration of main components of the hot spring H3

2.3 泉源間の干渉

H3号泉とH2号泉について、柱状図が類似していること（所々に流紋岩を挟む石英粗面岩）、両源泉の泉質（Table 1）が一致することから、両源泉は同一帯水層を起源とする泉源であることが推測された。これについて

Table 1 Chemical composition of hot spring H2 and H3

Hot spring	H2	H3	
Date of measurement	1987/5/20	1999/4/21	
Temperature (°C)	70.8	72.5	
pH(in laboratory)	6.73	6.90	
Evaporated residue (g/kg)	4.432	4.826	
Cation (mg/kg)	Na ⁺	1010	1170
	K ⁺	33.4	33.5
	Ca ²⁺	521	510
	Mg ²⁺	22.2	19.8
	F ⁻	2.64	4.46
Anion (mg/kg)	Cl ⁻	2237	2290
	SO ₄ ²⁻	475	378
	HCO ₃ ⁻	71.4	29
Non-dissociative chemical components (mg/kg)	H ₂ SiO ₃	97.4	105
	HBO ₂	3.22	4.13
Total dissolved chemical components (g/kg)	4.49	4.59	
Type of characteristic	Na・Ca-Cl	Na・Ca-Cl	

て明らかにするために、これら2源泉間の干渉実験を行った。干渉実験①～③におけるH2号泉の水位及びH3号泉の自噴量の経時変化をFig. 9に示した。実験①では、H2号泉が稼動していない状態でH3号泉の動力揚湯（400L/分）を停止したが、停止直後からH3号泉の自噴量は安定し、60分後まで同じ値を示した。実験②では、

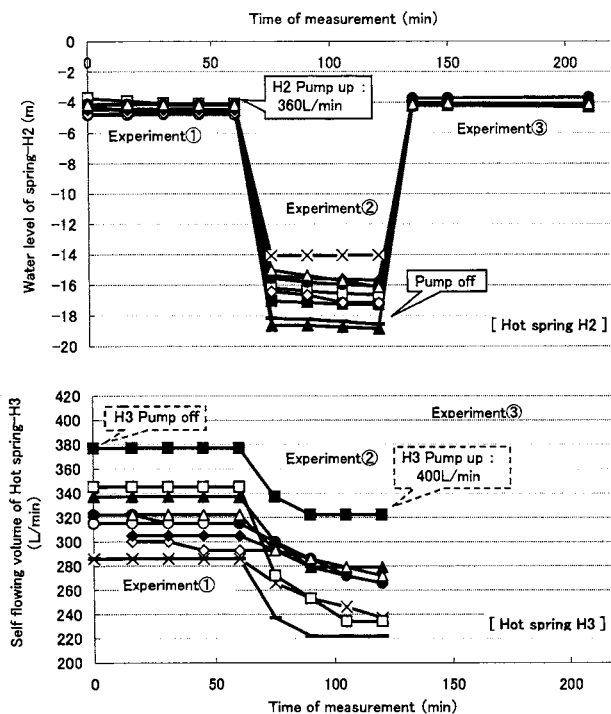


Fig. 9 Influence of discharge volume of the hot spring H2 on volume of self flowing of the hot spring H3

Experiment①: The pump of the hot spring H2 has stopped, the pump of the hot spring H3 is stopped (0-60min.). Experiment②: Next, the pump of the hot spring H2 is operated(60-120min.). Experiment ③: Next, the pump of the hot spring H2 is stopped, and the pump of the hot spring H3 is operated (120-210min.).

×:2001/12/06, ▲:2002/03/08, -:2002/02/07,
 ■:2002/04/04, □:2002/06/11, ●:2002/07/04,
 ○:2002/08/06, ◇:2002/10/16, ◆:2002/11/07,
 △:2002/12/05

H2号泉の動力揚湯（60～120分）によりH2号泉では水位の低下が、H3号泉では自噴量の減少が認められ、源泉間の干渉を示す結果が得られた。一方、実験③ではH2号泉のポンプを停止しH3号泉のポンプを稼働（120～210分）させたが、H2号泉の水位は両源泉のポンプを停止させている実験①（0～60分）の水位とほとんど同じであった。すなわち、(1)H2号泉の動力揚湯はH3号泉の自噴量に影響を与えている一方で、(2)H3号泉の動力揚湯に対してH2号泉は影響を受けていないことを示す結果が得られた。これらの結果から、両源泉は同一帯水層を起源とする源泉であることが推定された。また、(2)の影響を受けなかった理由については、H3号泉の自噴量（約300L/分）から考えて、動力揚湯時の揚湯量（400L/分）は大きな負荷をもたらさないこと、H3号泉の湧出口はH2号泉の湧出口よりも数m低い位置にあること等が考えられた。

これらの結果から、同一帯水層に由来する源泉から揚

湯する場合には、干渉の有無について十分な調査をすることが、枯渇防止対策として重要であることを示すことができた。

3. S泉

3.1 泉温及び自噴量

泉温は、最低値15.5℃、最高値22.0℃の温度範囲にあった。また、本源泉の湧出形態は、井戸底部の岩盤の亀裂から温泉水が自然湧出するものであり、正確な自噴量の測定を行うためには井戸内の全温泉水を排出することが必要となるが、本作業の実施は容易でないため、自噴量に代わるパラメーターとして水位を採用してきた。しかしながら、温泉水の利用状況等の人為的な要因による変動幅が大きく、これらの影響を除いた測定の実施が困難であったことから、今回は解析に至らなかった。本泉のような湧出形態（井戸底からの自噴）の源泉に対しては、井戸内の全温泉水を排水し、湧出直後の温泉水を調査することにより、より正確な測定結果が得られることが明確になったことから、今後は、この手法の導入を計り調査していくことを考えている。

3.2 泉質

泉質の主成分（陽、陰イオン）濃度の経年変化をFig. 10に示した。既報¹⁾では経年的（1997年9月～2001年7月）に成分量の増加傾向が認められたことを示したが、2001年7月以降2004年1月までは、大きな成分量の変化は認められず一定の値を示していた。しかしながら、その後、各成分の濃度の増減が認められ、これについては、所有者の変更に伴う利用状況の変化による影響が考えられ、今回の調査結果のみでは詳細な解析はできなかった。

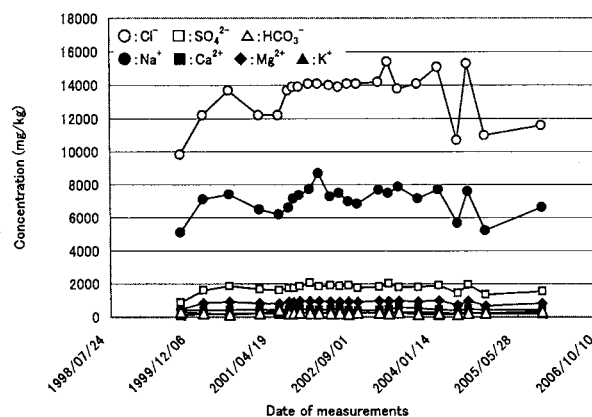


Fig. 10 Annual variation in the concentration of main components of the spring S

4. 電気伝導率と溶存物質質量（泉質）の関係

電気伝導率は、温泉分析表中に記載される測定項目で

はないが、水中の溶存イオン成分（陽イオン及び陰イオン）の種類や総濃度に関係する値であり、溶存物質質量に近似的に比例することが報告されている^{5, 6)}。一方、鉱泉の定義の一項目である溶存物質質量（ガス性のものを除く）は、ガス成分以外の成分の総量を示す値であり、概ね温泉の泉質を反映するパラメーターと言える。そこで、泉質を総合的に把握することが可能と考えられる電気伝導率と溶存物質質量との関連性を知る目的で、3源泉についてモニタリング調査を実施した。その結果について、モニタリング期間中の全57試料（K泉23, H3号泉11, S泉23）の電気伝導率と溶存物質質量との関係をFig.11に示した。2.2で示したように泉質の変動が認められなかったH3号泉ではプロットは1点に、また1.3で示したように泉質の変動が僅かであったK泉についても概ね1点にプロットは局在化し、泉質の変動が認められない場合には電気伝導率の変動も認められなかった。一方、H3号泉やK泉と比べて比較的大きな泉質の変動が認められたS泉では、プロットにばらつきが認められると共に電気伝導率と溶存物質質量との間に有意な正の相関関係 ($y=0.699x + 0.154, r=0.966, p<0.01$) が得られた。試料水として温泉水を用いた今回の結果から、電気伝導率と溶存物質質量との間には相関性が認められ、電気伝導率の測定は、溶存物質質量を介して泉質の変化を早期に把握できる簡便な手法として有効であることが考えられた。今後は現場での温泉監視業務への実用化に繋げるために、より詳細なデータの蓄積が必要であると考えている。

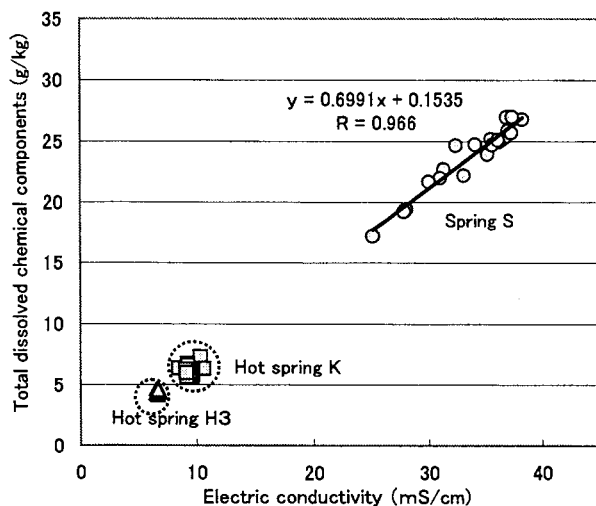


Fig. 11 Relationship between electric conductivity and total dissolved chemical components

IV まとめ

本研究では、温泉保護及び適正利用の観点から、自噴泉について中長期的なモニタリング調査を実施し、温泉の衰退等の兆候や湧出状況の変化を把握する因子とその

特徴について検討した。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. K泉の調査結果から、泉温と自噴量との有意な正の相関関係、自噴量と揚湯量（利用量）の間の有意な負の相関関係、泉温及び自噴量の変動と泉質変化の相関性が認められた。一方、H3号泉では揚湯量（利用量）が一定しており、泉温、自噴量、泉質には殆ど変化が認められなかった。これらのことから、温泉の保護と適性利用を目的とする監視において、泉温、自噴量、泉質の3要素のモニタリングを実施することにより、それらの結果が温泉の枯渇防止対策に活用できることが考えられた。
2. H3号泉とH2号泉の干渉調査の結果から、同一帯水層を起源として揚湯する2源泉が存在する場合には、相互に自噴量（湧出量）に影響を及ぼし合うことが認められた。他の源泉においても、必ず源泉間の干渉調査を実施して影響の程度を把握し、適性に利用することが重要と考えられた。
3. 電気伝導率は溶存物質質量に近似的に比例することから、泉質変化を早期に把握する方法として、現場で簡便に測定できる電気伝導率をモニタリングに適用し、その結果について示した。

謝 辞

長期間にわたるモニタリングの実施に際して、現地での調査及びサンプリング等にご協力頂きました兵庫県健康生活部業務課、豊岡健康福祉事務所業務・生活衛生課（旧浜坂保健所生活衛生課）、洲本健康福祉事務所業務・生活衛生課及び関係市町の多くの方々に深謝致します。また、本調査の計画及び遂行に際し、これまでご協力頂きました旧生活環境部及び水質環境部の皆様に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 矢野美穂, 磯村公郎, 寺西 清; 兵庫県立衛生研究所年報, 36, 119-126 (2001)
- 2) 官報第4571号 (2007.4.25)
- 3) 環境省自然環境局, 鉱泉分析法指針 (改訂) (2002)
- 4) 日本水道協会: 上水試験方法2001年版, 東京 (2001)
- 5) 地下水ハンドブック編集委員会編集: 地下水ハンドブック, 135-136, 丸善, 東京 (1985)
- 6) 半谷高久, 小倉紀雄: 改訂2版 水質調査法, 198-207, 地人書館, 東京 (1969)

水中フィプロニルの固相抽出-GC/MS法による 高感度分析法の開発に関する研究

川元達彦* 矢野美穂 英保次郎

Development of a Highly Sensitive Method for Analysis of Fipronil in Water by Solid Phase Extraction and GC/MS Methods

Tatsuhiko KAWAMOTO*, Miho YANO and Jiro EIHO

*Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29,
Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

We have established a highly sensitive method for analyzing the concentration of a newly regulated agricultural chemical, Fipronil, in water by solid phase extraction and GC/MS methods. In order to evaluate the analytical method, we conducted recovery experiments from distilled water, tap water and river water samples using a PS-2 column. The recovery rate was greater than 90% and the coefficient of variance was under 3%. The determination limit by this method was 0.003 μ g/L. Furthermore, we conducted a water-quality test using this method for water samples collected from 15 monitoring points in the Hyogo Prefecture. The results indicated that the concentrations of Fipronil is over a range from ND to 0.017 μ g/L. However, the detection of Fipronil in water sources was a significantly high rate of 40%.

I はじめに

2004年4月に改正・施行された水道法水道水質基準^{1, 2)}において、農薬類は水質管理目標設定項目として101項目の目標値が設定³⁾され、農薬の毒性を総合的に評価しうる総農薬方式が初めて水道水の水質基準に導入された。一方、水質基準の逐次改正方式の考え方のもと、2006年8月には第5回厚生科学審議会生活環境水道部会において、新しい農薬フィプロニル（殺虫剤、目標値案0.0005mg/L）の追加が審議され、2008年より新規項目として設定されることとなった。この農薬は毒性が強い

ものの、水道水中での微量分析法や水源における実態および挙動に関する報告例は殆ど認められない。

我々は、既に多くの農薬類について、高感度な多成分一斉分析法を開発し、水道原水中の実態把握および浄水処理過程における除去・低減化策を明らかにし、兵庫県の水道水の安全確保対策に寄与してきた⁴⁻⁶⁾。本研究では、新たに規制項目となるフィプロニルについて、我々が開発した固相抽出-TPI (Temperature Programmable Inlet) オンカラム注入-GC/MS法⁴⁻⁶⁾を適用した結果、良好な成績が得られたので報告する。

また、基準改正に先駆けて水道水の安全確保対策に資するため、本分析法を用いて兵庫県水道水質管理計画^{7, 8)}に基づいた監視地点におけるフィプロニルの測定結果についても併せて報告する。

水質環境部

* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究センター

水質環境部 川元達彦

II 材料と方法

1. 試料

1) 農薬: Fig. 1 に示す構造式を有するフィプロニルを分析対象とした。標準原液は標準品の粉末10.0mg (和光純薬工業社製, 純度98%以上) をアセトンで全量を10mLとし, 1,000mg/L溶液を調製した後に, さらにアセトンで希釈して100mg/Lの標準原液を調製した。この標準原液をアセトンまたはn-ヘキサンで適宜希釈し, 各種実験に必要な標準溶液を調製した。内部標準物質9-プロモアントラセンは市販の100mg/Lのn-ヘキサン溶液 (関東化学社製) を用い, n-ヘキサンで適宜希釈し, 実験に必要な内部標準溶液として調製した。

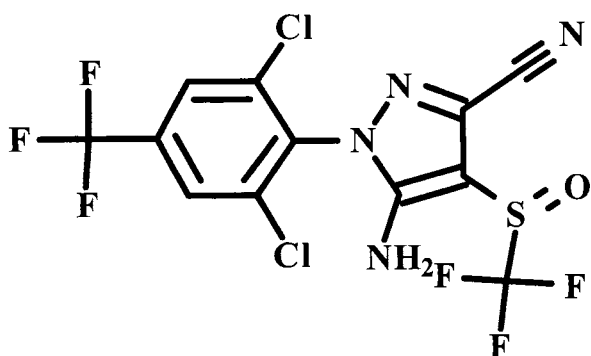


Fig. 1 Chemical structure of Fipronil
MW: 437.2, C₁₂H₄Cl₂F₃N₄OS, logPow: 4,
ADI: 0.0002mg

- 2) 精製水: 水道水をAuto Still (Yamato WG220) で加熱蒸留した後, Milli-Q SP TOC (Millipore社製) で精製したものをを用いた。
- 3) 水道水は県立健康環境科学研究所センターの3階給水栓水より採取し, アスコルビン酸ナトリウム (水道水1Lに10mg添加) で脱塩素したものを実験に供した。
- 4) 水道原水としての河川水は, 神戸市内のA区の河川より採取した。
- 5) アスコルビン酸ナトリウム (和光純薬社製)
- 6) 硫酸 (1 + 1): 水銀分析用 (関東化学社製)。
- 7) 無水硫酸ナトリウム: 残留農薬用の無水硫酸ナトリウム (和光純薬社製) は電気炉で500℃, 5時間乾燥した後, 使用時までデシケーターにて保存した。
- 8) 有機溶媒: ジクロロメタン, アセトンおよびn-ヘキサンは残留農薬試験用5,000 (和光純薬社製) を用いた。その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。
- 9) pH, 浮遊物質 (SS) および残留塩素: 精製水,

水道水および水道原水 (河川水) について, 上水試験方法⁹⁾ に準拠して分析した。

2. 装置: 農薬の抽出装置はVac Elut SPS 24 (Varian社製) を用いて, 抽出操作を行った。質量分析計付ガスクロマトグラフはFinnigan社製のイオントラップ型GCQを用いた。

3. 水中フィプロニルの固相抽出-TPIオンカラム注入-GC/MS分析

水中農薬の固相抽出は既報¹⁰⁾ に従って行った。固相抽出法の概略をFig. 2 に示し, その概要を以下に示した。

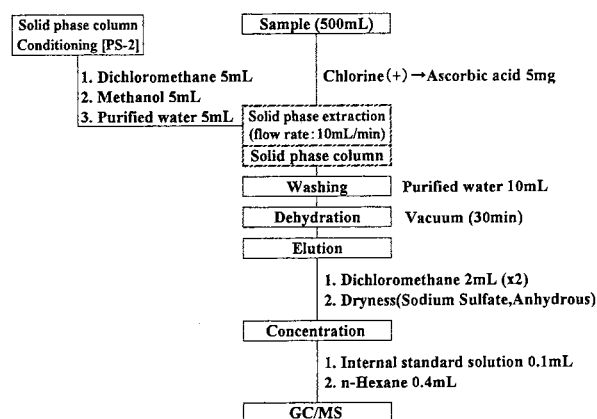


Fig. 2 Analytical procedures for Fipronil

試料水500mL (フィプロニルとして0.005, 0.05, 0.5 μg/Lを含むように精製水, 水道水, 河川水に標準溶液を添加) を固相抽出カラム (PS-2, Waters社製) に流速10mL/min以下で通水した。PS-2カラムは窒素パージにて30分間乾燥させた後, ジクロロメタン (2 mL, 2回) により農薬を溶出させた。2回の抽出液を合わせて, 無水硫酸ナトリウムにより脱水後, 窒素ガス気流下にて1 mLまで濃縮した。その後, n-ヘキサンに転溶後, 窒素気流下にて濃縮後, 内部標準物質9-プロモアントラセン0.1mL (1 μg/mL) を添加し, 正確に0.5mLとしたものを分析用検液とした。

GC/MS測定条件についてはTable 1 に示した。

農薬分析のための検量線作成 (濃度範囲: 0, 0.003~0.500mg/L) および定量にあたっては, フルスキャンで取り込んだイオンの中から, フィプロニルに特徴的なイオン (m/z367, 369, 371) を選択 (選択的検出法, SIM法) し, 内部標準物質でMSの感度を補正して測定を行った。

本法における農薬の添加回収実験の平均回収率と変動係数は, 3回の繰り返し実験により求めた。

Table 1 GC/MS operation conditions

【GC】
Injection method: TPI on column injection
Injection temp.: 40°C (1min) -80°C/min-240°C(42min)-80°C/min-320°C(2.5min)
Coolant: liquid CO ₂
Oven temp.: 40°C(4min)-20°C/min-180°C-2°C/min-200°C(5min)-2°C/min-240°C-20°C/min-320°C
Carrier gas: Helium, 40cm/sec(EPC)
Column: DB-5ms(film thickness: 0.1μm, l: 30m, i.d.: 0.25mm)
【MS】
Ion source temp.: EI; 200°C,
Transferline temp.: 275°C
Emission current: 285μA
Ionization volt: 70eV
Mass range: 50-500(m/z)

4. 水道原水中のフィプロニル含有量調査

兵庫県水道水質管理計画⁸⁾に基づいた水質監視地点のうち、監視14地点および関連1地点の計15地点(水源種別: 湖沼水1地点, 河川水5地点, 伏流水1地点, 浅井戸6地点, 深井戸2地点)(Fig. 3)について、2007年6月19日に採水した試料を用いた。各地点の原水500mLを試料として、3.の方法に従って農薬を抽出・溶出し、濃縮液に内部標準物質0.1μgを添加し、正確にn-ヘキサンで0.5mLとしたものを分析用検液とした。

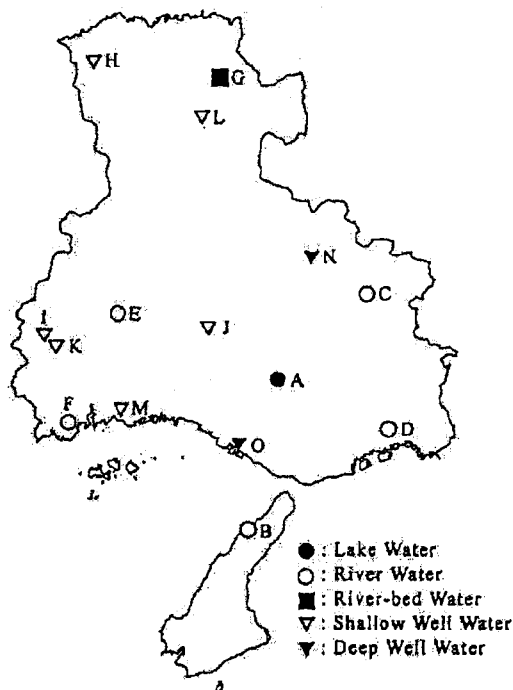


Fig. 3 Location of sampling points

なお、測定対象物質の検索はフルスキャンによるトータルイオンクロマトグラム上で得られたピークのマスパターン(標準物質の保持時間の±10秒以内, Signal/Noise (S/N) 比10以上のピーク)により行い、ライブ

ラリーとの相同性が80%以上の場合を測定物質として同定した。定量はフルスキャンで取り込んだイオンの中から、フィプロニルに特徴的なイオン(m/z367, 369, 371)を選んで、SIM法による測定を行った。

III 結果および考察

1. 固相抽出-TPIオンカラム注入-GC/MS法によるフィプロニルの分析法の条件設定について

1) 固相抽出カラムによる前処理法の検討

今回、水中フィプロニルの抽出・精製を目的とした固相カラムとして、他の農薬類と一齐分析⁴⁻⁶⁾に加えることを目的としたため、ポリスチレンジビニルベンゼン共重合体のPS-2カラムを用いて検討した。また、採水試料によってはpHが酸性~アルカリ性の範囲に変動することが十分に想定されるため、pH3.0, 5.0, 7.0, 9.0に変化させた水溶液にフィプロニル0.5μg/Lとなるように添加して回収率を検討した結果、平均回収率(n=3)として、それぞれ98.4, 98.7, 101.6, 96.4%と良好な結果を示した。兵庫県下の水道原水は河川水, 湖沼水, 浅井戸, 深井戸, 伏流水と多岐にわたっているが、本実験結果から、原水のpH調整の必要性は認められず、採水した試料水を直接、固相抽出カラムに供与し、フィプロニルの濃縮・精製操作を実施できることが分かった。

2) 分析条件等の検討

農薬の熱に対する安定性を考慮して、TPIオンカラム注入法を採用した。すなわち、ガスクロ注入口で不安定なトリクロロホンやメチルダイムロンなど水道水として規制されている多くの農薬と共に、効率的にフィプロニルを一齐に分析することが必要であるため、TPIオンカラム注入法を用いた⁴⁻⁶⁾。今回、結果を示していないが、注入口温度を50°C~300°Cまでの範囲設定において、フィプロニル標準溶液(0.5mg/L)を注入し熱分解物の検索を行ったが、熱分解物は全く認められなかった。

Fig. 4にフィプロニルと内部標準物質9-ブromoアントラセンのトータルイオンクロマトグラムを示したが、ピーク形状や分離は良好であった。また、Fig. 5にフィプロニルのマススペクトルを示した。フィプロニルのEI(電子衝撃)法による分子イオンピークは殆ど認められず、ピラゾール骨格の4位に結合したトリフルオロメチルスルフィニル基内の[-SO-CF₃]のうち、CF₃結合が切断された[M-CF₃]⁺であるm/z367, 369, 371(同位体)の特徴的なイオンが認められ、m/z367は最も強いイオン強度として認められた。マ

トリックスが多い試料の場合、このイオンが定量イオンとして特に有効であることを確認できた。

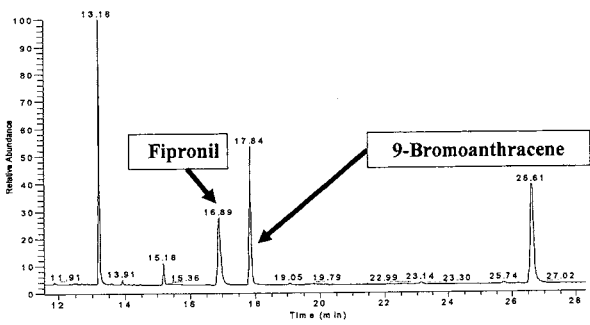


Fig. 4 Total ion chromatogram of Fipronil and 9-Bromoanthracene

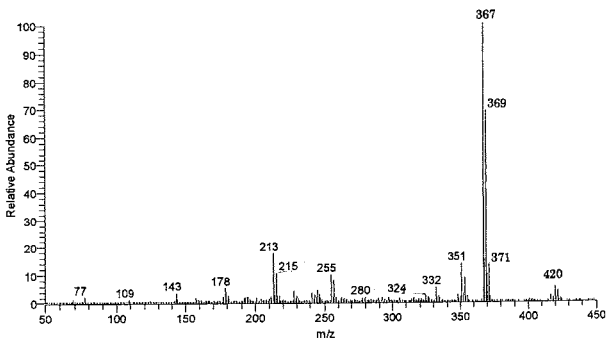


Fig. 5 Mass spectrum of Fipronil
quantitative ion: m/z367, 369, 371

以上の検討結果から得られたフィプロニルのモニターイオン、保持時間、検量線の直線回帰式および相関係数の分析パラメーターをTable 2にまとめて示した。農薬濃度とピーク面積との相関係数は1.0000と高い値を示し、濃度応答性の直線性が極めて良好であることを認めた。

Table 2 Various parameters of Fipronil measurement

monitor ion (m/z)	Retention time (min)	Regression curve *	Correlation coeff.
367, 369, 371	16.89	y=690.83x-2080.1	1.0000

* : Conc. 0.003-0.500mg/L(7 points: 0, 0.003, 0.005, 0.010, 0.05, 0.100, 0.500mg/L)

以上のことから、TPIオンカラム注入法がフィプロニルの分析に対しても、有効な分析方法であることが示された。

3) 添加回収実験

固相抽出-GC/MSの一斉分析による水中農薬の定量性および再現性を把握するため、試料水(蒸留水, 水道水, 河川水)を使った場合の回収率とその変動係数を求めた。

蒸留水, 水道水および水道原水(河川水) 500mLに農薬標準溶液0.0025 μ g, 0.025 μ g, 0.25 μ gを添加した

試料水を用いて、添加回収実験を行った。それらの回収率と変動係数の結果をTable 3に示す。

Table 3 Recoveries of Fipronil in water

Conc. (μ g/L)	Dist. water		Tap water		River water	
	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)	R(%)	CV(%)
0.005	99.2	1.0	96.7	1.3	90.8	2.8
0.05	99.3	2.1	96.5	1.5	96.3	0.9
0.5	101.6	1.4	101.2	2.4	101.6	2.9

Dist. water : pH7.0, SS ; <1.0mg/L, n=3
Tap water : pH6.9, SS ; <1.0mg/L, n=3
River water : pH6.9, SS ; 3.2mg/L, n=3
R(%) : recovery, CV(%) : coefficient of variation

蒸留水, 水道水および河川水にフィプロニル0.005 μ g/L添加した時の回収率の範囲は、90.8~99.2%であり、変動係数の範囲は1.0~2.8%であった。

また、蒸留水, 水道水および河川水にフィプロニル0.05 μ g/L添加した時の回収率の範囲は、96.3~99.3%であり、変動係数の範囲は0.9~2.1%であった。

さらに、蒸留水, 水道水および河川水にフィプロニル0.5 μ g/L添加した時の回収率の範囲は、101.2~101.6%であり、変動係数の範囲は1.4~2.9%であった。

このように、検討を行ったすべての試料水へ添加したフィプロニルの回収率は90%以上と良好であった。また、変動係数は3%未満と良好な再現性を示した。

このことから、実際のサンプルである水道水, 河川水に含有する水質成分による妨害はなく、定量可能であることが明らかとなった。また、フィプロニルは目標値0.5 μ g/Lの1/100の0.005 μ g/Lであっても、内部標準物質を用いることで分析の精度は高められ、極めて高感度に分析可能であることが認められた。本分析条件によるフィプロニルの定量下限は0.003 μ g/L (S/N=10)であった。なお、添加回収実験に用いた試料水にはフィプロニルは全く含まれていないことも確認している。

一方、水道水中におけるフィプロニルの安定性実験として、残留塩素0.5mg/Lを含有する水道水にフィプロニルの目標値0.5 μ g/Lを添加し、30分間反応させた結果、32.5% (n=3)まで速やかに分解した。フィプロニルはFig. 1に示す様に分子中に硫黄元素(S)を含んでいる構造である。また、S基を有する農薬は一般的に塩素によって分解されやすいことが報告されている¹⁰⁾。塩素に対する詳細な分解メカニズムは未だ明らかにされていないが、ひとつにはS基と塩素との反応によって分解の進行することが推測される。

本研究結果から、フィプロニルは水道水中塩素で比較的容易に分解することが判明し、分析操作上、脱塩

素操作は不可欠であることが明らかとなった。

2. 水道原水中のフィプロニル調査

兵庫県下の15ヶ所の水道原水について、フィプロニルの含有量調査を行った結果をTable 4に示す。水道原水から最高値0.017 $\mu\text{g/L}$ が検出された。この濃度は水道水の目標値0.5 $\mu\text{g/L}$ の約3.5%のレベルであり、比較的低濃度レベルであった。しかし、全体の検出率は6/15(40%)と極めて高い値を示し、水源別では特に河川水で多く検出され、また地下水の浅井戸においても検出されていることが分かった。

Table 4 Concentration levels of Fipronil in various water sources

Water sources	Concentration($\mu\text{g/L}$) ^{a)}	Frequency
River water	N.D.	4/5
	0.004	
	0.005	
	0.012	
	0.017	
Lake water	N.D.	0/1
River bed water	N.D.	0/1
Shallow well	N.D.	2/6
	N.D.	
	N.D.	
	0.004	
	0.004	
Deep well	N.D.	0/2
	N.D.	
Total	N.D.-0.017	6/15

Sampling date : June 19, 2007

* : Determination limit: 0.003 $\mu\text{g/L}$

以上、本研究結果から、原水中におけるフィプロニルの検出濃度は規制値と比べて低濃度レベルにあったが、検出率は極めて高く、注意を要する農薬であることが明らかとなった。今後とも、行政、水道事業所、試験研究機関が一体となり、浄水処理過程における挙動調査など詳細な研究を進めることが必要であると考えられる。

IV 要 旨

新規規制農薬であるフィプロニルについて、固相抽出-TPIオンカラム注入-GC/MS法による分析法の測定条件の検討および実態調査に関する研究を行った結果、以下の知見が得られた。

1. 水中フィプロニルの固相抽出カラムとして、ポリマー系のPS-2カラムを検討した結果、良好な抽出が可能であり、pH3.0~9.0の幅広い範囲においても抽出効率

に影響しないことも分かった。

2. さまざまな試料水(蒸留水、水道水、河川水)を用いて、フィプロニルの添加回収実験を行ったところ、回収率は90%以上と良好な結果が得られた。また、変動係数も3%未満と再現性の高い結果であることが認められた。これらのことから、本分析法の有用性が示され、ここに高感度な分析法が確立された。本法によるフィプロニルの定量下限値は0.003 $\mu\text{g/L}$ であり、目標値0.5 $\mu\text{g/L}$ の1/100まで十分定量可能であった。また、本法を適用することで、他の農薬類との一斉分析が可能であることも分かった。

3. 本法を兵庫県水道水質管理計画に基づいた監視14地点および関連1地点の合計15地点の水道原水中フィプロニルの濃度調査に適用した結果、N.D.~0.017 $\mu\text{g/L}$ の濃度範囲で検出され、目標値に比して低濃度レベルにあることが分かった。しかし、検出率は40%(15検体中6検体で検出)と極めて高く、注視すべき農薬であることを認めた。今後は、広範囲な実態調査および詳細な浄水処理過程における挙動調査を行うことが必要であると考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、試料水の採取にご協力をいただきました兵庫県健康生活部生活衛生課ならびに各市町水道事業所の皆様に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省:「水質基準に関する省令」, 2003年5月30日, 厚生労働省令第101号
- 2) 厚生労働省健康局水道課長通知:「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について」2003年10月10日, 健水発第1010001号
- 3) 厚生労働省健康局長通知:「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正について」2003年10月10日, 健水発第1010004号
- 4) Kawamoto, T. and Makihata, N.: Development of a simultaneous analysis method for carbofuran and its three derivative pesticides in water by GC/MS with temperature programmable inlet on-column injection. *Anal. Sci.*, **19**, 1605-1610 (2003)
- 5) Kawamoto, T., Makihata, N., Tsuji, H. and Teranishi, K.: Annual variation in the concentration levels and frequency of detection of

- pesticides in water sources in Hyogo Prefecture. *J. Health Sci.*, **45**, 401-411 (1999)
- 6) Kawamoto, T, Yano, M., and Makihata, N.: Development of a high-sensitivity quantitative analytical method for determining polycarbamate by gas chromatography-mass spectrometry incorporating temperature-programmable inlet on-column injection. *J. Chromatogr. A*, **1074**, 155-161 (2005)
- 7) 厚生労働省健康局水道課長通知: 「水道水質管理計画の策定にあたっての留意事項について」の一部改正について, 2004年1月22日, 健水発第0122002号
- 8) 兵庫県健康生活部生活衛生課: 「兵庫県水道水質管理計画」, 1994年3月策定(第1次), 2005年9月策定(第2次)
- 9) 日本水道協会編: 上水試験方法2001年版, P107-114, P119-120, P247-257, 日本水道協会出版, 東京(2001)
- 10) 川元達彦, 巻幡希子: 水道水質基準に新しく規制されたゴルフ場使用農薬の同時分析法の検討. 兵庫衛研年報, **34**, 176-183 (1999)
- 11) 新井崇子, 鎌田素之, 島崎大, 浅見真理, 相澤貴子: 農業の分子構造別の塩素分解性に関する研究. 水環境学会誌, **28**, 437-444 (2005)

播磨灘における海水温度の長期変動

宮崎 一* 英保次郎

Changes of Sea Water Temperatures during Long Time in the Sea of Harima

Hajime MIYAZAKI* and Jiro EIHO

*Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihira-cho,
Suma-ku, Kobe 654-0037, Japan*

Changes of sea water temperatures during long time at two experimental stations in the Sea of Harima that is an enclosed coastal sea from 1981 to 2005 (fiscal year) were researched. As a result, it was revealed that they had risen at the surface and bottom layers in almost all seasons at both stations. These sea water temperature rises were accompanied with atmospheric temperatures, therefore it seemed that the rise of sea water temperatures related to global warming.

I はじめに

地球温暖化が言われて久しい。平成19年度環境・循環型社会白書においては、総説を設けて現状、将来予測、対策について詳述されている¹⁾。温室効果ガスによる気候変動の見通し、自然、社会経済への影響評価及び対策に関する評価を担当している「気候変動に関する政府間パネル (IPCC)」の地球温暖化に関する科学的知見を集約している第1作業部会報告書²⁾によれば、大気中の二酸化炭素濃度は379ppm (2005年)と、産業革命前の約280ppmの約1.4倍となり、また、1906年から2005年までの100年間で、地球の平均気温は0.74 (0.56~0.92) °C上昇したとされている。さらに、最近50年間の長期傾向 (10年当たり0.13 (0.10~0.16) °C) は、過去100年のほぼ2倍の速さとされている。

地球温暖化による海水温度の上昇は海域の生態系に悪

影響を与える可能性も指摘されている。元来、インド洋から東シナ海にかけての亜熱帯から熱帯の沿岸域を生息地とするエイの一種ナルトビエイの生息域は近年北上し、1989年に五島列島 (長崎県) で生息の確認が報告されて以来、有明海や瀬戸内海でも大量の生息が確認され、タイラギやアサリなどの二枚貝等に対する食害が報告・懸念されている³⁾。

近年、内湾や内海の高生産性、水質浄化や生物多様性の保全のための重要性が認識されている干潟 (日本国内で約5万ha) はその緩やかな勾配 (平均約1/300) から50cmの海面上昇で幅150mの面積が消失すると概算され、地球温暖化に伴う海面上昇の影響が極めて大きいと予測されている^{4) 5) 6)}。また、砂浜海岸の浸食も深刻化し、30cmの海面上昇により日本全国の砂浜海岸の56.6%が浸食されると予想されている⁷⁾。

海水交換が緩慢な閉鎖性海域の海水温度は地球温暖化の影響をより大きく受ける可能性が考えられ、その影響が危惧されている。しかしながら個々の閉鎖性海域について海水温度の変動を長期的に評価している例は少ない。本稿では、本県が接する閉鎖性海域である播磨灘を対象として、1981年度から2005年度にわたる海水温度の測定

水質環境部

* 別刷請求先：〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27

兵庫県立健康環境科学研究所センター

水質環境部 宮崎 一

結果25年間分を解析し得られた知見について報告する。

II 調査地点と方法

Fig. 1 に調査地点を示す。環境省の委託を受け本県が広域総合水質調査を実施してきた播磨灘北部海域から、陸水流入による突発的な変動を受け難い沖合の2地点 (St.1 北緯34度36分12秒, 東経134度36分50秒, 水深約37mおよびSt.2 北緯34度26分27秒, 東経134度32分54秒 水深約42m) を調査地点として選定した。各地点の気温, 水温 (表層および底層として海底上1m (水深約36m~41m)) を1981年度から2005年度までの25年間に春夏秋冬の年間4回測定した結果を利用した。なお, 気温は水銀式ガラス製温度計, 水温はアレック電子(株)製のクロロテックを使用して測定した。

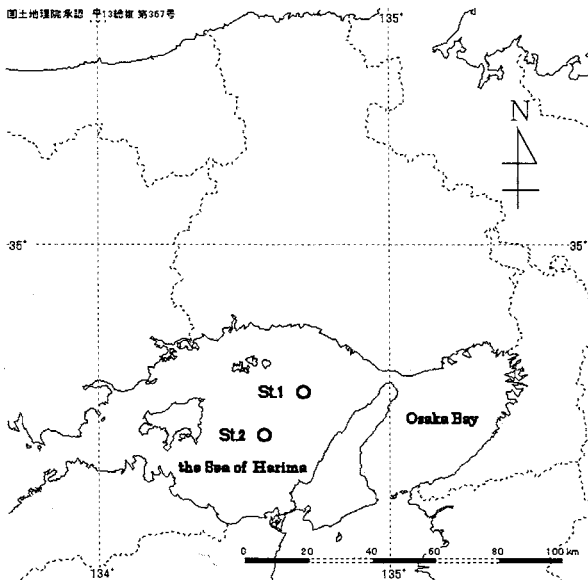


Fig. 1 Map of study site

III 結果

Fig. 2 に1981年度から2005年度の25年間の海水温度の変動を表層と底層について, 春夏秋冬 (5月, 7月 (1981年度と1983年度は8月に測定したので除外した.), 10月, 1月 (1985年度は2月に測定したので除外した.)) に分けて示した。

表層については一年間を通じて, 底層についてはSt. 2の春季を除く全期間で海水温度の上昇傾向が認められた。また, 同時期の気温の測定結果 (Fig. 3) からは, 変動幅が大きいため気温の上昇幅に対する評価は出来ないが, 全期間で気温の上昇傾向が認められた。これらの結果から, 気温の上昇傾向と時期を同じくして海水温度が上昇傾向であることが認められた。

1981年度から1990年度を基準年とした1991年度から2000年度および2001年度から2005年度の平均海水温度の変動についてFig. 4に示す。これらの比較の検討結果からは, 季節的には下降した時期はあるが, 年間平均値については, 両地点の表層と底層において長期的に海水温度が上昇傾向であることが示された。

また, Fig. 2およびFig. 4の結果を総合すると, 表層では春季と秋季, 底層では夏季と秋季に着実に海水温度が上昇していることが示唆された。

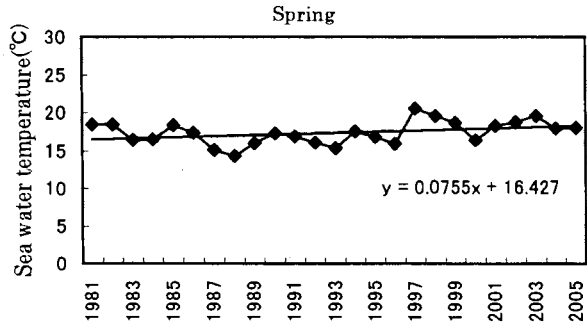
IV 考察

播磨灘のSt. 1およびSt. 2地点における25年間の海水温度の調査結果を解析したところ, 上昇傾向が認められた。この間に気温の上昇傾向も認められ, 地球温暖化との関連が示唆された。表層のみならず底層の海水温度もまた上昇しているが, このことは底層の生物活動を活発化させると考えられる。室内実験からは, 酵素活性は反応温度が20℃から30℃に上昇することにより反応速度が2倍以上になる結果が得られている^{8) 9) 10) 11)} ことから溶存酸素消費量の増加が見込まれる。また, 底層の微生物群の無機化活性の上昇により底質からのアンモニア態窒素の溶出が増加する¹²⁾と考えられる。このように表層のみならず底層を含めた海水温度の上昇は富栄養化した閉鎖性海域で問題となる, 底層の貧酸素化や底層からの栄養塩類の溶出に拍車をかける可能性が高い。

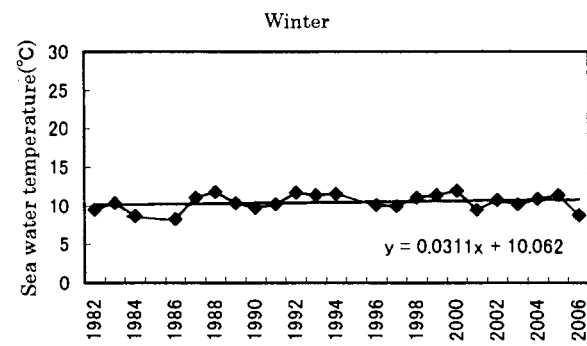
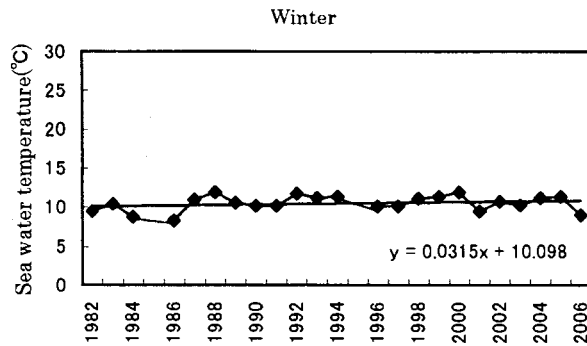
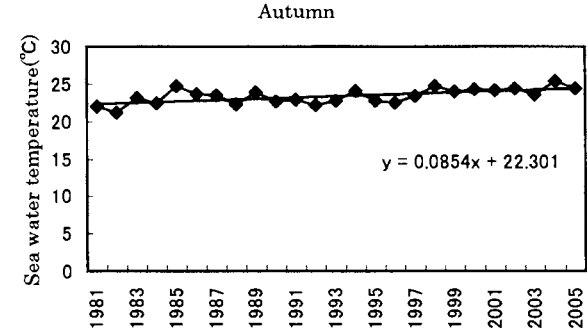
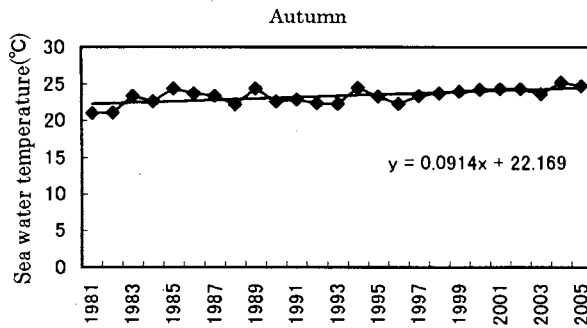
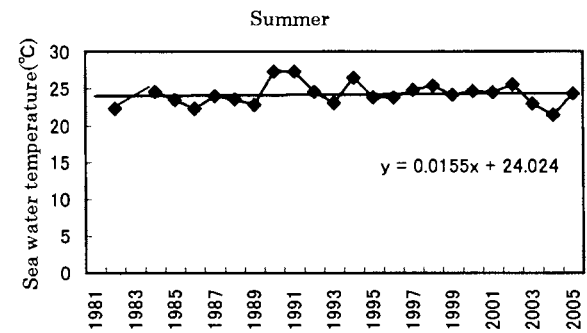
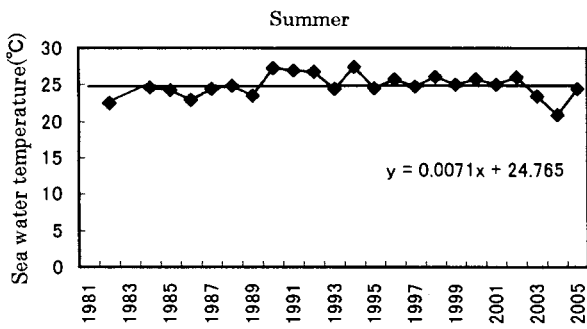
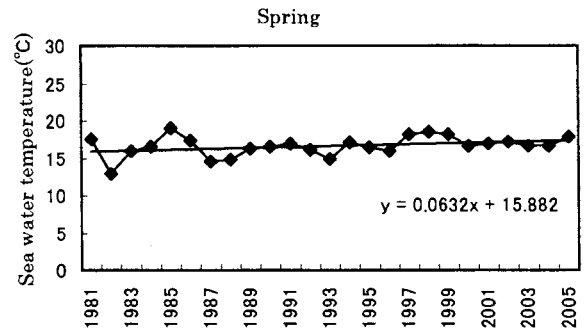
また, 表層における春季と秋季および底層における夏季と秋季の着実な海水温度上昇は, 従来からの海水温度の季節変化を乱すことになる。長崎県周辺と沖縄県石垣島における植食性魚類アイゴは, 海域と年度に係わらず水温25℃を超えた直後の短期間に産卵が集中することが認められ, 海水温度の上昇が産卵日の早期化をもたらすことが明らかとなった¹³⁾。このことは海水温度の上昇によりアイゴによる藻場に対する食害が深刻化する可能性を示唆している。また, 瀬戸内海中央部ではこの20年間における年間最低水温の約1.5℃の上昇を含む水温上昇傾向がミズクラゲの出現期間の長期化と越冬クラゲの出現を引き起こしたと推定されている¹⁴⁾。このことは近年の漁業技術の進歩による魚類資源に対する漁獲圧力の高まりと相まって, 海域においてクラゲが魚類を凌駕して優勢になる「クラゲスパイラル」¹⁴⁾に陥る要因となり得る。アイゴおよびミズクラゲは元来日本の沿岸域に広く生息しているため, これらの現象は海水温度の上昇に伴い範囲を拡大していくと考えられ, 生態系への影響が懸念される。

今後は, 海水温度上昇に伴う沿岸海域環境への悪影響

Surface(A)
(St.1)

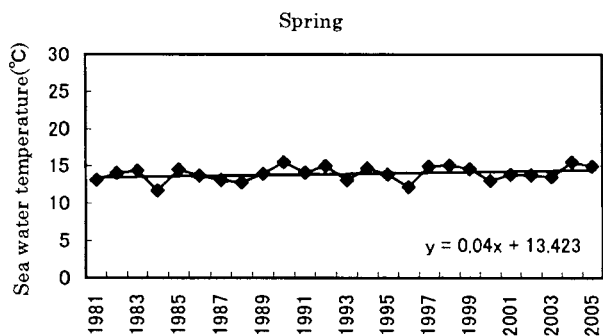


(St.2)



(Fig. 2 Changes of sea water temperatures in the surface(A) and bottom layer(B) at St.1 and 2 from FY 1981 to FY 2005)

Bottom(B)
(St.1)



(St.2)

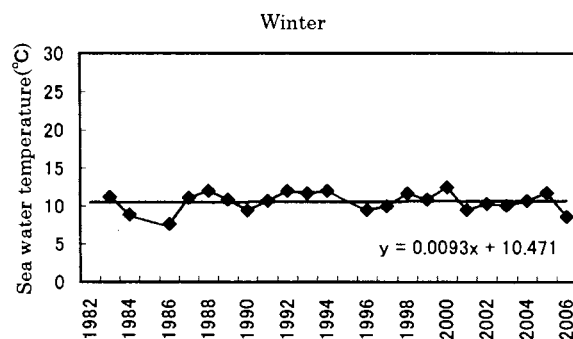
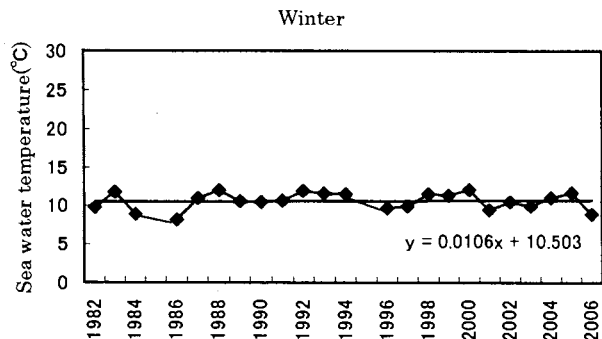
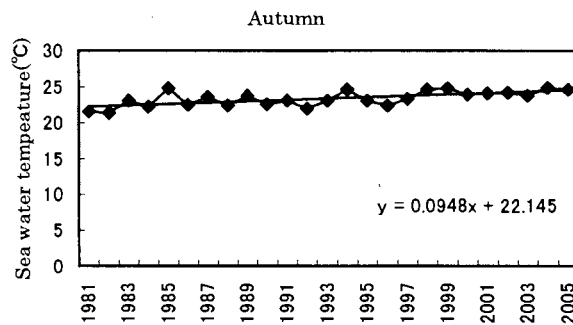
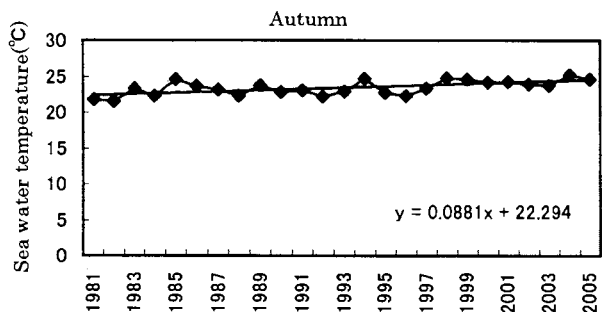
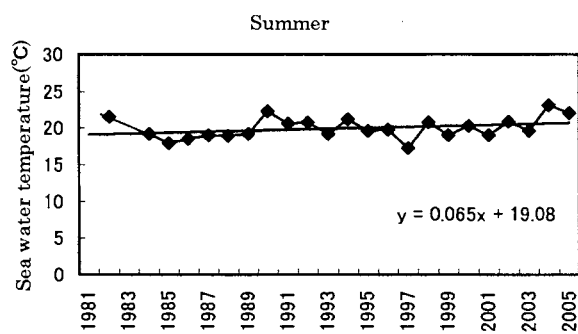
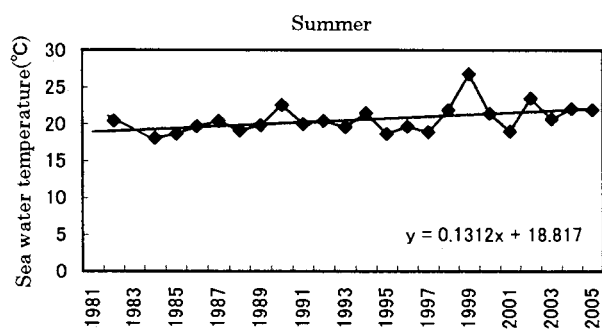
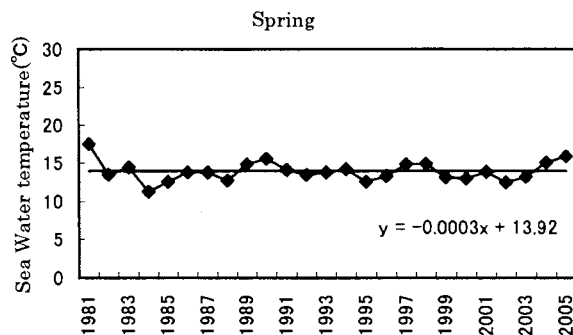
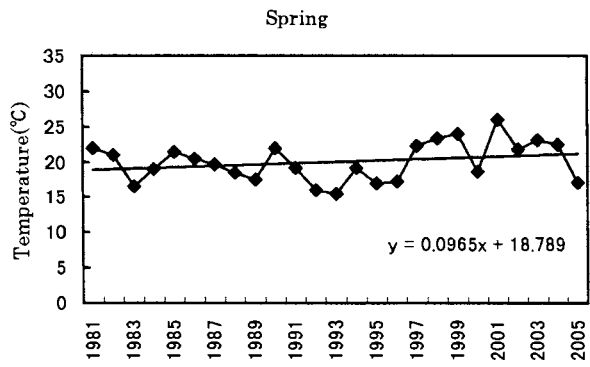


Fig. 2 Changes of sea water temperatures in the surface(A) and bottom layer(B) at St.1 and 2 from FY 1981 to FY 2005

St.1



St.2

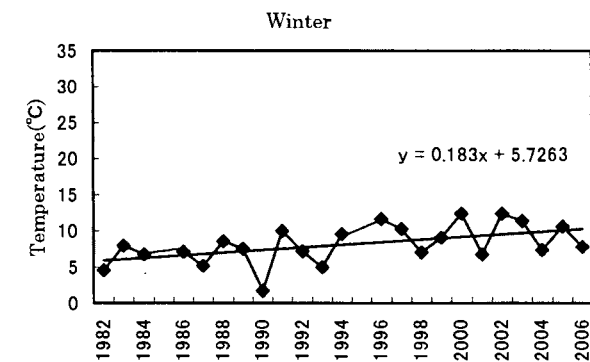
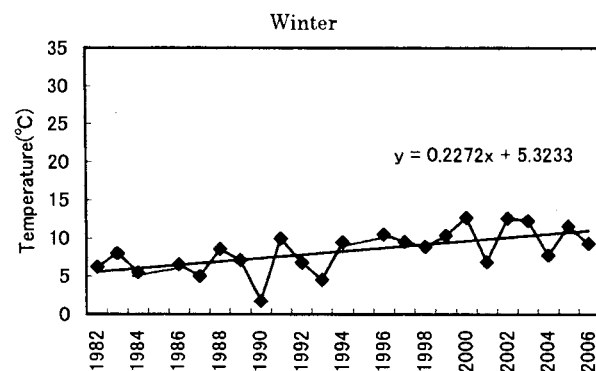
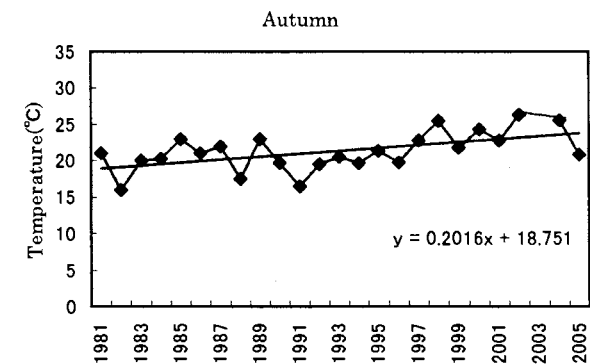
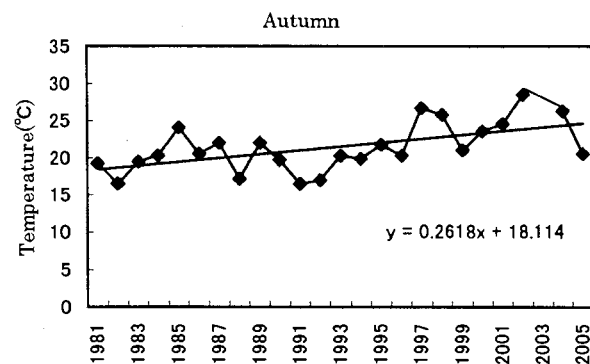
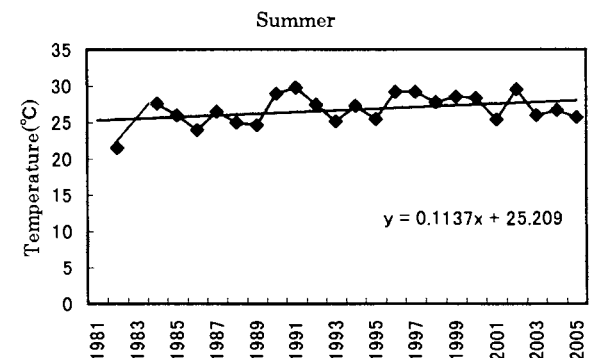
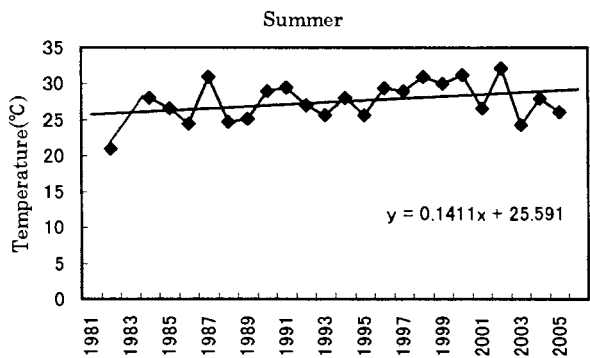
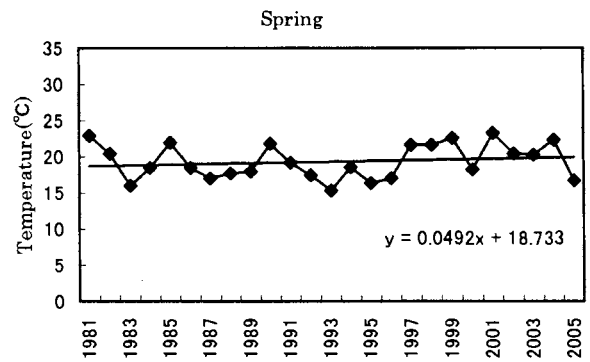
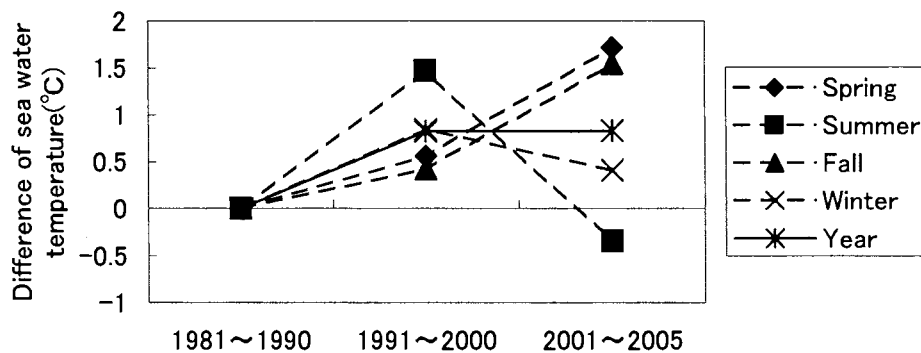
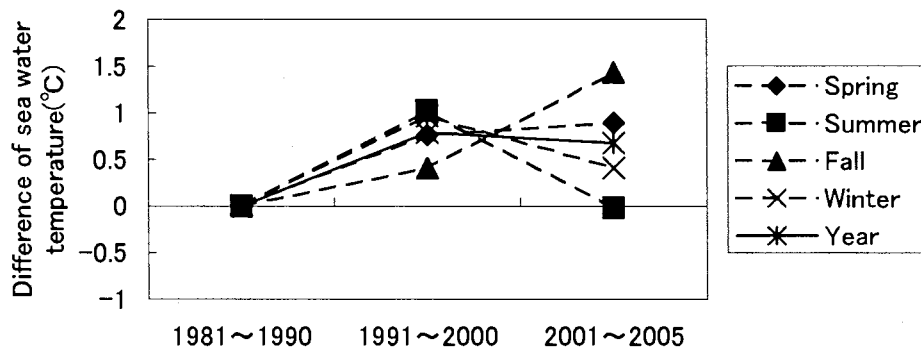


Fig.3 Changes of atmospheric temperatures at St.1 and 2 from FY 1981 to FY 2005

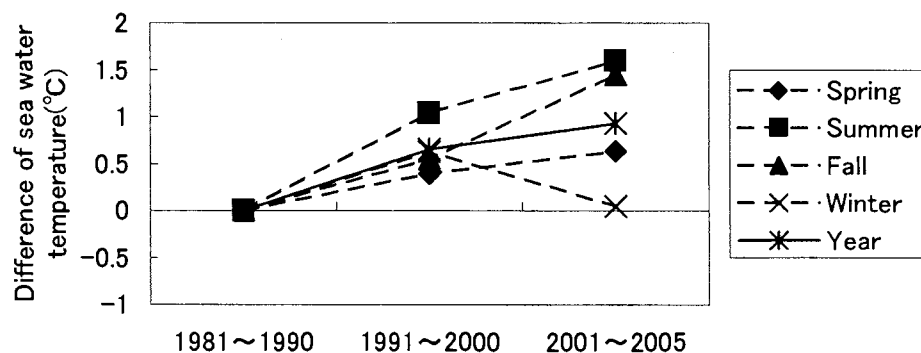
Surface
(St.1)



(St.2)



Bottom
(St.1)



(St.2)

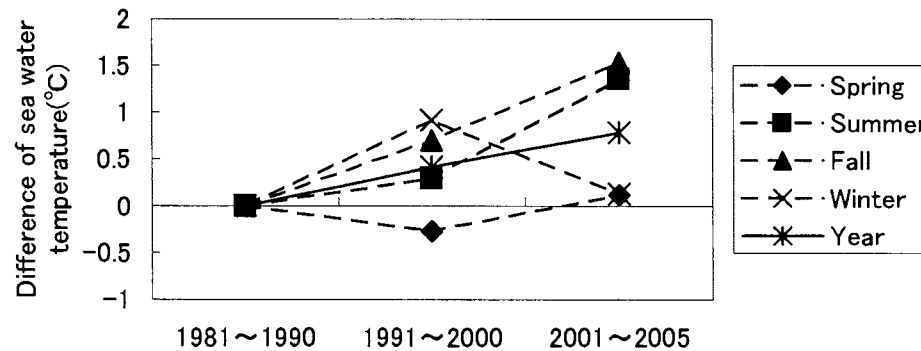


Fig. 4 Average sea water temperatures in each period (1991 to 2000 and 2001 to 2005) compared with them in 1981 to 1990

を最小限にするため、海水温度および生態系の十分な監視体制と対応策の早急な実施が必要である。また、適切な監視・対応を行うための海水温度上昇に伴う底層貧酸素化、栄養塩類の底質からの溶出等に代表される沿岸海域環境への調査研究の進展が望まれる。

V ま と め

1. 播磨灘の2地点における、1981年度から2005年度の25年間の表層および海底上1m（水深約36mおよび41m）の底層において海水温度の上昇が認められた。
2. 海水温度の上昇は過去25年間の検討結果から、表層および底層において、四季を通じて認められた。
3. 海水温度の上昇傾向は気温の上昇傾向と同時に起こっていることから、地球温暖化との関連が示唆された。

謝 辞

本調査研究は環境省から受託した「広域総合水質調査」の調査結果を利用したものである。

文 献

- 1) 環境・循環型社会白書、環境省(2007)
- 2) IPCC Working Group I Report "The Physical Science Basis" (2007)
(<http://www.ipcc-wgl.org/>)
- 3) 川原逸朗ら：有明海のタイラギ資源に及ぼすナルトビエイの影響、佐賀県有明水産振興センター研究報告, 22, 29-33 (2004)
- 4) 野原精一, 井上智美：干潟と地球温暖化, 地球環境, 245-254 (2006)
- 5) Goss-Custerd J.D., S. McGrorty and R. Kirby : Inshore birds of the soft coast and sea-level rise. In: J.J. Beukema, W.J. Wolff and J.J. W.M.

- Brouns, eds., Expected effects of climate change of marine coastal ecosystems, Kluwer, Dordrecht, 189-193 (1990)
- 6) Siefert, W. : Sea-level changes and tidal flat characteristics. In: J.J. Beukema, W.J. Wolff and J.J. W.M. Brouns, eds., Expected effects of climate change of marine coastal ecosystems, Kluwer, Dordrecht, 10-112 (1990)
 - 7) Mimura, N. and E. Kawaguchi : Responses of coastal topography to sea-level rise. Proc. of 25th ICCE, 1161-1165 (1996)
 - 8) Duddridge, J.E and M. Wainwright : Enzyme activity and kinetics in substrate-amended river sediments., Water Research, 16, 329-334 (1982)
 - 9) King, G.M. : Characterization of β -glucosidase activity in intertidal marine sediments., Applied and Environmental Microbiology, 51, 373-380 (1986)
 - 10) Mayer, L.M. : Extracellular proteolytic enzyme activity in sediments of an intertidal mudflat., Limnology and Oceanography, 34, 973-981 (1989)
 - 11) 広木幹也, 矢部徹, 野原精一, 宇田川弘勝, 佐竹潔, 古賀庸憲, 上野隆平, 河地正伸, 渡辺信 : 加水分解酵素活性を用いた日本各地の干潟底泥の有機物分解機能評価, 陸水学雑誌, 64, 113-120 (2003)
 - 12) 左山幹夫 : 沿岸域の堆積物表層における有機物の分解・無機化と栄養塩の溶出-富栄養化の進行に対して堆積物はどのように機能しているか-, NIRE(資源環境技術総合研究所)ニュース, (1998)
 - 13) 山田秀明, 桐山隆哉, 吉村 拓 : アイゴの初期生態の南北差, 水産工学, 43, 35-39 (2006)
 - 14) 上 真一 : 近年の東アジア沿岸域におけるクラゲ類の大量出現 : その原因と結果, 沿岸海洋研究, 43 (1), 13-17 (2005)

[Notes]

Evaluation of Availability of the Solar Radiation Shield in Air Temperature Measurement Survey

Masahide AIKAWA*, Takatoshi HIRAKI and Jiro EIHO

*Atmospheric Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27,
Yukihira-cho, Suma-ku, Kobe, 654-0037, Japan*

To examine the availability of the Solar Radiation Shield in the measurement of air temperature, air temperatures were measured in a thermometer shelter and the Solar Radiation Shield. A difference was observed in a monthly mean air temperature according to the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield. However when taking the measurement accuracy ($\pm 0.3^{\circ}\text{C}$) into account, the difference according to the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield was within the precision of each device. Similar mean diurnal variations of the air temperature were observed in the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield although a difference was observed in the daytime, being greatest from 14:00 to 16:00. In contrast the air temperatures measured in the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield were approximately the same at night. In conclusion, the Solar Radiation Shield can be applied in measuring the air temperature as the thermometer shelter is although both air temperatures should be compared with an air temperature measured in a forcibly ventilated shelter.

I INTRODUCTION

Air temperature is one of the most important parameters for the detection of climate change and the understanding of the urban heat island phenomenon¹⁻⁴⁾. It is preferable that air temperature be measured by using a forcibly ventilated shelter or at 1.5 m above ground by a thermometer shelter installed on the grass; however, the optimal conditions cannot always be achieved. In the current study, air temperatures were measured in different conditions by using different types of shelters to examine the appropriateness of the shelters.

II MATERIALS AND METHODS

1 Research site and period

Air temperatures were measured in May 2005 in a thermometer shelter and the Solar Radiation Shield (Davis Instruments Corp., California, USA) installed on the roof (about 25 m above ground) of a six-story building, the Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences. The thermometer shelter is made of wood, and the Solar Radiation Shield is made of UV stabilized white thermoplastic plates. Both the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield are naturally ventilated.

2 Measurement device and frequency

Air temperatures were measured by a Thermo Recorder TR-72U (T&D Corporation, Nagano, Japan). The measurement resolution was 0.1°C . The measurement accuracy was $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$. Air temperatures

大気環境部

*別刷請求先：〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27
兵庫県立健康環境科学研究所センター
大気環境部 藍川昌秀

were measured at 10-minute intervals, and hourly mean air temperatures were used for analyses.

3 Statistical analysis

The least significant difference (LSD) was used in analyses of the variations of daily mean, daily-highest, and daily-lowest air temperatures.

III RESULTS AND DISCUSSION

1 Comparison of air temperatures based on daily mean, daily-highest, and daily-lowest air temperatures

Statistical parameters of air temperatures measured in the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield are summarized in Table 1. The analysis by LSD clarified that there was no significant difference ($p > 0.05$) in daily mean, daily-highest, and daily-lowest air temperatures according to the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield.

The differences in daily mean, daily-highest, and daily-lowest air temperatures measured at the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield are shown in Fig. 1. The vertical and horizontal axes show the difference in air temperature according to the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield (thermometer shelter - Solar Radiation Shield) and the time of measurement shown by day, respectively. The mean differences in daily mean, daily-highest, and daily-lowest air temperatures were 0.14°C, 0.28, and 0.01, respectively. A larger difference was observed in daily-highest air temperature than in daily-lowest air temperature. The larger difference in daily-highest air temperature was due to a diurnal variation of

air temperature, which will be mentioned in detail later. Taking into account the measurement accuracy ($\pm 0.3^\circ\text{C}$) of the device used in the air temperature measurement, the differences in air temperatures according to the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield can be concluded to be within the precision of each device.

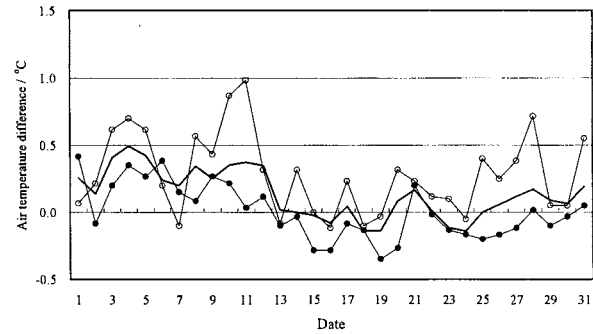


Fig. 1 Differences in daily mean, daily-highest, and daily-lowest air temperatures measured in the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield. No mark, open circle (\circ), and filled circle (\bullet) show daily mean, daily-highest, and daily-lowest, respectively.

2 Comparison of air temperatures based on diurnal variation

Mean diurnal variations of air temperatures measured in the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield are shown in Fig. 2. Similar mean diurnal variations were observed. The daily-highest and daily-lowest air temperatures appeared at 14:00 and 5:00, respectively, in both mean diurnal variations. On the other hand, some differences were also observed. The air temperature measured in the Solar Radiation Shield was approximately 0.3°C lower than that in the thermometer shelter in the daytime. The difference was largest from 14:00 to 16:00. In contrast, the air temperature measured

Table 1 Statistical parameters for air temperature measurement in thermometer shelter and the Solar Radiation Shield

		°C except N						
		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	Standard deviation	Standard error
Thermometer shelter	Daily mean	31	18.8	18.6	16.1	22.2	1.68	0.30
	Daily-highest	31	22.3	22.1	19.5	27.2	2.11	0.38
	Daily-lowest	31	15.5	15.6	11.0	18.8	2.29	0.41
Solar Radiation Shield	Daily mean	31	18.7	18.6	16.1	22.1	1.71	0.31
	Daily-highest	31	22.1	21.8	19.1	27.1	2.13	0.38
	Daily-lowest	31	15.4	15.8	11.2	19.0	2.28	0.41

in the Solar Radiation Shield was approximately the same as that in the thermometer shelter at night.

The air temperature generally is highest at about 14:00. In contrast, Dr. Miyazaki (private communication) clarified that the measurement of the highest air temperature in a thermometer shelter occurs a few hours later than in a forcibly ventilated shelter. The delay observed in the thermometer shelter is mainly due to the relatively large heat capacity of a thermometer shelter and insufficient ventilation. However, in the current study, the air temperature in the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield reached the highest level at 14:00, as mentioned above, suggesting that measurements were done properly in the current study. One of the presumed reasons for these proper measurements was the height (25 m above ground) of the research site as related to wind velocity, which increases with altitude⁵⁾. In the current study, the air temperature was measured at a site 25 m above ground, presumably providing a higher wind velocity compared with that at ground level. A high wind velocity promotes ventilation, resulting in the proper measurement of temperature.

On the other hand, it is preferable that air temperature be measured by using a forcibly ventilated shelter or at 1.5 m above ground by a thermometer shelter installed on the grass. In the current study, both air temperatures were measured on the roof of the six-story building, and the roof

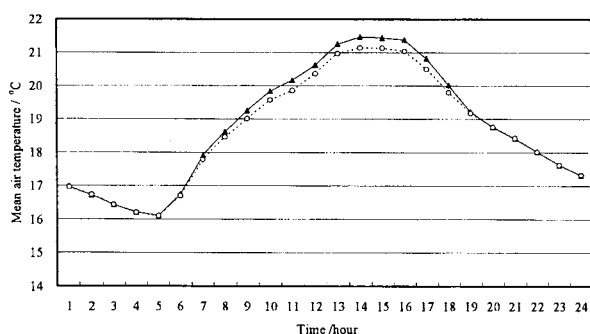


Fig. 2 Mean diurnal variations of air temperatures measured in the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield. Filled triangle (▲) and open circle (○) show thermometer shelter and the Solar Radiation Shield, respectively.

was covered with a waterproof sheet, not grass. Therefore, both air temperatures should be compared with air temperature that is measured in the optimal conditions mentioned above and then evaluated. However, our results indicate that the daily-lowest air temperature measured in the Solar Radiation Shield can be evaluated comparably with that measured in the thermometer shelter.

IV CONCLUSION

The availability of the Solar Radiation Shield in the air temperature measurement survey was examined. The findings can be summarized as follows;

1. A difference was observed in a monthly mean air temperature according to the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield although the difference was within the precision of measurement device.
2. Similar mean diurnal variations of the air temperature were observed in the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield.
3. The air temperatures measured in the thermometer shelter and the Solar Radiation Shield were approximately the same at night although a difference was observed in the daytime, being greatest from 14:00 to 16:00.
4. In conclusion, the Solar Radiation Shield can be applied in measuring the air temperature as the thermometer shelter, although both air temperatures should be compared with an air temperature measured in a forcibly ventilated shelter.

REFERENCES

- 1) Oke, T.R.: City size and the urban heat island. *Atmospheric Environment* 7, 769-779 (1973)
- 2) Jones, P.D., Groisman, P.Ya., Coughlan, M., Plummer, N., Jamason, N., Wang, W.-C., Karl, T.R.: Assessment of urbanization effects in time series of surface air temperature over land. *Nature* 347, 169-172 (1990)
- 3) Easterling, D.R., Horton, B., Jones, P.D., Peterson, T.C., Karl, T.R., Parker, D.E., Salinger, M.J., Razuvayev, V., Plummer, N.,

- Jamason, P., Folland, C.K.: Maximum and minimum temperature trends for the globe. *Science* 277, 364-367 (1997)
- 4) Gallo, K.P., Owen, T.W., Easterling, D.R., Jamason, P.F.: Temperature trends of the U.S. historical climatology network based on satellite-designated land use/land cover. *Journal of Climate* 12, 1344-1348 (1999)
- 5) Takeuchi K. *Meteorology of the Wind*, University of Tokyo Press, Tokyo, 1997, 13 pp. (in Japanese)

[ノート]

気温測定調査における簡易自然通風シェルター (Solar Radiation Shield) の利用可能性の検証

要約

気温を測定する際の簡易自然通風シェルター (Solar Radiation Shield) の利用可能性を検討するために、百葉箱と簡易自然通風シェルターを利用して気温を測定した。百葉箱及び簡易自然通風シェルターで測定された月平均気温に差が観測されたが、温度計の測定精度 (平均気温 $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$) を考慮すると、その差は測定機材の誤差範囲内の差であると考えられた。また、類似した平均日変化を示す一方で、14時から16時にかけて最大となる気温差が観測された。一方、夜間の平均気温は百葉箱及び簡易自然通風シェルターでほぼ同じ値を示した。百葉箱及び簡易自然通風シェルターのいずれについても強制通風シェルターによる結果と比較する必要はあるが、簡易自然通風シェルターは百葉箱と同様に気温測定に利用することが可能であると考えられた。

[資 料]

農薬等154種のLC/MS測定に用いる保持時間, モニターイオン等の分析情報

松岡智郁* 秋山由美 吉岡直樹

LC/MS Parameters for the Residue Analysis of 154 Pesticides

Tomofumi MATSUOKA*, Yumi AKIYAMA and Naoki YOSHIOKA

*Life Science Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29,
Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

I はじめに

ポジティブリスト制度施行により、暫定基準も含め約800成分の農薬等に基準が設定された。さらに基準が設定されていない農薬には一律基準として0.01 µg/g (0.01ppm) が適応され、これを超えて農薬が残留する食品は原則、流通禁止となった。これにより安全な食品の流通を確保するために、残留農薬検査ではより多くの成分を分析することが求められ、多成分を迅速かつ効率的に検出できる一斉分析法の需要が高まっている。我々は、GC/MS (ガスクロマトグラフ質量分析計) による多成分一斉分析法を開発し¹⁾、現在では農産物中に残留する農薬およびその代謝物の合計432種の残留試験をGC/MSで行っている。一方で、GC/MSでは測定困難な物質についてはLC/MS (液体クロマトグラフ質量分析計) による多成分一斉分析法を導入し²⁾、農薬およびその代謝物の合計154種をLC/MSで分析している³⁾。

当センターでは分析対象とする農薬等の成分の保持時間およびその特徴となるフラグメントイオンをデータベースとして蓄積し、2002年に導入された単連四重極型質量

分析計のLC/MS (QMS) で定性と定量を行っている。また、2006年にはQMSよりさらに精密質量での定性が長所である飛行時間型質量分析計のLC/MS (TOFMS) を導入し、QMSでは定性が困難な場合に、TOFMSによる確認試験が行えるよう精密質量のデータベースを作成した。

ここでは、LC/MS測定における対象農薬の保持時間、定性のためのフラグメントイオン、QMSでの検出限界値およびTOFMSでの精密質量の情報をLC/MSで農薬分析を行う場合の基礎資料として報告する。

II 方 法

1. 試薬

農薬標準品は、林純薬工業(株)、関東化学(株)、および、和光純薬工業(株)から購入した。これらをアセトン (残留農薬試験用, 和光純薬工業(株)製)、あるいは*n*-ヘキサン (残留農薬試験用, 関東化学(株)製) に溶解して、標準原液とした。LC/MS分析には、アセトニトリルで0.02~10 µg/mLの濃度に希釈して用いた。

2. 装置及び測定条件

QMSの装置はAgilent社製1100シリーズ液体クロマトグラフおよびMSD (SL) 質量分析計を、TOFMSの装置はAgilent社製1200シリーズ液体クロマトグラフおよび

健康科学部

* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究センター
健康科学部 松岡智郁

6210 Time-of-Flight質量分析計を用いた。各々の測定条件をTable 1に示した。

Table 1 Analytical conditions of LC/MS

Agilent1100 MSD(SI) ^{a)} and Agilent1200 TOF-MS ^{b)}	
Column : Ascentis C18(100 mm×3 mm i.d.,3 μm) + guard (10 mm×3 mm i.d.,3 μm),Sigma-aldrich ^{a),b)}	
Column temp : 40 °C ^{a),b)}	
Mobile phase : CH ₃ CN·10mM CH ₃ COONH ₄ (0.5 ml/min) ^{a),b)}	
Gradient : [(15:85)→(95:5)]/16 min + (95:5) 9 min ^{a),b)}	
Inj.program:Sample soln(acetonitrile) 4 μl+ Water 16 μl mix 5 times,then inject 20 μl ^{a),b)}	
Ionization and Capillary voltage : ESI (Positive, 4000 V),(Negative,3500 V) ^{a),b)}	
Nebulizer gas : 50 psi ^{a),b)}	
Drying gas : 10 L/min (350 °C) ^{a),b)}	
Fragmentor voltage : 100 V ^{a),b)} , 200 V ^{a)}	
Scan range and cycle : m/z 50-950 (0.98 cycles/sec) ^{a)} m/z 50-950 (1.00 cycles/sec) ^{b)}	
Reference mass ^{b)} : m/z=121.0509, 922.0098	
a) for QMS	
b) for TOFMS	

3. 検出限界値

クロマトグラム上の目的とするピークのシグナルがノイズ(ベースラインの揺らぎの最大と最小の幅の5分の2)の3倍(S/N=3)となる注入量を検出限界値として、各農薬について算出した。

III 結果および考察

1. LC/MS測定における農薬の分析情報

LC/MS分析では、フラグメンター電圧によりイオンの解裂の程度を制御することができる。そこで、分子イオンが得られやすい100Vと分解物イオンが得られやすい200Vの2種のフラグメンター電圧下でのデータが1回のSCAN分析で同時に取り込めるように設定した。なお、1回の注入で正イオンと負イオンの分析を同時に行うと感度が低下するため、正イオン化モード(pos)と負イオン化モード(neg)の2回の注入に分けて分析した。

LC/MSでは農産物中に残留する農薬137種および代謝物17種を分析対象とし、それらの異性体、分解物および内部標準物質を含めて169成分(pos:143成分, neg:26成分)について、保持時間及びその特徴となるフラグメントイオンの一覧をTable 2に示した。また、各農薬及び代謝物の検出限界値も合わせて示した。なお、トリアジメノールやピテルタノールのようにピークが2本出現する農薬で、異性体の単品標準試薬を入手することが難しい農薬は強度の大きい方のピークで検出限界値を算出した。また、チオファネートやピフェナゼートのよう

に分解物のピークが検出されるもの、さらにはエマメクチンやミルベメクチンのようにピークが複数検出されるものについても、強度の大きいピークで検出限界値を算出した。

2. 農産物中の残留農薬分析における検出限界

我々は農産物中の残留農薬分析で、10倍濃縮した試験溶液を調製し、そのうちの4μLをLC/MSに注入している³⁾。そこで、Table 2に示した検出限界値を農産物中の濃度に換算し、その分布をFig. 1に示した。農産物等に由来する妨害ピークと重ならなければ、154種中96種(pos:89種, neg:7種)で1ng/g、さらに48種(pos:36種, neg:12種)で3ng/gの検出を行うことができた。これらの成分に対しては、定量限界値(S/N=10に相当する量として定義される)が10ng/g(0.01ppm)を下回ることがわかった。

なお、LC/MS測定において検出限界値が3ng/g(絶対量として0.12ng)より大きくなったトリホリン等10種(pos:5種, neg:5種)のうち、デスメディファム、メトルカルブ、イプロジオン、イプロジオン代謝物、オルトフェニルフェノール、ターバシルの6種については、GC/MSによる分析で定量限界値が10ng/g未満であった⁴⁾。その他のトリホリン、バーバン、リニューロン、イソキサフルトールの4種は、LC/MS測定においては検出限界値が3.3~4.2ng/gと6ng/g(絶対量として0.24ng)を超えておらず、定量限界値についても10.4~13.9ng/gと20ng/gの定量は可能であった。

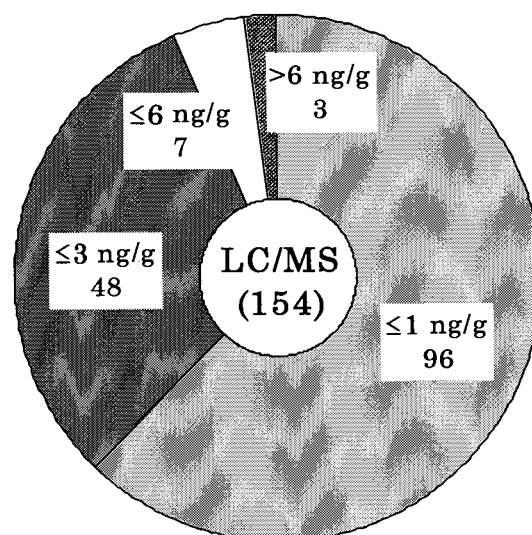


Fig. 1 Detection limits of pesticides analyzed by LC/MS For 154 peaks of pesticides including isomers, detection limits were calculated

Table 2 LC/MS analytical parameters

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)		Detection Limit (ng) ^{b)}	m/z for TOFMS
		Frag:100 V	Frag:200 V		
(Positive)					
Methamidophos	1.41	142.0 (M+H) ⁺	94.1 (125.0)	0.029	142.00862
Acephate	1.49	184.0 (M+H) ⁺	143.0 (95.1) (143.0)	0.044	184.01918
Omethoate	1.64	214.0 (M+H) ⁺	109.1 (125.0)	0.020	214.02975
Aldicarb sulfoxide	1.81	207.1 (M+H) ⁺	224.1 (89.2)	0.036	207.07979
Dinotefuran	2.01	203.1 (M+H) ⁺	(69.2) 225.2	0.040	203.11387
4,4'-Dimethyl-2-oxazolidinone	2.02	116.1 (M+H) ⁺	(133.1) 72.2 (116.1)	0.040	116.07061
Pymetrozine	2.30	218.1 (M+H) ⁺	105.1 (218.1)	0.029	218.10364
Oxydemetonmethyl	2.50	247.0 (M+H) ⁺	109.1 (269.0)	0.015	247.02222
Nitenpyram	2.79	271.1 (M+H) ⁺	(309.0) 196.1 (237.1)	0.025	271.09563
Aldoxycarb	2.91	240.1 (M+NH ₄) ⁺	(223.1) 86.1	0.031	240.10126
Oxamyl	2.91	237.1 (M+NH ₄) ⁺	72.1 (237.1)	0.056	237.10159
Monocrotophos	3.08	224.1 (M+H) ⁺	(241.2) 127.1	0.046	224.06824
Vamidothion sulfone	3.45	320.0 (M+H) ⁺	(342.0) 178.1	0.017	320.03860
Methomyl	3.56	163.1 (M+H) ⁺	88.1	0.059	163.05358
Propamocarb	4.34	189.2 (M+H) ⁺	102.1 (189.2)	0.033	189.15976
Ethiofencarb sulfoxide	4.50	242.1 (M+H) ⁺	(107.1) 107.1 (105.1)	0.031	242.08454
Thiamethoxam	4.51	292.0 (M+H) ⁺	(330.0) 181.1 (152.1)	0.042	292.02657
Methiocarb sulfoxide	5.06	242.1 (M+H) ⁺	(185.1) 185.1 (170.1)	0.030	242.08454
Trichlorfon	5.08	256.9 (M+H) ⁺	(274.0) 109.1 (274.0)	0.040	256.92986
Vamidothion	5.12	288.0 (M+H) ⁺	(146.2) 310.0 (146.1)	0.033	288.04877
Metamitron	5.35	203.1 (M+H) ⁺	175.1 (203.1)	0.025	203.09274
Clothianidin	5.38	250.0 (M+H) ⁺	(169.1) 113.1 (132.1)	0.044	250.01600
Ethiofencarb sulfone	5.48	275.1 (M+NH ₄) ⁺	(258.0) 107.1 (105.1)	0.024	275.10601
Thiacloprid-amide	5.53	271.0 (M+H) ⁺	(541.2) 126.1 (228.1)	0.025	271.04149
3OH-Carbofuran	5.60	255.1 (M+NH ₄) ⁺	(238.1) 163.1 (135.1)	0.043	255.13394
Chloridazon	5.71	222.0 (M+H) ⁺	(465.2) 222.0 (244.2)	0.018	222.04287
Carbendazim	5.74	192.1 (M+H) ⁺	160.1	0.024	192.07676
Imidacloprid	5.82	256.1 (M+H) ⁺	(294.0) 175.2 (273.0)	0.036	256.05958
Dimethoate	6.15	230.0 (M+H) ⁺	(252.0) 125.1	0.045	230.00690
Amitraz met.	6.18	163.1 (M+H) ⁺	107.1 (163.1)	0.114	163.12298
IS(Ethylphenylurea)	6.20	165.1 (M+H) ⁺	(329.1) 94.1 (105.1)		165.10224
Acetamiprid	6.35	223.1 (M+H) ⁺	(260.8) 126.1 (245.1)	0.027	223.07450
Tricyclazole	6.53	190.0 (M+H) ⁺	(228.0) (190.1) 163.1	0.018	190.04335
Thiabendazole	6.58	202.0 (M+H) ⁺	(202.1) 175.1	0.036	202.04335
Desmedipham	6.70	182.1 (M-119+H) ⁺	(65.1) 121.3	0.167	182.08117
Tepraloxymid	6.75	342.1 (M+H) ⁺	250.1 (342.1)	0.053	342.14667
Methiocarb sulfone	6.92	275.1 (M+NH ₄) ⁺	(258.1) 122.1 (201.0)	0.040	275.10600
Thiophanate deg.	7.06	206.1 (M+H) ⁺	134.1 (160.0)		206.09241
Cymoxanil	7.07	199.1 (M+H) ⁺	128.1	0.069	199.08257
Thiacloprid	7.35	253.0 (M+H) ⁺	(527.0) 126.1 (275.0)	0.031	253.03092
Naphtylacetamide	7.38	186.1 (M+H) ⁺	(371.2) 141.1 (186.1)	0.016	186.09134
Tebuthiuron	7.49	229.1 (M+H) ⁺	172.2 (229.2)	0.017	229.11176
Aldicarb	7.64	116.1 (M-75+H) ⁺	213.1	0.056	116.05285
Dimethirimol	7.78	210.2 (M+H) ⁺	(210.4) 140.2	0.033	210.16009
Oxadixyl	8.11	279.1 (M+H) ⁺	(296.2) 133.1 (219.1)	0.031	279.13394
Imazamethabenz methyl	8.18	289.2 (M+H) ⁺	289.2 (229.2)	0.013	289.15467
Isouron	8.24	212.1 (M+H) ⁺	(445.2) (234.1) 167.1	0.021	212.13936
Metolcarb	8.36	166.1 (M+H) ⁺	109.1 (94.1) (109.0)	0.129	166.08626
Azamethiphos	8.53	325.0 (M+H) ⁺	112.0 (139.0)	0.031	324.98094
Thiophanatemethyl	8.75	343.1 (M+H) ⁺	(365.0) 151.2 (365.0)	0.057	343.05293
Imazalil met.	8.93	257.0 (M+H) ⁺	(257.0) 69.2	0.031	257.02430

Table 2 LC/MS analytical parameters (continued)

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)			Detection Limit (ng) ^{b)}	m/z for TOFMS
		Frag:100 V		Frag:200 V		
Thiodicarb	9.00	355.1 (M+H) ⁺	377.0	(377.0) (393.0)	0.018	355.05630
Propoxur	9.10	210.1 (M+H) ⁺	168.0	(65.1) (111.0)	0.040	210.11247
Bendiocarb	9.15	224.1 (M+H) ⁺	(167.1)	81.2 (109.1)	0.031	224.09174
Carbofuran	9.26	222.1 (M+H) ⁺	(244.0)	123.1 (165.1)	0.022	222.11247
Methabenzthiazuron	9.33	222.1 (M+H) ⁺		(165.2) 150.0	0.017	222.06956
Chlortoluron	9.46	213.1 (M+H) ⁺		72.2 (213.1)	0.017	213.07892
Xylcarb	9.57	180.1 (M+H) ⁺	(123.1)	108.1 (123.1)	0.038	180.10191
Carbaryl	9.61	202.1 (M+H) ⁺	(145.1)	155.0 (145.1)	0.043	202.08626
Mepanipiry met.	9.65	244.2 (M+H) ⁺		226.2 (244.2)	0.013	244.14444
XMC	9.78	180.1 (M+H) ⁺	(123.1)	108.1 (123.1)	0.051	180.10191
Probenazole	9.87	224.0 (M+H) ⁺	241.1	(246.1)	0.036	224.03759
Ethiofencarb	9.97	226.1 (M+H) ⁺	(164.1)	107.1 (105.1)	0.036	226.08963
Isoproturon	9.98	207.1 (M+H) ⁺		72.2 (165.2)	0.015	207.14919
Diuron	10.08	233.0 (M+H) ⁺		72.2 (233.0)	0.061	233.02430
Triforine1	10.19	389.9 (M-43+H) ⁺	(456.9)	(389.9) 456.9	0.133	389.92626
Triforine2	10.33	389.9 (M-43+H) ⁺	(456.9)	(389.9) 456.9		389.92626
Ferimzone (Z+E)	10.46	255.2 (M+H) ⁺		(255.2) 132.1	0.017	255.16043
Isoprocarb	10.47	194.1 (M+H) ⁺	(211.2)	95.1 (105.1)	0.040	194.11756
Thiophanate	10.78	371.1 (M+H) ⁺	(393.0)	151.0 (393.0)	0.021	371.08423
Inabenfide	10.79	339.1 (M+H) ⁺	(377.0)	321.1 (339.1)	0.018	339.08949
Naphthalophos	11.17	350.1 (M+H) ⁺		214.0 (276.0)	0.018	350.07880
Triadimenol1	11.29	296.1 (M+H) ⁺		70.2	0.087	296.11603
Triadimenol2	11.51	296.1 (M+H) ⁺		70.2		296.11603
Clethodim	11.30	360.1 (M+H) ⁺	(382.1)	268.1 (360.1)	0.047	360.13947
Fluridone	11.46	330.1 (M+H) ⁺		330.1	0.018	330.11003
Phenmedipham	11.46	318.1 (M+NH4) ⁺	(301.1)	136.1 (168.1)	0.013	318.14484
Ethiprole	11.49	397.0 (M+H) ⁺		351.0 (397.0)	0.095	396.98990
Cycloxydim	11.55	326.2 (M+H) ⁺	(280.1)	280.1 (326.2)	0.025	326.17844
Methiocarb	11.56	226.1 (M+H) ⁺	(169.1)	122.1 (121.1)	0.022	226.08963
Fenobucarb	11.61	208.1 (M+H) ⁺	(230.1)	95.1 (105.1)	0.083	208.13321
Linuron	11.74	249.0 (M+H) ⁺		161.0 (182.0)	0.125	249.01921
Chloroxuron	11.84	291.1 (M+H) ⁺		291.1 (313.0)	0.015	291.08949
Promecarb	11.97	208.1 (M+H) ⁺	(151.2)	109.2 (91.2)	0.031	208.13321
Cumyluron	12.07	303.1 (M+H) ⁺	(341.0)	125.1 (185.1)	0.018	303.12587
Azoxystrobin	12.08	404.1 (M+H) ⁺	(442.0)	372.0 (344.1)	0.012	404.12410
Butoxydim	12.17	400.2 (M+H) ⁺	(422.0)	(400.2) 354.2	0.036	400.24824
Tiamulin (fumarate)	12.30	494.3 (M+H) ⁺		494.3 (192.2)	0.011	494.32986
Triadimefon	12.32	294.1 (M+H) ⁺		197.1 (294.1)	0.042	294.10038
Dymron	12.38	269.2 (M+H) ⁺		151.1 (269.2)	0.009	269.16484
Tralkoxydim	12.53	330.2 (M+H) ⁺		284.2 (138.2)	0.024	330.20637
Methyldymuron	12.55	269.2 (M+H) ⁺		151.2 (134.1)	0.009	269.16484
Bifenazate	12.74	301.2 (M+H) ⁺	(623.2)	198.2 (323.2)	0.019	301.15467
Imazalil	12.75	297.1 (M+H) ⁺		(297.1) 109.1	0.019	297.05560
Mepanipiry	12.81	224.1 (M+H) ⁺		224.1	0.016	224.11823
Methoxyfenozide	12.81	313.2 (M-56+H) ⁺	(369.2)	149.1	0.027	313.15467
Barban	12.92	275.0 (M+NH4) ⁺	(258.0)	143.2 (178.0)	0.167	275.03486
Bitertanol1	12.95	338.2 (M+H) ⁺	(360.2)	70.2 (360.2)	0.063	338.18631
Bitertanol2	13.21	338.2 (M+H) ⁺	(360.2)	70.2 (360.2)		338.18631
Benzobicyclon	12.96	447.0 (M+H) ⁺		(447.0) 469.0	0.048	447.04861
Sethoxydim	13.05	328.2 (M+H) ⁺		178.1 (282.2)	0.027	328.19409
Chromafenozide	13.06	395.2 (M+H) ⁺	(175.1)	175.1	0.025	395.23292
Fenoxycarb	13.14	302.1 (M+H) ⁺		324.0 (256.0)	0.047	302.13869

Table 2 LC/MS analytical parameters (continued)

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)				Detection Limit (ng) ^{b)}	m/z for TOFMS	
		Frag:100 V		Frag:200 V				
Oxpoconazole formyl	13.35	339.1	(M+H) ⁺	(361.1)	143.1	(361.1)	0.063	339.14700
Prochloraz	13.49	376.0	(M+H) ⁺	(378.0)	310.0	(225.0)	0.013	376.03809
Tebufozozide	13.61	297.2	(M-56+H) ⁺	(353.2)	133.1	(105.2)	0.011	297.15976
Pyrazoxyfen	13.68	403.1	(M+H) ⁺	(425.0)	403.1	(425.0)	0.022	403.06108
Fenoxanil	13.85	329.1	(M+H) ⁺	(367.0)	86.2	(189.0)	0.080	329.08181
Ethoxyquin	13.89	218.2	(M+H) ⁺		(218.2)	190.1	0.095	218.15394
Carpropamid	14.08	334.1	(M+H) ⁺	(336.0)	139.2		0.087	334.05268
Bensulide	14.22	398.1	(M+H) ⁺	356.0	(105.1)	(158.1)	0.054	398.06779
IS(Triphenylphosphate)	14.28	327.1	(M+H) ⁺	(344.1)	327.1	(349.1)		327.07808
Zoxamide	14.36	336.0	(M+H) ⁺		187.0		0.042	336.03194
Fentrazamide	14.51	197.0	(M-153+H) ⁺	(350.1)	115.1	(372.1)	0.019	197.02247
Pyraclostrobin	14.53	388.1	(M+H) ⁺		163.1		0.011	388.10586
Clofentezine	14.68	303.0	(M+H) ⁺	(305.0)	130.1	(102.0)	0.105	303.01988
Oxadiargyl	14.71	358.1	(M+NH ₄) ⁺	(341.1)	341.1	(363.1)	0.105	358.07198
Pencycuron	14.79	329.1	(M+H) ⁺		(329.1)	125.1	0.013	329.14152
Pyrazolynate	14.82	439.0	(M+H) ⁺	(441.0)	439.0	(173.0)	0.004	439.02806
Phoxim	14.85	299.1	(M+H) ⁺	129.1	(105.1)	(97.1)	0.017	299.06138
Bifenazate met.	14.98	299.1	(M+H) ⁺	(619.2)	213.1	(321.2)		299.13902
Terbucarb(MBPMC)	15.03	222.1	(M-56+H) ⁺	(278.0)	109.0		0.018	222.14886
Benzofenap	15.10	431.1	(M+H) ⁺		(431.1)	453.0	0.017	431.09238
EmamectinB1b FA	15.50	908.5	(M+Na) ⁺		908.5			908.47668
EmamectinB1b AM	15.53 ~	858.5	(M+H) ⁺	(880.2)	858.5			858.49982
Propaquizafop	15.66	444.1	(M+H) ⁺		299.0	(444.1)	0.029	444.13208
Fenpyroximate Z	15.92	422.2	(M+H) ⁺		366.1	(422.2)	0.011	422.20744
Furathiocarb	16.05	383.2	(M+H) ⁺		195.1	(167.1)	0.009	383.16352
Oxaziclomefone	16.09	376.1	(M+H) ⁺		190.1	(161.1)	0.009	376.08656
Temephos	16.15	484.0	(M+NH ₄) ⁺		467.0		0.014	484.02355
EmamectinB1b MFA	16.29	922.5	(M+Na) ⁺		922.5			922.49233
EmamectinB1a FA	16.32	922.5	(M+Na) ⁺		922.5		0.100	922.49233
Hexythiazox	16.60	353.1	(M+H) ⁺	(375.0)	228.1	(168.1)	0.100	353.10851
Fenpyroximate E	16.80	422.2	(M+H) ⁺		366.1	(422.2)	0.011	422.20744
Emamectin (benzoate) B _{1b}	17.29	872.5	(M+H) ⁺		872.5			872.51547
EmamectinB1a AM	17.30	872.5	(M+H) ⁺	(894.5)	872.5	(894.5)	0.043	872.51547
Cycloprothrin	17.32	499.1	(M+NH ₄) ⁺		208.1	(504.0)	0.011	499.11859
EmamectinB1a MFA	17.59	896.5	(M-18+H) ⁺	(816.5)	936.5	(896.5)	0.030	896.51547
AbamectinB1a	17.60	895.5	(M+Na) ⁺	305.2	(895.5)	(549.3)	0.025	895.48143
MilbemectinA3	17.62	511.3	(M-18+H) ⁺	(493.3)	(511.3)	493.3		511.30542
Amitraz	17.84	294.2	(M+H) ⁺		163.2	(122.1)	0.005	294.19648
MilbemectinA4	18.54	525.3	(M-18+H) ⁺	(507.3)	(525.3)	507.3	0.029	525.32107
Emamectin (benzoate) B _{1a}	19.26	886.5	(M+H) ⁺		886.5		0.053	886.53112
(Negative)								
Flonicamid	4.74	228.0	(M-H) ⁻		————	————	0.071	228.03902
IS(Ethylphenylurea)	6.21	223.1	(M+CH ₃ COO) ⁻	163.1	————	————		223.10881
Alloxydim-Na	6.99	322.2	(M-Na) ⁻		222.1	(264.1)	0.111	322.16599
Imibenconazole M(desbenzyl)	8.05	269.0	(M-H) ⁻		(269.0)	186.0	0.100	269.00024
Terbacil	8.21	215.1	(M-H) ⁻		159.0	(215.0)	0.308	215.05928
Fluometuron	9.66	231.1	(M-H) ⁻		(231.1)	186.1	0.048	231.07507
Siduron1	11.30	291.2	(M+CH ₃ COO) ⁻	(231.2)	92.2	(231.2)	0.018	291.17141
Siduron2	11.60	291.2	(M+CH ₃ COO) ⁻	(231.2)	92.2	(231.2)		291.17141
o-Phenylphenol	11.44	169.1	(M-H) ⁻		169.1	(141.1)	1.000	169.06588
Isoxaflutole	12.05	358.0	(M-H) ⁻		358.0		0.143	358.03663
Tiadinil	12.11	266.0	(M-H) ⁻		71.1		0.021	266.01603

Table 2 LC/MS analytical parameters (continued)

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)		Detection Limit (ng) ^{b)}	m/z for TOFMS
		Frag:100 V	Frag:200 V		
Diflubenzuron	12.79	309.0 (M-H) ⁺	345.0	0.074	309.02478
Oryzarin	12.96	345.1 (M-H) ⁺	345.1	0.017	345.08743
Iprodione	13.02	243.0 (M-85-H) ⁺	(243.0) 160.0	0.476	242.97335
Cyazofamid	13.75	216.0 (M-107-H) ⁺	216.0	0.024	216.03339
Triflumuron	13.97	357.0 (M-H) ⁺	176.1 (357.0)	0.083	357.02592
Hexaflumuron	14.62	459.0 (M-H) ⁺	(439.0) 276.0 (439.0)	0.029	458.97434
Iprodione met.	14.73	328.0 (M-H) ⁺	(141.1) 141.1	0.125	328.02612
Teflubenzuron	14.91	379.0 (M-H) ⁺	(359.0) 196.0 (339.0)	0.080	378.96697
Novaluron	15.06	491.0 (M-H) ⁺	(471.1) 471.0 (491.0)	0.080	491.00503
Imibenconazole	15.26	409.0 (M-H) ⁺	(411.0) 251.0 (157.0)	0.105	408.98537
Lufenuron	15.69	509.0 (M-H) ⁺	326.0	0.065	508.97114
Fluazuron	15.86	504.0 (M-H) ⁺	(541.9) 504.0 (321.0)	0.014	503.99466
Chlorfenapyr	15.93	346.9 (M-58-H) ⁺	(348.9) 348.9 (346.9)	0.016	346.92039
Flufenoxuron	16.27	487.0 (M-H) ⁺	(467.0) 304.0 (487.0)	0.118	487.02896
Chlorfluazuron	16.72	538.0 (M-H) ⁺	(518.0) 518.0 (355.0)	0.100	537.95569

a) Deg.means degradation product and met. Means metabolite.

b) As detection limits were calculated for the main peak among several peaks detected from each pesticide standard, they were vacant for the peaks except for main.

3. 精密質量を用いたTOFMSによる確認試験

一般に TOFMSはQMSより分解能が高く、精密質量を得ることができる。今回、我々が使用したLC/TOFMSは相対質量誤差 5 ppm未満の精度で精密質量の測定が可能である⁵⁾。すなわち、分子量が200の物質では質量誤差は0.001未満となり、小数点以下3桁目までは、測定値が理論値とほぼ一致する。そこで、抽出するイオンクロマトグラムの質量電荷比 (m/z) の幅を狭く (通常 0.02) 設定すると、目的とする成分を高い選択性で検出することができた。

したがって、分析対象とする成分について、モニターイオンの精密質量を計算して、Table 2の右端に示したようにデータベースを作成した。その結果、農産物由来の妨害成分と重なった時にはTOFMSで抽出するm/z幅を狭くすることで、妨害成分と分離して確認することができた。また同様に目的成分が極低濃度でQMSでは定性が困難な時にも、TOFMSで目的とする成分のm/z幅を狭くして抽出することで、S/N比が上がり、より正確に定性を行うことができた。Fig. 2にTOFMSによる確認試験を行った事例を示した。メロンより殺虫剤のClothianidin (分子式: C₆H₈ClN₅O₂S, 分子量: 249.68) が定量限界未満の濃度で検出された事例であるが、Fig. 2-Aおよび2-Bに示したようにQMSでは定性が困難であった。そこで、TOFMSを用いて抽出するイオンクロマトグラムの幅をm/z=250.01~250.03と狭く設定したところ、Fig. 2-Cおよび2-Dに示したようにClothianidinを高い選択性で検出することができた。また、我々のQMS測定条件では、MethomylやCymoxanilなどは100

Vのフラグメンター電圧での2本しかモニターイオンが得られず、200Vではモニターイオンが得られない。そのため、より正確に定性を行うためにはTOFMSによる確認試験が有効な手段であった。

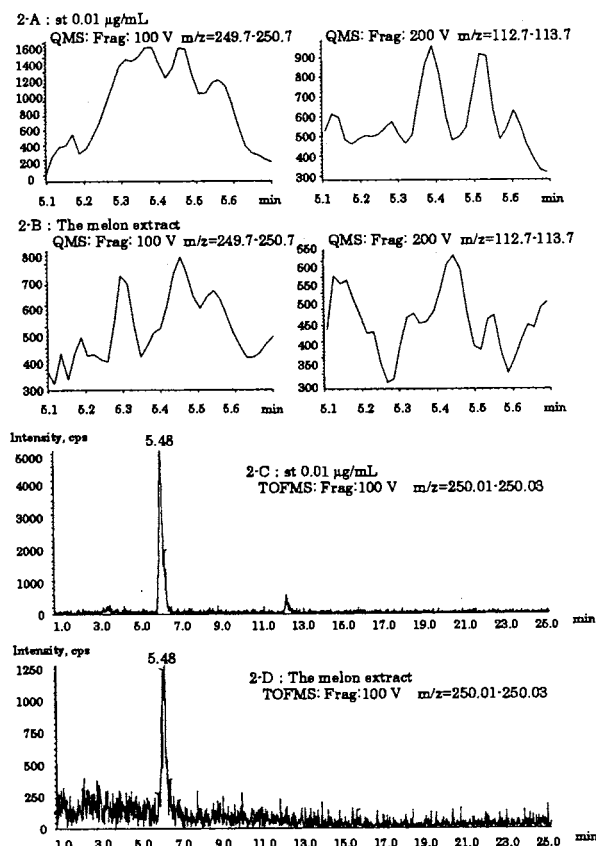


Fig. 2 Extract ion chromatograms obtained from standard mixture and the melon extract. 2-A and 2-C: analysed by QMS; 2-B and 2-D: analysed by TOFMS

IV ま と め

農産物中に残留する農薬のLC/MSを用いる多成分一斉分析では、QMSおよびTOFMSを使用している。両LC/MSの測定条件を設定し、異性体、分解物を含めた169成分のデータベースを作成した。これら成分の保持時間、特徴的なフラグメントイオン、検出限界値および精密質量の一覧を資料として報告する。

文 献

- 1) 秋山由美, 矢野美穂, 三橋隆夫, 武田信幸, 辻正彦: 固相抽出法を用いた農産物中残留農薬のGC/MSによる多成分一斉分析, 食衛誌, 37, 351-362 (1996)
- 2) 秋山由美, 吉岡直樹, 市橋啓子: 農産物中の残留農

薬調査—ポジティブリスト制に向けて, 食衛誌, 46, 305-318 (2005)

- 3) 秋山由美: GC/MS, LC/MSを用いた農産物中の残留農薬の一斉分析法, 今月の農薬 1月号, 50-55 (2007)
- 4) 秋山由美, 松岡智郁, 吉岡直樹: 農薬等432種のGC/MS測定に用いる保持時間, モニターイオン等の分析情報, 兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要第4号 103-114 (2007)
- 5) Ferrer, I., Garcia-Reyes, J. F., Mezuca, M., Thurman, E. J. and Fernandez-Alba, A. R.: Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1082, 81-90 (2005)

農薬等432種のGC/MS測定に用いる保持時間, モニターイオン等の分析情報

秋山由美* 松岡智郁 吉岡直樹

GC/MS Parameters for the Residue Analysis of 432 Pesticides

Yumi AKIYAMA,* Tomofumi MATSUOKA and Naoki YOSHIOKA

*Life Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health
and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

I はじめに

食品中に残留する農薬の検査に、多成分を同時に検出できる一斉分析法を導入することは、検査を迅速化し、安全な食品の流通を確保するなど、食品衛生行政上極めて有効である。我々は、1995年以来GC/MSによる多成分一斉分析法を開発し¹⁾、残留農薬検査に活用している²⁾。分析対象とする農薬の数を年々増加して³⁾、400種を超える農薬およびその代謝物の試験検査をGC/MSによる一斉分析で実施し⁴⁾、2006年5月に施行されたポジティブリスト制度に対応している。

定量確認を迅速に行うためには、分析対象とする農薬等の成分の保持時間およびマススペクトルのデータベースの蓄積が必要である。ここでは、保持時間、採択した2種類のフラグメントイオンおよび検出限界値の情報をGC/MSで農薬分析を行う場合の基礎資料として報告する。

II 方法

1. 試薬

農薬標準品は、林純薬工業(株)、関東化学(株)および和光純薬工業(株)から購入した。これらをアセトン(残留農薬試験用, 和光純薬工業(株)製)あるいは*n*-ヘキサン(残留農薬試験用, 関東化学(株)製)に溶解して、標準原液とした。GC/MS分析には、*n*-ヘキサン-アセトン(4:1)混液で0.01~5 µg/mLの濃度に希釈して用いた。

2. 装置および測定条件

装置: Agilent社製6890N型ガスクロマトグラフおよび5973inert型質量分析計

カラム: HP-5MS (Agilent社製, 30m×0.25mmi.d., 膜厚0.25µm)+ガードカラム (0.5m×0.25mmi.d., 未コーティング)

カラム温度: 70°C(3 min)→30°C/min→160°C(0 min)→2.5°C/min→200°C(0 min)→8°C/min→300°C(5.5 min)

注入口温度: 250°C, インターフェイス温度: 280°C

イオンソース温度: 230°C, 四重極温度: 150°C

キャリアガス(He)圧力プログラム: 40psi(1 min)→16psi定圧モード(注入時流量5.4mL/min, 分析時流量1.7→0.7mL/min, リテンションタイムロッキングの手法により, 分析時圧力を適宜修正する。)

健康科学部

* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所センター

健康科学部 秋山由美

注入量：4 μ L (スプリットレス注入法),
 パージオフ時間：1 min, イオン化電圧：70eV
 スキャン範囲：m/z 50-550
 スキャン速度：2.9cycles/sec

3. 検出限界値の算出法

厚生労働省残留農薬分析法検討班の手法に従い、クロマトグラム上の目的とするピークのシグナルがノイズ(ベースラインの揺らぎの最大と最小の幅の5分の2)の3倍($S/N=3$)となる注入量を検出限界値として、各農薬について算出した。

III 結果および考察

1. 農薬のGC/MS分析情報

GC/MS分析では、各農薬のマススペクトルから強度の大きい特徴的なフラグメントイオン2種を選び、それらのイオンクロマトグラムでのピークの有無および相対強度比により、目的とする成分の検出を行うことが多い。そこで、我々が分析対象としている農薬399種および代謝物33種を測定するために、異性体、GC/MS分析中の分解物および内部標準物質を含む515成分について保持時間および採択したフラグメントイオンの一覧をTable 1に示した。また、各農薬および代謝物の検出限界値も合わせて示した。なお、異性体の混合標準を用いているものおよび分解物のピークが検出されるものについては、複数のピークのうち、最も強度の大きいピークで算出した。

2. リテンションタイムロッキング

これは、キャリアガスのカラム圧力と指標物質の保持時間との関係をコンピューターに保存することにより、カラムやガードカラムを交換してカラム長さが変動しても、各農薬の保持時間が変動しないように、適切なカラム圧力を算出させるAgilent社が開発した手法である。この手法を導入するためには、キャリアガスを定圧モードで制御することが望ましく、カラム温度の昇温に伴ってカラム圧力が上昇する定流量モードに比べて、保持時間が長くなる欠点がある。しかし、保持時間を一定に保つことは、多成分を対象としたデータベースの修正が不要になり、一斉分析の結果を迅速に得られる利点がある。

Agilent社が設定した測定条件によるデータベースも市販されているが、我々は保持時間の短いアルジカルブやオキサミルの分解物を検出するためにカラムの初期温度(70 $^{\circ}$ C)でのホールド時間を2分から3分に延長し、一段目の昇温速度を25 $^{\circ}$ C/minから30 $^{\circ}$ C/minに、二段目

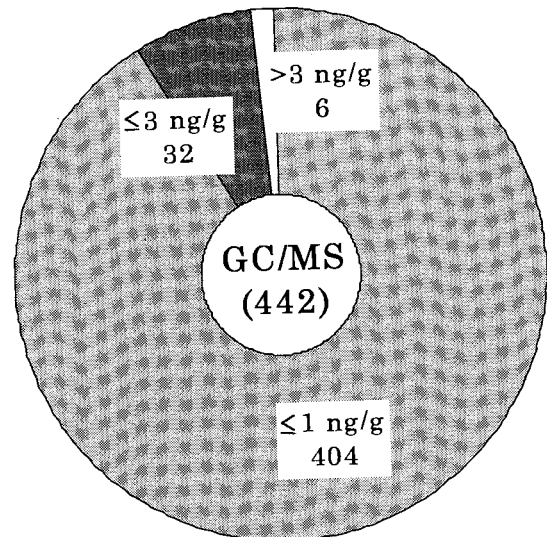


Fig. 1 Detection limits of pesticides analyzed by GC/MS

For 442 peaks of pesticides including isomers, detection limits were calculated

の昇温速度を3 $^{\circ}$ C/minから2.5 $^{\circ}$ C/minに変更した測定条件を採用した。そして、新規規制物質を含めて分析対象としている515成分について、保持時間とマススペクトルの独自のデータベースを作成し、活用している。

3. 農産物中の残留農薬分析における検出限界

農産物中の残留農薬分析では、我々は5倍濃縮した試験溶液を調製し、4 μ LをGC/MSに注入している⁴⁾。そこで、Table 1に示した検出限界値を農産物中の濃度に換算し、その分布をFig. 1に示した。農産物等に由来する妨害ピークと重ならなければ、442成分中404成分については1 ng/g、436成分については3 ng/gの検出が可能であった。これらの成分に対しては、 $S/N=10$ に相当する量として定義される定量限界値が10 ng/g (0.01 ppm)を満たすことがわかった。

なお、検出限界値が3 ng/g (絶対量として0.06 ng)より大きくなったアセタミプリド等6成分は、LC/MSで高感度に検出でき、10 ng/gの定量が可能であった⁵⁾。また、これまでに分析対象とした農産物の中では、脂質含量の高いアボカド、含硫成分を多く含むニンニク、およびショウガでは妨害成分が多く、定量限界値が2~3倍大きくなる項目があった。これらに対しては、LC/MSでの定量も補完的に行い、より高感度かつ正確なデータの提供に努めた。

Table 1 GC/MS analytical parameters

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)		Detection Limit (ng) ^{b)}
		Target	Qualifier	
Aldicarb deg.(nitrile)	2.65	115.1	100.0	0.017
Oxamyl deg.(nitrile)	3.44	98.1	72.0	0.160
Pencycuron deg.1 (Phenylisocyanate)	3.84	119.0	91.1	
Pencycuron deg.2 (Aniline)	4.11	93.1	66.1	
Metaldehyde	4.88	89.1	117.0	0.002
DCIP	4.98	121.0	77.0	0.009
Phenmedipham deg.	5.06	133.0	104.1	0.003
Methomyl oxim	5.07	105.0	58.1	0.013
Metolcarb deg.(phenol)	5.14	108.0	79.1	
Aldicarb deg.(oxim)	5.17	86.0	133.1	
XMC deg.(phenol)	5.94	122.1	107.1	
Phoxim deg.	5.95	103.0	130.0	0.020
Oxpoconazole met. (4,4-Dimethyl-2-oxazolidinone)	5.95	100.0	56.1	0.004
Clofentezine deg. (2-Chlorobenzonitrile)	6.02	137.0	102.1	0.008
Propoxur deg.(phenol)	6.02	110.0	152.1	
Xylylcarb deg.(phenol)	6.13	122.1	107.1	
Isoprocarb deg.(phenol)	6.18	121.0	136.0	
Methamidophos	6.45	94.0	141.0	0.009
Dichlorvos	6.60	109.0	185.0	0.002
Iprodione met. deg.1 (3,5-Dichlorophenylisocyanate)	6.67	186.9	124.0	
Bendiocarb deg.(phenol)	6.77	151.0	126.0	
Fenobucarb deg.(phenol)	6.77	121.0	150.0	
Allidochlor	6.92	56.1	132.0	0.013
Carbofuran deg.(phenol)	7.01	164.1	149.0	
Swep deg.(3,4-Dichlorophenylisocyanate)	7.09	186.9	124.0	
Flonicamid met.(TFNA-AM)	7.14	190.0	174.0	0.004
Imibenconazole met.2 (2,4-Dichloroaniline)	7.30	161.0	163.0	0.005
Iprodione met. deg.2 (3-Isopropylimidazoliden-2,4-dione)	7.44	127.0	100.9	
Dichlobenil	7.45	170.9	172.9	0.001
Nicotine	7.46	84.0	133.0	0.008
EPTC	7.49	128.1	189.1	0.003
Dichlormid	7.50	172.0	124.1	0.007
Diphenyl	7.76	154.1	76.0	0.001
Propamocarb	7.79	58.1	188.1	0.048
Iprodione met. deg.3 (3,5-Dichloroaniline)	7.95	160.9	126.0	
Ethiofencarb deg.(phenol)	8.12	107.1	168.0	
Mevinphos	8.17	127.0	192.0	0.003
Butylate	8.18	146.1	156.1	0.002
Acephate	8.27	136.0	94.0	0.018
Propham	8.45	93.1	179.1	0.006
Nitrapyrin	8.49	193.9	124.0	0.004
Etridiazole	8.50	210.9	182.9	0.004
Pebulate	8.50	128.1	203.1	0.005
Metolcarb	8.52	108.0	107.1	0.002
Folpet met.(Phthalimide)	8.54	147.0	104.0	0.006
Captafol,Captan met.(Tetrahydrophthalimide)	8.77	151.1	79.1	0.007
Methacrifos	9.01	125.0	180.0	0.003
Thiocyclam	9.01	71.1	135.0	0.011
Carbaryl deg.(phenol)	9.12	115.0	144.1	
Chloroneb	9.12	191.0	206.0	0.002
Terbucarb deg.(phenol)	9.14	205.2	220.2	
o-Phenylphenol	9.24	170.1	141.1	0.002
Oxamyl deg.(oxim)	9.43	72.0	162.0	
Isoprocarb	9.50	121.1	136.1	0.002

Table 1 GC/MS analytical parameters (continued)

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)		Detection Limit (ng) ^{b)}
		Target	Qualifier	
Molinate	9.51	126.1	187.1	0.002
Methiocarb deg.(phenol)	9.59	168.0	153.0	
XMC	9.79	122.1	107.0	0.003
Methomyl	9.87	105.0	88.0	0.052
MCPA-methyl	9.87	214.0	141.0	0.005
Diethyl toluamide	10.08	119.0	190.1	0.002
Xylylcarb(MPMC)	10.34	122.1	107.0	0.005
Omethoate	10.35	156.0	110.0	0.020
Flonicamid	10.51	174.0	146.0	0.005
Fenobucarb	10.54	121.1	150.1	0.003
Tecnazene	10.55	202.9	214.9	0.005
Propoxur	10.59	110.0	152.1	0.003
Propachlor	10.62	120.1	176.1	0.005
Demeton-S-methyl	10.74	88.0	60.0	0.004
Diphenylamine	10.76	169.1	168.1	0.002
Chlorethoxyfos	10.79	153.0	300.9	0.005
MCPA-ethyl	10.84	228.1	155.0	0.002
Ethoprophos	10.96	157.9	200.0	0.006
Cycloate	10.96	154.1	83.1	0.003
Phenmedipham	11.03	167.0	135.0	
Chlorpropham	11.21	127.0	213.0	0.005
Dichlofluanid met.	11.36	200.0	92.0	0.008
Ethalfuralin	11.38	276.0	316.0	0.008
Naled	11.39	109.0	145.0	0.008
Methabenzthiazuron	11.41	164.0	136.0	0.019
Diclotophos	11.63	127.0	193.0	0.008
Bendiocarb	11.64	151.0	166.0	0.002
Salithion	11.66	216.0	183.0	0.002
Trifluralin	11.68	306.1	264.0	0.004
Benfluralin	11.77	292.0	264.0	0.001
Pencycuron	11.80	125.0	180.0	0.010
Monocrotophos	11.87	127.0	192.0	0.010
Cadusafos	11.93	158.9	157.9	0.010
Promecarb	12.00	135.1	150.1	0.006
Di-allate1	12.04	234.1	86.1	0.002
Phorate	12.05	75.0	260.0	0.008
2,4-D-ethyl	12.11	175.0	248.0	0.004
a-BHC	12.23	180.9	216.9	0.008
Di-allate2	12.35	234.1	86.1	
Thiometon	12.45	88.0	125.0	0.007
Desmedipham deg.	12.48	181.0	122.1	0.044
Hexachlorobenzene	12.52	283.8	248.8	0.001
2,4-D-isopropyl	12.58	175.0	262.0	0.005
Dicloran	12.67	205.9	175.9	0.012
2,6-Diisopropyl-naphthalene	12.72	197.1	212.2	0.002
Dimethoate	12.76	87.0	125.0	0.010
Ethoxyquin	12.86	202.1	174.1	0.017
Simazine	12.95	201.1	186.0	0.006
Furilazole	12.99	220.0	262.0	0.005
Carbofuran	13.04	164.1	149.0	0.003
Chlorbufam	13.07	223.0	127.0	0.018
Swep	13.09	186.9	221.0	0.017
Monolinuron	13.15	214.0	126.0	0.016
Atrazine	13.18	200.1	215.1	0.002

Table 1 GC/MS analytical parameters (continued)

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)		Detection Limit (ng) ^{b)}
		Target	Qualifier	
Dimethipin	13.18	54.1	118.0	0.009
Clomazone	13.28	125.0	204.1	0.004
b-BHC	13.30	180.9	216.9	0.011
Propazine	13.37	214.1	229.1	0.005
Triflumizole met.	13.38	167.0	201.0	0.007
Tolyfluanid met.	13.43	106.1	214.0	0.009
g-BHC	13.50	180.9	216.9	0.008
Dioxathion deg.	13.60	97.0	270.0	
Quintozene	13.72	236.8	294.8	0.012
Cyanophos	13.77	243.0	109.0	0.005
Diazinon oxon	13.78	273.1	137.0	0.009
Terbufos	13.78	231.0	153.0	0.004
Terbutylazine	13.78	214.1	173.0	0.003
Pyroquilon	13.86	173.1	130.1	0.008
Fonofos	13.89	109.0	246.0	0.004
Propetamphos	13.89	138.0	194.0	0.006
Propyzamide	13.93	172.9	255.0	0.010
Pyrimethanil	14.11	198.1	77.0	0.003
Diazinon	14.38	179.1	137.1	0.006
Phosphamidon E	14.44	127.0	264.1	
Disulfoton	14.51	88.0	186.0	0.004
Parathion-methyl oxon	14.55	109.0	230.0	0.011
Prohydrojasmon1	14.58	153.1	83.1	0.005
d-BHC	14.59	180.9	216.9	0.008
Terbacil	14.68	161.0	117.0	0.006
Chlorothalonil	14.79	265.9	263.9	0.004
Phenothiol	14.79	244.0	155.0	0.007
Tri-allate	14.91	86.1	268.0	0.003
Tefluthrin	14.94	177.0	197.0	0.002
Isazofos	14.97	161.0	119.0	0.011
Etrimfos	15.07	292.1	181.1	0.003
Prohydrojasmon2	15.26	153.1	83.1	
Iprobenfos	15.33	204.0	91.1	0.005
Benoxacor	15.42	120.0	259.0	0.005
Formothion	15.52	125.0	93.0	0.012
MCPB-ethyl	15.53	87.1	115.1	0.004
Ethiofencarb	15.57	107.0	168.0	0.008
Pirimicarb	15.61	166.1	238.1	0.002
Benfuresate	15.92	163.1	256.1	0.001
Propanil	16.09	161.0	217.0	0.009
Dichlofenthion	16.11	279.0	222.9	0.003
Fenitrothion oxon	16.15	244.0	109.0	0.011
Dimethenamid	16.21	154.1	230.0	0.005
Phosphamidon Z	16.22	127.0	264.1	0.014
Metribuzin	16.22	198.1	144.0	0.005
Bromobutide	16.25	119.1	232.1	0.004
Acetochlor	16.51	146.1	223.1	0.015
Parathion-methyl	16.56	263.0	125.0	0.005
Chlorpyrifos-methyl	16.57	285.9	125.0	0.003
Vinclozolin	16.60	212.0	285.0	0.010
Terbucarb(MBPMC)	16.61	205.1	220.2	0.002
Dipropyl isocinchomeronate	16.62	165.1	192.0	0.008
Acibenzolar-S-methyl	16.71	182.0	135.0	0.009
Simeconazole	16.79	121.0	211.1	0.018

Table 1 GC/MS analytical parameters (continued)

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)		Detection Limit (ng) ^{b)}
		Target	Qualifier	
Simetryn	16.79	213.1	170.1	0.008
Tolclofos-methyl	16.79	265.0	125.0	0.001
Heptachlor	16.80	271.8	100.0	0.006
Carbaryl	16.81	144.0	115.1	0.009
Malathion oxon	16.81	127.0	195.0	0.011
Alachlor	16.99	160.1	188.1	0.007
Ametryn	17.08	227.1	212.1	0.006
Cinmethylin	17.24	105.1	123.1	0.008
Tridiphane	17.26	173.0	187.0	0.014
Prometryn	17.30	241.1	184.1	0.005
Parathion oxon	17.31	109.0	275.0	0.009
Fenclorophos	17.31	284.9	125.0	0.002
Metalaxyl (Mefenoxam)	17.32	206.1	249.1	0.009
Fenthion oxon	17.42	262.1	247.0	0.002
Demeton-S-methyl sulfone	17.62	169.0	109.0	0.006
Naphthylacetamide	17.68	141.1	185.1	0.007
Terbutryn	17.96	226.1	185.1	0.008
Dithiopyr	18.04	354.0	306.0	0.003
Methiocarb	18.06	168.0	153.0	0.004
Fenitrothion	18.07	277.0	125.0	0.007
Quinoclamine	18.20	207.0	172.0	0.008
Esprocarb	18.25	222.1	162.1	0.004
Pirimiphos-methyl	18.28	290.0	276.0	0.004
Bromacil	18.28	204.9	189.9	0.009
Ethofumesate	18.29	207.0	161.0	0.006
Dichlofluanid	18.44	123.0	226.0	0.004
Dimethylvinphos E	18.46	295.0	109.0	0.002
Aldrin	18.60	262.8	292.9	0.007
Thiobencarb	18.62	100.1	257.0	0.004
Oxamyl	18.76	72.0	162.1	
Malathion	18.80	173.1	125.0	0.008
Metolachlor	18.95	162.1	238.1	0.005
Chlorpyrifos oxon	19.08	269.9	298.0	0.004
Diethofencarb	19.13	267.1	225.1	0.008
Fenthion	19.15	278.0	125.0	0.004
Dimethylvinphos Z	19.22	295.0	109.0	0.004
Dicofol met. (4,4'-Dichlorobenzophenone)	19.29	139.0	250.0	0.005
Chlorpyrifos	19.29	196.9	313.9	0.008
Fenpropimorph	19.29	128.1	303.2	0.004
Thiazopyr	19.31	327.1	363.1	0.007
Parathion	19.33	291.0	109.0	0.008
Cyanazine	19.41	225.1	198.1	0.016
Triadimefon	19.47	208.0	181.0	0.014
Chlorthal-dimethyl	19.52	300.9	331.9	0.003
Carbetamide	19.63	119.0	93.0	0.016
Isocarbophos	19.68	136.0	121.0	0.015
Flufenacet	19.77	151.0	210.9	0.004
Isofenphos oxon	19.84	229.0	201.0	0.004
Phthalide	19.90	242.9	271.9	0.004
Nitrothal-isopropyl	19.91	236.1	194.0	0.009
Tetraconazole	19.94	336.1	171.0	0.012
N-(2-ethylhexyl)-8,9,10-trinorborn-5-ene-2,3-dicarboximide1	20.12	164.1	111.0	0.006
Bromophos	20.19	330.9	125.0	0.003
Fosthiazate1	20.24	195.0	283.0	0.028

Table 1 GC/MS analytical parameters (continued)

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)		Detection Limit (ng) ^{b)}
		Target	Qualifier	
Thiamethoxam	20.24	182.0	212.0	0.028
Diphenamid	20.33	167.1	239.1	0.003
Fosthiazate2	20.39	195.0	283.0	
Cyprodinil	20.70	224.1	210.1	0.003
N-(2-ethylhexyl)-8,9,10-trinorborn-5-ene-2,3-dicarboximide2	20.79	164.1	111.0	
Heptachlorepoxyde(exo)	20.92	352.8	236.8	0.004
Methoprene1	20.99	73.1	111.0	
Oxychlordane	21.04	386.8	184.9	0.006
Chlorfenvinphos1	21.16	267.0	322.9	
Pendimethalin	21.17	252.1	281.1	0.012
Thiabendazole	21.19	201.0	174.0	0.013
Heptachlorepoxyde(endo)	21.20	182.9	217.0	0.013
Penconazole	21.21	248.1	159.0	0.011
Dimethametryn	21.26	212.1	255.1	0.003
Ethychlozate	21.35	165.0	238.0	0.017
Pyrifenox1	21.42	262.0	186.9	0.009
Tolyfluanid	21.46	137.0	237.9	0.005
Captan	21.47	79.0	149.0	0.020
Methyldymuron	21.57	107.0	119.1	0.005
Chlozolate	21.60	188.0	259.0	0.012
Prothiofos oxon	21.62	293.0	161.9	0.010
Allethrin1	21.73	123.1	136.0	
Dimepiperate	21.76	119.1	145.0	0.012
Allethrin2	21.79	123.1	136.0	
Chlorfenvinphos2	21.81	266.9	323.0	0.011
Isofenphos	21.83	213.0	255.0	0.011
Diclocymet1	21.85	277.1	173.0	
Folpet	21.87	259.9	104.0	0.009
Quinalphos	21.88	146.0	157.0	0.007
Triadimenol1	21.92	112.0	168.1	
Mecarbam	21.95	131.0	159.0	0.015
Phenthoate	21.95	273.9	246.0	0.005
Allethrin3 (Bioallethrin1)	22.02	123.1	136.0	
Allethrin4 (Bioallethrin2)	22.06	123.1	136.0	0.025
Fipronil	22.08	366.9	212.9	0.007
Chlorbenside	22.12	125.0	268.0	0.004
Procymidone	22.23	283.0	96.0	0.005
Triadimenol2	22.34	112.0	168.1	0.015
trans-Chlordane	22.37	372.8	374.8	0.002
Methoprene2	22.52	73.1	111.0	0.019
Methidathion	22.59	145.0	85.1	0.006
Triflumizole	22.60	278.0	206.0	0.014
Ferimzone Z	22.62	239.1	254.1	0.011
Bromophos-ethyl	22.84	358.9	302.8	0.003
Diclocymet2	22.85	277.1	173.0	0.013
Paclobutrazol	22.87	236.0	125.0	0.011
Propaphos	22.91	220.0	304.1	0.010
Pyrifenox2	22.91	262.0	186.9	
a-Endosulfan	22.96	240.8	194.9	0.018
Fenothiocarb	23.03	72.1	160.1	0.003
Vamidothion	23.09	87.1	145.0	0.015
Trichlamide	23.10	148.0	121.0	0.010
cis-Chlordane	23.20	372.8	374.8	0.001
Disulfoton sulfone	23.27	213.0	153.0	0.003

Table 1 GC/MS analytical parameters (continued)

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)		Detection Limit (ng) ^{b)}
		Target	Qualifier	
Tetrachlorvinphos	23.29	328.9	109.0	0.006
Mepanipyrim	23.42	222.1	77.1	0.004
trans-Nonachlor	23.46	408.8	406.8	0.001
Imazamethabenz-methyl deg.	23.52	144.0	187.1	
Flutriafol	23.53	123.0	164.0	0.011
Butachlor	23.54	176.1	160.1	0.004
Chlorfenson (CPCBS)	23.69	174.9	111.0	0.004
Napropamide	23.81	128.1	271.1	0.010
Hexaconazole	23.88	214.0	83.1	0.012
Butamifos	23.92	286.1	200.0	0.008
2,4-D-butoxyethyl	23.93	220.0	320.1	0.009
Fenamiphos	23.97	303.1	154.0	0.011
Tricyclazole	24.00	189.0	162.0	0.012
Prothiofos	24.12	266.9	309.0	0.005
Imazalil	24.13	215.0	172.9	0.050
Pymetrozine	24.15	98.0	113.1	0.051
Flutolanil	24.17	173.0	145.0	0.004
Isoxathion oxon	24.25	161.0	105.0	0.027
Isoprothiolane	24.26	162.0	290.0	0.007
Dieldrin	24.26	79.1	262.9	0.006
Profenofos	24.29	207.9	337.0	0.011
Uniconazole P	24.39	234.0	70.0	0.015
p,p'-DDE	24.40	246.0	317.9	0.003
Metominostrobin E	24.42	191.1	238.1	0.015
Fludioxonil	24.48	248.0	127.0	0.015
Pretilachlor	24.51	238.1	162.1	0.013
Tribuphos(DEF)	24.52	169.0	201.9	0.010
Aramite1	24.62	135.1	185.0	
Carboxin	24.70	143.0	235.1	0.008
Imazalil met.	24.74	82.1	174.9	0.018
Aramite2	24.75	135.1	185.0	
Imibenconazole met.(desbenzyl)	24.81	83.1	235.0	0.041
Oxadiazon	24.81	174.9	258.0	0.006
Diclobutrazol	24.83	270.0	159.0	0.015
Myclobutanil	24.85	179.0	150.0	0.021
Metamitron	24.89	104.0	202.1	0.020
Iprovalicarb1	24.90	119.1	134.1	0.016
F1 amprop-methyl	24.95	105.0	77.1	0.002
Buprofezin	24.95	172.1	305.1	0.013
Azaconazole	24.96	217.0	173.0	0.008
Aramite3	24.98	185.0	319.1	
Flusilazole	25.02	233.0	206.0	0.005
Sulprofos oxon	25.07	306.1	140.0	0.012
Oxyfluorfen	25.09	252.0	361.0	0.010
Imazamethabenz-methyl1	25.18	144.0	245.0	0.073
Endrin	25.19	262.8	280.9	0.009
Pyrethrins1 (Cinerin I)	25.21	123.1	150.1	
Bupirimate	25.21	273.1	208.1	0.007
Thifluzamide	25.27	194.0	166.0	0.006
Nitrofen	25.28	283.0	202.0	0.008
Cyproconazole1	25.30	222.0	139.0	
Kresoxim-methyl	25.30	116.0	206.1	0.006
Metominostrobin Z	25.31	191.1	196.1	0.010
Cyproconazole2	25.34	222.0	139.0	0.015

Table 1 GC/MS analytical parameters (continued)

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)		Detection Limit (ng) ^{b)}
		Target	Qualifier	
Iprovalicarb2	25.35	119.1	134.1	
Isoxathion	25.39	105.0	177.0	0.019
Imazamethabenz-methyl2	25.42	144.0	245.0	
Aramite4	25.43	185.0	319.1	0.022
1,1-Dichloro-2,2-bis(4-ethylphenyl)ethane	25.58	223.1	165.0	0.003
b-Endosulfan	25.62	194.9	236.8	0.012
Carpropamid	25.63	139.0	103.1	0.020
Cyflufenamid	25.67	91.1	412.1	0.010
Fenoxanil1	25.67	189.0	139.1	0.012
Chlorfenapyr	25.70	59.1	247.0	0.003
Fenoxanil2	25.71	189.0	139.1	
Fluazifop-butyl	25.79	282.1	383.2	0.004
Chlorobenzilate	25.83	251.0	139.0	0.005
Fensulfothion	26.03	293.0	308.0	0.012
p,p'-DDD	26.14	235.0	165.0	0.002
Flufenpyr-ethyl	26.16	408.1	335.0	0.002
cis-Nonachlor	26.19	408.8	406.8	0.003
o,p'-DDT	26.24	235.0	165.1	0.003
Oxadixyl	26.37	163.1	132.1	0.017
Pyriminobac-methyl Z	26.38	302.1	256.0	0.003
Ethion	26.46	231.0	153.0	0.003
Pyrethrins2 (Jasmolin I)	26.67	123.1	164.2	
Clethodim	26.73	164.0	205.1	0.015
Mepronil	26.75	119.0	269.1	0.006
Imiprothrin1	26.80	123.1	151.0	
Sulprofos	26.83	322.0	156.0	0.006
Triazophos	26.94	161.0	257.0	0.018
Azamethiphos	26.99	215.0	109.0	0.039
Chlornitrofen	26.99	316.9	236.0	0.007
Imiprothrin2	27.01	123.1	151.0	0.012
Isoxadifen-ethyl	27.12	204.1	165.0	0.006
Carbophenothion	27.13	157.0	342.0	0.009
Pyrethrins3 (Pyrethrin I)	27.16	123.1	162.1	0.060
Fluacrypyrim	27.18	145.0	189.0	0.017
Famphur	27.18	218.0	125.0	0.004
Tepraloxydim	27.20	164.0	109.0	0.011
Benalaxyl	27.23	148.1	206.1	0.004
Edifenphos	27.26	173.0	310.0	0.010
Endosulfan sulfate	27.26	228.9	386.8	0.014
Quinoxifen	27.26	237.0	307.0	0.006
Diofenolan1	27.29	186.0	300.1	0.050
Cyanofenphos	27.31	157.0	169.0	0.007
Lenacil	27.39	153.0	136.0	0.006
Carfentrazone-ethyl	27.41	312.0	330.0	0.008
Propiconazole1	27.44	172.9	259.0	
Norflurazon	27.47	303.0	145.0	0.013
p,p'-DDT	27.49	235.0	165.0	0.004
Diofenolan2	27.53	186.0	300.1	
Chloridazon	27.54	221.0	77.1	0.030
Propiconazole2	27.65	172.9	259.0	0.050
EPN oxon	27.73	141.0	306.0	0.008
Clodinafop-propargyl	27.73	238.0	349.0	0.008
Trifloxystrobin	27.81	116.0	131.1	0.006
Hexazinone	27.91	171.1	83.1	0.007

Table 1 GC/MS analytical parameters (continued)

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)		Detection Limit (ng) ^{b)}
		Target	Qualifier	
Pyraflufen-ethyl	27.91	412.0	349.0	0.004
Pyriminobac-methyl E	27.92	302.1	256.0	0.002
Tebuconazole	27.98	250.0	125.0	0.020
Thenylchlor	28.00	127.0	288.1	0.005
Captafol	28.16	79.1	151.0	0.019
Diclofop-methyl	28.16	253.0	340.0	0.012
Propargite1	28.22	135.1	173.1	0.015
IS (Triphenylphosphate)	28.25	326.1	170.0	
Propargite2	28.26	135.1	173.1	
Diflufenican	28.30	266.0	394.1	0.008
Resmethrin1	28.31	123.1	171.1	
Oxycarboxin	28.40	175.0	267.0	0.009
Piperonyl butoxide	28.42	176.1	149.0	0.005
Resmethrin2 (Bioresmethrin)	28.50	123.1	171.1	0.018
Epoxiconazole	28.59	192.0	138.0	0.013
Zoxamide	28.60	186.9	258.0	0.006
Mefenpyr-diethyl	28.83	253.0	299.0	0.006
Pyributicarb	28.86	165.0	108.0	0.005
Chlomethoxyfen	28.89	313.0	266.0	0.021
Iprodione	28.96	314.0	186.9	0.007
Acetamiprid	29.04	152.0	126.0	0.133
Pyridaphenthion	29.06	340.0	199.1	0.012
Phosmet	29.07	160.0	316.9	0.003
Tetramethrin1	29.16	164.0	123.1	
Bromopropylate	29.19	340.9	182.9	0.007
EPN	29.20	157.0	169.0	0.015
Fenoxycarb	29.25	116.1	186.0	0.016
Picolinafen	29.34	238.0	376.1	0.006
Tetramethrin2	29.36	164.0	123.1	0.003
Dicofol	29.37	139.0	251.0	0.020
Bifenazate	29.39	300.2	199.0	0.019
Bifenthrin	29.39	181.1	165.1	0.001
Cloquintocet-mexyl	29.40	192.0	163.0	0.010
Piperophos	29.41	320.1	140.1	0.007
Methoxychlor	29.42	227.1	212.1	0.002
Fenpropathrin	29.56	97.1	181.0	0.014
Etoazole	29.62	141.0	204.1	0.015
Tebufenpyrad	29.63	318.1	171.0	0.004
Indanofan	29.65	174.0	159.0	0.007
Metoconazole	29.65	125.0	250.1	0.018
Fenamidone	29.67	238.1	268.1	0.010
Bifenox	29.76	341.0	173.0	0.011
Anilofos	29.81	226.0	125.0	0.010
Clomeprop	29.84	120.1	288.1	0.008
Tetradifon	29.95	158.9	111.0	0.008
Phenothrin1	29.99	123.1	183.1	
Iprodione met.	30.02	329.0	127.0	0.023
Furametpyr	30.10	157.0	298.1	0.008
Phenothrin2	30.15	123.1	183.1	0.005
Triticonazole	30.15	235.1	299.1	0.011
Orysastrobin	30.16	116.1	205.1	0.007
Furathiocarb	30.19	163.1	194.0	0.005
Azinphos-methyl	30.24	160.0	132.0	0.010
Phosalone	30.27	182.0	367.0	0.007

Table 1 GC/MS analytical parameters (continued)

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)		Detection Limit (ng) ^{b)}
		Target	Qualifier	
Pentoxazone	30.31	285.0	70.1	0.004
Pyrethrins4 (Cinerin II)	30.39	107.1	121.0	
Orysastrobins(5Z)	30.41	116.1	205.1	0.007
Mirex	30.43	271.8	236.8	0.002
Pyriproxyfen	30.44	136.1	226.1	0.004
Mefenacet	30.56	192.0	120.1	0.008
Cyhalofop-butyl	30.60	256.1	229.0	0.015
Cyhalothrin1	30.65	181.1	197.0	
Tralkoxydim	30.68	137.0	283.2	0.008
Furametpyr met.	30.79	157.0	296.1	0.011
Naproanilide	30.94	291.1	171.1	0.008
Cyhalothrin2	30.96	181.1	197.0	0.009
Fenarimol	31.01	139.0	251.0	0.009
Lactofen	31.06	344.0	223.0	0.010
Tebufenozide	31.21	133.0	296.1	0.632
Pyrazophos	31.26	221.1	373.1	0.013
Pyrifthalid	31.27	318.0	274.1	0.005
Acrinathrin	31.28	181.0	208.1	0.015
Pyrethrins5 (Jasmolin II)	31.31	107.1	135.1	
Pyrethrins6 (Pyrethrin II)	31.37	133.1	161.0	
Pyraclofos	31.43	360.0	194.0	0.013
Fenoxaprop-ethyl	31.55	288.0	361.0	0.014
Cycloxydim	31.64	178.0	101.0	0.017
Bitertanol1	31.83	170.0	112.0	0.018
Bitertanol2	31.98	170.0	112.0	
Spirodiclofen	31.98	71.1	312.0	0.004
Permethrin1	32.00	183.1	163.0	
Pyridaben	32.14	147.1	117.1	0.007
Permethrin2	32.16	183.1	163.0	0.006
Fluquinconazole	32.26	340.0	108.0	0.008
Oxabetrinil	32.27	138.0	98.1	0.057
Oxpoconazole fumarate	32.30	294.2	208.1	0.006
Coumaphos	32.31	362.0	226.0	0.016
Prochloraz	32.36	180.1	308.0	0.053
Dioxathion	32.45	271.0	152.9	0.011
Etobenzanide	32.58	179.0	121.0	0.027
Butafenacil	32.60	331.0	180.0	0.012
Cafenstrole	32.77	100.1	188.1	0.005
Fenbuconazole	32.79	129.0	198.1	0.018
Cyfluthrin1	32.86	163.0	206.0	
Cyfluthrin2	32.97	163.0	206.0	0.029
Cyfluthrin3	33.10	163.0	206.0	
Cyfluthrin4	33.15	163.0	206.0	
Cypermethrin1	33.29	181.0	163.0	
Boscalid	33.31	140.0	342.0	0.007
Halfenprox	33.33	262.9	183.1	0.009
Cypermethrin2	33.41	181.0	163.0	0.036
Quizalofop-ethyl	33.48	299.0	372.1	0.014
Cypermethrin3	33.53	181.0	163.0	
Cypermethrin4	33.58	181.0	163.0	
Flucythrinate1	33.58	199.1	157.0	0.008
Etofenprox	33.67	163.1	135.0	0.008
Pyridalyl	33.76	204.0	164.0	0.011
Flucythrinate2	33.87	199.1	157.0	

Table 1 GC/MS analytical parameters (continued)

Pesticide ^{a)}	Retention Time (min)	Monitor Ion (m/z)		Detection Limit (ng) ^{b)}
		Target	Qualifier	
Silafluofen	33.88	179.1	286.1	0.014
Fluridone	34.15	328.1	154.6	0.018
Thiacloprid	34.21	101.0	126.0	0.200
Pyrimidifen	34.28	184.0	186.0	0.008
Fenvalerate1	34.53	125.0	167.0	0.022
Acetamiprid	34.56	354.1	287.1	0.133
Fluvalinate1	34.82	250.0	181.0	
Fenvalerate2	34.83	125.0	167.0	
Fluvalinate2	34.89	250.0	181.0	0.012
Difenoconazole1	35.11	323.0	265.0	
Difenoconazole2	35.20	323.0	265.0	0.025
Pyrazoxyfen	35.33	104.9	172.8	1.000
Deltamethrin1	35.40	181.0	252.9	
Indoxacarb	35.55	150.0	218.0	0.022
Deltamethrin2 (Tralomethrin)	35.59	181.0	252.9	0.022
Flumiclorac-pentyl	35.85	423.1	308.0	0.012
Azoxystrobin	36.05	344.1	388.1	0.019
Famoxadone	36.08	330.1	196.1	0.027
Dimethomorph1	36.10	301.0	387.1	0.017
Tolfenpyrad	36.18	383.1	171.0	0.014
Tecloftalam imide	36.41	393.9	213.9	0.011
Butoxydim	36.43	310.1	353.2	0.010
Dimethomorph2	36.60	301.0	387.1	
Imibenconazole	36.99	125.0	253.0	0.049
Cinidon-ethyl	37.31	330.0	358.1	0.012
Fluthiacet-methyl1	37.66	403.0	56.1	0.034
Propaquizafop	38.33	299.0	443.1	0.030
Fluthiacet-methyl2	38.42	403.0	232.0	
Quizalofop-P-tefuryl	39.76	285.0	428.1	0.053

a) Deg. means degradation product and met. means metabolite.

b) As detection limits were calculated for the main peak among several peaks detected from each pesticide standard, they were vacant for the peaks except for main.

IV まとめ

GC/MSを使用して農産物中に残留する農薬およびその代謝物の合計432種を一斉分析している。定量確認を迅速に行うために、異性体、分解物を含めた農薬等515成分のデータベースを作成した。保持時間、特徴的なフラグメントイオンおよび検出限界値の一覧を資料として報告する。

文 献

- 1) 秋山由美, 矢野美穂, 三橋隆夫, 武田信幸, 辻正彦: 固相抽出法を用いた農産物中残留農薬のGC/MSによる多成分一斉分析, 食衛誌, **37**, 351-362 (1996)
- 2) Akiyama, Y., Yoshioka, N., Tsuji, M.: Pesticide Residues in Agricultural Products Monitored in Hyogo Prefecture, Japan, FYs 1995-1999, J. AOAC Int., **85**, 692-703 (2002)
- 3) 秋山由美, 吉岡直樹, 市橋啓子: 農産物中の残留農薬調査-ポジティブリスト制に向けて, 食衛誌, **46**, 305-318 (2005)
- 4) 秋山由美: GC/MS、LC/MSを用いた農産物中の残留農薬の一斉分析法, 今月の農業, **51**, 50-55 (2007)
- 5) 松岡智郁, 秋山由美, 吉岡直樹: 農薬等154種のLC/MS測定に用いる保持時間, モニターイオン等の分析情報, 兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要第4号, 97-103 (2007)

兵庫県民の残留農薬の一日摂取量調査研究 —マーケットバスケット方式による2003～2006年度の結果—

吉岡直樹* 秋山由美 松岡智郁

Daily Intake of Pesticide Residues in Hyogo Prefecture
—in Fiscal Years 2003-2006 by Market Basket Method—

Naoki YOSHIOKA*, Yumi AKIYAMA and Tomofumi MATSUOKA

*Life Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health
and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

I はじめに

県民が食品に残留する農薬を、日常の食事を通してどの程度摂取しているかを調査する目的で、2003年度から2006年度にかけて1年に1回、計4回の摂取量調査を行った。調査は、食品摂取統計に基づいて全食品を市場で購入し、それぞれ一般的な調理法で調理した後、食品群毎にまとめて有害物質等を分析するというマーケットバスケット方式で行った。この方法で調製した試料について、約400種類の農薬を測定し、検出された農薬の濃度から、食物経由の農薬一日摂取量を推定した。

また、その値を慢性毒性の指標である一日摂取許容量(ADI)および急性毒性の指標である急性参照値(ARfD)と比較したので報告する。

II 方法

1. 試料

厚生労働省の国民健康・栄養調査¹⁻⁴⁾では、全食品を

健康科学部

*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所センター

健康科学部 吉岡直樹

100種類に分類し、1人あたりの食品類別一日摂取量が集計されている。そこで、100食品類の中からそれぞれ1～3種ずつ選んだ食品を、神戸市内の量販店で購入した。表1には、年度毎に調査対象とした食品の数を示した。

表1 調査に用いた食品数と測定農薬数

年 度	対象食品数	測定農薬数
2003	202	326
2004	185	398
2005	174	409
2006	174	457

各食品は、皮むき・加水などの前処理後、国民健康・栄養調査の地域ブロック別摂取量表の近畿Iブロック(兵庫県・大阪府・京都府)の一日摂取量に従って計量し、加熱等通常の調理方法により処理した後、I群～XIII群の13群に分けてホモジナイズし、分析用試料とした。なお、XIV群の飲料水は兵庫県立健康環境科学研究所センター(兵庫庁舎)の水道水を用いた。

一例として2006年度調査の各食品群の内容を表2に示した。

2. 調査対象農薬

調査年度毎の測定農薬数を表1に示し、また2006年度

調査で測定した農薬名を表3に示した。

3. 試薬および試液

農薬標準品は、和光純薬工業(株)、林純薬工業(株)、関東化学(株)、Dr.Ehrenstorfer社、Riedel-de Haën社製の残留農薬試験用の農薬標準品を用いた。ODSおよびPSAミニカラムは、IST社製ISOLUTEを用いた。アセトニトリル、アセトンおよびn-ヘキサンは和光純薬工業(株)製残留農薬・PCB試験用、その他は試薬特級を用いた。HPLC移動相として、和光純薬工業(株)製高速液体クロマトグラフ用アセトニトリルを用いた。

4. 装置および分析条件

4.1 GC/MS (ガスクロマトグラフ質量分析計) による測定条件

装置 : Agilent 6890GC + 5973 inert MS
 カラム : HP-5MS (30 m×0.25 mm i.d., 膜厚0.25 μm) (未コーティングのキャピラリーカラム(0.25 mm i.d.) 約50 cmをプレカラムとして接続)
 カラム温度 : 70°C (3 min)→30°C/min→160°C (0 min)→2.5°C/min→200°C (0 min)→8°C/min→300°C (5 min) , 注入口温度 : 250°C,
 インターフェイス温度 : 280°C, イオンソース温度 : 230°C, 四重極温度 : 150°C
 キャリアガス(He)圧力プログラム : 40 psi(1 min)→17 psi 定圧モード
 (リテンションタイムロッキングを活用, 注入時流量 5.4 mL/min, 分析時流量1.8→0.7 mL/min)
 注入量 : 4 μL (スプリットレス注入法), パージオフ時間 : 1 min, イオン化電圧 : 70 eV
 スキャン範囲及びスキャン速度 : m/z 50-550 (2.9

cycles/sec)

4.2 LC/MS (液体クロマトグラフ質量分析計) による測定条件

装置 : Agilent 1100 MSD (SL)
 カラム : Spelco Ascentis C18 (100 mm×3.0 mm, 3 μm) + guard (10 mm, 3.0 mm, 3 μm)
 移動相 : アセトニトリル-10mM酢酸アンモニウム [(15:85)→(95:5)] / 16 min + (95:5) 9 min
 流量 : 0.5 mL/min, カラム温度 : 40°C,
 注入量 : 試験溶液 (アセトニトリル) 4 μL + 水16 μL
 インジェクションループ内でピストンを動かし混合 (5回) 後, 注入
 イオン化法およびキャピラリー電圧 : ESI (Positive, 4000 V), (Negative, 3500 V)
 ネブライザーガス : 50 psi, 乾燥ガス : 10 L/min (350°C)
 フラグメンター電圧 : 100 V, 200 V
 スキャン範囲及びスキャン速度 : m/z 50-950 (0.98 cycles/sec)

5. 試験溶液の調製

農産物の残留農薬試験で用いている多成分一斉分析法⁵⁾をもとに、各食品群に含まれる脂質等の共存物質に応じて調製法を一部変更した。各食品群別の調製法を図1に示した。調製した試験溶液をGC/MSおよびLC/MSにより分析した。定量限界は、すべての農薬について0.01 μg/gであった。

表2 2006年度調査の各食品群の内容

食品群	一日摂取量	食品例
I群	米・加工品	323.7 g 白米、玄米、餅、ビーフン等
II群	小麦・いも・種実類	177.7 g 小麦粉、パン、うどん、スパゲッティ、そば、ポテトチップス、ピーナツバター等
III群	砂糖・甘味料・菓子類	33.5 g 砂糖、はちみつ、和菓子、ケーキ、チョコレート、キャンデー等
IV群	油脂類	10.7 g バター、マーガリン、サラダ油、オリーブ油、ラード等
V群	豆類	57.3 g 大豆、きな粉、豆腐、油揚げ、納豆、豆乳、あん等
VI群	果実類	114.7 g いちご、みかん、バナナ、リンゴ、マーマレード、果汁飲料等
VII群	緑黄色野菜	91.8 g トマト、にんじん、ほうれん草、ピーマン、野菜ジュース等
VIII群	その他の野菜・きのこ・藻類	173.0 g キャベツ、きゅうり、大根、たまねぎ、はくさい、漬物、しいたけ、のり等
IX群	嗜好飲料類	696.8 g 日本酒、ビール、ワイン、焼酎、茶、コーヒー、ココア等
X群	魚介類	90.4 g あじ、さば、さけ、たい、まぐろ、貝、いか、たこ、えび、かに、蒲鉾等
XI群	肉・卵類	117.6 g 牛肉、豚肉、鶏肉、ハム、ソーセージ、鶏卵等
XII群	乳類	130.5 g 牛乳、チーズ、アイスクリーム、ヨーグルト等
XIII群	調味料・香辛料・補助栄養素・特定保健用食品	113.0 g ソース、しょうゆ、食塩、マヨネーズ、味噌、ケチャップ、とうがらし等
XIV群	水	600.0 g 飲料水 (水道水)

表3 2006年度調査における測定農薬

有機リン系農薬 (83種)

EPN, acephate, anilofos, azamethiphos, azinphosmethyl, bensulide, bromophos, bromophosethyl, butamifos, cadusafos, carbophenothion, chlorethoxyfos, chlorfenvinphos(-E, -Z), chlorpyrifos, chlorpyrifosmethyl, coumaphos, cyanofenphos, cyanophos, demeton-S-methyl, diazinon, dichlofenthion, dichlorvos, dicrotophos, dimethoate, dimethylvinphos(-E, -Z), dioxathion, disulfoton, edifenphos, ethion, ethoprophos, etrimfos, famphur, fenamiphos, fenchlorphos, fenitrothion, fensulfothion, fenthion, fonofos, formothion, fosthiazate, iprobenfos, isazofos, isocarbophos, isofenphos, isoxathion, malathion, mecarbam, methacrifos, methamidophos, methidathion, mevinphos, monocrotophos, naled, omethoate, parathion, parathionmethyl, phenthoate, phorate, phosalone, phosmet, phosphamidon, phoxim, piperophos, pirimiphosmethyl, profenofos, propaphos, propetamphos, prothiofos, pyraclofos, pyrazophos, pyridaphenthion, quinalphos, salithion, sulprofos, temephos, terbufos, tetrachlorvinphos, thiometon, tolclofosmethyl, triazophos, tribuphos, trichlorfon, vamidothion

有機塩素系農薬 (38種)

2,4-D butoxyethyl, 2,4-D ethyl, 2,4-D isopropyl, 1,1-dichloro-2,2-bis(4-ethylphenyl)-ethane, BHC(α -, β -, γ -, δ -), DCIP, DDT(*p,p'*-, *o,p'*-), aldrin, aramite, captafol, captan, chlorbenside, chlordane, chlorfenson, chlorbenzilate, chloroneb, chlorthal-dimethyl, dichlobenil, diclofop-methyl, dicloran, dicofol, dieldrin, endosulfan(α -, β -), endrin, folpet, heptachlor, heptachlor epoxide (*endo*, *exo*), hexachlorobenzene, indanofan, methoxychlor, mirex, nonachlor, phthalide, quintozone, spirodiclofen, tecnazene, tetradifon, tridiphane

N-メチルカーバメート系農薬 (18種)

XMC, aldicarb, bendiocarb, carbaryl, carbofuran, ethiofencarb, fenobucarb, furathiocarb, isoprocarb, methiocarb, methomyl, metolcarb, oxamyl, promecarb, propoxur, terbucarb, thiodicarb, xylycarb

含窒素系農薬 (274種)

EPTC, N-(2-ethylhexyl)-8,9,10-trinorborn-5-ene-2,3-dicarboximide, abamectin, acetamiprid, acetochlor, acibenzolar-S-methyl, alachlor, allidochlor, alloxydim-Na, ametryn, amitraz, atrazine, azaconazole, azoxystrobin, barban, benalaxyl, benfluralin, benomyl, benoxacor, benzofenap, bifenazate, bifenox, bitertanol, boscalid, bromacil, bromobutide, bupirimate, buprofezin, butachlor, butafenacil, butoxydim, butylate, cafenstrole, carbendazim, carbetamide, carboxin, carfentrazone-ethyl, carpropamid, chlormethoxyfen, chlorbufam, chlorfenapyr, chlorfluazuron, chloridazon, chlornitrofen, chloroxuron, chlorpropham, chlortoluron, chlozolinate, chromafenozide, cinidonethyl, clethodim, clodinafop-propargyl, clofentezine, clomazone, clomeprop, cloquintocet-mexyl, clothianidin, cumyluron, cyanazine, cyazofamid, cycloate, cycloxydim, cyflufenamid, cyhalofopbutyl, cymoxanil, cyproconazole, cyprodinil, desmedipham, di-allate, dichlofluanid, dichlormid, diclobutrazol, diclocymet, diethofencarb, diethyltoluamide, difenoconazole, diflubenzuron, diflufenican, dimepiperate, dimethametryn, dimethenamid, dimethirimol, dimethomorph, dinotefuran, diphenamid, diphenylamine, dipropyl isocinchomeronate, dithiopyr, diuron, dymron, emamectin, epoxiconazole, esprocarb, ethalfluralin, ethiprole, ethoxyquin, ethychlozate, etobenzanid, etoxazole, etridiazole, famoxadone, fenarimol, fenbuconazole, fenamidone, fenothiocarb, fenoxanil, fenoxapropethyl, fenoxycarb, fenpropimorph, fenpyroximate, fentrazamide, ferimzone (-E, -Z), fipronil, flamprop-methyl, fluacrypyrim, fluazuron, fludioxonil, flufenacet, flufenoxuron, flufenpyrethyl, flumeturon, flumiclorac-pentyl, flumioxazin, fluquinconazole, fluridone, flusilazole, fluthiacet-methyl, flutolanil, flutriafol, furametopyr, furilazole, hexaconazole, hexaflumuron, hexazinone, hexythiazox, imazalil, imazamethabenz-methyl, imibenconazole, imidacloprid, inabenfide, indoxacarb, iprodione, iprovalivarb, isoproturon, isouron, isoxadifenethyl, isoxaflutole, kresoximmethyl, lactofen, lenacil, linuron, lufenuron, mefenacet, mefenpyr-diethyl, mefenoxam, mepanipyrim, mepronil, metalaxyl, metamitron, methabenzthiazuron, methoxyfenozide, methyl-dymron, metoconazole, metolachlor, metominostrobin(-E, -Z), metribuzin, milbemectin, molinate, monolinuron, myclobutanil, naphtylacetylamide, naproanilide, napropamide, nitenpyram, nitenpyrin, nitrofen, nitrothal-isopropyl, norflurazon, novaluron, oryzarin, oxabetrinil, oxadiargyl, oxadiazon, oxadixyl, oxaziclomefone, oxpoconazole fumarate, oxycarboxin, oxyfluorfen, paclobutrazol, pebulate, penconazole, pencycuron, pendimethalin, pentoxazone, phenmedipham, picolinafen, pirimicarb, pretilachlor, probenazole, prochloraz, procymidone, prometryn, propachlor, propamocarb, propanil, propaquizafop, propazine, propham, propiconazole, propyzamide, pymetrozine, pyraclostrobin, pyraflufenethyl, pyrazolate, pyrazoxyfen, pyributicarb, pyridaben, pyridaryl, pyrifenoxy(-E, -Z), pyrifenthiol, pyrifenthiol, pyrimidifen, pyriminobacmethyl(-E, -Z), pyriproxyfen, pyroquilon, quinochlor, quinoxyfen, quizalofopethyl, quizalofop-P-tefuryl, sethoxidim, siduron, simazine, simeconazole, simetryn, swep, tebuconazole, tebufenozide, tebufenpyrad, tebutiuron, teflubenzuron, tepraloxydim, terbacil, terbuthylazine, terbutryn, tetraconazole, thenylchlor, thiabendazole, thiacloprid, thiamethoxam, thiazopyr, thifluzamide, thiobencarb, thiocyclam, thiophanate, thiophanate-methyl, tiadinil, tiamulin, tolfenpyrad, tolylfluanid, tralkoxydim, tri-allate, triadimefon, triadimenol, trichlamide, tricyclazole, trifloxystrobin, triflumizole, triflumuron, trifluralin, triforine, triticonazole, uniconazole P, vinclozolin, zoxamide

ピレスロイド系農薬 (25種)

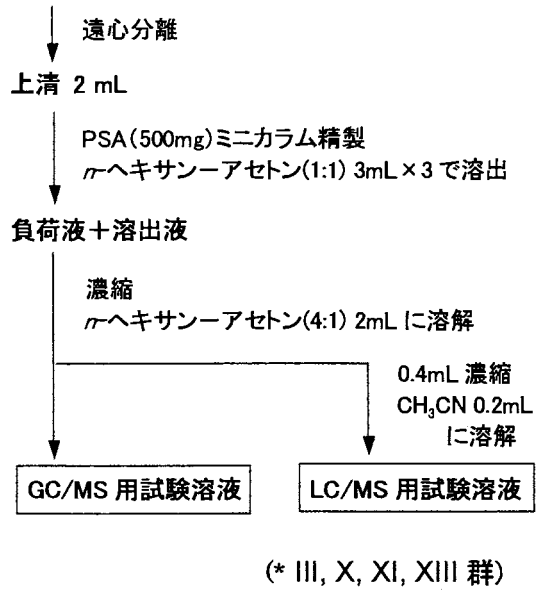
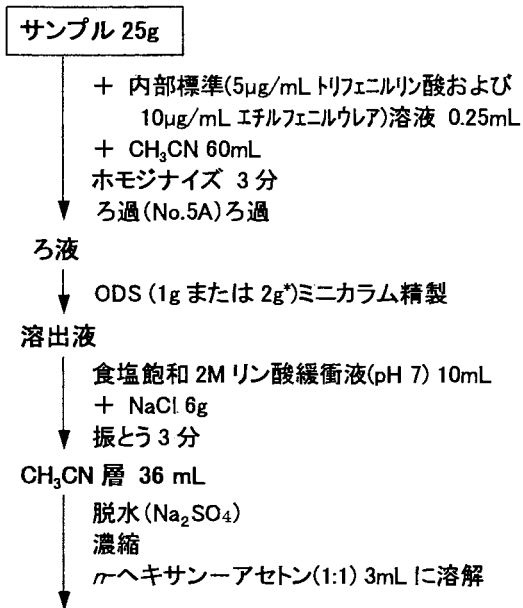
acrinathrin, allethrin, bifenthrin, bioallethrin, bioresmethrin, cycloprothrin, cyfluthrin, cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, ethofenprox, fenpropathrin, fenvalerate, flucythrinate, fluvalinate, halfenprox, imiprothrin, permethrin, phenothrin, pyrethrins, resmethrin, silafluofen, tefluthrin, tetramethrin, tralomethrin

その他 (19種)

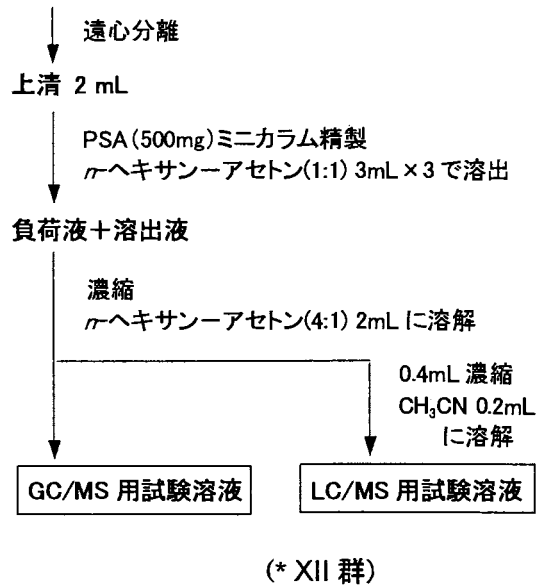
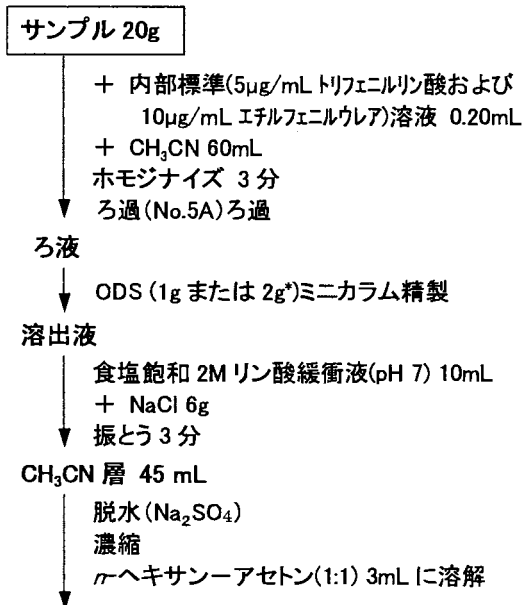
2,6-diisopropyl-naphthalene, MCPA-methyl, MCPB-ethyl, benfuresate, benzobicyclon, bromopropylate, cinmethylin, dimethipin, diofenolan, diphenyl, ethofumesate, isoprothiolane, metaldehyde, phenothiol, piperonyl butoxide, prohydrojasmon, methoprene, o-phenylphenol, propargite

図1 試験溶液の調製法

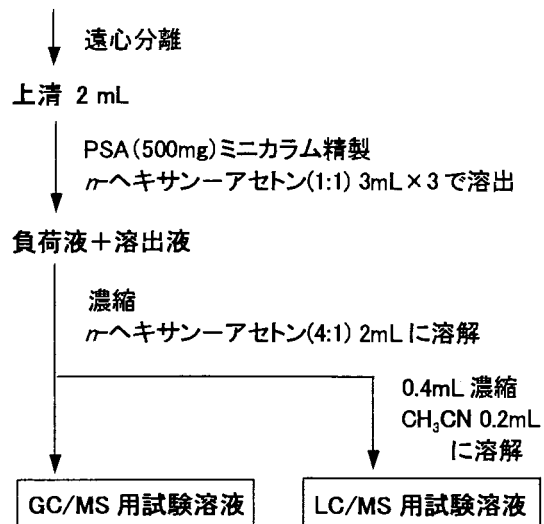
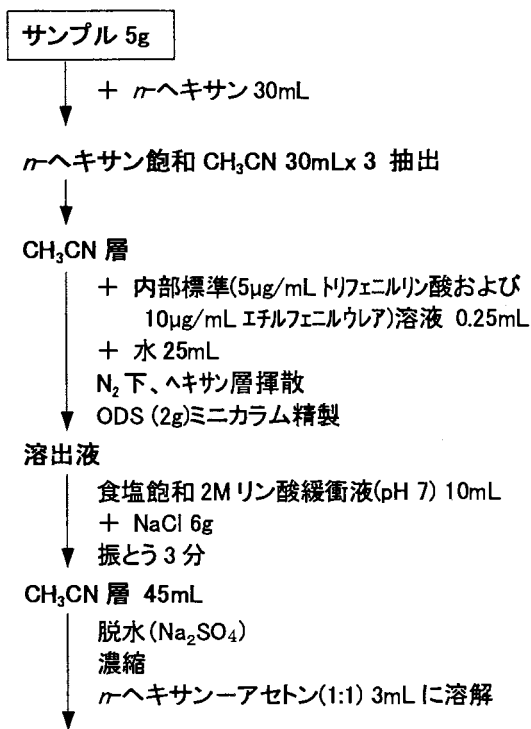
(i) I~III, V~VIII, X, XI, XIII 群



(ii) IX, XII 群



(iii) IV群



III 結果および考察

4年間の調査で、0.01µg/g以上検出された農薬を表4に示した。I~XIV食品群中、2003年度は4農薬が検出され、2004、2005、2006年度は、それぞれ、5農薬、8農薬、3農薬が検出された。

検出農薬数の多い順に群別で見ると、VII群(緑黄色野菜)から7農薬(アセタミプリド、メソミル、ファモキサド、イミダクロプリド、トリフルミゾール、フルフェノクスロン、ニテンピラム)、VI群(果実類)から5農薬(エンドスルファンサルフェート、カルベンダジム、イマザリル、イミダクロプリド、チアベンダゾール)、VIII群(その他の野菜・きのこ・藻類)から5農薬(プロシミドン、クロルフェナピル、フェンバレレート、インドキサカルブ、カルベンダジム)、II群(小麦・いも・種実類)から、のべ2農薬(クロルプロファミン)、XI群(肉・卵類)から1農薬(エトキシキン)が検出された。

また、I群(米・加工品)、III群(砂糖・甘味料・菓子類)、IV群(油脂類)、V群(豆類)、IX群(嗜好飲料類)、X群(魚介類)、XII群(乳類)、XIII群(調味料・香辛料・補助栄養素・特定保健用食品)、XIV群(水)の9群については、4年間にわたり残留濃度0.01µg/g以上の農薬は検出されなかった。

検出された農薬のうち、II群のクロルプロファミン(除草剤・発芽防止剤)はポテトチップスの原料であるばれいしょ、VI群のイマザリルおよびチアベンダゾール(防かび剤)はオレンジ、XI群のエトキシキン(抗酸化剤・成長調整剤)は家畜飼料由来の可能性が高いと推測された。

農薬の一日摂取量は、各食品群の分析値と食品一日摂取量から推定した。これを体重50kgの人のADIおよびA

(iv) XIV群

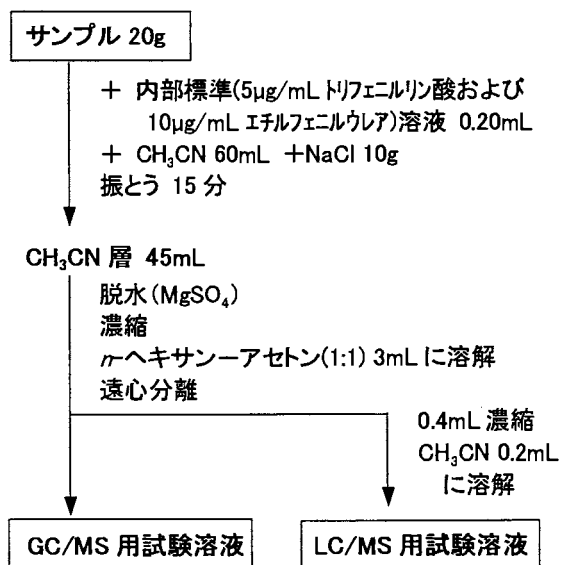


表4 検出された農薬と対ADIおよび対ARfD比

年度	食品群	農薬	濃度 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	一日摂取量 ($\mu\text{g}/\text{日}$)	ADI ($\text{mg}/50\text{kg}/\text{日}$)	対ADI比 (%)	ARfD ($\text{mg}/50\text{kg}/\text{日}$)	対ARfD比 (%)	ADI出典	ARfD出典
2003	VI	Endosulfan sulfate	0.021	2.25	0.3	0.75	1	0.23	JMPR(1998)	JMPR (1998)
	VII	Acetamiprid	0.031	2.86	3.3	0.09	5	0.06	日本	オーストラリア(2001)
	VII	Methomyl	0.016	1.48	1	0.15	1	0.15	JMPR(2001)	JMPR(2001)
	VIII	Procymidone	0.014	2.52	5	0.05	1.5	0.17	JMPR(1989)	オーストラリア(2003)
合計						1.04 %		0.60 %		
2004	II	Chlorpropham	0.019	4.03	2.5	0.16	25	0.02	JMPR(2005)	JMPR(2005)
	VI	Carbendazim	0.017	2.24	1.5	0.15	25	0.009	JMPR(1995)	JMPR(2005)
	VII	Famoxadone	0.033	3.14	0.3	1.05	30	0.01	JMPR(2003)	JMPR(2003)
	VII	Imidacloprid	0.455	43.24	3	1.44	20	0.22	JMPR(2001)	JMPR(2001)
	VII	Triflumizole	0.024	2.28	0.925	0.25			日本	
合計						3.05 %		0.25 %		
2005	II	Chlorpropham	0.011	2.11	2.5	0.08	25	0.008	JMPR(2005)	JMPR(2005)
	VI	Imazalil	0.022	2.57	1.5	0.17	2.5	0.10	JMPR(2000)	JMPR(2005)
	VI	Imidacloprid	0.010	1.17	3	0.04	20	0.006	JMPR(2001)	JMPR(2001)
	VI	Thiabendazole	0.019	2.19	5	0.04	50	0.004	JMPR(1997)	JMPR(2006)
	VII	Flufenoxuron	0.095	8.77	1.85	0.47			日本	
	VIII	Chlorfenapyr	0.031	5.67	1.3	0.44			日本	
	VIII	Fenvalerate	0.024	4.40	1	0.44			JMPR(1986)	
	VII	Indoxacarb	0.012	2.26	0.5	0.45	5	0.65	JMPR(2005)	JMPR(2005)
合計						2.14 %		0.17 %		
2006	VII	Nitenpyram	0.012	1.00	26.5	0.004			日本	
	VII	Carbendazim	0.011	1.97	1.5	0.13	25	0.008	JMPR(1995)	JMPR(2005)
	XI	Ethoxyquin	0.011	1.07	0.25	0.43	25	0.004	JMPR(2005)	JMPR(2005)
合計						0.56 %		0.01 %		

JMPR: Joint Meeting on Pesticide Residues (FAO/WHO合同残留農薬専門家会議)で設定された値

日本: 食品衛生調査会または食品安全委員会が設定した値

オーストラリア: オーストラリア政府が設定した値

RfDと比較すると、各農薬について、ADIに対して0.004~1.44%、ARfDに対して0.004~0.23%であった。また、ADIおよびARfDが設定されている農薬について、年度毎に、対ADIおよび対ARfD比を単純合計しても、ADIで3%以下、ARfDで0.6%以下という低いレベルであり、調査対象とした農薬に関しては、慢性および急性毒性の点から見て、健康への影響はないものと考えられた。

IV まとめ

2003~2006年度にかけて、1年に1回、計4回、マーケットバスケット方式を用い、約400種農薬について食物経由の一日摂取量調査を行った。その結果、2003年度は4農薬が検出され、2004、2005、2006年度は、それぞれ

5農薬、8農薬、3農薬が検出された。これら農薬について一日摂取量を算出し、体重50kgの人のADIおよびARfDと比較したところ、年度毎の対ADIおよび対ARfD比の合計がADIで3%以下、ARfDで0.6%以下であり、健康への影響はないものと考えられた。

文 献

- 1) 厚生労働省:平成12年国民栄養調査(2002)
- 2) 厚生労働省:平成13年国民栄養調査(2003)
- 3) 厚生労働省:平成15年国民健康・栄養調査(2005)
- 4) 厚生労働省:平成16年国民健康・栄養調査(2006)
- 5) 秋山由美:GC/MS, LC/MSを用いた農産物中の残留農薬の一斉分析法, 今月の農業, 51, 50-55(2007)

兵庫県下における2005年および2006年の空中花粉の飛散状況

藤田昌民* 後藤 操 市橋啓子

A Survey of Airborne Pollen in Hyogo from 2005 to 2006

Masatami FUJITA*, Misao GOTOU and Keiko ICHIHASHI

*Life Science Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

I はじめに

近年、花粉症対策の一環として、主な原因であるスギ科およびヒノキ科花粉の飛散状況調査が全国各地域で実施されている。

当研究センターでは、平成8年度からスギ科、ヒノキ科、カバノキ科、イネ科およびキク科等の花粉症の原因と考えられている花粉について、通年測定を行い、その飛散状況を調査してきた^{1, 2)}。

平成13年度から兵庫県では「花粉飛散状況調査実施要領」を作成し、当研究センターおよび7県健康福祉事務所で、飛散花粉の通年観測を実施している。

本報告では、最近の2年間（2005年1月～2006年12月）の観測データを解析し、花粉の飛散状況を取りまとめた。

II 調査方法

1. 観測地点

花粉飛散調査の観測地点は、当研究センター（神戸）および7県健康福祉事務所（宝塚、加古川、社、龍野、豊岡、柏原、洲本）の計8地点で実施した。県内の飛散状況を把握するため、当研究センターの他、東地域として宝塚、西地域として龍野、北部地域として豊岡の各健

健康科学部

* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所
健康科学部 藤田昌民

康福祉事務所のデータを用いた。

2. 調査対象の花粉

木本（樹木）花粉：スギ科、ヒノキ科、カバノキ科
草本花粉：イネ科、キク科

3. 測定方法

飛散花粉はワセリンを塗布したスライドガラスを花粉キャッチャー（自動花粉捕集器、ダーラム型捕集器）にセットして捕集した。当研究センターでは、原則として毎日、午前9時にスライドガラスを交換した。健康福祉事務所においては、スギ・ヒノキ科花粉飛散シーズン中は当研究センターと同様にして、それ以外の時期には2日間から7日間連続捕集した。

捕集後のスライドガラスは光学顕微鏡で検鏡し、花粉の分類と数を測定した^{3, 4)}。

得られたデータは、1月の第一月曜日が属する週（月曜日～日曜日）を第1週とし、以降、同様に1週単位で集約した²⁾。

III 結果と考察

1. 花粉の年間総飛散数

各観測地点における各種花粉の年間総飛散数を表1に示す。木本花粉ではスギ科およびヒノキ科がいずれの観測地点においても1000個/cm³以上であるのに対して、カバノキ科はそれ以下であった。スギ科花粉は観測地点別に見ると、2005年は神戸が最も多く、次いで豊岡、龍野、宝塚であった。2006年は豊岡が最も多かった。ヒノキ科花粉は、2005年は豊岡が他の3観測地点よりも2倍以上

多かった。2006年は龍野が最も多く、豊岡は前年の1/4以下であった。カバノキ科はスギ科およびヒノキ科に比して概ね1/10以下であった。草本花粉ではイネ科は豊岡や龍野で多く、また、キク科は豊岡が他の3観測地点に比べて1ヶタ多い値であった。花粉飛散数が観測地点により違いが見られる原因として、周辺の樹木等の植栽および植生が反映していると考えられる。例えば、豊岡ではヒノキ科を、神戸ではスギ科を多く植栽していることが影響を与えていると推定される。また、市街地である神戸および宝塚は周辺にまとまった草本植物群落がないため、草本花粉であるイネ科およびキク科の飛散数が少ないと考えられる。

花粉の総飛散数について2005年と2006年を比較すると、2006年は前年よりも少ない傾向を示した。スギ科は前年の約24~41%、ヒノキ科は約25~61%、カバノキ科は約6~82%、イネ科は約29~68%、キク科は約17~89%に減少した。ただし、龍野のヒノキ科および神戸のイネ科は1.5倍に増加していた。

表1 各観測点における総飛散数(単位:個/cm³)

種類	年	神戸	宝塚	龍野	豊岡
スギ科	2005年	4753.6	4261.4	3983.5	3963.0
	2006年	1409.9	1008.5	1412.0	1603.8
ヒノキ科	2005年	4720.8	3914.5	2879.8	9570.8
	2006年	2874.9	1867.7	4433.8	2381.1
カバノキ科	2005年	282.1	121.0	170.2	824.9
	2006年	230.2	75.3	107.8	50.3
イネ科	2005年	117.0	268.4	352.2	483.7
	2006年	174.6	105.6	101.6	328.6
キク科	2005年	67.8	26.0	84.9	477.9
	2006年	60.3	6.4	14.8	185.4

2. 各科花粉ごとの飛散状況

2.1 スギ科

毎週のスギ科花粉の飛散状況を図1に示した。4観測地点における飛散状況は概ね類似しており、2年間ともに第8週~第17週(2月中旬~3月下旬)の間に飛散ピークが観測された。飛散開始日については、神戸に比べて豊岡は飛散開始日が約2週間遅くなっていた。2005年神戸及び豊岡の1ヶ月の平均気温は、1月6.5℃及び3.1℃、2月9.5℃及び3.1℃、同様に2006年は、1月5.5℃及び2.1℃、2月6.6℃及び3.3℃であった。神戸と豊岡におけるこのような気温の差が、スギ雄花の開花時期に影響した一因と考えられる。

また、スギ科は秋期である10月下旬~11月上旬に飛散花粉の小さな山が観測されることがある。我々が過去に実施した着花状況調査においても、秋季に雄花が開花しているのを確認している。

2.2 ヒノキ科

ヒノキ科はスギ科より1カ月程度遅れて花粉飛散が始まり、各観測地点共に第13週~第18週(3月下旬~5月上旬)の間に飛散ピークが観測された(図2)。飛散開始期の立ち上がりは急で、スギ科に比べて一気に飛散が開始すると推測される。

2.3 カバノキ科

カバノキ科はスギ科やヒノキ科の花粉飛散期と同時期に観測されたが、それらに比べて若干長期間飛散していた(図3)。カバノキ科ではほぼ2峰性の飛散ピークを示し、特に神戸では顕著に認められた。これは、神戸の前半(第6~7週)と後半(第12~13週)の飛散ピークとでは、花粉の種類が異なることを示している。

2.4 イネ科

イネ科花粉の抗原性はスギ科の10倍強いといわれ、田園部の小児ではスギ花粉症より早くイネ科花粉症になることが多く、スギ科と異なり喘息を生じさせることもある⁵⁾。

イネ科は神戸では第12~40週(3月下旬~10月上旬)の間に、他の地域では概ね第20~40週(3月下旬~10月上旬)の間にかけて飛散しており、5種の花粉の中では最も長期間にわたり観測されている(図4)。飛散ピーク期は春季と秋季に認められた。

2.5 キク科

キク科のうちヨモギ属およびブタクサ属の花粉は、イネ科と同じ程度の強い抗原性が見られ、これらが原因となる花粉症の発症も報告されている⁵⁾。

キク科の飛散は、豊岡では第33週頃(8月中旬)から、他の地域では約2週間遅れの第35週頃(8月下旬)から始まり、4観測地点ともほぼ第43週頃(10月下旬)に終了した(図5)。キク科の中では、まずブタクサ属が、次に少し遅れてヨモギ属が飛散し、最後に微量のアキノキリンソウ属の飛散も認められた。豊岡の第36週(9月上旬)前後に見られる大きな飛散ピークは、ブタクサ属によるものであり、周辺の群生地の影響を受けていると推測される。

2.6 神戸における各科花粉の飛散期間の比較

実際、大気中には上記の花粉以外にも木本花粉としてマツ科、ブナ科、ニレ科等、草本花粉としてタデ科、クワ科(カナムグラ属)、アカザ科等が、年間を通じて飛散している。

当研究センターではこれらの花粉についても観測して

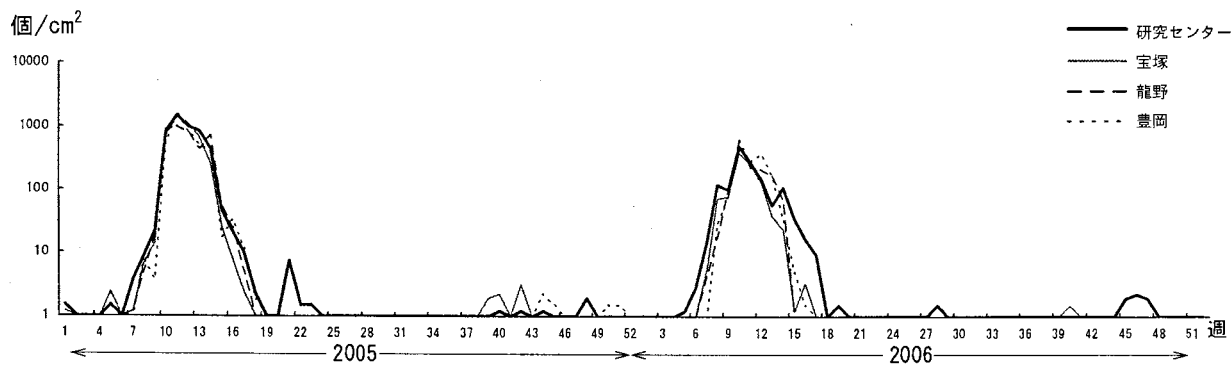


図1 スギ科花粉の飛散状況（2005年～2006年）

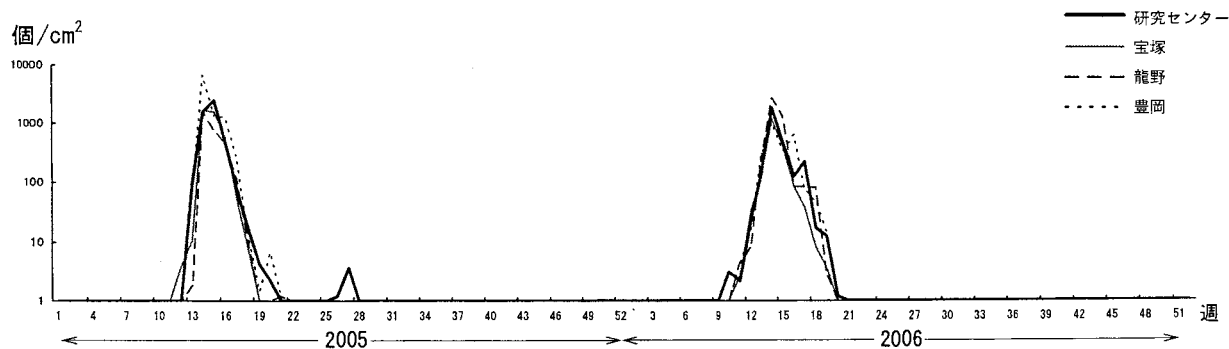


図2 ヒノキ科花粉飛散状況（2005年～2006年）

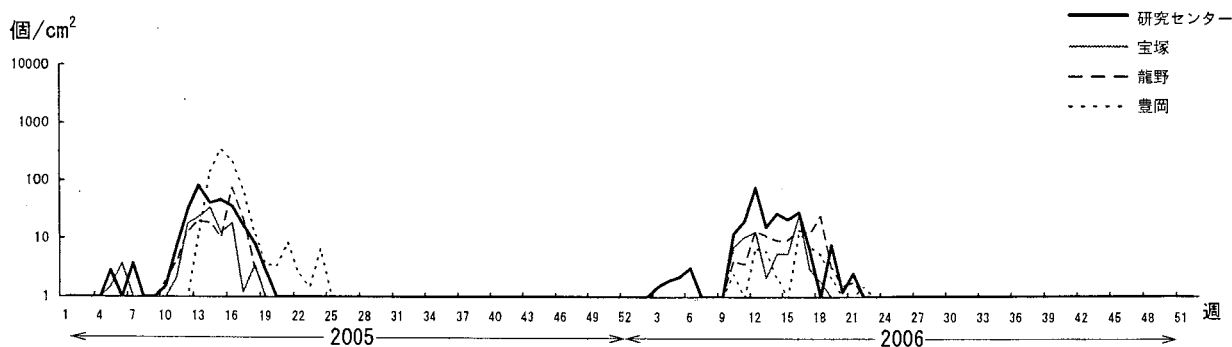


図3 カバノキ科花粉飛散状況（2005年～2006年）

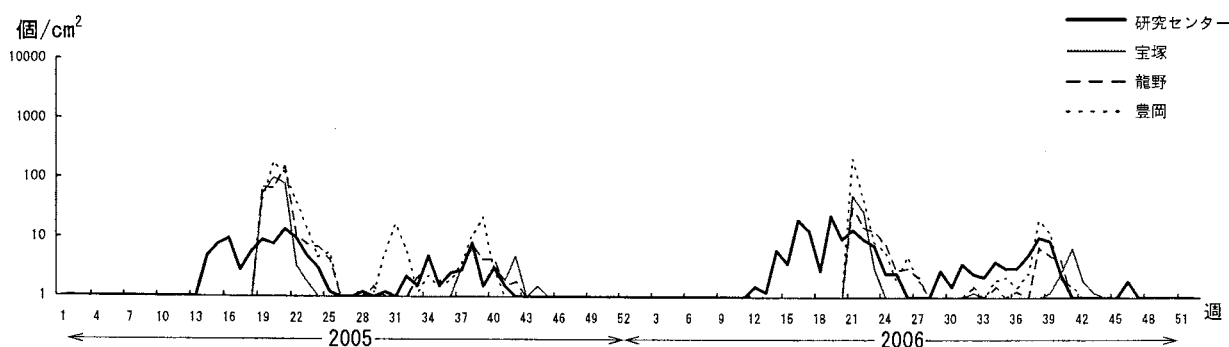


図4 イネ科花粉飛散状況（2005年～2006年）

1月の第1月曜日から日曜日の1週間を第1週とした（第1月曜日は、2005年：1月2日、2006年：1月1日）。
 なお、1週間単位に飛散総数を集計し、1.0個/cm以上をグラフに示した。

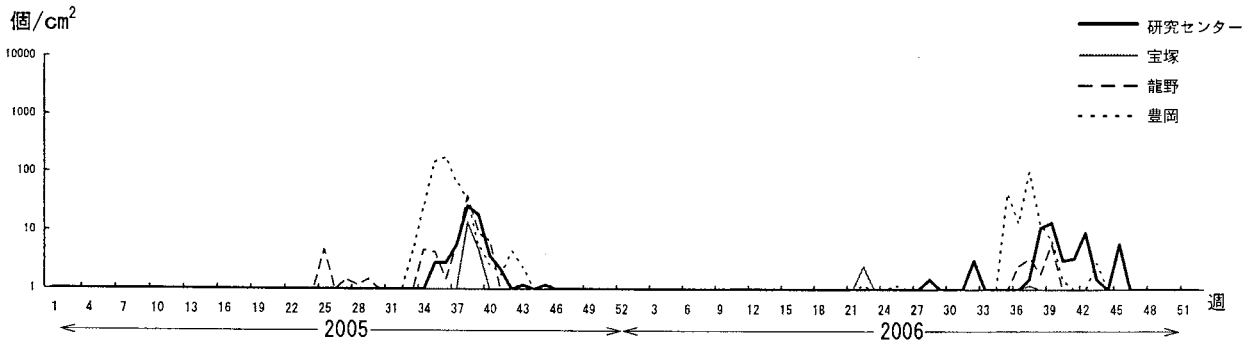


図5 キク科花粉の飛散状況 (2005年～2006年)

集計期間および飛散数表示については図1-4と同様

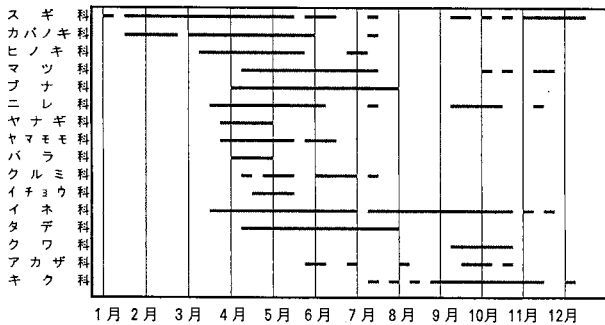


図6 各科花粉の飛散期間 (神戸)

きた。各科花粉の飛散期間を比較するため図6を作製した。なお、ここで示す飛散状況は、2年間の週毎の平均花粉飛散数が1個/cm²/週以上観測された週を飛散期とみなして、横線でプロットした²⁾。

年間を通じて飛散花粉の種類が最も多い時期が4月であった。春のこの時期には多種類の花粉が観測され、木本花粉としてスギ科、ヒノキ科、カバノキ科、マツ科、ブナ科等11科、草本花粉としてイネ科、タデ科の2科の計13科が観測された。春季は木本花粉が多く飛散するが、秋季には草本花粉が多く飛散している。9、10月にはイネ科、クワ科、アカザ科、キク科の4科の草本花粉の他、木本花粉としてニレ科、少数飛散ではあるがスギ科、マツ科の3科が観測された。ニレ科は飛散期が春季と秋季とに分かれており、前者はエノキ属、ムクノキ属、ケヤキ属であり、後者はアキニレ属である。他の月についてもいずれかの科の花粉飛散が認められ、飛散数の多少はあるものの年間を通じて花粉が飛散していることが明らかとなった。

IV まとめ

1. 木本花粉であるスギ科、ヒノキ科、カバノキ科では、前者2科の飛散数が多く、カバノキ科は、1桁低い値であった。草本花粉のイネ科とキク科も同様であり、少ない飛散数であった。また、2005年と2006年の比較

では、神戸のイネ科及び龍野のヒノキ科を除いて2006年の花粉飛散数が少なかった。

2. 県内4箇所の観測地点におけるスギ科、ヒノキ科、カバノキ科、イネ科、キク科の飛散パターンを比較すると、ほぼ同様のパターンを示した。
3. 神戸における通年観測データを解析した結果、各科花粉の飛散時期やそのパターン等の特徴を把握することができた。春季には木本花粉が、秋季には草本花粉が多く飛散し、年間を通じて種々の花粉が飛散していることが明らかとなった。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本調査事業にご協力頂いた県庁健康生活部疾病対策課関係各位、また、花粉飛散データを提供していただいた7健康福祉事務所(宝塚、加古川、社、龍野、豊岡、柏原、洲本)の検査室長並びに担当者の皆様に深謝します。

文 献

- 1) 後藤操, 藤原月見, 奥野俊博, 小笠原寛: 平成8年の神戸市における花粉飛散状況, 兵庫衛研報, 32, 170-173 (1997)
- 2) 後藤操, 藤原月見, 奥野俊博, 小笠原寛: 平成9年の神戸市における花粉飛散調査, 兵庫衛研報, 33, 138-141 (1997)
- 3) 環境庁環境保健部保健調査室監修: 花粉症の原因となる花粉の形態学的観測法, p.61-110 (1993), (公害研究対策センター)
- 4) 佐橋紀男, 岸川禮子, 西間三馨, 長野準: 日本における空中花粉測定および花粉情報の標準化に関する研究報告, 日本花粉学会誌, 39, 129-134 (1993)
- 5) 小笠原寛: 兵庫県の花粉尘, p.11-16, 神戸新聞総合出版センター, 兵庫 (1995)