

青森県環境保健センター年報

Annual Report
of
Aomori Prefectural Public Health and Environment Center
No.34 2023

青森県環境保健センター

目 次

I 環境保健センターの概要

1 沿 革	1
2 組織、所掌事務及び職員の状況	2

II 業務の概要（令和4年度実績）

1 総務室	4
2 微生物部	5
3 理化学部	11
4 公 害 部	15
5 研修等業務（所内研修会）	18
6 年間動向	19
1) 講師等派遣	19
2) 委員会、協議会等の委員	19
3) 令和4年度青森県環境生活部出先機関等職員研究発表会「あすをひらく」	19
4) 会議・学会・研修会等出席状況	20

III 研究報告

1 報 文

コマンドラインによる結核菌次世代シーケンスデータの再解析 高橋 洋平	24
分子生物学的手法による顎口虫の虫種同定 高橋 洋平 小笠原 和彦	31
青森県でヒトから分離された感染性胃腸炎起因菌の病原体サーベイランス（2022年） 高橋 洋平 岩間 貴士 長内 志保美	37
規制値付近のホタテガイ所内組成型標準物質を用いた LC-MS/MS による麻痺性貝毒試験法の検討 田中 綾乃 柴田 めぐみ 五十嵐 飛鳥 岩館 樹里 山本 明美	44
大気拡散計算を行うエクセルマクロの開発：米国 EPA の“AERMOD”モデル 花石 竜治	55

2 ノート

青森県環境保健センターにおける新型コロナウイルス検査対応 坂 恭平 鈴木 敬 長崎 幸生 筒井 理華 山上 剛志 高橋 洋平 小川 裕貴 武差 愛美 福田 理 菩提寺 誉子 二本柳 朋子 橋本 恭奈 小笠原 和彦	74
2021/22シーズンに発生した集団胃腸炎事例におけるノロウイルスの遺伝子解析 坂 恭平 鈴木 敬 長崎 幸生	80
麻痺性貝毒マウス試験における ddY マウスと ICR マウスの感受性比較 山本 明美 岩館 樹里 西堀 祐司 五十嵐 飛鳥	84
PCR法とシーケンスによる遺伝子解析を用いた毒キノコ種鑑別法の検討 小川 裕貴 田中 綾乃 福田 理 山本 明美	89

LC-MS/MSによるキノコの毒成分一斉試験法の構築	
田中 綾乃 小川 裕貴 福田 理 山本 明美	94
青森県内の光化学オキシダント濃度について	
対馬 典子 内海 宣俊	99
弘前市における有害大気汚染物質等モニタリング調査結果について	
内海 宣俊 対馬 典子 北畠 茂 菅尾 聡也	108
十和田湖における気温変化と水温変化の関係について	
白銀 ゆい 菩提寺 誉子 内海 宣俊	120
青森県内における河川水中のマイクロプラスチック実態調査	
長内 志保美 貝森 優希	126
IV 他誌投稿・学会等発表抄録	130

Table of contents

1. Reports

Command line reanalysis of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> next-generation sequencing data	
Yohei Takahashi	24
Identification of <i>Gnathostoma</i> species using molecular biological methods	
Yohei Takahashi, Kazuhiko Ogasawara	31
Pathogen surveillance of infectious gastroenteritis bacteria isolated from humans in Aomori prefecture (2022)	
Yohei Takahashi, Takashi Iwama, Shihomi Osanai	37
Evaluation of a paralytic shellfish toxin testing method around the regulatory limits utilizing LC-MS/MS using scallop in-house reference materials	
Ayano Tanaka, Megumi Shibata, Asuka Igarashi, Juri Iwadate, Akemi Yamamoto	44
Development of an Excel macro to calculate atmospheric dispersion: US EPA "AERMOD" model	
Ryuji Hanaishi	55

2. Notes

Measures for SARS-CoV-2 testing at Aomori Prefectural Public Health and Environment Center	
Kyohei Saka, Takashi Suzuki, Kouki Nagasaki, Rika Tsutsui, Takeshi Yamagami, Yohei Takahashi, Yuki Ogawa, Manami Musashi, Osamu Fukuda, Motoko Bodaiji, Tomoko Nihonyanagi, Yukina Hashimoto, Kazuhiko Ogasawara	74
Genetic analysis of norovirus in patients involved in the onset of mass gastroenteritis during the 2021/22 season	
Kyohei Saka, Takashi Suzuki, Kouki Nagasaki	80
Comparison of sensitivity between ddY and ICR mice in a paralytic shellfish toxin mouse assay	
Akemi Yamamoto, Juri Iwadate, Yuji Nishibori, Asuka Igarashi	84
Evaluation of a method to identify toxic mushroom species using genetic analyses by PCR and sequencing	
Yuki Ogawa, Ayano Tanaka, Osamu Fukuda, Akemi Yamamoto	89
Establishing a method to simultaneously identify mushroom toxin components through LC-MS/MS	
Ayano Tanaka, Yuki Ogawa, Osamu Fukuda, Akemi Yamamoto	94
Photochemical oxidant concentrations in Aomori prefecture	
Noriko Tsushima, Nobutoshi Utsumi	99
Results of monitoring of hazardous air pollutants in Hirosaki city	
Nobutoshi Utsumi, Noriko Tsushima, Shigeru Kitabatake, Souya Sugao	108
Relationship between water temperature changes, transparency, and COD in Lake Towada	
Yui Shirogane, Motoko Bodaiji, Nobutoshi Utsumi	120
Survey of status of microplastics in river waters in Aomori prefecture	
Shihomi Osanai, Yuki Kaimori	126

I 環境保健センターの概要

1 沿革

(1) 設置の目的

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

(2) 沿革

【環境保健センター】

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

【旧衛生研究所】

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

【旧公害センター】

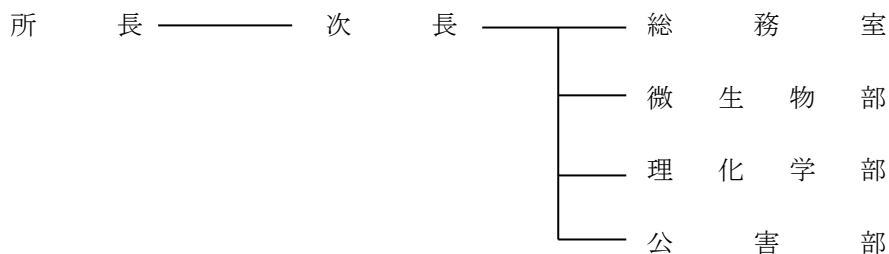
年 月 日	概 要
昭和46年4月1日	青森県公害センター開設

【旧公害調査事務所】

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

2 組織、所掌事務及び職員の状況

(1) 組織



(2) 所掌事務

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

(3) 分掌事務

総務室

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

微生物部

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

理化学部

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

⑥ その他必要な試験検査及び調査研究に関すること。

公害部

① 大気汚染、水質汚濁、土壌汚染、騒音、振動及び悪臭の防止に係る試験検査並びに調査研究に関すること。

② 微小粒子状物質（PM_{2.5}）及び有害化学物質等の試験検査並びに調査研究に関すること。

③ 廃棄物の処理に係る試験検査及び調査研究に関すること。

④ その他必要な試験検査及び調査研究に関すること。

(4) 職員の状況

(令和 5 年 4 月 1 日現在)

区 分	課 長 級	副 参 事 級	総 括 主 幹 級	主 幹 級	主 査 級	主 技 事 師	技 能 技 師	非 常 勤 事 務 員	非 常 勤 技 術 員	非 常 勤 労 務 員	計
所 長	1										1
次 長		1									1
総 務 室			1	1		1	1	1			5
微生物部		1			5	1			3		10
理化学部			1	1	3	1			3		9
公 害 部			2		3	2			1		8
計	1	2	4	2	11	5	1	1	7		34

Ⅱ 業務の概要(令和4年度実績)

1 総務室

1.1 職場見学者の受入れ

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

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

令和 4 年度は受入実績はなかった。

区 分	H30 年度	R 元年度	R2 年度	R3 年度	R4 年度
見学者（人）	4	2	—	—	—

1.2 センター内ベンチャー制度

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

令和 4 年度は、次の研究を実施した。

研 究 名	研 究 期 間
LC-MS/MS 法及び PCR 法を用いた毒キノコの鑑別に関する研究	令和 4 年度～令和 5 年度

2 微生物部

2.1 調査研究

(1) 感染症流行予測調査事業

厚生労働省感染症流行予測調査事業の一環として、環境水からのウイルス分離によるポリオ感染源調査及びブタにおける HI 抗体調査による日本脳炎感染源調査を実施している。令和4年度は新型コロナウイルス感染症検査対応に係る大幅な業務量の増加により保留していた令和3年度分（検体採取のみ実施）の調査も併せて実施した。

ア ポリオ感染源調査

(ア) 令和3年度採取検体

令和3年4月から12月にかけて、青森市内下水処理施設から採取した下水処理前水 54 検体を対象にウイルス分離を実施した結果、ウイルスは分離されなかった。

(イ) 令和4年度採取検体

令和4年4月から12月にかけて、青森市内下水処理施設から採取した下水処理前水 54 検体を対象にウイルス分離を実施した結果、アデノウイルス 12 株（1 型 1 株、2 型 9 株、31 型 2 株）が分離された。

令和5年度においても引き続き実施する。

イ 日本脳炎感染源調査

(ア) 令和3年度採取検体

令和3年7月から9月にかけて、十和田食肉衛生検査所及び田舎館食肉衛生検査所で採取したブタの血液 70 検体を対象に HI 抗体調査を実施した結果、10 倍以上の抗体価を保有している日本脳炎陽性ブタは認められなかった。

(イ) 令和4年度採取検体

令和4年7月から9月にかけて、十和田食肉衛生検査所及び田舎館食肉衛生検査所で採取したブタの血液 70 検体を対象に HI 抗体調査を実施した結果、10 倍以上の抗体価を保有している日本脳炎陽性ブタは認められなかった。

令和5年度においても引き続き実施する。

(2) 感染症発生動向調査事業（ウイルス等・細菌等）

平成11年度から感染症法に基づき、県内の細菌・ウイルス・リケッチア・クラミジア等の病原体を把握するために感染症発生動向調査の一環として病原体検査を実施しており、令和4年度においては次のとおり行った。

令和5年度においても引き続き実施する。

ア ウイルス・リケッチア・クラミジア

県内（青森市及び八戸市を除く。）の医療機関が採取した材料 14,919 検体（糞便（直腸ぬぐい液・腸内容物）2 検体、喀痰 2 検体、咽頭ぬぐい液（鼻咽頭ぬぐい液・鼻腔ぬぐい液・鼻汁）13,798 検体、唾液 1,103 検体、髄液 4 検体、血液・血清 7 検体、痂皮 3 検体）からウイルス分離及び遺伝子検出を実施した結果は、次のとおりであった。

ウイルス等の検出状況

疾患等	検出されたウイルス等	検出数
インフルエンザ	インフルエンザウイルス AH3	23
RS ウイルス感染症	ヒト RS ウイルス B	1
無菌性髄膜炎関連	単純ヘルペスウイルス 1 型	1
つつが虫病	<i>Orientia tsutsugamushi</i> (Karp 株)	1
肺炎関連	ヒトメタニューモウイルス	1

	新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)	1
新型コロナウイルス感染症	新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)	4,745

(ア) 新型コロナウイルスとインフルエンザウイルスの同時検査

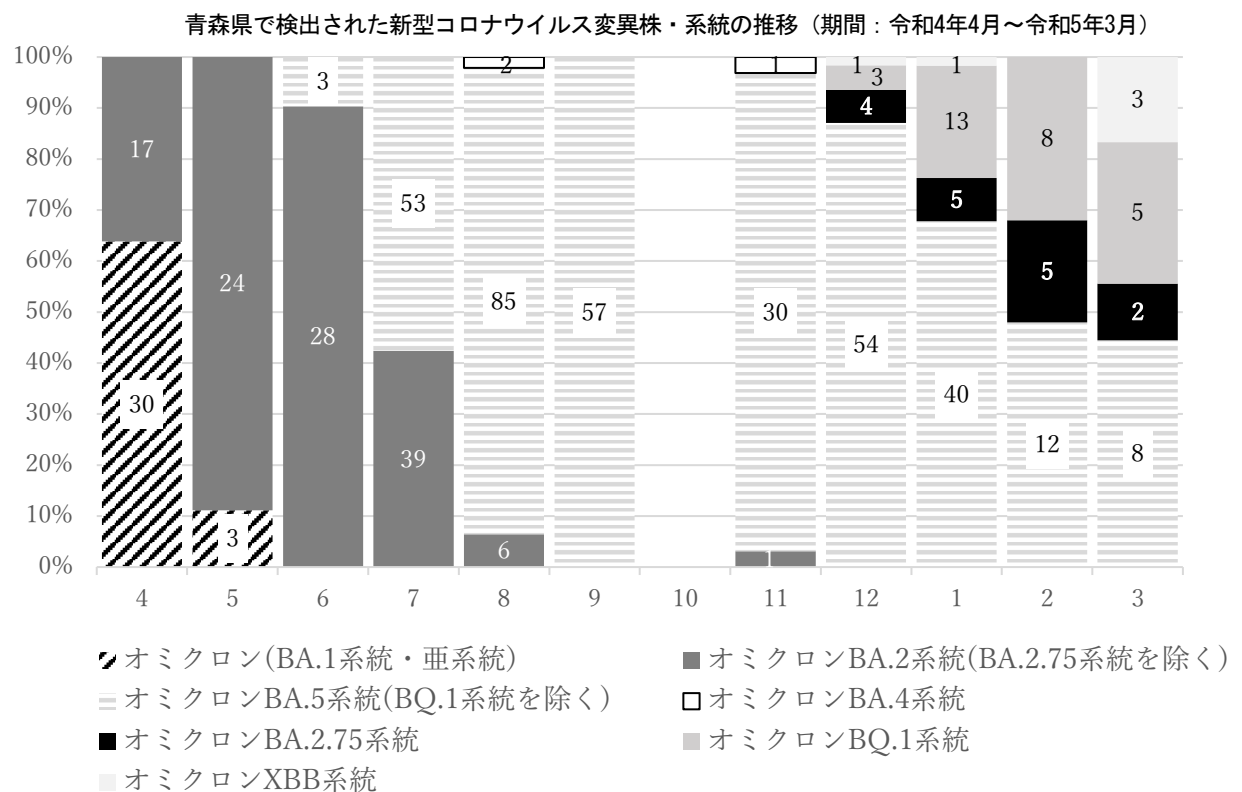
新型コロナウイルスとインフルエンザウイルスの同時流行が懸念されたため、令和4年12月1日以降の新型コロナウイルス検査については、インフルエンザウイルスとの同時検査を行うこととした。対象となった37検体のうち、1検体は新型コロナウイルス陽性／インフルエンザウイルス陰性であったが、36検体はいずれも陰性だった。

(イ) 新型コロナウイルス変異株の特異的な変異の検出

陽性例について、変異株の推定のため、特定の変異株に特異的にみられるスパイクタンパク質上の変異(N501Y/L452R/G339D)の有無を検出した(令和4年6月21日まで実施)。84検体について実施し、1検体からN501Y変異を、79検体からG339D変異を検出した。

(ウ) 新型コロナウイルスの全ゲノム解析

変異株の系統を特定するため、621検体の全ゲノム解析を実施した。なお、令和4年度内に採取され、解析できた543検体に係る結果は、次のとおりであった。



※ 令和4年10月のデータの欠測について: 政府の新型コロナウイルス感染症患者の全数把握見直しにより、国への報告対象が高齢者等重症化リスクの高い4類型に限定され、行政検査が大幅に減少した影響で、ゲノム解析を実施できなかったもの。

イ 細菌等

県内(青森市及び八戸市を除く。)の医療機関等で、腸管出血性大腸菌感染症患者及び保菌者から採取された検体由来の菌株計8株の性状確認及び遺伝子検査を実施した結果、Og111:Hg8 VT1が2株、Og157:Hg7 VT1VT2が4株、Og157:Hg7 VT2が2株であった。

薬剤耐性菌について、県内(青森市及び八戸市を除く。)の医療機関で、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症患者から採取された検体由来の菌株計5株の性状確認及び遺伝子検査を実施した結果、カルバペネマーゼを産生する菌株は認められなかった。また、バンコマイシン耐性腸球菌感染症患者から採取された検体由来の菌株1株の遺伝子検査及び型別試験を実施した結果、バンコマイシン耐性

遺伝子を検出した。このほか、感染性胃腸炎疑い患者から採取された検体由来の菌株1株の遺伝子検査及び型別試験を実施した結果、大腸菌 01/Og1:Hg1/12 を検出した。

(3) 結核菌の遺伝子解析

平成24年度から、県の結核対策の一つとして、VNTR法による結核菌の遺伝子型別解析を行っており、令和4年度は、24株（青森市及び八戸市を除く。）について遺伝子解析を行った。

令和5年度についても引き続き実施する。

(4) 青森県病原微生物検出情報

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

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

ア 令和4年度は、提供を受けた検出情報及び気温等の環境情報を解析し、環境保健センターのホームページに週報として52回掲載した。

令和5年度においても引き続き実施する。

イ 収集した病原性菌株について生化学的試験、血清学的試験、PCR及び薬剤感受性試験等を実施し、その結果を関係機関に提供している。令和4年度は91株について試験を実施した。

令和5年度においても引き続き実施する。

(5) 厚生労働科学研究事業

令和4年度に研究事業として厚生労働科学研究班等に参加した事業は、以下のとおりである。

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

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

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

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

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

ア～エは、令和5年度においても引き続き参加する。（オは、名称変更のうえ、新規参加。）

(6) 菌株の収集事業

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

令和5年度においても引き続き実施する。

(7) 感染症発生動向調査事業に係る青森県感染症発生情報

平成13年度から感染症患者の把握と予防啓発を目的に実施している。

令和4年度は、県内の感染症患者情報及び病原体検出情報を収集・分析し、その結果を週報として52回（インフルエンザ情報を適時掲載）、月報として12回、環境保健センターのホームページに掲載した。また、令和3年の感染症発生動向調査事業報告書を作成し、ホームページに掲載するとともに関係機関に配付した。

令和5年度においても引き続き実施する。

2.2 試験検査

(1) ウイルス性食中毒等関連検査

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

令和4年度は、ウイルス性食中毒(疑いを含む。)及び感染症集団胃腸炎事例が8事例あり、糞便93検体、食品49検体、ふき取り31検体、計173検体についてRT-PCR法、リアルタイムPCR法及びダイレクトシーケンス法により原因ウイルスの検索及び遺伝子解析を行った。

その結果、糞便93検体中1検体からノロウイルス Genogroup I (GI型) が、17検体からノロウイルス Genogroup II (GII型) が、それぞれ検出された。

令和5年度においても引き続き実施する。

(2) 細菌等による食中毒等関連検査

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

令和4年度は、感染源が温泉と疑われたレジオネラ症事例が1事例あり、浴場水2検体についてレジオネラ属菌の検索を行った。その結果、レジオネラ属菌は検出されなかった。

令和5年度においても引き続き実施する。

2.3 青森市及び八戸市に対する技術協力

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

(1) 食中毒等関連検査（ウイルス等・細菌等）

ア ウイルス等

令和4年度は、八戸市で発生したウイルス性食中毒(疑いを含む。)6事例について、RT-PCR法及びリアルタイムPCR法により、糞便28検体、ふき取り5検体、計33検体について原因ウイルスの検索を行った。

イ 細菌等

令和4年度は、事例がなかった。

(2) 感染症発生動向調査事業（ウイルス等・細菌等）

ア ウイルス・リケッチア・クラミジア

青森市内の医療機関が採取した材料は、21検体（糞便（直腸ぬぐい液）4検体、咽頭ぬぐい液6検体、髄液4検体、血液・血清4検体、痂皮3検体）であった。

八戸市内の医療機関が採取した材料は、4検体（喀痰1検体、咽頭ぬぐい液（鼻咽頭ぬぐい液・鼻腔ぬぐい液・鼻汁）3検体）であった。

イ 細菌等（3月末終了分）

青森市内の医療機関が採取した材料は、21検体（菌株21検体）であった。

八戸市内の医療機関が採取した材料は、15検体（菌株14検体、髄液1検体）であった。

2.4 精度管理

(1) ウイルス等

令和4年度は、厚生労働省健康局結核感染症課が感染症法に基づき実施している新型コロナウイルスに関する外部精度管理事業（次世代シーケンシング(NGS)による遺伝子の解読・解析及び核酸抽出検査）に参加し、検査技能は適正であると判定された。

令和5年度においても引き続き実施する。

(2) 細菌等

令和4年度は、公益財団法人結核予防会結核研究所で実施している結核菌遺伝子型別外部精度評価、

日水製薬株式会社で実施しているレジオネラ属菌検査精度管理サーベイ及び厚生労働科学研究（食品の安全確保推進研究事業）「食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究」で実施した MLVA 法検査精度試験に参加し、検査技能は適正であると判定された。

令和5年度においても引き続き参加する。

2.5 教育・指導

(1) 病原体等の包装・運搬に係る研修

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

令和4年度においては、依頼がなかった。

(2) 衛生検査所に対する外部精度管理

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

令和4年度においては、依頼がなかった。

2.6 健康危機管理

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

試験検査総括表（令和4年度）

分 類	事 業 等	検体数	検査項目数	検査総数
(1) ウィルス (行政検査)	① 感染症発生動向調査（ウィルス等）			
	・ インフルエンザウィルス	25	7	175
	・ RS ウィルス	5	11	55
	・ 手足口病関連ウィルス		7	
	・ ヘルパンギーナ関連ウィルス		6	
	・ 突発性発しん関連ウィルス		6	
	・ 水痘関連ウィルス	2	6	12
	・ 咽頭結膜熱関連ウィルス		3	
	・ 流行性耳下腺炎関連ウィルス	1	3	3
	・ 伝染性紅斑関連ウィルス		3	
	・ 感染性胃腸炎関連ウィルス	5	8	40
	・ 無菌性髄膜炎関連ウィルス	3	10	30
	・ 麻しん・風しん関連ウィルス		2	
	・ A 型肝炎ウィルス		1	
	・ E 型肝炎ウィルス	1	1	1
	・ 新型コロナウイルス	14,872	1	14,872
	・ その他のウィルス等	30	1	30
	② ポリオ感染源調査	108	6	648
	③ 日本脳炎感染源調査	140	1	140
	④ ウィルス性食中毒等関連検査	206	5	1,030
	小 計	15,398		17,036
(2) 細菌等	① 感染症発生動向調査（細菌等）			

(行政検査)	・腸管出血性大腸菌	16	4	64
	・カルバペネム耐性腸内細菌科細菌	30	3	90
	・ジフテリア菌	1	2	2
	・ライム病ボレリア	1	1	1
	・カルバペネム耐性緑膿菌	1	3	3
	・バンコマイシン耐性腸球菌	1	3	3
	・レジオネラ属菌	2	2	4
	・大腸菌	1	3	3
	②結核菌の遺伝子解析	24	3	72
	③病原微生物検出情報に基づく収集菌株			
	・サルモネラ属菌	41	3	123
	・エシェリキア属菌	34	3	102
	・エルシニア属菌	17	3	51
	・ビブリオ属菌	1	3	3
	・リステリア属菌	1	1	1
	小 計	171		522
	合 計	15,569		17,558

3 理化学部

3.1 試験検査

(1) 有害物質等検査

ア 国産農産物の残留農薬検査

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

令和4年度は、主に県産の農作物について次の16種54検体、1検体当たり約250項目について検査を実施した。かぶ2検体（230項目）、だいこん3検体（227項目）、きゅうり5検体（236項目）、レタス3検体（221項目）、もも2検体（231項目）、ぶどう4検体（228項目）、ねぎ1検体（234項目）、玉ねぎ5検体（241項目）、和なし2検体（239項目）、洋なし3検体（239項目）、はくさい3検体（245項目）、キャベツ2検体（245項目）、りんご8検体（233項目）、大豆4検体（229項目）、小豆1検体（232項目）及びにんにく6検体（231項目）。（ ）内の項目数は試験法の妥当性が確認された項目数

その結果、だいこん、きゅうり、レタス、もも、ぶどう、ねぎ、和なし、洋なし及びりんごからは下表に示す農薬が検出されたが、いずれも基準値未満であった。

かぶ、玉ねぎ、はくさい、キャベツ、大豆、小豆及びにんにくについては、全ての項目について定量下限未満であった。

なお、予定していたピーマン及びえだまめは、新型コロナウイルス対応のため収去が中止となった。また、かぶ、きゅうり、レタス、もも及びぶどうの一部については収去が中止となった。

令和5年度においても引き続き実施する。

検 出 農 薬

作物名	検出農薬名（検出検体数）
だいこん	オキサミル（1）
きゅうり	アゾキシストロビン（2）、プロシミドン（1）、ペルメトリン（1）
レタス	トルクロホスメチル（2）、フェンバレーレート（2）
もも	アセタミプリド（1）、テブコナゾール（1）
ぶどう	アゾキシストロビン（1）、シプロジニル（2）、シペルメトリン（1）、テブコナゾール（1）、フェニトロチオン（1）、フルジオキシニル（1）、ペルメトリン（2）
ねぎ	トルフェンピラド（1）
和なし	アセタミプリド（1）
洋なし	アセタミプリド（1）、クレソキシムメチル（2）、シフルトリン（1）、シプロジニル（1）、シペルメトリン（3）、スピロジクロフェン（1）、テブコナゾール（1）、トリフロキシストロビン（1）
りんご	アセタミプリド（3）、シフルトリン（1）、シペルメトリン（5）、スピロジクロフェン（1）、チアクロプリド（1）、トリフロキシストロビン（2）、フェニトロチオン（2）、プロパルギット（2）

イ 輸入農産物の残留農薬検査

令和4年度は、県内に流通している輸入農産物としてバナナの残留農薬検査を予定していたが、新型コロナウイルス対応のため収去が中止となった。

ウ 流通貝の貝毒検査

貝毒による食中毒を未然に防止するため、流通貝について貝毒検査を継続的に実施している。平成28年度より下痢性貝毒についてはLC-MS/MSを用いた機器分析による検査となった。令和4年度は、ホタテガイ2検体について下痢性貝毒検査を実施した結果、ジノフィシストキシン-1が1検体から検出されたが、規制値未満であった。

令和5年度においても、下痢性貝毒及び麻痺性貝毒について実施する。

エ りんごジュースのカビ毒検査

県産りんごジュースの安全性を確保するため、平成17年度から、カビ毒（パツリン）の検査を実施している。令和4年度は、10検体について検査した結果、すべて定量下限値未満であった。また、pHを測定したところ3.7～4.1であった。

令和5年度においても引き続き実施する。

オ アレルギー物質検査

令和4年度は、35検体（菓子類24検体、めん・パン類10検体、調味料及びスープ1検体）の特定原材料5品目（小麦・そば・落花生・卵・乳）について、それぞれ2種類の検査キットで検査を実施した。

その結果、乳で1検体が基準値を超過したが、収去先を調査した結果、原材料が「小麦粉」ではなく「脱脂粉乳を使用したミックス粉」であった。

なお、小麦及び卵の一部については新型コロナウイルス対応のため収去が中止となった。

令和5年度においても引き続き実施する。

カ 魚類加工品のヒスタミン検査

ヒスタミンによる食中毒を未然に防止するため、令和3年度から魚類加工品のヒスタミン検査を実施している。令和4年度は、魚類加工品6検体について検査した結果、すべて定量下限未満であった。

令和5年度においても引き続き実施する。

(2) 畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査

畜水産食品の安全性を図るため、合成抗菌剤、抗生物質及び寄生虫駆除剤についての動物用医薬品検査を実施している。令和4年度は、県内で収去された鶏卵13検体（31品目）、牛乳7検体（39品目）について検査を実施した結果、全て定量下限未満であった。

令和5年度においても引き続き実施する。

(3) 対EU輸出ホタテガイ生産海域のモニタリング検査

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

令和4年度は、1検体（野辺地1定点・年1回（11月））について、7項目（総水銀、カドミウム、鉛、ベンゾ[a]ピレン、ベンゾ[a]アントラセン、ベンゾ[b]フルオランテン、クリセン）の検査を実施した結果、総水銀、カドミウム、ベンゾ[b]フルオランテンが検出されたが、いずれもEU向けホタテガイに係る基準値未満であった。その他の項目については定量下限未満であった。

令和5年度においても引き続き実施する。

(4) 家庭用品の試買検査

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

令和5年度においても引き続き実施する。

(5) 医薬品の収去検査

不良医薬品の製造及び流通を防止するため、医薬品等一斉監視指導において収去した医薬品の検査

を実施している。令和4年度は、2検体についてプロブコールの定量試験を実施した結果、全て規格に適合していた。

令和5年度においても引き続き実施する。

(6) その他の行政検査（食中毒疑いに係る検査）

令和4年9月に津軽地方において発生したフグ内臓を喫食したことによる食中毒について、残置食品として搬入されたフグの筋肉1検体、ヒレ及び皮1検体の計2検体について、フグ毒であるテトロドトキシンの検査を実施した。検体の部位ごとに検査を行ったところ、筋肉については10 MU/g以下、ヒレ及び皮については10 MU/g以上のテトロドトキシンが検出された。

令和5年度においても健康被害、苦情事例には迅速に対応する。

3.2 精度管理調査

(1) 食品薬品安全センター秦野研究所による外部精度管理調査

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

令和4年度は、重金属（玄米のカドミウム）、残留農薬（とうもろこしペーストのアトラジン、クロロピリホス、ダイアジノン、フェントエート、フルトラニル、マラチオンの6種のうち3種）、残留動物用医薬品（鶏肉（むね）ペーストのスルファジミジン）、麻痺性貝毒（ホタテガイペースト）及びアレルギー物質（卵）（かぼちゃペースト）の5項目について実施した。いずれも結果は良好であった。

令和5年度においても引き続き実施する。

(2) 水道水質検査の外部精度管理調査

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

令和4年度は、水質検査に従事する県内4施設を対象に、六価クロム化合物並びに鉛及びその化合物について外部精度管理調査を実施した。各施設のデータをXbar-R管理図により解析した結果、鉛及びその化合物について、一つの検査機関で管理限界を超過したが、その他は全て管理限界内であった。なお、参加機関が少ないこと、各機関の鉛の測定結果の範囲（R）の値が小さく、全体のばらつきがとても小さいことから管理限界を超過した検査機関については、この結果のみをもって異常な値と判断することはできない。z-スコアによる評価は全て良好であった。

令和5年度においても引き続き実施する。

(3) 医薬品の外部精度管理調査

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

令和4年度は、カルベジローラ錠（定量法（HPLC法）及び純度試験（HPLC法））について実施した。

令和5年度においても引き続き参加する。

(4) 地域保健総合推進事業（北海道・東北・新潟ブロック）精度管理事業

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

令和4年度は、トリカブトによる食中毒を想定した精度管理（トリカブト（有姿試料及びホモジナイズした試料）及びモミジガサ（有姿試料及びホモジナイズした試料）のアコニチン、ジェサコニチン、ヒパコニチン及びメサコニチン（トリカブトの主な毒成分））を実施した。結果は良好であり、地域ブロック内での情報共有が図られた。

(5) 一般社団法人日本バイオテクノロジー認証機構（JBCO）主催による食品の技能比較試験

JBCO主催による技能試験（理化学試験：ヒスタミン）に参加した。

さば水煮缶中のヒスタミンについて分析したところ、結果は良好であった。

(6) 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所による室間共同研究

特定原材料検査（小麦）の試験室間共同試験に参加し、夾雑成分による影響の検討のため、主催者の調製した試料のアレルギー物質（小麦）の検査を行った。とりまとめ結果については令和4年度厚生労働科学研究所補助金における研究報告として、令和5年度に主催者が報告を行う予定である。

業務実績総括表（令和4年度）

分 類	部 門	事 業	検体数	項目数 /1検体	総項目数※ ²
試験検査	(1) 有害物質検査	①国産農産物の残留農薬検査 ※ ¹	54	221～245	12, 615
		②輸入農産物の残留農薬検査	0	0	0
		③流通貝の貝毒検査	2	2	4
		④りんごジュースのカビ毒検査	10	2	20
		⑤アレルギー物質検査	35	2	70
		⑥魚類加工品のヒスタミン検査	6	1	6
		小 計	107		12, 715
	(2) 畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査	①動物用医薬品検査（鶏卵）	13	31	403
		②動物用医薬品検査（牛乳）	7	39	273
		小 計	20		676
	(3) 対EU輸出ホタテガイ生産海域のモニタリング検査	環境汚染物質検査	1	7	7
		小 計	1		7
	(4) 家庭用品の試買検査	①家庭用洗剤の検査	10	4	40
		②繊維製品の検査	10	1	10
		小 計	20		50
	(5) 医薬品の収去検査		6	1	6
	(6) その他の行政検査		2	1	2
合 計		156		13, 456	
精度管理	(1) 外部精度管理調査（食品薬品安全センター）		5	1～6	11
	(2) 水道水質検査の外部精度管理調査		4	2	8
	(3) 医薬品の外部精度管理		1	2	2
	(4) 地域保健総合推進事業（北海道・東北・新潟ブロック）精度管理事業		2	4	8
	(5) 技能比較試験（JBCO）		1	1	1
	(6) 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所による 室間共同研究		8	2	16
	合 計		21		46
総 数			177		13, 502

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

※2 検体数×項目数の総和

4 公害部

4.1 大気関係

(1) 環境大気監視

弘前市2地点、黒石市1地点、五所川原市1地点、十和田市1地点、三沢市1地点、むつ市1地点、六ヶ所村1地点及び鯉ヶ沢町1地点の計9地点で大気中の二酸化硫黄(SO_2)、窒素酸化物(NO_x)、一酸化炭素(CO)、光化学オキシダント(O_x)、浮遊粒子状物質(SPM)、微小粒子状物質($\text{PM}_{2.5}$)、炭化水素(HC)について常時監視を実施した。これらのうち、環境基準が定められている6測定項目についての環境基準の達成状況は、下表のとおりであった。

測定項目	二酸化硫黄(SO_2)					二酸化窒素(NO_2)			一酸化炭素(CO)				
評価区分	有効測定	短期的評価		長期的評価		有効測定	適	否	有効測定	短期的評価		長期的評価	
		適	否	適	否					適	否	適	否
測定局数	1	1	0	1	0	8	8	0	1	1	0	1	0

測定項目	光化学オキシダント(O_x)		浮遊粒子状物質(SPM)					微小粒子状物質($\text{PM}_{2.5}$)				
評価区分	適	否	有効測定	短期的評価		長期的評価		有効測定	短期基準に関する評価		長期基準に関する評価	
				適	否	適	否		適	否	適	否
測定局数	0	4	8	7	1	8	0	2	2	0	2	0

(2) 稲わら焼却による大気汚染状況調査

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

令和5年度においても引き続き参加する。

(3) 酸性雨実態調査

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

令和5年度においても引き続き参加する。

(4) 有害大気汚染物質等モニタリング調査

有害大気汚染物質等による大気汚染の状況を把握するため、弘前市1地点において、ベンゼン等優先取組物質20物質並びに水銀及びその化合物について毎月1回の調査を実施した結果、環境基準が設定されているベンゼン等4物質及び指針値が設定されているアクリロニトリル等11物質については、いずれも基準値及び指針値を下回っていた。

令和5年度においても引き続き参加する。

(5) 微小粒子状物質($\text{PM}_{2.5}$)成分測定調査

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

令和5年度においても引き続き参加する。

(6) アスベスト調査

十和田市1地点において一般環境大気中のアスベスト濃度の測定を実施した。また、建築物解体現場等周辺地域7地点においてアスベスト濃度の測定を実施した。なお、試料採取は各環境管理部が実施した。

令和5年度においても引き続き参加する。

4.2 水質関係

(1) 公共用水域・地下水の水質測定及びクロスチェック

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

令和5年度は、クロスチェックを引き続き実施するほか、地下水の水質測定の一部を直営により実施する。

(2) 水浴場水質調査

県内 17 水浴場における水質調査（化学的酸素要求量(COD)、ふん便性大腸菌群数等）については、環境保全課において外部分析機関に委託して実施していることから、分析に関する精度を確保するため、外部機関と試料分割法によるクロスチェックを実施した。

令和5年度においても引き続き参加する。

(3) 十和田湖水質保全事業

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

令和5年度においても引き続き参加する。

(4) 排水基準監視クロスチェック

特定事業場排水の水質測定については、環境保全課において外部分析機関に委託して実施していることから、分析に関する精度を確保するため外部分析機関とクロスチェックを実施した。

令和5年度においても引き続き参加する。

4.3 騒音、振動関係

(1) 航空機騒音調査

八戸飛行場及び三沢飛行場周辺地域の航空機騒音の環境基準達成状況を把握するため、三沢市、六戸町及び六ヶ所村の各1地点並びに東北町2地点で騒音調査を実施した結果、全ての地点で環境基準を達成した。

令和5年度においても引き続き参加する。

(2) 新幹線騒音調査

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

令和5年度においても引き続き参加する。

4.4 その他

(1) 精度管理

環境省が実施する統一精度管理調査に参加し、模擬排水試料2検体（六価クロム、カドミウム、鉛、砒素、全燐）について分析した。Zスコアによる評価は、いずれの項目も満足できる結果であった。

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

令和5年度においても引き続き参加する。

(2) 行政依頼検査等

関係課からの緊急の依頼を受けた水質事故、魚類へい死等に係る分析を実施した。

業務実績総括表（令和4年度）

分類	事業	業務	地点数	検体数	分析項目数
大気	環境監視・調査	環境大気常時監視	9	—	36
		稲わら焼却による大気汚染調査	1	1	4
		酸性雨実態調査	2	52	568
		有害大気汚染物質等モニタリング調査【検体採取】	1	12	(156)
		有害大気汚染物質等モニタリング調査	1	12	96
		微小粒子状物質（PM _{2.5} ）成分測定調査【検体採取】	1	56	(168)
		微小粒子状物質（PM _{2.5} ）成分測定調査	1	56	2,128
		アスベスト調査	8	20	20
水質	水質保全	公共用水域、地下水等クロスチェック分析	—	2	6
		水浴場水質調査クロスチェック分析	—	1	1
		十和田湖水質保全事業調査	4	19	279
		排水基準監視クロスチェック分析	—	1	2
騒音	騒音防止対策	航空機騒音調査	5	—	5
		新幹線騒音調査	2	—	4
その他	精度管理	統一精度管理調査	—	2	10
		酸性雨分析精度管理調査	—	2	20
	行政依頼検査等	魚類へい死・水質事故等	7	155	444

5 研修等業務（所内研修会）

研修名	研修内容	実施日	対象者	受講者数	開催部名
特定病原体等適正管理研修（メール配信）	バイオリスク管理と病原体の管理について	2022/11/14	病原体の取扱い、管理又はこれに付随する業務に従事する者であって、管理区域内に立ち入る者	15	微生物部
GLP 食品検査の基礎（OJT）	ガラス体積計及びマイクロピペット検証の技術習得	2022/4/7	食品検査新規試験検査担当者	3	理化学部
GLP 食品検査の基礎	食品衛生検査施設等における業務管理についての知識習得	2022/4/11	食品検査新規試験検査担当者	2	理化学部
GLP 食品検査受付の基礎	食品衛生検査における受付業務の習得	2022/5/12 2022/10/24	食品検査新規受付担当者	各1	理化学部
動物飼育管理の基礎	動物実験管理体制及び実験動物を扱うための知識習得	2022/4/18	動物実験新規担当者	3	理化学部
GMP 医薬品検査の基礎	分析法のバリデーション・関係法令等についての知識習得	2022/4/15	医薬品検査新規試験検査担当者	2	理化学部
GMP 医薬品検査の基礎	日本薬局方についての知識習得	2023/2/10	医薬品検査新規試験検査担当者	2	理化学部
令和4年度青森県環境生活部出先機関等職員研究発表会「あすをひらく」	環境、公衆衛生、原子力関係の知見の習得	2023/1/27 書面	環境生活部、健康福祉部、危機管理局、各地域県民局職員		微生物部
GLP 食品検査の基礎（OJT）	ガラス体積計及びマイクロピペット検証の技術習得	2022/4/7	食品検査新規試験検査担当者	3	理化学部
GLP 食品検査の基礎	食品衛生検査施設等における業務管理についての知識習得	2022/4/11	食品検査新規試験検査担当者	2	理化学部
GLP 食品検査受付の基礎	食品衛生検査における受付業務の習得	2022/5/12 2022/10/24	食品検査新規受付担当者	各1	理化学部
動物飼育管理の基礎	動物実験管理体制及び実験動物を扱うための知識習得	2022/4/18	動物実験新規担当者	3	理化学部
GMP 医薬品検査の基礎	分析法のバリデーション・関係法令等についての知識習得	2022/4/15	医薬品検査新規試験検査担当者	2	理化学部
GMP 医薬品検査の基礎	日本薬局方についての知識習得	2023/2/10	医薬品検査新規試験検査担当者	2	理化学部

6 年間動向

(1) 講師等派遣

研修等の名称	内容 (対象者)	実施日	講師派遣部 (職員氏名)

(2) 委員会、協議会等の委員

委嘱団体等の名称	委員の名称	任 期	委員派遣部 (職員氏名)
青森県 (保健衛生課)	新型インフルエンザ等対策青森県有識者会議委員	2021/10/1 ～2023/9/30	微生物部 (坂 恭平)
青森県 (保健衛生課)	青森県感染症発生動向調査委員会委員	2021/12/6 ～2023/1/31	所 長 (長谷川寿夫)
青森県 (医療薬務課)	青森県精度管理専門委員	2020/8/31 ～2023/8/30	微生物部 (山上剛志)
青森市	青森市精度管理専門委員	2022年4月1日 ～2024年3月31日	理 化 学 部 (山本 明美)
八戸市	八戸市衛生検査所精度管理専門委員	2021年10月1日 ～2023年9月30日	理 化 学 部 (山本 明美)

(3) 令和4年度青森県環境生活部出先機関等職員研究発表会「あすをひらく」

開催日時：令和5年1月27日（金）【動画データの共有による開催（非対面形式）】

発 表 者		演 題 名
所 属	氏 名	
微生物部	山上 剛志	青森県における腸管出血性大腸菌感染症の発生動向（2013～2022年）
理化学部	田中 綾乃	フグ毒（テトロドトキシン）による食中毒事例紹介ーLC-MS/MSによる試験法の構築ー
公害部	花石 竜治	十二湖青池の呈色機構に関する研究 ～近年の取り組みと成果～
原子力センター	佐藤 康亮	モニタリングカーによる空間放射線量率測定
原子力センター	奈良 和久	労働基準法・労働安全衛生法等適用状況調査結果への対応について
理化学部	福田 理	PCR法を用いた毒きのこの種の推定【センター内ベンチャー中間報告】

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

(4) 会議・学会・研修会等出席状況

ア 会議・検討会等出席

名 称	開催地	開催月日	出席者	出席者数
リケッチアレファレンスセンタークローズ会議	Web 開催	2022/4/14	微生物部員	2
地方衛生研究所全国協議会臨時総会	Web 開催	2022/6/3	所長	1
AMED 黒田班会議（全体会議）	Web 開催	2022/6/13	微生物部員	5
AMED 黒田班会議（GenEpid-J 技術研修）	Web 開催	2022/6/14	微生物部員	4
環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究 第1回班会議	Web 開催	2022/6/21	微生物部員	1
インフルエンザ・レファレンス等関連会議	Web 開催	2022/6/23-24	微生物部員	4
AMR 研究班会議	Web 開催	2022/6/28	微生物部員	1
大腸菌レファレンス会議	Web 開催	2022/6/30	微生物部員	1
感染症流行予測調査事業担当者会議	Web 開催	2022/7/6	微生物部員	1
地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部総会	Web 開催	2022/7/7	所長	1
レジオネラレファレンス会議	Web 開催	2022/7/8	微生物部員	1
「地域保健総合推進事業」第1回地域ブロック会議	Web 開催	2022/8/30	所長	1
環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究 第2回班会議	Web 開催	2022/9/2	微生物部員	1
地方衛生研究所全国協議会総会	Web 開催	2022/10/6	所長	1
地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部微生物研究部会総会・研修会	山形市	2022/10/12-13	微生物部員	2
地方衛生研究所全国協議会北海道・東北・新潟支部公衆衛生情報研究部会総会・研修会	Web 開催	2022/10/13	微生物部員	2
動物由来感染症レファレンス Web ミーティング	Web 開催	2022/11/18	微生物部員	4
環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究 第3回班会議	Web 開催	2022/11/21	微生物部員	1
「地域保健総合推進事業」第2回地域ブロック会議	Web 開催	2022/12/22	所長	1
アデノウイルスレファレンスセンター会議	Web 開催	2022/12/26	微生物部員	3
環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究 第4回班会議	Web 開催	2023/3/1	微生物部員	1
感染症発生動向調査委員会	Web 開催	2023/3/6	所長ほか	3
AMED 第2回班会議	Web 開催	2023/3/14	微生物部員	1
令和4年度地衛研全国協議会北海道・東北・新潟支部衛生化学研究部会総会	青森市	2022/10/13～14	理化学部員	6
令和4年度「地域保健総合推進事業」地方衛生研究所地域ブロック専門家会議（理化学部門）	青森市	2022/10/14	理化学部員	6
令和3年度環境測定分析統一精度管理調査結果説明会（Web）	—	2022/7/4	公害部員	4

令和4年度全国環境研協議会支部統一精度管理ブロック会議 (Web)	—	2022/7/15	公害部員	6
国環研Ⅱ型共同研究会合 (Web)	—	2022/8/24	公害部員	1
国環研Ⅱ型共同研究会合 (Web)	—	2022/11/18	公害部員	1
国環研Ⅱ型共同研究会合 (Web)	—	2022/12/14	公害部員	1
令和4年度化学物質環境実態調査環境科学セミナー	—	2023/1/23～24	公害部員	3
国環研Ⅱ型共同研究会合 (Web)	—	2023/2/10	公害部員	1
国環研Ⅱ型共同研究会合 (Web)	—	2023/2/17	公害部員	1
国環研Ⅱ型共同研究会合 (Web)	—	2023/3/22	公害部員	1

イ 学会・研究会等出席

名 称	開催地	開催月日	出席者	出席者数
衛生微生物技術協議会第42回研究会	Web 開催	2022/6/30-7/1	微生物部員	6
第21回みちのくウイルス塾 講演会	仙台市	2022/7/23	微生物部員	1
公衆衛生情報研究協議会総会・研究会	Web 開催	2023/1/26-27	微生物部員	2
地域保健総合推進事業発表会（業務都合により、3月6日の一部のみ）	Web 開催	2023/3/6	微生物部員	1
日本食品衛生学会第118回学術講演会	長崎市	2022/11/10～11	理化学部員	1
第59回全国衛生化学技術協議会年会	川崎市	2022/10/31～11/1	理化学部員	2
令和4年度漁場環境保全関係研究開発推進会議赤潮・貝毒部会 東日本貝毒分科会（WEB参加）	—	2022/11/21～22	理化学部員	2
令和4年度地衛研全国協議会近畿支部自然毒部会研究発表会（WEB）	—	2022/11/4	理化学部員	6
大気環境学会北海道・東北支部第29回総会・研究発表会	福島県	2022/10/21	公害部員	2
プラズマ分光分析研究会第117回講演会	八戸市	2022/10/13	公害部員	3
2022年度陸水物理学会	釧路市	2022/11/5～6	公害部員	1
第38回全国環境研究所交流シンポジウム（Web）	—	2023/2/9～10	公害部員	2
第57回日本水環境学会年会	愛媛県	2023/3/15～16	公害部員	1

ウ 研修会・講習会等出席

名 称	開催地	開催月日	出席者	出席者数
ICT人材育成研修（基礎編）	Web 開催	2022/7/11-12	微生物部員	1
次世代シーケンス 新型コロナウイルスゲノム解析セミナー	Web 開催	2022/7/13	微生物部員	3
初めてのリアルタイム PCR セミナー～ポイントを押さえた確実な実験と最新情報～1. もっと基礎からわかるリアルタイム PCR	Web 開催	2022/7/14	微生物部員	2
バイオ基礎セミナー：PCRと遺伝子解析入門	Web 開催	2022/7/28, 9/6	微生物部員	2

網羅的なウイルスゲノム・薬剤耐性遺伝子検出用 NGS 試薬の案内	Web 開催	2022/7/29	微生物部員	1
これから始める人は必見！細胞培養のキホンのキ ～必要なものからやり方まで～	Web 開催	2022/8/2	微生物部員	1
初めての次世代シーケンスセミナー	Web 開催	2022/8/15	微生物部員	1
初めてのリアルタイム PCR セミナー～ポイントを押さえた確実な実験と最新情報～2. さらに活用するリアルタイム PCR	Web 開催	2022/8/23	微生物部員	1
次期感染症サーベイランスシステム研修会	Web 開催	2022/9/7	微生物部員	1
令和4年度検査機関に対する検査能力・精度管理等の向上を目的とした講習会（検査能力向上講習会）	Web 開催	2022/9/8-9	微生物部員	1
薬剤耐性菌の検査に関する研修（基本コース）	Web 開催	2022/10/5-6	微生物部員	1
サル痘対応に関する医療機関向け臨時セミナー	Web 開催	2022/10/21	微生物部員	2
信頼性確保部門研修会	Web 開催	2022/10/25	微生物部員	1
所内上映会①（全国疫学情報ネットワーク構築会議・録画配信講演）	Web 開催	2022/11/1	次長ほか	3
所内上映会②（全国疫学情報ネットワーク構築会議・録画配信講演）	Web 開催	2022/11/2	微生物部員	3
QIAGEN 感染症学シンポジウム	Web 開催	2022/11/15	微生物部員	1
アニサキスを中心とした寄生虫性食中毒に関する技術講習会	Web 開催	2022/11/17	微生物部員	3
北海道・東北・新潟ブロック腸管出血性大腸菌検査担当者 Web 研修会	Web 開催	2022/11/29	微生物部員	3
風疹実験室検査法の実地研修会	武蔵村山市	2022/11/30-12/2	微生物部員	1
地域保健総合推進事業シンポジウム	Web 開催	2022/12/7	微生物部員	1
地衛研 Web セミナー（第1回）～微生物分野におけるNGSの活用	Web 開催	2022/12/8	微生物部員	5
電子契約の一部導入に係る職員向け説明会	Web 開催	2022/12/12	微生物部員	1
これからシーケンス解析を始められる方へダイレクトシーケンス、始めてみませんか？	Web 開催	2022/12/16	微生物部員	1
レジオネラ属菌検査の内部精度管理	Web 開催	2023/1/27	微生物部員	3
感染症サーベイランスシステム2次リリース研修会	Web 開催	2023/2/6	微生物部員	1
新型コロナウイルス研究班ツール説明会（感染者数推計ツール）	Web 開催	2023/2/6	微生物部員	2
希少感染症診断技術研修会	Web 開催	2023/2/15-16	微生物部員	2
全国地方衛生研究所長会（地衛研法制化関係説明会）	Web 開催	2023/2/17	所長	1
新型コロナウイルス研究班ツール説明会	Web 開催	2023/2/20	微生物部員	2
感染症法等の改正を踏まえた保健所・地方衛生研究所の強化等に係る自治体向け説明会	Web 開催	2023/2/22	室長ほか	9
新型コロナウイルス感染症の感染症法上の位置づけの変更に伴う自治体向け説明会（第1部）	Web 開催	2023/3/20	微生物部員	1

新型コロナウイルス感染症の感染症法上の位置づけの変更に伴う自治体向け説明会（第2部）	Web 開催	2023/3/22	微生物部員	2
感染症法の一部改正に係る自治体向け説明会	Web 開催	2023/3/28	微生物部員	1
Restek Web セミナー GCにおいて異なるキャリアガスを選択するための考慮事項	Web 開催	2022/4/28	理化学部員	4
日本食品衛生学会関東ブロック公開セミナー 「残留農薬のリスク管理の動向と食品安全を支える微生物検査」	Web 開催	2022/6/6	理化学部員	4
JFRL 講習会 「食中毒とその原因となる微生物について」	Web 開催	2022/6/7	理化学部員	3
令和4年度貝毒分析研修会	横浜市	2022/10/18～21	理化学部員	1
アイスティサイエンス Web セミナー STQ 法ガイドブック徹底解説	Web 開催	2022/8/25 ほか 4回	理化学部員	各3～4
JBCO 技能試験 2022 理化学試験（ヒスタミン） フォローアップセミナー	Web 開催	2022/10/18	理化学部員	2
日本食品衛生学会関西ブロック公開セミナー 「残留農薬のリスク管理の動向とゲノム編集食品」	Web 開催	2022/12/2	理化学部員	6
島津製作所 Webinar 「食品輸出規制の最新動向 Webinar～欧州水産物規制を例に～」	Web 開催	2022/12/8	理化学部員	5
第5回日本食品衛生学会近畿地区勉強会	大阪府	2023/2/24	理化学部員	1
令和4年度地衛研全国協議会理化学部会 衛生理化学分野研修会	Web 開催	2023/2/2	理化学部員	5
実験動物管理者等研修会	Web 開催	2023/2/8	理化学部員	4
第27回 GLP 研修会（PMDA 主催）	Web 開催	2023/2/10	理化学部員	6
第38回宮城県保健環境センター研究発表会	Web 開催	2023/3/3	理化学部員	6
日本 Waters ライブ Webinar 薬局方の記載に基づく HPLC 分析法の高速化	Web 開催	2023/3/7	理化学部員	4
日本 Waters ライブ Webinar ヘリウムガス不要！APGC イオン化法を用いた高感度農薬定量分析	Web 開催	2023/3/9	理化学部員	5
令和4年度水道水質検査精度管理に関する研修	Web 開催	2023/3/10	理化学部員	6
国環研Ⅱ型共同研究試料採取研修	大阪府	2022/11/10～12	公害部員	1

Ⅲ 研 究 報 告

1 報 文

コマンドラインによる結核菌次世代シーケンスデータの再解析

高橋洋平

結核菌の次世代シーケンスデータを精査する過程で、コンタミネーションが確認されたサンプルが認められたことから、コマンドラインによる再解析を試行した。元データを結核菌とそれ以外のリードに分割し、各々のリードを解析した結果、コンタミネーションしている菌種は *M. intracellulare* であることが推定され、結核菌のリードのみを SNV 解析に供すると、SNV は 255 から 100 程度にまで減少することが明らかとなった。保存サンプルから菌株を分離して取得したデータでも同様の解析結果が得られたことから、データ処理によるコンタミネーション除去が有効な方法であることが示唆された。NGS 解析の結果は非常に高精度である一方、質の悪いデータからであっても何らかの結果を得ることができるため、誤った結果を採用しないよう、技術や知識を常にアップデートする必要があると考えられる。

Key words : *M. tuberculosis*, NGS, SNVs, WSL2, command line

1. はじめに

結核は、感染症法で二類感染症に分類され、全国で毎年 1 万人以上の患者が報告されている我が国の主要な感染症である。青森県における 2022 年の新登録結核患者数は 90 人、罹患率（人口 10 万人に対する新登録結核患者数）は 7.5 で、全国の罹患率 8.2 より低いものの、2021 年同様、青森県を除く東北 5 県での罹患率が 5 前後の中、依然東北では最も高い状態が続いている¹⁾。

結核菌の分子疫学解析に関しては、既報²⁾において、2012 年度以降に当センターに搬入された結核菌の VNTR 分析をキャピラリー電気泳動シーケンサーにより再実施し、同一又は近縁型のデータベースを再構築するとともに、同一又は類似の VNTR 型を持つ株の一部に対し次世代シーケンサー（Next Generation Sequencer; NGS）を用いたゲノム解析を実施し、VNTR 分析よりもさらに高精度の結果が得られたことを報告している。

今回、結核菌の NGS データを精査する過程で、既報²⁾で報告したネットワークを構成するサンプルの中にコンタミネーションのあるサンプルの存在が明らかとなった。そこで、この一つに着目し、NGS データを再度詳細に解析したので、その結果を報告する。

2. 方法

2.1 対象コンプレックス及び対象菌株

既報²⁾で報告したコンプレックスのうち、疫学的に関連がなく、地理的にも離れている 2 地域で VNTR が 24 領域一致した事例である Mt-18c14 を取り上げる。Mt-18c14 に含まれる 2 株のネットワーク図は図 1 に示すとおりであり、コンプレックスを構成する 2 株を、それぞれ Mt-18s14 及び Mt-18s31 と呼ぶこととする。既報²⁾では、両株の VNTR パターンは完全に一致した一方、比較ゲノム解析では SNV 数が 255 となり、直接的な伝播の可能性は否定的と推察された事例である。

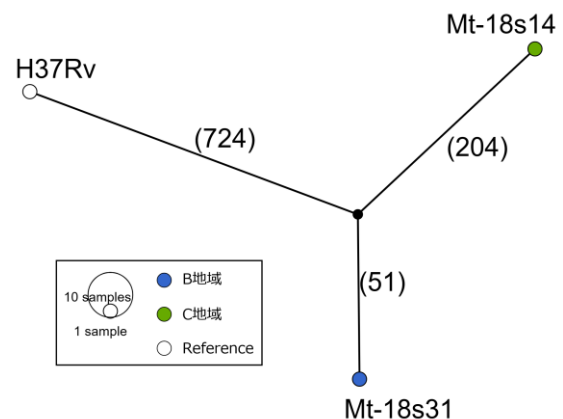


図 1 既報²⁾において TGS-TB により解析した Mt-18c14 のネットワーク図

2.2 再解析の経緯

研究協力⁴⁾により提供を受けた Mt-18s14 の fastq を *de novo* アセンブルに付したところ、計算が終了せず、プログラムを強制的に停止させることとなった。アセンブラーを変更して再度 *de novo* アセンブルしたところ、計算は最後まで進んだものの、生成したコンティグ長の合計が 10.1 Mbp と、結核菌のゲノム長である約 4.4 Mbp の 2 倍を超える数値となった。このことから、当該 fastq には結核菌以外の生物種がコンタミネーションしている可能性が高いと判断し、ネットワークを含めて再解析することとした。

2.3 コマンドラインによるデータ解析

NGS データの解析には、WSL2²⁴⁾をインストールした Windows 11 の PC を使用し、Linux 上でコマンドラインによる解析を実施した。ディストリビューションは Ubuntu 22.04.3 LTS、シェルは zsh とし、prezto²⁵⁾を導入して操作性を向上させた。PC のスペックとして、CPU は Intel Core i7-1185G7, 3.0 GHz (4 コア 8 スレッド)、実装 RAM は 32 GB のうち 24 GB を WSL2 に割り当て、スワップは 0 GB とした。WSL2、Linux、コマンドライン、シェルスクリプト及びバイオインフォマティクス関連の基礎となる知識や技術、基本的な操作方法の習得には、成書²⁶⁾及び Web サイト²⁷⁾を参照したほか、Web 検索を活用した。

実際の解析には表 1 に掲げるツールを使用し、ツールの管理にはパッケージマネージャー Bioconda²³⁾を使用した。解析の流れを要約すると以下のとおりである。

研究協力⁴⁾により提供を受けた Mt-18s14 の paired end fastq を H37Rv にマッピングし、マッピングされるリードとマッピングされないリードに分割した後、各々の fastq のクオリティトリミング及びクオリティチェックを行った。続いて、H37Rv に対してマッピングされなかった fastq を *de novo* アセンブルし、得られたドラフトゲノムに対して菌種及びコンタミネーションの確認を行った。また、H37Rv に対してマッピングされた fastq は、*de novo* アセンブル、菌種及びコンタミネーションの確認に続き、結核菌プロファイリング及び Mt-18s31 との比較解析を行った。比較解析の外群には H37Rv (RefSeq アクセッション番号 NC_000962.3) を置いた。一連の解析工程はシェルスクリプト化し、簡単なコマンド入力によりある程度自動で解析が進むようにした。シェルスクリプトの作成及び一部のファイルの閲覧には Visual Studio Code²⁸⁾を、SNV

解析の結果を基にした Median-Joining Network²⁹⁾による作図には PopART³⁰⁾を使用した。

2.4 保存菌株の再培養、DNA 抽出及びデータ取得

凍結保存していた Mt-18s14 を新たにビット培地 (極東製薬) に接種し、36°C で約 1 か月培養した後、発育したコロニーの形態を観察した。ビット培地において、微小なコロニー及び比較的大きめのラフ型コロニーをビット培地に継代し、36°C で約 7 週間培養した菌体を DNA 抽出に付した。DNA 抽出及び精製には、PowerBead Tubes, Glass 0.5 mm (QIAGEN) 及び Monarch Genomic DNA Purification Kit (New England Biolab) を用い、操作はキットのプロトコルを参考に次のとおりとした。すなわち、PowerBead Tube に 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 150 µL、Tissue Lysis Buffer 150 µL、Proteinase K 15 µL 及び 1 µL ループ約 5 回分の菌体を入れ、MN Bead Tube Holder (マッハライナーゲル/タカラバイオ) を取り付けた Voltex Genie 2 (Scientific Industries) にセットし、Speed 7 で 5 分間ボルテックスして菌体を破碎した。処理後のバイアルを 10,000 × *g* で 1 分間遠心分離し、70 °C で 10 分間加熱後、再度 10,000 × *g* で 1 分間遠心分離し、得られた上清 150~200 µL を回収した。回収した上清に Binding Buffer 400 µL を加え、その後の精製操作はキットのプロトコルに従った。なお、バイアルの蓋を開放して行う操作は、全て安全キャビネット内で実施した。

得られた DNA 溶液の純度及び濃度を NanoDrop One^c spectrometer (Thermo Scientific)、Qubit 4 Fluorometer dsDNA HS (Invitrogen) により評価した後、QIAseq FX DNA Library UDI Kit (QIAGEN) を用いてライブラリーを作製し、50×の Coverage depth を目標に iSeq100 システム (Illumina) でデータを取得した。

3. 結果

3.1 NGS データ解析

Mt-18s14 の fastq を H37Rv に対するマッピングにより分割した後の統計値は表 2 のとおりであった。このことから、提供されたリードには、結核菌に由来しないリードが少なくとも約 20%含まれることが推測された。なお、元の fastq はデータ量が大きく、リード分割後も解析可能なデータ量が残った。

H37Rv にマッピングされなかったリードを DFAST_QC¹⁴⁻¹⁶⁾により評価したところ、生物種は *M. intracellulare* (ANI 99.2523, Completeness 95.06, Contamination 5.95, Strain heterogeneity 2.56) であった。また、*de novo* アセンブル後のドラフトゲノム

長は約 5.58 Mb であり、*M. intracellulare* のゲノム長 (RefSeq アクセッション番号 NZ_085945.1) と大きな差はなかった。このことから、Mt-18s14 のデータには *M. intracellulare* がコンタミネーションしていることが推定された。

また、H37Rv にマッピングされたリードも併せて DFAST_QC¹⁴⁻¹⁶⁾により評価した結果、生物種は *M. tuberculosis* (ANI 99.9601、Completeness 98.41、Contamination 0.44、Strain heterogeneity 33.33) であり、*de novo* アセンブル後のゲノム長は結核菌のゲノム長として適切な約 4.35 Mb であった。このことから、得られたデータは下流の解析に支障がない程度までコンタミネーション由来のリードが除去できているものと判断し、Mt-18s31 との比較解析に進んだ。その結果、抽出された SNV 数は Snippy¹⁹⁾ で 117 SNVs、MTBseq²²⁾ で 100 SNVs となり、いずれも既報²⁾の 255 SNVs から大きく減少した。図 2 には、MTBseq で抽出した SNVs を元に描画したネットワーク図を示した。

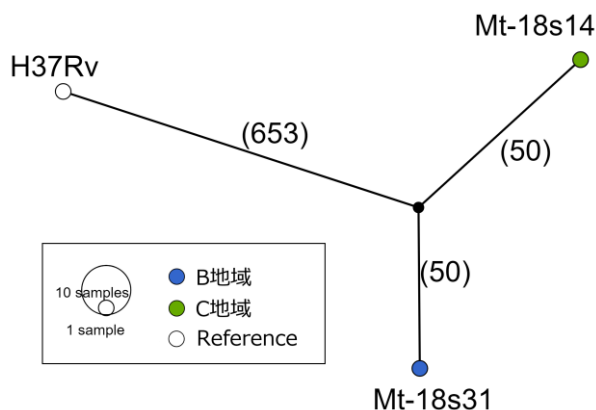


図 2 データ処理後 MTBseq²²⁾により再解析した Mt-18c14 のネットワーク図

3.2 保存菌株の再培養及びデータ取得

凍結保存してあった株を再度培養し観察したところ、ビット培地上において、微小なコロニー及び比較的大きめのラフ型コロニーの混在が認められた。このことから、当センターで初めに凍結保存した段階で、Mt-18s14 には既にコンタミネーションがあったことが判明した。

確認された 2 種のコロニーを継代培養し、DNA 抽出を経て NGS 解析に供したところ、微小なコロニーは *M. intracellulare* (ANI 99.3401、Completeness 97.71、Contamination 3.32、Strain heterogeneity 0.00)、ラフ型コロニーは *M. tuberculosis* (ANI 99.9374、Completeness 98.41、Contamination 0.31、Strain heterogeneity 0.00) であることが明らかとなった。

M. tuberculosis と同定された菌株のデータと Mt-18s31 のデータを用いて比較解析を実施したところ、抽出された SNV 数は Snippy¹⁹⁾で 117 SNVs、MTBseq²²⁾で 100 SNVs となり、データ処理によりコンタミネーションを除去したリードと同様の解析結果となった。

4. 考察

既報²⁾において、国立感染症研究所の結核菌解析用パイプライン TGS-TB³⁾は、NGS データのアップロードにより解析が可能であり、系統や薬剤感受性予測に関するデータも得られるため、結核菌のゲノム解析に非常に有用であったことを述べた。しかし、2023 年途中から TGS-TB は使用できない状態が継続しており、取得したデータの詳細な解析が困難となったため、結核菌 NGS データの解析をコマンドライン主体の手法に切り替えた。

Web ベースのパイプラインは、操作が簡便である一方、アップロード先のサーバーにトラブル等があった場合、解析が完全に止まってしまう恐れがある。このため、Web ベースパイプラインを日常的に使用する場合であっても、有料ツールや他のパイプライン等の代替法を準備しておくことは重要と考えられる。コマンドラインを用いる場合、相応の習熟時間を必要とするが、既存のツールよりも解析の自由度が高い上、コマンドラインの知識がパイプライン等で出力されたデータのトラブル解決に有用なことがあるため、使用可能な環境の整備は有益と推察される。

NGS データの解析において、測定機器から得られた fastq をパイプラインにアップロードして解析する場合、正否を問わず何らかのデータは得ることができると思われる。しかし、本報告のように、実際にはデータの質が悪く、そのデータを元に誤った結果が導かれている可能性がある。このため、NGS 解析を実施する場合、あらかじめデータのコンタミネーションやクオリティのチェックをし、解析結果がどのようなデータからどのような過程を経て得られた結果なのかを把握しておくことが非常に重要と考えられる。今回の場合においても、あらかじめデータのクオリティチェックをしておけば再解析を回避できたものであることから、結果をそのまま鵜呑みにすることの危険性を再認識した。

今回、NGS データの再解析にあたり、元の NGS データを結核菌とそれ以外のリードに振り分ける工程を試行し、データ処理によりコンタミネーション除去した場合と実際の分離菌株からデータ取得

した場合と同様の比較解析結果が得られた。データ中にコンタミネーションの存在が判明した場合、菌株を再分離し、純培養菌にした後再度 NGS 解析するのが最良ではあるが、結核菌は培養に時間を要するため、データ処理によりコンタミネーションしているリードを分離し、菌種を推定する方法には利点があるものと思われる。また、NGS は、解析単価が下がってきたとはいえ、いまだ従来の方法よりは高コストである。測定したデータが無駄にせず、データ解析により活用方法を見出すこともまた重要であると考ええる。

また、本報告では、株間の比較解析に Snippy¹⁹⁾ 及び MTBseq²²⁾を使用した。これら 2 つツールでは、比較解析の際に SNV のカウントをしないマスク領域のほか、SNV 抽出方法やパラメータが異なっているため、検出される SNV の数もそれに伴い異なることとなる。本報告では、Snippy におけるマスク領域の設定には、当該 web サイト¹⁹⁾で公開されている bed ファイルを用いた。当該ファイルは TGS-TB³⁾のマスク領域を基に作成されているため、SNV 抽出方法やパラメータは若干異なるものの、マスクされる領域は TGS-TB とほぼ同一と考えられる。一方、MTBseq では、マスク領域に PE/PPE 領域³¹⁾及び薬剤感受性関係遺伝子の変異が含まれている。このように、NGS データの解析では、用いたツール、ツールの特徴、他のツールとの違いの概要を把握し、結果導出までの過程を理解しておくことが重要で、ひいては誤判定の回避にもつながるものと考えられる。今回の事例では、いずれのツールを用いた場合も 2 株間の直接的な伝播の可能性は否定的と推察される結果となったが、SNVs が数箇所となるような近縁の株同士の場合は、2 つ以上のツールを用いて結果を比較することで、より確実性の高い結論を導くことができると推察される。

5. まとめ

今回、既報²⁾で報告したコンプレックス Mt-18c14 を構成する Mt-18s14 の NGS データにコンタミネーションが確認された。再解析にあたり、既報において解析に用いた TGS-TB が使用できなくなったことから、コマンドラインによる再解析を試行した。元リードを結核菌とそれ以外のリードに分割し、各々のリードを解析したところ、コンタミネーションしている菌種は *M. intracellulare* であり、それに由来するリードを除いた結核菌のデータで比較解析を再実施すると、Mt-18s31 との SNV は 255 から 100 程度にまで減少することが明らかとなった。保

存サンプルから菌株を分離して取得したデータでも同様の解析結果が得られたことから、データ処理によるコンタミネーション除去が有効な方法であることが示唆された。

NGS 解析の結果は非常に高精度である一方、質の悪いデータからであっても何らかの結果を得ることができる。誤った結果を採用しないよう、データの質の確認、解析工程、解析に用いたツール及びその概要、得られた結果の解釈等、技術や知識を常にアップデートすることが必要である。サンプル調製からデータ解析まで、NGS をブラックボックスのまま使用せず、理解を深めていくことが良質な結果を得ることにつながっていくと思われる。

今回の報告内容を踏まえ、今後も結核菌の VNTR 分析と NGS 解析を継続し、良質なデータを基にして疫学調査につなげ、県内の結核対策に貢献していきたい。

謝 辞

研究協力⁴⁾により NGS データを提供いただいた、公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部 御手洗聡先生、村瀬良朗先生に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 青森県結核の概要 2022. https://www.pref.aomori.lg.jp/soshiki/kenko/hoken/files/01_2022gaiyou.pdf 令和 6 年 2 月 5 日閲覧。
- 2) 高橋洋平ほか：青森県内で検出された結核菌の VNTR 分析及びゲノム比較による分子疫学解析の検討。青森県環境保健センター年報, **33**, 21-29, 2022
- 3) Sekizuka T. et al: TGS-TB: Total Genotyping Solution for *Mycobacterium tuberculosis* Using Short-Read Whole-Genome Sequencing. *PLoS One*, **10**, e0142951, 2015
- 4) 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「オミックス情報に基づく結核感染制御技術の開発研究」(主任研究者:御手洗 聡) 「東北地区における結核菌ゲノム分子疫学調査研究」：研究成果報告会・技術研修会資料, 2021 年 3 月 19 日
- 5) (a) Langmead, B et al: Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*, **9**, 357-359, 2012. (b) <https://github.com/BenLangmead/bowtie2>
- 6) (a) Chen, S.: Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp. *iMeta* **2**, e107, 2023. <https://doi.org/10.1002/imt>

- 2.107 (b) Chen, S. et al.: fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, **34**, i884-i890, 2018. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560> (c) <https://github.com/OpenGene/fastp>
- 7) (a) <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (b) <https://github.com/s-andrews/FastQC>
- 8) (a) Shen, W. et al.: SeqKit: a cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0163962 (b) <https://github.com/shenwei356/seqkit> (c) <https://bioinf.shenwei.me/seqkit/>
- 9) <https://github.com/tseemann/shovill>
- 10) Souvorov, A. et al.: SKESA: strategic k-mer extension for scrupulous assemblies. *Genome Biol.*, **19**, 153, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1540-z>
- 11) Prjibelski, A. et al.: Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr. Protoc. Bioinformatics*, **70**, e102, 2020. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
- 12) (a) Gurevich, A. et al.: QUAST: quality assessment tool for genome assemblies, *Bioinformatics*, **29**, 1072-1075, 2013. (b) <https://quast.sourceforge.net/> (c) <https://github.com/ablab/quast>
- 13) Ewels, P. et al.: MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, **32**, 3047-3048, 2016. doi: 10.1093/bioinformatics/btw354 (b) <https://multiqc.info/> (c) <https://github.com/ewels/MultiQC>
- 14) https://github.com/nigyt/dfast_qc
- 15) Jain, C. et al.: High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun.*, **9**, 5114, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- 16) Donovan, H. et al.: CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.*, **25**: 1043-1055, 2015. doi:10.1101/gr.186072.114
- 17) (a) Wood, D.E. et al.: Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.*, **20**, 257, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0> (b) <https://github.com/DerrickWood/kraken2>
- 18) (a) Phelan, J. et al.: Integrating informatics tools and portable sequencing technology for rapid detection of resistance to anti-tuberculous drugs. *Genome Med.*, **11**, 41, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0650-x> DB: c2fb9a2 (b) <https://github.com/jodyphelan/TBProfiler> (c) <https://jodyphelan.github.io/TBProfiler/en/>
- 19) <https://github.com/tseemann/snippy>
- 20) (a) Page, A. J. et al.: SNP-sites: rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments. *Microb. Genom.*, **2**, 2016. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000056> (b) <https://github.com/sanger-pathogens/snp-sites>
- 21) <https://github.com/tseemann/snp-dists>
- 22) (a) Kohl, T. A. et al.: MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *PeerJ*, **6**, e5895, 2018. <https://doi.org/10.7717/peerj.5895> (b) https://github.com/ngs-fzb/MTBseq_source
- 23) (a) Grüning, B. et al.: Bioconda: sustainable and comprehensive software distribution for the life sciences. *Nat Methods* **15**, 475-476, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0046-7> (b) <https://bioconda.github.io/>
- 24) <https://learn.microsoft.com/ja-jp/windows/wsl/>
- 25) <https://github.com/sorin-ionscu/prezto>
- 26) (a) 西村めぐみ : Linux+コマンド入門 シェルとコマンドライン、基本の力 (WEB+DB PRESS plus シリーズ) . 技術評論社, 東京, 2021. (b) 西村めぐみ他 : [新版 zsh&bash 対応] macOS×コマンド入門 ターミナルとコマンドライン、基本の力 (WEB+DB PRESS plus シリーズ) . 技術評論社, 東京, 2020. (c) 山森丈範 : [改訂第 3 版]シェルスクリプト基本リファレンス —#!/bin/sh で、ここまでできる (WEB+DB PRESS plus シリーズ) . 技術評論社, 東京, 2017. (d) 清水厚志他編著 : 次世代シーケンサー DRY 解析教本 改訂第 2 版. 学研メディカル秀潤社, 東京, 2019. (e) 坊農秀雅 : Dr. Bono の生命科学データ解析 第 2 版. メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 2021. (f) 坊農秀雅 : 生命科学者のための Dr. Bono データ解析実践道場. メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 2019.
- 27) (a) <https://kazumaxneo.hatenablog.com/> (b) <http://biopapyrus.jp/> (c) <https://qiita.com/>
- 28) <https://azure.microsoft.com/ja-jp/products/visual-studio-code/>
- 29) Bandelt, H. et al.: Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, **16**, 37-48, 1999.
- 30) Leigh, J. W. et al.: PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.*, **6**, 1110-1116, 2015; <https://popart.maths.otago.ac.nz/>
- 31) 松村和典ほか : 結核菌タンパク質 PE_PGRS の

機能解析. エンドトキシン・自然免疫研究, **23**,
59-63, 2020.

表 1 データ解析において使用したツール

解析工程	ツール名	バージョン	文献
マッピングによるリードの分割	Bowtie2	2.5.1	5
リードのトリミング	fastp	0.23.4	6
fastq の品質評価	FastQC	0.12.1	7
各種統計値の算出	SeqKit	2.5.1	8
<i>de novo</i> アセンブル	Shovill	1.1.0	9
	SKESA	2.4.0	10
	SPAdes	3.15.3	11
アセンブル後の評価	QUAST	5.2.0	12
解析結果の統合	MultiQC	1.17	13
菌種同定、コンタミ確認	DFAST_QC	0.5.7	14
	FastANI	1.32	15
	CheckM	1.2.2	16
リードの分類	Kraken2	2.1.2	17
プロファイリング	TBProfiler	4.4.0	18
SNV 解析	Snippy	4.6.0	19
SNV の抽出	SNP-sites	2.5.1	20
SNV のカウント	SNP-dists	0.8.2	21
SNV 解析、プロファイリング	MTBseq	1.1.0	22

表 2 リード分割後の各種統計値 (クオリティトリミング前、Seqkit⁸⁾ により算出)

リード名*	リード数	合計塩基数	平均リード長	Q20(%)	Q30(%)	GC (%)
Mt-18s14-raw_R1	2028032	296468831	146.2	95.17	91.62	65.32
Mt-18s14-raw_R2	2028032	303710431	149.8	92.91	89.04	65.56
Mt-18s14-al_R1	1583102	237017207	149.7	96.32	92.79	65.48
Mt-18s14-al_R2	1583102	237016025	149.7	95.94	92.37	65.44
Mt-18s14-un_R1	444930	59451624	133.6	90.56	86.96	64.69
Mt-18s14-un_R2	444930	66694406	149.9	82.16	77.23	65.99

*raw: 元データ ; al: H37Rv にマッピングされたリード ; un: H37Rv にマッピングされなかったリード

Command line reanalysis of *Mycobacterium tuberculosis* next-generation sequencing data

Yohei Takahashi

In the course of detailed evaluations of *M. tuberculosis* next-generation sequencing data, the sample was confirmed to show contamination and, thus, an attempt was made to perform a reanalysis using command line. The original data was divided into *M. tuberculosis* and other leads, and each lead was analyzed. The contaminated bacterial species was estimated to be *M. intracellulare* and SNVs were found to decrease from approximately 255 to 100 when *M. tuberculosis* leads alone were subjected to SNV analyses. Similar analysis results obtained with data attained by isolating strains from stored samples suggested that removal of contamination through data processing was an effective method. While the results of NGS analyses are very precise, results can be obtained even from poor quality data and, thus, performing constant updates of technology and updating knowledge is considered necessary to avoid adopting erroneous results.

Keywords: *M. tuberculosis*, NGS, SNVs, WSL2, command line

分子生物学的手法による顎口虫の虫種同定

高橋洋平 小笠原和彦

2022 年秋、青森県内で顎口虫感染による皮膚爬行症患者が数百人規模で確認される事例が発生した。このことを受け、当センターでは、分子生物学的手法による顎口虫の虫種同定を検討した。形態学的試験により日本顎口虫と同定された第 3 齢幼虫 1 虫体から DNA を抽出し、6 セットのプライマーを用いて PCR を実施した。得られた増幅産物をダイレクトシーケンスに付した結果、4 領域のコンセンサス配列が日本顎口虫の塩基配列のみと 100%一致した。また、ヒトに皮膚爬行症を引き起こすとされる顎口虫 5 種の参照配列と用いたプライマーセット 6 セットを *in silico* で精査した結果、いずれの虫種も分子生物学的手法で同定できることが示唆された。

Key words : *Gnathostoma*, creeping disease, identification, sequence, ITS2

1. はじめに

顎口虫 *Gnathostoma* spp. は、ヒトに皮膚爬行症（クリーピング病）を引き起こす寄生蠕虫の一種であり、ドロレス顎口虫 *G. doloresi*, 日本顎口虫 *G. nipponicum*, 有棘顎口虫 *G. spinigerum*, 剛棘顎口虫 *G. hispidum*, 二核顎口虫 *G. binucleatum* の 5 種がヒトに皮膚爬行症を引き起こす病原体として知られている^{1,4,5)}。このうち日本国内では、前述のうち二核顎口虫を除く 4 種が報告されている^{2,3)}。

顎口虫は、イヌ、ネコ、ブタ、イノシシ、イタチ等の哺乳類を終宿主とし、その胃壁に成虫として寄生する。終宿主から排出された虫卵は淡水中で発育孵化し、第 1 中間宿主のケンミジンコに摂取され成長する。これらを第 2 中間宿主であるドジョウ、ナマズ、ブラックバス、ライギョ等の淡水魚や両生類が摂取すると、その筋肉内で、ヒトに感染性を有する第 3 齢幼虫まで成長する。ヒトは非固有宿主ではあるが、第 2 中間宿主及びマムシや鳥類等の待機宿主を加熱不十分のまま摂取すると、顎口虫感染のリスクが生じる。顎口虫幼虫はヒトに摂取されると、腸壁を穿通し、皮下を移行して皮膚爬行症を引き起こす¹⁾。

青森県内では、2022 年 9 月下旬から 11 月下旬の

間に、皮膚爬行症患者が医療機関を受診し、一部の患者病変から顎口虫が検出される事例が発生した。2023 年 5 月 12 日時点で 306 名の患者が確認され、患者の多くが非加熱のシラウオを喫食していたことが分かっている³⁾。しかし、現在のところシラウオから顎口虫は検出されておらず、現時点では原因の特定に至っていない。

顎口虫の虫種を同定する場合、第 3 齢幼虫の形態学的観察が一般的である²⁾が、当センターでは、Ando ら⁴⁾、Korekawa ら⁵⁾の報告をもとに、分子生物学的手法による分離虫体の虫種同定を検討することとした。

Ando らは、前述 5 種の顎口虫について、染色体 DNA 中の 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S 領域及びミトコンドリア DNA 中の MCO1 領域の種多様性を調べ、ITS2 領域及び MCO1 領域が同定に有用であると述べている⁴⁾。一方、Korekawa らは、ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルから抽出した虫体 DNA を用いて *G. nipponicum* を同定できるプライマーを報告している⁵⁾。

今回、*G. nipponicum* 虫体からの DNA 抽出、PCR、ダイレクトシーケンス及び塩基配列検索の検討結果に加え、ヒトに皮膚爬行症を引き起こすとされる

顎口虫 5 種の参照配列とプライマーセットを *in silico* で精査したので報告する。

2. 材料と方法

2.1 材料

ドジョウから分離された *G. nipponicum* の第 3 齢幼虫を用いた。虫体は、試験に供するまで 1.5mL マイクロチューブ中 -30℃ で凍結保存した。

2.2 方法

(1) DNA 抽出

虫体からの DNA 抽出には QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用い、組織からの DNA 抽出プロトコルに従った。すなわち、Proteinase K 溶液中、一晩かけ虫体を溶解し、プロトコルに従って DNA を精製した。DNA の溶出は 50 µL の溶出バッファーで行い、溶出液を PCR テンプレートとして使用した。

(2) PCR

表 1 に示すプライマー 6 セットを用いて PCR を実施した。実施にあたっては、表 2 に示したアクセッション番号を参照配列として、Primer-BLAST⁹⁾ を用いて期待される増幅産物長をあらかじめ調べた。なお、検索の過程で、Korekawa らの報告⁵⁾において ITS1 を増幅するとされている ITS/GN/F3 – ITS/GN/R1 のプライマーセットが ITS2 を、ITS2 を増幅するとされている ITS/GN/F4 – ITS/GN/R3 のプライマーセットが ITS1 を増幅することが分かったため、本報告では修正して記載した。PCR 試薬には EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (タカラバイオ) を用い、反応条件は、94℃ で 5 分間の初期熱変性後、94℃ で 30 秒、52℃ で 30 秒、72℃ で 60 秒の工程を 35 サイクル後、最終伸長を 72℃ で 7 分間とした。PCR 後、反応液を 2% アガロースゲルで電気泳動し、増幅の有無を確認した。

(3) ダイレクトシーケンス

PCR で得られた増幅産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) により精製し、得られた精製産物をテンプレートとして、PCR と同じプライマー及び BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。反応後、AutoSeq G-50 (cytiva) 又は DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN) により反応産物を精製し、3500 genetic analyzer (Applied Biosystems) によりシーケンス解析を実施した。得られたフォワード及びリバースのシーケンスデータを GeneStudio Professional Edition ver. 2.2.0.0 (GeneStudio, Inc) によりアセンブルし、コンセンサス配列を得た。

(4) 配列検索

ダイレクトシーケンスにより得られたコンセンサス配列からプライマー配列を除き、表 2 に示す顎口虫 5 種の参照配列と BLASTn 検索⁷⁾により比較した。

(5) 参照配列とプライマーの精査

ヒトに皮膚爬行症を引き起こすとされる顎口虫 5 種の参照配列と今回用いたプライマー 6 セットを SnapGene Viewer ver. 7.1 (GSL Biotech 社) により可視化し、プライマーのアニーリング位置と不一致塩基数を調べた。

3. 結果

3.1 DNA 抽出

前述の方法に従い 1 虫体から抽出した DNA 溶液の濃度は、NanoDrop One^c spectrometer (Thermo Scientific)、Qubit 4 Fluorometer dsDNA HS (Invitrogen) いずれの測定方法でも測定下限未満であった。

3.2 PCR

6 セットのプライマーいずれの領域においても良好な反応効率でほぼ単一のバンドを検出することができた。アガロースゲル上で確認できる範囲では、増幅産物長はいずれも *G. nipponicum* で期待される鎖長と概ね一致した。

3.3 ダイレクトシーケンス

PCR で得られた増幅産物計 6 領域のうち 5 領域でコンセンサス配列を得ることができた。しかし、ミトコンドリアの MCO1 領域を標的としたプライマーセット FH5 – MCO1B のシーケンスデータを確認したところ、得られた波形に弱い別の波形が重なって観測されており、PCR において複数の配列が増幅されている可能性が否定できなかったため、その後の解析から除外した。Lim1657 – 58S2 のプライマーセットで増幅された 1 領域においては、シーケンス途中で波形が消失し、良好な結果を得ることができなかった。

3.4 配列検索

コンセンサス配列が得られた 4 領域 (LC1 – HC2: 585bp; ITS/GN/F3 – ITS/GN/R1: 154bp; ITS/GN/F2 – ITS/GN/R5: 203bp; ITS/GN/F4 – ITS/GN/R3: 172bp) は、いずれもカバー率 100% で *G. nipponicum* の配列のみと 100% 一致した。

3.5 参照配列とプライマーの精査

顎口虫 5 種の参照配列とプライマー 6 セットの比較結果は表 2 に示すとおりであり、5 種全てで不一致塩基数が 0 となったプライマーは、58S2、

ITS/GN/R3, ITS/GN/F2, ITS/GN/R1 の 4 本であった。

4. 考察

4.1 DNA 抽出

今回材料として用いた日本顎口虫 *G. nipponicum* からの DNA 抽出は、組織からの DNA 抽出が可能な市販の DNA 抽出キットを用いて抽出することが可能であった。他の顎口虫 *Gnathostoma* spp. も、同様の方法により DNA 抽出が可能と考えられる。

4.2 PCR

PCR は、文献⁴⁵⁾に記載のプライマーを用い、前述の反応条件に付すことで、6 領域全てを良好に増幅することができた。このうち、Ando ら⁴⁾が報告している ITS1 とその周辺を増幅するプライマーセット Lim1657 – 58S2 においては、シークエンス解析は困難である一方、日本国内で報告のある顎口虫 4 種のうち、*G. nipponicum* のみで 1 kb を超える増幅産物が得られるため、この領域の PCR は *G. nipponicum* の同定には有効と考えられる。

4.3 ダイレクトシークエンス、配列検索及び参照配列とプライマーの精査

Ando らの報告⁴⁾では、ヒトに皮膚爬行症を引き起こす顎口虫 5 種のミトコンドリア MCO1 領域は多様性が高く、虫種同定に有用であることが述べられている。このことを踏まえると、当該領域の塩基配列比較から *G. nipponicum* 以外の顎口虫の同定も可能であると考えられるが、多様性の高さゆえ、数種の顎口虫に配列の不一致なく幅広く適用できるプライマーの設計は困難であることが予想される。今回の検討においても、当該領域では良質なコンセンサス配列を得ることができなかったため、定法として当該配列を虫種同定に用いるのは困難と推察される。

また、シークエンス途中で波形が消失した Lim1657 – 58S2 領域について、Ando らは、ITS1 領域の塩基配列には多様性がある一方、シークエンス解析が困難であると述べている⁴⁾。そこで、参照配列について、当該プライマーセットの標的となっている領域の塩基配列をあらためて確認したところ、ITS1 の配列中に繰り返し配列が存在していることが判明した。このことがシークエンスを困難にしている可能性が考えられる。

一方、今回の検討において良好な結果を得ることができた 4 領域のうち、3 領域が ITS2 を標的としたものであった。ITS2 はシークエンス解析が容易であることに加え、虫種ごとの多様性も高いことから、虫種同定に非常に有用な領域であるといえる。今回

入手できた虫体は *G. nipponicum* のみであり、これ以外の虫種は実際に検証できていないが、BLASTn 検索⁷⁾の結果からは、*G. nipponicum* 以外の顎口虫も同じ手法で同定が可能と考えられる。参照配列との比較にあたっては、プライマーの配列にミスマッチが含まれる領域が多いことから、コンセンサス配列からプライマー配列を除いて検索する必要がある。

また、Korekawa ら⁵⁾のプライマーと参照配列を *in silico* で精査したところ、図 1 に示すとおり、ITS/GN/F2 は 5.8S rRNA の末端、ITS/GN/R1 は 28S rRNA の先端に設計されており、これら 2 つのプライマーを用いると、rRNA の配列を含まない ITS2 のみの配列全長を増幅できる可能性が示唆された。5.8S rRNA 及び 28S rRNA は顎口虫ではよく保存されており、ITS/GN/F2 – ITS/GN/R1 のプライマーセットは 5 種の顎口虫全てで参照配列とのミスマッチを含まないことから、状態の良い虫体の抽出 DNA を用いることができる場合、ITS2 の全長を標的とした精度の高い虫種同定ができる可能性がある。一方、ホルマリン固定パラフィン包埋虫体から抽出した DNA では、DNA が損傷を受けていると考えられることから、*G. nipponicum* の同定には標的配列長の短い Korekawa らの方法⁵⁾が効果的と考えられる。

5. まとめ

本報告では、Ando ら⁴⁾、Korekawa ら⁵⁾の報告を基に、日本顎口虫 *G. nipponicum* を材料として、分子生物学的手法による顎口虫 *Gnathostoma* spp. の虫種同定を検討した。形態学的試験により *G. nipponicum* と同定された第 3 齢幼虫 1 虫体から DNA を抽出し、6 セットのプライマーを用いて PCR を実施した。得られた増幅産物をダイレクトシークエンスに付した結果、4 領域のコンセンサス配列が *G. nipponicum* の塩基配列のみと 100% 一致した。さらに、ヒトに皮膚爬行症を引き起こす顎口虫 5 種の参照配列とプライマー 6 セットを *in silico* で精査した結果、いずれの虫種も分子生物学的手法で同定できることが示唆された。

顎口虫の同定は、形態学的鑑別が標準的な手法となっている。しかし、顎口虫第 3 齢幼虫は全長 2 mm 程度と小さく、確実な虫種同定には経験と知識が必要であることから、試験員の異動等がある場合、安定した結果判定や技術伝達には困難が伴う。今回検討した分子生物学的手法は、細菌等の菌種同定にも用いられる一般的な手法であることから、プロトコル等の作成や試験員のトレーニングも比較的容易と推察される。今後、顎口虫による健康被害があった

場合に、本法を適用し、迅速に虫種同定することで公衆衛生対策の一助としたい。

謝 辞

日本顎口虫の虫体を分与いただいた、北里大学獣医学部獣医寄生虫学研究室の筏井宏実准教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 中込治他編：標準微生物学第 12 版. 医学書院, 東京, 2015
- 2) 公益社団法人日本食品衛生協会：食品衛生検査指針 微生物編 2015, 825-826.
- 3) <https://www.pref.aomori.lg.jp/soshiki/kenko/hoken/gnathostoma.html> (2024 年 1 月 31 日閲覧)
- 4) Ando, K. et al. : Comparative study on DNA sequences

of ribosomal DNA and cytochrome c oxidase subunit 1 of mitochondrial DNA among five species of gnathostomes. *J. Helminthol.*, **80**, 7-13, 2006

5) Korekawa, A. et al. : Two cases of cutaneous gnathostomiasis after eating raw *Salangichthys microdon* (icefish, shirauo). *J. Dermatol*, **46**, 791-793, 2019

6) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>

7) https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch

表 1 検討に用いたプライマー及び標的領域

No.	プライマー名	プライマー配列 (5'→3')	標的領域	文献
1	Lim1657 58S2	CTGCCCTTTGTACACACCG TCTTTATGCTCAATGTCTTCGC	partial 18S, complete ITS1, partial 5.8S	4
2	LC1 HC2	CGAGTATCGATGAAGAACGCAGC ATATGCTTAAGTTCAGCGGG	partial 5.8S, complete ITS2, partial 28S	4
3	FH5 MCO1B	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTA TAAAGAAAGAACATAATGAAAATGAGC	partial cox1	4
4	ITS/GN/F4 ITS/GN/R3	GATCGAAGCAGACTTGATGACC CTTCATCGATACACGAGCCG	partial ITS1, partial 5.8S	5
5	ITS/GN/F2 ITS/GN/R5	GGCACGCCTGGTTGAGGGTCG GATGATGCGCCACACTCGTAC	terminal 5.8S, partial ITS2	5
6	ITS/GN/F3 ITS/GN/R1	CGTGAGGATCGTTCGGGGAAT CACGTCTGAGTTGAGGTCTACG	partial ITS2, beginning of 28S	5

表 2 各虫種における PCR 増幅産物、プライマーの不一致塩基数及び参照配列

No.	プライマー名	<i>G. hispidum</i>		<i>G. nipponicum</i>		<i>G. doloresi</i>		<i>G. spinigerum</i>		<i>G. binuleatum</i>	
		bp	mis	bp	mis	bp	mis	bp	mis	bp	mis
1	Lim1657	866	0	1128	0	905	0	918	0	n/d	-
	58S2		0		0		0		0		0
2	LC1	592	2	644	2	593	2	647	2	596	1
	HC2		1		1		1		1		1
3	FH5	n/d	-	441	2	n/d	-	441	2	441	2
	MCO1B		-		5		-		4		4
4	ITS/GN/F4	192	0	214	0	194	1	195	1	197	0
	ITS/GN/R3		0		0		0		0		0
5	ITS/GN/F2	n/d	0	245	0	n/d	0	245	0	222	0
	ITS/GN/R5		-		0		-		2		1
6	ITS/GN/F3	200	0	197	1	194	0	217	4	193	2
	ITS/GN/R1		0		0		0		0		0
参照配列 (rRNA)		AB181158.1		AB181157.1		AB181156.1		AB181155.1		AB181159.1	
参照配列 (mitochondrion)		-		NC_034239.1		-		NC_027726.1		NC_080314.1	

bp: 期待される増幅産物長; mis: プライマーと参照配列間の不一致塩基数 (Primer-BLAST⁶⁾ 及び SnapGene Viewer ver. 7.1 により算出) ; n/d: not determined.

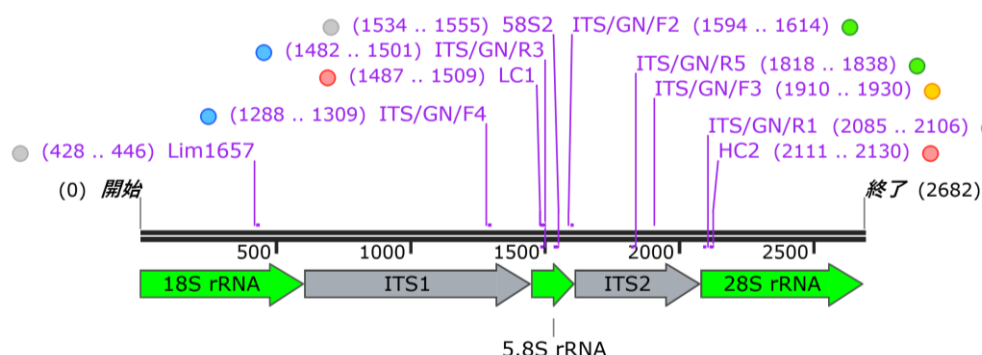


図 1 *G. nipponicum* (AB181157.1; 2,682 bp) を参照配列としたときの各プライマーの位置 (SnapGene Viewer v7.1 で描画)

Identification of *Gnathostoma* species using molecular biological methods

Yohei Takahashi, Kazuhiko Ogasawara

In autumn of 2022, several hundred individuals were found to have creeping disease caused by *Gnathostoma* infections in Aomori prefecture. In response, our center evaluated the identification of *Gnathostoma* species using molecular biological methods. DNA was extracted from a third instar larva, which was morphologically identified as *Gnathostoma japonicum* and PCR was performed using 6 sets of primers. The amplification products were subjected to direct sequencing and the results showed that consensus sequences of the 4 regions matched 100% with the sequences of *Gnathostoma japonicum* alone. In addition, *in silico* evaluations of reference sequences of 5 species of *Gnathostoma*, which are known to cause creeping disease in humans, using the 6 primer sets, suggested that all of the species could be identified using molecular biological methods.

Keywords: *Gnathostoma*, creeping disease, identification, sequence, ITS2

青森県でヒトから分離された感染性胃腸炎起因菌の病原体サーベイランス (2022 年)

高橋洋平 岩間貴士 長内志保美

県内の 10 定点機関で 2022 年に分離されたサルモネラ属菌、ビブリオ属菌、エルシニア属菌及びエシェリキア属菌 (*E. coli* 及び *E. albertii*) の 4 属の感染性胃腸炎起因菌を収集し、生化学的試験、血清学的試験、PCR 及び薬剤感受性試験を実施した。その結果、サルモネラ属菌では血清型 Oranienburg の集積及びプラスミド性 AmpC 保有株が認められたほか、プラスミド性又はバクテリオファージ由来の病原遺伝子の保有状況には、血清型による差が認められた。エルシニア属菌については、これまで同様、検出地域における抗原遺伝子型の違い、抗原遺伝子型による病原性プラスミドの保有状況の差が認められた。エシェリキア属菌においても、特定の抗原遺伝子型の集積や、これまでに複数回検出されている抗原遺伝子型の継続検出、*E. albertii* の複数株検出などの特徴がみられた。

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

1. はじめに

青森県環境保健センターでは、飲食起因感染症の早期発見と予防を目的に、県内の 10 定点機関における感染性胃腸炎起因菌 (サルモネラ属菌 *Salmonella* spp.、カンピロバクター属菌 *Campylobacter* spp.、ビブリオ属菌 *Vibrio* spp. 及びエルシニア属菌 *Yersinia* spp.) の検出状況を収集し、青森県病原微生物検出情報として週単位で取りまとめ公表している¹⁾。このうち、サルモネラ属菌、ビブリオ属菌及びエルシニア属菌については、定点機関からの検出報告をもとに菌株を収集し、性状解析を実施している。加えて、定点機関のうち 1 機関から協力を得て、病原遺伝子を保有する大腸菌 (*Escherichia coli*) の菌株も収集し、性状解析を実施している²⁾。

今回、2022 年に分離されたサルモネラ属菌、ビブリオ属菌、エルシニア属菌及びエシェリキア属菌 (*E. coli* 及び *E. albertii*) の 4 属の感染性胃腸炎起因菌を対象として、生化学的試験、血清学的試験、PCR 及び薬剤感受性試験を実施し、その結果を取りまとめたので報告する。

2. 調査方法

2.1 材料

サルモネラ属菌、ビブリオ属菌、エルシニア属菌

については、2022 年 1 月から同年 12 月の 1 年間に 10 定点機関からの検出報告をもとに収集した菌株を用いた。エシェリキア属菌 (*E. coli* 及び *E. albertii*) については、1 協力定点機関において PCR により病原遺伝子が検出され、当センターに搬入された菌株を用いた。

2.2 生化学的試験

既報²⁾と同様に、各種分離培地及び確認培地 (栄研化学、日水製薬 (現: 島津ダイアグノスティクス) 又は BD) を用いて、定法に従い菌種を確認した。必要に応じて、同定キット api20E 又は ID32E (いずれもバイオメリュー) を用いた。加えて、ビブリオ属菌については、NaCl (0%、3%、8% 及び 10%) 加ペプトン (BD) における発育を確認し、エルシニア属菌においては、各種糖分解培地を含む確認培地、リパーゼ・レシチナーゼ反応、 β -グルコシダーゼ・ β -ガラクトシダーゼ検出試験により、菌種及び生物型を確認するとともに、低温 (22 °C) 及び高温 (37 °C) 培養における運動性及び自己凝集反応を調べた^{11,12)}。

2.3 血清型別試験

サルモネラ属菌及びエルシニア属菌については、免疫血清 (デンカ) を用いて定法に従い血清型を確認した。

2.4 PCR

PCR 試薬には、TaKaRa Ex Taq 又は EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (いずれもタカラバイオ) を用い、各属の菌株を次のとおり PCR に付した。

サルモネラ属菌に対しては、既報^{2,3)}と同様に、*fljB* の検出及び亜種推定を実施するとともに、同一の反応条件の下、既報^{4,6)}のプライマーを用い、複相の発現に関与する *hin*、プラスミド性病原遺伝子 *spvRBC*、プラスミド性線毛遺伝子 *pefA* 及びバクテリオファージ由来の病原遺伝子である *sodCI*, *gipA*, *sopE* の保有状況を調べた。実施にあたっては、亜種推定³⁾の反応系を 1 セット、*hin*, *spvRBC*, *pefA* の検出系を 1 セット、*sodCI*, *gipA*, *sopE* の検出系を 1 セットの計 3 セットの multiplex PCR とした。得られた増幅産物は 3 %アガロースゲルで電気泳動した。

ビブリオ属菌に対しては、既報^{2,7-10)}と同様に、菌種確認の PCR を実施し、得られた増幅産物を 2%アガロースゲルで電気泳動した。

エルシニア属菌についても、既報^{2,12-15)}と同じく、PCR による菌種・抗原遺伝子型の確認及び病原遺伝子(染色体性: *inv*, *ail*, *ystA*, *ystB*; プラスミド性: *yadA*, *virF*) の検索を行った。実施にあたっては、既報の検出系¹³⁾を 2 セット、*yadA*, *virF*, *ystA* の検出系を 1 セットの計 3 セットの multiplex PCR とした。

エシェリキア属菌に対しては、既報のプライマー¹⁶⁻²³⁾を用いた病原遺伝子の検索、*E. albertii* の判別、抗原遺伝子型の確認を実施した。ETEC と分類された菌株に対しては毒素遺伝子の型別²⁴⁾を行い、EPEC に対しては *bfpA*²²⁾の保有状況を確認した。得られた増幅産物は、2%~3%アガロースゲル又は自動キャピラリー電気泳動装置 QIAxcel DNA Screening Kit (QIAGEN) で電気泳動した。

2.5 薬剤感受性試験

既報²⁾及び定法に従い、KB ディスク(栄研化学)を用いて 1 濃度ディスク拡散法により行った。McFarland 濃度 0.5 に調製した菌液をミュラーヒントン II 寒天培地(BD)に塗布し、ディスク配置後、35℃、好氣的条件下で 16~18 時間培養後判定した。エルシニア属菌の培養時間は 24 時間とした。使用薬剤は、β-ラクタム系薬剤 11 剤(ABPC, PIPC, CEZ, CTM, CTX, CAZ, CFPM, CMZ, IPM, MEPM, AZT)及びそれ以外の薬剤 13 剤(FOM, GM, KM, AMK, TC, DOXY, MINO, NA, CPFX, LVFX, ST, CP, CL)の計 24 剤とした。ビブリオ属菌における使用薬剤は 12 剤(ABPC, CTX, CAZ, CFPM, CFX, IPM, MEPM, GM, AMK, TC, CPFX, ST)とした。

また、薬剤感受性パターンから AmpC β-ラクタ

マーゼの産生が疑われた株については、阻害剤を用いたディスク拡散法によるスクリーニング及び PCR による保有薬剤耐性遺伝子の検索²⁵⁾を行った。

3. 結果と考察

3.1 サルモネラ属菌

2022 年の病原微生物検出情報では 52 例のサルモネラ属菌の報告があり、このうち 41 株を収集することができた。収集した株の試験結果は表 1 のとおりであった。

血清型では Oranienburg が 8 株と最も多く、次いで、O4:i:- が 6 株、Enteritidis が 5 株、Schwarzengrund が 3 株と続いた。このほか、*S. enterica* subsp. *diarizonae* と同定された株が 1 株、*S. enterica* subsp. *enterica* と同定されたものの血清型の判定が困難な株が 2 株認められ、このうち 1 株は運動性陰性の株であった。この中で、2022 年に最も株数の多かった Oranienburg は、8 株中 7 株が、6 月を中心に 5 月下旬から 7 月上旬にかけ集中して検出されていた。検出地域には偏りがなく、広域的に検出されていたことから、検出株のゲノム解析による株間の差異等、今後詳細な解析を進める必要がある。

また、PCR で検出された病原遺伝子については、*spvRBC* が Enteritidis 及び Derby のみから検出される等、血清型により保有状況に差が認められたほか、バクテリオファージ由来の病原遺伝子については、O4:i:-及び Wertavreden において同じ血清型の中でも保有状況に差が認められることが分かった。

薬剤感受性試験の結果では、O4:i:-は 6 株中 5 株が 1 剤以上の薬剤に耐性を示し、既報²⁾同様に薬剤耐性が最も多く認められた。また、2022 年分離株では、Minnesota が 11 剤に耐性を示し、特にβ-ラクタム系薬剤に対する耐性が多く認められたことから、薬剤耐性遺伝子を探索したところ、CIT 型プラスミド性 AmpC 遺伝子の保有が認められた。なお、今回の調査対象株では、第 4 世代セフェム系薬剤(CFPM)や、カルバペネム系薬剤(IPM, MEPM)に耐性を示す株は確認されなかった。

3.2 ビブリオ属菌

2022 年の病原微生物検出情報では 1 例のビブリオ属菌の報告があり、当該株のみを収集することができた。試験の結果、菌種は *V. alginolyticus* であり、薬剤感受性試験では ABPC に耐性が認められた。

3.3 エルシニア属菌

2022 年の病原微生物検出情報では計 20 例のエルシニア属菌の検出報告があり、このうち、計 18 株を収集することができた。収集した菌株の試験結果

は表 2 のとおりであった。なお、菌種は全て *Y. enterocolitica* であり、血清学的試験と抗原遺伝子型 (Og と表記) の結果は全て一致していた。本報告では、表記を全て Og で統一している。

抗原遺伝子型・生物型では、Og:3 が 13 株と最も多く、このうち、生物型 3 が 7 株、生物型 4 が 6 株であった。このほか、Og:8/1B が 4 株、Og:9/2 が 1 株であった。22 °C 培養での運動性については、既報²⁾同様、Og:3 及び Og:9 では全ての供試株が陰性であったのに対し、Og:8 では全て陽性であった。病原性プラスミド (pYV) の保持状況についても、Og:3 及び Og:9 では全ての株が pYV を保持していたのに対し、Og:8/1B では、試験の時点で 4 株中 3 株が pYV を保有していなかった。なお、薬剤感受性試験では、元来耐性傾向を示す ABPC, CEZ, CMZ に加え、CP に対して耐性を示す株が Og:3/3 で 1 株認められたが、既報²⁾で見られたような TC, ST に耐性を示す株は認められなかった。

このほか、地域ごとの病原体保有者数及び病原体保有者の年齢層について、分離株の抗原遺伝子型・生物型では、18 株中 16 株が東青地域と中南地域から搬入されたこと、中南地域では 9 株全てが Og:3 であるのに対し、東青地域では 7 株中 3 株が Og:8 であったこと、また、18 株中 9 株が 0 歳～9 歳、7 株が 10 歳～19 歳、2 株が 20 歳～29 歳から検出されており、低年齢層が病原体保有者の大部分を占めることも、既報²⁾とほぼ同様の傾向であった。

3.4 エシェリキア属 (*E. coli*, *E. albertii*)

病原遺伝子を保有する *E. coli* (腸管出血性大腸菌として搬入された菌株を除く) 又は *E. albertii* 疑いとして、2022 年に検出された 32 株を収集することができた。試験結果を表 3 に示した。

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

病原遺伝子として ST 遺伝子又は LT 遺伝子を保有していた *E. coli* は 1 株で、抗原遺伝子型は Og7:Hg24 であった。保有する毒素遺伝子は LT であり、このほかに *astA*, *cdt* も保有していた。薬剤感受性は既報²⁾とは異なり供試薬剤全てに感性であった。

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

病原遺伝子として *eae* を保有していた *E. coli* は 25 株であり、いずれの株からも *bfpA* は検出されなかった。既報²⁾と同様に、2022 年においても多様な抗原遺伝子型が確認された中、OgUT:Hg6 が 4 株 (うち 1 株は *astA*, *cdt* を保有) 認められた。既報

²⁾で多く検出されていた抗原遺伝子型では、Og109:Hg21 が 1 株 (*cdt* 非保有)、Og128:Hg2 が 2 株 (うち 1 株が *astA* を保有) 確認された。

薬剤感受性試験の結果、5 剤に耐性を示す株が 2 株検出され、うち 1 株は Og111:Hg8 であった。当該抗原遺伝子型は腸管出血性大腸菌でよくみられる抗原遺伝子型であることから、その関連性に興味が持たれる。

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

病原遺伝子として *aggR* を保有していた *E. coli* は 2 株であり、*aggR* 以外の病原遺伝子が検出された株はなかった。既報²⁾で多く検出されてきた Og92:Hg33 は、2022 年分離株では確認されなかった。また、2 株とも 1 剤以上の薬剤に耐性が認められた。

(4) *E. albertii*

PCR により *E. albertii* と同定された菌株は 4 株であった。同定された 4 株全てで *eae* 及び *cdt* が検出され、*stx2f* が検出された株はなかった。また、供試薬剤に対して耐性を示した菌株も認められなかった。

4. まとめ

2022 年に検出されたサルモネラ属菌、ビブリオ属菌、エルシニア属菌及びエシェリキア属菌の 4 属の感染性胃腸炎起因菌について、生化学的試験、血清学的試験、PCR 法及び薬剤感受性試験を実施した。その結果、サルモネラ属菌では血清型 Oranienburg の集積又はプラスミド性 AmpC 保有株が認められ、プラスミド性及びバクテリオファージ由来の病原遺伝子の保有状況には、血清型や菌株間による差が認められた。エルシニア属菌については、既報²⁾同様、検出地域における分離数や抗原遺伝子型の違い、抗原遺伝子型による病原性プラスミドの保有状況に差が認められた。エシェリキア属菌においても、特定の抗原遺伝子型の集積や、これまでに複数回検出されている抗原遺伝子型の継続検出、*E. albertii* の複数検出などの特徴がみられた。

今後も、病原体の性状を解析し、公衆衛生の質を向上させていくため、サーベイランスを継続していく必要がある。

謝 辞

菌株収集に御協力いただいた、青森県立中央病院、青森市医師会臨床検査センター、青森市民病院、弘前市医師会健診センター、八戸市医師会臨床検査セ

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

文 献

- 1) https://www.pref.aomori.lg.jp/soshiki/kankyo/kankyosenta/byougenbiseibutu_top.html
- 2) 高橋洋平他：青森県でヒトから分離された感染性胃腸炎起因菌の病原体サーベイランスの検討. 青森県環境保健センター年報, **33**, 30-40, 2022 及び当該文献の被参照文献
- 3) Lee, K. et al.: A novel multiplex PCR assay for *Salmonella* subspecies identification. *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 805-811, 2009
- 4) Soyer, Y. et al.: *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 3546-3556, 2009.
- 5) Smith, K. P. et al.: Elucidation of antimicrobial susceptibility profiles and genotyping of *Salmonella enterica* isolates from clinical cases of Salmonellosis in New Mexico in 2008. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 1025-1031, 2010.
- 6) Bertelloni, F. et al.: Some pathogenic characters of paratyphoid *Salmonella enterica* strains isolated from poultry. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **10**, 1161-1166, 2017.
- 7) Kim, H.-J. et al.: Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomes. *BMC Microbiol.*, **15**, 239, 2015.
- 8) Tarr, C. L. et al.: Identification of *Vibrio* Isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 134-140, 2007.
- 9) di Pinto, A. et al.: A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Prot.*, **68**, 150-153, 2005.
- 10) Chakraborty, R. et al.: Species-specific identification of *Vibrio fluvialis* by PCR targeted to the conserved transcriptional activation and variable membrane tether regions of the *toxR* gene. *J. Med. Microbiol.*, **55**, 805-808, 2006.
- 11) 公益社団法人日本食品衛生協会：食品衛生検査指針 微生物編 2015, 284-292.
- 12) Weagant, S. D. et al.: Bacteriological Analytical Manual. Chapter 8, *Yersinia enterocolitica*. January 2001; updated August 2007.
<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072633.htm> (2018 年 7 月 22 日閲覧)
- 13) Garzetti, D. et al.: A molecular scheme for *Yersinia enterocolitica* patho-serotyping derived from genome-wide analysis. *Int. J. Med. Microbiol.*, **301**, 275-283, 2014.
- 14) Thoerner, P. et al.: PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1810-1816, 2003.
- 15) Ibrahim, A. et al.: Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of the *Yersinia* heat-stable enterotoxin gene (*yst*). *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1636-1638, 1997.
- 16) Hyma, K. E. et al.: Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and *Shigella boydii* strains. *J. Bacteriol.*, **187**, 619-628, 2005.
- 17) Oaks, J. L. et al.: *Escherichia albertii* in wild and domestic birds. *Emerg. Infect. Dis.*, **16**, 638-646, 2010.
- 18) 国立感染症研究所：腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル, 2021 年 9 月.
- 19) Iguchi, K. et al.: *Escherichia coli* O-genotyping PCR; a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping. *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 2427-2432, 2015.
- 20) 井口純他：腸管出血性大腸菌の主要な O 血清群と病原性遺伝子を判定する One-shot マルチプレックス PCR 法の開発と評価, 日本食品微生物学会雑誌, **32**, 215-218, 2015.
- 21) Banjo, M. et al.: *Escherichia coli* H-genotyping PCR; a complete and practical platform for molecular H-typing. *J. Clin. Microbiol.*, **56**, e00190-18, 2018.
- 22) 国立保健医療科学院、国立感染症研究所：平成 29 年度短期研修細菌研修資料, 2017 年 11 月.
- 23) Tóth, I. et al.: Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4285-4291, 2003.
- 24) タカラバイオ株式会社：毒素原性大腸菌エンテロトキシン遺伝子の検出, 参考資料 特殊細菌検出用 Primer Set Application 2, 4-5, 2017 年 6 月.
- 25) 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター：薬剤

耐性菌研修会資料, 2017 年 9 月

表 1 サルモネラ属菌株の血清型、耐性薬剤及び保有病原遺伝子

血清型名	耐性薬剤	株数	保有遺伝子 (株数)
Corvallis	-	1	-
	NA	1	-
Derby	TC, DOXY, CP	1	<i>spvRBC, sopE</i>
Enteritidis	-	3	<i>spvRBC, pefA, sodCI, sopE</i>
	ABPC, PIPC, NA	1	<i>spvRBC, pefA, sodCI, sopE</i>
	NA	1	<i>spvRBC, pefA, sodCI, sopE</i>
Infantis	TC	1	-
Krefeld	TC, MINO, DOXY	1	-
Litchfield	-	1	<i>gipA</i>
Manhattan	TC	1	-
Minnesota	ABPC, PIPC, CEZ, CTM, CTX, CAZ, CMZ, AZT, TC, DOXY, NA	1	<i>pefA, AmpC (CIT 型)</i>
Newport	-	2	<i>gipA</i>
Oranienburg	-	8	-
Panama/Houston	-	1	<i>sopE</i>
Paratyphi B	-	1	<i>sodCI, sopE</i>
Rissen	ABPC	1	-
Schwarzengrund	-	2	-
	KM, TC, DOXY	1	-
Thompson	-	1	-
Weltevreden	-	2	<i>sodCI, gipA, sopE (1); sodCI, gipA (1)</i>
O4:i:-	-	1	<i>sodCI, gipA</i>
	ABPC, TC, MINO, DOXY	1	<i>sodCI, gipA, sopE</i>
	ABPC, PIPC, TC, MINO, DOXY, ST	1	<i>sodCI, gipA</i>
	ABPC, TC, MINO, DOXY	2	<i>sodCI, gipA, sopE (1); gipA (1)</i>
	CP	1	-
O9:HNM	-	1	<i>pefA, sodCI, sopE</i>
OUT:z10:UT*	-	1	-
OUT:z29:-	-	1	-
		総数	41

NM: no motile; *: *S. enterica* subsp. *diarizonae*

表 2 エルシニア属菌株の内訳と特徴

Og/生物型	計	pYV ⁺	特徴 (株数)
Og3/3	7	7	CP 耐性 (1)
Og3/4	6	6	
Og8/1B	4	1	
Og9/2	1	1	
総計	18	15	

表 3 エシェリキア属菌の分類、抗原遺伝子型、耐性薬剤及び保有遺伝子

分類 (株数)	抗原遺伝子型	耐性薬剤	株数	病原遺伝子 ^{*1}
ETEC (1)	Og7:Hg24	-	1	LT, <i>astA</i> , <i>cdt</i>
EPEC (25)	Og21:Hg21	-	2	-
	Og45:Hg15 ^{*2}	-	1	-
	Og51:Hg49	ABPC, PIPC, ST	1	-
	Og55:Hg7	-	1	-
	Og63:Hg6 ^{*2}	-	1	-
	Og76:Hg45 ^{*2}	-	1	-
	Og85:Hg31	-	2	-
	Og87:Hg6 ^{*2}	-	1	-
	Og88:Hg25	-	1	-
	Og109:Hg21	-	1	-
	Og111:Hg8	-	1	-
		ABPC, PIPC, TC, DOXY, ST	1	-
	Og128:Hg2	-	2	<i>astA</i> (1)
	Og139:Hg19 ^{*2}	ABPC, PIPC, GM, TC, DOXY	1	-
	Og156:Hg8	-	1	-
	OgUT:Hg6	-	1	<i>astA</i> , <i>cdt</i>
		-	3	-
	OgUT:Hg21	-	1	-
	OgUT:Hg30	-	1	-
	OgUT:Hg49	-	1	-
EAggEC (2)	Og99:Hg10	ABPC, TC, DOXY, NA, ST	1	-
	OgGP9:Hg18 ^{*2}	ABPC, PIPC	1	-
<i>E. albertii</i> (4)	(nt)	-	4	<i>eae</i> , <i>cdt</i>
(nt): not tested.			総数	32

^{*1}: EPEC が有する *eae* 及び EAggEC が保有する *aggR* は記載していない。

^{*2}: 各分類において今回初めて検出された抗原遺伝子型。

Pathogen surveillance of infectious gastroenteritis bacteria isolated from humans in Aomori prefecture (2022)

Yohei Takahashi, Takashi Iwama, Shihomi Osanai

Four genera of organisms causing infectious gastroenteritis, *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia*, and *Escherichia* (*E. coli* and *E. albertii*) species, isolated at 10 fixed location institutions in Aomori prefecture in 2022 were collected and biochemical tests, serological tests, PCR, and drug susceptibility tests were performed. The results showed that, in *Salmonella* species, accumulation of serovar Oranienburg and the strain carrying the plasmid-encoded AmpC gene were observed and there were differences in the retention status of virulence genes derived from plasmids or bacteriophages among serovars. As in the past, differences in antigen genotype and retention status of virulence plasmids among *Yersinia* species were also observed in detection areas. *Escherichia* species were also characterized by the accumulation of specific antigen genotypes, continuous detection of antigen genotypes that had been detected multiple times, and detection of multiple strains of *E. albertii*.

Keywords: *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Escherichia*, surveillance

規制値付近のホタテガイ所内組成型標準物質を用いた LC-MS/MS による麻痺性貝毒試験法の検討

田中綾乃 柴田めぐみ¹ 五十嵐飛鳥 岩館樹里 山本明美

東日本海域で毒化したホタテガイホールボディを用い、日本における麻痺性貝毒の規制値 4 MU/g 付近で値付けした所内組成型標準物質(In-House Reference Materials; iHRM)を対象として、規制値付近での LC-MS/MS による測定値のばらつきについて検討を行った。iHRM のうち 10 試料を LC-MS/MS 法で測定した結果、総毒量のばらつきは 10 %以下であり、マウス毒性試験(Mouse bioassay; MBA)で得られるばらつきと同程度であった。また、現在の日本の公定法での 0.1 mol/L 塩酸溶液による抽出と AOAC OMA 2005.06 等の国際的に認められた機器分析法で使用されている 1 %酢酸溶液による抽出の毒組成及び総毒量を比較したところ、有意な差は見られなかった。ホールボディを用いた場合、規制値付近の毒力及び総毒量は LC-MS/MS 法のほうが MBA より若干高い値となった。

Key words : paralytic shellfish toxins, LC-MS/MS, scallop

1. はじめに

麻痺性貝毒(paralytic shellfish toxins; PSTs)とはサキシトキシン(saxitoxin; STX)とその同属体群の総称であり、おもに海産渦鞭毛藻によって生産される。毒は捕食者の二枚貝に移行、蓄積され、ときに人の食中毒を引き起こす。中毒症状は口唇、四肢の麻痺が特徴的で、重篤になると呼吸麻痺によって死に至る。海産毒による食中毒の中でもフグ毒と並んで死亡率の高い危険な食中毒であり、世界及び日本各地で毎年、二枚貝の麻痺性貝毒による毒化が起きているために、食品衛生上、また、産業上大きな脅威となっている¹⁾。

STX 群は *Alexandrium* 属や *Gymnodinium* 属の有毒藻類により生産され、わが国で二枚貝の毒化原因となることが確認されている主な種は、*Alexandrium catenella*(旧 *A.tamarense*)、*Alexandrium pacificum*(旧 *A.catenella*)、*Alexandrium tamiyavanichii*、*Gymnodinium catenatum* である。主要な毒は C1、C2 と gonyautoxin(GTX)1、2、3、4 であるが、一部の海域の *G.catenatum* は GTX5、6 を主要毒として有する^{2,3)}。

現在わが国における PSTs 検査は、昭和 55 年 7 月 1 日付環乳第 30 号環境衛生局乳肉衛生課長通知⁴⁾による MBA が公定法として用いられており、二

枚貝に含まれる PSTs の規制値は 4 MU/g と定められている。近年、国際的に動物愛護の観点から動物を用いない代替法として機器分析へ移行しつつある中で、EU では 2021 年 10 月から動物試験を廃止して機器分析法に完全移行した。EU 2021/1709 では過氧化物又は過ヨウ素酸塩による酸化誘導体化プレカラム HPLC 法である公定法 EN14526、あるいは生きた動物を使用しない国際的に妥当性確認され容認された方法のみ認められ、測定する物質は少なくとも STX、NeoSTX、GTX1/4、GTX2/3、GTX5(B1)、GTX6(B2)、C1/C2、C3/C4、dcSTX、dcNeoSTX、dcGTX2/3 の 16 物質を確認することとされている⁵⁾。

将来的にわが国でも PSTs の公定法が機器分析へ移行する可能性を見据え、機器分析の検討を進めておく必要がある。しかしながら、主要毒の一つで毒性の高い STX は、わが国では「化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律」に規定される特定物質であり、その所持、使用等に厳しい制限があることから、標準物質ならびに STX を含む蓋然性のある物質を入手することが難しい状況にある。

青森県では、陸奥湾産ホタテガイを EU に輸出するため、採捕時期に合わせて生産海域モニタリング検査を実施している。輸出対象国である EU の活

1 青森県環境生活部環境保全課

二枚貝中の PSTs の規制値は、0.8 mg STX・2HCl eq./kg (可食部あたり) であり、STX に換算した単位で結果を出す必要があるため、当所は STX・2HCl を用いて 2020 年度まで AOAC OMA 959.08 により MBA を実施してきた。なお、EU の規制値は国際規格である「活及び生鮮二枚貝の国際規格(CODEX STAN 292-2008)」で定められた規制値と同じである。

今後、PSTs の検査法が機器分析へ移行した場合、分析法の性能確認のためには組成型認証標準物質の分析が必要と考えられるが、海外で販売されている組成型認証標準物質には STX が含まれているため、輸入することは難しい。また、わが国の公定法では PSTs の抽出に 0.1 mol/L 塩酸溶液が用いられているが、国際法として認められているプレカラム蛍光化-HPLC 法(AOAC OMA 2005.06)や EN14526、海外で妥当性が確認された LC-MS/MS 法⁹⁾では抽出に 1 %酢酸溶液が用いられている。食品衛生法では規制値レベルでの測定値のばらつきが重要となるため、このレベルでの 2 種類の抽出法の違いにより毒組成及び毒量がどの程度異なるのか検証することとした。

そこで、筆者らは国内で毒化したホタテガイホールボディを均質化して日本における規制値 4 MU/g 付近で値付けした iHRM を作成し、これを国際的に妥当性評価された Boundy らの LC-MS/MS 法⁹⁾を用いて 2 種類の抽出溶液の分析を実施し、得られた毒量の併行精度を確認したので報告する。また、同一の塩酸抽出液を用いて MBA により得られた毒力とも比較したので、併せて報告する。

2. 方法

2.1 試料

2013 年 5 月に東日本海域で毒化したホタテガイホールボディのホモジネートに、2019 年 2 月に陸奥湾で採捕された無毒のホタテガイホールボディのホモジネートを加えて均質化し、MBA により毒量を約 3.5 MU/g に調製したものを iHRM(付与値: 3.54 MU/g, 721 µg STX・2HCl eq./kg)とした。この iHRM を約 110 g ずつサンプルカップに分取し、-60 °C で冷凍保管した。iHRM の均一性については、任意に抽出した 5 個について国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所(以下、水研機構)にポストカラム蛍光化-HPLC 法による分析を依頼した結果、総毒量の変動係数が 8.7 %であったことから、均一であると確認した。

また、iHRM の抽出溶液を 3.5 MU/g とみなし無毒ホタテガイ抽出溶液で希釈し、2 及び 1 MU/g の

毒力に相当するよう調製した溶液も試験に供した。

2.2 標準品および試薬等

2.2.1 PSTs 標準品

C1/C2、GTX1/4、GTX2/3、dcGTX2/3、GTX5、GTX6 は National Research Council of Canada(以下、カナダ NRC)製の認証標準物質(Certified Reference Materials; CRM)を使用した。各 CRM を 250 µL ずつ分取し、1 %酢酸溶液を加えて 20 倍希釈したものを NRC 混合標準溶液とした。

STX はアメリカ FDA の STX・2HCl(100 µg/mL, lot No.088)を使用した。これを 0.3 mL 分取し、5 mmol/L 塩酸で 30 mL に定容し、1 µg/mL の STX・2HCl 溶液を調製し、試験に使用した。

NEO 及び dcSTX は水研機構より供与された混合溶液(NEO: 1.74 µmol/L、dcSTX: 0.43 µmol/L)を使用した。

NRC 混合標準溶液、1 µg/mL STX・2HCl 溶液、NEO・dcSTX 混合溶液及び 1 %酢酸溶液を同量混合したものを混合ストック標準溶液とし、4°C で保存した。

本分析は用事調製したマトリクス検量線法により実施した。あらかじめ MBA で無毒を確認したホタテガイホールボディから、後述の 2.5.1 に準じて調製して得られた LC-MS/MS 測定溶液をマトリクス溶液とし、このマトリクス溶液の比率が各希釈段階で一定になるよう、不足分を 1 %酢酸溶液で補いながら混合ストック標準溶液を段階希釈し、検量線用標準溶液(7 点)を調製した。検量線用標準溶液の調製方法を表 1 に示す。

2.2.2 その他の試薬等

アセトニトリル、メタノール、ギ酸、蒸留水は関東化学(株)製または富士フィルム和光純薬(株)製の LC/MS グレード、酢酸は特級、アンモニア水は特級で濃度 25 %のものを使用した。固相抽出カラムは、Supelco 製 supelclean ENVI-carb 250 mg/3 mL(以下、カーボンカラム)を使用した。

MBA に使用したマウスは、日本 SLC(株)から 4 週齢の ICR 系雄マウスを購入し、2 日間順化させ体重が 19~21 g となった個体を使用した。

2.3 装置及び器具

LC-MS/MS は Waters 製 ACQUITY UPLC I-Class(LC 部)及び Xevo TQ-S micro (MS 部)、遠心分離機は日立工機(株)製 himac CF16RX 及び(株)久保田製作所製 3520 を使用した。

2.4 分析条件

Boundy らの方法⁹⁾により、国際室間妥当性試験で配布されたプロトコルに基づき作成された

「PST_sとテトロドトキシン測定のための超高速液体クロマトグラフィー質量分析法(UHPLC/MS/MS)マニュアル(以下、マニュアル)」⁷⁾を参考とした。

分析条件の詳細を表 2 に示す。分析前にはマニュアルに準じて充分カラムをコンディショニングした。

表 1 マトリクス検量線の調製方法

	混合ストック 標準溶液 (μL)	Level 3 (μL)	1%酢酸 (μL)	マトリクス溶液 (μL)
Level 7	100			150
Level 6	50		50	150
Level 5	25		75	150
Level 4	10		90	150
Level 3	10		190	300
Level 2		100		150
Level 1		50	50	150

表 2 LC-MS/MS 測定条件

LC 部				
装置：Waters ACQUITY UPLC I-Class		流速及びグラジエント条件：		
分析カラム：Waters ACQUITY UPLC BEH Amide		時間 (分)	流速 (mL/min)	A(%) B(%)
1.7 μm，φ 2.1×150 mm（ガードカラム付）		初期	0.4	2.0 98.0
移動相：A 0.015 %ギ酸+0.015 %アンモニア水 (pH 9.0～9.4)	B 0.01 %ギ酸含有 70 %アセトニトリル	5.00	0.4	2.0 98.0
		7.50	0.4	50.0 50.0
		9.00	0.5	50.0 50.0
測定時間：11 分	カラム温度：60 ℃	9.50	0.5	2.0 98.0
注入量：2 μL		10.00	0.8	2.0 98.0
※別途作成したメソッドにてカラムコンディショニング 後、上記測定メソッドに切り替え		10.60	0.8	2.0 98.0
		10.61	0.4	2.0 98.0
		11.00	0.4	2.0 98.0
MS 部				
装置：Waters Xevo TQ-S micro イオン化モード：ESI(positive,negative)				
Capillary：2.5 kV Desolvation Gas：600 ℃,1000 L/hr Cone Gas：100 L/hr Source Temp.：150 ℃				

MRM 条件

	ESI(+)	ESI(-)
STX	300.1 > 204.1, 138.0	
NEO	316.1 > 126.1, 220.1	
dcSTX	257.1 > 126.1, 222.0	
GTX2		394.1 > 351.1, 333.1
GTX3	396.1 > 298.1	394.1 > 333.1, 351.1
GTX1		410.1 > 367.1, 349.1
GTX4	412.1 > 314.1	410.1 > 367.1, 349.1
dcGTX2		351.1 > 164.0, 333.1
dcGTX3	353.1 > 255.1	351.1 > 333.1
C1		474.1 > 122.0, 351.1
C2	396.1 > 298.1	474.1 > 122.0

太字は定量用イオン

2.5 LC-MS/MS 測定溶液の調製方法

2.5.1 1 %酢酸抽出による測定溶液

50 mL ポリプロピレン製遠沈管に iHRM 5 g を量りとり、1 % 酢酸 5 mL を加えてボルテックスミキサーで 90 秒間混合した。沸騰したウォーターバスに 5 分間静置し、流水で 5 分間冷却したのち、再度ボルテックスミキサーで 90 秒間混合し、4,000 × g、20 °C 10 分の条件で遠心分離した。上清(以下、酢酸抽出液)1 mL をポリプロピレン製チューブに分取し、25 %アンモニア水 5 μL を加えてすぐに攪拌し、10,000 × g、1 分の条件で遠心分離した。

精製は、カーボンカラムに 1 %酢酸含有 20 %アセトニトリル 3 mL、0.025 %アンモニア水 3 mL の順に通液しコンディショニングしたのち、酢酸抽出液を 400 μL 負荷した。蒸留水 700 μL で洗浄後、1 % 酢酸含有 20 % アセトニトリル 2 mL で溶出し、ポリプロピレン製チューブに採取した。ボルテックスミキサーでよく混合して均質化したもの(以下、溶出液)100 μL 及びアセトニトリル 300 μL をポリプロピレン製バイアルに分取して混合した溶液を LC-MS/MS 測定溶液とした。上記抽出および精製法のフローを図 1 に示す。

2.5.2 0.1 mol/L 塩酸抽出による測定溶液

AOAC OMA 959.08 に準じ、iHRM と 0.1 mol/L 塩酸を同量混合し加熱抽出後、pH 3.0 に調整し遠心分離して得られた上清(以下、塩酸抽出液)を用いた。この塩酸抽出液についても、2.5.1 の 1 mL 分取後 25 %アンモニア水を添加する操作以降と同様の工程により LC-MS/MS 測定溶液を得た。

2.6 AOAC OMA 959.08 による毒力の測定方法

2.5.2 で得られた塩酸抽出液を 5 匹のマウスに 1 mL ずつ腹腔内投与し、その中央致死時間からマウス毒力(MU/g)を算出した。AOAC OMA 959.08 では使用するマウスの系統群や飼育状況などによる感受性の違いを標準化するため、既知濃度の STX 溶液を投与することによりマウスの Conversion Factor(以下、CF 値; μg/MU)を求め、STX 当量(μg STX・2HCl eq./kg)とする。得られたマウス毒力に別に求めた CF 値を乗じて STX 当量を算出した。

なお、本研究に係る MBA は青森県環境保健センター動物実験委員会の承認を受け実施した。

3 結果および考察

3.1 LC-MS/MS 測定条件の検討

3.1.1 MS 条件の検討

MS の装置条件検討段階において、イオン化効率に寄与する項目であるキャピラリー電圧がピーク

の検出感度に与える影響が大きいと考え、キャピラリー電圧を 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 kV と割り振ったメソッドにより、同一の混合標準溶液を測定し、各成分の面積値の変化を確認した。その結果、図 2 に示すように、STX、NEO 及び dcSTX はキャピラリー電圧の値が大きくなるにつれて面積値は減少傾向にあったが、他の成分は横ばいもしくは増加傾向であった。分析条件を決定するにあたり、毒性の高い STX 群を正確に測定することはもとより、毒化した場合の毒組成を正確に把握することも目的とし、毒性の強弱によらず全成分を広域的に検出できるようキャピラリー電圧は 2.5 kV に設定した。その他の MS 条件については、成分により大きな違いは見られなかった。

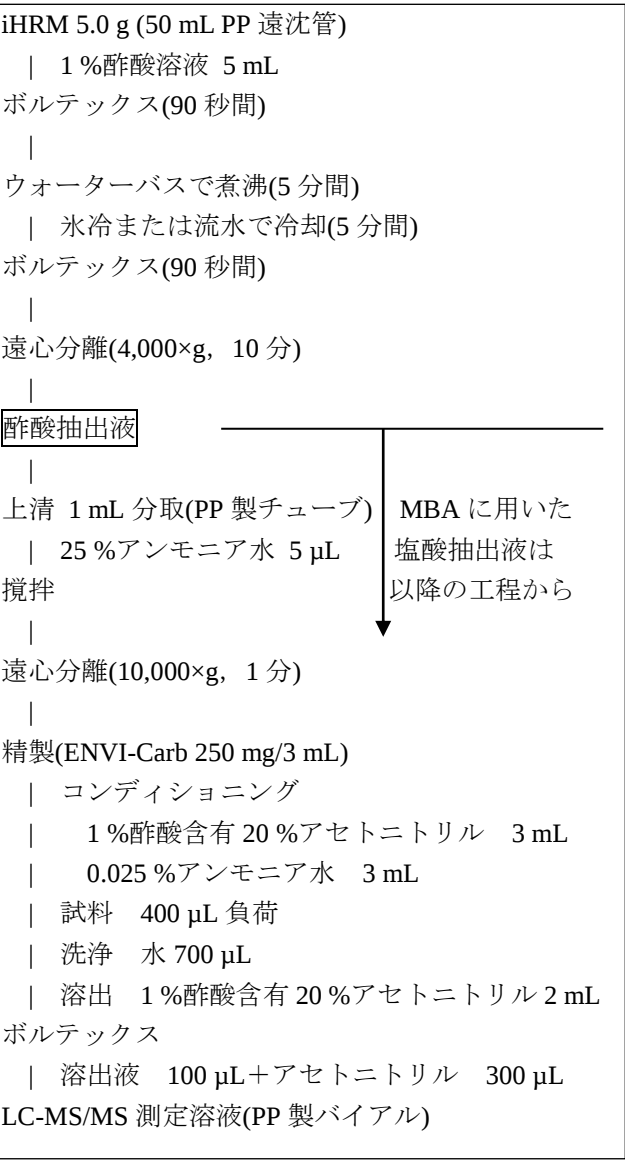


図 1 LC-MS/MS 測定溶液調製方法

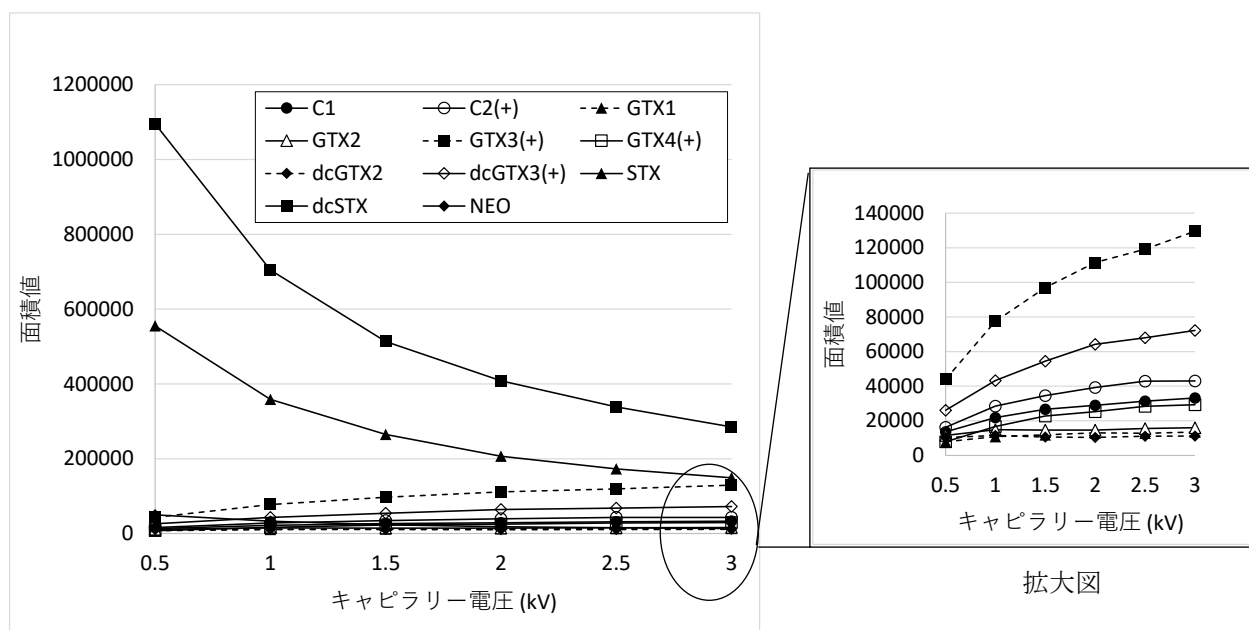


図 2 キャピラリー電圧による面積値変化

3.1.2 検量線の直線性

Boudry 法原法の標準調製では 10 種の標準品を当量混合したものを混合ストック標準液としていたが、日本ではすべての標準溶液を入手できるとは限らない。そこで、C1/C2、GTX5 及び GTX6 が強毒成分に変換しない 1%酢酸溶液を用いて NRC 混合標準溶液とした。また、原法と検量線範囲が概ね同じになるように混合ストック標準溶液を調

製した。今回使用した検量範囲を表 3 に示す。この検量範囲(7 点)において、回帰直線の相関係数は STX を除いては 0.995 以上であった。STX は最も高濃度の検量点が理論値よりも低い傾向を示し、それに伴い回帰直線の相関係数が 0.99 に満たなかった。高濃度の 1 点を除いたところ回帰直線の相関係数は 0.995 以上となったことから、STX のみ 6 点検量で定量した。

表 3 検量濃度範囲 (単位: nmol/L)

	Level 7	Level 6	Level 5	Level 4	Level 3	Level 2	Level 1
C1	469.0	234.5	117.3	46.9	23.5	9.38	4.69
C2	137.0	68.5	34.3	13.7	6.9	2.74	1.37
dcGTX2	500.5	250.3	125.1	50.1	25.0	10.01	5.01
dcGTX3	147.0	73.5	36.8	14.7	7.4	2.94	1.47
GTX2	513.0	256.5	128.3	51.3	25.7	10.26	5.13
GTX3	217.5	108.8	54.4	21.8	10.9	4.35	2.18
GTX1	286.0	143.0	71.5	28.6	14.3	5.72	2.86
GTX4	90.0	45.0	22.5	9.0	4.5	1.80	0.90
dcSTX	43.0	21.5	10.8	4.3	2.2	0.86	0.43
STX	268.7	134.4	67.2	26.9	13.4	5.37	2.69
NEO	174.0	87.0	43.5	17.4	8.7	3.48	1.74

3.1.3 マトリクス検量線の検討

マトリクス検量線用標準溶液の調製には、MBA で無毒であることを確認した陸奥湾産ホタテガイホールボディから調製したものをマトリクス溶液として用いているが、MBA で無毒であっても機器分析では検出される可能性も考えられたため、マ

トリクス溶液を試料の 1 つとみなして、LC-MS/MS 法で確認した。その結果、C1、C2 及び GTX5 が若干検出され、その分を含む検量線で算出すると、実際の含有量よりも低く見積もられることが懸念された。iHRM から検出された各毒成分の測定濃度の合計(nmol/L)に占める C1 及び C2 の割合は 7.8 %

～17.0 %であったが、Oshima の比毒性⁹⁾及び欧州食品安全機関(EFSA)の毒性等価係数(TEF)で換算したマウス毒力(MU/g)では最大 0.7 %、STX 当量($\mu\text{g STX} \cdot 2\text{HCl eq./kg}$)では最大 0.8 %であり、毒力で評価する場合の影響はごくわずかであることを確認した。なお、GTX5 及び GTX6 は 4 回目測定以降から追加測定することとした項目であるため、その

測定結果は本研究のデータ検証からは除外した。

3.2 LC-MS/MS による測定結果

3.2.1 性能評価

2021 年 2 月から 2022 年 10 月にかけて 2 名の検査員で実施し、計 10 試料について酢酸抽出及び塩酸抽出により得られた LC-MS/MS 測定溶液における各毒成分の測定結果を表 4-1、4-2 に示す。

表 4-1 塩酸抽出の測定結果 (単位 : nM)

No.	C1	C2	dcGTX2	dcGTX3	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	dcSTX	STX	NEO
14	2.7	2.6	0.0	0.0	25.3	12.9	4.5	10.1	0.0	1.9	7.0
28	6.8	2.7	0.0	0.0	28.4	14.2	6.5	11.4	0.0	2.3	6.4
27	5.6	2.7	1.7	0.0	34.9	14.5	4.2	10.1	0.0	3.1	2.9
23	4.4	3.4	0.0	0.2	25.6	14.1	6.3	10.4	0.0	4.6	5.5
24	3.9	3.3	0.0	0.0	23.9	12.2	6.6	10.5	0.0	4.1	4.9
19	5.5	2.4	0.0	0.5	26.2	18.4	8.2	10.9	0.0	3.6	7.2
25	4.3	2.3	0.0	0.0	26.3	19.4	7.5	13.1	0.0	3.7	7.6
11	8.9	2.7	0.0	0.0	27.7	12.4	6.5	12.2	0.0	3.8	5.3
33	11.6	2.8	2.5	0.5	31.3	13.3	7.3	13.9	0.0	3.1	6.1
13	8.4	2.6	0.0	0.0	24.9	11.0	6.6	8.8	0.0	4.2	4.7
平均	6.2	2.7	0.4	0.1	27.5	14.3	6.4	11.1	0.0	3.4	5.8

表 4-2 酢酸抽出の測定結果 (単位 : nM)

No.	C1	C2	dcGTX2	dcGTX3	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	dcSTX	STX	NEO
14	3.4	1.9	0.0	0.0	27.3	13.3	3.6	7.5	0.0	2.3	5.3
28	7.2	2.2	0.0	0.0	28.9	13.6	4.2	6.5	0.0	3.2	9.1
27	6.4	1.6	1.7	0.0	26.7	15.9	2.8	8.3	0.0	4.4	4.9
23	4.2	2.1	0.0	0.3	21.5	18.4	6.0	6.6	0.0	4.4	4.5
24	3.9	2.1	0.0	0.2	25.9	17.6	6.0	7.9	0.0	4.6	5.2
19	10.0	2.1	0.0	0.4	19.7	23.2	6.3	6.6	0.0	5.2	6.1
25	8.7	2.1	1.9	0.3	22.3	20.4	6.8	8.8	0.0	4.8	6.6
11	11.8	1.8	0.0	0.0	26.3	17.2	5.2	8.4	0.0	3.8	5.8
33	10.4	2.2	0.0	0.0	26.5	16.0	5.4	9.0	0.0	3.4	5.9
13	6.9	1.7	0.0	0.0	27.0	9.9	3.8	7.0	0.0	3.7	3.4
平均	7.3	2.0	0.4	0.1	25.2	16.6	5.0	7.7	0.0	4.0	5.7

iHRM のため真度は評価できないが、CODEX STAN 292-2008 における PSTs の機器分析による検査法の性能基準を参考とし、得られたデータを評価した。表 5 に示したとおり、今回用いた iHRM の各毒成分の測定値は、おおむね適用範囲内 (0.05~0.2 mg/kg または 0.1~0.5 mg/kg) であり、検出

下限(0.01 または 0.03 mg/kg)および定量下限(0.02 または 0.06 mg/kg)の基準を満たしていた。精度については、本研究で得られた値は単一試験室における室内精度(RSD_r)であり、性能基準で評価に用いられている室間再現精度(RSD_R)よりも小さい値となることが推測されるため参考としての比較になる

が、おおむね基準を満たしていた。ただし、C1 については室間再現精度 RSD_R が 38 % 以下という性能基準に対して、室内精度 RSD_r が塩酸抽出液で 43.9 %、酢酸抽出液で 39.9 % と高かった。これにつ

いては、C1 の検出レベルが最低検量濃度付近であり、3.1.3 で述べたマトリクス検量線用標準溶液の調製に用いたマトリクス溶液から C1 が若干検出されたことが要因と考えられる。

表 5 コーデックス規格 (CODEX STAN 292-2008) における
麻痺性貝毒の機器分析による検査法の性能基準との比較

	C1	C2	dcGTX2	dcGTX3	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	dcSTX	STX	NEO
検量線範囲 (mg/kg)											
Level 1	0.09	0.03	0.07	0.02	0.05	0.08	0.03	0.01	-	0.04	0.02
Level 7	8.92	2.61	7.05	2.07	4.71	8.11	3.44	1.48	0.44	4.00	2.19
測定値平均 (mg/kg)											
	0.14	0.04	0.01	0.00	0.41	0.26	0.08	0.13	0	0.06	0.07
CODEX 性能基準の適用範囲 (mg/kg)											
最小	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05	0.1	0.1	0.05	0.05	0.05	0.05
最大	0.5	0.5	0.5	0.5	0.2	0.5	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2
検出下限 (S/N = 3)											
	0.013	0.003	0.017	0.002	0.004	0.022	0.001	0.007	0.002	0.003	0.010
CODEX 性能基準の検出下限 (mg/kg)											
	0.03	0.03	0.03	0.03	0.01	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01
定量下限 (S/N = 10)											
	0.045	0.009	0.056	0.008	0.013	0.074	0.004	0.023	0.006	0.010	0.033
CODEX 性能基準の定量下限 (mg/kg)											
	0.06	0.06	0.06	0.06	0.02	0.06	0.06	0.02	0.02	0.02	0.02
室内精度 (RSD_r)											
塩酸	43.9	13.2	-	-	12.2	18.7	19.2	13.6	-	24.8	24.3
酢酸	39.9	10.9	-	-	11.8	22.7	26.4	12.2	-	21.7	26.6
CODEX 性能基準の室間再現精度 (RSD_R %)											
	38	38	38	38	44	38	38	44	44	44	44

3.2.2 抽出溶液の違いによる比較

表 4-1、4-2 に示した 2 種類の抽出液の測定値の平均から各抽出液における毒組成の割合をグラフ化し図 3 に示す。毒組成については抽出溶液の違いによる有意な差はみられなかった。

測定結果に希釈係数を乗じた各毒成分の測定濃度 (nmol/kg) に比毒性を乗じてマウス毒力 (MU/g) を、TEF 及び STX・2HCl の分子量 (372.2) を乗じて STX 当量 ($\mu\text{g STX} \cdot 2\text{HCl eq./kg}$) を求めたものを表 6 に示す。マウス毒力は、塩酸抽出液では平均 5.37 MU/g、変動係数 8.5 %、酢酸抽出液では平均 4.92 MU/g、

変動係数 5.8 % であった。また、STX 当量は、塩酸抽出液では平均 811 $\mu\text{g STX} \cdot 2\text{HCl eq./kg}$ 、変動係数 7.9 %、酢酸抽出液では平均 748 $\mu\text{g STX} \cdot 2\text{HCl eq./kg}$ 、変動係数 5.8 % であり、総毒量については抽出液の違いによる有意な差はみられなかった。

低 pH 下では、低毒力の C1/C2 が高毒力の GTX2/3 へ、GTX5/6 が STX 及び neoSTX へ変換することが知られており^{9,10)}、今回用いた 2 種類の抽出溶液で毒組成に違いがあることが推測されたが、毒組成及び総毒量に有意な差はなく、抽出溶液の違いによる毒の変換への影響は低いことが確認された。

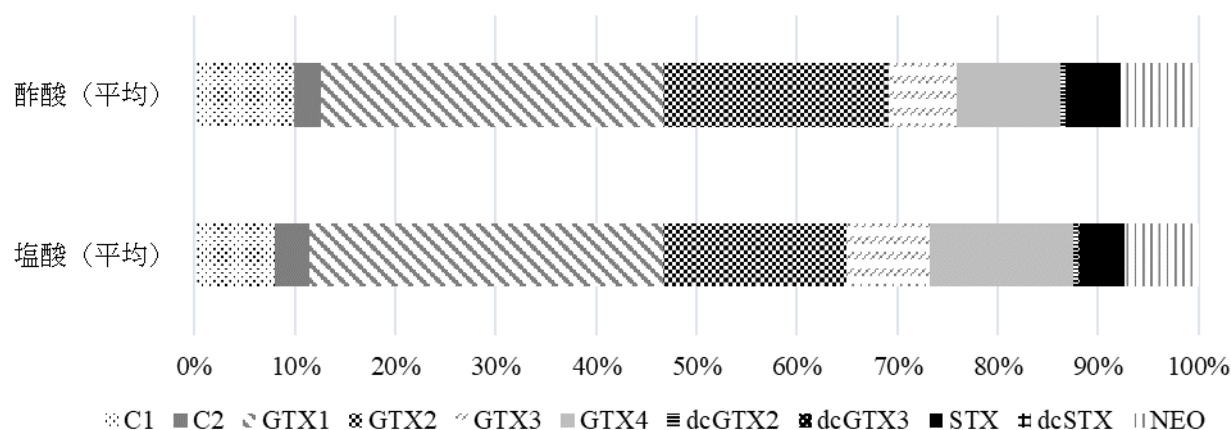


図 3 毒成分の組成比(各毒成分の測定濃度(nM)の占める割合)

表 6 規制値付近での MBA 結果との比較

			マウス毒量	STX 当量
			(MU/g)	($\mu\text{g STX} \cdot 2\text{HCl eq./kg}$)
法 LC-MS/MS	酢酸	平均値	4.92	748
		(変動係数)	(5.8 %)	(5.8 %)
	塩酸	平均値	5.37	811
		(変動係数)	(8.5 %)	(7.9 %)
MBA	塩酸	平均値	3.25	673
		(変動係数)	(6.7%)	(7.2 %)

(n=10)

3.3 MBA との比較

3.3.1 MBA による測定結果

LC-MS/MS 法と併行実施した iHRM 10 試料の MBA の平均値及び変動係数を LC-MS/MS 法の結果とあわせて表 6 に示す。付与値を 3.54 MU/g, 721 $\mu\text{g STX} \cdot 2\text{HCl eq./kg}$ とした iHRM を分析した結果、10 試料のマウス毒力の平均は 3.25 MU/g、変動係数 6.7 %、得られたマウス毒力に CF 値を乗じて求めた STX 当量は平均 673 $\mu\text{g STX} \cdot 2\text{HCl eq./kg}$ 、変動係数 7.2 %であった。

3.3.2 規制値付近での検証

各 iHRM を分析し得られた LC-MS/MS 法と MBA によるマウス毒力及び STX 当量の測定結果をプロットし図 4 に示す。マウス毒量、STX 当量のいずれについても LC-MS/MS 法が MBA より高い値となり、4 MU/g を規制値とした場合、MBA と LC-MS/MS 法で規制超過の判定が異なる可能性が考えられた。ただし、マウス毒力では MBA と LC-MS/MS 法に乖離がみられたが、本試験で用い

たマウスは STX で標準化しており、STX 当量と比較してみると、LC-MS/MS 法と MBA の乖離は小さくなる傾向にあった。なお、規制値付近での結果のばらつきは LC-MS/MS 法、MBA とも 10 %未満であり、ほぼ同等であった。

3.3.3 規制値以下での検証

iHRM の各抽出液を無毒ホタテガイホールボディの各抽出液で比例計算により希釈し、2 及び 1 MU/g 相当に調製した各 3 試料を LC-MS/MS 法で測定した。また、塩酸抽出液で希釈したものは AOAC OMA 959.08 による MBA を行った。調製した毒力 3.5、2 及び 1 MU/g を理論値として得られた結果を表 7 に、その平均値をプロットしたものを図 5 に示す。

規制値以下では、LC-MS/MS 法から得られた結果は STX 当量では概ね理論値とした毒力に見合った毒量となった。また、抽出溶液の違いによる大きな違いはみられなかった。一方、MBA は回帰直線の傾きが小さく、規制値相当濃度では LC-MS/MS

法がやや高い傾向にあったが、2 MU/g 付近でその傾向が逆転し、毒量は高く見積もられる傾向にあった。MBA では、マウスの中央致死時間が 5~7 分の値を採用して算出することとしており、これは

マウス毒力で 2.78~3.87 MU/g に相当する。よって、この範囲を下回る場合は、MBA では真値から乖離していくことが推測された。

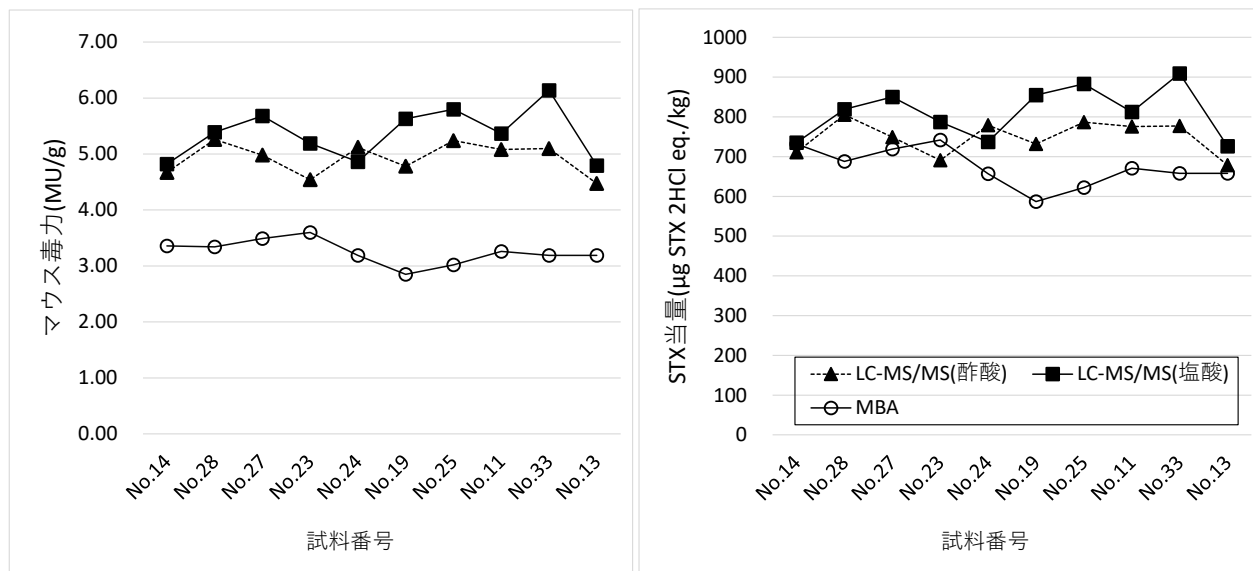


図 4 LC-MS/MS 法と MBA との比較 (左図：マウス毒力、右図：STX 当量)

表 7 規制値以下での MBA 結果との比較

		マウス毒量 (MU/g)			STX 当量 (μg STX・2HCl eq./kg)		
理論値		3.54	2	1	721	407	204
LC-MS/MS 法							
酢酸	平均値	5.05	2.70	1.39	767	413	209
塩酸	平均値	5.73	2.94	1.41	857	446	215
MBA							
塩酸	平均値	3.31	2.37	2.00	683	488	412

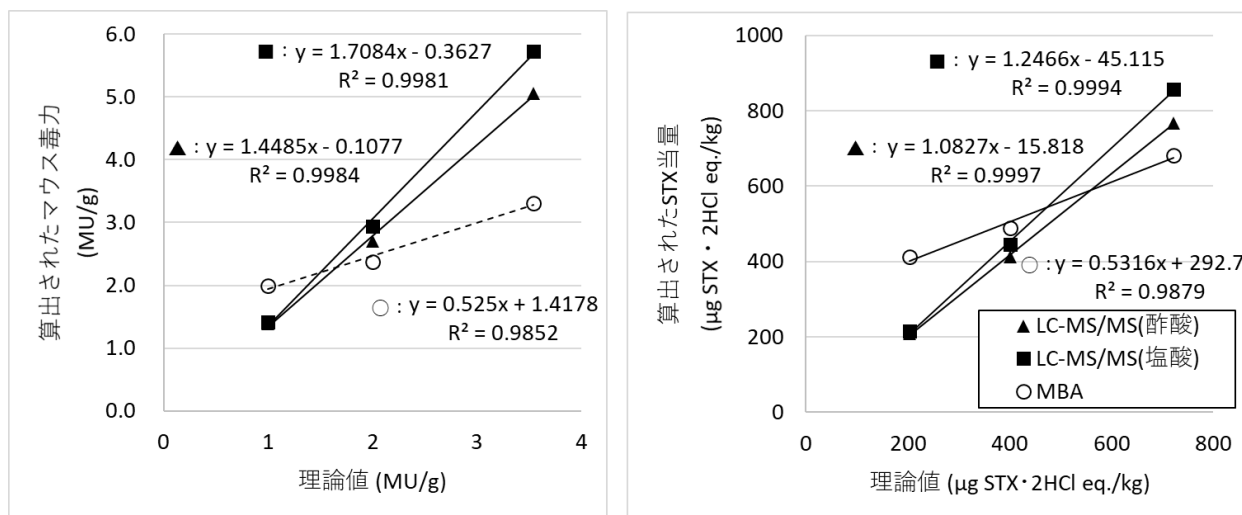


図 5 規制値以下での MBA 理論値と実測値との比較 (左図：マウス毒力、右図：STX 当量)

4. まとめ

規制値付近では LC-MS/MS 法による分析結果にどの程度のばらつきがあるのかを、東日本海域で毒化したホタテガイホールボディを用いて作成した規制値付近の iHRM によって確認した。10 試料の総毒力の分析結果は MBA で得られたばらつきと同程度の 10 %未満で iHRM の均一性のばらつきとほぼ同等であり、個々の毒成分の RSDr は CODEX STAN 292-2008 の性能基準をおおむね満たしていた。また、現在の日本の公定法での 0.1 mol/L 塩酸溶液による抽出と AOAC OMA 2005.06 等の国際的に認められた機器分析法で使用されている 1 %酢酸溶液による抽出で総毒量が大きく異なるのかを検証した結果、今回使用した iHRM のような GTX1-4 を主な成分とする組成では、各抽出液の毒組成に大きな違いはみられず、総毒量も有意な差はみられなかった。

また、ホールボディを試料とした今回の検証では、規制値付近の毒力及び総毒量は LC-MS/MS 法が MBA より若干高い値となった。海域により生息するプランクトンは異なることが報告されており^{9,10)}、それを捕食する二枚貝の毒組成も異なる。また、毒化の初期と終期では毒組成が異なることも報告されている^{11,12,13)}。今回の検証では GTX 群が主な毒成分であったが、異なる毒組成においても検証は必要と考えられる。

iHRM を無毒試料で希釈したものを用いて規制値以下で比較したところ、MBA と LC-MS/MS 法による分析で両者とも毒量と得られる分析結果に相関関係は見られたが、回帰直線の傾きは異なった。LC-MS/MS 法ではマウス毒力及び STX 当量とも比例計算で希釈した毒力に見合った変化となったが、MBA では異なる結果となり、このことから中央致死時間が 7 分を超過する低い毒量の場合には MBA の毒力は実際の毒力とずれがあることを確認した。EFSA も 800 µg STX・2HCl eq./kg の規制値付近では MBA で定量可能だが、370 µg STX・2HCl eq./kg 以下での定量は難しいとしており、毒化の発生及び収束の動向を正確に把握するには毒性の高い STX 及び NEO も測定対象に含めた LC-MS/MS 法が有用であることが示唆された。

謝 辞

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

研究を進めるにあたり御助言頂きました、国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所の渡邊龍一先生に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1)大島泰克:麻痺性貝毒に関する化学・生化学研究. 日本水産学会誌,**74**(5),767-771,2008
- 2)鈴木敏之他:貝毒ー新たな貝毒リスク管理措置ガイドラインとその導入に向けた研究. 恒星社厚生閣,9-26,2017 (ISBN978-4-7699-1611-6)
- 3)鈴木敏之:世界の貝毒規制値と国内の貝毒監視体制. 水環境学会誌,**43**(A)No.10,359-364,2020
- 4)昭和 55 年 7 月 1 日付環乳第 30 号厚生省環境衛生局肉肉衛生課長通知「貝毒の検査等について」
- 5)COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU)2021/1709,2021
- 6)Boundy,M.J.et al. : Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction.*J.Chromatogr.A*,1387,1-12,2015
- 7)渡邊龍一他:麻痺性貝毒とテトロドトキシン測定のための超高速液体クロマトグラフィー質量分析法(UHPLC/MS/MS)マニュアル”,国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所,2020
- 8)Oshima,Y : Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J.AOAC Int.*,**78**,528-532,1995
- 9)村上りつ子他:麻痺性貝毒ー最近の知見を中心にー. 食品衛生学雑誌,**41**(1),1-10,2000
- 10)野口玉雄他:貝毒の謎ー食の安全と安心. 成山堂書店,1-55,2004 (ISBN4-425-8819-5)
- 11)今井一郎他:貝毒研究の最先端ー現状と展望. 恒星社厚生閣,9-29,2007 (ISBN978-4-7699-1062-6)
- 12)沼野聡他:LC-MS/MS によるホタテガイ中の麻痺性貝毒分析,食品衛生研究,**72**(3),53-59,2022
- 13)新貝達成:LC-MS/MS を用いたホタテガイとアカガイの麻痺性貝毒分析について. 宮城県保健環境センター年報,**40**,42-45,2022

Evaluation of a paralytic shellfish toxin testing method around the regulatory limits utilizing LC-MS/MS using scallop in-house reference materials

Ayano Tanaka, Megumi Shibata,¹ Asuka Igarashi, Juri Iwadate, Akemi Yamamoto

In-house reference materials (iHRM) using whole body scallops from the East Japan sea area that had become toxic and that were around the Japanese limit of 4 MU/g for paralytic shellfish toxins were used to evaluate the variability of measured values around the limits using LC-MS/MS. When 10 samples among iHRM were measured using LC-MS/MS, the variability of the total toxic content was $\leq 10\%$, similar to that observed in a mouse bioassay (MBA). In addition, comparisons of the toxin composition and total toxin content between the 0.1 mol/L hydrochloric acid solution extraction in the current official Japanese method and the 1% acetic acid solution extraction used in internationally recognized instrumental methods such as the AOAC OMA 2005.06 showed no significant differences. When the whole body was used, the toxicity and total toxin content around the limits were slightly higher using the LC-MS/MS method compared to the MBA method.

Keywords: paralytic shellfish toxins, LC-MS/MS, scallop

大気拡散計算を行うエクセルマクロの開発：米国 EPA の“AERMOD”モデル

花石竜治

大気拡散シミュレーションモデルである、米国環境保護局の“AERMOD”を表計算ソフト・マイクロソフト社エクセルのマクロでコードした。粉じんの拡散を計算するために、このモデルに重力沈降および乾性沈着を取り入れた。また、AERMOD において地形が汚染物質の地表濃度分布に与える影響を考慮する *dividing streamline* (流れの分割) の概念を、地形を考慮したモデル計算で示した。また、適用例として、安定層条件における粉じんの粒径別の濃度分布およびそれに対する地形の効果、並びに対流層条件における小規模焼却炉から排出されたダイオキシン類の濃度分布の年間平均値を得るための試算例を論じた。これらの検討から、このエクセルマクロの大気拡散シミュレーションモデルにより、汚染物質の濃度分布やその濃度の桁を推定できることが確認された。

Key words: Atmospheric dispersion model, AERMOD, Dividing streamline, Particulate matter, Dioxins

1. はじめに

大気環境科学において、発生源からの汚染物質の放出に伴う移送および拡散は、公害問題が顕在化した時代から、研究されてきた。

大気拡散シミュレーションは、これら移送、拡散の現象を、気象学の知見をもとに数理的に推定するものである。その歴史は、1950 年代までの Sutton、Bosanquet らの計算式による方法に始まった。これらは我が国の大気汚染防止法による二酸化硫黄の規制 (K 値規制) に適用され¹⁾、大気中の二酸化硫黄濃度の削減において成果をもたらした。

その後、1990 年代には、米国環境保護局(USEPA)により次世代の ISC モデル (*Industrial Source Complex model*) が提唱された。これ以降の世代のモデルは、環境問題の質的変化により、主に環境アセスメントの分野で使用されてきている。我が国の経済産業省-低煙源工場拡散モデル (*Ministry of Economy, Trade and Industry-Low rise Industrial Source dispersion model*; METI-LIS モデル) は、この USEPA の ISC モデルに基礎を置く²⁾。また、現在は、企業が開発した拡散計算を行うソフトウェア³⁾ も入手可能であり、拡散計算はルーチンワークとなっている。

このような中で、USEPA が現在、公認している大気拡散計算モデル (*the American Meteorological Society and U.S. Environmental Protection Agency*

Regulatory MODEL; AERMOD モデル)⁴⁾ は、2000 年代に開発され、基本的には定常的正規型プルーム式を拡散モデルとしている。このソフトウェアは、対流層における鉛直方向の濃度分布を *bi-Gaussian* (2 正規型) と仮定し、また、複雑な地形での大気拡散について流れの分割 (*dividing streamline*) の概念を導入するなどの特徴がある。計算機資源が豊富な今日では、数値解モデルの差分法などの精密で大規模な数値計算法が確立されているが、AERMOD はプルーム式を用いることから、計算時間が短くすみ、現在でも十分に有効な計算法であると考えられる。

AERMOD はソースコードも公開されているが、FORTRAN で記述されているため、モデルパラメータの可視化などが見にくく、コード全体を理解するのも困難である。そこで、著者は、このモデルを表計算ソフトウェア・マイクロソフト社エクセルのマクロで記述し、エクセルのワークシート内で計算設定をして結果の図示までを完結させればより使いやすくなると考えた。本研究は、AERMOD をエクセルマクロに移植し、簡便に拡散計算を行うことを目的とした。本報告は、計算法の理論の記述も含み、これに多くのスペースを割いたが、これは記述を本報告で完結させるよう努めたことによる。なお、本報告では、蛇行するプルームの扱いおよびダウンウォッシュの扱いは省略した。

また、AERMOD の計算コードでは、それぞれ気象や地形考慮のプリプロセッサ（拡散計算に先だって実行する演算ユニット）である AERMET や AERMAP が別に動作するようになっているが、本報告では、これらの機能を AERMOD 本体にまとめて一つのプログラムとした。

なお、AERMOD 計算法の記述^{5),7)}では、気象学および大気環境科学の多くの文献が引用されたが、本報告においては、その解説^{5),7)}が引用されているものは再引用せず、一部の論述で確認のために文献^{6),8)-11)}を引用したことを断っておく。

2. 理論

2.1 境界層におけるエネルギー収支⁵⁾

(1) 顕熱フラックス

境界層の成長と構造を決める熱と運動量の流れをエネルギー収支によって議論する。まず、顕熱フラックス H を推定する。これは上向きを正に取る。

ボーエン比 B_0 ⁶⁾ は、顕熱と潜熱の比で、水の蒸発に必要な潜熱を L_e 、水の蒸発量を E 、潜熱フラックスを $L_e E$ とすると、

$$B_0 = \frac{H}{L_e E} \quad (1)$$

で定義される。

正味の放射量を R_n とすると、これも上向きが正で、

$$H = (1 - s) \frac{R_n}{1 + \frac{1}{B_0}} \quad (2)$$

とおくことができ、AERMOD では、 $s = 0.1$ により顕熱フラックス H を求めている。

(2) 正味の放射量

次式により、正味の放射量 R_n が与えられる。

$$R_n = \frac{(1 - r\{\varphi\})R + c_1 T_{ref}^6 - \sigma_{SB} T_{ref}^4 + c_2 n}{1 + c_3} \quad (3)$$

こ こ で、 $c_1 = 5.31 \times 10^{-13} \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-6}$ 、 $c_2 = 60 \text{ W m}^{-2}$ 、 $c_3 = 0.12$ 、 σ_{SB} は Stefan Boltzmann 定数($5.67 \times 10^{-8} \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-4}$)、 T_{ref} は参照高さにお

ける気温(K)、 n は割合で示した雲量である。

地表のアルベドは

$$r\{\varphi\} = r' + (1 - r')\exp(a\varphi + b) \quad (4)$$

で表され、 $a = -0.1$ 、 $b = -0.5(1 - r')^2$ 、 $r' = r\{\varphi = 90^\circ\}$ である。(4)式中の太陽高度 φ は、度の単位で表す。また、以下、括弧 $\{ \}$ は、 $\{ \}$ 内を引数とする関数を示す。

雲量で補正された日射 R は

$$R = R_0(1 - 0.75n^{3.4}) \quad (5)$$

で、 R_0 は直達日射の場合の放射量で、

$$R_0 = 990 \sin \varphi - 30 \text{ (W m}^{-2}\text{)} \quad (6)$$

である。

(3) 対流層と安定層の間の遷移

太陽高度が変化し、境界層が対流層から安定層に変わるとき、顕熱フラックスの符号が正から負へと変化する。この遷移点の太陽高度（臨界太陽高度 φ_{crit} とする。）は、(3)式で $R_n = 0$ と置き、これについて解くと得られる。このとき、(3)(6)式から、

$$\sin \varphi_{crit} = \frac{1}{990} \left[\frac{-c_1 T_{ref}^6 + \sigma_{SB} T_{ref}^4 - c_2 n}{(1 + r\{\varphi_{crit}\})(1 - 0.75n^{3.4})} + 30 \right] \quad (7)$$

が得られる。太陽高度が上記の臨界太陽高度 φ_{crit} より高い場合、境界層は対流層、それ以外の場合には安定層となる。

2.2 対流層のパラメータ導出^{5),7)}

摩擦速度 u_* は、乱流の強さのパラメータで風速の次元を持ち、

$$u_* = \frac{k u_{ref}}{\ln \left(\frac{z_{ref}}{z_0} \right) - \Psi_m \left\{ \frac{z_{ref}}{L} \right\} + \Psi_m \left\{ \frac{z_0}{L} \right\}} \quad (8)$$

であり、 k は無次元の Karman 定数(0.4)、 u_{ref} は参照高さでの風速、 z_{ref} は参照高さ、 z_0 は地表の粗度長で、地表面の空気力学的な粗度を示すパラメータ、 Ψ_m は対流層についての普遍関数である。

次なる(9)(10)式により μ および μ_0 を、(11)(12)式で普遍関数 Ψ_m を定義する。普遍関数とは、風速の鉛直方向の勾配を無次元化したものである。

$$\mu = \left(1 - 16 \frac{z_{ref}}{L}\right)^{\frac{1}{4}} \quad (9)$$

$$\mu_0 = \left(1 - 16 \frac{z_0}{L}\right)^{\frac{1}{4}} \quad (10)$$

$$\Psi_m \left\{ \frac{z_{ref}}{L} \right\} = 2 \ln \left(\frac{1 + \mu}{2} \right) + \ln \left(\frac{1 + \mu^2}{2} \right) - 2 \tan^{-1} \mu + \frac{\pi}{2} \quad (11)$$

$$\Psi_m \left\{ \frac{z_0}{L} \right\} = 2 \ln \left(\frac{1 + \mu_0}{2} \right) + \ln \left(\frac{1 + \mu_0^2}{2} \right) - 2 \tan^{-1} \mu_0 + \frac{\pi}{2} \quad (12)$$

Monin-Obukhov 長 L は次式により定義され、大気の安定度の数値的な指標である。

$$L = - \frac{\rho c_p T_{ref} u_*^3}{kgH} \quad (13)$$

ここで、 ρ は空気の密度(1.2 kg m^{-3})、 g は重力加速度 (9.8 m s^{-2})、 c_p は空気の定圧比熱 ($1004 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$)である。

(8)(13)式を繰り返し計算で収束させ、 u_* と L を得る。

対流速度スケール w_* は、次式で表され、対流の強さを表すパラメータである。

$$w_* = \sqrt[3]{\frac{gHz_{ic}}{\rho c_p T_{ref}}} \quad (14)$$

ここで、 z_{ic} は対流混合高さであり、後述する。

2.3 安定層のパラメータ導出^{5), 7)}

摩擦温度 (温度スケール) θ_* は、摩擦速度 u_* から次式で決定できる。

$$\theta_* = - \frac{H}{\rho c_p u_*} \quad (15)$$

(13)(15)式から、Monin-Obukhov 長は、

$$L = \frac{T_{ref}}{kg\theta_*} u_*^2 \quad (16)$$

である。

安定層における上空の風速として、

$$u = \frac{u_*}{k} \left[\ln \left(\frac{z}{z_0} \right) + \frac{\beta_m z_{ref}}{L} \right] \quad (17)$$

を用いる。ここで $\beta_m = 5$ であり、(16)式を(17)式に代入して、解 u の式を得る。その解は

$$C_D = \frac{k}{\ln(z_{ref}/z_0)} \quad (18)$$

$$u_o^2 = \frac{\beta_m z_{ref} g \theta_*}{T_{ref}} \quad (19)$$

として、

$$u_* = \frac{C_D u_{ref}}{2} \left[1 + \sqrt{1 - \left(\frac{2u_o}{C_D^{1/2} u_{ref}} \right)^2} \right] \quad (20)$$

である。ここで(20)式の導出においては、上空の風速 u を、参照高さにおける風速 u_{ref} に置換した。(20)式は、風速 u_{ref} が臨界値 $u_{crit} = \sqrt{4\beta_m z_{ref} g \theta_* / T_{ref} C_D}$ 以上の時に実数解を与える。風速がこの臨界値よりも小さい場合、次式で摩擦速度 u_* および摩擦温度 θ_* を定義する。

$$u_* := u_* \{u = u_{crit}\} \frac{u}{u_{crit}} \quad \text{for } u < u_{crit} \quad (21)$$

$$\theta_* := \theta_* \{u = u_{crit}\} \frac{u}{u_{crit}} \quad \text{for } u < u_{crit} \quad (22)$$

(19)(20)式から摩擦速度 u_* を求めるには、摩擦温度 θ_* が必要であるが、次の経験式を使用できる。

$$\theta_* = 0.09 \left[1 - \frac{1}{2} n^2 \right] \text{ (K)} \quad (23)$$

顕熱フラックス H は、(15)式から導かれた次式から求める。

$$H = -\rho c_p u_* \theta_* \quad (24)$$

また Monin-Obukhov 長 L は、求めたパラメータを用いて、(13)式で計算する。

2.4 混合高さ^{5), 7)}

対流層における混合高さ z_i は、対流層境界の高さであり、機械的混合高さ z_{im} と対流混合高さ z_{ic} の高い方とする。

一方、安定層においては、混合高さ z_i は、安定層の境界高さで、機械的混合高さ z_{im} に等しい。

(1) 対流混合高さ

日の出前の早朝の温位と、時間変化する地表の熱フラックスを、対流層の時間発展の計算に用いる。

$$\begin{aligned} z_{ic} \theta\{z_{ic}\} - \int_0^{z_{ic}} \theta\{z\} dz \\ = (1 + 2A) \int_0^t \frac{H\{t'\}}{\rho c_p} dt' \quad (25) \end{aligned}$$

ここで、 $A = 0.2$ 、 t は日の出からの時間である。

なお、(25)式の左辺の温位は日の出前のものであり、よって安定層条件のものであり、日の出後に対流層となった場合にゼロとなる温位勾配とは関係しない。

(2) 機械的混合高さ

機械的混合高さ z_{im} は、中緯度における次の経験式により求める。

$$z_{im} = 2300 u_*^{3/2} \text{ (m)} \quad (26)$$

(26)式は安定層条件および対流層条件の両方に用いることができる。

2.5 境界層の鉛直構造^{5), 7)}

(1) 風速

風速の鉛直プロファイルは次の対数型を取る。

$$u\{z\} = u\{z = 7z_0\} \left(\frac{z}{7z_0} \right) \quad \text{for } z < 7z_0 \quad (27)$$

$$\begin{aligned} u\{z\} \\ = \frac{u_*}{k} \left[\ln \left(\frac{z}{z_0} \right) - \Psi_m \left\{ \frac{z}{L} \right\} \right] \quad \text{for } 7z_0 \leq z \leq z_i \quad (28) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} + \Psi_m \left\{ \frac{z_0}{L} \right\} \\ u\{z\} = u\{z = z_i\} \quad \text{for } z > z_i \quad (29) \end{aligned}$$

対流層の場合、普遍関数 Ψ_m は、(11)(12)式の z_{ref} を z で置き換えて用いる。

安定層の場合、次式を用いる。

$$\Psi_m \left\{ \frac{z}{L} \right\} = -17 \left[1 - \exp \left(-0.29 \frac{z}{L} \right) \right] \quad (30)$$

$$\Psi_m \left\{ \frac{z_0}{L} \right\} = -17 \left[1 - \exp \left(-0.29 \frac{z_0}{L} \right) \right] \quad (31)$$

(2) 温位勾配

対流層においては、温位勾配 $\partial\theta/\partial z$ はゼロとする。対流層より上の安定層においては、温位勾配は 0.005 K m^{-1} の一定値を用いる。

安定層においては、100 m 以下では、次の温位勾配の鉛直プロファイルを使用する。

$$\frac{\partial\theta}{\partial z} = \frac{\theta_*}{k(z=2)} \left[1 + 5 \frac{(z-2)}{L} \right] \quad \text{for } z \leq 2 \text{ m} \quad (32)$$

$$\frac{\partial\theta}{\partial z} = \frac{\theta_*}{kz} \left(1 + 5 \frac{z}{L} \right) \quad \text{for } 2 \text{ m} < z \leq 100 \text{ m} \quad (33)$$

高度 100 m より上の温位勾配は、次式で表す。

$$\frac{\partial\theta}{\partial z} = \frac{\partial\theta\{z_{mx}\}}{\partial z} \exp \left[-\frac{(z - z_{mx})}{0.44 z_{i\theta}} \right] \quad (34)$$

ここで、 $z_{mx} = 100 \text{ m}$ 、 $z_{i\theta} = \max(z_{im}, 100 \text{ m})$ であり、定数 0.44 は測定から得られた数値である。安定層においては、すべての高度 z において、温位勾配の最小値を 0.002 K m^{-1} とする。

(3) 温位

AERMOD では、温位勾配から温位の鉛直プロファイルを計算する。まず参照高さ(z_{ref})における温位を求める。

$$\theta\{z_{ref}\} = T_{ref} + \frac{gz_{msl}}{c_p} \quad (35)$$

ここで、 $z_{msl} = z_{ref} + z_{base}$ は、温度プロファイルの基礎となる高さである。温位はその勾配から次式で計算する。

$$\theta\{z + \Delta z\} = \theta\{z\} + \frac{\overline{\partial\theta}}{\partial z} \Delta z \quad (36)$$

ここで、 $\overline{\partial\theta/\partial z}$ は層 Δz における平均的な温位勾配である。

(4) 鉛直方向の乱流

対流層においては、鉛直方向の乱流拡散係数 σ_{wT}^2 は、機械的成分($\sigma_{wm} \propto u_*$)および強い対流条件の極限 ($\sigma_{wc} \propto w_*$)からなり、次式で表される。

$$\sigma_{wT}^2 = \sigma_{wc}^2 + \sigma_{wm}^2 \quad (37)$$

対流成分 σ_{wc} は次式で計算する。

$$\sigma_{wc}^2 = 1.6 \left(\frac{z}{z_{ic}} \right)^{2/3} w_*^2 \quad \text{for } z \leq 0.1z_{ic} \quad (38)$$

$$\sigma_{wc}^2 = 0.35w_*^2 \quad \text{for } 0.1z_{ic} < z \leq z_{ic} \quad (39)$$

$$\begin{aligned} \sigma_{wc}^2 \\ = 0.35w_*^2 \exp \left[-\frac{6(z - z_{ic})}{z_{ic}} \right] \quad \text{for } z > z_{ic} \end{aligned} \quad (40)$$

機械的乱流の拡散係数(σ_{wm})は、境界層成分 σ_{wml} と、境界層の上($z > z_i$)の残余層(residual layer)成分 σ_{wmr} からなる。

$$\sigma_{wm}^2 = \sigma_{wml}^2 + \sigma_{wmr}^2 \quad (41)$$

境界層成分の拡散係数 σ_{wml} は、混合層内では摩擦速度に比例し、次のとおりとなる。

$$\sigma_{wml} = 1.3u_* \sqrt{1 - \frac{z}{z_i}} \quad \text{for } z < z_i \quad (42)$$

$$\sigma_{wml} = 0 \quad \text{for } z \geq z_i \quad (43)$$

残余層成分の拡散係数 σ_{wmr} は、混合層より上($z > z_i$)の測定結果がない場合、混合高さにおける風速に比例するとして、 $\sigma_{wmr} = 0.02u\{z_i\}$ とする。混合層内では、この σ_{wmr} は、高さ z_i からゼロまで、高さに対して直線的に減少するとする。

安定層においては、鉛直方向の乱流は機械的乱流のみからなり、(37)式の σ_{wm} のみとなる。この項を、対流層と同様に用いて、中立条件で拡散幅が連続となるようにする。

(5) 横方向の乱流

対流層においては、横方向の全乱流の拡散係数もまた、機械的成分 σ_{vm} と対流成分 σ_{vc} の二乗和で求められ、

$$\sigma_{vT}^2 = \sigma_{vc}^2 + \sigma_{vm}^2 \quad (44)$$

である。乱流の対流成分は対流速度スケールと関係して、次式で求められる。

$$\sigma_{vc}^2 = 0.35w_*^2 \quad (45)$$

z_i 以上の高さでは、最小値を $\sigma_{vc} = 0.5 \text{ m s}^{-1}$ とする。

安定層では、横方向の乱流は、機械的乱流のみからなる。

対流層および安定層の機械的乱流の拡散係数 σ_{vm} は、地表付近で次の形とし、摩擦速度に関係する。

$$\sigma_{v0}^2 = 3.6u_*^2 \quad (46)$$

地表と機械的混合高さの上端までは、 σ_{vm}^2 は直線的に変化すると仮定する。

$$\sigma_{vm}^2 = \left(\frac{\sigma_{vm}^2\{z_{im}\} - \sigma_{v0}^2}{z_{im}} \right) z + \sigma_{v0}^2 \quad \text{for } z \leq z_{im} \quad (47)$$

$$\sigma_{vm}^2 = \sigma_{vm}^2\{z_{im}\} \quad \text{for } z > z_{im} \quad (48)$$

ここで、 $\sigma_{vm}^2\{z_{im}\} = \min(\sigma_{v0}^2, 0.25 \text{ m}^2 \text{ s}^{-2})$ である。

2.6 地形の考慮^{5),7)-10)}

ここで述べる地形モデルにおいては、汚染物質濃度を二つの漸近状態で補間する。大気の状態が安定な条件では、流れとその中のプルームは、障害物に遭遇した場合、水平方向に動く。一方、大気が不安定な条件では、プルームはより簡単に障害物を駆け上がる。すなわち、これらの二つの場合が二つの漸近状態となる。

AERMOD における地形の考慮では、プルームが発生源からリセプターまで直線上を飛行すると仮

定してリセプターにおける汚染物質濃度を推定するが、地形によって流れが蛇行することは想定していない。

一般的な濃度式は次式のとおりである。

$$C_T\{x_r, y_r, z_r\} = f C_{c,s}\{x_r, y_r, z_r\} + (1-f) C_{c,s}\{x_r, y_r, z_p\} \quad (49)$$

ここで、 $C_T\{x_r, y_r, z_r\}$ は全濃度、 $C_{c,s}\{x_r, y_r, z_r\}$ は丘の水平方向へ流れるプルームからの寄与（添え字 c と s は、それぞれ、対流層および安定層の条件を示す）、 $C_{c,s}\{x_r, y_r, z_p\}$ は地形に従い丘に登るプルームからの寄与を示し、 f は重み付け因子、 $\{x_r, y_r, z_r\}$ はリセプターの座標である。

ここで、 z_t をリセプターにおける地形の局所的な高さとする、 $z_p (= z_r - z_t)$ はリセプターの地表からの高さを示す。

平坦な地形では、 $z_t = 0$ 、 $z_p = z_r$ であり、(49) 式の濃度は、単一の水平なプルームの形になる。

重み付け因子 f は「臨界的な分割する流れの高さ」(critical dividing streamline height) H_c の概念により定式化する。

いま、単位質量の気塊のエネルギーについて、次式を得る。

$$\frac{1}{2} u^2(H_c) = \int_{H_c}^z (z - \zeta) N^2(\zeta) d\zeta \quad (50)$$

ここで、 $u(H_c)$ は高さ H_c における風速、 $N(z)$ は浮力についての Brunt-Vaisala 振動数であり、次式で与えられる。

$$N(z) = \sqrt{\frac{\partial \theta}{\partial z} \frac{g}{\theta}} \quad (51)$$

Brunt-Vaisala 振動数とは、浮力が働く系において、気塊が平衡高さから動こうとする場合、変位に比例し負号を付した復元力が働くため、変位の二乗に比例するポテンシャルエネルギーを持つ系となつて、調和振動子と同様に考えることができる。このとき、次元が時間の逆数の振動数が与えられ、これが Brunt-Vaisala 振動数である。(50) 式の両辺は、 $[(長さ)^2(時間)^{-2}]$ の次元となっている。

さて、モデルで水平方向へ流れる割合 φ_p について次式で定義する。これは H_c の関数である。

$$\varphi_p = \frac{\int_0^{H_c} C_{c,s}\{x_r, y_r, z_r\} dz}{\int_0^\infty C_{c,s}\{x_r, y_r, z_r\} dz} \quad (52)$$

(49) 式の重み付け因子 f は、次式で与えられ、 $\varphi_p = 1$ のとき H_c が十分に高く、プルームが丘を駆け上がれず、このとき $f = 1$ である。逆に φ_p が小さいときは H_c が低いことに対応し、プルームが丘を駆け上がる。このとき、 $f \rightarrow 1/2$ となる。

$$f = \frac{1}{2} (1 + \varphi_p) \quad (53)$$

不規則に複数の丘がある地域では、局所的な地形の高さ z_h と有効プルーム高さ h_e の和である鉛直方向の高さ z' を超えてプルームが運ばれる場合にリセプターに濃度上昇をもたらすと仮定して、これまでに述べた概念を応用できる。この鉛直高さは次式で定義される。

$$z' = z_h + h_e \quad (54)$$

よって、(50) 式により H_c を求めるときに、 $z = z'$ とおき計算する。

2.7 対流層における AERMOD の濃度推定^{5),7)}

対流層 ($L < 0$) で、鉛直方向の速度 (w) の鉛直分布は、非正規型の濃度分布となり、一般的に、高い位置にある浮力を持たない発生源のプルームの中心線が降下する。AERMOD では、濃度の鉛直方向の広がり、を、2 正規分布を用いてモデル化する。一方、横方向の拡散は、正規分布と仮定する。

対流層内の拡散では、直接的発生源、間接的発生源、および進入する発生源の三つを考える。図 1 にこれらの概念を示した。

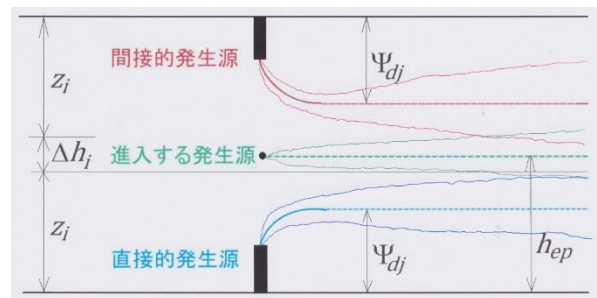


図 1 対流層において想定する発生源の概念図。記号は文中で記述している。

「直接的」な発生源は、地表に直接的に運ばれるブルームを扱い、これらの地表および対流層の境界での反射を考慮する。ブルームの高さは、多重反射がない場合には、煙突高さにブルーム上昇分を加えて、鉛直方向の拡散を考慮したものとなる。

「間接的」な発生源とは、拡散の初期に上昇気流で上昇したブルームが混合高さ z_i において反射され、以後、それに続いて地表 $z = 0$ と混合高さ z_i において反射されるように設定する。その際に、ブルームの上昇 (Δh_i) により、下方への拡散をある程度遅らせるように考える。これは、浮力により上昇するブルームが、混合高さ z_i の近くで留まり、下方へ混合しにくい傾向があることをモデル化していると考えてよい。ブルームの高さは、あらわに多重反射の効果を含み、それが 1 回の図 1 の例では、 $2z_i - \Psi_{dj} + \Delta h_i$ となる。

「進入する」発生源とは、対流層境界の上の逆転領域に進入し、その後、対流層に再び入り拡散するものを考える。

進入しない、すなわち対流層に留まった発生源物質の割合 f_p は、

$$f_p = 0 \quad \text{for } \Delta h_h < 0.5\Delta h_{eq} \quad (55)$$

$$f_p = 1 \quad \text{for } \Delta h_h > 1.5\Delta h_{eq} \quad (56)$$

$$f_p = \frac{\Delta h_h}{\Delta h_{eq}} - 0.5 \quad \text{for } 0.5\Delta h_{eq} \leq \Delta h_h \leq 1.5\Delta h_{eq} \quad (57)$$

ここで、 $\Delta h_h = z_i - h_s$ 、 h_s は煙突高さ、 Δh_{eq} は安定条件でブルームが上昇する平衡高さであり、

$$\Delta h_{eq} = \sqrt[3]{2.6^3 P_s + \left(\frac{2}{3}\right)^3 \Delta h_h} \quad (58)$$

と表される。 P_s を進入についてのパラメータ、 F_b を煙突の浮力フラックス、 N_h を混合高さより高い層における Brunt-Vaisala 振動数とすると、次式が成り立つ。

$$P_s = \frac{F_b}{u N_h^2 \Delta h_h^3} \quad (59)$$

ここで、

$$F_b = g w_s r_s^2 \frac{\Delta T}{T_s} \quad (60)$$

$$N_h = \sqrt{\frac{g}{\theta\{z_i\}} \frac{\partial \theta}{\partial z}} \Big|_{500 \text{ m} > z > z_i} \quad (61)$$

また、 u は煙突高さにおける風速、 w_s は煙突からの排出速度、 r_s は煙突の半径、 T_s は排出口における温度、 $\Delta T = T_s - T_a$ 、 T_a は室温である。

対流層における全濃度 (C_c) は、上記の直接的、間接的および進入する三つの発生源の寄与の和として得られる。ブルームが水平方向の状態のとき、

$$C_c\{x_r, y_r, z\} = C_d\{x_r, y_r, z\} + C_r\{x_r, y_r, z\} + C_p\{x_r, y_r, z\} \quad (62)$$

ここで、 C_d 、 C_r および C_p は、それぞれ直接的、間接的および進入する発生源寄与である。同様に、地形にしたがう状態の濃度は、(62)式で、 z を z_p に置き換えた形となる。

以下に拡散式を展開するが、安定層条件においても、それらは拡散の 1 時間値としてのスケールを想定している。

(1) 対流層における濃度への直接的な発生源寄与

直接的なブルームによる濃度は次式で与えられる。添え字 j は 2 正規分布関数において、上昇気流 ($j = 1$) と下降気流 ($j = 2$) に対応する関数を指定する。

$$\begin{aligned} C_d\{x_r, y_r, z\} &= \frac{Q f_p}{\sqrt{2\pi} \tilde{u}\{x, y\}} F_y\{x_r, y_r\} \sum_{j=1}^2 \sum_{m=0}^{\infty} \frac{\lambda_j\{x_r\}}{\sigma_{zj}\{x_r\}} \\ &\times \left\langle \exp \left[-\frac{(z - \Psi_{dj}\{x_r\} - 2mz_i)^2}{2\sigma_{zj}\{x_r\}^2} \right] \right. \\ &\left. + \exp \left[-\frac{(z + \Psi_{dj}\{x_r\} + 2mz_i)^2}{2\sigma_{zj}\{x_r\}^2} \right] \right\rangle \quad (63) \end{aligned}$$

ここで、 $\Psi_{dj}\{x_r\} = h_s + \Delta h_d\{x_r\} + \overline{w}_j x_r / u$ はブルームの高さ、 u は煙突における風速、 $F_y\{x_r\}$ は横方向の分布関数((64)式、後述)、 $\Delta h_d\{x_r\}$ はブルームの上昇分((71)式、後述)、 Q は排出速度である。

これら以外のパラメータについては後述する。

横方向の分布関数は次式で与えられる。

$$F_y\{x_r, y_r\} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_y\{x_r\}} \exp\left(-\frac{y_r^2}{2\sigma_y\{x_r\}^2}\right) \quad (64)$$

ここで、横方向の拡散幅は次式で与えられる。

$$\sigma_y\{x_r\} = \frac{\sigma_v\{x, y\}x_r/\tilde{u}\{x, y\}}{\left(1 + \frac{x_r/\tilde{u}\{x, y\}}{2T_{Ly}}\right)^p} \quad (65)$$

ここで、 $p = 0.5$ 、 $\tilde{u}\{x, y\}$ は有効風速、 $\sigma_v\{x, y\}$ は横方向の有効乱流拡散係数、 T_{Ly} はラグランジアン積分時間スケールである。

ここで、ラグランジアン積分時間スケールについて記述する。まず、自己相関関数というものを考える。これは、時刻 t において、ランダムな物理量 M について時間間隔 T を与えた場合に、統計力学的集団の期待値 $\langle M(t)M(t+T) \rangle$ に比例する量をいう。系が定常的な場合、この値は t に依存しない。この期待値は単純には、時間間隔 T におけるランダムなパラメータの相関係数を示すと考えられる。自己相関関数を T の軸で積分した値が積分時間スケールである。自己相関関数が T の増加に伴ってすぐに減衰する関数、すなわち相関時間が短い場合は、積分時間スケールが小さい。一方、これがすぐに減衰せず、相関時間が長い関数となる場合、積分時間スケールが長い。

乱流とは、その流れの場において速度差が生じている流れを指す。流れのベクトル場で速度差があるということは、ベクトル場の回転 ($\mathbf{M}$ を流れの速度ベクトルとした場合、 $\text{rot } \mathbf{M} = \nabla \times \mathbf{M}$) がゼロベクトルでないことである。すなわち、乱流とは、渦が生じている流れである。

乱流現象において、積分時間スケールが長いというのは、乱流をつくる渦が長い間、存在することを示す。このように、積分時間スケールは渦の寿命と考えられ、乱れの強さと関係していると解釈できる。

また、大気のような連続体の記述方法として、ラグランジュの方法と、それに対比されるオイラーの方法がある。前者は時間差で構成要素の移動を追跡し、後者は空間の各点における物理量の時間変化を追跡する。ラグランジアン積分時間スケールとは、

ラグランジュの方法により物理学的系の構成要素についての自己相関関数から求めた積分時間スケールとなる。つまり、系の構成要素として、いまの場合、流れを作る気塊の動きに着目した乱流の強さを示す量と解釈できる。

また、「有効」パラメータは、そのパラメータの鉛直プロファイルから、プルーム中の汚染物質が発生源からリセプターまで輸送される（プルームが拡散過程で経験する）層を鉛直方向で平均化して、「有効」な（等価な）値として求めたものである。この「有効」パラメータは、チルダマークで表記する（例えば、有効風速は $\tilde{u}$ で示す）。

有効パラメータの定義を以下に示す。考える高さの下限と上限をそれぞれ h_b 、 h_t とする。これはプルームが経験する高さの範囲を示すものである。これらを、リセプターの高さ z_r とリセプターの水平座標 (x, y) およびプルーム高さ H_p および拡散幅 σ_z から次式で与える。

$$h_b = \begin{cases} H_p\{x, y\} & \text{if } H_p\{x, y\} \leq z_r \\ \max[H_p\{x, y\} - 2.15\sigma_z\{x_r, z_r\}, z_r] & \text{if } H_p\{x, y\} > z_r \end{cases} \quad (66)$$

$$h_t = \begin{cases} \min[H_p\{x, y\} + 2.15\sigma_z\{x_r, z_r\}, z_r] & \text{if } H_p\{x, y\} \leq z_r \\ H_p\{x, y\} & \text{if } H_p\{x, y\} > z_r \end{cases} \quad (67)$$

ここで、リセプターの水平座標 (x, y) は、地形を考慮してその高さ z_r を与えるものであり、風下距離 x_r とその軸から 90° 位相が進んだ軸の座標 y_r および天頂から見て北から時計回りに進む風向の角度 θ から次式の直交変換で与えられる。

$$\begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} = -\begin{pmatrix} \sin \theta & \cos \theta \\ \cos \theta & -\sin \theta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_r \\ y_r \end{pmatrix} \quad (68)$$

これらを用いて、水平座標 (x, y) におけるパラメータ α の有効値 $\tilde{\alpha}(x, y)$ は次式で与えられる。

$$\tilde{\alpha}(x, y) = \frac{1}{h_t - h_b} \int_{h_b}^{h_t} \alpha(z) dz \quad (69)$$

つまり、拡散幅を考慮し、プルームの高さの幅において平均的なパラメータの値を求めている。

さて、 l を横方向の乱流長さスケールとすると、ラグランジアン積分時間スケール T_{Ly} は横方向の有効拡散係数 $\sigma_v\{x, y\}$ から、 $T_{Ly} = l/\sigma_v\{x, y\}$ と表せる。すなわち、横方向の拡散が強い場合には、この時間スケールは小さくなる。これにより、

(65)式は無次元の風下距離 X と、無次元の高さスケール δ で表される。

$$\sigma_y\{x_r\} = \frac{\widetilde{\sigma}_v\{x, y\}x_r}{\widetilde{u}\{x, y\}(1 + \delta X)^{p'}} \quad (70)$$

ここで、 $X = \widetilde{\sigma}_v\{x, y\}x_r/\widetilde{u}\{x, y\}z_i$ 、 $\delta = z_i/l$ である。 δ 、 p' はそれぞれ、78、0.3 と設定される。

$\Delta h_d\{x_r\}$ は、煙突からの排出の運動量と浮力効果を重ね合わせて、次式で与えられ、排出速度が大きく、また浮力がいほど大きくなるが、また、煙突付近の風速にも関係する。

$$\Delta h_d\{x_r\} = \left(\frac{3F_m x_r}{\beta_1^2 u_p^2} + \frac{3}{2\beta_1^2} \cdot \frac{F_b x_r^2}{u_p^3} \right)^{1/3} \quad (71)$$

ここで、 $F_m = (T/T_s)w_s^2 r_s^2$ は煙突における運動量、 F_b は煙突における浮力フラックス((60)式)、 $\beta_1 = 0.6$ は取り込みのパラメータである。 u_p はプルームの上昇を計算するときの風速で、対流層の場合、 $u_p = u\{h_s\}$ と取る。

添え字 j は、上昇気流に対して 1、下降気流に対して 2 であり、 $\lambda_j\{x_r\}$ は、それぞれの分布への重み付け因子である。(63)式は、虚像プルームによる地面での反射を扱っている。これに続く多重反射は、発生源の高さを $2z_i + h_s, -2z_i - h_s, 4z_i + h_s, -4z_i - h_s$ などのようにおいて扱う。

鉛直方向の拡散幅 ($\sigma_{zj}\{x_r\}$) は、上空成分 ($\sigma_{zej}\{x_r\}$) および地表成分 ($\sigma_{zg}\{x_r\}$) からなり、次式が成り立つ。

$$\sigma_{zj}\{x_r\}^2 = \sigma_{zej}\{x_r\}^2 + \sigma_{zg}\{x_r\}^2 \quad (72)$$

ここで、上空成分 $\sigma_{zej}\{x_r\}$ は次式となっており、鉛直方向の拡散係数と風速の関数である。

$$\sigma_{zej}\{x_r\} = \alpha_b \frac{\sigma_{wj}\{x_r\}x_r}{\widetilde{u}\{x, y\}} \quad (73)$$

ここで、 $\sigma_{wj}\{x_r\}$ は、上昇気流 ($j = 1$) および下降気流 ($j = 2$) に対する鉛直方向の拡散係数である。

係数 α_b は、 $\alpha_b = \min(0.6 + 4\Psi_{d2}/z_i, 1.0)$ とし、地表層の上 ($\Psi_{dj} \geq 0.1z_i$) について 1.0 になるようにする。

次に、拡散係数 $\sigma_{wj}\{x_r\}$ の算出を記述する¹¹⁾。対流層においては、二つの正規分布の重ね合わせ

が、 w の確率密度関数(PDF, probability density function) p_w に対する良い近似となることが実験的に示されている。これによれば、

$$p_w = \frac{\lambda_1\{x_r\}}{\sqrt{2\pi}\sigma_{w1}\{x_r\}} \exp\left[-\frac{(w - \overline{w}_1\{x_r\})^2}{2\sigma_{w1}\{x_r\}^2}\right] + \frac{\lambda_2\{x_r\}}{\sqrt{2\pi}\sigma_{w2}\{x_r\}} \exp\left[-\frac{(w - \overline{w}_2\{x_r\})^2}{2\sigma_{w2}\{x_r\}^2}\right] \quad (74)$$

ここで、 $\overline{w}_j\{x_r\}$ および $\sigma_{wj}\{x_r\}$ ($j = 1, 2$) は、それぞれ、鉛直方向速度の平均値および拡散係数であり、二乗平均を取った鉛直方向の全乱流拡散係数である σ_w に比例する。 $\overline{w}_1\{x_r\}$ 、 $\overline{w}_2\{x_r\}$ 、 $\sigma_{w1}\{x_r\}$ 、 $\sigma_{w2}\{x_r\}$ 、 $\lambda_1\{x_r\}$ 、 $\lambda_2\{x_r\}$ は、 w の統計分布の 3 次のモーメントを $\overline{w^3}\{x_r\}$ として $S\{x_r\} = \overline{w^3}\{x_r\}/\sigma_w\{x_r\}^3$ 、およびパラメータ $R = \sigma_{w1}\{x_r\}\overline{w}_1\{x_r\} = -\sigma_{w2}\{x_r\}\overline{w}_2\{x_r\}$ として表せる。

(74)式の $p_w(w)$ のパラメータは、その統計分布の 0 次から 3 次のモーメントを取って得られる。その結果、 $\overline{w^0} = \lambda_1\{x_r\} + \lambda_2\{x_r\} = 1$ 、 $\overline{w}\{x_r\} = 0$ 、 $\sigma_w^2 = 1.2u_*^2 + 0.31w_*^2$ 、 $\overline{w^3}\{x_r\} = S\{x_r\}\sigma_w^3$ が得られる。なお、モーメントとは、統計分布の形状から、その分布の性質を積分によって求めたものである。

$R = \sigma_{w1}\{x_r\}/\overline{w}_1\{x_r\} = -\sigma_{w2}\{x_r\}/\overline{w}_2\{x_r\}$ から、 $\overline{w}_1\{x_r\}$ および $\overline{w}_2\{x_r\}$ の解が次式で表される。

$$\frac{\overline{w}_1\{x_r\}}{\sigma_w} = \frac{\gamma_1 S\{x_r\}}{2} + \frac{1}{2} \sqrt{\gamma_1^2 S\{x_r\}^2 + \frac{4}{\gamma_2}} \quad (75)$$

$$\frac{\overline{w}_2\{x_r\}}{\sigma_w} = \frac{\gamma_1 S\{x_r\}}{2} - \frac{1}{2} \sqrt{\gamma_1^2 S\{x_r\}^2 + \frac{4}{\gamma_2}} \quad (76)$$

ここで、

$$\gamma_1 = \frac{1 + R^2}{1 + 3R^2} \quad (77)$$

$$\gamma_2 = 1 + R^2 \quad (78)$$

また、次式が得られる。

$$\lambda_1\{x_r\} = \frac{\overline{w_2}\{x_r\}}{\overline{w_2}\{x_r\} - \overline{w_1}\{x_r\}} \quad (79)$$

$$\lambda_2\{x_r\} = -\frac{\overline{w_1}\{x_r\}}{\overline{w_2}\{x_r\} - \overline{w_1}\{x_r\}} \quad (80)$$

こうして、 σ_w^2 、 S 、 R が決まれば、 $\overline{w_j}\{x_r\}$ 、 $\sigma_{wj}\{x_r\}$ 、 $\lambda_j\{x_r\}$ ($j = 1, 2$) が決定できる。ここで、 $R = 2$ と仮定する。以上から、(73)式の鉛直方向の拡散幅の上空成分が求められる。

一方、鉛直方向の拡散幅の地表成分 $\sigma_{zg}\{x_r\}$ は、摩擦速度、Monin-Obukhov 長などの関数で、 $\Psi_{dj} < 0.1z_i$ のとき、

$$\begin{aligned} \sigma_{zg}\{x_r\} \\ = b_c \left[1 - 10 \left(\frac{\Psi_{dj}\{x_r\}}{z_i} \right) \right] \left(\frac{u_*}{\tilde{u}\{x, y\}} \right)^2 \left(\frac{x_r^2}{|L|} \right) \end{aligned} \quad (81)$$

ここで、 $b_c = 0.5$ である。地表層より上 ($\Psi_{dj} > 0.1z_i$) では、 $\sigma_{zg}\{x_r\} = 0$ とする。一方、地表からの拡散の極限 ($\Psi_{dj} = 0$) に対する鉛直方向の拡散幅は $\sigma_{zg}\{x_r\} \propto (u_*/\tilde{u}\{x, y\})^2 (x_r^2/|L|)$ となる。

(2) 対流層における間接的な発生源の濃度への寄与

間接的な発生源からの濃度は、次式の形を取る。

$$\begin{aligned} C_r\{x_r, y_r, z\} \\ = \frac{Q f_p}{\sqrt{2\pi}\tilde{u}\{x, y\}} F_y\{x_r, y_r\} \sum_{j=1}^2 \sum_{m=1}^{\infty} \frac{\lambda_j\{x_r\}}{\sigma_{zj}\{x_r\}} \\ \times \left\langle \exp \left[-\frac{(z + \Psi_{rj}\{x_r\} - 2mz_i)^2}{2\sigma_{zj}\{x_r\}^2} \right] \right. \\ \left. + \exp \left[-\frac{(z - \Psi_{rj}\{x_r\} + 2mz_i)^2}{2\sigma_{zj}\{x_r\}^2} \right] \right\rangle \end{aligned} \quad (82)$$

ここで、 $\sigma_{zj}\{x_r\}$ と $F_y\{x_r\}$ については直接的発生源の場合と同様に定義する。プルームの高さは、 $\Psi_{rj}\{x_r\} = \Psi_{dj}\{x_r\} - \Delta h_i\{x_r\}$ であり、 $\Delta h_i\{x_r\}$ は次式で与えられる¹¹⁾。

$$\Delta h_i\{x_r\} = \sqrt{\frac{2F_b z_i}{\alpha_h u_p r_y r_z}} \frac{x_r}{u_p} \quad (83)$$

ここで、後述するように r_y と r_z はそれぞれ横方向および鉛直方向のプルームの半幅である。 u_p はプルームの上昇の算出に使用した風速、 $\alpha_h = 1.4$ である。

プルームの断面積の半幅 r_y および r_z を求める。修正した取り込み(entrainment)モデルを、対流層の上端に上ったプルームに適用すると、

$$r_y\{x_r\}r_z\{x_r\} = r_i^2 + \frac{\alpha_e \alpha_y^{3/2} w_*^2 x_r^2}{4 u_p} \quad (84)$$

ここで、 $r_i = \beta_2(z_i - h_s)$ はプルームが対流層の上端に達したときのプルームの半径で、 $\beta_2 = 0.4$ 、 $\alpha_y = 2.3$ 、 α_e は無次元の取り込みパラメータで、経験的に 0.1 と推定されている。

(3) 対流層における進入する発生源の濃度への寄与

進入する発生源とは、対流層境界の上に達したプルームがもう一度対流層に取り入れられるものである。

進入する発生源については、鉛直方向および横方向の双方の濃度分布が正規型となり、

$$\begin{aligned} C_p\{x_r, y_r, z\} &= \frac{Q(1-f_p)}{\sqrt{2\pi}\tilde{u}\{x_r\}\sigma_{zp}\{x_r\}} F_y\{x_r, y_r\} \\ &\times \sum_{m=-\infty}^{\infty} \left\langle \exp \left[-\frac{(z - h_{ep} - 2mz_{ieff}\{x_r\})^2}{2\sigma_{zp}\{x_r\}^2} \right] \right. \\ &\left. + \exp \left[-\frac{(z + h_{ep} + 2mz_{ieff}\{x_r\})^2}{2\sigma_{zp}\{x_r\}^2} \right] \right\rangle \end{aligned} \quad (85)$$

ここで、 $F_y\{x_r\}$ は(64)式で定義し、 $z_{ieff}\{x_r\}$ は、安定層について後述するように、混合リッド（鉛直方向の大気拡散を制限する蓋）の高さである。

対流層に留まる発生源物質の割合について $f_p = 0$ のとき（進入しない割合がゼロのとき、すなわち全部が進入するとき）、進入するプルームの高さは $h_{ep} = h_s + \Delta h_{eq}$ となる。一方、部分的に進入する場合については、 $h_{ep} = h_s + z_i/2 + 0.75\Delta h_{eq}$ となる。

進入する発生源の寄与について、鉛直方向の拡散幅($\sigma_{zp}\{x_r\}$)は、(72)式にある項のうち高い位置におけるもの($\sigma_{zep}\{x_r\}$)と仮定される。この項は、鉛

直方向の有効拡散係数 $\widetilde{\sigma}_{wT}$ ((41)式) およびラグランジアン積分時間スケール T_{Lzp} にも依存し、

$$\sigma_{zep}\{x_r\} = \frac{\widetilde{\sigma}_{wT}(x_r/\tilde{u}\{x_r\})}{\sqrt{1 + \frac{x_r/\tilde{u}\{x_r\}}{2T_{Lzp}}}} \quad (86)$$

と表され、乱れが強いほど大きい。

ラグランジアン時間スケールを、 $T_{Lzp} = l/\widetilde{\sigma}_{wT}$ と表し、中立 ($l_n = 0.36h_{ep}$) と安定 ($l_s = 0.27\widetilde{\sigma}_{wT}/N$) の極限で補間 ($1/l = 1/l_n + 1/l_s$) すると、(86)式は次のように書き直される。

$$\sigma_{zep}\{x_r\} = \frac{\widetilde{\sigma}_{wT}x_r/\tilde{u}\{x, y\}}{\sqrt{1 + \frac{\widetilde{\sigma}_{wT}x_r/\tilde{u}\{x, y\}}{2} \left(\frac{1}{0.36h_{ep}} + \frac{\tilde{N}\{x, y\}}{0.27\widetilde{\sigma}_{wT}} \right)}} \quad (87)$$

ここで、 $\tilde{N}\{x, y\}$ は有効な Brunt-Vaisala 振動数であり、浮力の効果を表す。

進入する発生源については、(87)式で $\tilde{N}\{x, y\} = 0$ が適用されるが、その理由は、ブルームが地表の高さのリセプターに到達する前に、よく混合された対流層 (Brunt-Vaisala 振動数がゼロ) を通過するよう設定されるからである。

2.7 安定層における AERMOD の濃度推定^{5), 7)}

安定的な条件 ($L > 0$) にあるとき、AERMOD は濃度を次のように推定する。

$$C_s\{x_r, y_r, z\} = \frac{Q}{\sqrt{2\pi}\tilde{u}\{x, y\}\sigma_{zs}\{x_r\}} F_y\{x_r, y_r\} \times \sum_{m=-\infty}^{\infty} \left\langle \exp \left[-\frac{(z - h_{es}\{x_r\} - 2mz_{ieff}\{x_r\})^2}{2\sigma_{zs}\{x_r\}^2} \right] + \exp \left[-\frac{(z + h_{es}\{x_r\} + 2mz_{ieff}\{x_r\})^2}{2\sigma_{zs}\{x_r\}^2} \right] \right\rangle \quad (88)$$

ここで、 $z_{ieff}\{x_r\}$ は有効な混合リッド高さ、 $\sigma_{zs}\{x_r\}$ は全鉛直方向拡散幅、 $h_{es}\{x_r\}$ はブルームの有効高さで $h_{es}\{x_r\} = h_s + \Delta h_s\{x_r\}$ 、 $F_y\{x_r\}$ は横方向の分布関数である。

安定層におけるブルーム上昇 $\Delta h_s\{x_r\}$ は、排ガスの運動量や浮力による上昇のほか、浮力によるポテンシャルエネルギーに関する Brunt-Vaisala 振動数の項も含み、次式で与えられる。

$$\begin{aligned} \Delta h_s\{x_r\} &= 2.66^3 \sqrt{\frac{F_b}{N\{h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2\}^2 u_p\{h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2\}}} \\ &\times \left[\frac{N'\{h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2\} F_m}{F_b} \sin \left(\frac{N'\{h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2\} x_r}{u_p\{h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2\}} \right) \right. \\ &\left. + 1 - \cos \left(\frac{N'\{h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2\} x_r}{u_p\{h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2\}} \right) \right] \end{aligned} \quad (89)$$

ここで、 $N'\{h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2\} = 0.7N\{h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2\}$ で、Brunt-Vaisala 振動数 $N\{z\}$ は次式で定義する。

$$N\{z\} = \sqrt{\frac{g}{\theta\{z\}} \frac{\partial \theta}{\partial z}} \quad (90)$$

また、 $F_m = (T/T_s)w_s^2 r_s^2$ である。 N および u_p は、計算の初期では、煙突における量 (高さ $h_s\{x_r\}$) として設定する。その後、 N および u_p を高さ $h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2$ におけるものと置いて、繰り返し計算で収束させる。(89) 式は、ブルームが最大高さに達する風下距離 x_f の手前の場合に適用する。これより遠くでは、 $\Delta h_s\{x_r\}$ は x_r に関して定数とする。ここで、風下距離 x_f は次式で与えられる。

$$\begin{aligned} x_f &= \frac{u_p \left\{ h_s + \frac{\Delta h_s\{x_r\}}{2} \right\}}{N' \left\{ h_s + \frac{\Delta h_s\{x_r\}}{2} \right\}} \\ &\times \tan^{-1} \left(\frac{-F_m N' \{ h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2 \}}{F_b} \right) \end{aligned} \quad (91)$$

(91)式を(90)式に代入して、最終的なブルーム上昇高さを得る。

$$\begin{aligned} \Delta h_s\{x_r\} &= 2.66^3 \sqrt{\frac{F_b}{u_p\{h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2\} N\{h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2\}^2}} \end{aligned} \quad (92)$$

大気の状態が中立に近いとき、Brunt-Vaisala 振動数がゼロに近くなり、(89)式が異常なブルーム上昇高さを与える。この条件では、次式でブルーム上昇高さを求める。

$$\Delta h_s\{x_r\} = 1.2L_n^{3/5} (h_s + 1.2L_n)^{2/5} \quad (93)$$

ここで、 $L_n\{x_r\} = F_b/(u_p\{x_r\}u_*^2)$ である。

風速がゼロに近いとき、(89)式はまた非現実的な値を与える。このとき次式を用いる。

$$\Delta h_s = \frac{4F_b^{1/4}}{N\{h_s + \Delta h_s\{x_r\}/2\}^{3/4}} \quad (94)$$

安定層においては、プルーム物質は次式で与えられる有効リッド高さ $z_{ieff}\{x_r\}$ で反射されると仮定する。これはプルーム高さに鉛直方向の拡散幅による高さを加えたものと混合高さとして、高い方を取ったものである。

$$z_{ieff}\{x_r\} = \max(h_{es}\{x_r\} + 2.15\sigma_{zs}\{x_r\}, z_{im}) \quad (95)$$

よって、 $z_{ieff}\{x_r\}$ は風下距離 x_r に依存するものとなる。

安定層においては、鉛直方向の拡散幅($\sigma_{zs}\{x_r\}$)は、高い位置の成分($\sigma_{zes}\{x_r\}$)と、地表近くの成分($\sigma_{zgs}\{x_r\}$)の寄与からなると仮定される。それ以外の場合には、 $h_{es}\{x_r\} < z_i$ のとき、これら二つの成分の間の単純な線形補間を仮定して、拡散幅を得る。すなわち、

$$\sigma_{zs}\{x_r\} = \left(1 - \frac{h_{es}\{x_r\}}{z_i}\right)\sigma_{zgs}\{x_r\} + \left(\frac{h_{es}\{x_r\}}{z_i}\right)\sigma_{zes}\{x_r\} \quad (96)$$

ここで、 $h_{es}\{x_r\} \geq z_i$ のとき、 $\sigma_{zs}\{x_r\}$ は $\sigma_{zes}\{x_r\}$ に等しいと置く。

高い位置の成分は、(87)式と同様に、

$$\sigma_{zes}\{x_r\} = \frac{\widetilde{\sigma}_{wT} x_r / \tilde{u}\{x_r\}}{\sqrt{1 + \frac{x_r / \tilde{u}\{x_r\}}{2T_{Lzs}}}} \quad (97)$$

ここで、 $\widetilde{\sigma}_{wT}$ は機械的混合による鉛直方向の乱流の拡散係数である((37)式)。 T_{Lzs} はラグランジアン時間スケールで、(87)式と同様に、(97)式は次のように書き直される。

$$\sigma_{zes}\{x_r\} = \frac{\sigma_{wT} x_r / \tilde{u}\{x, y\}}{\sqrt{1 + \frac{\widetilde{\sigma}_{wT} x_r / \tilde{u}\{x, y\}}{2} \left(\frac{1}{0.36h_{es}\{x_r\}} + \frac{\tilde{N}\{x, y\}}{0.27\widetilde{\sigma}_{wT}} \right)}} \quad (98)$$

拡散幅の地表近くの成分 $\sigma_{zgs}\{x_r\}$ は次のように計算され、乱流の大きさを表す摩擦速度 u_* や Monin-Obukhov 長の関数である。

$$\sigma_{zgs}\{x_r\} = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \left(\frac{u_* x_r}{\tilde{u}\{x, y\}} \right) / \sqrt[3]{1 + 0.7 \frac{x_r}{L}} \quad (99)$$

さて、(95)式に戻る。リセプターの高さが $z_r > z_{ieff}\{x_r\}$ の場合、有効反射面(リッド)は考慮されない。この考え方は、対流層での進入する発生源に対しても応用される(この場合、 $z_{ieff}\{x_r\}$ は、 $\sigma_{zs}\{x_r\}$ および $h_{es}\{x_r\}$ をそれぞれ $\sigma_{zp}\{x_r\}$ および $h_{ep}\{x_r\}$ に置き換えた(95)式を用いて計算する)。

また、(88)式における横方向の分布関数は、対流層条件の(64)式で、その拡散幅は同じく(65)式で与えられる。

なお、(65)式の $\sigma_y\{x_r\}$ は、より新しい(70)式で求める。これらのパラメータの意味は対流層の場合と同じである。

2.9 浮力による鉛直方向の拡散係数の増加^{5), 7)}

乱流に加えて、全体の鉛直方向の拡散へのプルームの浮力の寄与を組み入れる。浮力による拡散係数は、次のとおり計算される。

$$\sigma_b\{x_r\} = \frac{0.4\Delta h\{x_r\}}{\sqrt{2}} \quad (100)$$

ここで、 $\Delta h\{x_r\}$ は煙突の上端からの安定なプルームの上昇高さである。対流層の場合、直接的寄与について $\Delta h\{x_r\} = \Delta h_d\{x_r\}$ ((71)式)、間接的寄与について $\Delta h\{x_r\} = \Delta h_d\{x_r\} - \Delta h_i\{x_r\}$ ((83)式)、進入する寄与について $\Delta h\{x_r\} = h_{ep}\{x_r\} - h_s$ 、安定層の場合 $\Delta h = \Delta h_s\{x_r\}$ ((89)(92)(93)(94)式)である。全拡散係数の二乗は $\sigma_b\{x_r\}$ を二乗の形で $\sigma_{zs}\{x_r\}$ の二乗に加えて計算される。

2.10 粉じんの扱い^{12), 13)}

AERMOD の粉じんの扱いは、米国エネルギー省

の粉じん飛散シミュレーションソフトウェア DUSTRAN に記述がある¹⁴⁾。AERMOD そのものの粉じんの扱いの理論的記述は現在、公開されていないが、DUSTRAN が採用している粉じんの乾性沈着速度の計算式として、米国 Desert Research Institute の経験式に基づくものがあり、粉じんの粒径（流体力学径）と地面の粗度長をパラメータとしている¹⁴⁾。

本研究では、ダイオキシン類¹²⁾ および重金属類¹³⁾ の拡散計算で使用された式を用いる。

粉じんの拡散における特徴は、(a) 地表面で反射されないこと（煙源の虚像を考慮する必要がないこと）、(b) 風下距離に応じて重力沈降すること、および (c) 地表面で沈着されること、である。

(b)については、プルームの中心線の高さが、風速 $\tilde{u}\{x, y\}$ と沈降速度 V_s 、および風下距離 x_1 で、 $V_s/\tilde{u}\{x, y\} \cdot x_1$ だけ下がることを考慮する。

(c)については、本研究では乾性沈着のみを考慮する。排出速度 Q が乾性沈着により補正されて $Q(x_r)$ となるとして、粒子の沈着速度を V_g とすると、宮野ほか¹³⁾ から、

$$Q(x_r) = Q \cdot \exp \left\{ -\sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{V_g}{\tilde{u}\{x, y\}} \int_0^{x_r} F_z \{x_1\} dx_1 \right\} \quad (101)$$

となる。ここで、 $F_z \{x_1\}$ は拡散式(63)(82)(85)(88)式にある指数関数の項であるが、(a)を考慮して、虚像反射を無視した。

この関数は、対流層条件における直接的な寄与の場合は(102)式で、同じく間接的寄与の場合は(103)式で、同じく進入する寄与の場合は(104)式で、安定層条件の場合は(105)式で与えられる。これらの式について(101)式で積分を取った。また、吉田ほか¹²⁾ に従い、 $V_g = V_s$ と仮定し、粉じんの粒径に対する近似式は、吉田ほか¹²⁾ により、(106)式で表した。ここで、 ϕ は粉じんの粒径(μm)を示す。

$$\begin{aligned} F_{z,d}\{x_1\} &= \sum_{j=1}^2 \sum_{m=0}^{\infty} \frac{\lambda_j \{x_1\}}{\sigma_{zj} \{x_1\}} \\ &\times \exp \left[-\frac{\{(\Psi_{dj} \{x_1\} - V_s / \tilde{u}\{x, y\} \cdot x_1) + 2mz_i\}^2}{2\sigma_{zj} \{x_1\}^2} \right] \end{aligned} \quad (102)$$

$$\begin{aligned} F_{z,r}\{x_1\} &= \sum_{j=1}^2 \sum_{m=1}^{\infty} \frac{\lambda_j \{x_1\}}{\sigma_{zj} \{x_1\}} \\ &\times \exp \left[-\frac{\{(\Psi_{rj} \{x_1\} - V_s / \tilde{u}\{x, y\} \cdot x_1) - 2mz_i\}^2}{2\sigma_{zj} \{x_1\}^2} \right] \end{aligned} \quad (103)$$

$$\begin{aligned} F_{z,p}\{x_1\} &= \frac{1}{\sigma_{zp} \{x_1\}} \\ &\times \sum_{m=-\infty}^{\infty} \exp \left[-\frac{\{(h_{ep} - V_s / \tilde{u}\{x, y\} \cdot x_1) + 2mz_{ieff} \{x_1\}\}^2}{2\sigma_{zp} \{x_1\}^2} \right] \end{aligned} \quad (104)$$

$$\begin{aligned} F_{z,s}\{x_1\} &= \frac{1}{\sigma_{zs} \{x_1\}} \\ &\times \sum_{m=-\infty}^{\infty} \exp \left[-\frac{\{(h_{es} \{x_1\} - V_s / \tilde{u}\{x, y\} \cdot x_1) + 2mz_{ieff} \{x_1\}\}^2}{2\sigma_{zs} \{x_1\}^2} \right] \end{aligned} \quad (105)$$

$$\begin{aligned} V_s &= 2.88 \times 10^{-5} \phi^2 + 5.54 \times 10^{-6} \phi \\ &\quad - 2.84 \times 10^{-5} \text{ (m s}^{-1}\text{)} \end{aligned} \quad (106)$$

3. 材料と方法

3.1 数値計算の対象

(1) 粉じんの拡散計算

地形の効果および粉じんの粒径に応じた拡散の違いの効果を試算するために、県内の金属製錬工場の煙突からの粉じん飛散を想定した。

用いたパラメータを列挙すると、煙突高 60.0 m、有効煙突高 64.1 m、排出速度 $9,700 \mu\text{g s}^{-1}$ 、湿りガス量 $115,900 \text{ m}^3\text{-N h}^{-1}$ 、煙突半径 1 m、排ガス温度 194°C 、地表付近での風速 2 m s^{-1} 、地表温度 25°C 、拡散計算のパラメータは、日時が 6 月 21 日 3:30 JST、地面の粗度長 0.5 m、ボーエン比 0.5、雲量 0、地表のアルベド 0.05 であった。

発生源のデータは、重金属類についての宮野ほかの既報¹³⁾ により、工場の煙突からのニッケル化合物の排出を想定し、排ガス中のニッケル濃度を $300 \mu\text{g m}^{-3}\text{-N}$ とした。

(2) ダイオキシン類の拡散計算

年間平均の濃度分布および環境基準達成の可否を試算するために、県内のある焼却炉について、ダイオキシン類の拡散計算を試行した。

この焼却炉が日中 8 時間稼働し、日射がある場合の対流層条件で排ガスが拡散すると仮定した。排ガス中のダイオキシン類は、粒径の細かいばいじんの形態で排出されると考え、ガス体の拡散と

近似した。

用いたパラメータは、煙突高 8.87 m、有効煙突高は約 9.5 m (風速により異なる)、ダイオキシンの排出速度 $0.00104 \mu\text{g-TEQ s}^{-1}$ 、排ガス中の湿りガス量は $2,485 \text{ m}^3\text{-N h}^{-1}$ 、煙突半径 0.25 m、排ガス温度 122 °C とした。拡散計算のパラメータは、地面の粗度長 0.5 m、ボーエン比 0.5、地表のアルベド 0.05 であった。

また、2022 年の気象庁「過去のデータ」¹⁵⁾ を参照し、最寄りのアメダスのデータを用いた。毎月の風向頻度や平均気温、および日照率(%)を 10 で除した数を雲量として採用した。月ごとの変動を考慮するために、毎月 15 日の正午の太陽高度を試算¹⁶⁾ して、12 か月の大気拡散を計算し重ね合わせ、年間平均値の濃度分布を求めた。

3.2 数値計算の方法

(1) 非線形方程式の解法

(7)式は φ_{crit} についての非線形方程式であるが、これは Newton 法で解いた。また、数値積分は台形公式で計算した。

(2) 座標変換に伴う処理

ブルーム式は風下距離とそれに直交する軸 (x_r, y_r) で記述されるが、任意の風向に対応して、北を縦軸の正の方向、東を横軸の正の方向とする座標系 (x, y) に移行した。その座標変換は、天頂から見て北から時計回りに進む風向の角度を用いた(68)式で表される。濃度分布を得るための計算では、16 方位で示される風向を按分して、年間平均値を求める場合は 32 方位、単一の風向について計算する場合は 64 方位とした。

上記の座標変換で、変換前の離散的座標値 (物理量の分布を記述する行列の添え字に対応する離散的な座標値) と変換後の離散的座標 (同) は、必ずしも 1 対 1 対応しない。このため、変換後の離散的座標点における濃度分布は、変換により同一の離散的座標点に与えられた濃度のうちの最大値を取り、これらをスプライン補間して取得した。

(3) 太陽高度および対流混合高さの算出

(3)(4)(6)(7)(25)式における太陽高度は、その場所の緯度経度および暦日時刻から、赤坂の式¹⁶⁾ で算出した。

(25)式の顕熱フラックス $H(t)$ は、(3)式で与えられる正味の放射量 R_n から(2)式により分刻み

で求めた。これを時刻 (時間単位) について積分し、高度を変えてこの変数について積分を行い、左辺から右辺を引いた量が正となるときの高度を対流混合高さ z_{ic} とした。

(4) 地形データの取得および演算法

3.1 (1) の工場周辺の地形データは、以下の方法で取得した。

国土地理院の電子地図で、5 m 間隔のメッシュで標高を示したものがある¹⁷⁾。このデータは xml 形式であり、フリーウェア¹⁸⁾ で緯度、経度、標高の順にテキストデータが並んだ csv 形式に変換できる。しかしこのままでは、5 m 間隔のデータであり、拡散計算のスケールで、2 km 四方の 25 m 間隔の $80 \times 80 = 6400$ 点程度の行列データとするには、過密であった。そこで、本研究では、フリーウェアのソフトが出力した csv ファイルを読み込み、緯度・経度方向の 5 点の平均で 25 m 間隔の標高データとして、もとの各 csv ファイルを統合するソフトウェアを Visual Basic で作成した。これにより、一度に 500 個のもとの各 csv ファイルから、25 m 間隔の標高データを持つ一つの csv ファイルとすることができた。

今回作成したエクセルマクロでは、この 25 m 間隔の標高データを読み込み、発生源を中心とした 11.4 km 四方の正方形の地表の標高を得て、95 m 間隔の地形データの二次元データ (120×120) として計算に供し、 80×80 の二次元データを表示した。なお、経度が与える距離が緯度に対して持つ比率は、発生源位置の緯度の余弦とした。

この地形データに対して、AERMOD の地形考慮を行うために、(54)式で定義される鉛直高さ z' を、(50)式で $z = z'$ として、この式で H_c を $H_c = 0$ から上方へ走査し、左辺から右辺を差し引いた量が符号を変えるときの高さ H_c を求めた。

(5) 計算コードの高速化

本研究においては、数値計算量が膨大なため、高速演算を指向して、定型の演算部の一部 (温位勾配や拡散係数のような高度に依存するパラメータの計算) を C++ で記述し DLL として、エクセルマクロの Visual Basic for Application (VBA) コードからその関数を呼び、使用した。この方法の要点の一つは、VBA コードと C++ コードで配列データを授受するときに、C++ の SAFEARRAY データ型を使用することである。

また、同一の気象パラメータのもとで行う拡散計算そのものは、同じく C++ で記述してコンソールアプリケーションとし、データの授受はファイル操作で行い、これをエクセルマクロから同期して使用した。エクセルマクロから DLL を繰り返して使用した場合、DLL の関数実行後にそのメモリ領域を解放できなかったが、コンソールアプリケーションであれば処理終了後に確実にメモリから解放されることから、これを使用した。

4. 結果

4.1 粉じんの拡散計算（安定層条件の例）

3.1(1) の計算条件では、安定層条件で、Monin-Obukhov 長 711 m であった。図 2 に上空の (a) 風速、(b) 温位勾配、(c) 温位、(d) 鉛直方向拡散係数、(e) 水平方向拡散係数のプロファイルを示す。この図で、横軸は各物理量を示し、縦軸は高度を混合高さ ($z_i = 969$ m) で除した量を示す。

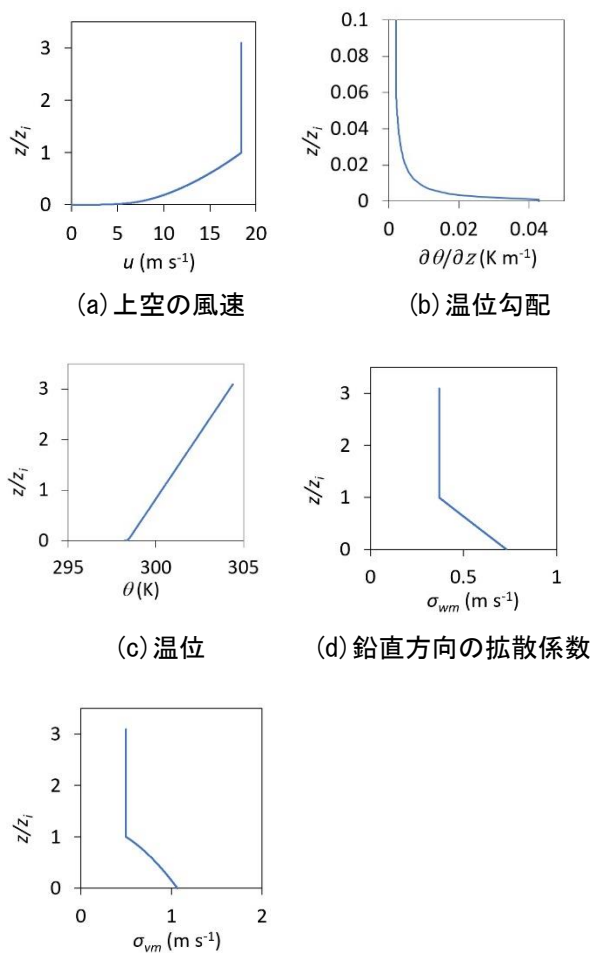


図 2 粉じんの拡散計算で設定した安定層条件における鉛直方向のプロファイル。

図 3 に、標高データを考慮しない場合に汚染物質濃度を粉じんの粒径別に風下距離に対してプロットしたものを示す。

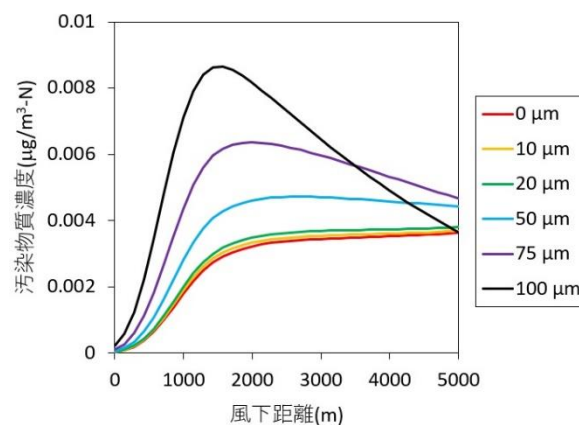
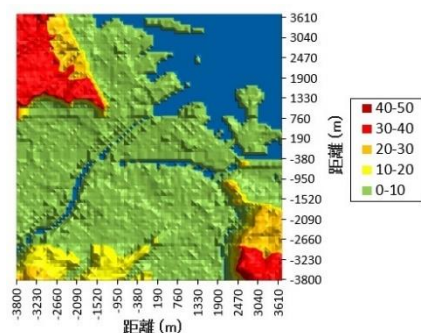
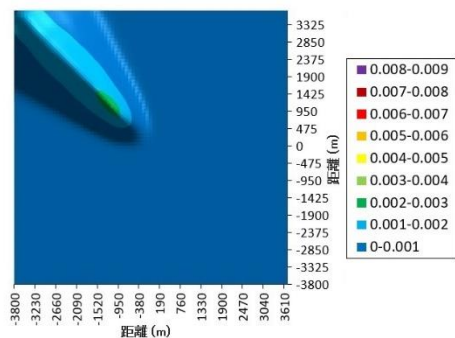


図 3 粉じんの粒径別の風下距離についての汚染物質濃度分布。凡例は粒径を示す。

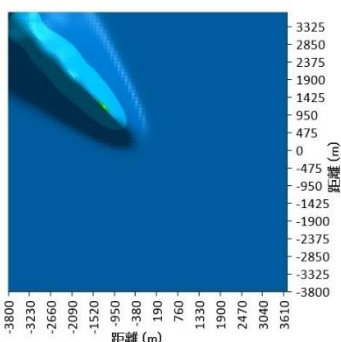
図 4 に、(a) 標高データから求めた地形の等高線図、ガス体の場合で (b) 発生源から南東の風が吹いた場合の汚染物質の濃度分布で標高データを考慮したもの、および (c) 標高データを考慮しないもの、粉じんの粒径 100 μm の場合、(d) 同じく標高データを考慮したもの、(e) 考慮しないものを示す。なお、以下の等高線図はすべて上が北である。



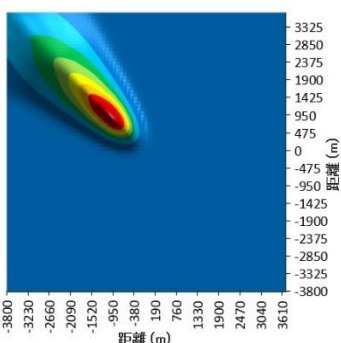
(a) 標高データ（凡例は高さ (m)、青色は水域を示す）



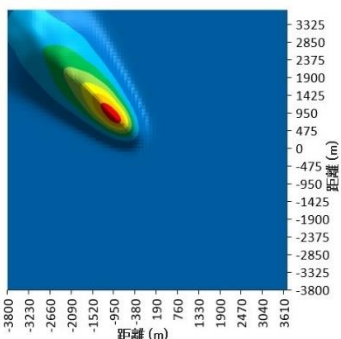
(b) ガス体、地形考慮



(c) ガス体、地形考慮せず



(d) 粒径 100 μm、地形考慮



(e) 粒径 100 μm、地形考慮せず

図 4 標高データ、ガス体および粉じんの大気拡散における地形の効果。(b)の凡例は大気中濃度($\mu\text{g m}^{-3}\text{-N}$)。

4.2 ダイオキシン類の拡散計算(対流層条件の例)

3.1(2)の計算結果を図5に示す。この図では、対流層条件における①直接的な寄与、②間接的な寄与、および③進入する寄与の三つの寄与の和を示す。今回の条件ではこれらの三つの寄与のうち、①直接的な寄与がほとんどを占めており、表示した等高線図のすべての位置で 99.99%以上であった。

年平均値の最大着地濃度地点は、発生源から北北東に 51 m の距離であり、最大着地濃度は、 $9.1 \times 10^{-9} \mu\text{g-TEQ m}^{-3}\text{-N} = 0.0091 \text{ pg-TEQ m}^{-3}\text{-N}$ と試算された。

なお、大気の安定性を示すパラメータで、計算で得られた Monin-Obukhov 長 L の範囲は、 $-507 \text{ m} < L < -123 \text{ m}$ であり、弱不安定の条件に相当した¹⁹⁾。また、計算時間は約 2 時間であった。

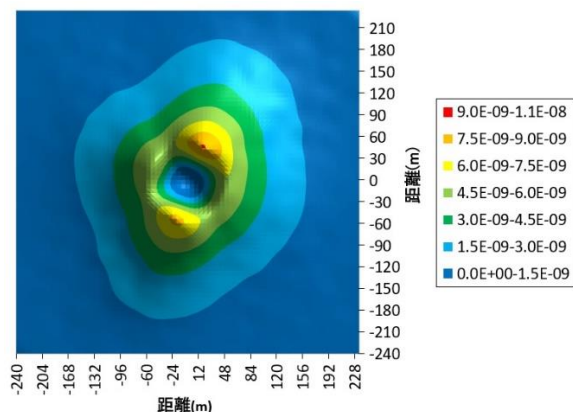


図 5 焼却炉周辺におけるダイオキシン類の大気拡散シミュレーション。原点が発生源の位置で、凡例は大気中濃度(単位: $\mu\text{g m}^{-3}\text{-N}$)を示す。

5. 考察

5.1 気象学的パラメータの高度分布

今回は安定層条件における気象学的パラメータだけを図示した(図2)が、この図で、混合層境界($z = z_i$)の上下でのパラメータの高度分布の扱いを明瞭に示すことができた。これらのパラメータは、特に混合層内で高度に対して依存しており、これらのパラメータを使用することで、従来の単純な正規型ブルーム式を高精度化できたと考えられた。

5.2 粉じんの粒径別の拡散

安定層条件の図 3 のとおり、粉じんの粒径が大きくなるにつれて最大着地濃度地点が発生源側に近づくことを示すことができた。特に、風下距離約 1.5 km に粒径 100 μm の大気中濃度の極大があり、機械的破碎などの非燃焼系由来の粗大粒子の粉じんが、工場の比較的近傍の環境に影響することが示された。

また、風下距離に応じて、卓越する粒径が異なることから、その距離毎で観測される粉じんの粒径が異なることも、シミュレーションの結果から予期されることである。

なお、今回のシミュレーションでは、排ガス中の汚染物質であるニッケル濃度を 300 $\mu\text{g m}^{-3}\text{-N}$ としたが、粒径 100 μm の粉じんの粒子は、8 $\text{ng m}^{-3}\text{-N}$ を超える最大着地濃度を与えると計算され、工場周辺地域の大気環境に影響する可能性が示唆された。

5.3 地形の影響

この影響を評価するためのシミュレーションでは、図 4 に示した等高線図の原点（中央）に発生源を位置し、そこから北西方向の丘陵地帯での地表濃度への影響を見るために、南東の風を想定した。この丘陵地帯は海拔約 40 m である。

地形を考慮したシミュレーションでは、特に粉じんの粒径が 100 μm のときのほうが、地形の影響が強く出て、地形を考慮すると最大着地濃度が高くなった。これは今回の例で、有効煙突高が 60 m 以上で、高い位置からの拡散であったことも関係すると考えられた。

よって、発生源が海岸にある場合、臨海の丘陵地帯における大気環境には留意する必要があると考えられた。

5.4 ダイオキシン類の拡散

今回の計算では、最大着地濃度は 0.0091 $\text{pg-TEQ m}^{-3}\text{-N}$ と試算された。大気中のダイオキシン類の環境基準値は年平均値で 0.6 pg-TEQ m^{-3} であり、試算値は基準値を大幅に下回った。

今回取り上げた大気拡散シミュレーション法は、それを年間平均値の推定に使うには多くの計算時間を必要とし、またそのための仮定は現実のすべてを考慮するものではなく、単純化されたものではあるが、拡散の傾向や地形を考慮し、大気環境における濃度の桁を推定することができるという

特徴があると考えられた。

6. 結論

本研究では、USEPA 公認の大気拡散モデル AERMOD をエクセルマクロに移植し、粉じんの拡散を新たに追加し、あたかもエクセルの機能の一部のように使用できる環境を整えた。本報告では、その計算理論と、その数値計算法を記述した。

これを青森県内の大気拡散に適用し、粉じんの粒径に応じた拡散の違いおよび地形の効果を検討して、ダイオキシン類の拡散の年間平均値の推定を行った。

エクセルマクロに移植したことで、実行可能ファイルとして AERMOD を使用するよりも、得られたパラメータの高度分布や、汚染物質濃度の等高線図、パラメータの設定値および計算値がセットになって一つのワークシートに残るため、管理が容易であるという特徴があり、またパラメータや濃度データを加工・利用しやすいといった長所もあると思われる。

今後は、環境アセスメントへの応用などを視野に入れて、なお一層、コードの完成度を高めたいと考えている。

謝 辞

本研究は、元八戸環境管理事務所長 早狩 進氏のアイデアで開始したものです。また、研究の進行にあたっては、元八戸環境管理事務所長 吉田 毅氏にご激励と有益なご示唆をいただきました。お二方に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 岡本眞一：大気環境予測. ぎょうせい, 東京, 2001.
- 2) (一社) 産業環境管理協会: プログラムの解説 MTI-LIS モデルプログラム.
<https://www.jemai.or.jp/tech/meti-lis/analysis.html>
(2023.10.28 アクセス)
- 3) 株式会社日立パワーソリューションズ製品ラインアップ: 大気拡散シミュレーションシステム「かくさんすけっと」. <https://www.hitachi-power-solutions.com/product-site/environment/products/kakusansuketto/products/index.html> (2023.10.21 アクセス)
- 4) USEPA: Air Quality Dispersion Modeling – Preferred and Recommended Models.

<https://www.epa.gov/scram/air-quality-dispersion-modeling-preferred-and-recommended-models>
(2023.10.28 アクセス)

5) USEPA: AERMOD: Description of Model Formulation.

https://gaftp.epa.gov/Air/aqmg/SCRAM/models/preferred/aermod/aermod_mfd_454-R-03-004.pdf
(2023.10.28 アクセス)

6) 近藤純正 編著: 水環境の気象学—地表面の水収支・熱収支—. 朝倉書店, 東京, 1994

7) Cimorelli, A.J. et al.: AERMOD: A Dispersion Model for Industrial Sources Application. Part I: General Model Formulation and Boundary layer Characterization. *J. Appl. Meteorol.*, **44**, 682-693, 2005

8) Sheppard, P. A.: Airflow over Mountains. *Q. J. R. Met. Soc.*, **82**, 528-529, 1956

9) Snyder, W. H. et al.: The Structure of strongly stratified flow over hills: dividing-streamline concept. *J. Fluid Mech.*, **152**, 249-288, 1985

10) Venkatram, A. et al.: A complex terrain dispersion model for regulatory applications. *Atom. Environ.*, **35**, 4211-4221, 2001

11) Weil, J. C.: A PDF Dispersion Model for Buoyant Plumes in the Convective Boundary Layer. *J. Appl. Meteorol.*, **36**, 982-1003, 1997

12) 吉田 毅, 花石竜治: ばいじんの重力沈降、沈着を考慮した正規型大気拡散式の特徴—ダイオキシン類の沈着量の推定—. 青森県環境保健センター研究報告, **12**, 42-51, 2001

13) 宮野裕文, 吉田 毅, 花石竜治: 八戸市内における大気中のヒ素・ニッケル濃度の推定計算—拡散計算値と実測値の適合性の検討—. 青森県環境保健センター研究報告, **14**, 51-61, 2003

14) University of North Texas: DUSTRAN 1.0 User's Guide: A GIS-based Atmospheric Dust Dispersion Modeling System – UNT Digital Library
<https://digital.library.unt.edu/ark:/67531/metadc885005/> (2024.2.19 アクセス)

15) 気象庁過去のデータ検索:
<https://www.data.jma.go.jp/stats/etrn/index.php>
(2024.1.20 アクセス)

16) 株式会社気象データシステム:
https://www.metds.co.jp/wp-content/uploads/2019/03/TE_SunPosition_160401.pdf
(2024.1.18 アクセス)

17) 国土地理院 基盤地図情報ダウンロードサービス:
<https://fgd.gsi.go.jp/download/menu.php>
(2024.1.20 アクセス)

18) xml50tocsv の詳細情報: Vector ソフトを探す:
<https://www.vector.co.jp/soft/winnt/business/se503372.html> (2024.1.20 アクセス)

19) 嶋谷祐馬, 大澤輝夫, 嶋田 進, 竹山優子, 中村聡志: WRF による洋上での大気安定度再現性の評価. 第 42 回風力エネルギー利用シンポジウム, 2020 年 11 月 27 日.

Development of an Excel macro to calculate atmospheric dispersion: US EPA “AERMOD” model

Ryuji Hanaishi

The author coded the U.S. Environmental Protection Agency's (USEPA) “AERMOD,” an atmospheric dispersion simulation model as a macro of a spreadsheet application software, Excel. In order to calculate dispersion of particulate matters, he took into considerations of its gravitational settling and dry deposition. In addition, he showed the concept of dividing streamline of AERMOD, which considers concentration distributions of pollutants at receptors in complex terrain by model calculations. Moreover, as application examples, the author has shown different concentration distribution of particulate matters by their particle size under stable layer conditions, and an example of concentration distribution of dioxins emitted from a small-scale incinerator under convective layer conditions so as to obtain the annual average concentrations. These model calculations proved to be capable of estimating concentration distribution of pollutants as well as the order of magnitude of their concentrations.

Key words: Atmospheric dispersion model, AERMOD, Dividing streamline, Particulate matter, Dioxins

2 ノ ー ト

青森県環境保健センターにおける新型コロナウイルス検査対応

坂 恭平 鈴木 敬 長崎幸生 筒井理華¹ 山上剛志² 高橋洋平 福田 理³
小川裕貴 武差愛美⁴ 菩提寺誉子 二本柳朋子⁵ 橋本恭奈⁶ 小笠原和彦

国内において、2020 年 1 月 15 日に新型コロナウイルス（以下「SARS-CoV-2」という。）の感染者が初確認された。当センターにおいても、2020 年 2 月 14 日から臨床検体での SARS-CoV-2 の PCR 検査を開始した。新型コロナウイルス感染症（以下「COVID-19」という。）は、2023 年 5 月 8 日に感染症法上の位置づけが 5 類感染症に移行となったが、検査内容は変更されつつも、2024 年現在でも SARS-CoV-2 検査対応を継続している。

Key words : SARS-CoV-2, Variant, Whole genome analysis

1. はじめに

SARS-CoV-2 は、コロナウイルス科ベータコロナウイルス属に属する約 30,000 塩基のプラス 1 本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスである。肺炎を引き起こすウイルスとして 2019 年 12 月に中国武漢で確認され、咳や飛沫を介してヒトからヒトへ伝播し、全世界へ感染拡大した。SARS-CoV-2 は変異を繰り返し、感染・伝播性、重症化リスク、ワクチン・治療薬の効果、診断法などに影響を及ぼすリスク評価を行い、各国が「懸念される変異株（VOC : Variants of Concern）」、「注目すべき変異株（VOI : Variants of Interest）」、「監視下の変異株（VUM : Variants Under Monitoring）」といった分類をしてきた¹⁾。

国内では、国立感染症研究所が PCR 検査に係るマニュアル²⁾を作成し、地方衛生研究所での検査体制が整えられ、積極的疫学調査を実施してきた。各変異株に対応するために、病原体検出マニュアルが追加³⁾されたほか、変異株スクリーニング検査に係るマニュアル⁴⁻⁶⁾や全ゲノム解析に係るマニュアル⁷⁾が整備され、国立感染症研究所から地方衛生研究所へ技術移転がなされた。

今回、当センターにおけるこれまでの SARS-CoV-2 検査対応について取りまとめたので、報告する。

2. 調査方法

2.1 陽性判定検査

2020 年 2 月以降、病原体検出マニュアル^{2), 3)}に沿って、臨床検体から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR を行い、SARS-CoV-2 が陽性か陰性かを判定した。2020 年 9 月には、反応時間の短縮のため、TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix 等の Fast モード対応試薬を導入した。同じく 2020 年 9 月には、全自動核酸抽出増幅システムである BD マックスを 2 台導入した。2021 年 8 月には、検査時間の更なる短縮のため、ダイレクト PCR 対応試薬である SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit を導入した。

2022 年には、それまで流行が抑えられていたインフルエンザとの同時流行が懸念されたため、SARS-CoV-2 とインフルエンザウイルス（以下「FluV」という。）の同時検査キットである Takara SARS-CoV-2 & Flu ダイレクト PCR 検出キットを 2022 年 12 月から導入した。

2.2 変異株スクリーニング検査

変異株スクリーニング検査に係るマニュアル⁴⁻⁶⁾に沿って、2.1 で陽性と判定した臨床検体から抽出した RNA から、リアルタイム PCR 装置の

1 保健衛生課
2 十和田食肉衛生検査所
3 三八地域県民局環境管理部
4 東青地域県民局環境管理部
5 青森県立中央病院
6 令和 3 年度末で退職

Genotyping 機能を使用し、変異株のスクリーニング検査を行った。2021 年 2 月からはアルファをスクリーニングするために N501Y 変異、2021 年 6 月からはデルタをスクリーニングするために L452R 変異、2022 年 1 月からはオミクロンをスクリーニングするために G339D 変異の検出を行った。

2.3 全ゲノム解析

厚生労働省通知⁷⁾による要請に基づき、2021 年 6 月までは、2.2 で N501Y 変異を有していた検体等について、国立感染症研究所へ抽出 RNA を送付し、全ゲノム解析が行われた。その後、自治体主体で全ゲノム解析を行うこととされ、国立感染症研究所による技術移転が行われた 2021 年 6 月以降は、全ゲノム解析に係るマニュアル^{8), 9)}に沿って自施設で次世代シーケンサー（以下「NGS」という。）を用いた全ゲノム解析を行った。大量の検体からの RNA 抽出に対応するため、2022 年 1 月には、自動核酸抽出機 Maxwell RSC 48 を 1 台導入した。解析は、NGS から得られた読取情報を国立感染症研究所が運営する新型コロナウイルスゲノム解析サイト「COG-JP」にアップロードして行った。

3. 結果

2020 年 2 月から 2023 年 12 月までに、当センターで実施した検査件数を表 1 にまとめた。

表 1 当センターにおける新型コロナウイルス検査対応件数 (2020. 2～2023. 12)

陽性判定検査	変異株スクリーニング検査					全ゲノム解析
	N501Y	880	L452R	1,008	G339D	210
総件数	45,982					1,250
陽性	8,673	650	390	3		1,246
陰性	37,309	218	604	202		4
	判定不能	12	判定不能	14	判定不能	5

3.1 陽性判定検査

県内保健所の積極的疫学調査で採取された検体を用いて、リアルタイム RT-PCR により陽性判定検査を行った結果を図 1 に示した。2020 年 2 月から 2023 年 12 月まで、計 45,982 件を実施した。

2020 年 4 月は、県内初のクラスター発生¹⁰⁾を受け、検査数が 556 件に急増した。2020 年 10 月は、弘前保健所管内の飲食店クラスターを起因とする感染拡大が確認され¹⁰⁾、検査数が 1,407 件になった。2021 年 7 月にはデルタが確認され、検査数が 8 月には 2,637 件、9 月には 2,674 件になった。デルタの収束とともに検査数も減少したが、オミクロンが確認された 2022 年 1 月以降は再び増加し、6 月には、月別では過去最大となる 3,472 件を実施した。

2022 年 9 月 8 日に、COVID-19 に係る国の全数把握方針が見直され、感染症法上の届出対象が重症化リスクの高い人に限定された^{11), 12)}。本県においても、保健所業務が逼迫したため、保健所の積極的疫学調査を重症化リスクの高い施設等に集中化した（以下「疫学調査集中化」という。）ことを受け、検査数が激減した。

SARS-CoV-2 と FluV の同時 PCR 検査は、これまでに 40 件実施した。そのうち、3 件は SARS-CoV-2 陽性、1 件は FluV 陽性、36 件はどちらのウイルスも陰性であり、PCR 検査で SARS-CoV-2 と FluV の両方が陽性となることはなかった。

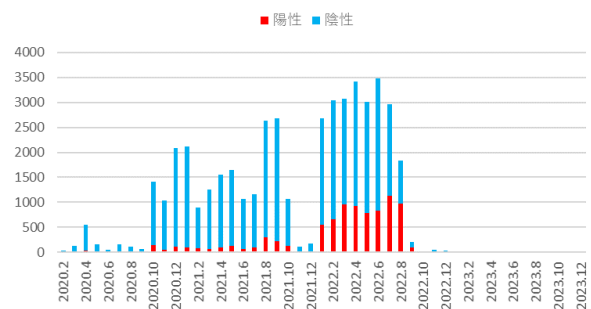


図 1 SARS-CoV-2 の陽性判定検査の推移 (2020. 2～2023. 12)

3.2 変異株スクリーニング検査

陽性と判定した検体の一部について、アルファをスクリーニングするための N501Y 変異の検出を行った結果を図 2、デルタをスクリーニングするための L452R 変異の検出を行った結果を図 3、オミクロンをスクリーニングするための G339D 変異の検出を行ったものを図 4 に示した。

N501Y 変異の検出は、計 880 件実施した（図 2）。2021 年 7 月には、78 件中 70 件が N501Y 変異を有していた。2021 年 8 月には、デルタへの置き換わりが進み、N501Y 変異と L452R 変異の両方を検査していたが、検査数の急増に伴い（図 1）、N501Y 変異の検出は中断した。2021 年 12 月から 2022 年 1 月にかけて、オミクロンへの置き換わりが進んだが、オミクロンに特徴的な変異の検出系は未確立だったため、オミクロンも有する N501Y 変異の検出を再開することにより、スクリーニングを行った。2022 年 1 月には、118 件中 98 件が N501Y 変異を有していた。

L452R 変異の検出は、計 1,008 件実施した（図 3）。2021 年 8 月には、269 件中 259 件が L452R 変異を有していた。2021 年 11 月には、検査数の減少に伴

い(図 1)、L452R 変異の検出も実施しなかったが、オミクロン出現後は、N501Y 変異とともに L452R 変異の検出を再開した。オミクロンは L452R 変異を有しないが、2022 年 1 月には、201 件中 180 件が L452R 変異を有していなかった。

G339D 変異の検出は、計 210 件実施した(図 4)。ただし、検出系が確立され、当センターでの体制を整えた時点で、ほぼすべての株がオミクロンへ置き換わった。さらに、標的の塩基以外の変異が蓄積して判定不能となる例が出てきたことから、全ゲノム解析に移行することとし、2022 年 6 月には変異株スクリーニング検査を終了した。

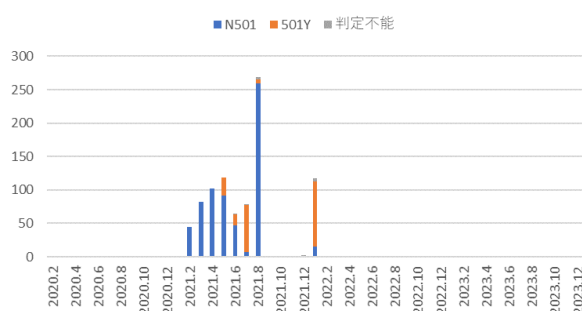


図 2 N501Y 変異の検出結果 (2020. 2～2023. 12)

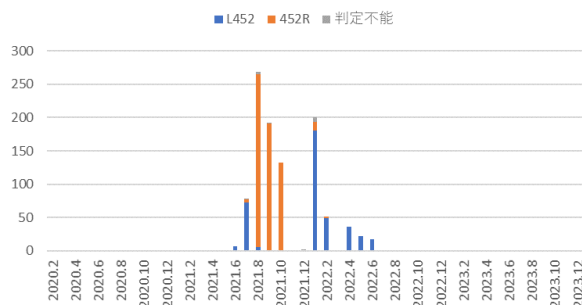


図 3 L452R 変異の検出結果 (2020. 2～2023. 12)

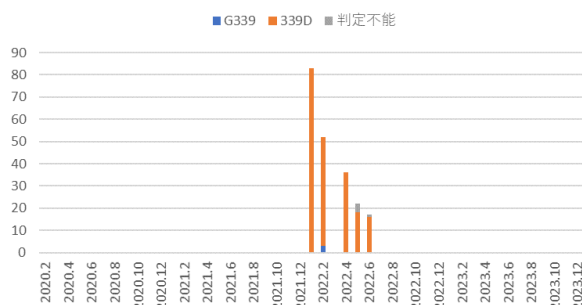


図 4 G339D 変異の検出結果 (2020. 2～2023. 12)

3.3 全ゲノム解析

2023 年 12 月までに、自施設で全ゲノム解析を行った件数を図 5 に、国立感染症研究所から結果の提

供があった分も含めた各系統の割合を図 6 に示した。また、分子疫学解析を行い、武漢株を起点とするネットワーク図を図示し、2023 年 3 月に県保健医療調整本部へ発出した(図 7)。

2023 年 12 月までに、自施設で 1,250 件の全ゲノム解析を実施した(図 5)。当初は、陽性判定検査で陽性と判定された検体から県保健医療調整本部が解析の必要があるとして選定したものを対象に実施した。しかし、疫学調査集中化のため、保健所からの検体提出が激減し、特に 2022 年 10 月採取の検体が確保できなかった(図 6)。そこで、県保健医療調整本部の調整により、県内の 6 保健所管内から 1 医療機関ずつ、計 6 医療機関から当センターへ陽性検体が提供される体制が構築された。2022 年 1 月以降、オミクロンの様々な派生が置き換わりを繰り返しながら確認され、2024 年現在も続いている。また、検出された変異のうち、特に感染性・免疫逃避能に影響の大きいスパイクタンパク質領域の変異について、個々にその性質を確認した。さらに、分子疫学解析により、特に 2023 年 2 月時点での BQ.x 系統の広がりを図示し、情報提供した(図 7)。

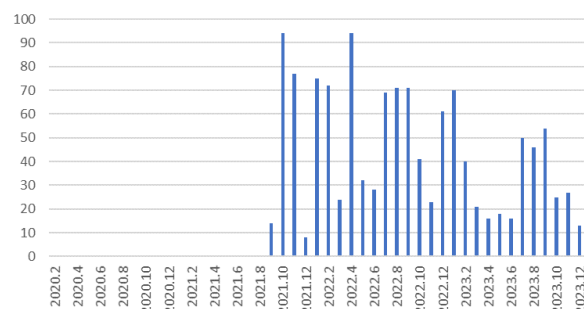


図 5 結果発出日ごとの全ゲノム解析数の推移 (2020. 2～2023. 12)

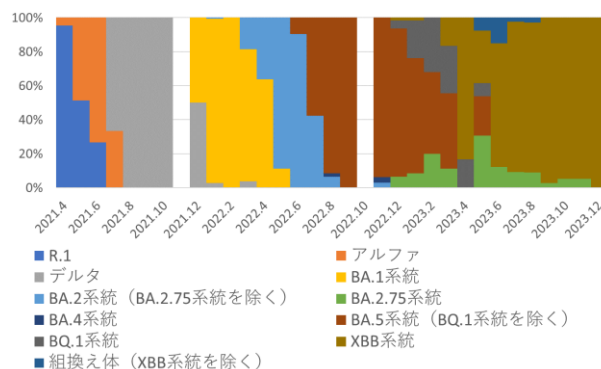
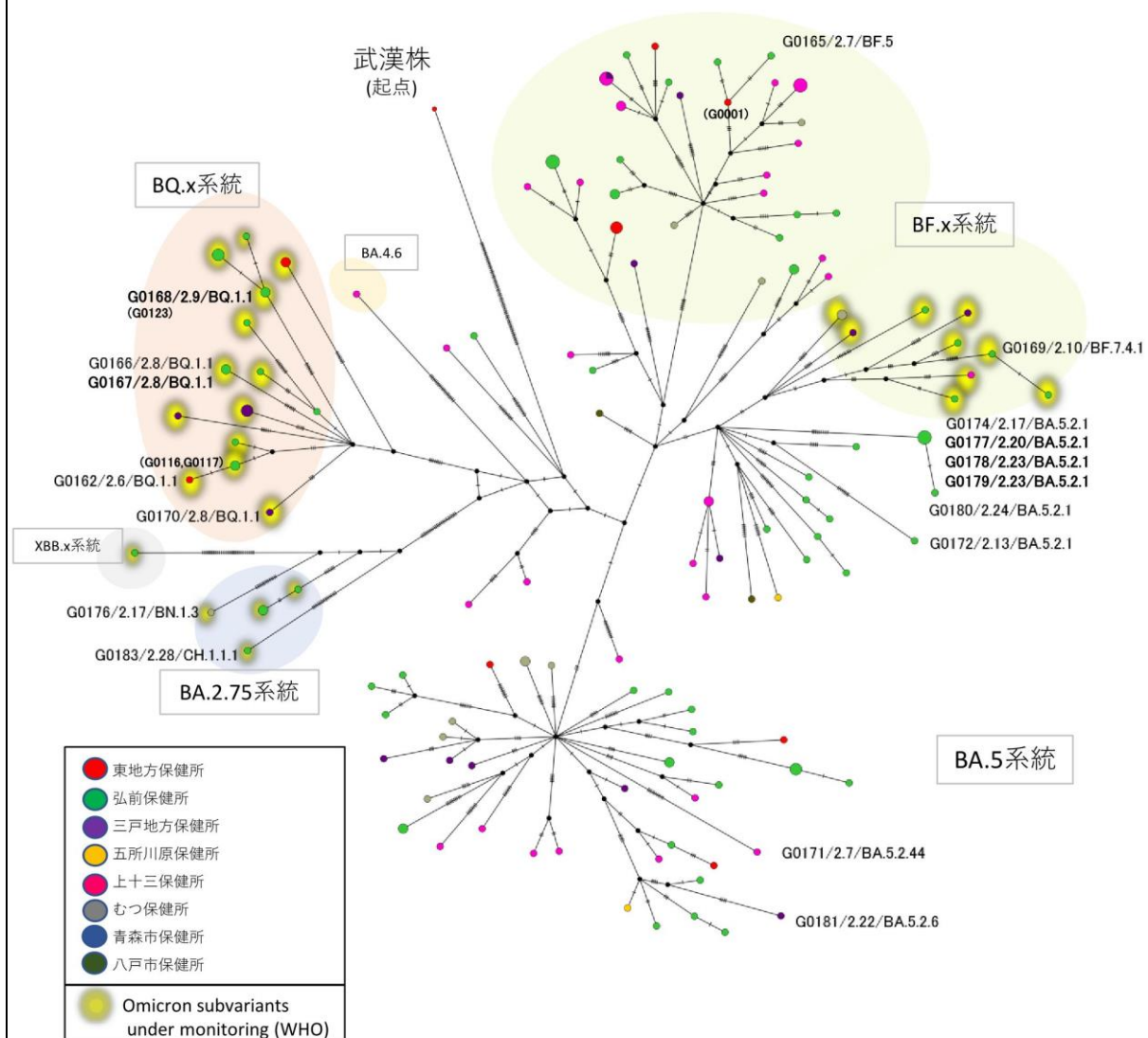


図 6 分子系統解析による検体採取日ごとの変異株の推移 (2021. 4～2023. 12)

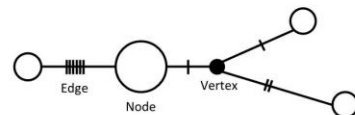


青森県内で検出されたオミクロンの分子疫学解析図

ゲノム解析の結果、オミクロンと判定された検体のうち、2022年11月14日以降の検体（解析不可と判定された検体を除く）を使用し解析した。図中には、2023年2月6日から2月28日の間に採取された検体（G0162～G0183）の情報並びに当該検体と同一又は直前の変異元の遺伝子配列を有する検体の番号を記載した。

県内感染者数の減少に比例して、解析対象検体数の減少及び採取地域の偏りが大きくなっており、本解析図が県全体の状況を示しているとの解釈はできないが、2023年2月6日から2月28日に採取された検体の解析結果から、BQ.x系統及びBA.2.75系統が主に広がった状況が見られた。これらの系統の半数以上がWHOがOmicron subvariants under monitoringに指定する系統だった。

図の見方：



- 丸 (Node) : 同一塩基配列の株が含まれる。円が大きいほど多くの検体が属する。
- 線 (Edge) : 線上のライン(+)数はNode間の変異数を示す。長さは変異数に比例していない。
- 点 (Vertex) : 変異の分岐点に存在すると考えられる株で、検査対象検体には含まないもの。

注：ウイルスの遺伝子的親子関係を示すものであり、検体どうしの感染リンクを直接示すものではない。

図 7 分子疫学解析によるネットワーク図 (2023 年 3 月 15 日発行)

4. 考察

4.1 検査体制の構築

2019 年 12 月に SARS-CoV-2 が確認され、国立感染症研究所を中心に検査マニュアル²⁾を構築し、当センターでも 2020 年 2 月から実際の臨床検体での検査を開始した。その後、変異株の出現等に合わせ、マニュアルの改訂や追加^{3-6), 8), 9)}が行われ、随時検査内容を変更してきた。試薬としては、Fast モード対応の TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix 等、ダイレクト PCR 対応の SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit を導入し、検査時間の短縮を実現した。また、Takara SARS-CoV-2 & Flu ダイレクト PCR 検出キットを導入し、SARS-CoV-2 と FluV の同時検査にも対応した。機器としては、全自動核酸抽出増幅システムである BD マックス、自動核酸抽出機である Maxwell RSC 48 を導入し、検査の効率化を実現した。応援要員の協力も得ながら、検査依頼の増加に適宜対応してきた。

一方、全世界的な検査需要の急増により、プラスチック製品等が入手しづらくなり、検査が不可能になる事態にはならなかったが、消耗品の在庫が枯渇しかけることがあった。また、人事異動により、業務に慣れた人が転出し、初めて PCR 検査等を行う人が転入してくることを複数回経験した。当センターの他部職員や当センター以外の職員の応援を得て業務に臨んだが、全員の知識や技術を一定以上のレベルに保つことに苦慮した。現在、当センターにて SARS-CoV-2 の陽性判定検査や変異株スクリーニング検査を実施することはほとんど無くなったが、必要な物品の在庫を確保するとともに、約 4 年間の業務で得られた知識・技術・設備等を絶やすことなく、継承・維持しなければならない。

4.2 結果の発出

陽性判定検査は、発生初期から疫学調査集中化まで、当部の業務の大半を占め続けた。それに追加し、2021 年 9 月からは、全ゲノム解析も並行して実施しなければならず、いずれの業務も結果の発出に苦慮した。陽性判定検査は、検査終了後に口頭等で結果連絡を行っていたが、検査依頼に対する正式な回答文書を発出するまでに、数ヶ月を要していた。全ゲノム解析は、系統名のほかに、こういった情報を、こういった形で提供するのが望ましいか、今もなお改良を検討する必要がある。

現在、当センターにおける SARS-CoV-2 検査対応の中心は、全ゲノム解析に移行した。全ゲノム解析情報の有効な用途の一つは、分子疫学解析で得た情報と保健所の疫学調査結果と合わせることであり、

還元し、感染経路推定の精度を高め、適時適切な感染対策を講じることである。しかし、情報が最も有効かつ必要であったと思われる流行初期には、当センターの全ゲノム解析技術が未確立で、国立感染症研究所に検体を送付するのみで、主体的な解析ができなかった。自施設で対応できるようになってからは、オミクロンの流行により陽性判定検査に追われ、分子疫学解析にまでは手が回らなかった。疫学調査集中化により、2022 年 9 月以降は各種解析に取り組むことができる状況となったが、既に保健所の積極的疫学調査は縮小しており、情報が有効な時期は過ぎていたと思われる。

4.3 今後の展望

将来、再び新興感染症のパンデミックが訪れる可能性は高いと予想される。その際、当センターは、早期に検査技術及び検査体制を構築し、本県の陽性判定検査の主力を担うことが求められている。しかし、民間検査普及後は、変異株スクリーニング検査や全ゲノム解析等、当センターが本来担うべき役割に、より早く主軸をシフトすることが望ましい。

また、今回の SARS-CoV-2 の流行により、当センターに NGS による全ゲノム解析技術が確立された。全ゲノム解析の情報が、有効かつ必要とされる時期に、適時還元できるよう、次のパンデミックまで知識・技術・設備等を継承・維持しなければならない。

さらに、患者サーベイランスや病原体サーベイランスのほかに、様々な指標を組み合わせた重層的なサーベイランスの重要性が挙げられている^{13), 14)}。当センターとしては、下水サーベイランス等を通して、一歩踏み込んだ流行状況の把握に引き続き取り組んでいきたい。

5. まとめ

1) 当センターでは、2020 年 2 月から SARS-CoV-2 検査対応を始め、2023 年 12 月までに計 45,982 件の陽性判定検査を実施した。

2) 現在、当センターにおける SARS-CoV-2 検査対応の中心は全ゲノム解析であり、今後も継続して変異株の動向等を注視し、適切な情報を発信していく必要がある。

3) 今後の新興感染症のパンデミックに備え、陽性判定検査や全ゲノム解析の知識・技術・設備等を継承・維持していく必要がある。

6. 謝辞

当センターにおける SARS-CoV-2 検査対応に応援要員として派遣された県職員、検体の取りまとめ

や搬送にご協力いただいた県保健医療調整本部や各保健所の職員、患者の診断や検体の採取にご尽力された医療機関、消耗品等をご提供いただいた厚生労働省、技術面での指導や設備面での支援をいただいた国立感染症研究所の皆様に、深謝申し上げます。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：SARS-CoV-2 変異株について。
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/2019-ncov/2624-flu/12055-flu2-1-1.html>
- 2) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル 2019-nCoV.
- 3) 国立感染症研究所：「感染研・地衛研専用」SARS-CoV-2 遺伝子検出・ウイルス分離マニュアル.
- 4) 国立感染症研究所：リアルタイム one-step RT-PCR 法による SARS-CoV-2 Spike N501Y 変異の検出.
- 5) 国立感染症研究所：リアルタイム one-step RT-PCR 法による SARS-CoV-2 Spike L452R 変異の検出.
- 6) 国立感染症研究所感染症危機管理研究センター：リアルタイム one-step RT-PCR 法による SARS-CoV-2 Spike G339D 変異識別法.
- 7) 厚生労働省：新型コロナウイルス感染症の積極

的疫学調査における検体提出等について（要請）.
令和 3 年 2 月 5 日付け健感発 0205 第 4 号，厚生労働省健康局結核感染課長通知

8) 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター：新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル Oxford Nanopore Mk1c & NEB 社 ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit (ONT) 編.

9) 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター：新型コロナウイルスゲノム解読プロトコル Qiagen 社 QiaSEQ FX 編.

10) 青森県新型コロナウイルス感染症に係る危機対策本部：新型コロナウイルス感染症 青森県の取組（振り返り）. 2023

11) 新型コロナウイルス感染症対策本部：With コロナに向けた政策の考え方. 令和 4 年 9 月 8 日新型コロナウイルス感染症対策本部決定

12) 厚生労働省新型コロナウイルス感染症対策推進本部：With コロナの新たな段階への移行に向けた全数届出の見直しについて. 令和 4 年 9 月 12 日付け事務連絡

13) 神垣太郎他：新型コロナウイルス感染症の発生動向に対する重層的モニタリングの取り組み. 病原微生物検出情報，**43**(12)，280-282，2022

14) 厚生労働省：新型コロナウイルス感染症に関する今後の患者の発生動向の把握方法等について. 第 71 回厚生科学審議会感染症部会 資料 2，2023

2021/22 シーズンに発生した集団胃腸炎事例におけるノロウイルスの遺伝子解析

坂 恭平 鈴木 敬 長崎幸生

2021 年 9 月～2022 年 8 月 (2021/22 シーズン) に発生した青森県内における集団胃腸炎事例のうち、7 事例から検出されたノロウイルス (Norovirus、以下「NoV」という。) の遺伝子解析を行った。その結果、GI.3[P3]が 2 事例、GII.2[P16]が 3 事例、GII.4 Sydney_2012[P31]が 2 事例から検出された。

Key words : Norovirus, Dual typing, Molecular epidemiology

1. はじめに

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

NoV の培養については、腸管幹細胞由来オルガノイドを用いる方法が Ettayebi ら³⁾ によって報告されたが、検出や分類は、検体に含まれる遺伝子の検出による方法が多い。NoV 遺伝子は、配列によって大きく GI から GX の遺伝子群 (Genogroup) に分類され、ヒトに感染するものは GI と GII が主流である。カプシド領域の配列によって、GI は 9 種類 (GI.1～9)、GII は 26 種類 (GII.1～14、16～27) の遺伝子型 (Genotype) に細分化される⁴⁾。さらに、ORF1 と ORF2 のジャンクション領域において遺伝子組換えを起こすことが判明している⁵⁾。

今回、2021/22 シーズンに発生した青森県内における集団胃腸炎事例 (県外感染を含む。) から検出された NoV について、ポリメラーゼ領域の一部も含む遺伝子解析を行ったので報告する。

2. 材料及び方法

2.1 検査材料

2021/22 シーズンの計 7 事例の検体 (便、食品、

施設拭き取り) から検出された NoV 検体を用いた。中核市である青森市で発生した事例については、検査を行った青森市保健所から陽性検体の cDNA の分与を得て解析に用いた。同じく中核市である八戸市で発生した事例については、すべて当センターに検査依頼があり、搬入された検体を用いた。

2.2 検査方法

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

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

(2) 遺伝子解析

(1) で得られた cDNA を鋳型に、病原体検出マニュアル⁶⁾ に準じた Dual typing 法による PCR を行い、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した (GI : 540 塩基、GII : 527 塩基)。ポリメラーゼ領域も含む遺伝子型の表記については、Chhabra ら⁴⁾ が発表しているとおり、カプシド領域による型別の後に [] でポリメラーゼ領域による型別を記載することとした。得られた塩基配列を NoroNet の NoV 遺伝子型分類ツール (Norovirus Genotyping Tool Version 2.0) を用いて遺伝子型分類を行った。また、Kimura 2-parameter model を用いた最尤法 (Maximum-likelihood (ML) 法) で系統樹を作成した。系統樹の信頼性の評価には bootstrap 法 (反復回数 1000) を用いた。標準株は、Chhabra ら⁴⁾ に記載され、Norovirus Genotyping Tool Version 2.0 でも採用されている株を使用した。

3. 結果

3.1 2021/22 シーズンに検出された遺伝子型

2019/20 シーズン～2021/22 シーズンに発生した青森県内における NoV による集団胃腸炎事例（県外感染を含む。）について、NoV の遺伝子型を表 1 に示した。

2021/22 シーズンは、GI.3[P3]が 2 事例、GII.2[P16]が 3 事例、GII.4 Sydney_2012[P31]が 2 事例から検出された。また、同一事例内で複数の遺伝子型が検出されることはなかった。

2019/20 シーズンに青森市保健所管内を中心に検出された GII.4 Sydney_2012[P16]は、2020/21 シーズンには検出されなかった。また、新たな組換え体は確認されなかった。

3.2 青森県内の過去 3 シーズンの NoV の動向

2019/20 シーズン～2021/22 シーズンに発生した青森県内における NoV による集団胃腸炎事例（県外感染を含む。）について、遺伝子型ごとの事例数を図 1 に、シーズンごとの事例数の割合を図 2 に示した。ただし、同一事例内で複数の遺伝子型が検出された事例があるため、事例数計 39 と NoV 検出事例数 46 は一致しない。

GII.2 は、過去 3 シーズンの計 39 事例中、17 事例から検出された。GII.2 の事例数の割合に大きな増減は無く、GII.2 は主要流行株の 1 つであった。

既報にて、GII.4 の割合は、2017/18 シーズンから 2019/20 シーズンにかけて増加し、2020/21 シーズンに減少したことを報告したが、2021/22 シーズンに再び増加に転じた（図 2）。

なお、2021/22 シーズンは、NoV による事例数が計 7 しかなく、例年の半分程度であった。

3.3 ポリメラーゼ領域の一部も含む遺伝子解析

過去 3 シーズンの計 39 事例から検出された遺伝子型ごとの塩基配列を用いて、検出の多い GII についての系統樹を作成した（図 3）。同一事例内で同一遺伝子型であったものは、より多数の検体から検出された配列 1 つを事例代表株とした。配列名は、（シーズン名）—（表 1 の事例番号）—（カプシド領域による遺伝子型）とした。

系統樹を確認したところ、2019/20 シーズンのみに検出された GII.4 Sydney_2012[P16]は、6 事例すべて塩基配列が一致していた。同じ遺伝子型同士を比較すると、GII.2[P16]は事例間で変異が少ない一方、GII.4 Sydney_2012[P31]は事例間で変異がより多く見られた。

表 1 青森県内における集団胃腸炎事例（県外感染を含む）から検出された NoV の遺伝子型（2019/20 シーズン～2021/22 シーズン）

シーズン	番号	管轄保健所	遺伝子型		年度
			GI	GII	
2019/20	1	青森市		GII.4 Sydney_2012[P16]	R1
	2	青森市		GII.4 Sydney_2012[P16]	
	3	五所川原		GII.4 Sydney_2012[P16]	
	4	青森市		GII.4 Sydney_2012[P16]	
	5	青森市		GII.4 Sydney_2012[P16]	
	6	八戸市		GII.2[P16]	
	7	弘前		GII.2, GII.3[P12], GII.4 Sydney_2012	
	8	青森市		GII.4 Sydney_2012[P31]	
	9	八戸市		GII.2[P16]	
	10	青森市		GII.3[P12]	
	11	八戸市		GII.2[P16]	
	12	弘前		GII.4 Sydney_2012[P16]	
	13	むつ		GII.2[P16]	
	14	青森市		GII.3[P12]	
	15	むつ		GII.4 Sydney_2012[P31]	
	16	青森市		GII.4 Sydney_2012[P31]	
	17	青森市	GI.3	GII.17[P17]	
	18	八戸市		GII.2[P16]	
	19	八戸市		GII.2[P16]	
2020/21	1	むつ		GII.4 Sydney_2012[P31]	R2
	2	弘前		GII.2[P16], GII.6	
	3	八戸市	GI.6[P11]		
	4	五所川原		GII.2[P16]	
	5	五所川原	GI.6[P11]	GII.2[P16]	
	6	五所川原		GII.2[P16]	
	7	青森市、八戸市、弘前、五所川原	GI.2[P2], GI.6[P11]	GII.17[P17]	
	8	青森市		GII.2[P16]	
	9	青森市		GII.6[P7]	
	10	八戸市		GII.4 Sydney_2012[P31]	
	11	五所川原		GII.2[P16]	
	12	弘前		GII.2[P16]	
	13	八戸市		GII.4 Sydney_2012[P31]	
2021/22	1	むつ		GII.4 Sydney_2012[P31]	R3
	2	上十三		GII.2[P16]	
	3	青森市		GII.2[P16]	
	4	むつ		GII.4 Sydney_2012[P31]	
	5	八戸市	GI.3[P3]		
	6	八戸市		GII.2[P16]	
	7	八戸市	GI.3[P3]		R4

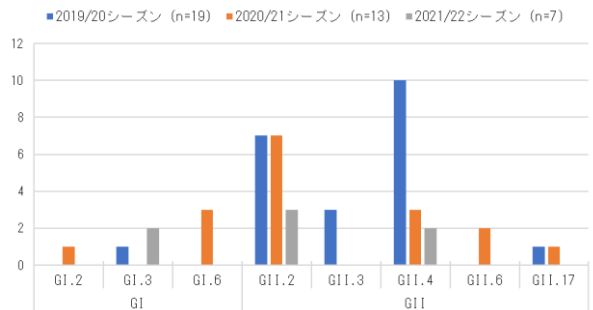


図 1 青森県内の NoV による集団胃腸炎事例（県外感染を含む）の遺伝子型ごとの事例数（2019/20 シーズン～2021/22 シーズン）

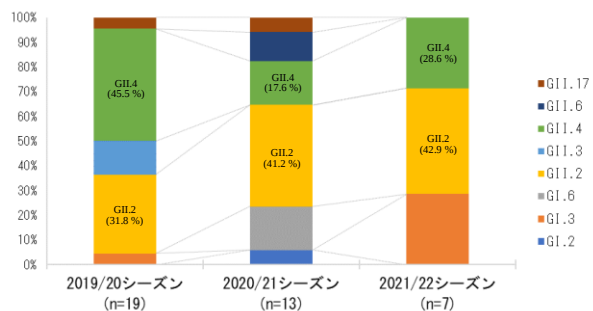


図 2 青森県内の NoV による集団胃腸炎事例（県外感染を含む）のシーズンごとの事例数の割合（2019/20 シーズン～2021/22 シーズン）

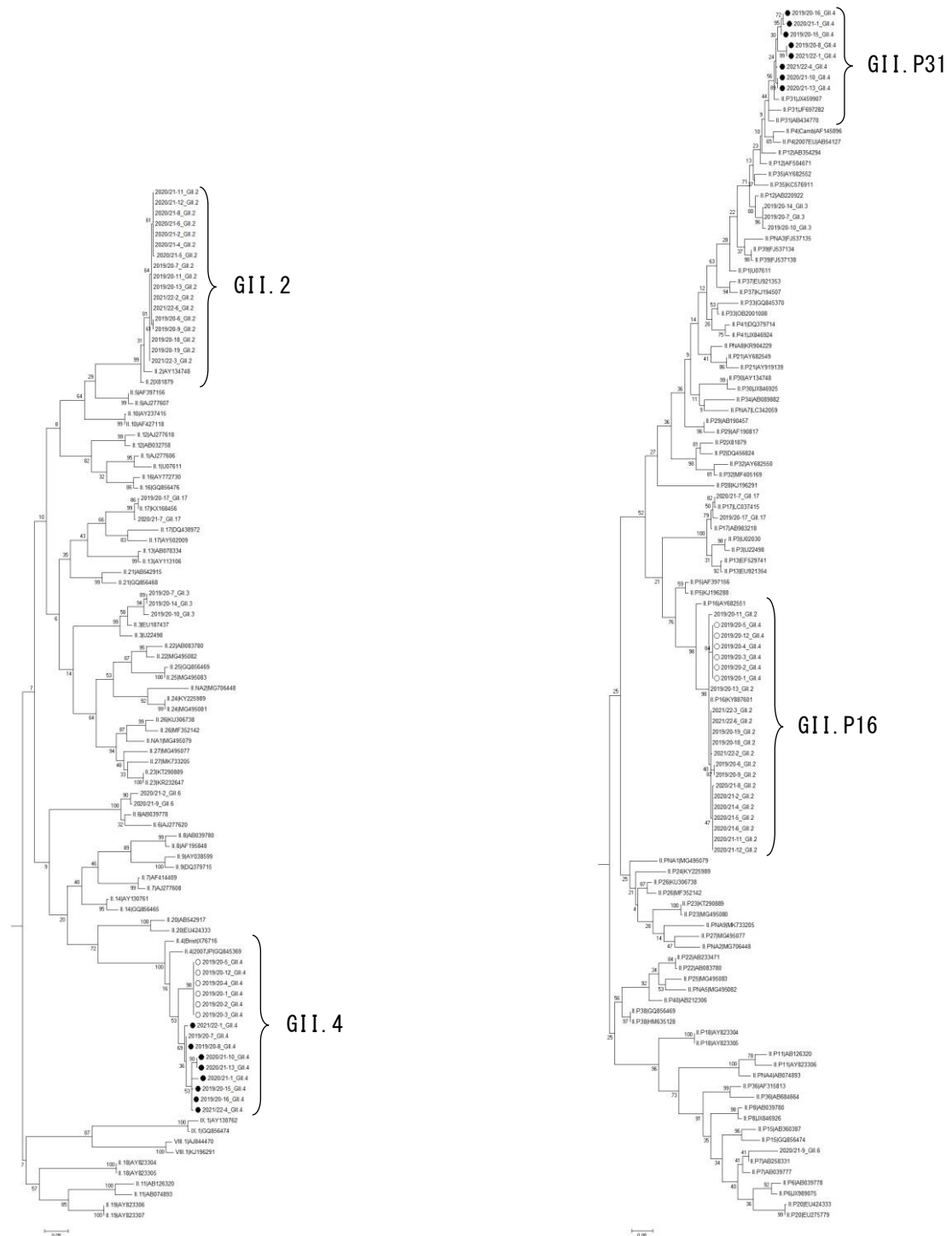


図 3 2019/20 シーズン～2021/22 シーズンに集団胃腸炎事例から検出された NoV GII の系統樹
 左：カプシド領域 (280 塩基) 右：ポリメラーゼ領域 (243 塩基)
 ○：GII.4 Sydney_2012 [P16] ●：GII.4 Sydney_2012 [P31]

4. 考察

4.1 過去 3 シーズンの NoV の動向

2021/22 シーズンは、NoV による事例数が計 7 しかなかった。2021/22 シーズンは、新型コロナウイルスのオミクロンが出現した時期であり、社会全体での衛生観念がより一層向上し、その行動変容が影響している可能性がある。そのため、各遺伝子型の

増減などを一概には判断できない。

過去 3 シーズンを通して、GII.2 の検出数及び割合が多く、17/39 と約半数を占めていた (表 1)。また、ポリメラーゼ領域も解析できたものは、すべて GII.2 [P16] に分類された。GII.2 の検出は、これまでと同様に保育園での事例が多く、GII.2 に対する免疫を持たない小児等による感染・流行の拡大があっ

たことなどが考えられる。引き続き、今後の動向に注意が必要である。

GII.4 については、各シーズンに渡って[P31]が検出されたが、2019/20 シーズンのみ、青森市保健所管内を中心に[P16]が検出された(表 1)。また、[P31]は、事例間における変異が多い傾向であった(図 3)。GII.4 の進化速度の影響のほか、様々な経路からウイルスが持ち込まれたことが考えられるため、今後データも蓄積していく必要がある。

4.2 集団事例における遺伝子解析の重要性

集団事例において、検出された NoV の遺伝子解析を迅速に行うことは、保健所における行政指導や二次感染の防止の観点からも重要である。また、発症者由来 NoV と調理従事者由来 NoV の比較は、食中毒の判断や原因究明の正しい判断材料にもなる。保健所における食中毒か否かの判断は、疫学調査に加え、病原体の検出結果を根拠とする場合が多いが、集団事例の正しい原因究明のため、NoV の遺伝子群の検出のみではなく、遺伝子型の同定まで迅速に行うことが重要である。

Dual typing 法の導入により、短時間で簡便に広い領域を解析でき、保健所にも早期に遺伝子型の情報を提供できるようになった。GII.4 について、過去 3 シーズンにおいて同一事例内で[P16]と[P31]が同時に検出されたことはなかった(表 1、図 3)が、今後、同一事例内に[P16]と[P31]が存在する場合であっても、正しく解析することが可能である。県外では、これまでに集団事例として報告例のない GII.4 Sydney_2012[P12]の検出報告⁸⁾や、海外では、GI.3[P10]等の新たな組換え体が報告されており⁹⁾、今後も引き続き動向を注視しながら、データを蓄積していく必要がある。

一方、Dual typing 法は、検出感度がやや劣っていることが指摘されており¹⁰⁾、当センターにおける調査でも一部の検体で解析ができなかった(表 1)。また、Dual typing 法で標的としているポリメラーゼ領域は、3'末端側の 240 塩基程度だが、より詳細な分子疫学解析のためには、より幅広い領域の解析が必要と考えられる。ポリメラーゼ領域約 500 塩基について、カプシド領域と同時に一度の PCR で解析できる方法¹¹⁾のほか、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析についても検討していきたい。

5. まとめ

1) 2021/22 シーズンに発生した青森県内における

NoV による集団胃腸炎事例は、計 7 事例で、GI.3[P3]が 2 事例、GII.2[P16]が 3 事例、GII.4 Sydney_2012[P31]が 2 事例から検出された。

2) NoV による集団事例の対応にあたっては、より幅広い領域の遺伝子解析をより迅速に実施(遺伝子型まで同定)することが重要である。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症疫学センター：感染症発生動向調査週報ノロウイルス感染症 2004 年第 11 号
- 2) 国立感染症研究所：感染後のノロウイルス排出期間および排出コピー数。病原微生物検出情報，**28**(10)，286-288，2007
- 3) Ettayebi K. et al. : Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*, **353**(6306), 1387-1393, 2015
- 4) Chhabra P. et al. : Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology*, **100**(10), 1393-1406, 2019
- 5) Bull R. A. et al. : Norovirus Recombination in ORF1/ORF2 Overlap. *Emerging Infectious Diseases*, **11**(7), 1079-1085, 2005
- 6) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアルノロウイルス(第 1 版)令和元年 6 月。2019
- 7) 坂恭平他：2017/18 シーズン～2020/21 シーズンに発生した集団胃腸炎事例におけるノロウイルスの遺伝子解析。青森県環境保健センター年報，**33**，41-49，2022
- 8) 世田谷区世田谷保健所生活保健課他：都内で発生したノロウイルス GII.P12-GII.4 Sydney_2012 による食中毒事例について。病原微生物検出情報，**39**(8)，146-147，2018
- 9) Navarro-Lleó N. et al. : Recombinant Noroviruses Circulating in Spain from 2016 to 2020 and Proposal of Two Novel Genotypes within Genogroup I. *Microbiology Spectrum*, **10**(4), 2022
- 10) 豊嶋千俊他：愛媛県の急性胃腸炎事例における Dual Typing 法によるノロウイルス遺伝子型別の検討。愛媛県立衛生環境研究所年報，**21**，8-11，2018
- 11) Nakamura K. et al. : Detection of a novel recombinant norovirus from sewage water in toyama prefecture, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **62**(5), 394-398, 2009

麻痺性貝毒マウス試験における ddY マウスと ICR マウスの感受性比較

山本明美 岩館樹里 西堀祐司 五十嵐飛鳥

これまで当所で使用してきた ICR 系雄マウス、同じ非近交系マウスで日本の麻痺性貝毒公定法で使用されている ddY 系雄マウスとで麻痺性貝毒成分による感受性の違いを確認するため、ddY にデカルバモイルサキシトキシン (dcSTX) 及びサキシトキシン (STX) の各標準毒を投与して比較した。その結果、dcSTX を投与して求めた CF 値に違いは見られず、ddY と ICR で dcSTX に対する感受性は同等と考えられた。一方、STX に対しては ddY が早く致死する傾向が見られ、毒成分によって感受性が異なることが示唆されたが、ICR を用いて有毒ホタテガイ試料を分析したマウス毒力は、2011 年から 2022 年までの外部精度管理調査において、いずれも z-スコア評価で 2 を超えることはなかったことから、2 マウス群の感受性の差はマウス試験で許容される範囲内と考えられた。

Key words : ddY mouse, ICR mouse, mouse bioassay, decarbamoylsaxitoxin, saxitoxin

1. はじめに

日本における麻痺性貝毒 (paralytic shellfish toxins ; PSTs) の検査法は「貝毒の検査方法等について」(昭和 55 年 7 月 1 日付環乳第 30 号厚生省環境衛生局乳肉衛生科長通知) で定められたマウス毒性試験 (mouse bioassay ; MBA) が公定法とされている。この方法は、1959 年に採用され国際法として認知されている AOAC OMA 959.08¹⁾ (以下「AOAC 法」という。) を準用しているが、AOAC 法でマウスの感受性の補正に用いられる標準毒のサキシトキシン (saxitoxin ; STX) が「化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律 (平成 7 年法律第 65 号、平成 7 年 4 月 5 日公布)」の特定物質であり、その製造、所持、譲渡、保管、運搬、廃棄等が同法により厳しく規制されていることから、日本の公定法では、使用するマウスの系統群と性別を ddY 系雄マウス (以下「ddY」という。) に指定することにより生物試験に伴う誤差を小さくしているとされている。

AOAC 法では致死時間の中央値が 5-7 分となるような STX-2HCl 塩酸塩溶液の希釈液を 2~3 濃度用意し、1 群各 10 尾のマウスに投与して致死時間を計る。投与した STX-2HCl 濃度 ($\mu\text{g/mL}$) と群の中央致死時間より求めた毒力 (MU/mL) から変換係数 (Conversion Factor : CF 値) を求める。CF 値は 1 MU に相当する STX-2HCl の量 ($\mu\text{g/MU}$)

を表す。この試験を日を変えて行い、各群で得られた CF 値の平均値を標準点とする。通常の検査の際には、5 尾のマウスを使って再度 CF 値を求め、その値が標準点の $\pm 20\%$ に収まっていることを確認する。このことから、MBA においては同じ系統のマウス群を使用しても 20% の範囲でのばらつきは許容されていると考えられる。

当所ではホタテガイを EU に輸出するための生産海域モニタリング検査に、世界的に広く用いられており公定法とは異なる非近交系マウスである ICR 系雄マウス (以下「ICR」という。) を使用し AOAC 法を実施していた。そのため、一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 (以下「食薬センター」という。) が食品衛生外部精度管理調査として実施している動物を用いた麻痺性貝毒検査においても ICR を用いてきた。今般、当該検査の依頼が無くなったことから、初めて公定法で使用する ddY を使用して今年度の外部精度管理調査を実施することとした。

食薬センターの外部精度管理調査では、標準毒としてデカルバモイルサキシトキシン (decarbamoylsaxitoxin ; dcSTX) によりマウス感受性を確認し、CF 値を求めることとされている。CF 値は、標準毒を 5 尾以上のマウスに投与した際に算出されるものであるため、標準点として求めた CF 値の平均値を、本文中では基準 CF 値とする。

今回、マウス系統群を切り替えるにあたり、ddY を用いた時、麻痺性貝毒の毒成分の一つである dcSTX による基準 CF 値に違いが見られるのか、ICR を使用した過去のデータと比較した。

また、これまで ddY に対して STX-2HCl を投与したことはなかったため、ddY と ICR に STX-2HCl 標準毒及び有毒ホタテガイ抽出液を併行投与することにより、感受性に違いがあるかを確認した。この試験では ddY と ICR を同一ブリーダーから購入し、購入日と順化（飼養）日数を同一として、STX 投与溶液及び有毒ホタテガイ抽出液として食品衛生外部精度管理試料（23PS：ホタテガイペースト）より得た PSTs 試験液を同一日に腹腔内投与して比較したので報告する。

2. 材料及び方法

2.1 材料

外部精度管理調査に使用したマウスは、日本 SLC 株式会社より購入した 4 週齢 16 g の雄マウスを 2 日間順化して使用した。2011 年から 2022 年までは ICR を、2023 年は ddY を使用した。順化後マウスは体重を計測し、概ね 19～21 g のものを使用し、群内に 19 g 未満又は 21 g 超のマウスがいる場合はその群すべてのマウスの体重補正を行った。なお、23 g を超えるマウスは使用しなかった。

標準毒 STX 及び同一の有毒ホタテガイ抽出液の併行投与による比較に用いたマウスは、日本 SLC 株式会社より購入した。ICR は 3 週齢 14～15 g のマウスを、ddY は 4 週齢 14～15 g のマウスを購入し、ともに 3 日間順化して使用した。順化後マウスは体重を計測し、概ね 19～21 g のものを使用し、すべてマウスの体重補正を行った。なお、21 g を超えるマウスは使用しなかった。

dcSTX 標準溶液は、食薬センターより配付された dcSTX-二酢酸塩酢酸溶液を使用した。この溶液には Oshima の比毒性 STX 2483 MU/μmol、dcSTX 1274 MU/μmol^{2,3)}をもとに STX 換算された値が付与されており、2011 年から 2014 年までは 2.55 μmol/L (STX-2HCl として 0.49 FDA-STX μg/mL)、2015 年から 2023 年までは 2.35 μmol/L (STX-2HCl として 0.45 FDA-STX μg/mL) であった。

STX 標準溶液は、FDA より供与された 100 μg/mL STX-2HCl 塩酸溶液を使用した。STX 標準溶液 0.3 mL を 5 mmol/L 塩酸溶液で希釈し 30 mL とした STX-2HCl 実用標準溶液 (1 μg/mL) を調製

- 試 料 100 g
 - | 同量の 0.1 mol/L 塩酸を加える
- ホモジナイズ (ホモジナイザー 10,000 rpm 3 分)
 - | pH 調整 (pH 3 とする)
- 加 熱 (ホットプレート 5 分間煮沸)
- |
- 放 冷 (室温まで)
 - | pH 調整 (pH 3 とする)
- メスアップ (250 mL 共栓メスシリンダーに移し、
 - | 水を加えて 200 mL とする)
- 遠心分離 (3,000rpm 10 分)
- |
- 上 清 (マウス投与液)

図 1 PSTs 試験液 (マウス投与液) の調製フロー

し、同溶液 10 mL に希釈液 3 mmol/L 塩酸を 20 mL 加えた液を STX 投与溶液 (0.333 μg/mL) とした。

有毒ホタテガイ抽出液は、日本の公定法に基づいて調製した。調製フローを図 1 に示す。

2.2 マウス系統群の違いによる比較方法

(1) 外部精度管理調査における CF 値の比較

食薬センターが実施している動物を用いた麻痺性貝毒外部精度管理調査は、AOAC 法に準拠した方法であるが、標準毒としては dcSTX 標準溶液を用い CF 値を算出する。CF 値 (μg/MU) は投与した標準毒溶液の濃度 (μg/mL) をマウス単位毒力 (MU/mL) の中央値で除して求める。

食薬センター実施手順書に基づき、1 mL の腹腔内投与による致死時間の中央値が 5～7 分に入る希釈濃度の dcSTX 標準投与溶液を 3 液調製した。希釈液には水を使用し、一定量の dcSTX 標準溶液に希釈液量を 0.5 mL ずつ変えて 3 濃度とした。

3 濃度の投与溶液を、各濃度について 10 尾のマウス群に 1 mL ずつ腹腔内投与し、中央致死時間から Sommer's table を用いて投与溶液 1 mL 中のマウス単位毒力 (MU/mL) を求めた。各投与溶液の STX-2HCl としての濃度 (μg/mL) を、求めたマウス単位毒力 (MU/mL) で割って CF 値 (μg/MU) を求め、3 つの平均値から基準 CF 値を算出した。

この投与は同一日に 1 名の投与者により実施した。

2011 年から 2022 年までは ICR を、2023 年は ddY を用いた。

今回 2023 年に ddY で得た基準 CF 値を、これまで当所で ICR を使用して求めた基準 CF 値及び食薬センターの統計値から求めた基準値と比較した。

(2) STX 溶液投与による比較

調製した 0.333 $\mu\text{g/mL}$ の STX 投与溶液を各系統の 10 尾のマウス群に投与し、致死時間を比較した。また、中央致死時間から Summer's table を用いて投与溶液 1 mL 中のマウス単位毒力 (MU/mL) を求め、CF 値 ($\mu\text{g/MU}$) を算出した。

この投与は 2023 年度外部精度管理調査と同一の投与者により実施した。

(3) 同一の有毒ホタテガイ抽出液投与による比較

公定法に基づき調製した食品衛生外部精度管理試料 (23PS) より得た PSTs 試験液を各系統の 5 尾のマウス群に投与し、致死時間を比較した。また、中央致死時間から Summer's table を用いて投与溶液 1 mL 中のマウス単位毒力 (MU/mL) を求め、マウス毒力 (MU/g) を算出した。

本検討は 2 名の投与者により実施した。

表 1 デカルバモイルサキシトキシシン投与による基準 CF 値 (2011 年～2022 年)

実施年度	食薬センター配付の	当 所	食薬センター統計値より		
	dcSTX濃度 (FDA-STX $\mu\text{g/mL}$)		基準CF値 (FDA-STX $\mu\text{g/MU}$)	使用マウス ^{※1}	基準CF値 ^{※2} (FDA-STX $\mu\text{g/MU}$)
2011	0.49	ICR雄	0.194	ddY雄	0.204
2012	0.49	ICR雄	0.209	ddY雄	0.203
2013	0.49	ICR雄	0.198	ddY雄	0.201
2014	0.49	ICR雄	0.185	ddY雄	0.199
2015	0.45	ICR雄	0.175	ddY雄	0.176
2016	0.45	ICR雄	0.178	ddY雄	0.179
2017	0.45	ICR雄	0.173	ddY雄	0.180
2018	0.45	ICR雄	0.185	ddY雄	0.182
2019	0.45	ICR雄	0.185	ddY雄	0.184
2020	0.45	ICR雄	0.185	ddY雄	0.177
2021	0.45	ICR雄	0.191	ddY雄	0.179
2022	0.45	ICR雄	0.187	ddY雄	0.187
2011～2022年度		平均	0.187		0.188
		標準偏差	0.010		0.011
2011～2014年度		平均	0.197		0.202
		標準偏差	0.010		0.002
2015～2022年度		平均	0.182		0.181
		標準偏差	0.006		0.004

※1 参加27～33機関のうち、当所のみがICR雄マウスを使用。他はすべてddY雄マウスを使用。

※2 基準CF値＝参加機関の標準化毒力 (FDA-STX $\mu\text{g/g}$) の平均値／参加機関の毒力 (MU/g) の平均値

3. 結果および考察

3.1 dcSTX に対するマウス感受性の比較

当所で 2011 年から 2022 年まで、ICR を用い、食薬センター実施手順書に基づいて dcSTX 標準溶液投与により求めた基準 CF 値を表 1 に示す。

また、食薬センターによる動物を用いた麻痺性貝毒外部精度管理調査結果⁴⁾から求めた統計値による基準 CF 値を併せて表 1 に示す。食薬センターの統計値は従来方式による解析結果で、データ・クリーニング及び 2σ 処理により除外されたものを除いた有効機関数での平均値を用いた。本調査には 27～33 機関が参加しているが、使用マウスは

当所以外すべて ddY であったことから、得られた基準 CF 値は ddY によるものとみなした。

配付された dcSTX 標準溶液は、2011 年から 2014 年までは STX-2HCl として 0.49 FDA-STX $\mu\text{g/mL}$ 、2015 年から 2023 年までは 0.45 FDA-STX $\mu\text{g/mL}$ であり、それを水で希釈して投与した。

ICR を使用した当所の基準 CF 値と概ね ddY 使用により得られた統計値からの基準 CF 値を比較したところ、0.49 FDA-STX $\mu\text{g/mL}$ を使用した 2011 年から 2014 年の基準 CF 値は、当所平均 0.197 ± 0.010 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$ 、統計値平均 0.202 ± 0.002 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$ であり概ね同等であった。

また、0.45 FDA-STX $\mu\text{g/mL}$ を使用した 2015 年から 2022 年の基準 CF 値は当所平均 0.182 ± 0.006 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$ 、統計値平均 0.181 ± 0.004 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$ とこちらも同等であった。

今回 ddY を使用した 2023 年の基準 CF 値は 0.187 FDA-STX $\mu\text{g/MU}$ であり、2015 年以降の ICR を使用した当所平均値の範囲内であった。

また、今回得られた CF 値は統計値平均 $\pm 2\sigma$ の範囲内でもあり、食薬センター統計値より求めた他機関との比較結果も合わせると、dcSTX に対する感受性は、ddY と ICR で差はないものと考えられ

た。

3.2 STX に対するマウス感受性の比較

各マウス群 10 尾に、同一投与者が 0.333 $\mu\text{g/mL}$ の STX 投与溶液を 1 mL 腹腔内投与した結果について、致死時間順に並べたものを表 2 に示す。

ddY のほうが若干早く死に至る傾向が見られ、5 番目と 6 番目の致死時間の平均を中央致死時間とすると、ddY では 5 分 18 秒、ICR では 6 分 3 秒であった。

表 2 サキトキシシン投与による ddY マウスと ICR マウスの感受性比較

ddY 雄マウス					ICR 雄マウス				
マウス体重	致死時間	マウス 単位毒力	中央値	CF 値	マウス体重	致死時間	マウス 単位毒力	中央値	CF 値
(g)	(分:秒)	(MU/mL)	(MU/mL)	(STX $\mu\text{g/mL}$)	(g)	(分:秒)	(MU/mL)	(MU/mL)	(STX $\mu\text{g/mL}$)
20.7	4:02	2.552			19.3	4:57	1.918		
20.2	4:06	2.655			19.3	5:24	1.738		
20.5	4:42	2.090			19.7	5:35	1.699		
19.7	4:53	1.952			19.4	5:48	1.622		
20.6	5:10	1.893	1.852	0.180	19.1	5:57	1.568	1.571	0.212
20.9	5:26	1.811			20.2	6:09	1.573		
20.6	5:42	1.712			19.5	6:27	1.469		
19.2	5:55	1.581			19.1	6:41	1.404		
20.5	6:01	1.619			19.7	8:02	1.238		
20.4	6:11	1.574			19.8	生存	—		

※ マウス単位毒力:致死時間からSummer's tebleを用いて求めた値を体重補正したもの

※ 中央値:致死時間が5番目と6番目のマウス単位毒力の平均値

※ サキトキシシン投与溶液濃度: 0.333 $\mu\text{g/mL}$

表 3 同一の有毒ホタテガイ抽出液投与による ddY マウスと ICR マウスの感受性比較

投与者	ddY 雄マウス				ICR 雄マウス			
	マウス体重	致死時間	マウス 単位毒力	マウス毒力	マウス体重	致死時間	マウス 単位毒力	マウス毒力
	(g)	(分:秒)	(MU/mL)	(MU/g)	(g)	(分:秒)	(MU/mL)	(MU/g)
A	20.3	3:57	2.570		19.2	6:50	1.382	
	20.5	3:57	2.586		19.6	7:16	1.330	
	20.1	5:26	<u>1.769</u>	3.54	19.5	7:20	<u>1.316</u>	2.63
	20.2	6:35	1.471		19.2	7:40	1.259	
	20.5	6:53	1.430		19.2	8:55	1.138	
B	20.3	3:18	3.315		19.8	5:03	1.890	
	19.3	4:51	<u>1.950</u>		19.1	5:16	1.774	
	20.6	4:56	1.987	3.90	20.2	5:47	<u>1.667</u>	3.33
	20.7	5:13	1.880		18.4	5:36	1.617	
	20.7	5:42	1.717		19.8	6:01	1.586	

※ マウス単位毒力:致死時間からSummer's tebleを用いて求めた値を体重補正したもの

下線は中央値

本検討で、致死時間が 5 番目と 6 番目のマウス単位毒力の平均値から求めた中央値は、ddY で 1.852 MU/mL、ICR で 1.571 MU/mL であった。これから求めた STX による CF 値は、ddY で 0.180 µg/MU、ICR で 0.212 µg/MU となり、ddY の方が ICR より STX に対する感受性が高いことが示唆された。

3.3 同一の有毒ホタテガイ抽出液投与によるマウス感受性の比較

各マウス群 5 尾に、公定法に基づき調製した食品衛生外部精度管理試料 (23PS: ホタテガイペースト) より得た PSTs 試験液を 1 mL 腹腔内投与した結果について、致死時間順に並べたものを表 3 に示す。

STX 標準溶液投与時と同様、ddY のほうが致死時間は早く、マウス毒力 (MU/g) は ddY のほうが高くなった。これは投与者が違っても同様の傾向であった。

今回試料とした 23PS の毒組成は調べていないが、STX と dcSTX でマウス感受性に違いが見られたことから、毒成分とその含有量によって ddY と ICR でマウスの致死時間が異なる可能性が示唆された。

しかし、2023 年度食品衛生外部精度管理調査結果速報より、試料 (23PS) を分析した 28 機関のマウス毒力平均値は 3.278107 MU/g、標準偏差は 0.466256 MU/g であり、今回の 2 名の投与者によるマウス毒力はいずれも 2σ の範囲内 (2.345 MU/g~4.210 MU/g) にあった。

また、これまで ICR を用いて参加してきた当該検査においても z-スコア評価で 2 を超えることはなかったことから、非近交系マウスである ddY と ICR での感受性の差は MBA において許容される範囲内にあると考えられた。

4. まとめ

マウスの系統群により PSTs の毒成分である dcSTX や STX に対する感受性の違いについて、公定法で用いられている ddY 雄マウスと世界的に広く用いられている ICR 雄マウスで比較した。

過去のデータと比較した結果、dcSTX に対する感受性は ddY と ICR で差はないと考えられた。しかし、ddY と ICR に STX を併行投与した結果、ddY のほうが若干、致死時間が早い傾向が見られ、毒成分によっては感受性が異なることが示唆された。

今回の検討で ddY の STX-2HCl に対しての CF

値は、0.180 µg/MU であり、これまで当所で ICR を用いて求めた CF 値⁵⁾ 0.197±0.015 µg/MU (2011 年から 2019 年の基準 CF 値の平均値) に比べ若干低い値となったが、これは ddY と ICR の STX-2HCl に対する感受性の違いによるものと考えられた。

本研究に係る MBA は青森県環境保健センター動物実験委員会の承認を受け実施した。

文 献

- 1) AOAC Official Method 959.08 : Paralytic shellfish poison Biological method. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, 2005
- 2) Oshima Y. : Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.*, **78** (2), 528-532, 1995
- 3) Oshima Y. : Chemical and biochemical studies on paralytic shellfish toxins. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **74** (5), 767-771, 2008
- 4) 食品衛生外部精度管理調査結果報告書 一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 (2011 年度~2022 年度)
- 5) 山本明美: 外部精度管理調査におけるデカルバモイルサキシトキシンを使用した基準 CF 値と AOAC OM 959.08 によるサキシトキシンを使用した基準 CF 値の比較. 青森県環境保健センター年報, **32**, 41-50, 2021

PCR 法とシーケンスによる遺伝子解析を用いた毒キノコ種鑑別法の検討

小川裕貴 田中綾乃 福田 理¹ 山本明美

食中毒発生時の毒キノコ種の鑑別法として、PCR 法を用いた遺伝子検出及び LC-MS/MS 法を用いた毒成分検出¹⁾を検討した。本稿では PCR 法の検討結果を報告する。本法は調理品のみならず、メタノールによる毒成分抽出後の残渣に対しても適用できることを確認した。

野生の毒キノコを入手し、各キノコ種に特異的に反応するプライマーを用いて PCR を行ったところ、多くのキノコ種で本法による鑑別が可能であった。しかし、一部のキノコ種で鑑別できないものがあり、シーケンス解析の結果から、プライマー結合箇所の塩基配列が異なる系統群が存在することが判明した。鑑別の際は、シーケンス解析や LC-MS/MS 法の結果と合わせて検討することが重要だと考えられる。

Key words : poisonous mushroom, food poisoning, PCR, primer, sequencing

1. はじめに

国内では、毎年毒キノコの喫食が原因とされる食中毒事例が発生している。症状は種類によって異なり²⁾、最悪の場合死に至る可能性がある。正しい情報提供や再発防止等の観点から、キノコ種の正確かつ迅速な鑑別は重要であると考えられる。

現在本県では、専門家に形態鑑定を依頼しているが、調理により形態が失われ判別が難しくなる等の課題がある。現在、キノコ種の鑑別や毒成分分析に係る検査の公定法等は存在せず、化学的な検査手法の開発が求められている。

そこで当所では、「LC-MS/MS 法及び PCR 法を用いた毒キノコの鑑別に関する研究」というテーマで、既報^{3,4,5,6,7)}において報告されたプライマーを用いた PCR 法による遺伝子検出と LC-MS/MS 法による毒成分検出を組み合わせた鑑別法を検討した。

本稿では、PCR 法による毒キノコ種の鑑別について、各種条件での検討結果を報告する。また、毒キノコ由来のプライマーがないキノコ等についてはシーケンスによる塩基配列の解読を行ったので、解析結果から得られた知見についても報告する。

2. 試料と検査方法

2.1 試料

シイタケは市販品を用いた。野生の毒キノコは、

形態から判別ができる専門家からの提供等によって入手した。

2.2 試薬等

1 M Tris-HCl(pH 8.0)、0.5 M EDTA(pH 8.0) 及び 10% SDS solution は(株)ニッポンジーン製、NaCl は関東化学(株)製、Proteinase K は QIAGEN 製、2×Ampdirect Plus は(株)島津製作所製、BIOTAQ HS DNA Polymerase は Bioline 製のものを使用した。

2.3 機材等

ディスポーザブルホモジナイザー：バイオマッシャーII (株)ニッピ)、ドライブロックインキュベーター：BSR-MiniTC (株)バイオメディカルサイエンス)、マイクロ遠心分離機：Centrifuge 5415R (Eppendorf)、サーマルサイクラー：GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)、電気泳動装置：Mupid-2plus (ADVANCE)、PCR 産物精製キット：QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)、サイクルシーケンスキット：BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)、DNA シーケンサー：3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

2.4 DNA 抽出

次に示す 3 種類の DNA 抽出法を試行した。

(1)タンパク質分解酵素を用いた抽出法³⁾

(Proteinase K 法) (以下「PK 法」という。)

1 三八地域県民局環境管理部

- (2)シリカゲル膜タイプキットを用いた抽出法⁸⁾
(Plant Mini Kit 法)
(3)イオン交換樹脂タイプキットを用いた抽出法⁸⁾
(Genomic-Tip 法)

PK 法が最も迅速・簡便で、かつ試料が少量でも十分な感度で検出可能であることを確認したため、PK 法を採用した。抽出方法を図 1 に示す。

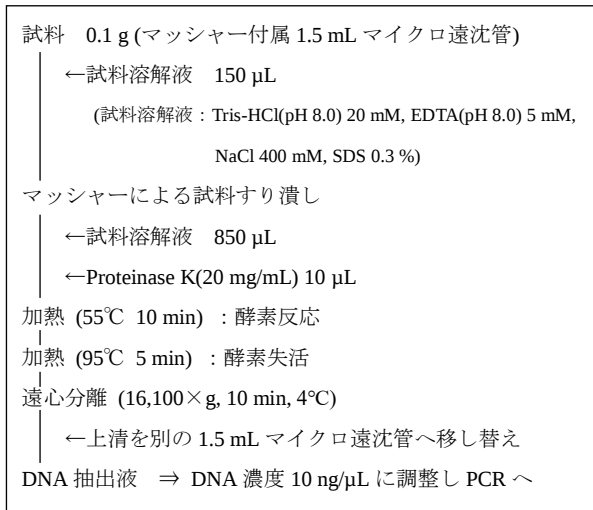


図 1 PK 法による DNA 抽出方法

2.5 PCR

ITS 領域の全体又は一部をターゲットとするプライマーを用いた。一覧を表 1 に示す。

Universal (ITS5/ITS4、ITS1/ITS2) は全てのキノコ種で増幅するプライマーであり、それ以外は各キノコ種に対し特異的に増幅するプライマー (以下「判定用プライマー」という。) である。

Universal プライマーはシーケンス解析の際の増幅プライマー、判定用プライマーは PCR によるキノコ種の鑑別に使用した。

表 1 使用したプライマー

名称	配列 (5'→3')	キノコ種 (塩基長)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Universal ⁴⁾
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(700-900 bp)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Universal ⁴⁾
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	(約 350 bp)
LE-F1	TGGTGGATTGTTGCTGGCCTTTG	シイタケ ⁵⁾
LE-R1	GAGCACCTTCAAAACCCGATGAAAG	(109 bp)
OJSP-F	GTGCACGTTTCCTTTCAAT	ツキヨタケ ⁶⁾
OJSP-R	AGAATCATCAACAGAGCTGC	(107 bp)
AISP-F	GCTTGTTCTTTCATCTCTCC	イボテンタケ ³⁾
APSP-R	CATAGACAACCTGAACAATGCC	(71 bp)
AVSP-F	GCTCTCCTGGAATGTAATTAGTGG	ドクツルタケ ³⁾
AVSP-R	GGTTAGACAGCAGAGAGAACTAAC	(103 bp)
ERSP-F	TTTGAGAACTGCTGTGAAATC	クサウラベニタケ ⁶⁾
ERSP-R	GGCACAAGTCCCTATATGTTTA	(110 bp)
28F	AAACCTGGCTTGGTTGATG	ニガクリタケ ⁷⁾
27R	CCTCACAACCGAGTTTCCTC	(123 bp)
TUSP-F	TAGTAGGGACCTCTGTTGCCTT	カキシメジ ^{1 6)}
TUSP-R	AACCTCCAATTAAAGCTGCTTAC	(80 bp)
11F	GTAGGGACCTCTGTTGCCTTAG	カキシメジ ^{2 7)}
10R	AGGAGACGGTAGAAAGCAGT	(99 bp)

反応試薬及び反応条件は、既報^{3,7)}を参考とし、表 2 のとおりとした。

PCR 後の増幅産物は、アガロースゲル電気泳動により目的サイズ付近のバンドの有無を確認した。

表 2 反応試薬及び反応条件

反応試薬組成 () 内は終濃度)
Ampdirect Plus (1 x), BIOTAQ HS (0.025 U/μL), primer (F,R 各 0.5 μM), Template DNA 1 μL 添加し、水で全量 25 μL とする
反応条件
94 °C 4 min→(98 °C 10 sec, 55 °C 30 sec, 72 °C 1 min) 30 cycles→4 °C 保持

2.6 ITS1 領域増幅によるシーケンス解析

シーケンス解析では、抽出 DNA から Universal プライマー (ITS1/ITS2) で ITS1 領域を増幅し、DNA シークエンサーを用いて塩基配列を解読した。得られた塩基配列は、米国の National Center for Biotechnology Information (NCBI) の遺伝子情報データベース (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて検索を行い、登録済データとの比較を行った。

3. 結果

3.1 調理品の検討 (シイタケ)

調理が PCR に及ぼす影響を確認するため、シイタケ試料に模擬的な調理を行った。調理法を以下に示す。⑥～⑩は加熱時間のみ変えている。

- ①焼き ②炒め ③みそ汁 ④マリネ ⑤ベーコン炒め
⑥茹で (30 分) ⑦茹で (60 分) ⑧茹で (90 分)
⑨茹で (120 分) ⑩茹で (180 分)

Universal プライマー (ITS5/ITS4) 及び判定用プライマー (LE-F1/LE-R1 (シイタケ)) を用いて PCR を行った。なお、本検討のみ DNA 抽出時の酵素反応条件を 55 °C 1 h としている。

電気泳動像を図 2 に示す。Universal プライマー (ITS5/ITS4) を用いた PCR では、①～⑦ではバンドが検出されたが、試料を長時間茹でた条件でバンドが見られなくなった。増幅のターゲットとなる領域が 700 bp- 900 bp と長いため、加熱による変性等の影響を受けやすいものと推測された。

一方、判定用プライマーについては、長時間の茹で試料を含む全ての試料で増幅が確認され、バンドの強度低下も見られなかった。判定用プライマーについては、LE-F1/LE-R1 のターゲット領域が 109 bp、その他のキノコ種も 100 bp 前後であるため、調理影響は限定的であると考えられた。

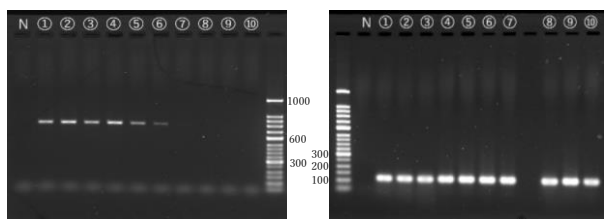


図 2 PCR 増幅産物の電気泳動像 (調理品)
(左: Universal (ITS5/ITS4) 右: シイタケ判定用 (LE-F1/LE-R1))

3.2 調理品の検討 (イボテングタケ)

野生の毒キノコを調理し、PCR 及びシーケンス解析を実施した。入手したイボテングタケで調理 (ミートソース、キノコ汁) を行い、未調理品とともに判定用プライマー (AISP-F/APSP-R (イボテングタケ)) を用いて PCR を行った。

PCR 結果から、未調理品及び調理品で同様の増幅が確認され、反応阻害は見られなかった。

シーケンス結果から、未調理品及び調理品で同一の塩基配列となり、解読した 243 塩基がイボテングタケ (*Amanita Ibotengutake*) と完全一致した。

調理品のシーケンスについて、夾雑物による阻害や加熱の影響等なく実施できることを確認した。

3.3 メタノール抽出残渣を用いた検討

食中毒発生時に、通常は LC-MS/MS 法と PCR 法を並行して検査するのが合理的と考えられるが、本検討では、残試料が少量であった場合を想定し、LC-MS/MS 法¹⁾で毒成分抽出を行った後の残渣から DNA 抽出を行い、PCR 法での検出を試みた。

LC-MS/MS 法では、試料からメタノールにより毒成分を抽出している。遠心残渣にはキノコの組織が含まれることから、PK 法で残渣から DNA を抽出し、PCR を行った。概要を図 3 に示す。

試料として、イボテングタケの未調理品及び調理品 5 種類 (①未調理品、②カレー、③グラタン、④ソテー、⑤天ぷら、⑥ぎょうざ) のメタノール抽出残渣を用いた。

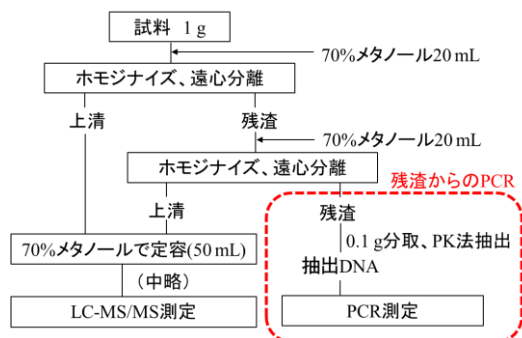


図 3 LC-MS/MS 抽出工程及び残渣からの PCR

電気泳動像を図 4 に示す。未調理品及び全ての調理品で増幅が確認され、バンドの強度低下も見られなかった。調理及びメタノール抽出の両方の影響を受けた試料についても、本法で問題なく検出可能であることを確認した。

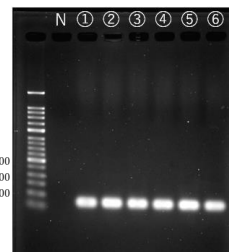


図 4 PCR 増幅産物の電気泳動像 (抽出残渣)
(イボテングタケ判定用 (AISP-F/APSP-R))

3.4 毒キノコの鑑別

専門家が形態により判別を行った毒キノコ試料を入手し、PCR を実施した。

判定用プライマーが存在する試料 (イボテングタケ、ドクツルタケ、クサウラベニタケ、ツキヨタケ、ニガクリタケ、カキシメジ) については、各判定用プライマーを用いて PCR を行った。判定用プライマーがない試料及び判定用プライマーによる PCR で陰性となった試料については、ITS1 領域についてシーケンス解析を行った。

結果を表 3 に示す。

判定用プライマーを用いた PCR では、クサウラベニタケを除くキノコ種で増幅が見られた。平成 11 年から令和 5 年に青森県内で発生したキノコによる食中毒発生件数は 33 件で、ツキヨタケ(9)、クサウラベニタケ(9)、イボテングタケ(2)、カキシメジ(2)、ドクツルタケ(1)、テングタケ(1)、カヤタケ属キノコ(4)、テングタケ属キノコ(1)、アセタケ属キノコ(1)、種類不明(3)であり、主なキノコ食中毒の原因とされているキノコは、クサウラベニタケを除き、判定用プライマーによる判定が可能であることを確認した。

試料 (No.25) は、ドクツルタケの判定用プライマーで PCR が陰性となり、シーケンス解析からコテングタケモドキという別のキノコ種であることが示唆された。LC-MS/MS の結果から、コテングタケモドキで検出される毒成分が確認されたことから、コテングタケモドキと鑑別した。

試料 (No.41、No.42) は、クサウラベニタケの判定用プライマーでの PCR が陰性となったが、シーケンス解析ではクサウラベニタケの一種と塩基

配列が一致し、判定用プライマーを用いた結果とシーケンスで異なる鑑別結果となった。

ITS1 領域でのシーケンスを実施した BLAST 検索結果では、塩基配列が類似する複数の種が推定されるものも多く、種の同定をする場合は、更に広い領域でのシーケンスや系統解析が必要であり、本法のみで種の同定は難しいことを確認した。しかし、BLAST 検索で推定される種は概ね同じ属または科に属しており、毒成分分析の結果と併せることで食中毒原因となったキノコの大まかな属または科の推定は可能であると考えられた。

4. クサウラベニタケに関する考察

日本国内のクサウラベニタケについては、近藤らが系統解析を行い、3つの系統群に分類されると報告⁹⁾している。近藤らは系統群を clade-I～clade-III と分類しており、シーケンス解析結果から、試料 (No.41、No.42) は clade-III に分類されることが判明した。

試料 (No.41、No.42)、各系統群のクサウラベニタケ検体⁹⁾の塩基配列の一部及び判定用プライマー (ERSP-F/ERSP-R) の塩基配列を表4に示す。データベースに登録されている検体「KUB110

(clade-I)、KUB1 (clade-II)、KUB102 (clade-III)」については、いずれも近藤らが報告したものである。

判定用プライマー (ERSP-F/ERSP-R) の配列は clade-II のプライマー結合箇所と完全一致しており、この系統群を基に設計したのと考えられる。一方で、clade-I 及び clade-III は配列が異なるため、当該プライマーを用いた PCR で増幅が起こらないことが判明した。

以上の結果から、クサウラベニタケのように複数の系統群を持つキノコ種について、塩基配列の違いにより、判定用プライマーによる PCR では一部の系統群が検出されない可能性があることが示唆された。

5. まとめ

PCR 法を用いた毒キノコ種鑑別法を構築した。本法は調理品のみならず、調理品をメタノール抽出した残渣からの検出が可能であったことから、少量しか試料がない場合でも、最初に毒成分抽出して LC-MS/MS 法による分析を行い、次に残渣から DNA を抽出して PCR 法による遺伝子検出を行う、という検査が実施できることを確認した。

表3 毒キノコの判定用プライマーによる PCR 結果とシーケンス解析結果

番号	形態による判別	PCR 結果	シーケンス解析結果		
			全長	BLAST 検索で推定された種	一致率
No.22	イボテングタケ	陽性	243bp	イボテングタケ(<i>Amanita ibotengutake</i>)	100.00%
No.25	ドクツルタケ(疑い)	陰性	262bp	コテングタケモドキ(<i>Amanita pseudoporphyria</i>)	100.00%
No.30	アセタケ属(患者宅から) ^{※2}	—	272bp ^{※1}	アセタケ科の複数種がヒット	
No.31	アセタケ属(野生から) ^{※2}	—	272bp ^{※1}	アセタケ科の複数種がヒット	
No.35	ドクツルタケ	陽性	251bp	ドクツルタケ(<i>Amanita virosa</i>)	100.00%
No.38	ヒメアジロガサモドキ	—	277bp	ヒメアジロガサ(<i>Galerina marginata</i>)	99.28%
No.39	タマシロオニタケ	—	153bp ^{※1}	タマシロオニタケ(<i>Amanita aburupta</i>)	97.40%
No.40	クサウラベニタケ	陰性	塩基の波形に重なりが多く、解読不可。		
No.41	クサウラベニタケ	陰性	311bp	複数種がヒットしたが、下記と一致 クサウラベニタケ(<i>Entoloma rhodopolium</i>) (KUB102)	
No.42	クサウラベニタケ	陰性	283bp	上記と同一配列であり、結果は同上	
No.46	ツキヨタケ	陽性	—		
No.49	ニガクリタケ	陽性	—		
No.50	カキシメジ(広葉樹)	陽性 ^{※3}	—		
No.51	カキシメジ(針葉樹)	陽性 ^{※3}	—		

※1 塩基配列が部分的にしか解読できない試料については、配列の相関性が高いものを参考に、「種」又は「属」の推定を行っている。

※2 実際の食中毒事案で採取された試料。青森県きのこ会工藤伸一氏が「アセタケ属キノコ(コブアセタケ類似種)」と鑑定。

※3 プライマー2種類(TUSP-F/TUSP-R及び11F/10R)で陽性となることを確認。

表4 クサウラベニタケ塩基配列の比較 (プライマー結合箇所のみ抜粋)

試料又はプライマー	塩基配列 (F プライマー)	塩基配列 (R プライマー) ※	
試料 (No.41)	TTTGAGAACTGCTGCAA-----	TTTAATTAT-TGGCCTTTTTGTGCC	同一配列
試料 (No.42)	TTTGAGAACTGCTGCAA-----	TTTAATTAT-TGGCCTTTTTGTGCC	
KUB102 (登録検体) ⁹⁾ clade-III	TTTGAGAACTGCTGCAA-----	TTTAATTAT-TGGCCTTTTTGTGCC	
KUB110 (登録検体) ⁹⁾ clade-I	TTTGAGAACTGCCG-----	CAATCTTTACTGGCTTTTTGTGCC	同一配列
KUB1 (登録検体) ⁹⁾ clade-II	TTTGAGAACTGCTGTGAAAATC	TAAACATATAGGGAC---TTTGTGCC	
プライマー (ERSP-F/ ERSP-R※)	TTTGAGAACTGCTGTGAAAATC	TAAACATATAGGGAC---TTTGTGCC	

※ 塩基配列の比較のため、R プライマーは相補鎖を示している。

本法は、詳細なキノコ種同定のためではなく、食中毒発生時の初期対応において毒成分分析では毒成分が特定できなかった場合の補完を目的として検討を行った。多くのキノコ種で本法により大まかな鑑別が可能であることを確認したが、クサウラベニタケのように部分的に塩基配列が異なる複数の系統群が存在する場合には、判別用プライマーを用いた PCR 法単独では鑑別できない可能性があることが判明した。

キノコは種が多いだけでなく、似通った種や未登録の種も多数ある。キノコ種の遺伝子系統については未解明の部分が多く、他のキノコ種にもクサウラベニタケと同様に複数の系統群が存在する可能性がある。鑑別の確実性を高めるためには、形態による鑑別と遺伝子学的な解析、毒成分分析の結果などを組み合わせて検討することが重要である。

謝 辞

本研究の実施にあたり、試料を御提供いただいた湯口竹幸様、試料採取に御協力頂きました青森市森林博物館の皆様にご心から謝意を表します。

また、キノコの分子生物学的同定法やシーケンス解析結果の評価等について御教授頂きました国立医薬品食品衛生研究所の曾我慶介先生、渡辺麻衣子先生、青木渉先生、諸先生方を御紹介くださった同研究所の阿部裕先生に深謝致します。

文 献

- 1) 田中綾乃他: LC-MS/MS によるキノコの毒成分一斉試験法の構築. 青森県環境保健センター年報, **34**, 94-98, 2023
- 2) 厚生労働省 HP: 自然毒のリスクプロファイル: 植物性自然毒: キノコ
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/>

kenkou_iryoushokuhin/syokuchu/poison/index.html (2024/2/15 閲覧)

3) 野田拓史: 毒キノコによる食中毒の検査体制の構築 (第3報). 福井県衛生環境研究センター年報, **19**, 36-42, 2020

4) White, T.J. et al.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics, PCR protocols: A Guide to Methods and Applications: 315-322, Academic Press, San Diego, 1990

5) 昌山敦他: 食中毒原因究明のための遺伝子解析によるキノコ鑑別. 食衛誌, **53**, 237-242, 2012

6) Maeta, K et al.: Rapid Species Identification of Cooked Poisonous Mushrooms by Using Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3306-3309, 2008

7) 野村千枝他: 食中毒を引き起こす有毒キノコの種特異的プライマーによるスクリーニング法の開発. 食衛誌, **58**, 132-142, 2017

8) 消費者庁: 食品表示基準について (別添 アレルゲンを含む食品の検査方法) (平成 27 年 3 月 30 日消食表第 139 号)

9) Kondo, K et al.: Molecular phylogenetic analysis of new *Entoloma rhodopolium*-related species in Japan and its identification method using PCR-RFLP. *Sci. Rep.*, **7**:14942, 1-12, 2017

LC-MS/MS によるキノコの毒成分一斉試験法の構築

田中綾乃 小川裕貴 福田 理¹ 山本明美

キノコの喫食が原因と疑われる食中毒が発生した場合、調理品からでも鑑別可能な方法として、遺伝子解析による方法¹⁾と LC-MS/MS を用いた簡便かつ迅速な毒成分検出法を組み合わせた鑑別方法を構築した。今回述べる毒成分検出法では、ターゲットとして致死性が高い毒キノコ及び食中毒事例の多い毒キノコ^{2),3)}の毒成分のうち、標準品の入手が可能な 10 成分について一斉分析を試みた。毒成分は、調理品中のキノコだけでなくキノコ以外の汁等からも検出され、キノコを含まない残置食品からも食中毒原因の特定につながる可能性が示唆された。

Key words : poisonous mushrooms, food poisoning, LC-MS/MS

1. はじめに

毒キノコの誤食による食中毒は毎年全国各地で発生しており、本県でも今年度発生事例があった。毒キノコの中には致死性の高い毒成分を含むものもあり、迅速に原因を究明し、早期に治療を行うことが重要である。中毒疑い事例が発生した場合、これまでは外部の専門家に形態鑑別を依頼してきたが、調理等により形状が変化することによって正確な鑑定が困難な場合もある。そこで、調理品からでも鑑定可能な方法として遺伝子解析による方法と LC-MS/MS を用いた簡便かつ迅速な毒成分検出法を組み合わせた鑑別方法の構築を試みた。本報では、LC-MS/MS による毒成分一斉分析により県内で採取した毒キノコ（推定）の分析を実施した結果及び実際に発生した食中毒事例への対応について報告する。

2. 方法

2.1 標準品及び試薬等

α -アマニチン、イボテン酸、ムシモール、ファラシジン、ファロイジン（富士フィルム和光純薬）、アリルグリシン（東京化成工業）、イルジン S（林純薬工業）、ムスカリン、プロパルギルグリシン、カナバニン（Sigma-Aldrich）の 10 種を用いた。精製カラムは Oasis HLB(60 mg/3 cc)（Waters）、試験溶液の最終ろ過には孔径 0.2 μ m PVDF シリンジフィルター（cytiva）を用いた。

2.2 標準原液・混合標準溶液の調製

各標準品はメタノール（カナバニンは 50 %メタノール）に溶解して各 100 μ g/mL または 200 μ g/mL の標準溶液を調製し、この 10 種を混合して 70 %メタノールを加え 10 μ g/mL 混合標準溶液を調製した。検量線用として、10 μ g/mL 混合標準溶液を 70 %メタノールで 0.1~1,000 ng/mL の範囲になるように適宜希釈して調製した。

2.3 試料

市販のシイタケ、県内で採取され遺伝子検査で同定されたイボテングタケ及びカキシメジを用いた。

2.4 試験溶液の調製方法

試料は生及び調理したキノコを用いた。野田の方法^{4),5)}を参考に、試料 1 g を 70 %メタノールで抽出して遠心分離後の上清を分取、残渣に 70 %メタノールを加えて再度抽出及び遠心分離した上清を合わせて 50 mL に定容した。そのうち 2.5 mL を Oasis HLB(60 mg/3 cc)に負荷して精製し、溶出液を 70 %メタノールで 10 mL に定容し、フィルターでろ過したものを試験溶液とした（図 1）。なお、イボテン酸及びプロパルギルグリシンについては、マトリクスの影響によりイオン化が抑制されることが確認されており、各 2 倍、20 倍以上希釈したものを測定に用いた。

2.5 装置及び測定条件

幅広い極性の対象成分に対応するため、マルチモード ODS カラムである Imtakt 製 Scherzo

1 三八地域県民局環境管理部

SS-C18(3 μm , ϕ 2×50 mm)を用いた。測定条件を表 1 に示す。

2.6 添加回収試験

フードプロセッサーで粉碎したシイタケを 1 g 秤取りし、10 $\mu\text{g/mL}$ の 10 種混合標準溶液を 0.5 mL 添加し、図 1 に従って試験溶液を調製した (n=3)。マトリクスによるイオン化抑制の影響を確認するため、原液に加え 2, 5, 10, 20 倍希釈溶液も調製し、LC-MS/MS で測定した。

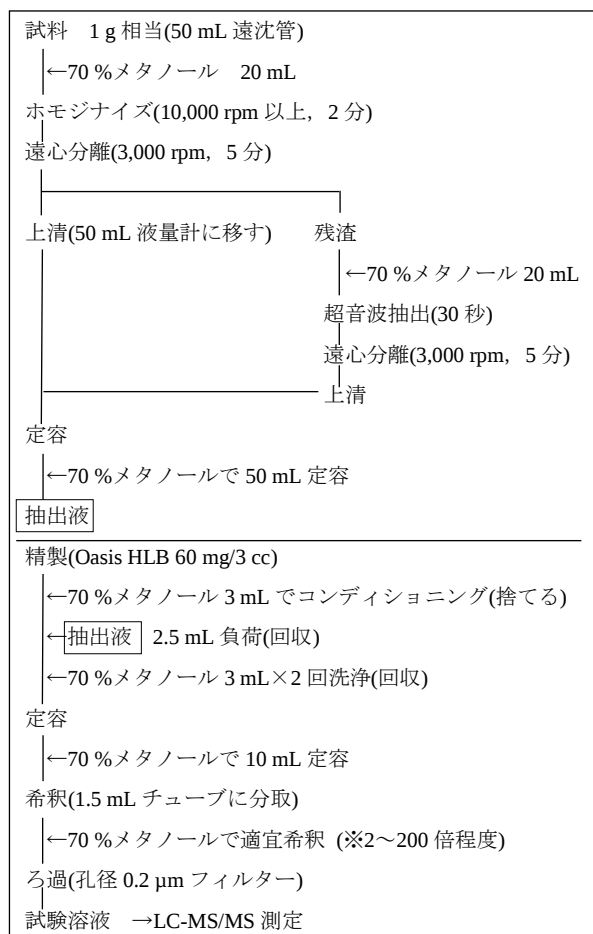


図 1 試験溶液調製方法

2.7 標準品のないカキシメジの定性分析法検討

カキシメジによる中毒事例は過去に本県でも起きているが、主な毒成分であるウスタリン酸は標準品が市販されていない。

そこで今回、PCR 法でカキシメジと判定されたキノコを用い、ウスタリン酸の単離精製を行った渡部らの方法⁶及び宮手の方法⁷を参考に定性を目的とした試験法を検討した。

3. 結果と考察

3.1 装置への注入量及び分析時間の検討

標準溶液及び試験溶液をそのまま測定するとピ

ークの割れやリーディングが確認されたため注入方法の検討を行った。感度を維持しながらシャープなピーク形状を得るには、装置の Auto addition 機能を利用した溶液 5 μL + 水 5 μL の同時注入が最適であった。また、分析用カラムは長さ 50 mm の短いものを用い、ピーク分離を維持したまま分析時間を 12 分に短縮した。

また、カナバニンはこの方法ではピークが検出されなかったため条件を再検討した結果、表 1 に示す測定条件のうち、水系移動相を 0.07 %酢酸から 0.07 %酢酸含有 15 mM 酢酸アンモニウム水に変更することにより検出が可能となった。

3.2 調理品における毒成分の検出状況比較

県内の公園から採取したイボテングタケを用いて、生及び調理による毒成分の検出状況を確認した。方法として、PCR 法でイボテングタケであることを確認した数本のキノコから傘と柄を少量ずつ切り出し、他の食材とともに一般的な方法で調理した。その各調理品から、キノコのみを取り出したもの、汁、ソースまたは他の具材等キノコ以外のものをそれぞれ検体とした。その結果、主な毒成分であるイボテン酸及びムシモールは、生のキノコからだけでなく、今回検討した調理品全てにおいてキノコ以外の汁等からも検出された。各調理済みキノコ 1 g に含まれる毒量を 1 とした場合の、キノコ以外の汁等 1 g に含まれる毒量の割合を表 2 に示す。

今回検討に用いたイボテングタケの他にも、ツキヨタケやドクササコ等においても毒成分が調理品全体に移行することが報告されており^{8),9),10)}、食中毒発生時に生のキノコ残品が無い場合であっても調理品の一部から食中毒原因の特定につながる可能性が示唆された。

3.3 添加回収試験結果

対象とした 10 成分の各回収率は 51.5 % ~ 139.4 %であった(表 3)。本法において、マトリクスによるイオン化抑制の影響を受けやすいとされるプロパルギルグリシン及びイボテン酸は、検量線濃度範囲内で最大に希釈して 50 % ~ 60 %程度とやや低めであったものの、緊急時の原因特定を目的とした検査における検出確認には十分な回収率が得られた。

3.4 実際の毒キノコ(推定)の検査結果及び PCR 法による結果との比較

形態鑑別で毒キノコと判定され、PCR 法またはシーケンス解析でその種が確定したものについて、LC-MS/MS 法で毒成分の一斉分析を行った。

その結果、表 4 に示すとおり遺伝子検査で同定されたキノコ種から推定されたとおりの毒成分が概ね検出された。しかし、クサウラベニタケ及びニ

ガクリタケについては推定された毒成分が検出されなかった。

表 1 LC-MS/MS 測定条件

LC 部								
装置：Waters ACQUITY UPLC I-Class		流速及びグラジエント条件：						
分析カラム：Imtakt Scherzo SS-C18		時間(分)	流速 (mL/min)	A(%) B(%)				
(3 μm,2.0×50 mm),ガードカラム付		初期	0.3	100.0 0.0				
移動相：A 0.07 %酢酸水溶液		5.00	0.3	100.0 0.0				
(カナバニン用：0.07 %酢酸含有 15 nM 酢酸アンモニウム水)		7.50	0.3	0.0 100.0				
B 15 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール		9.00	0.3	0.0 100.0				
測定時間：12 分 カラム温度：40 °C		9.50	0.3	100.0 0.0				
注入量：5 μL+水 5 μL(Auto Addition 機能使用)		10.00	0.3	100.0 0.0				
MS 部								
装置：Waters Xevo TQ-S micro イオン化モード：ESI(positive,negative)								
Capillary：0.5 kV		Desolvation Gas：600 °C,1000 L/hr		Cone Gas：50 L/hr Source Temp.：150 °C				
MRM 条件								
	Precursor ion (m/z)	Cone (V)	Product ion (m/z)	CE (eV)	Product 2 ion (m/z)	CE (eV)	Product 3 ion (m/z)	CE (eV)
プロパルギルグリシン	113.9	5	68.0	10	73.8	10	41.3	15
ムシモール	114.9	10	97.8	10	29.8	15	40.1	25
アシルグリシン	115.9	10	70.0	10	73.9	5	43.2	15
イボテン酸	158.9	5	112.8	10	42.0	20	-	-
ムスカリン	174.1	10	56.9	20	42.9	25	60.0	20
イルジン S	265.0	15	216.8	10	94.8	15	247.0	5
ファロイジン	789.6	10	156.9	50	185.0	45	85.9	50
ファラシジン	847.2	10	156.9	50	811.1	20	330.0	50
α-アマニチン	919.4	20	259.0	45	86.3	50	339.3	50
カナバニン	176.9	10	76.0	15	160.0	10	117.9	10

表 2 調理品におけるキノコ以外の部分の毒成分含有割合

調理品 (検体)	キノコ汁 (汁)	ミートソース (ソース)	カレー (ルー)	グラタン (ソース)	天ぷら (衣)	ギョウザ (皮を除く他の具材)
イボテン酸	0.89	0.67	0.38	0.50	0.18	0.15
ムシモール	1.04	0.72	0.72	0.36	0.20	0.18

※各調理品中のキノコ 1 g に含まれる毒量を 1 とした場合のキノコ以外の汁等 1 g に含まれる毒量の割合

表3 添加回収試験結果 (n=3)

	平均回収率(%)	併行精度(%)
プロパルギルグリシン	61.5	5.0
ムシモール	120.9	1.7
アリルグリシン	93.0	1.6
イボテン酸	51.5	3.3
ムスカリン	105.5	0.6
イルジンS	99.2	1.6
ファロイジン	73.9	2.6
ファラシジン	(定性のみ)	
α -アマニチン	121.6	1.8
カナバニン	139.4	8.8

3.5 カキシメジの検査結果

広葉樹近くで採取されたもの及びマツなど針葉樹近くで採取されたものの2種類を入手し、検査に用いた。2種の判定用プライマーを用いたPCR法ではいずれも増幅を確認しカキシメジと判定されたが、337.0>219.0及び337.0>117.0のイオンをモニターして今回ウスタリン酸のピークが確認されたのは、広葉樹近くで採取されたものからのみであり、針葉樹近くで採取されたものからはピークは検出されなかった(図2)。

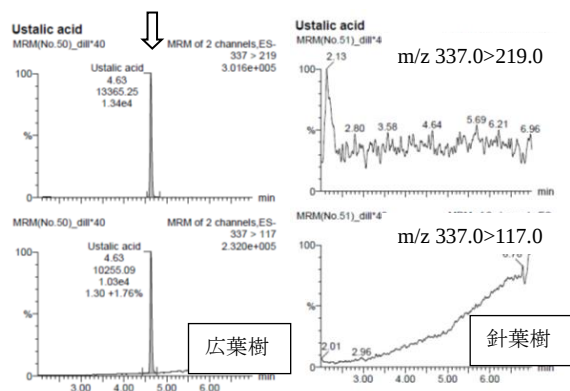


図2 ウスタリン酸のピーク確認

3.6 食中毒事例の概要と検査結果

2023年9月に県内のA保健所管内で毒キノコの喫食による食中毒が発生した。主な症状は、下痢、著しい発汗及び嘔吐であり、専門家による形態鑑別の結果アセタケ属と判定されたキノコの一部を入手した。

当所での検査の結果、遺伝子解析による方法ではシーケンス解析でアセタケ属と判定された。毒成分としてはムスカリンの検出が想定され、LC-MS/MS法を実施したところムスカリン及び α -

アマニチンを検出し、形態鑑別結果を裏付ける結果となった(表4)。

4. まとめ

LC-MS/MSによる主要な毒キノコの毒成分一斉試験法及びウスタリン酸定性試験法を構築した。クサウラベニタケやニガクリタケなどは、自然毒のリスクプロファイル²⁾には毒成分としてムスカリンが記載されているが、今回の分析対象のように遺伝子解析で鑑別されても主要毒とされている成分を含まないものもあることがわかった。今回分析対象としていない成分を含む可能性、または毒キノコの個体差や採取場所及び時期により毒成分をほとんど含まない可能性が考えられる。

毒成分は調理品中のキノコだけでなくキノコ以外の汁等からも検出され、キノコを含まない残置食品からも食中毒原因の特定につながる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の実施にあたり、試料採取に御協力頂いた湯口竹幸氏及び森林博物館職員の皆様へ深く御礼申し上げます。

文 献

- 1)小川裕貴：PCR法とシーケンスによる遺伝子解析を用いた毒キノコ種鑑別法の検討，青森県環境保健センター年報，34，89-93，2023
- 2)厚生労働省 HP：自然毒のリスクプロファイル：植物性自然毒：キノコ
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/shokuchu/poison/index.html(2024/2/16 閲覧)

- 3) 工藤伸一：青森県産きのこ図鑑, アクセス二十一出版, 2017 (ISBN 978-4-900912-12-0)
- 4) 野田拓史：毒キノコによる食中毒の検査体制の構築(第 3 報), 福井県衛生環境研究センター年報, **19**, 36-42, 2021
- 5) 野田拓史：毒キノコによる食中毒の検査体制の構築(第 2 報), 福井県衛生環境研究センター年報, **18**, 54-57, 2020
- 6) 渡部淳他：カキシメジの毒性成分ウスタリン酸の単離精製法の検討, 山形県衛生研究所報, **55**, 1-6, 2022
- 7) 宮手公輔：カキシメジの定性に向けたウスタリン

酸粗組成品の作成について, 令和 3 年度地衛研支部衛生化学研究部会総会抄録, 103, 2021

8) 若林勇輝他：ツキヨタケに含まれる有毒成分の分析法の検討, 栃木県保健環境センター年報, **23**, 73-76, 2018

9) 大河原龍馬他：調理加工を行ったツキヨタケ中の中毒成分イルジン S の残存量, 山形県衛生研究所報, **52**, 1-7, 2019

10) 石田恵崇：ドクササコ有毒成分同時分析法の調理加工品への応用, 食品衛生学雑誌, **64**(2), 89-93, 2023

表 4 遺伝子解析結果との比較及び毒成分の検出結果

遺伝子解析結果	検出方法	検出が想定される毒成分	検出された毒成分
イボテングタケ	PCR	イボテン酸, ムシモール, ムスカリン, α -アマニチン, アリルグリシン, プロパルギルグリシン等	イボテン酸 ムシモール
コテングダケモドキ	シーケンス解析	プロパルギルグリシン, アリルグリシン等	プロパルギルグリシン アリルグリシン
ドクツルタケ	PCR	α -アマニチン, ファラシジン, ファロイジン等	α -アマニチン ファラシジン ファロイジン
ヒメアジロガサ	シーケンス解析	α -アマニチン等	α -アマニチン
タマシロオニタケ	シーケンス解析	プロパルギルグリシン, アリルグリシン等	プロパルギルグリシン アリルグリシン
クサウラベニタケの 一種	PCR(陰性)→ シーケンス解析	ムスカリン, (ムスカリジン, コリン)等	検出なし
ツキヨタケ	PCR	イルジン S, (イルジン M, ネオイルジン)等	イルジン S
ニガクリタケ	PCR	ムスカリン, (ファシキユロール, ファシキユリン酸)等	検出なし
カキシメジ(広葉樹)	PCR	ウスタリン酸	(ウスタリン酸) (337.0>219.0, 337.0>117.0)
カキシメジ(針葉樹)	PCR	ウスタリン酸	検出なし
アセタケ属 (食中毒事例)	シーケンス解析	ムスカリン等	ムスカリン α -アマニチン

※検出が想定される毒成分のうち、()は今回分析していない成分

青森県内の光化学オキシダント濃度について

対馬典子 内海宣俊

青森県では昭和 47 年から光化学オキシダントの測定を開始し、現在は一般環境大気測定局 6 局（県測定 4 局、青森市測定 1 局、八戸市測定 1 局）で実施しているが、昭和 54 年度以降全局で環境基準を達成していない状況が続いている。年平均値の推移については平成 20 年度以降は地点間の差が小さく、横ばいの状況である。

また、県内全域において、春季に高く夏季に低い一山型の類似した経月変化を示した。

Key words : Oxidants concentration , Seasonal change , Diurnal variation , Duration of sunshine

1. はじめに

オキシダントとは、中性ヨウ化カリウム溶液からヨウ素を遊離するオゾンやパーオキシアセチルナイトレート、二酸化窒素等の酸化性物質の総称であり、オキシダントの中から二酸化窒素を除いた物質が光化学オキシダント（以下「Ox」という。）と定義されている。Ox は強い酸化性を有するため、高濃度では眼・咽頭の粘膜へ刺激症状を引き起こし、その健康被害が懸念される。また、植物による二酸化炭素吸収を阻害することから、気候変動の観点からもその影響が懸念されている。

現在、本県における Ox の測定は、一般環境大気測定局 6 局（県測定 4 局、青森市測定 1 局、八戸市測定 1 局）で実施しているが、本稿では、主に県測定 4 局（図 1、表 1）での近年の状況や特徴について報告する。また、八甲田田茂范岳山頂（高度 1,324 m 地点）及び過去に東アジア酸性雨モニタリングネットワーク（EANET）の国内リモート地点として稼働していた旧国設竜飛酸性雨測定所での調査結果等についても併せて紹介する。

2. 青森県における Ox 測定の歩み

本県では、昭和 47 年 5 月より八戸市に測定局を 1 箇所設置し、そこでオキシダントの測定を開始した¹⁾。

また、環境大気を総合的に監視測定するため、大気汚染監視測定車「あおぞら」号を購入し、昭和 47 年 11 月から八戸市内で測定を開始し、昭和 48～49 年度には複数市において測定を実施した。

八戸市の測定局については、昭和 50 年度に 5

局、昭和 53 年度には 9 局と順次増やすとともに、六ヶ所村に 1 局を設置し、測定を開始した。

その後、昭和 62 年度から平成 9 年度にかけて 3 局（八戸市 2 局、六ヶ所村 1 局）、平成 10 年度から平成 12 年度にかけて 4 局（青森市 1 局、八戸市 2 局、六ヶ所村 1 局）に整理され、平成 13 年度以降は弘前市、むつ市、鯉ヶ沢町に測定局が追加され、現在は、県内 6 局で常時監視測定を行っている。

3. 過去 10 年間の基準達成状況

Ox の環境基準は 1 時間値が 0.06 ppm 以下とされているが（昭和 48 年 5 月設定）、全国 1,180 局の Ox 測定局のうち、令和 3 年度に環境基準を達成

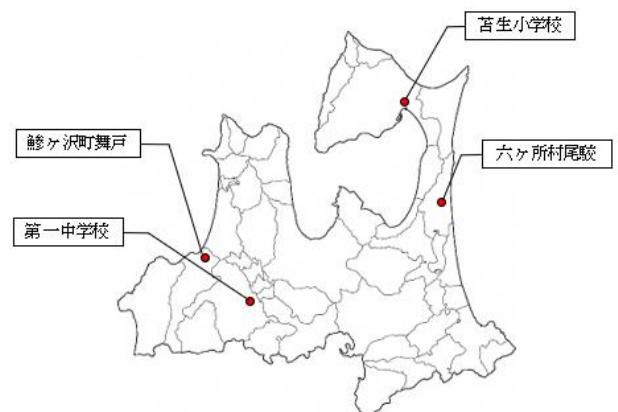


図 1 Ox 常時監視地点図（県 4 局）

表 1 地点の概要

市町村	地 点	緯度経度(世界測地系)		標高(m)	用途地域
		北緯	東経		
弘前市	第一中学校	40° 36' 31"	140° 28' 35"	30.0	住居専用
むつ市	苦生小学校	41° 17' 5"	141° 12' 28"	3.0	住居専用
鯉ヶ沢町	鯉ヶ沢町舞戸	40° 46' 58"	140° 14' 19"	12.0	未
六ヶ所村	六ヶ所村尾駈	40° 58' 7"	141° 22' 25"	6.0	住居専用

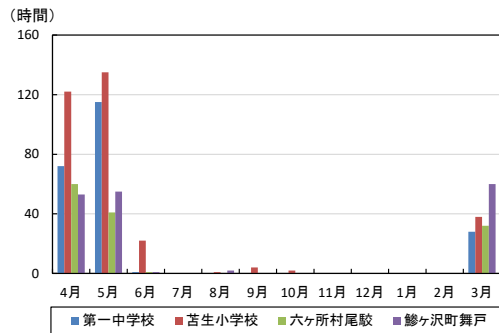


図2 基準超過時間数（令和4年度）

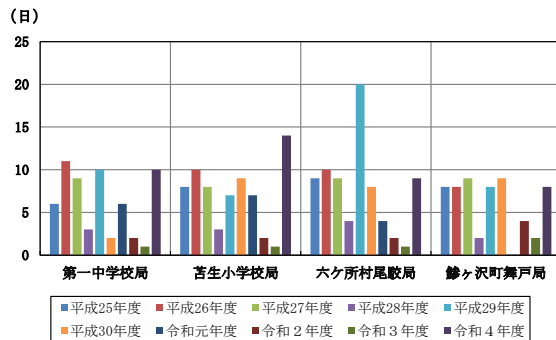


図3-1 基準超過日数（4月）

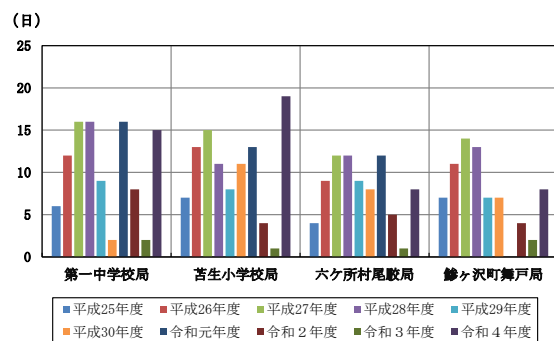


図3-2 基準超過日数（5月）

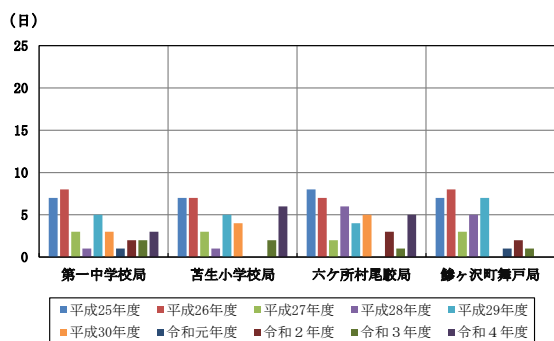


図3-3 基準超過日数（3月）

したのは一般環境大気測定局で2局と、全国的に環境基準を達成できない状況にあり²⁾、本県においても昭和54年度以降全局で環境基準を達成していない。

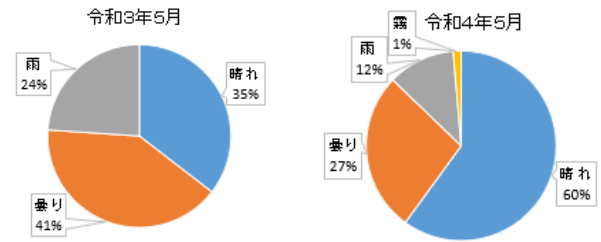


図4 天気概況割合（むつ観測所データ）

図2に令和4年度における県測定4局のOx濃度が環境基準（0.06 ppm以下）を超過した時間数を示す。4局ともに、超過時間数は3～5月の春季に多くなっている。

次に、春季（3～5月）について、平成25年度から令和4年度の過去10年間の環境基準を超過した日数を示す（図3）。3月と比較し総体的に4月、5月における超過時間数が多いが、年度によりばらつきも見られる。

4. オキシダント濃度と気象の関係

苫生小学校局について、令和3年5月と令和4年5月の基準超過日数はそれぞれ1日、19日であったが、令和3年5月と令和4年5月における1日毎の超過時間数と気象³⁾の一覧を示す（表2）。

Ox濃度は、日差しが強く、風が弱く、気温が高い気象条件時に高くなりやすく、特に日射量が多くなると高くなりやすいと言われている。当該比較において、気温や風速では大きな差は見られず、日照時間において明らかな差が見られた。特に、1日の日照時間が10時間以上の割合は、令和3年5月の22.6%に対し、令和4年5月は51.6%を占めていた（表3）。

また、天気概況の割合比較では、晴れの割合は令和3年5月の35%に対し令和4年5月は60%を占めており、その差が顕著であった（図4）。

5. 考察

5-1. 経年変化

渡部ら⁴⁾によると、平成19年度までは概ね八戸、六ヶ所地域の測定局の年最大値が他の地域より高かったが、平成20年度以降は、弘前、むつ地域の測定局の年最大値が他の地域の測定局より高くなっているとの報告がなされている。

昭和55年度から有効な年間データを有する六ヶ所村尾駁局について、過去43年間（昭和55年

表2 令和3年5月と令和4年5月の基準超過時間数と気象（むつ観測所）の比較

日	基準超過時間数(時間)		降水量(mm)		平均気温(℃)		平均湿度(%)		平均風速(m/s)		日照時間(h)	
	令和3年	令和4年	令和3年	令和4年	令和3年	令和4年	令和3年	令和4年	令和3年	令和4年	令和3年	令和4年
1	0	0	0	0.5	10.3	9	68	78	2.5	2.3	8.6	0
2	0	0	0	0.5	7	9.4	78	68	2.9	3.2	0.1	9.8
3	0	0	3	0	7.9	10.6	77	63	2.7	4.2	0.7	9.1
4	0	8	0	0	13.6	13.2	60	61	2.9	4.6	12.8	12.5
5	0	3	0	--	12.4	11.8	82	76	2.4	1.7	1.2	12.3
6	0	8	--	--	15.1	14.8	56	68	4	1.4	13.1	12.9
7	3	11	--	9.5	15.5	15.3	54	71	2.2	2.3	11.1	10.0
8	0	0	0	0	15.2	11.8	61	57	4	4	10.5	10.3
9	0	0	5	--	12.3	12.7	72	56	2.7	4.6	7.1	12.8
10	0	6	2.5	--	10.1	13.8	77	60	4.2	4.4	2.6	13.2
11	0	5	0.5	--	10.5	14.3	80	69	2.2	2	3.9	13.2
12	0	8	0	--	11	14.9	80	74	2.1	2.2	10.2	7.3
13	0	0	0.5	0	10.7	12.5	89	91	2.2	2.7	3.3	0
14	0	6	3.5	0	14.4	13.8	84	85	2	3.9	8.8	4.3
15	0	2	--	0.5	15.2	12.1	67	74	2.2	3.3	13.3	2.7
16	0	7	8	--	15.5	12.9	83	67	2.1	2.7	0.2	13.2
17	0	5	31.5	--	16.3	13.1	95	68	2.6	1.7	0.4	10.6
18	0	9	0.5	--	15.3	13.4	83	71	2.3	2.2	8.5	13.3
19	0	3	0	1.5	14.3	12.5	90	84	2.1	1.3	0.8	3.5
20	0	12	--	--	15.9	14.4	82	81	2	2	7.6	6.6
21	0	16	28	0	13.1	16.5	96	70	2.1	1.5	0.0	10.6
22	0	6	4.5	6.5	13.1	15.7	92	85	2.5	1.7	0.0	1.3
23	0	6	1.5	--	14.1	15.3	90	81	2.2	2	1.3	4.7
24	0	10	0	--	15.4	16.4	86	77	2.5	2.5	2.3	12.4
25	0	4	4	--	15.4	18.7	80	72	3.7	2.1	9.2	13
26	0	0	--	--	15.4	14.6	60	89	4.6	3	13.4	8.8
27	0	0	4	25	14.4	14.4	78	98	2.4	2.2	3.1	0
28	0	0	12	3	13.5	15	90	82	2.9	3.1	1.9	4
29	0	0	6	--	15.2	16.8	87	71	2.9	3	2.0	13
30	0	0	0	--	14.5	13	76	77	3.7	2.6	1.9	14
31	0	0	--	16.5	13.2	11.2	71	96	2.5	3.2	9.5	0
	3	135	115.0	63.5	13.4	13.6	78.2	74.8	2.7	2.7	5.5	8.2
	1ヶ月の累計値				1ヶ月の平均値							

表3 令和3年5月と令和4年5月の日照時間ランク別割合の比較

日照時間		0～0.9	1～1.9	2～2.9	3～3.9	4～4.9	5～5.9	6～6.9	7～7.9	8～8.9	9～9.9	10以上
令和3年	日数	7	4	3	3	0	0	0	2	3	2	7
	%	22.6	12.9	9.7	9.7	0	0	0	6.5	9.7	6.5	22.6
令和4年	日数	4	1	1	1	3	0	1	1	1	2	16
	%	12.9	3.2	3.2	3.2	9.7	0	3.2	3.2	3.2	6.5	51.6

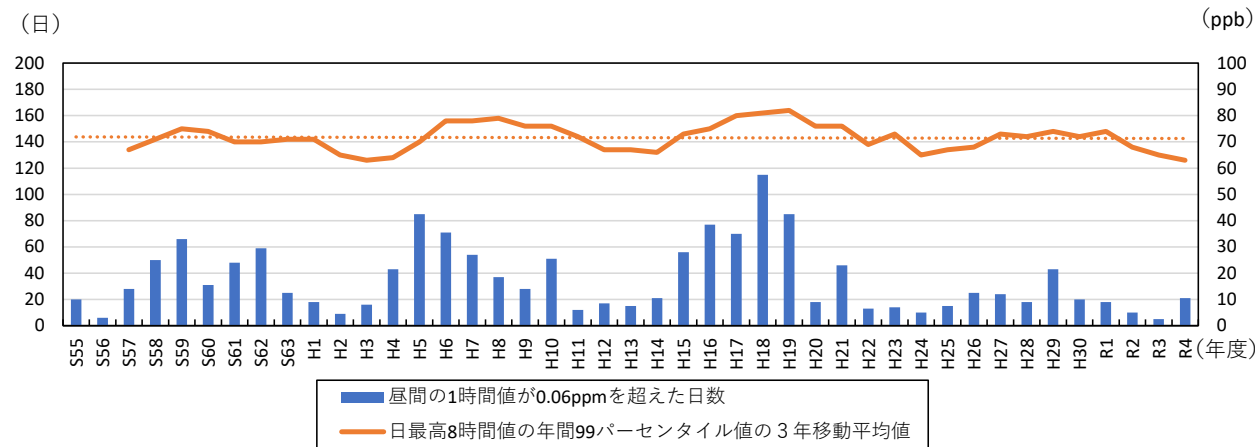


図5 六ヶ所村尾駁局における推移（1）

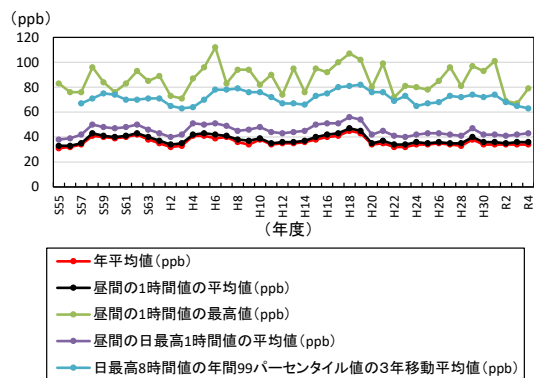


図 6 六ヶ所村尾駁局における推移 (2)

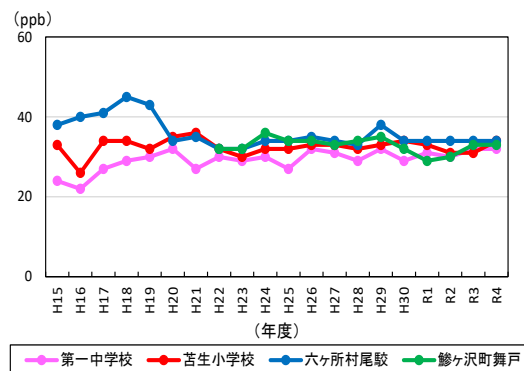


図 7 過去 20 年間の年平均値の推移

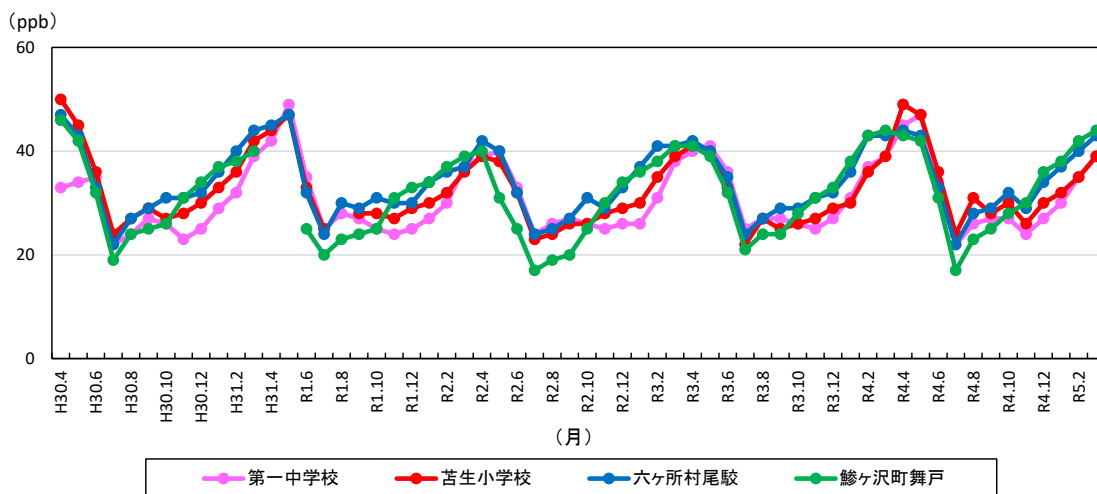


図 8 月平均値の 5 年間の推移 (平成 30 年 4 月～令和 5 年 3 月)

度～令和 4 年度) の O_3 濃度の日最高 8 時間値の年間 99 パーセンタイル値の 3 年移動平均値及び昼間の 1 時間値が 0.06 ppm を超えた日数の推移を図 5 に示す。3 年間の移動平均により変動の少ない経年的な濃度傾向を把握することができる。移動平均値は年度により上下しているものの、平成 20 年度以降は年度間の振幅は減少し、概ね一定のレベルで推移している。このことは、昼間の 1 時間値が 0.06 ppm を超えた日数について、年度によりばらつきが見られるものの平成 20 年度以降の超過日数がそれ以前の超過日数と比較し減少したと概ね一致している。

図 6 に六ヶ所村尾駁局における O_3 濃度の年平均値、昼間の 1 時間値の平均値、昼間の 1 時間値の最高値、昼間の日最高 1 時間値の平均値及び日最高 8 時間値の年間 99 パーセンタイル値の 3 年移動平均値の推移を示す。

本県では、大気汚染の緊急事態に備えるため、平成 20 年 5 月に「青森県大気汚染緊急時対策要綱」を制定し、その中で、オキシダント注意報の

発令基準を 0.12 ppm と設定している。これまで発令基準に達したことはないが、年によっては基準に迫る O_3 濃度が観測されている。

次に、県測定 4 局における過去 20 年間 (平成 15 年度～令和 4 年度) の年平均値の推移を図 7 に示す。なお、平成 22 年 2 月より測定を開始した鰺ヶ沢町舞戸局については、平成 22 年度より対象とした。平成 19 年度までは 3 局間に差がみられていたが、平成 20 年度以降は地点間の差が減少し、また年平均値の変化も緩やかになり、近年はほぼ横ばいの状況である。

5-2. 季節的特徴

図 8 に、平成 30 年 4 月から令和 5 年 3 月までの県 4 局の O_3 濃度月平均値の変化を示す。概して 4 局ともに 3～5 月に O_3 濃度が高くなる傾向がみられた。

梅原らによると、北国における春のオキシダント高濃度現象は、移動性高気圧との関連が極めて高く、成層圏オゾンの沈降現象であると考察している⁵⁻⁶⁾。

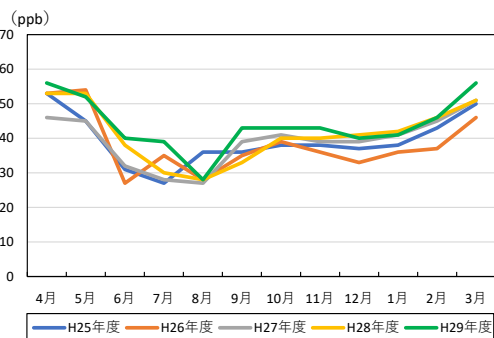


図9 旧国設竜飛酸性雨測定所における年度別経月変化

平成 15～17 年度の 3 年間にわたり、全国環境研協議会北海道・東北支部酸性雨調査研究専門部会は、共同調査として小川式パッシブサンプラー法によりオゾンを含めた乾性沈着濃度調査を行い、調査結果について濃度分布及び乾性沈着量評価などの解析を分担し取りまとめている⁷⁾。本県においては雲谷（森林）及び名川（農地）の 2 地点で参加した⁸⁻⁹⁾。その報告の中で、土地用途区分問わず、全域において春季に高く夏季に低い一山型の類似した経月変化を示した。

大気汚染防止法に基づく常時監視地点の多くは都市部に配置されており、本県においても都市部を中心に Ox 濃度の常時監視を行ってきたが、他に、国設竜飛酸性雨測定所（外ヶ浜町）が平成 6 年度から平成 30 年度まで東アジア酸性雨モニタリングネットワーク（EANET）の国内モニタリング地点として稼働していた。竜飛崎は津軽半島北端に位置し、対岸の北海道白神岬とは津軽海峡を挟んで 19 km ほどの距離にあり、年間平均風速 10 m/s の風が吹き付ける。固定発生源や移動発生源の汚染の影響が少ない測定局として位置づけられ、平成 11 年 5 月より大気汚染自動測定機により大気汚染物質についても測定された。

図 9 に、旧国設竜飛酸性雨測定所における平成 25 年度から平成 29 年度までの Ox 濃度月平均値の変化を年度別に示す¹⁰⁾。

県の一般環境大気測定局 4 局同様、3～5 月に Ox 濃度が高くなる傾向がみられた。

昭和 58～60 年に八甲田山の高度 1,324 m の地点で O₃（及び Ox）濃度の連続測定を行った結果によると、春に高く、夏から冬にかけて最低となる季節変化を示していた¹¹⁻¹²⁾。

5-3. 日内変化

県 4 局における Ox 濃度の令和 4 年度年間平均日内変化を図 10 に示す。年間平均としてはいずれの局も日中に濃度が高くなり、夜間に低くなる日内変化を示した。これは、日中に光化学反応に

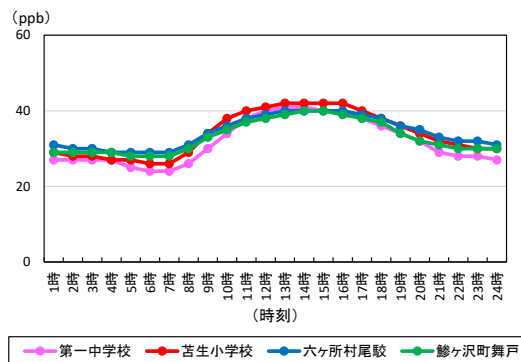


図10 平均日内変化（令和4年度）

よる Ox 生成が活発となることが原因の一つと考えられる。

次に、上記の傾向について季節により変化に差異がみられるかの確認のため、『春』『夏』『秋』『冬』の 4 区分による考察を行った。なお、特に断りがない場合、季節区分を春（3～5 月）、夏（6～8 月）、秋（9～11 月）、冬（12～2 月）とした。

図 11 に季節毎の局別平均日内変化を示す。『春』『夏』『秋』においては、4 局ともに日中に濃度が高くなり、夜間に低くなる一山型の変動パターンを示したが、『冬』においては六ヶ所村尾駁局及び鰯ヶ沢町舞戸局については朝方から比較的濃度が高く、日内変化が小さい平坦型を示し、第一中学校局と苫生小学校局については、朝 6～9 時の時間帯に濃度が落ち込み、緩やかに日中上昇し夜間に緩やかに低下する低濃度型を示した。

また、『冬』では『春』『夏』『秋』に比べて濃度の変動が小さかった。

次に、図 12 に平成 30 年 3 月から令和 5 年 2 月までの 5 年間にわたる局毎の季節別平均日内変化を示す。4 局ともに『春』に濃度が上昇することは共通しているが、季節別の日内変化は、第一中学校局と苫生小学校局との間で類似しており、この 2 局の『冬』においては、朝 6～9 時の時間帯に濃度が落ち込み、日中は緩やかに上昇し、夜間に緩やかに低下する低濃度型であった。これに対し、六ヶ所村尾駁局では朝方からやや濃度が高く日内変化も緩やかになり、更に鰯ヶ沢町舞戸局では日内変化がより緩やかになり明確な平坦型を示した。

第一中学校局と苫生小学校局は都市域に分類されるが、六ヶ所村尾駁局と鰯ヶ沢町舞戸局はその 2 局と比較し、自動車や工場・事業場などの汚染物質の発生源が少ないことから、人為的発生源の影響を受けにくい地点であるといえる。

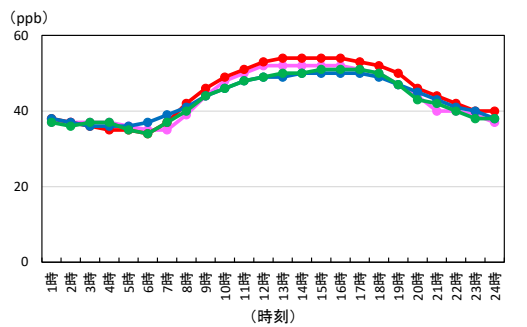


図 11—1 平均日内変化 (令和4年3～5月)

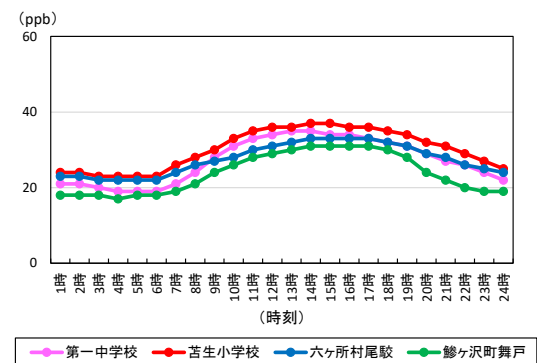


図 11—2 平均日内変化 (令和4年6～8月)

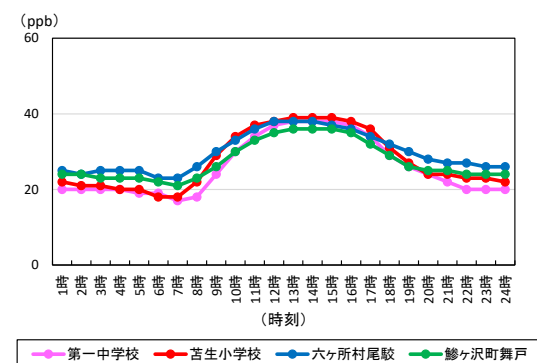


図 11—3 平均日内変化 (令和4年9～11月)

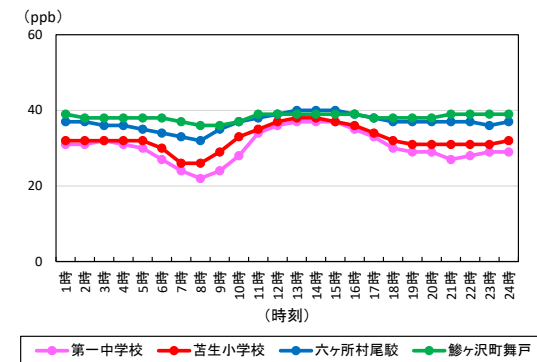


図 11—4 平均日内変化 (令和4年12～令和5年2月)

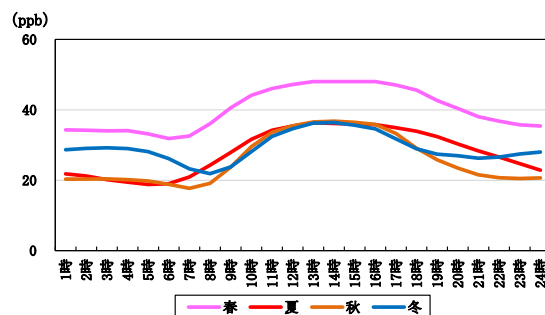


図 12—1 平成30年3月～令和5年2月における平均日内変化 (第一中学校)

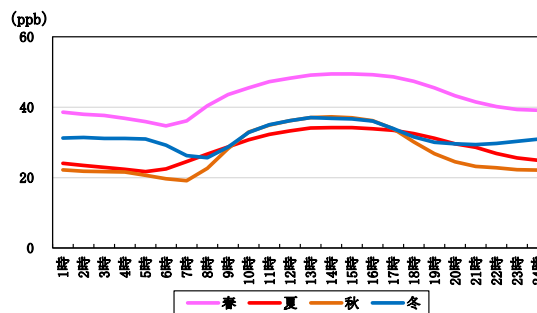


図 12—2 平成30年3月～令和5年2月における平均日内変化 (苫生小学校)

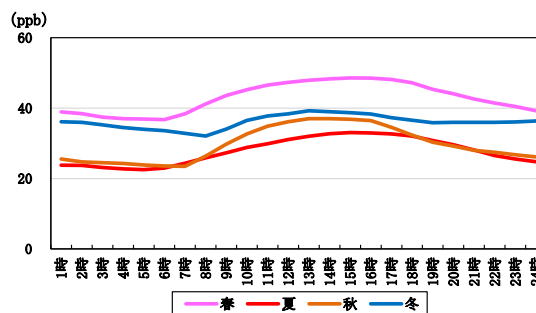


図 12—3 平成30年3月～令和5年2月における平均日内変化 (六ヶ所村尾駁)

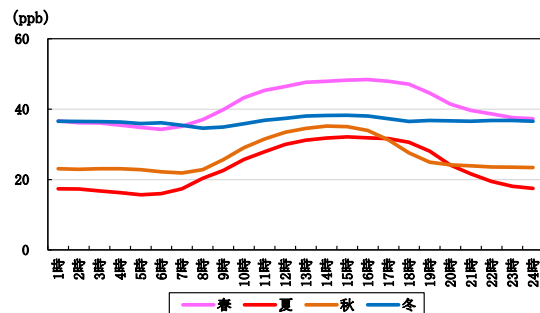


図 12—4 平成30年3月～令和5年2月における平均日内変化 (鰺ヶ沢町舞戸)

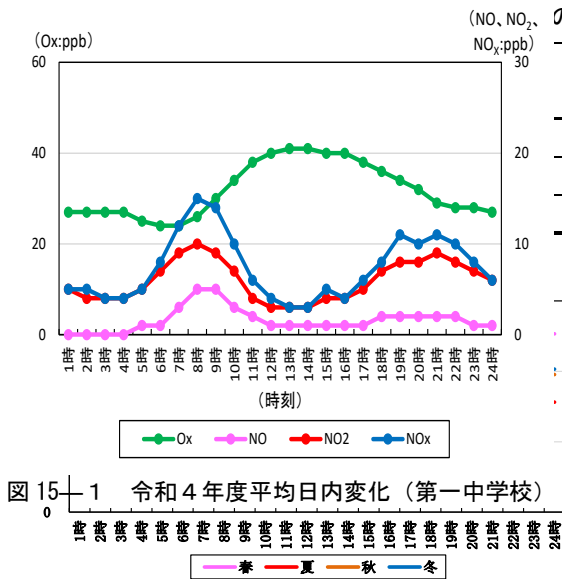


図 13 平成 25 年 3 月～平成 30 年 2 月における
平均日内変化 (旧国設竜飛酸性雨測定所)

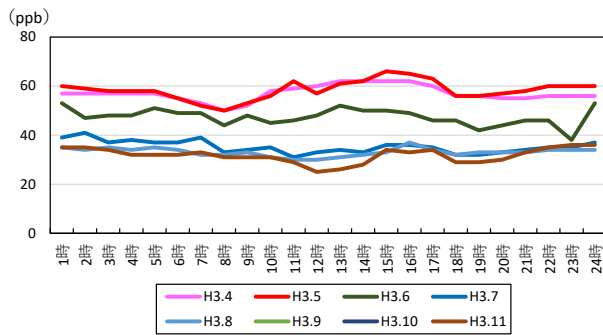


図 14 月別平均日内変化 (八甲田田茂范岳山頂)

朝 6～9 時の時間帯は、都市域では自動車をはじめとする移動発生源等からの一酸化窒素 (NO) の排出量が増加し、図 11-4 に示すとおり、都市域に分類される第一中学校局と苦生小学校局では Ox が NO と反応して NO₂ となり Ox 濃度を減少させていると示唆された。なお、ピークが減少する時間帯において、苦生小学校局よりも第一中学校局が更に低い濃度で推移しているが、このことは後述の図 15 において NO の濃度帯が第一中学校局が苦生小学校局と比較し、より高いことから説明できる。

また、全局の『春』『夏』『秋』及び第一中学校局、苦生小学校局の『冬』において、O_x濃度が日中に上昇することが確認されたが、このことは局所的に存在する O_x の前駆物質が光化学反応により O_x を生成すると考えられた。

の相関係数 ※カッコ内はデータ数

夏	秋	冬
(R4.6-8)	(R4.9-11)	(R4.12- 5.2)
−0.213 (2032)	− 0.488 (2117)	− 0.75 (2116)
−0.29 (2193)	− 0.405 (2136)	− 0.714 (2129)
−0.301 (2194)	− 0.471 (2134)	− 0.583 (2130)

図 13 に、平成 25 年 3 月から平成 30 年 2 月までの 5 年間に於ける国設竜飛酸性雨測定所の季節別平均日内変化を示す¹³⁾。『春』に濃度が上昇し、夏に低下することは県内 4 局における過去 5 年間の状況と同様であるが、『春』『夏』『秋』『冬』問わず、日内変化の小さい平坦型を示した。

また、八甲田田茂范岳山頂 (山間部 バックグラウンド) において、昭和 58 年から 62 年にかけて、国立公害研究所 (現国立研究開発法人国立環境研究所) との共同研究を行った¹⁴⁾。それによると、八甲田山のオゾン濃度は、昼間が夜間より低くなる日内変化パターンを示すと報告されている。

八甲田に関し、冬期間を除く平成 3 年 4～11 月のモニタリングデータが残っている。図 14 に平成 3 年 4 月から 11 月に観測した月別平均日内変化を示す。旧国設竜飛酸性雨測定所同様、どの月においても日内変化の小さい平坦型を示した。

光化学オキシダントは、大気中の窒素酸化物や非メタン炭化水素 (NMHC) が太陽光 (紫外線) を受けて、光化学反応により生成される二次的汚染物質であり、日内変化は地域的に存在する原因物質が関与する昼間の生成反応と夜間の消失反応により増減することから窒素酸化物等の発生源がある地域と発生源がない地域では傾向が異なると言われている。また、NO_x の濃度低下によって O₃ が NO との反応で消費される現象が進行しにくい。

第一中学校局、苦生小学校局及び六ヶ所村尾駁局について、令和 4 年度におけるオキシダントと窒素酸化物の日内変化をグラフ化した (図 15)。O_x が朝 6～9 時の時間帯に濃度が落ち込み、日中上昇し夜間に緩やかに低下するのに対し、窒素酸化物は逆に上昇する傾向があり、第一中学校局及び苦生小学校局については両者は明確な負の相関を示した。

表 4 に O_x と NO_x 間の相関係数を示す。通年ではやや負の相関関係がみられたが、『冬』においては第一中学校局と苦生小学校局で強い負の相関関係がみられた。

6. まとめ

県内の O_x 濃度データについて整理した結果、以下の知見が得られた。

(1) 年平均値の推移については平成 20 年度以降は地点間の差は小さく、また横ばいである。

(2) 県内全域において、春季に高く夏季に低い一山型の類似した経月変化を示した。

(3) 季節別の日内変化は、第一中学校局と苫生小学校局との間で似通った変動パターンを示した。

(4) 『冬』において、第一中学校局と苫生小学校局では朝 6～9 時の時間帯に濃度が落ち込み、緩やかに日中上昇し夜間に緩やかに低下する低濃度型の変動パターンであったが、六ヶ所村尾駮局と鰺ヶ沢町舞戸局では朝方からやや濃度が高く日内変化も緩やかになり、更に鰺ヶ沢町舞戸局では日

(6) 『冬』においては第一中学校局と苫生小学校局では O_x と NO_x 間に強い負の相関関係がみられた。

7. おわりに

本県では平成 20 年 5 月の青森県大気汚染緊急時対策要綱の制定以降、これまで緊急時の注意報発令基準である 0.12 ppm に達したことはないものの、今後の光化学オキシダント対策を推進していく上で、 O_x の前駆物質である NO_x 、揮発性有機化合物 (VOC)、NMHC 及び気象との関連性等を更に考察し、変動要因や高濃度要因を詳細に解明していくことが必要と考える。

文 献

- 1) 青森県：公害白書(昭和 48 年版)
- 2) 環境省：報道発表資料「令和 3 年度大気汚染状況について」2023 年 3 月 30 日,
- 3) 気象庁：『過去の気象データ検索』
<https://www.data.jma.go.jp/stats/etrn/index.php>
- 4) 渡部陽一他：大気汚染常時監視測定項目の経年変化について．青森県環境保健センター研究報告, 23,23-26,2012
- 5) 早狩 進：北国におけるオキシダント濃度の特性．青森県公害センター所報, 6,1-6,1983
- 6) 梅原 茂他：北国におけるオキシダント濃度の特性(2)．青森県公害センター所報, 7,21-26,1985
- 7) 全国環境研協議会北海道・東北支部 酸性雨調査研究専門部会：『北海道・東北におけるガス状酸性化成分等の濃度分布調査 3 年間のまとめ』(平成 20 年 3 月)
- 8) 対馬典子他：パッシブサンプラー法による SO_2 、 O_3 濃度調査結果．青森県環境保健センター研究報告, 20,41-45,2009
- 9) 工藤香織他：パッシブサンプラー法による環境大気中ガス状酸性化成分等濃度調査結果．青森県環境保健センター研究報告, 22,60-63,2011
- 10) 『Data Report, EANET Acid Deposition Monitoring Network in East Asia』
<https://monitoring.eanet.asia/document/public/index>
- 11) 財団法人 日本気象協会：昭和 60 年度 環境庁委託業務結果報告書「オゾンのバックグラウンド濃度解析調査」(昭和 61 年 3 月)

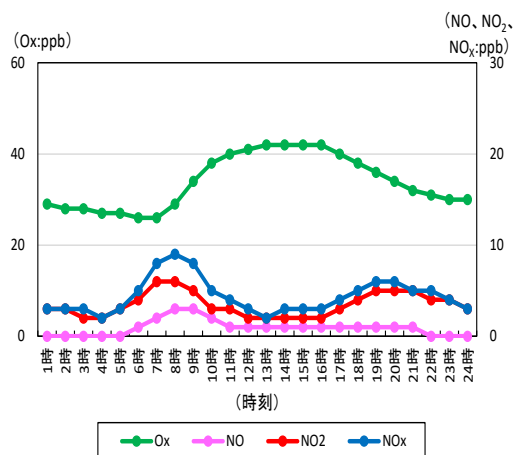


図 15—2 令和 4 年度平均日内変化(苫生小学校)

内変化がより緩やかになり明確な平坦型を示した。

(5) 気象要因については、気温、風速などの気象

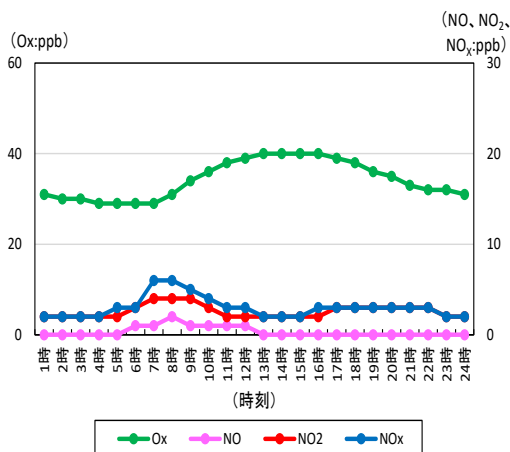


図 15—3 令和 4 年度平均日内変化(六ヶ所村尾駮)

要因と比較し、ことに日射量が大きくなると光化学オキシダントの濃度が高くなりやすいことが示唆された。

12) 財団法人 日本気象協会 : 昭和 61 年度 環境庁
委託業務結果報告書「オゾンのバックグラウンド
濃度解析調査」(昭和 62 年 3 月)

13) 『Download, EANET Acid Deposition Monitoring
Network in East Asia』

<https://monitoring.eanet.asia/document/signin>

14) 早狩 進他 : 八甲田山におけるバックグラウ
ンドオゾンの挙動. 国立公害研究所研究報
告,23,121-143,1989

弘前市における有害大気汚染物質等モニタリング調査結果について

内海宣俊 対馬典子 北畠 茂¹ 菅尾聡也¹

有害大気汚染物質等モニタリング調査地点である第一中学校局(弘前市)における有害大気汚染物質(優先取組物質)の大気中濃度の①季節変動、②経年変化及び③各項目間の類似性を把握することを目的として、平成29年度から令和4年度までの調査結果について集計及び解析を行った。その結果、①については「トルエン」等のいくつかの調査項目で明瞭な季節変動がみられ、②については環境基準値等が設定されている15項目すべてにおいて環境基準等を達成していたほか、各項目とも減少傾向または横ばいであった。③については、クラスター解析や各項目の濃度と風向頻度との相関を解析した結果、「トルエン」、「1,3-ブタジエン」、「ベンゼン」及び「ベンゾ[a]ピレン」の4項目において類似性が高く、これらは同一の発生源(例えば自動車排出ガス)からの影響を強く受けている可能性が高いことが示唆された。

Key words : hazardous air pollutants monitoring , Correlation, Cluster analysis, Wind direction frequency

1. はじめに

低濃度であるが長期暴露によって人の健康を損なうおそれのある「ベンゼン」や「トリクロロエチレン」等の有害大気汚染物質への対策が平成8年5月の大気汚染防止法の改正により制度化され、本県では平成9年10月から青森市及び八戸市各2地点で有害大気汚染物質モニタリング調査(以下「モニタリング調査」という。)を開始した。その後、両市の中核市移行に伴い、両市におけるモニタリング調査の実施主体は各市へ移行されたことから、県では新たに平成29年4月から弘前市1地点でモニタリング調査を開始した。

本県におけるモニタリング調査に係る集計・解析結果については、これまでに対馬や花石ら^{1,2)}によって報告されているが、弘前市におけるモニタリング調査については平成29年度の調査結果を除き報告されていないことから、今回これまでに得られたデータの集計及び解析を行った。その結果、物質間の相関や風向との相関について一定の知見が得られたので報告する。

2. 調査概要

2.1 調査地点

図1に弘前市の調査地点である第一中学校局の位置を示す。

当該地点におけるモニタリング調査の区分は

一般環境、用途地域は住居地域となっている。

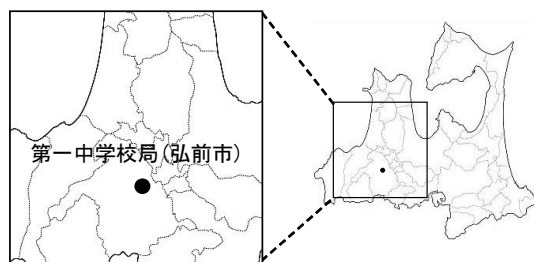


図1 調査地点

2.2 調査方法

モニタリング調査は、「大気汚染防止法第22条の規定に基づく大気汚染の状況の常時監視に関する事務の処理基準」³⁾及び「有害大気汚染物質測定方法マニュアル」⁴⁾に準拠して行った。

2.3 調査項目

調査項目を表1に示す。本県では、中央環境審議会大気環境部会「今後の有害大気汚染物質対策のあり方について(第九次答申)」においてリストアップされた優先取組物質23項目のうち、ダイオキシン類を除き、「六価クロム化合物」と「クロム及び三価クロム化合物」を合わせて「クロム及びその化合物」とした計21項目を対象としている。モニタリング調査は月1回、24時間連続採取により実施しており、21項目のうち8項目を県が分析し、

残り13項目の分析を外部機関に委託している。

表1 調査項目

調査項目	環境基準値等		分析機関
アクリロニトリル	2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	指針値	委託業者
塩化ビニルモノマー	10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	指針値	
塩化メチル	94 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	指針値	
クロロホルム	18 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	指針値	
1,2-ジクロロエタン	1.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	指針値	
ジクロロメタン	150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	環境基準値	
テトラクロロエチレン	200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	環境基準値	
トリクロロエチレン	130 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	環境基準値	
トルエン	-	-	
1,3-ブタジエン	2.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	指針値	
ベンゼン	3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	環境基準値	
酸化エチレン	-	-	
水銀及びその化合物	40 ngHg/m^3	指針値	
アセトアルデヒド	120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	指針値	県
ホルムアルデヒド	-	-	
ベンゾ[a]ピレン	-	-	
クロム及びその化合物	-	-	
ニッケル化合物	25 ngNi/m^3	指針値	
ヒ素及びその化合物	6 ngAs/m^3	指針値	
ベリリウム及びその化合物	-	-	
マンガン及びその化合物	140 ngMn/m^3	指針値	

3. 解析

平成29年度から令和4年度までの6年間における優先取組物質の各項目の測定データから各項目間の相関解析、クラスター解析及び各項目と風向頻度との相関解析を行った。

4. 結果と考察

4.1 各項目の月別推移と経年変化

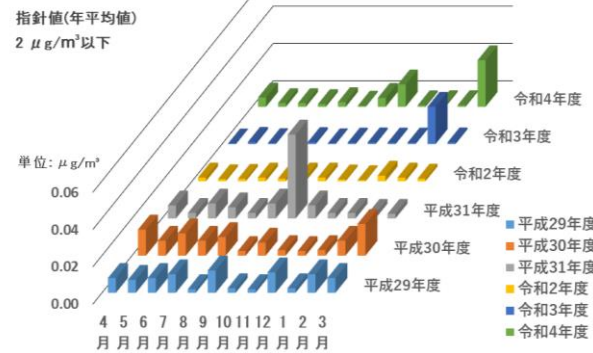
調査した優先取組物質21項目の月別推移を図2に示す。各項目の季節変動に着目すると、「トルエン」、「1,3-ブタジエン」、「ベンゼン」及び「ベンゾ[a]ピレン」については、夏季である6月から9月にかけて濃度が低く、冬季である11月から3月にかけて濃度が上昇する傾向がみられた。これらの物質は、自動車排出ガス等が主な発生源^{5,6)}である揮発性有機化合物（VOC）とされているが、光化学反応により分解されることが知られており⁷⁾、夏季は日射量が多くなるため各項目の濃度が低くなったと考えられる。冬季については、①発生源

である自動車が低気温を原因とした燃費の悪化⁸⁾によってガソリン等の消費量が増加したり、暖房器具の使用により灯油等の消費量が増加することに加え、②冬は大気構造が安定化しやすく拡散が起りにくい時期⁹⁾であるため、各項目の濃度が高い傾向となったと考えられた。

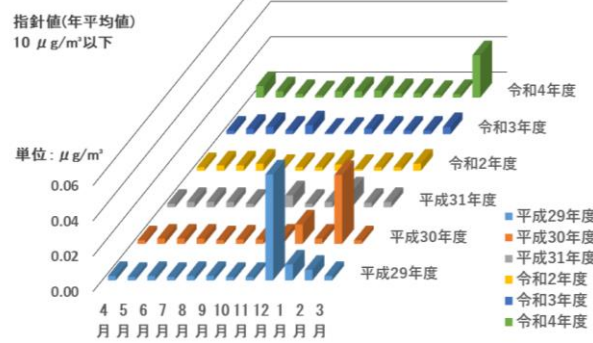
「アセトアルデヒド」及び「ホルムアルデヒド」については、夏季から秋季にかけて濃度が上昇する傾向がみられた。これらは光化学反応により二次生成されるため、夏季の日射量増加により二次生成が促進され、濃度が上昇したと考えられた。

「ニッケル化合物」等の重金属類については、春季である3月から5月にかけて濃度が上昇する傾向にあり、特に平成29年5月及び令和元年5月は顕著な濃度上昇が見られた。3月から5月は黄砂が日本に多く飛来する季節で粉じん量が多い時期である。黄砂は中国内陸部のタクラマカン砂漠等の土壌・鉱物粒子が偏西風とともに飛来するもの¹⁰⁾であり、粒子に含まれる「マンガン」等の重金属類が濃度上昇に影響していると考えられた。

アクリロニトリル

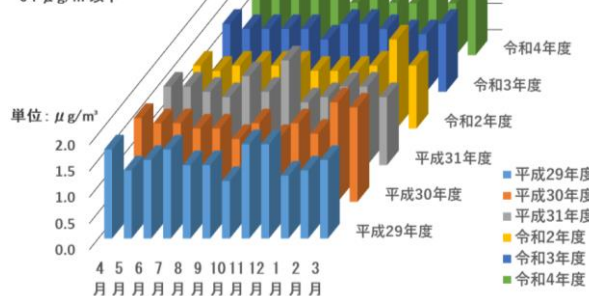


塩化ビニルモノマー



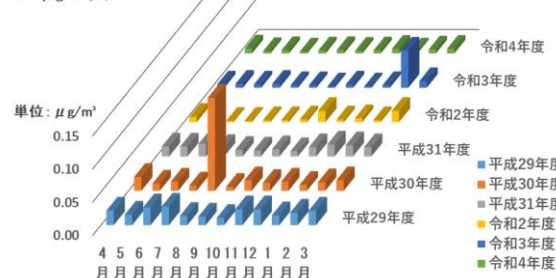
塩化メチル

指針値(年平均値)
94 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下



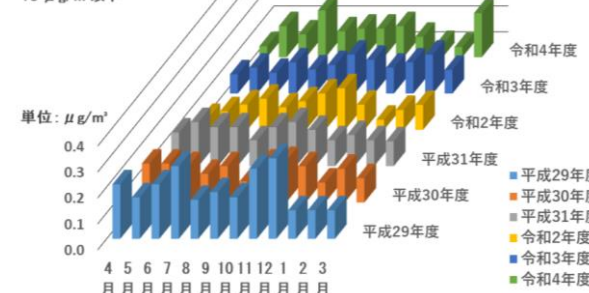
テトラクロロエチレン

環境基準値(年平均値)
200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下



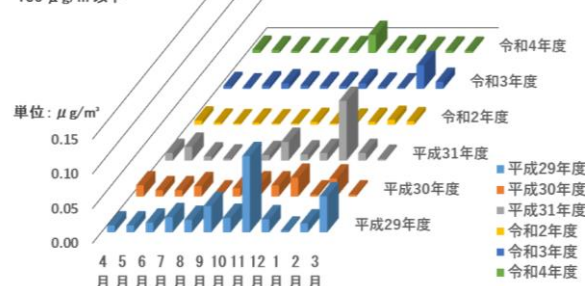
クロロホルム

指針値(年平均値)
18 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下



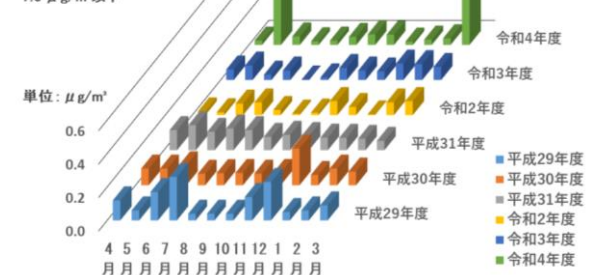
トリクロロエチレン

環境基準値(年平均値)
130 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下

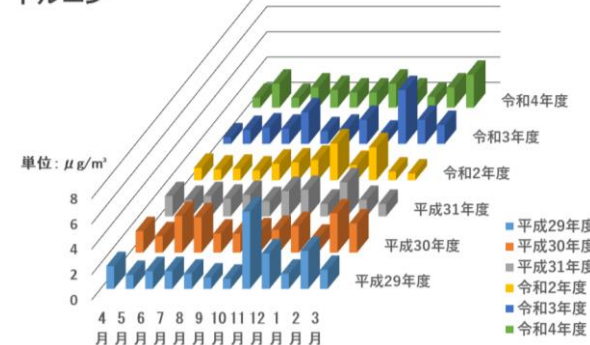


1,2-ジクロロエタン

指針値(年平均値)
1.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下

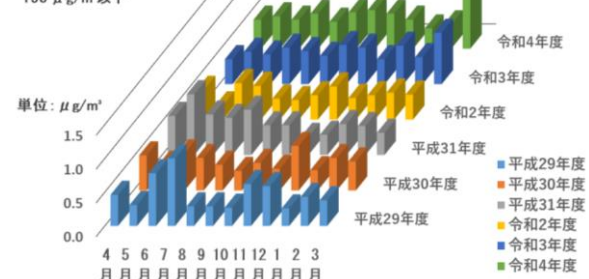


トルエン



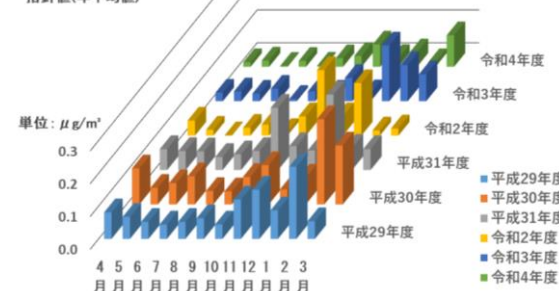
ジクロロメタン

環境基準値(年平均値)
150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下



1,3-ブタジエン

指針値(年平均値)



ベンゼン

環境基準値(年平均値)
3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下

単位: $\mu\text{g}/\text{m}^3$



ベンゾ[a]ピレン

単位: ng/m^3



酸化エチレン

単位: $\mu\text{g}/\text{m}^3$



ニッケル化合物

指針値(年平均値)
25 ng/m^3 以下

単位: ng/m^3



水銀及びその化合物

指針値(年平均値)
40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下

単位: ng/m^3



ヒ素及びその化合物

指針値(年平均値)
6 ng/m^3 以下

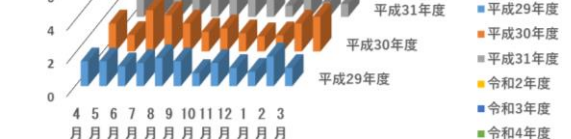
単位: ng/m^3



アセトアルデヒド

指針値(年平均値)
120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下

単位: $\mu\text{g}/\text{m}^3$



ベリリウム及びその化合物

単位: ng/m^3

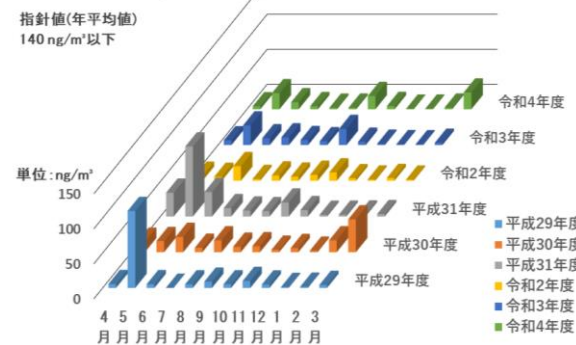


ホルムアルデヒド

単位: $\mu\text{g}/\text{m}^3$



マンガン及びその化合物



クロム及びその化合物

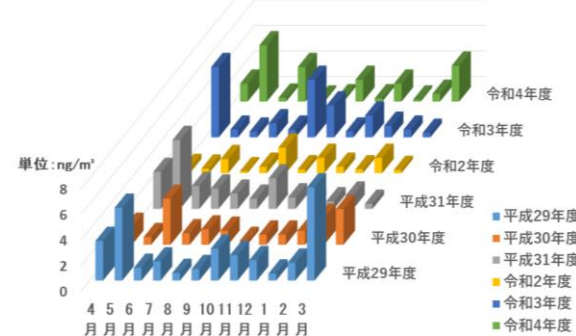
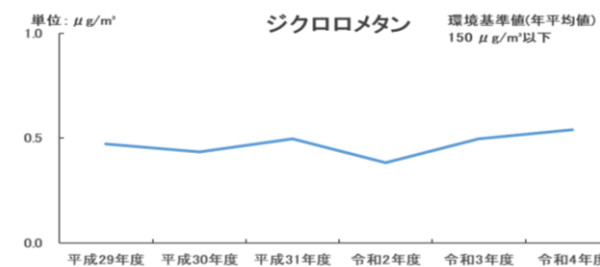
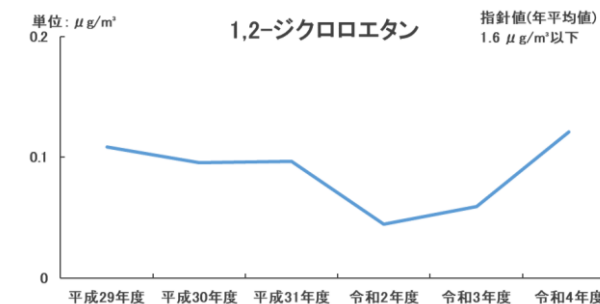
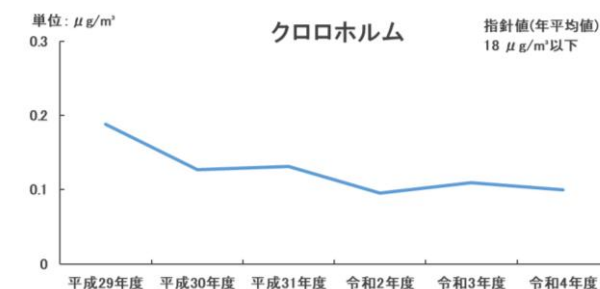
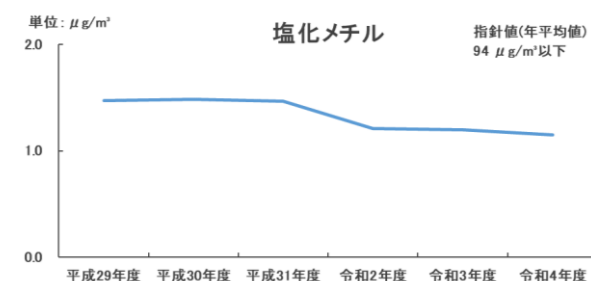
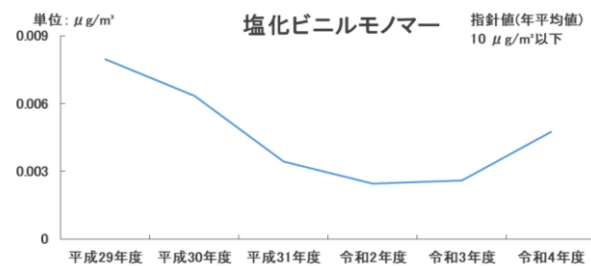
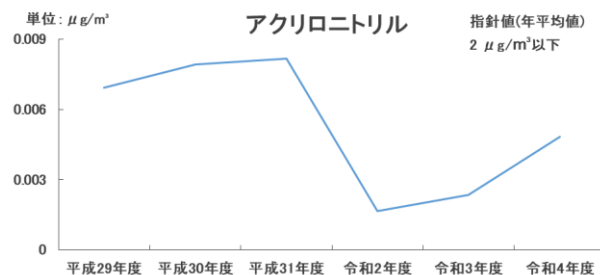


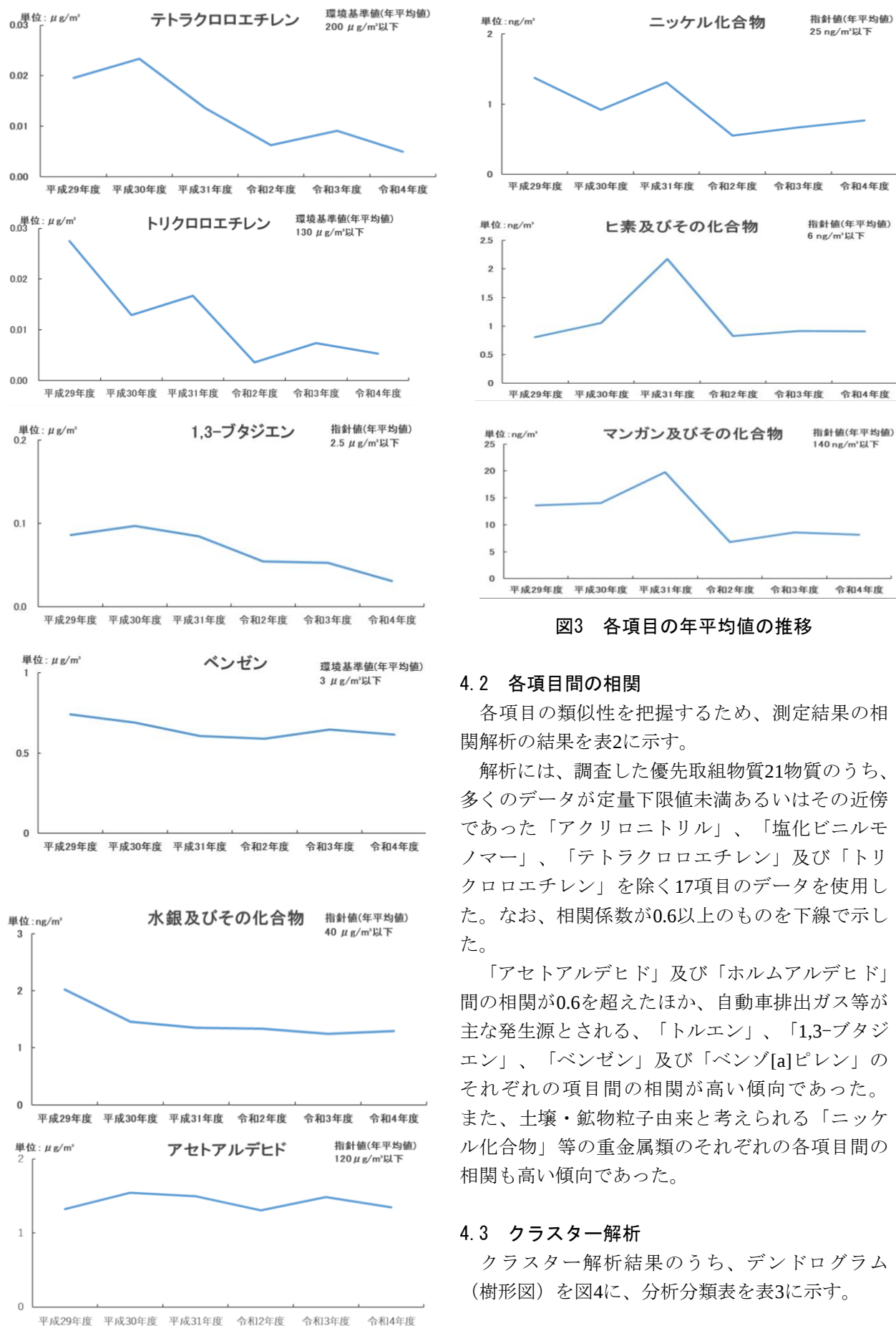
図2 各項目の月別推移

次に、調査した優先取組物質21項目のうち環境基準値等が設定されている15項目の年平均値の推移を図3に示す。年平均値は各年度12回の測定結果の算術平均であり、測定値が検出下限値未満の場合は検出下限値の1/2の値を用い、検出下限値以上で定量下限値未満の場合は当該測定値を用いた。

平成29年度から令和4年度においては、調査した優先取組物質のうち、環境基準値が設定されている項目について全て環境基準を達成していた。

調査期間中の経年変化が減少傾向であった項目は、「塩化メチル」、「クロロホルム」、「テトラクロロエチレン」、「トリクロロエチレン」、「水銀及びその化合物」、「マンガン及びその化合物」であり、その他の項目については概ね横ばいであった。環境省が毎年公表する「有害汚染物質等に係る常時監視結果」¹¹⁾においても、全国的に同様の傾向がみられており、各項目の濃度低減が着実に進んでいることが示唆された。





4.2 各項目間の相関

各項目の類似性を把握するため、測定結果の相関解析の結果を表2に示す。

解析には、調査した優先取組物質21物質のうち、多くのデータが定量下限値未満あるいはその近傍であった「アクリロニトリル」、「塩化ビニルモノマー」、「テトラクロロエチレン」及び「トリクロロエチレン」を除く17項目のデータを使用した。なお、相関係数が0.6以上のものを下線で示した。

「アセトアルデヒド」及び「ホルムアルデヒド」間の相関が0.6を超えたほか、自動車排出ガス等が主な発生源とされる、「トルエン」、「1,3-ブタジエン」、「ベンゼン」及び「ベンゾ[a]ピレン」のそれぞれの項目間の相関が高い傾向であった。また、土壌・鉱物粒子由来と考えられる「ニッケル化合物」等の重金属類のそれぞれの各項目間の相関も高い傾向であった。

4.3 クラスター解析

クラスター解析結果のうち、デンドログラム（樹形図）を図4に、分析分類表を表3に示す。

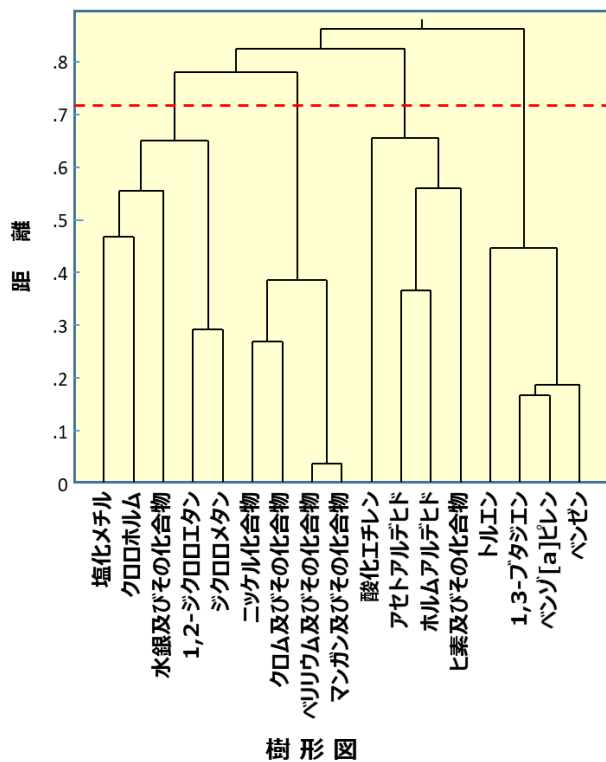


図4 クラスタ解析樹形図

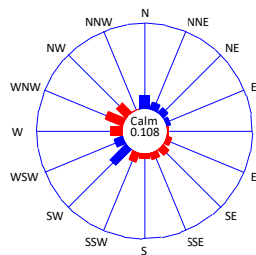
表3 クラスタ解析分類表

第1クラスター	第2クラスター
塩化メチル	ニッケル化合物
クロロホルム	ベリリウム及びその化合物
1,2-ジクロロエタン	マンガン及びその化合物
ジクロロメタン	クロム及びその化合物
水銀及びその化合物	
第3クラスター	第4クラスター
酸化エチレン	トルエン
アセトアルデヒド	1,3-ブタジエン
ホルムアルデヒド	ベンゼン
ヒ素及びその化合物	ベンゾ[a]ピレン

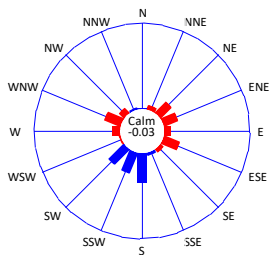
表2 測定項目間の相関関係

	塩化 メチル	クロロ ホルム	1,2- ジクロロ エタン	ジクロロ メタン	トルエン	1,3- ブタジエン	ベンゼン	酸化 エチレン	水銀及び その化合物	アセト アルデヒド	ホルム アルデヒド	ベンゾ [a]ピレン	ニッケル 化合物	ヒ素及び その化合物	ベリリウム 及びその 化合物	マンガン 及びその 化合物	クロム 及びその 化合物
塩化メチル	1																
クロロホルム	0.53	1															
1,2-ジクロロエタン	0.34	0.43	1														
ジクロロメタン	0.30	0.42	<u>0.71</u>	1													
トルエン	0.35	0.40	0.27	0.28	1												
1,3-ブタジエン	0.43	0.25	0.11	0.08	<u>0.64</u>	1											
ベンゼン	0.31	0.14	0.33	0.30	0.57	<u>0.80</u>	1										
酸化エチレン	0.09	0.03	-0.07	0.07	0.03	0.19	0.01	1									
水銀及びその化合物	0.39	0.51	0.30	0.33	0.13	0.04	0.04	-0.08	1								
アセトアルデヒド	0.37	0.20	0.17	0.26	0.35	0.31	0.12	0.46	0.05	1							
ホルムアルデヒド	0.00	-0.06	0.13	0.21	0.06	-0.14	-0.18	0.22	-0.13	<u>0.64</u>	1						
ベンゾ[a]ピレン	0.24	-0.04	0.08	0.00	0.46	<u>0.84</u>	<u>0.83</u>	0.20	0.06	0.13	-0.20	1					
ニッケル化合物	0.43	0.37	0.32	0.34	0.05	-0.04	-0.10	0.17	0.31	0.26	0.13	-0.07	1				
ヒ素及びその化合物	0.40	0.26	0.25	0.30	0.15	0.29	0.21	0.37	-0.06	0.59	0.29	0.08	0.35	1			
及びその化合物	0.19	0.17	0.15	0.20	-0.03	0.07	0.00	0.25	0.08	0.14	-0.02	0.11	<u>0.69</u>	0.37	1		
マンガン及びその化合物	0.21	0.16	0.18	0.22	-0.01	0.04	-0.05	0.37	0.07	0.25	0.08	0.07	<u>0.72</u>	0.40	<u>0.96</u>	1	
クロム及びその化合物	0.27	0.21	0.29	0.17	0.04	0.01	0.06	0.06	0.14	0.16	0.06	0.07	<u>0.73</u>	0.21	0.52	0.55	1

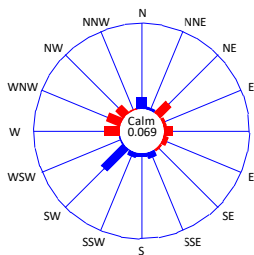
ニッケル化合物



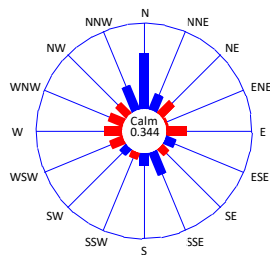
ヒ素及びその化合物



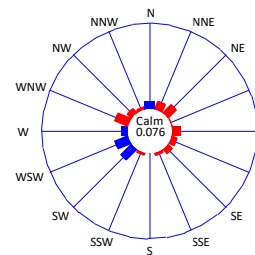
ベリリウム及びその化合物



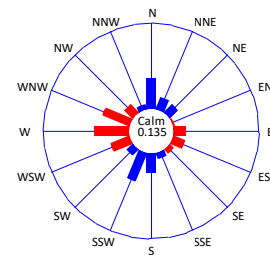
マンガン及びその化合物



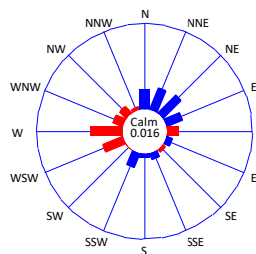
クロム及びその化合物



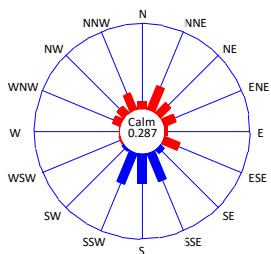
アセトアルデヒド



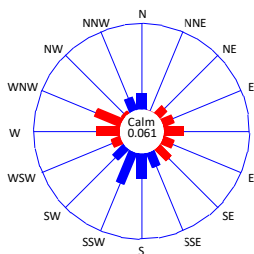
ホルムアルデヒド



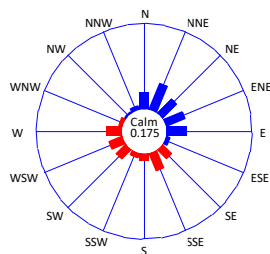
ベンゾ[a]ピレン



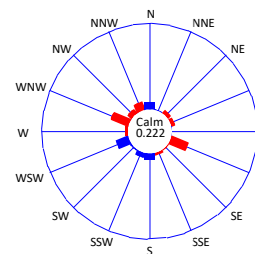
酸化エチレン



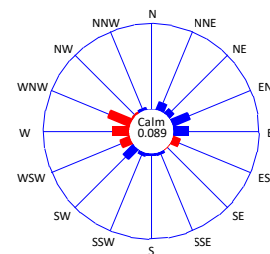
水及びその化合物



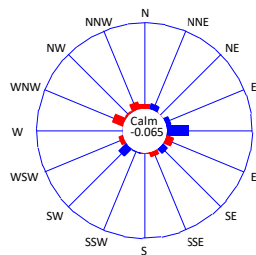
塩化メチル



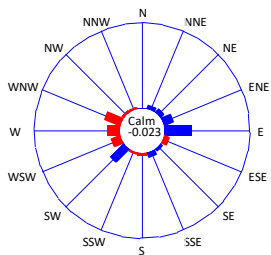
クロロホルム



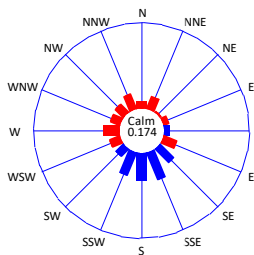
1,2-ジクロロエタン



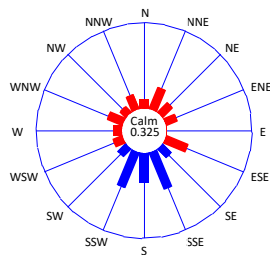
ジクロロメタン



トルエン



1,3-ブタジエン



ベンゼン

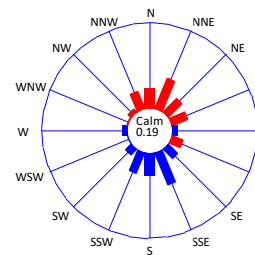


図5 各項目の濃度と風向頻度の相関

クラスター分析とは、異なる性質をもつデータを含むデータ群から類似した性質のものを集め、クラスター(集団)を作り、対象を分類する手法で、分類過程が視覚的に把握できる利点がある。

今回、解析および図の描画には、早狩¹²⁾が作成した表計算ソフトのアドインを使用した。非類似度計算法は相関係数を採用し、結合手法は群平均法、グルーピング数を4とした。

第1クラスターは、主に洗浄剤等で使用されるクロロカーボン類である「塩化メチル」、「クロロホルム」、「1,2-ジクロロエタン」及び「ジクロロメタン」並びに「水銀及びその化合物」が集団を形成した。

第2クラスターは、重金属類のうち「ヒ素及びその化合物」を除いた4項目が集団を形成した。

第3クラスターは、「酸化エチレン」、「アルデヒド類」及び「ヒ素及びその化合物」が集団を形成した。

第4クラスターは、自動車排出ガス等が主な発生源とされる「トルエン」、「1,3-ブタジエン」、「ベンゼン」、「ベンゾ[a]ピレン」が集団を形成した。

これら4つのクラスターは、概ね使用用途や発生源が類似していると考えられるものに分類されたと考えられた。

4.4 風向頻度との相関

各項目の濃度と風向頻度の相関を図5に示す。解析項目は、優先取組物質21物質のうち、「アクリロニトリル」、「塩化ビニルモノマー」、「テトラクロロエチレン」及び「トリクロロエチレン」を除く17項目とし、各項目とも平成29年度から令和4年度までの6年分のデータを使用した。また、風向のデータは気象庁ホームページに掲載されている過去の気象データ¹³⁾のうち、地点：青森県「弘前」、期間：平成29年度から令和4年度までの調査を実施した日、項目：「風向・風速」を選択して得られたデータを使用した。風向は16方位にCalm(無風)を加えたものとした。

なお、解析および図の描画には、早狩¹²⁾が作成した表計算ソフトのアドインを使用した。出力した風向頻度との相関係数に基づき、項目ごとに集計・描画したものであり、青が正の相関を、赤が負の相関を示している。

特定の風向と高い相関を示した項目として、「ヒ素及びその化合物」は南西寄り、「水銀及びその化合物」は北から東寄り、「クロロホルム」、「1,2-ジクロロエタン」及び「ジクロロメタン」は

北東から東寄りの風向頻度と正の相関が高い傾向であった。

また、「トルエン」、「1,3-ブタジエン」、「ベンゼン」、「ベンゾ[a]ピレン」は、南西から南東寄りの風向頻度と正の相関が高い傾向がみられており、濃度と風向頻度の相関の傾向が類似していた。

5. 結論

今回行った各項目間の相関、クラスター解析及び風向頻度との相関結果を踏まえると、「トルエン」、「1,3-ブタジエン」、「ベンゼン」、「ベンゾ[a]ピレン」の4項目は、各解析結果において類似性が高かったことから、同一の発生源(例えば自動車排出ガス)からの影響を強く受けている可能性が高いことが示唆された。

風向頻度との相関を把握することで、各項目の発生源の把握が検討しやすくなると考えられるため、今後も継続してモニタリング調査を実施するとともに、周辺の発生源側のデータも整理していく必要がある。

6. まとめ

第一中学校局(弘前市)におけるモニタリング調査について集計及び解析を実施した結果、以下の知見が得られた。

(1) 季節変動

「トルエン」、「1,3-ブタジエン」、「ベンゼン」、「ベンゾ[a]ピレン」は、冬季である11月から3月にかけて濃度の上昇傾向がみられるほか、「アルデヒド類」や「ニッケル化合物」等の重金属類においても季節変動が明瞭にみられた。

(2) 経年変化

1)環境基準値等が定められている項目については、すべて環境基準を達成していた。

2)調査した優先取組物質21項目については、概ね減少傾向または横ばいであった。

(3) 相関

自動車排出ガス等が主な発生源とされる「トルエン」等の4項目間並びに「ニッケル化合物」等の重金属類の項目間で高い相関がみられた。

(4) クラスター解析結果

使用用途や発生源が似ていると考えられるものに概ね分類することができた。

(5) 風向頻度との相関

1)「ヒ素及びその化合物」は南西寄り、「水銀及びその化合物」は北から東寄りの風向頻度と正の相関が高い傾向であるなど、特定の風向と高い

相関を示した項目がみられた。

2) 「トルエン」、「1,3-ブタジエン」、「ベンゼン」、

「ベンゾ[a]ピレン」は、南西から南東寄りの風向頻度と正の相関が高い傾向がみられており、濃度と風向頻度の相関の傾向が類似していた。

文 献

- 1)対馬典子, 他: 青森県内における有害大気汚染物質モニタリング-優先取組物質のトレンドと季節変動を中心に-. 青森県環境保健センター年報, **29**, 59-77, 2018
- 2)花石竜治, 他: 八戸市内における有害大気汚染物質(重金属類)の発生源の推定. 青森県環境保健センター研究報告,**12**,31-41,2001
- 3)環境省:「大気汚染防止法第22条の規定に基づく大気の汚染の状況の常時監視に関する事務の処理基準」(平成13年5月制定、令和5年11月最終改正)
- 4)環境省:「有害大気汚染物質測定方法マニュアル」(平成23年3月、令和5年5月改訂)
- 5)環境省: 化学物質の環境リスク評価 各巻
- 6)国立環境研究所: VOC-揮発性有機化合物による都市大気汚染. 環境儀,**5**,10-11,2002
- 7)内田悠太, 他: 首都圏における大気中 VOC 成分のオゾン生成への寄与. 東京都環境科学研究所年

報,23-32,2011

8)ReCooHP レクー会員燃費データの季節変動

<https://www.recoo.jp/ja/ecodrive/kisetsuhendo.html>

(2024.2.1 アクセス)

9)河野 仁, 他: 都市境界層の大気安定度推定のためのタワーを使った気温鉛直分布の年間観測.

天気,**57**(8),589-600,2010

10)環境省 HP: 黄砂ってなに?

https://www.env.go.jp/air/kousa/dss_01.html

(2024.2.1 アクセス)

11)環境省HP: 令和3年度大気汚染状況について(有害大気汚染物質モニタリング調査結果報告) 参考資料「有害汚染物質等に係る常時監視結果」

12)Excelアドイン工房「早狩」

<http://www7b.biglobe.ne.jp/~hayakari/index.html>

(2024.2.2 アクセス)

13)気象庁: 過去の気象データ・ダウンロードサイト

<https://www.data.jma.go.jp/gmd/risk/obsdl/index.php>

(2024.1.16 アクセス)

十和田湖における気温変化と水温変化の関係について

白銀ゆい 菩提寺誉子 内海宣俊

日本の平均気温は 1980 年代後半から急速に上昇しており、全国的に湖沼の水温上昇が確認されている。本研究では、1982 年から 2022 年までの気象庁の気温データを用いて、十和田湖近傍の休屋を含めた県内 5 地点における年平均気温の長期変化傾向を求めた。また、十和田湖における公共用水域水質調査結果のうち、環境基準点 2 地点（「中央」及び「子ノ口前面」）の表層及び中層の水温データを用いて、気温変化が水温に与えた影響について検討した。その結果、県内気温については休屋を含め、全域で気温上昇が確認された。水温については、経年で緩やかに上昇している傾向があり、温暖化の影響が示唆された。表層及び中層とも水温上昇率が最も高いのは 6 月で、上昇傾向がみられなかったのは 4 月及び 8 月であった。

Key words: Lake Towada, global warming, a long term trends, water temperature changes

1. はじめに

日本では、平均気温が 1980 年代後半から急速に上昇しており、その背景には温室効果ガス増加に伴う地球温暖化による長期的な昇温傾向及び数十年周期の自然変動の影響があると考えられている¹⁾。2021 年の環境省の報告によると、夏季は調査対象湖沼の 8 割以上、冬季は北海道を除き 7 割以上の地点で水温上昇が確認されている²⁾。

青森県と秋田県の県境に位置する十和田湖は、1971 年に最も厳しい環境基準（湖沼 AA 類型）が指定され、公共用水域の水質常時監視とともに、「十和田湖水質・生態系改善行動指針」（2001 年策定）に基づく水質保全対策が実施されているが、近年の水温上昇やその影響に係る研究報告は少ない。

本研究では、1982 年から 2022 年までの気温データから、十和田湖近傍の休屋を含めた県内 5 地点の年平均気温の長期変化傾向を把握し、気温変化と十和田湖の水温との関係について検討した。

2. 気温・水温の対象データ

2.1 対象とするデータ及び期間について

気象庁ホームページ³⁾で公開されている気温データ及び十和田湖における公共用水域水質調査の水温データを対象とした。

具体的には、気温・水温データともに 1982 年から 2022 年までのデータを用いた。

表 1 に気温及び水温データの対象期間及び項目を示す。このうち、「統計を行う対象資料が許容範

囲を超えて欠けている（資料不足値）」と表示されたものである。2011 年の「むつ」、1982 年の「休屋」のデータを除外した。

2.2 県内の気象観測地点の選定

十和田湖近傍の観測地点である「休屋」のほか、県内全域の傾向を把握するため、気象官署「青森」及び特別地域気象観測所「むつ」、「深浦」、「八戸」を選定した。図 1 にそれぞれの観測地点の位置を示す。

2.3 公共用水域水質調査について

公共用水域水質調査における 9 つの調査地点を図 2 に示す。このうち、環境基準点である中央（秋田県呼称は湖心）及び子ノ口前面（同 子ノ口）の 2 地点を本研究の対象とした。

なお、この調査は青森・秋田両県で分担して実施しており、調査時期は青森県が 5 月、7 月、9 月、10 月及び 11 月の 5 回、秋田県が 4 月、6 月及び 8 月の 3 回の年 8 回となっている。湖水試料については、2 地点とも表層及び中層（水深 5 m）で採取したものである。

3. 対象データの検討方法

3.1 気温データ

(1) 年平均気温によるトレンド推定

長期変化傾向（以下、「トレンド」という。）は、数十年から百年を超える観測値などについてその期間の平均的な変化を示したもので、10 年あたり 0.25℃のように時間的な変化の割合で表される。経

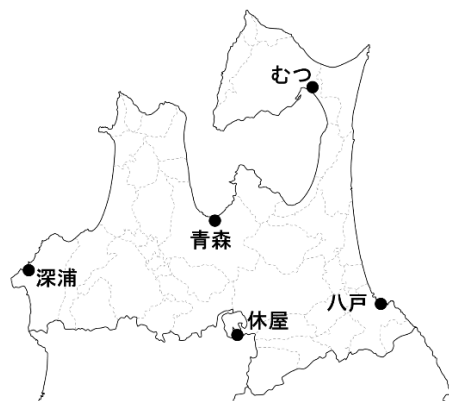


図 1 気象観測地点位置図



図 2 公共用水域採水地点

表 1 対象データ、期間及び項目

データ	観測地点	対象期間	使用・検討項目
気象	休屋	1982 年～2022 年	年平均気温
	青森		
	むつ		
	深浦		
	八戸		
水質	St.5 中央 (湖心)	1982 年～2022 年 (4 月～11 月)	水温 (表層、中層)
	St.9 子ノ口前面 (子ノ口)		

年変化を示したグラフでは、トレンドは回帰直線で示され、その変化の割合は回帰直線の傾きとなる⁴⁾。

本研究では、年平均気温の経年変化について、Excel の線形近似により回帰直線を求め、トレンドとその変化の割合を推定した。

(2) 年平均気温のトレンドの評価

t 検定により、(1) で得たトレンドが偶発的に現れる確率を検定し、統計的に有意であるか評価を行った。なお、気象庁においても t 検定によるトレンドの評価が実施されている。具体的な検定方法は次のとおりである。

ア t 検定

年ごとの統計量 t の出現頻度が正規分布に従うと仮定し、年平均値の経年変化グラフにおける回帰直線から相関係数 r を求めた。

次に、(1) 式により、測定値の個数を n とし、「各年平均気温に有意差がない」という帰無仮説を設定した場合の統計量 t_0 を求めた。

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

最後に、自由度 $n-2$ 、有意水準 α の t 分布表

⁵⁾ の値 $t(n-2, \alpha)$ と比較し、 $|t_0| \geq t(n-2, \alpha)$ ならば「トレンドは統計的に意味がある (変化傾向がある)」、 $|t_0| < t(n-2, \alpha)$ ならば「トレンドは統計的に意味がない (変化傾向がみられない)」と評価した。

イ 詳細な評価基準

気象庁で実施しているトレンドの有意検定の評価基準に準じ、表 2 に示すとおり評価した。

表 2 評価基準

結果記号 (α)	結果の記述
* (10%)	「上昇 (下降) しているとみられる」 (90% で統計的に有意)
** (5%)	「上昇 (下降) 傾向が現れている」 (95% で統計的に有意)
*** (1%)	「上昇 (下降) している」 (99% で統計的に有意)
-	「有意な変化傾向はみられない」

3.2 水温データ

水温データは、気象データと比べてデータ数が少ないことから有意検定は実施せず、過去から現在までの数値の変化を回帰直線の傾きにより上昇の割合 (動向) として示した。なお、「年平均値」は 4 月

～11 月の 8 か月の平均値を示している。

4. 結果及び考察

4.1 県内 5 地点の年平均気温の経年変化

1982 年～2022 年における各気象観測地点の年平均気温の経年変化を図 3 に、検定結果を表 3 に示す。なお、グラフ中の横軸 x は年、縦軸 y は気温である。

経年変化をみると、全地点において年平均気温が $2.5^{\circ}\text{C} \sim 3.9^{\circ}\text{C}/100$ 年の割合で上昇しており、県内全域で温暖化が進んでいることが示唆された。なお、休屋のトレンドは $3.0^{\circ}\text{C}/100$ 年であった。

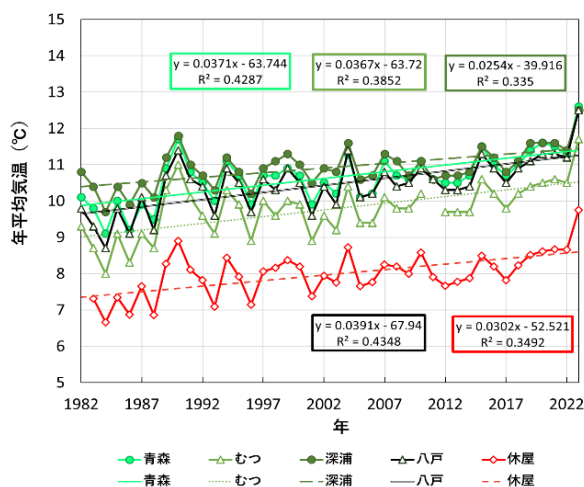


図 3 県内 5 地点の年平均気温経年変化

表 3 県内 5 地点の年平均気温トレンド

地点	青森	むつ	深浦	八戸	休屋
n	42	41	42	42	41
r^2	0.4287	0.3852	0.3350	0.4348	0.3492
r	0.6547	0.6206	0.5787	0.6593	0.5909
t_0	5.478	4.943	4.488	5.547	4.574
傾き	0.037	0.036	0.025	0.039	0.030
	***	***	***	***	***
結果	3.7°C /100 年	3.6°C /100 年	2.5°C /100 年	3.9°C /100 年	3.0°C /100 年

4.2 休屋における季節別の気温経年変化

休屋の気温データを気象庁の季節区分に従い、冬（12 月～2 月）、春（3 月～5 月）、夏（6 月～8 月）及び秋（9 月～11 月）に分けて集計した季節別の月平均気温の経年変化（例えば、1984 年の冬は 1983 年 12 月～1984 年 2 月のデータを使用している）を図 4 に、検定結果を表 4 に示す。

上昇トレンドがみられたのは、春、夏及び秋であった。その中でも 3 月及び 7 月の平均気温はそれ

ぞれ $5.0^{\circ}\text{C}/100$ 年、 $5.9^{\circ}\text{C}/100$ 年以上の割合で上昇しており、温暖化の影響を強く受けていると考えられた。ただし、4 月及び 8 月は上昇傾向がほぼみられなかった。冬については、上昇トレンドもなく、12 月にいたっては回帰直線の傾きが負であったことから、他の季節とは傾向が異なっていた。

4.3 十和田湖における水温の経年変化

図 5 に「中央」及び「子ノ口前面」における年平均水温、図 6 (a) ～ (c) 及び図 7 (a) ～ (c) に表層及び中層の月別水温の各経年変化を示す。なお、グラフ中の横軸 x は年、縦軸 y は水温である。

(1) 年平均水温

両地点とも緩やかな上昇傾向がみられ（図 5）、回帰直線の傾きは「中央」表層で 0.0497 、中層で 0.0473 、「子ノ口前面」表層で 0.0458 、中層で 0.0457 と、いずれも傾きが同程度であり、表層及び中層とも温暖化の影響を同程度受けていると考えられた。

(2) 月別水温と月平均気温の関係

回帰直線の傾きより（図 6, 7）、表層・中層ともに最も上昇傾向がみられたのは両地点とも 6 月であった。一方、傾向がみられなかった（回帰直線の傾きの絶対値が小さかった）のは、両地点とも 4 月及び 8 月であった。

過去に花石ら⁵⁾が実施した十和田湖の水温連続測定では、気温と水温の相関について、水深が浅いほど早く大きく気温の影響を受けることが示唆されている。これを踏まえると、表層は中層よりも気温の影響を強く受けていることが回帰直線の傾きから考えられる。

上昇傾向があまりみられなかった 4 月は、3 月までの気温による影響の他に雪解け水の流入による湖水の冷却が生じて表面水温上昇に至らなかった可能性がある。一方、8 月については、梅雨明け前の雨、日照量の減少、台風などの影響で水温上昇が抑えられている可能性がある。

気温に比べて水温の方が回帰直線の傾きが大きいことについては、明確な要因を特定できなかった。

5 まとめ

- 1) 県内全域で年平均気温が $2.5^{\circ}\text{C} \sim 3.9^{\circ}\text{C}/100$ 年の割合で上昇していた。
- 2) 休屋における気温上昇トレンドがみられたのは春、夏及び秋で、その中でも 3 月及び 7 月の平均気温は $5^{\circ}\text{C}/100$ 年以上の割合で上昇していた。
- 3) 休屋における 12 月の平均気温については、回帰直線の傾きが負となり、他の季節とは異なっていた。

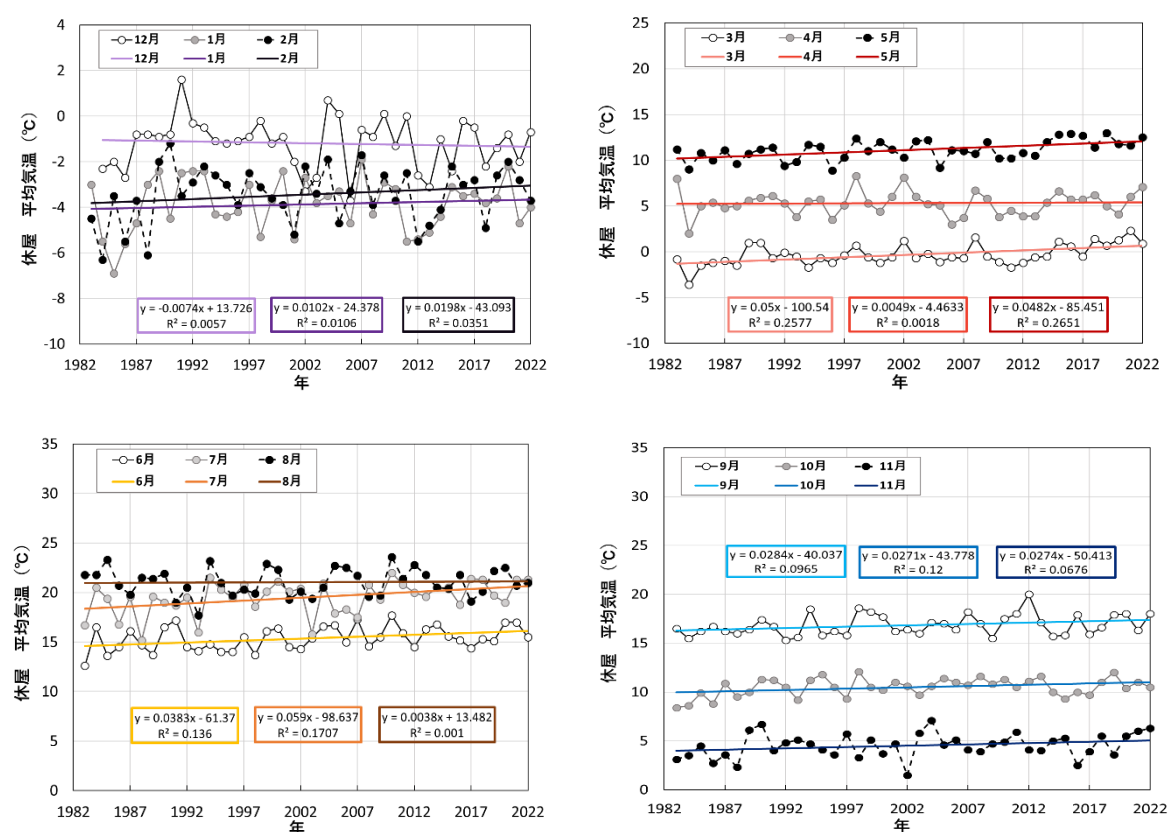


図 4 休屋の季節別平均気温経年変化

表 5 休屋の季節別平均気温トレンド

	冬			春			夏			秋		
月	12 月	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月
n	39	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
r ²	0.0057	0.0106	0.0351	0.2577	0.0018	0.2651	0.1360	0.1707	0.0010	0.0965	0.1200	0.0676
r	0.0755	0.1030	0.1873	0.5076	0.0424	0.5149	0.3688	0.4132	0.0316	0.3106	0.3464	0.2600
t ₀	0.461	0.638	1.176	3.632	0.262	3.703	2.446	2.797	0.195	2.014	2.276	1.660
傾き	-0.0074	0.0102	0.0198	0.0500	0.0049	0.0482	0.0383	0.0590	0.0038	0.0284	0.0271	0.0274
結果	-	-	-	***	-	***	**	***	-	*	**	-
	-	-	-	5.0℃ /100 年	-	4.8℃ /100 年	3.8℃ /100 年	5.9℃ /100 年	-	2.8℃ /100 年	2.7℃ /100 年	-

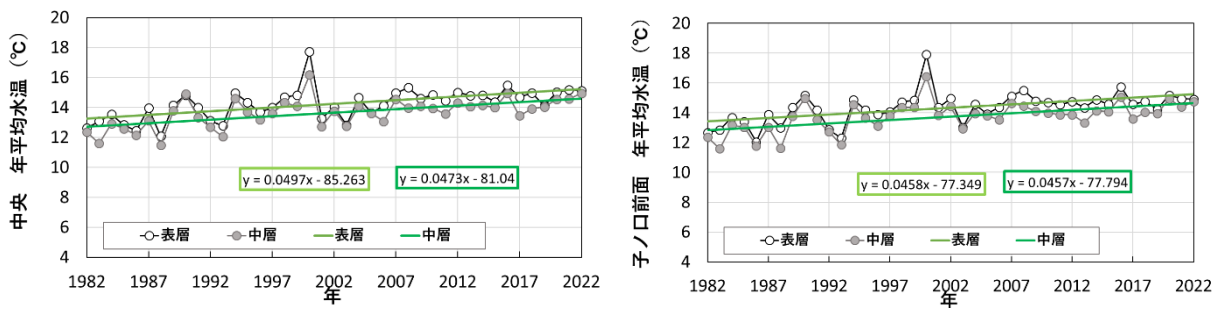


図 5 年平均水温経年変化

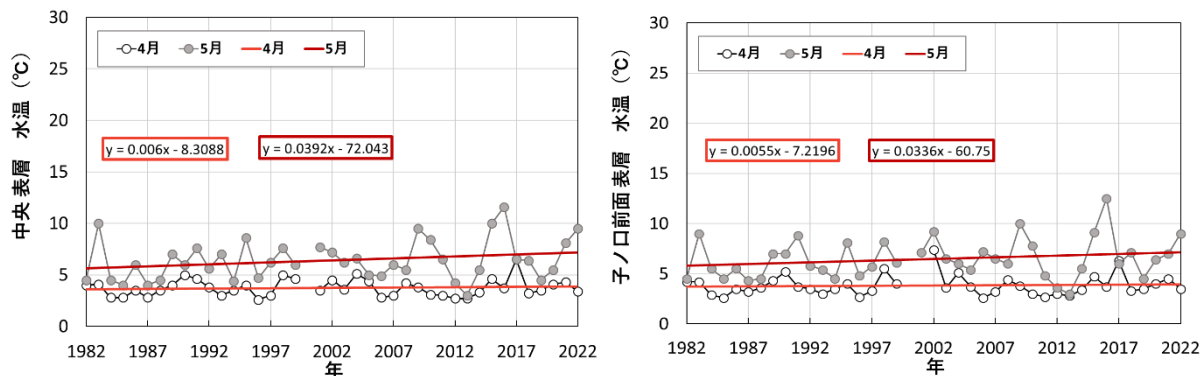


図 6(a) 春 月別水温経年変化 表層

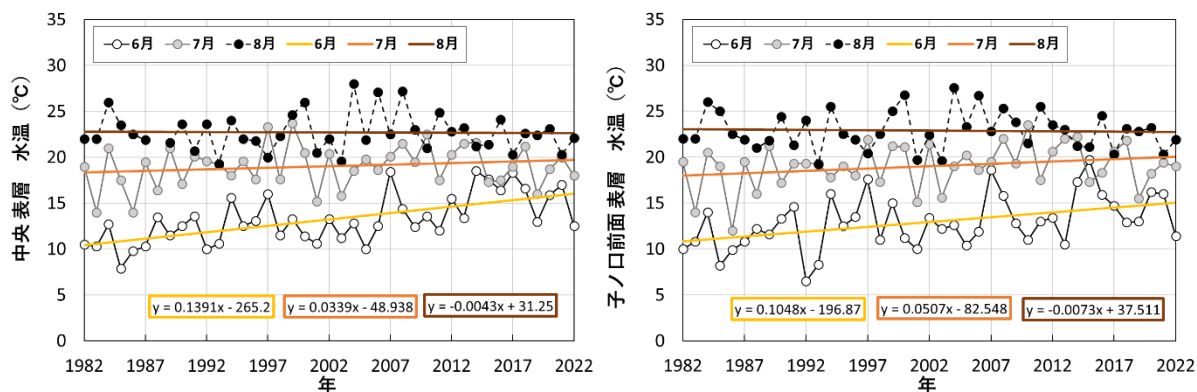


図 6(b) 夏 月別水温経年変化 表層

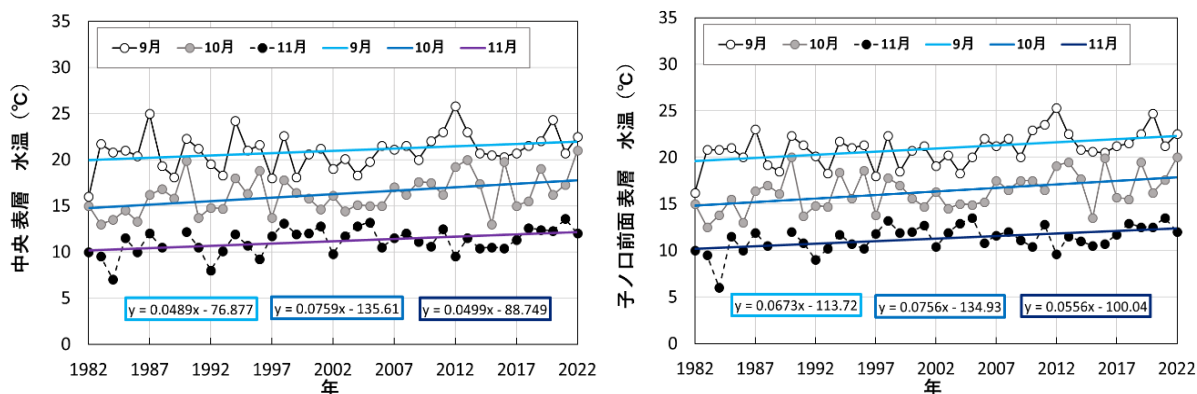


図 6(c) 秋 月別水温経年変化 表層

いた。

- 4) 十和田湖の環境基準点である「中央」及び「子ノ口前面」において、両地点とも緩やかな水温の上昇傾向がみられ、回帰直線の傾きから表層及び中層ともに温暖化の影響を同程度受けていることが示唆された。
- 5) 月別水温の経年変化をみると、表層及び中層とも水温上昇率が最も高いのは6月で、上昇傾向がみられなかったのは4月及び8月であった。

6 今後の課題

- 1) 休屋において、気温上昇トレンドがみられなか

った4月、8月及び冬については、今後、他の気象要因と併せて原因を検討する。

- 2) 水温上昇についても、上昇トレンドがみられなかった4月、8月と同様に、そのときの日射量、風向等にも影響を受けると考えられるため、今回把握したデータを基に水温上昇に寄与する要因を検討する。

3) 気温よりも水温の回帰直線の傾きが大きくなる要因を検討する。

- 4) 公共用水域水質調査とは別に実施している十和田湖の定点における水深別の水温変化を考察する。

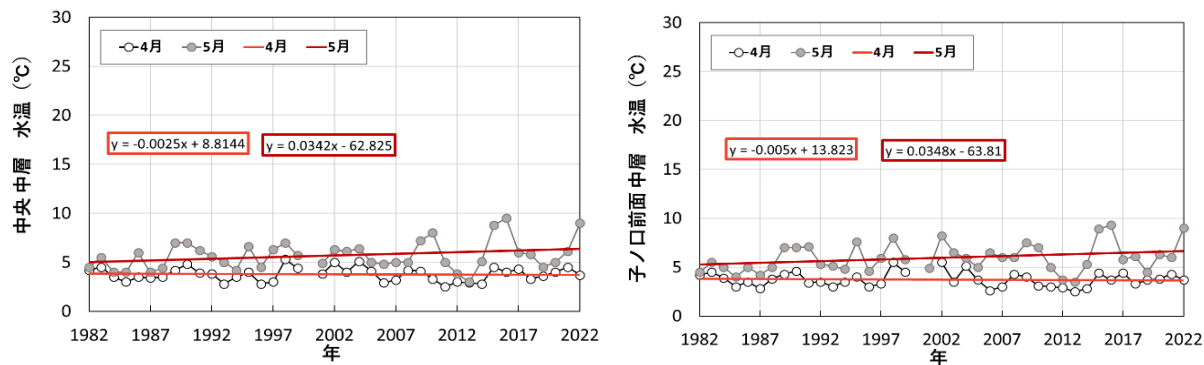


図 7(a) 春 月別水温経年変化 中層

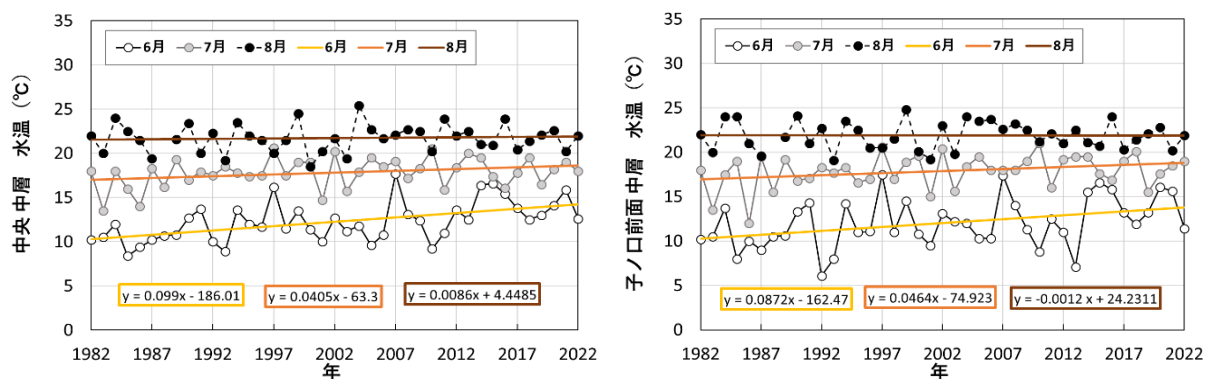


図 7(b) 夏 月別水温経年変化 中層

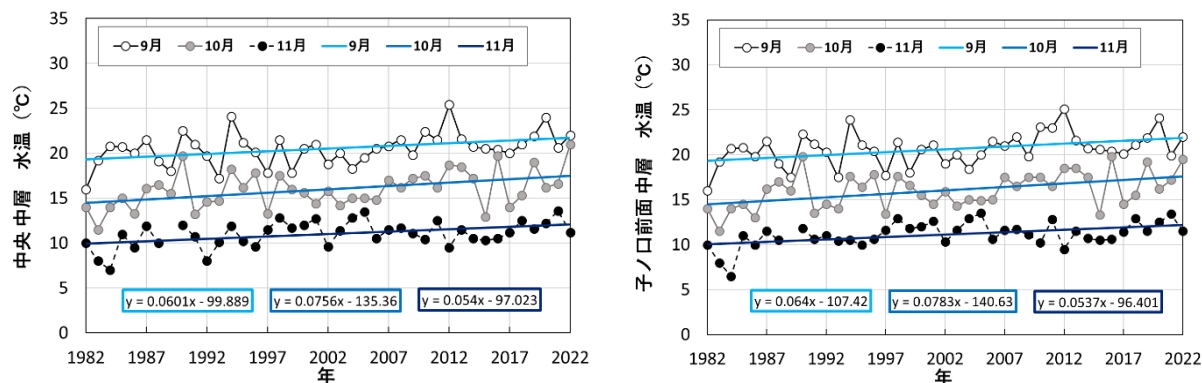


図 7(c) 秋 月別水温経年変化 中層

文 献

- 1) 気象庁 | 令和 3 年度報道発表資料「平年値の更新について」(2021 年 3 月 24 日)
https://www.jma.go.jp/jma/press/2103/24a/210324_hein_enchi.html
- 2) 環境省:「気候変動による湖沼の水環境への影響評価・適応策検討に係る手引き」(2021 年 3 月)
<https://www.env.go.jp/content/900542176.pdf>

- 3) 気象庁:過去の気象データ・ダウンロード
- 4) 気象庁:長期変化傾向(トレンド)の解説
<https://www.data.jma.go.jp/cpdinfo/temp/trend.html>
- 5) 藤森利美:分析技術者のための統計的方法. 社団法人日本環境測定分析協会, 1995.
- 6) 花石竜治ほか:水温の連続測定から見た十和田湖の水温の季節変動. 青森県環境保健センター年報, 15, 23-30, 2004.

青森県内における河川水中のマイクロプラスチック実態調査

長内志保美 貝森優希

閉鎖性海域である陸奥湾に流入する河川の下流部において、マイクロプラスチックの存在状況に関する調査を実施した。その結果、対象とした 6 河川全てでマイクロプラスチックが検出され、その材質として、ポリエチレン及びポリプロピレンの割合が多く、その他にポリエチレンテレフタレート、ナイロン等が検出された。

Key words: microplastics, enclosed sea area, river water

1. はじめに

マイクロプラスチック（以下「MP」という。）は、大きさが 5 mm 未満の微細なプラスチック類で、その発生源として、歯磨き粉や洗顔料等に含まれるスクラブ剤等の 1 次的 MP、プラスチックごみ等が波による破砕や紫外線による劣化等を受け微細化した 2 次的 MP が考えられている。

MP は、水環境中に残留する有害化学物質を吸着する性質があるとされ、これを水生生物が摂取（生物濃縮）し、食物連鎖を通じて人体に取り込まれることにより、がんの発生や免疫力の低下、生殖能力の低下等の健康被害を引き起こすことが懸念されている¹⁾。

MP は、日本の周辺海域においても確認されており、今後発生源対策を実施していく上で、陸域（河川等）から海域へ流入する MP の実態を把握する必要がある。

本県は、三方を海に囲まれており、中でも閉鎖性水域である陸奥湾は、MP の滞留・蓄積が懸念される。このため、陸奥湾に流入する河川水中の MP の存在状況について調査を行った。

2. 調査方法

調査は、環境省作成の「河川・湖沼マイクロプラスチック調査ガイドライン」²⁾（以下「ガイドライン」という。）に基づき実施した。

2.1 調査地点

陸奥湾に直接流入する河川のうち、流域人口が比較的多い 8 河川の下流部（図 1・表 1）を対象とした。

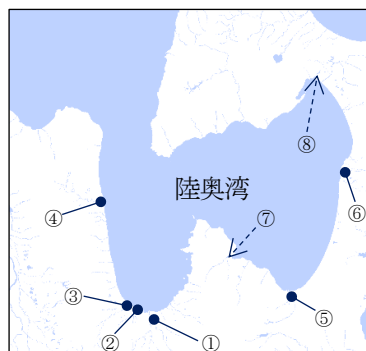


図 1 調査地点

表 1 調査対象河川

河川名	調査地点	所在地	備考
① 堤川	松園橋	青森市	
② 沖館川	沖館橋	青森市	※1
③ 新城川	新井田橋	青森市	※1
④ 蟹田川	蟹田橋	外ヶ浜町	※1
⑤ 野辺地川	ことぶきばし	野辺地町	
⑥ 三保川	新開橋	横浜町	
⑦ 小湊川	新雷電橋	平内町	※2
⑧ 田名部川	下北橋	むつ市	※1 ※2

※1 公共用水域水質測定に係る環境基準点

※2 十分なる水量を確保できず、採取できなかった。

2.2 試料採取

試料採取は、国立研究開発法人国立環境研究所（以下「国環研」という。）が作製した専用の器具を使用し、令和5年10月～11月の2か月間で実施した。

具体的には、口径30cm、目開き0.1mm程度のプランクトンネットを取り付けた器具を橋上から河川に投下し、ろ水量（ネットを通過する水量）が10～20m³程度となった段階で器具を引き上げ、植物片等の夾雑物を除去した。その後、ネットの外側から水道水をかけ、ネット内の試料を底管（コットエンド）に集め、保存容器に移し替えた。



図2 試料採取の状況

2.3 前処理

(1) ろ過

目開き0.1mmのネットを使用して採取試料から固形物を分離し、5mm以上の夾雑物がある場合はピンセットで除去した。

(2) 酸化処理

MPの表面に付着した試料中の植物片を除去し、プラスチック候補粒子を目視しやすくするため、30%過酸化水素水を加えて55℃で数日間加温（酸化分解）し静置した。酸化分解が不十分である場合は、30%過酸化水素水を更に加えて、1日間加温し静置した。

(3) 比重分離

酸化分解で除去できない泥などの無機物は、プラスチックとの比重差を利用して分離した。比重分離には5.3Mヨウ化ナトリウム溶液（比重：約1.4g/cm³）を用いた。

2.4 プラスチック候補粒子の分取・識別・分類

ピンセットを用いて、前処理後の試料からプラスチック候補粒子を分取した。なお、分取したプラスチック候補粒子については、マイクロスコープを用いて長さの計測や色、形状の観察を併せて行った。

2.5 プラスチックの同定

プラスチックの種類の同定には、地方独立行政法人青森県産業技術センター工業総合研究所のフーリエ変換赤外分光光度計（PerkinElmer社製Frontier FT-IR）を用いた。測定条件は、測定波数領域4000～650cm⁻¹、サンプルスキャン回数4回とした。

3. 結果と考察

3.1 個数密度

MPの個数密度（ろ水1m³当たりのMPの個数）の測定結果を表2に示す。個数密度は0.16～4.4個/m³（平均1.5個/m³）の範囲であり、最大が沖館川（沖館橋）の4.4個/m³、最小が蟹田川（蟹田橋）の0.16個/m³であった。Kataokaら²⁾が日本国内29河川36地点を対象に実施したMP全国調査では、個数密度の平均が1.6個/m³であり、本調査結果はこれよりも低い値であった。

新城川（新井田橋）は、ろ水量が2.4m³と少ないが、個数密度が沖館川の次に大きい値となった。ガイドライン¹⁾では、河川の表層で採取することとされているが、水深が浅く、採取器具が河底に触れたことで、河底に堆積していたMPが混入した可能性がある。

表2 調査河川におけるMP個数密度

調査河川	MP 個数 (個)	ろ水量 (m ³)	個数密度 (個/m ³)
① 堤川	9	19.7	0.46
② 沖館川	58	13.3	4.4
③ 新城川	8	2.4	3.3
④ 蟹田川	2	12.9	0.16
⑤ 野辺地川	9	43.8	0.21
⑥ 三保川	6	31.8	0.19

3.2 材質分類

MPの材質ごとの存在割合を表3に、検出されたその他のプラスチックの材質を表4に示す。プラスチックの材質は、ポリエチレン（PE）、ポリプロピレン（PP）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ナイロン（Nylon）、その他の5種類に分類した。

堤川、新城川及び野辺地川ではPEの割合が多く、沖館川ではPPの割合が多かった。また、沖館川ではPETが、蟹田川ではNylonが確認された。

表3 MPの材質ごとの存在割合

調査河川	存在割合 (%)				
	PE	PP	PET	Nylon	その他

①堤川	44.4	33.3	—	—	22.2
②沖館川	36.2	48.3	3.4	—	12.1
③新城川	62.5	—	—	—	37.5
④蟹田川	—	50.0	—	50.0	—
⑤野辺地川	77.8	—	—	—	22.2
⑥三保川	—	50.0	—	—	50.0

※四捨五入により合計が100%とならない場合がある。

表4 採取したMPのその他の材質

エチレンプロピレンジエンゴム (EPDM)
スチレン-アクリロニトリル共重合体
エチレン-プロピレン共重合体
スチレン-エチレン-ブチレン-ブロック共重合体
ブチルメタクリレートイソブチルメタクリレート共重合体
ポリビニルステアレート
ポリウレタン
ポリ塩化ビニリデン
アクリル繊維
PARAPLEX G-50

PE と PP はともに 2022 年度に最も多く生産されたプラスチックであると報告されており³⁾、レジ袋のほか、近年、COVID-19 の感染拡大防止のため大量に使用された不織布マスクにも PE や PP が使用されている。

また、本調査は河川の表層で採取しているため、河川水よりも比重の小さいPE(比重:約0.91~0.97 g/cm³)やPP(比重:約0.90~0.91 g/cm³)が捕集されたと考えられる。これらのことから、採取したMPのPE、PPの割合が大きくなった可能性がある。

本調査において、ペットボトルの原料などに使用されているPETの検出は少なかった。PETから生産されるポリエステル繊維は、フリース素材等の化学繊維布に使用されており、家庭からの洗濯排水に大量に含まれるとの指摘がある⁴⁾。

試料採取を行ったのは10~11月であり、冬季と比較してフリース素材等の使用頻度がそれほど高くないものと考えられ、PEやPPに比べPETの検出割合が低くなった可能性がある。

MP 個数が最も多かった沖館川では、青色や緑色の破片状のものが多く見られた(図3(a), (b))。材質は、青色のものは全てPE、緑色のものはほとんどがPPであった。しかし、実際には色や形状から元の製品を推定することは困難であると考えられる。一方、沖館川で検出されたPETの形状は繊維状であり、衣類等が由来である可能性がある。

4. まとめ

- 1) 調査を実施した6河川全てにおいてMPが確認された。
- 2) 6河川の平均個数密度(1.5個/m³)は全国平均(1.6個/m³)と比較して低い値であった。
- 3) MPの材質としてはPE、PPが多く、調査を実施した6河川全てにおいて、これらの割合が半数以上であった。

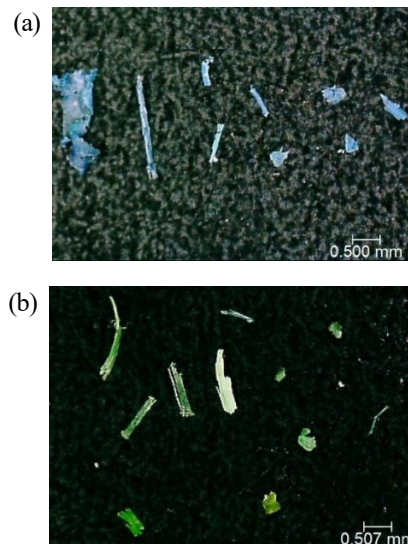


図3 沖館川で採取したMP(破片状)の例

謝 辞

本調査は、国環研との第II型共同研究「河川プラスチックごみの排出実態把握と排出抑制対策に資する研究」(研究期間:令和3~5年度)の一環として、当センター内ベンチャー制度を活用して実施したものである。国環研をはじめ、関係地方環境研究所の皆様にご協力いただき、心から御礼申し上げる。

また、測定機器の借用及び使用方法の指導については、地方独立行政法人青森県産業技術センター工業総合研究所技術支援部の横濱和彦氏及び宮川大志氏に御協力いただいた。この場を借りて謝意を表すものである。

文 献

- 1) 環境省水・大気環境局水環境課: 河川・湖沼マイクロプラスチック調査ガイドライン(令和5年3月)
- 2) Kataoka, T. et al.: Assessment of the sources and inflow processes of microplastics in the river environments of Japan. *Environmental Pollution*, **244**, 958-965, 2019
- 3) 塩ビ工業・環境協会: プラスチックの種類別生産量

https://www.vec.gr.jp/statistics/statistics_4.html

(2024.2.2 閲覧)

- 4) Santini, S. et al.: Occurrence of Natural and Synthetic Micro-Fibers in the Mediterranean Sea: A Review. *Toxics*, **10**, 391, 2022

IV 他誌投稿・学会等発表抄録

A study on the coloration mechanism of Ao-ike Pond, Aomori Prefecture, Japan: refinement of the image analysis methods

Hanaishi R., Chikita K.A.¹ : *Limnology*, Published online: 08 December 2023

(<https://doi.org/10.1007/s10201-023-00734-5>)

In order to verify the blue coloration model for Ao-ike Pond, Aomori Prefecture, Japan, the authors refined the formulas previously reported for the light intensities in the coloration model. Then, the authors utilized a homography transformation technique to obtain the coordinates on the pond water surface from the digital camera image. Moreover, they experimentally determined the sensitivity factor and white balance factor of a digital camera used. Assuming potential coloration mechanisms including irregular reflection at the pond bottom, molecular scattering by water and Mie scattering by suspended solids, two types of images were analyzed so as to determine model parameters; images taken in early spring when the shading by tree leaves does not exist above the pond surface, and images photographed in early summer containing incident light trajectories brought by the sunbeam's passage through the leaves above the pond surface. Analytical results obtained by both of the images revealed that the main coloration mechanism is molecular scattering by water but with no contribution of Mie scattering. Thus, the blue color of Ao-ike Pond was judged to be attributed to the nature of water itself.

¹ Arctic Research Center, Hokkaido University

青森県・青池の青色呈色に関する研究：画像の RAW ファイル使用の試み

花石竜治、知北和久¹：陸水物理学会第 44 回研究発表会(2023 新潟大会), 2023.11.11 (新潟県新潟市)

光学的に純水に近く青色を呈する water body の呈色機構については、以前は水の分子散乱によるものと定性的に理解されてきた。

発表者らは、それまで湖水の「青さ」の原因が未解明であった青森県・青池の呈色機構研究を 2016 年から行ってきた。発表者らの呈色計算法は、散乱の一次近似のもとで光線逆方向追跡法により各呈色機構（湖底乱反射、水の分子散乱および懸濁物質のミー散乱）による湖面各点の呈色を高速に算出する。

これまでの研究では、デジタルカメラが出力した JPEG ファイルの画像データをビットマップにキャスト変換し解析してきた。しかし、JPEG ファイルは色が加工されて出力された可能性があるため、画像解析をより正確に行うために、色の加工がなされていない RAW ファイルの使用が期待されている。今回、これを用いた解析を試みた。

RAW ファイルを使用することにより、青池の青色は湖底乱反射、水の分子散乱および懸濁物質のミー散乱における、水の光学的性質としての光散乱と光吸収により説明されると結論された。

¹ 北海道大学北極域研究センター

青森県十二湖青池と隣接湖沼の水質比較

菩提寺誉子、花石竜治、長内志保美：第 58 回日本水環境学会年会, 2024.3.6-8（福岡県福岡市）

青池は、青森県十二湖の中でも透明度が高く、水が青く見えることで知られているが、着色性の溶質や懸濁物質が極めて希薄であり、光物理学的な再現モデルによって主要な呈色機構は水の分子散乱であると結論付けられている。しかし、青池の水質調査は実施回数が少なく、水質の季節的な変動は明らかにされていない。本研究では、青池と、これに隣接する鶏頭場ノ池の表層水について水質の経月変動を比較し、青池の呈色機構への影響を検討した。

その結果、青池と鶏頭場ノ池の水質は、イオンバランスの観点では地点間差や経月変動が殆どなかった。また、青池の表層水には、植物プランクトンの光合成や窒素固定による影響が殆ど確認されず、植物プランクトンの存在量が比較的少ないことが示唆された。植物プランクトンは光の散乱により濁りを生じさせるため、植物プランクトンの増殖が抑えられていることが、青池が青く見える要因の一つとなっていると考えられる。