

平成31年(令和元年)度

広島市衛生研究所 業績発表会

発表要旨集

広島市衛生研究所

平成31年（令和元年）度  
広島市衛生研究所業績発表会要旨集目次

生活科学部

① 食品中のポテトグリコアルカロイド分析法の検討	松木 司
② アゾ染料由来の特定芳香族アミン類の定量試験に関する検討 一分散染料が使用されている繊維製品の場合	長谷川 富子

生物科学部

① PCRによるカンピロバクター・ジェジュニのPenner血清型別法の検討	池田 伸代
② 広島市で検出された基質拡張型β-ラクタマーゼ産生腸管出血性大腸菌について	栗林 智早
③ A群ロタウイルスのイムノクロマト法の検出感度及び広島市における遺伝子型の検出状況	則常 浩太

環境科学部

① 広島市における大気中のレボグルコサン濃度	下田 喜則
② 広島市における要監視項目（金属類）の測定結果について	竹井 秀夫

# 食品中のポテトグリコアルカロイド分析法の検討

生 活 科 学 部 松 木 司

## はじめに

ジャガイモには、ポテトグリコアルカロイド(以下、PGA)と呼ばれる毒素が含まれており、小学校の調理実習では、PGA が原因物質である食中毒が毎年のように発生している。

また、PGA の 95%は $\alpha$ -ソラニンと $\alpha$ -チャコニンであり、両物質の LC による試験方法が、一般試料と油脂試料に分けて、衛生検査指針理化学編(以下、検査指針)に記載されている。今回、この手法により分析法の検討を行ったので報告する。

## 方 法

### 1 試薬及び器具

#### (1) 標準品

$\alpha$ -ソラニンと $\alpha$ -チャコニンは、PhytoLab GmbH & Co. KG 製を用いた。

#### (2) 標準原液

両標準品をメタノールに溶解して、 $\alpha$ -ソラニンは $100 \mu\text{g/ml}$ とし、 $\alpha$ -チャコニンは $80 \mu\text{g/ml}$ とした。

#### (3) 検量線作成用標準溶液

両標準原液を混合し、メタノールで希釈し、両物質共に  $5, 10, 15, 20 \mu\text{g/ml}$  となる標準溶液を作成した。

#### (4) その他の試薬

メタノールとアセトニトリルは、関東化学(株)製の高速液体クロマトグラフィー用を使用した。

精製のミニカートリッジカラムは、Waters 製の Sep-Pak Plus C18 と Sep-Pak Plus NH2 を使用した。

### 2 装置及び測定条件

装置及び測定条件を表 1 に示す。

### 3 添加回収試験

一般試料として、生ジャガイモとマッシュポテトを、油脂試料として、ポテトチップスとフライドポテト(冷凍食品)を用いた。

生ジャガイモとフライドポテトはスピードカッターで細断し、ポテトチップスはビニール製袋に入れ手で粉碎し、マッシュポテトはそのまま使用した。

各試料 5g に両標準原液を各々 1.5ml 添加したものと無添加のものを試験試料とした。一般試料の前処理のフローを図 1 に、油脂試料については図 2 に示す。

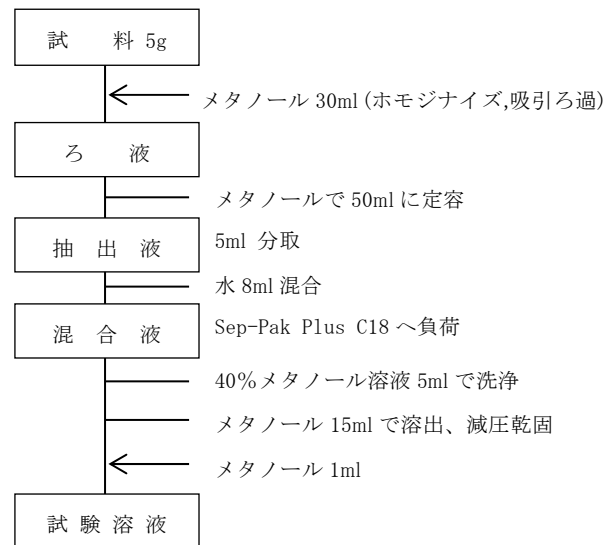


図 1 一般試料の前処理

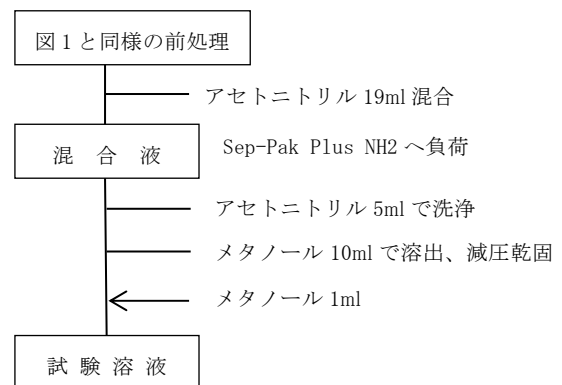


図 2 油脂試料の前処理

表 1 高速液体クロマトグラフ装置及び測定条件

装置	(株)島津製作所製 LC-20ADXR
検出器	(株)島津製作所製 SPD-M20A
カラム	Intersil NH2 5 $\mu\text{m}$ 4.6 $\times$ 250mm
カラム温度	40 $^{\circ}\text{C}$
移動相	アセトニトリル:20mM/1 リン酸二水素 カリウム水溶液 = 25:75
流速	0.7ml/min
注入量	20 $\mu\text{l}$
検出波長	202 nm

各試験溶液中の $\alpha$ -ソラニンと $\alpha$ -チャコニン的高速液体クロマトグラフ装置で定量し、添加試料の含有量から無添加試料の含有量を差し引き、回収率を算出した。

#### 4 メタノール溶液洗浄による目的物の損失確認

本法では、試料抽出液を Sep-Pak Plus C18 に負荷後、40%メタノール液 5ml で洗浄したが、この洗浄液のメタノール濃度が測定値に影響を与える可能性が指摘されている<sup>1)</sup>。そこで、標準原液を添加回収試験と同様に添加したマッシュポテトを試料とし、洗浄液のメタノール濃度を 40, 30, 20, 10% として各々処理し測定値を比較した。

### 結果と考察

#### 1 添加回収試験

結果を表 2 に示す。

表 2 回収率 (%)

試料	$\alpha$ -ソラニン	$\alpha$ -チャコニン
生ジャガイモ	91.9	88.2
マッシュポテト	67.5	85.5
ポテトチップス	76.8	85.0
フライドポテト	88.7	112.9

$\alpha$ -ソラニンは、試料の種類によって回収率のばらつきがみられるが、 $\alpha$ -チャコニンは、フライドポテトを除くと同程度の回収率が得られた。

マッシュポテトでの $\alpha$ -ソラニンの回収率が一般的な回収率の目標値である 70~120%の範囲をわずかに下回ったが、その他の回収率はこの範囲内であった。

#### 2 メタノール溶液洗浄による目的物の損失確認

洗浄液のメタノール濃度を 10%とした時の試験溶液中の $\alpha$ -ソラニン濃度を 1.0 とし、洗浄液のメタノール濃度を 20, 30, 40%とした時の各試験溶液中の $\alpha$ -ソラニン濃度との比を図 3 に示す。また、同様に $\alpha$ -チャコニンの場合を図 4 に示す。両図から、 $\alpha$ -ソラニンの損失と洗浄液のメタノール濃度の間には関係性はみられず、 $\alpha$ -チャコニンは洗浄液のメタノール濃度が高い程、損失が大きくなる傾向が伺えた。

#### 3 夾雑物ピークについて

図 5 に、マッシュポテトとポテトチップスのクロマトグラムを示す。マッシュポテトでは、 $\alpha$ -チャコニンの近傍に 3 本の夾雑物ピークがある。生ジャガイモとフライドポテトも同様のパターンを示した。一方、ポテトチップスではこれらの夾雑物

ピークはなかった。また、冷凍保存したマッシュポテトを約 4 月後に測定したところ、夾雑物ピークは消失していた。夾雑物ピークの成分は PGA より不安定であるが、測定の際には、これらの存在を把握し $\alpha$ -チャコニンとの分離を確認する事が重要である。また、測定時間短縮の為、流速を上げた測定、あるいは 150mm カラムの使用を試みたが、夾雑物ピークが $\alpha$ -チャコニンに重複し困難であった。

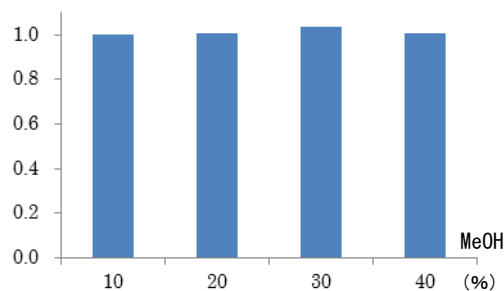


図 3 MeOH 溶液洗浄による $\alpha$ -ソラニンの損失

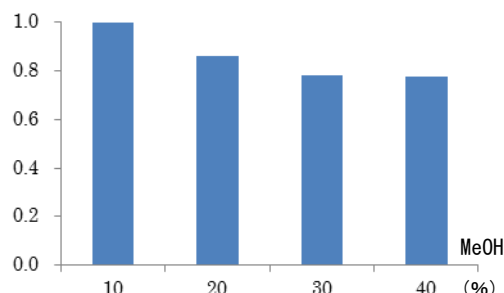


図 4 MeOH 溶液洗浄による $\alpha$ -チャコニンの損失

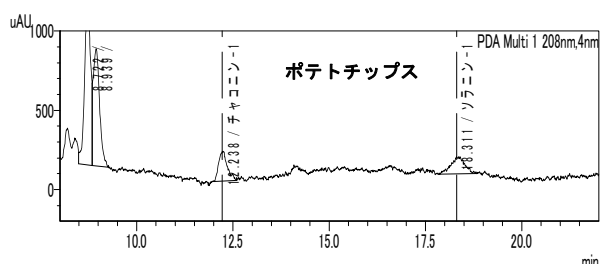
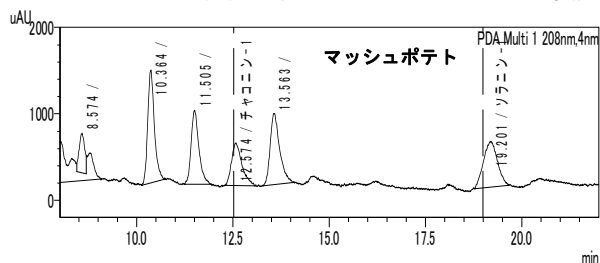


図 5 PGA 無添加試料のクロマトグラム

### 文献

- 1) 米澤 友紀子 他: 地域保健総合推進事業におけるポテトグリコアルカロイドの精度管理事業について, 第 56 回全国衛生化学技術協議会講演集, 98~99(2019)

## アゾ染料由来の特定芳香族アミン類の定量試験に関する検討

### —分散染料が使用されている繊維製品の場合—

生活科学部 長谷川 富子

#### 1、はじめに

平成27年4月8日に「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」における有害物質にアゾ化合物が指定されたことに伴い、平成27年7月9日に当該家庭用品を指定するとともに、家庭用品の区分に応じて基準が定められました。

今年度、分散染料を使用している可能性のある繊維製品について定量試験方法の検討を行ったので、その結果を報告します。

#### 2、試験方法

有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則に示されている試験法に基づき実施しました。分散染料が使用されている可能性のある試料の試験方法は次のとおりです。短冊状に試料を調整し、クロロベンゼンによる還流抽出を行います。脱色した場合には、試料残さを破棄し溶液を還元処理します。完全に脱色しない場合は、試料を細切し直接還元処理します。パラ-フェニルアゾアニリンは40℃、その他の特定芳香族アミンは70℃で亜ジチオン酸ナトリウムで還元します。次にパラ-フェニルアゾアニリンはMTBEで液々抽出操作を行い、その他の特定芳香族アミン類は珪藻土カラムに負荷しMTBEで溶出させます。その後、GC/MS (SIM) により測定します。

2-メチル-4-(2-トリルアゾ)アニリンや2-メチル-5-ニトロアニリンは還元処理により、オルト-トルイジンや2,4-ジアミノトルエンとして測定されるので実際には測定できません。パラ-フェニルアゾアニリンはアニリンまたは1,4-フェニレンジアミンに分解されます。一定量のアニリンまたは1,4-フェニレンジアミンを確認した場合はパラ-フェニルアゾアニリンの追加試験を行う必要があります。これらのことを踏まえて、パラ-フェニルアゾアニリン及び23種の特定芳香族アミン類の添加回収試験を行いました。測定には、島津製作所製GCMS-QP2020NXを使用しました。

#### 3、結果及び考察

(1) パラ-フェニルアゾアニリンを試料1gに50 $\mu$ g添加したときの添加回収試験結果は表1のとおりでした。パラ-フェニルアゾアニリンのJIS L 1940-3の回収率の最低要求基準は60%であり、添加回収率の平均は約68%で良好でした。分散染料の抽出のために行う、クロロベンゼンによる抽出操作及び濃縮操作を丁寧に行うことが必要だと考えられました。

(表1) パラ-フェニルアゾアニリンの実試料への添加回収試験結果

試料名	濃度 ( $\mu$ g/g)			回収率 (%)
	添加試料	無添加試料	差	
ドレス[ピンク色]	33	0	33	66
帽子[茶色]	32	0	32	64
中衣[淡赤色]	34	0	34	68
オールインワン[灰色]	42	0	42	84
カバーオール[ピンク色]	28	0	28	56

(2) JIS L 1940-1 の添加回収試験では、各アミンが 30  $\mu$ g (アニリン及び 1,4-フェニレンジアミンは 5  $\mu$ g) 生じる容量並びに 2.0ml のメタノールを、予熱した 15ml クエン酸/水酸化ナトリウム緩衝液の入った反応溶液に加えます。今回は、繊維製品中に遊離体として芳香族アミン類が残存する可能性を考慮してクロロベンゼン抽出からの添加回収試験も併せて行いました。パラ-フェニルアゾアニリン以外の特定芳香族アミン類の添加回収試験の結果は表 2 のとおりでした。

(表 2) 23 種特定芳香族アミンの添加回収試験結果

	化合物名	必要回収率 (%)	クロロベンゼン抽出なし (%)	クロロベンゼン抽出あり (%)
1	アニリン	70	84	41
2	o-トルイジン	50	91	69
3	2,4-ジメチルアニリン	なし	91	81
4	2,6-ジメチルアニリン	なし	95	83
5	o-アニジジン	70	94	81
6	p-クロロアニリン	70	91	79
7	2-メトキシ-5-メチルアニリン	70	90	85
8	2,4,5-トリメチルアニリン	70	95	86
9	1,4-フェニレンジアミン	なし	6	6
10	4-クロロ-2-メチルアニリン	70	92	85
11	2,4-ジアミノトルエン	50	73	70
12	2,4-ジアミノフェノール	20	35	40
13	2-ナフチルアミン	70	72	92
14	4-アミノフェニル	70	73	82
15	4,4'-ジアミノフェニルエーテル	70	73	84
16	4,4'-メチレンジアニリン	70	85	88
17	ベンジジン	70	83	85
18	4,4'-ジアミノ-3,3'-ジメチルフェニルメタン	70	78	95
19	3,3'-ジメチルベンジジン	70	87	88
20	4,4'-ジアミノフェニルスルフィド	70	86	93
21	3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノフェニルメタン	70	99	102
22	3,3'-ジクロロベンジジン	70	94	97
23	3,3'-ジメチルベンジジン	70	77	80

クロロベンゼンでの抽出操作を行わない添加回収試験では、アニリンも含め特定芳香族アミン類の回収率は良好でした。クロロベンゼン抽出操作を行った添加回収試験では、アニリン以外の回収率は良好でした。つまり、クロロベンゼンによる抽出及び濃縮操作の過程で、アニリンの損失が起きていると考えられます。

「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則」では、クロロベンゼン抽出液の濃縮操作は、45～60℃で濃縮するようになっていますが、突沸しないように減圧度を調整し、時間をかけて穏やかに濃縮してもアニリンの回収率は約40%でした。クロロベンゼンの沸点（131℃）が高く、回収試験用アミン溶液中のアニリンと沸点差が他の芳香族アミン類と比べて近いことが影響したものと考えられます。

そこで、アニリンのd体であるサロゲート標準溶液を使用して、回収率の検討を行いました。基準値相当のアニリン標準溶液及びアニリン重水素化物を添加して、添加回収試験を行ったところ、回収率は104%(n=3)と良好な結果が得られました。

## PCRによるカンピロバクター・ジェジュニの Penner 血清型別法の検討

広島市衛生研究所生物科学部 ○池田伸代 清水裕美子 山本泰子  
栗林智早 青田達明 京塚明美 坂本 綾

### 1 はじめに

カンピロバクター属菌のうち、腸炎の原因菌となる主な菌種は *Campylobacter jejuni* (以下 *C. jejuni*) と *Campylobacter coli* の 2 菌種であり、食中毒起因菌として指定されている。*C. jejuni* による食中毒発生時の疫学解析の手法の一つとして受身血球凝集反応 (PHA) を利用した Penner 法 (以下 PHA 法) による血清型別が用いられる。PHA 法では市販試薬により 25 種の血清群の型別が可能であるが、約半数の株が型別不能となることが知られている。そこで 12 血清群 (15 の抗原因子グループ) の検出が可能なマルチプレックス PCR による Penner 血清型別法 (以下 PCR 法) の検討を行い、PHA 法で型別不能であった株について実施した。

### 2 材料と方法

2015～2019 年に医療機関から分与された、又は当所で分離した *C. jejuni* 448 株を供試した。市販カンピロバクター免疫血清 (デンカ生研株式会社) を用いた PHA 法を実施し、型別不能であった株、複数の血清群に凝集を示した株について PCR 法を実施した。

PCR 法に供した DNA テンプレートはアルカリ熱抽出法により調製した。プライマーは Poly 法<sup>1)</sup>の方法に従った。マルチプレックス PCR は、10 の Penner 血清群 (A, B, C, D, F, G/HS17, I, L/U, R, Z2) を 13 の Penner 抗原因子グループ (HS1, HS2, HS3, HS4A, HS4B, HS6/HS7, HS8/HS17, HS10, HS15/HS31, HS23/HS36, HS41, HS44, HS53) により型別する甲斐法<sup>2)</sup>の方法に準拠した。近年当所で分離株数の多い Penner0 群 (HS19) 及び PennerY 群 (HS37) についてモノプレックス PCR を実施、又は前述のマルチプレックス PCR 検出系に組み込んで実施した (表 1, 2)。陽性コントロールは東京都健康安全研究センターから分与されたものを使用し、陽性コントロールが入手できなかった血清群については、当所で分離された *C. jejuni* 株のうち PHA 法で該当血清群を示した株から抽出したテンプレートを陽性コントロールとした。当所で抽出した陽性コントロールは、PCR 産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により確認し使用した。

### 3 結果

448 株中、PHA 法で型別できたのは 150 株 (33.5%) であり、型別不能であった 297 株、複数の血清群に凝集を示した 1 株の合計 298 株を PCR 法に供したところ、267 株がいずれかの血清群に型別された (表 3)。

PCR 法を実施した 298 株のうち、PennerB 群と判定された株が 114 株 (38.3%)、Penner0 群と判定された株が 58 株 (19.5%) であった。PHA 法では型別できなかったが PCR 法により型別可能となった株の割合が高い血清群は、PennerB 群 (85.7%)、A 群 (83.3%)、R 群 (72.0%)、0 群 (63.7%) であった (図 1)。PCR 法に供した株のうち 31 株 (10.4%) は型別不能であった。

PHA 法と PCR 法を併用することにより、448 株中 417 株の血清群を決定することができ、型別率は PCR 法実施前の 33.5% から 93.1% へ向上した。

### 4 考察

PennerB 群については市販血清の型別率の低さが指摘されているが<sup>3)</sup>、B 群だけでなく A 群、0 群、R 群についても、PHA 法では型別率が低い結果となり、それを PCR 法で補うことができた。

文献によると、PennerG 群 (HS8)/HS17 検出用プライマーで、PennerV 群 (HS32) であってもバンドが検出される場合があること、また PennerL 群 (HS15)/U 群 (HS31) 検出用プライマーで、HS58 であってもバンドが検出される場合があることが判明している<sup>1)</sup>。当所ではその判別をしていないので、G/HS17 とした株の中に V 群であるものが含まれる可能性、L/U とした株の中に HS58 であるものが含まれる可能性がある。また、L 群と U 群は血清学的な関連はないにもかかわらず、当所の検出系では区別ができていない。今後はこれらの判別のための検出系の追加のほか、現在当所で検出対象としていない血清群の検出系の追加を検討していければと考える。



表 1 プライマーミックスの組み合わせとプライマー濃度

Primer mix	抗原因子	Penner血清群	終濃度(μM)	(bp)
1	HS2	B	0.4	62
	HS3	C	0.2	149
	HS10	I	0.2	229
	HS19	O	0.2	450
2	HS1	A	0.1	607
	HS8/HS17	G/HS17	0.2	342
	HS23/HS36	R	0.2	161
3	HS6	F	0.2	185
	HS15/HS31	L/U	0.2	325
	HS44	A	0.2	148
	HS53	R	0.4	251
	HS37	Y	0.2*	541
4	HS4A	D	0.4	370
	HS4B	D	0.3	652
	HS41	Z2	0.2	279

※ モノプレックスで実施する場合は0.1 μMとした

表 2 PCR 反応条件

	(μl)
10×Ex-taq buffer*	2.5
2.5mM dNTP*	2
50×Primer mix	0.5
Ex Taq Hot Start Version*	0.15
Templete DNA	2
DW	17.85
	25

※ タカラバイオ株式会社

35 cycle	94 °C	1 min
	94 °C	30 sec
	56 °C	60 sec
	72 °C	90 sec
	72 °C	5 min

表 3 PHA 法及び PCR 法による Penner 血清群型別株数

血清群	PHA	(%)	PCR	(%)	PHA+PCR	(%)
A	3	(0.7)	15	(5.0)	18	(4.0)
B	19	(4.2)	114	(38.3)	133	(29.7)
C	6	(1.3)	2	(0.7)	8	(1.8)
D	19	(4.2)	13	(4.4)	32	(7.1)
E	1	(0.2)	—	—	1	(0.2)
F	17	(3.8)	4	(1.3)	21	(4.7)
G	8	(1.8)	—	—	8	(1.8)
G/HS17	—	—	21	(7.0)	21	(4.7)
I	3	(0.7)	5	(1.7)	8	(1.8)
J	6	(1.3)	—	—	6	(1.3)
K	6	(1.3)	—	—	6	(1.3)
L	7	(1.6)	—	—	7	(1.6)
L/U	—	—	8	(2.7)	8	(1.8)
O	33	(7.4)	58	(19.5)	91	(20.3)
R	7	(1.6)	18	(6.0)	25	(5.6)
U	1	(0.2)	—	—	1	(0.2)
Y	8	(1.8)	9	(3.0)	17	(3.8)
Z	2	(0.4)	—	—	2	(0.4)
Z6	4	(0.9)	—	—	4	(0.9)
小計	150	(33.5)	267	(89.6)	417	(93.1)
UT*	298	(66.5)	31	(10.4)	31	(6.9)
合計	448	(100.0)	298	(100.0)	448	(100.0)

※ UT:Untypable. PHAでは複数血清へ凝集した株も含む。

## 5 文献

- 1) Poly F et al.: Updated *Campylobacter jejuni* Capsule PCR Multiplex Typing System and Its Application to Clinical Isolates from South and Southeast Asia, PLoS ONE, 10(12), e0144349 (2015)
- 2) 甲斐明美 他:カンピロバクターの型別方法の検討と分離菌株の特徴, 厚労科研「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班平成 26 年度総括・分担研究報告書, 41~46(2015)
- 3) 甲斐明美 他:カンピロバクターの型別方法の検討と分離菌株の特徴, 厚労科研「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班平成 27 年度総括・分担研究報告書, 51~56, (2016)

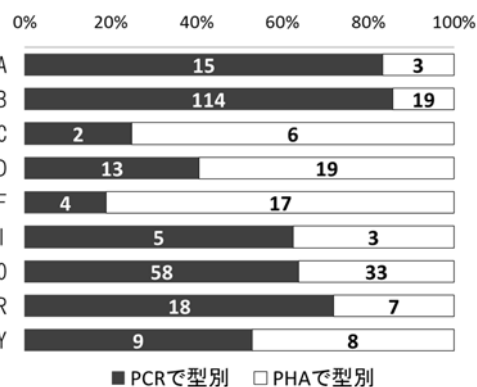


図 1 各方法で血清群を型別できた株数

# 広島市で検出された基質拡張型β-ラクタマーゼ産生腸管出血性大腸菌について

生物科学部 栗林 智早

## 1. はじめに

腸管出血性大腸菌(*Enterohemorrhagic Escherichia Coli*: EHEC)感染症は、感染症法の3類感染症として届出が義務づけられ、国内での年間報告数は4000件前後を推移している<sup>1)</sup>。

基質拡張型β-ラクタマーゼ(Extended Spectrum β-Lactamase: ESBL)は、Amber分類のクラスAに属し、ペニシリンや第3、第4世代セファロスポリン等のβ-ラクタム薬を分解する酵素である。ESBL産生菌による感染症は院内感染のみならず、市中でも増加傾向を示しており、公衆衛生上の問題となっている。ESBL産生菌の多くは大腸菌O25やO86であることが報告されているが<sup>2)</sup>、ESBL産生EHECの報告例は比較的少ない。今回、当所においてESBL産生EHECを検出したのでその事例について報告する。

## 2. 概要

2019年7月市内医療機関より腸管出血性大腸菌感染症の届出があり、患者菌株、患者便及び患者家族便が搬入された。患者家族便からEHECが検出され無症状病原体保有者として腸管出血性大腸菌感染症の届出がされた。

## 3. 方法

選択分離培地としてクロモアガーSTECを用いて培養し、発育した特徴的な藤色コロニーについて性状確認、血清型別、VT毒素遺伝子を確認した。また、Clinical&Laboratory Standard Institute(CLSI)に準拠しKirby-Bauer法による薬剤感受性試験を実施した。更に分子疫学的解析手法であるMulti-locus variable-number tandem repeat analysis(MLVA)及び制限酵素Xba Iを用いてPulsed-field gel electrophoresis(PFGE)を実施した。なお、MLVAについては国立感染症研究所に菌株を送付し型番の付与を受けた。

薬剤感受性試験において、セフトキシム(CTX)耐性となった菌株について、ESBLスクリーニング検査を実施した。国立感染症研究所薬剤耐性菌研修会収載の方法に従い、阻害剤であるクラブラン酸及びスルバクタムによるディスク法とPCR法によるESBL遺伝子の検出を行った。検出された遺伝子については、山口らの報告<sup>3)</sup>を参考に塩基配列を決定し、アミノ酸に変換した後、参照株との相同性解析を実施し、遺伝子型を決定した。また、CTX感受性菌株についても、確認のためESBL遺伝子試験を実施した。

## 4. 結果・考察

患者菌株及び患者家族菌株は、O103:H2 VT1産生EHECであった。MLVA型は両株とも19m4014であり、PFGEは同一パターンを示し(図1)、患者家族と患者家族菌株は、同一由来であることが示唆された。一方、薬剤感受性試験を実施したところ(表1)、患者菌株はセフトキシム(CTX)耐性であったが、患者家族菌株はCTX感受性という結果であった。患者菌株は、クラブラン酸による阻害効果があり、さらに遺伝子解析を実施した結果(図2)、*bla*<sub>CTX-M-2</sub>を保有していたことからESBL産生EHECであることが判明した。患者家族菌株は、薬剤耐性遺伝子は確認されなかった。

ESBL遺伝子はプラスミド上に存在し、菌種間を超えて伝播することが報告されていることから、患者菌株と患者家族菌株で薬剤耐性遺伝子保有の有無が生じたことが推測される。

今回、報告例の少ない ESBL 産生 EHEC を検出した。患者家族菌株は ESBL 産生株ではなかったが、薬剤耐性菌の市中感染拡大防止対策の一助として、今後も EHEC の薬剤耐性株の検索をし、その動向に注視していきたいと考えている。

- 1) 病原微生物検出情報：腸管出血性大腸菌感染症 2019 年 3 月現在，40(5)71~72(2019)
- 2) Suzuki,S.et al,Antimicrob.Agents Chemother.63(2009),72-79
- 3) 山口 友美 他：基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼを産生する腸管出血性大腸菌 O15 の遺伝子解析，宮城県保健環境センター年報，(30)，27~30(2012)

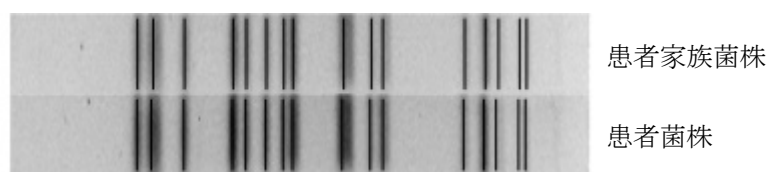


図 1 患者菌株と患者家族菌の PFGE 解析結果

表 1 薬剤感受性試験結果

薬剤ディスク	患者	患者家族
Ampicilin(ABPC)	R	I
Cefotaxime (CTX)	R	S
Ceftazidime (CAZ)	I	S
Cefmetazole(CMZ)	S	S
Imipenem(IPM)	S	S
Meropenem(MEPM)	S	S
Streptomycin(SM)	S	S
Kanamycin(KM)	S	S
Gentamicin(GM)	S	S
Tetracyclin(TC)	S	S
Chloramphenicol(CP)	S	S
Nalidixic Acid(NA)	S	S
Ciprofloxacin(CPFX)	S	S
Trimethoprim(TMP)	S	S
Sulfamethoxazole/Trimethoprim(SXT)	S	S
Fosfomycin(FOM)	S	S

S：感性 I：中間耐性 R：耐性

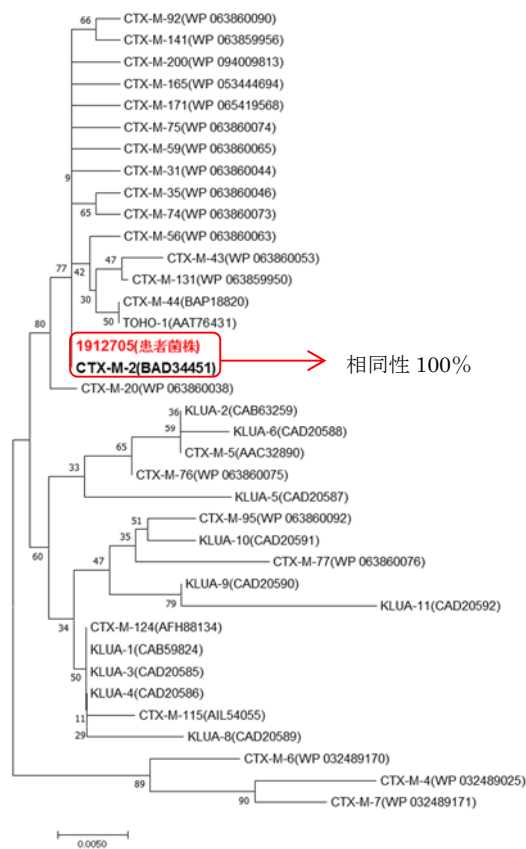


図 2. CTX-M 遺伝子分子系統樹(291 アミノ酸)

## 1 はじめに

ロタウイルス（RV）は主に冬から春にかけて流行し、嘔吐、下痢、発熱といった症状を引き起こす。RVは抗原性に基づいて、A群～G群に分類されているが、ヒトに感染し流行を起こすのは多くがA群ロタウイルス（RVA）である。RVAに感染すると、通常は1～2週間で治癒するが、時に脳炎などの重篤な合併症を併発する場合もある。治療法は特異的なものはなく、補液などの対症療法となるが、ワクチンによる重症化予防が可能である。日本においてはヒトロタウイルスG1P[8]株を弱毒化したワクチン（ロタリックス）及びウシロタウイルスとヒトロタウイルスを組み合わせたワクチン（ロタテック）が任意接種されており、重症患者は減少傾向にある。

RVAに感染すると、便中に多量のRVAが排出される。その検査方法は、イムノクロマト法（IC法）、遺伝子検査法及びELISA法など様々なものがあるが、とりわけ、IC法は臨床現場で多用されている。しかし、IC法キットは複数販売されており、各キットの遺伝子型による検出感度については不明であるため、その検討を行った。また、2010年から2019年までに当市で検出されたRVAのVP7（G型）及びVP4（P型）領域の遺伝子型別を行い、流行遺伝子型の経年変化を調べた。

## 2 材料及び方法

### (1) IC法の検討

標準物質を用いた定量リアルタイムPCR法により、5種類の異なる遺伝子型の便1g当たりのコピー数を定量した。それら便の10%懸濁液を10倍段階希釈し、市販されている3種類のICキットで検査を行い、各検出感度を調べた。

### (2) RVAの遺伝子型別分類

2010年から2019年までの期間に検出されたRVA40株のVP7及びVP4領域の遺伝子解析を行い、遺伝子型を調べた。

## 3 結果及びまとめ

IC法の検討結果を表に示す。3種類のキットでIC法を検討した結果、G1P[8]、G3P[8]、G3P[9]は便1g当たり $10^8$ コピー程度、G2P[4]は $10^{10}$ コピー程度、G9P[8]は $10^{11}$ コピー程度が検出限界であり、遺伝子型によって検出感度に差がみられた。また、3種類のキット間でも検出感度に差がみられた。

当市検出のRVA遺伝子型（図）は年によって傾向が変わり、2010年から2013年まではG1P[8]が主流であったが、2015年から2016年はG2P[4]、2018年以降はG9P[8]が多く検出された。ロタウイルスワクチンが日本に導入されて9年が経過し、2020年からの定期接種化が実現した。これによりロタウイルス性胃腸炎による重症患者数は現在より減っていくことが予想される。今後ワクチンの選択圧等の影響により検出されるRVAの遺伝子型が、どのように推移していくか把握するため解析を継続していきたい。

表 遺伝子型による I C 法検出感度の比較

G1P[8]	A	B	C	コピー数/便 1g
原液	-	+	+	$2.59 \times 10^8$
× 10 希釈	NT	-	-	$2.59 \times 10^7$

G2P[4]	A	B	C	コピー数/便 1g
原液	+ <sup>w</sup>	+	+	$1.41 \times 10^{11}$
× 10 希釈	-	-	+ <sup>w</sup>	$1.41 \times 10^{10}$
× 100 希釈	NT	NT	-	$1.41 \times 10^9$

G9P[8]	A	B	C	コピー数/便 1g
原液	+	+	+	$8.21 \times 10^{11}$
× 10 希釈	-	+ <sup>w</sup>	-	$8.21 \times 10^{10}$
× 100 希釈	-	-	-	$8.21 \times 10^9$

G3P[8]	A	B	C	コピー数/便 1g
原液	+	+	+	$2.01 \times 10^{10}$
× 10 希釈	+ <sup>w</sup>	+	+	$2.01 \times 10^9$
× 100 希釈	-	+ <sup>w</sup>	-	$2.01 \times 10^8$
× 1000 希釈	NT	-	NT	$2.01 \times 10^7$

G3P[9]	A	B	C	コピー数/便 1g
原液	+	+	+	$1.20 \times 10^{10}$
× 10 希釈	-	+	+	$1.20 \times 10^9$
× 100 希釈	NT	+ <sup>w</sup>	-	$1.20 \times 10^8$
× 1000 希釈	NT	-	NT	$1.20 \times 10^7$

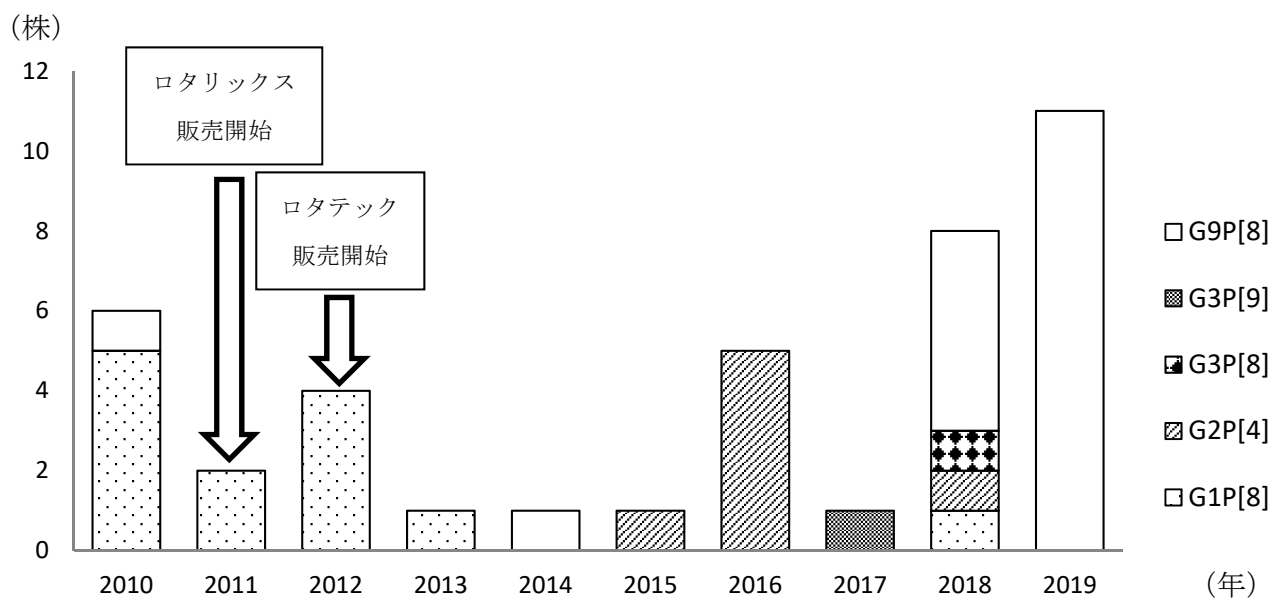


図 2010年～2019年のRVA検出数

# 広島市における大気中のレボグルコサン濃度

環境科学部 下田喜則

## はじめに

本市では、ダイオキシン類対策特別措置法に基づき、ダイオキシン類に係る環境調査を委託により行っているが、継続的に、安芸地区における大気中のダイオキシン類の濃度が高値となっている(図1)。

大気中のダイオキシン類調査は年4回実施しており、安芸地区では秋季から冬季にかけて濃度が高くなる傾向にある。調査地点周辺は、大規模な工場、事業場がなく、農作地利用が多いことから、ダイオキシン類が高値となる要因として、野焼き等のバイオマス燃焼の影響が考えられる。

このため、本調査は、バイオマス燃焼の有機マーカであるレボグルコサンに着目し、大気中のダイオキシン類を調査する時期に合わせ、同地点で、レボグルコサンの調査を行った。

また、バイオマスの不完全燃焼時に発生するベンゾ[a]ピレン及び多成分が同時に分析できる揮発性有機化合物を合わせて調査を行ったので、その結果を報告する。

## 方法

調査は、令和元年5月、7月、11月及び令和2年2月に実施した。

レボグルコサン、ベンゾ[a]ピレン及び揮発性有機化合物の試料採取期間は、ダイオキシン類の試料採取期間である7日間のうち、24時間とした。調査地点は、図2に示す。

### (1) レボグルコサン

試料は、環境省の有害大気汚染物質等測定方法マニュアル(以下「環境省マニュアル」という。)のハイボリウムエアサンプラによるフィルタ採取による方法に準じて採取した。試料採取には、ふっ素樹脂フィルタを使用した。

試料採取したフィルタの一部を分取し、ジクロロメタン/メタノールで抽出した後、BSTFAで誘導体化し、GC-MSで分析した。

### (2) ベンゾ[a]ピレン

試料は、レボグルコサンの試料採取に使用したフィルタを用い、環境省マニュアルに準じて分析した。

### (3) 揮発性有機化合物

6Lキャニスターを用い、環境省マニュアルに準じて試料を採取し、分析した。測定項目は、ベンゼン等有害大気汚染物質21物質を含む50項目とした(使用した標準原ガスは、住友精化製HAPs-J44+F7)。

## 結果

図3に、レボグルコサン及びベンゾ[a]ピレン調査結果を示す。安芸区スポーツセンター(以下「安芸区SC」という。)が2物質ともに、他地点より高値であり、特に、秋季が高濃度であった。また、ダイオキシン類の濃度の変動に対し、レボグルコサン及びベンゾ[a]ピレンの濃度は同様の挙動を示した。

揮発性有機化合物は、安芸区SCのジクロロメタン及び1,2-ジクロロエタンが同一日に試料採取した他地点より高値であった(図4)。その他の項目は、他地点と同様の挙動を示した。

## 文献

- 1) 萩野浩之：大気中PM2.5のレボグルコサン測定研究の動向，大気環境学会誌，54(1)，18～27(2019)
- 2) 萩野浩之：さいたま市における初冬季の微小粒子中のレボグルコサンと炭素成分，エアロゾル研究，21，38-44(2006)
- 3) 熊谷貴美代：有機マーカに着目したPM2.5の動態把握と発生源寄与評価，大気環境学会誌，53(3)，A50～52(2018)
- 4) 下田喜則：広島市におけるダイオキシン類調査について，広島市衛研年報，37，89-92(2018)
- 5) 長谷川就一：野外焼却の実態とPM2.5濃度への影響に関する考察，大気環境学会誌，52(1)，40～50(2017)
- 6) Engling, G. : Size-Resolved Anhydro-sugar Composition in smoke aerosol from controlled field burning of rice straw, Aerosol Sci. Technol., 43, 662～672(2009)
- 7) Zhang, T. : Source profiles of particulate organic matters emitted from cereal straw burnings, J. Environ. Sci., 19,

167~175(2007)

- 8) Zhang, T. : Characterization and seasonal variations of levoglucosan in fine particulate matter in Xi'an, China, J. Air Waste Manag. Assoc., 64, 1317~1327 (2014)

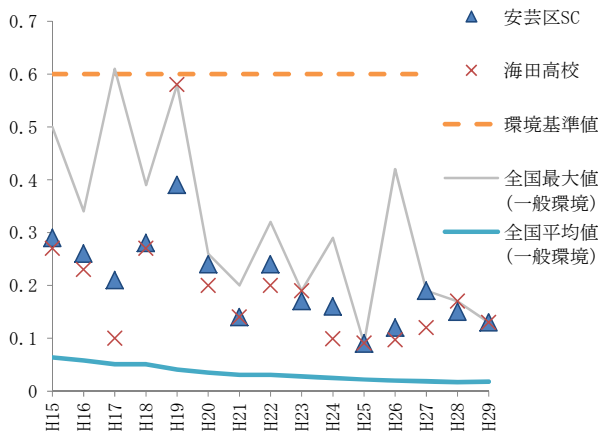


図1 安芸地区における大気中のダイオキシン類濃度の推移

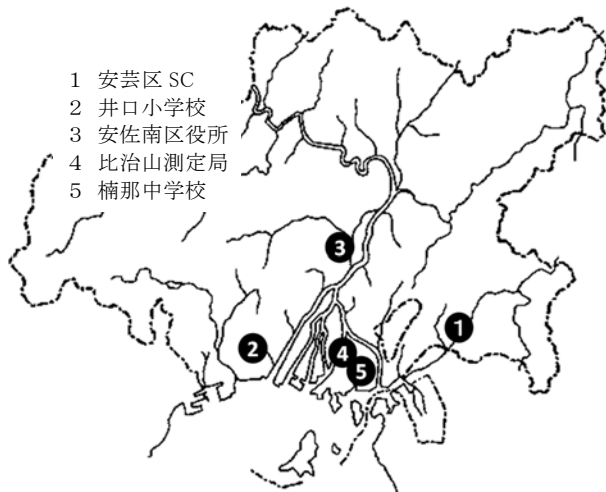


図2 調査地点

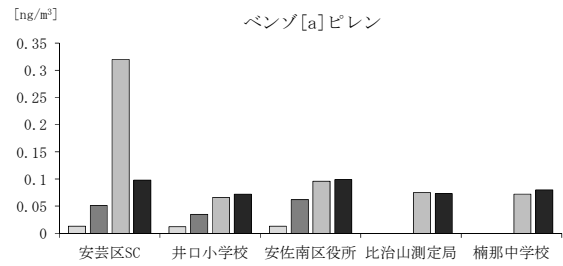
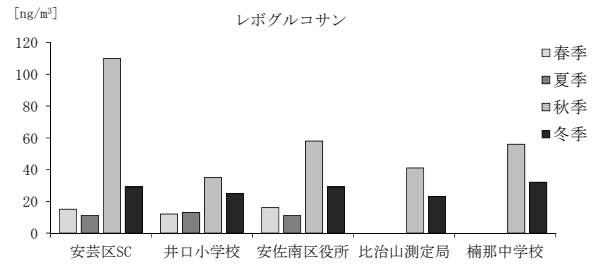


図3 レボグルコサン等の調査結果

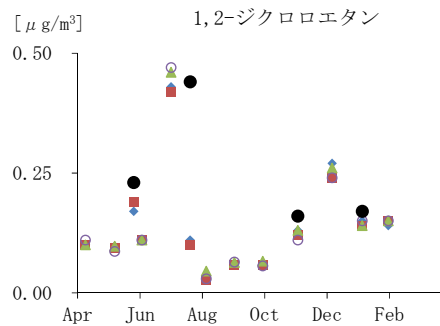
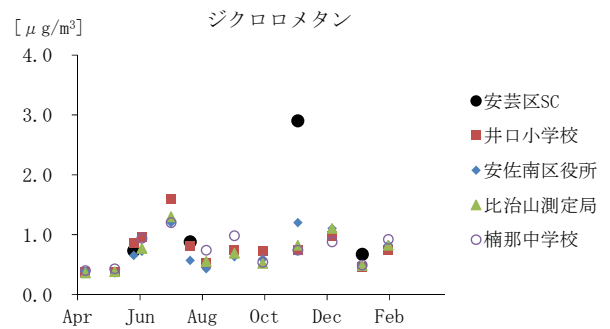


図4 揮発性有機化合物の測定結果

〔レボグルコサン調査時の結果のほか、毎月実施している有害大気汚染物質調査の結果を示した。〕

# 広島市における要監視項目（金属類）の測定結果について

環境科学部 竹井 秀夫

## はじめに

公共用水域等の水質測定項目のうち、要監視項目である金属類（表1の項目）については、平成30年度に分析方法を検討し、目標定量下限値を満たす結果が得られた<sup>1)</sup>。

本年度は、昨年度検討した分析方法を用いて、市内の河川水の調査をしたので、その結果を報告する。

表1 要監視項目、指針値及び定量下限値<sup>2)</sup>  
(抜粋) 単位：mg/L

項目	指針値	定量下限値 <sup>2)</sup>
ニッケル (Ni)	—	0.001
モリブデン (Mo)	0.07 以下	0.007
アンチモン (Sb)	0.02 以下	0.001
全マンガン (Mn)	0.2 以下	0.005
ウラン (U)	0.002 以下	0.0002

## 方 法

### 1 調査地点（図1）及び頻度

表2及び表3のとおり

### 2 分析方法

平成30年度に検討した分析方法<sup>1)</sup>に従い、測定した。

試料量は原則50mlとした。なお、海水の影響が考えられるF新大州橋及びG仁保橋については、超純水47.5mlに試料2.5mlを加えて20倍希釈にして測定した。

### 3 測定装置

誘導結合プラズマ-質量分析装置

サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）製 ICP-MS X-Series II

各測定元素に対する測定モード及び内部標準元素を表4に示す。

内部標準液は、7元素混合溶液(Be, Co, Ga, Y, In, Tl, Te 各5µg/L)を使用した。

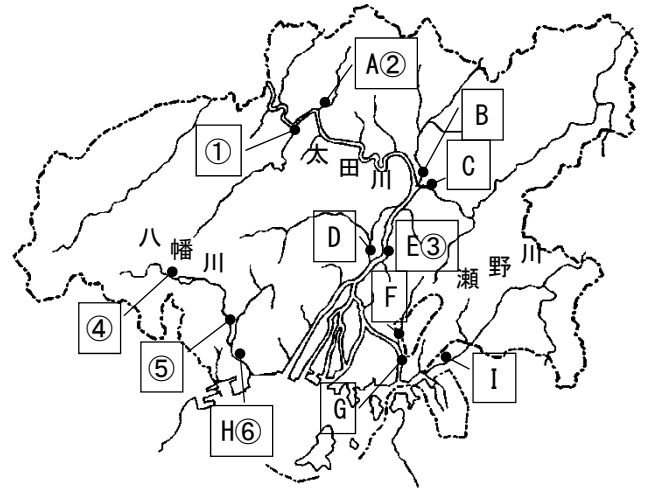


図1 調査地点

表2 一般調査地点（図1のA～I）

A	宇津橋（②と同地点）	
B	根の谷橋	
C	深川橋	
太田川水系	D 東原	
E	戸坂上水道取水口（③と同地点）	採水頻度： 3か月に
F	新大州橋	1回
G	仁保橋	
八幡川水系	H 泉橋（⑥と同地点）	
瀬野川水系	I 日浦橋	

表3 通年調査地点（図1の①～⑥）

	① 吉山川	
太田川水系	② 宇津橋	
	③ 戸坂上水道取水口	採水頻度： 毎月1回
八幡川水系	④ 魚切貯水池上流	
	⑤ 郡橋	
	⑥ 泉橋	



表4 測定モード及び内部標準元素

	モード	内標元素
<sup>55</sup> Mn	STD	<sup>115</sup> In
<sup>60</sup> Ni	STD	<sup>115</sup> In
<sup>95</sup> Mo	STD	<sup>115</sup> In
<sup>121</sup> Sb	STD	<sup>89</sup> Y
<sup>238</sup> U	STD	<sup>205</sup> Tl

結 果

表2の一般調査地点9地点(A~I)の測定結果を表5に示す。アンチモン(Sb)については全地点、モリブデン(Mo)についてはG仁保橋を除く全地点、ニッケル(Ni)についてはA宇津橋、C深川橋、D東原、E戸坂上水道取水口及びH泉橋、ウラン(U)についてはA宇津橋、C深川橋及びE戸坂上水道取水口において、全ての結果が定量下限値未満(以下、「N.D.」という。)であった。一方、F新大州橋及びG仁保橋においては、アンチモン(Sb)を除く4項目について、他地点と比較して高い値を示したが、いずれも年平均値は指針値より低い値であった。

また、表3の通年調査地点6地点(①~⑥)に

ついて、マンガン(Mn)及びウラン(U)の結果を図2及び3に示す。両項目とも年間を通じ、八幡川水系の下流地点である泉橋において、最も高い値であった。ウラン(U)については、夏場に値が低くなる傾向を示し、泉橋において顕著であった。泉橋以外の地点は定量下限値またはN.D.と低い値であったが、同じ傾向を示した。これは、降水量すなわち河川の流量の増減に反比例して夏場に濃度が低くなっている可能性を示唆している。一方、マンガン(Mn)については、季節と連動する傾向はみられず、年間を通じて大きく変動する地点が多かった。なお、ニッケル(Ni)、モリブデン(Mo)、アンチモン(Sb)については、全てN.D.であった。

文 献

- 1) 竹井秀夫: ICP-MSによる要監視項目(金属類)の測定について、平成30年度広島市衛生研究所業績発表会発表要旨集、9~10(2019)
- 2) 広島県: 平成31年度公共用水域等の水質測定計画 平成31年3月(2019)

表5 一般調査地点9地点(A~I)の測定結果

単位: mg/L

	A(宇津)	B(根谷)	C(深川)	D(東原)	E(戸坂)	F(新大州)	G(仁保)	H(泉)	I(日浦)
Ni	平均値 <0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	0.018	<0.001	0.001
	最小値 <0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.003	<0.001	<0.001
	最大値 <0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.004	0.030	<0.001	0.001
Mo	平均値 <0.007	<0.007	<0.007	<0.007	<0.007	<0.007	0.009	<0.007	<0.007
	最小値 <0.007	<0.007	<0.007	<0.007	<0.007	<0.007	<0.007	<0.007	<0.007
	最大値 <0.007	<0.007	<0.007	<0.007	<0.007	<0.007	0.011	<0.007	<0.007
Sb	平均値 <0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	最小値 <0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	最大値 <0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Mn	平均値 0.005	0.006	0.015	0.016	0.011	0.11	0.053	0.023	0.016
	最小値 <0.005	<0.005	0.009	0.012	0.007	0.013	0.028	0.020	0.006
	最大値 0.006	0.007	0.020	0.020	0.017	0.28	0.098	0.028	0.036
U	平均値 <0.0002	0.0002	<0.0002	0.0002	<0.0002	0.0009	0.0014	0.0005	0.0004
	最小値 <0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0004	0.0002	0.0002	<0.0002
	最大値 <0.0002	0.0002	<0.0002	0.0003	<0.0002	0.0013	0.0021	0.0007	0.0006

注) 平均値の計算に当たっては、当該地点における測定結果の算術平均値を記載した。ただし、定量下限値未満のデータが混在する場合は、定量下限値を用いて平均値を算出した。なお、全測定結果が定量下限値未満の場合は、平均値も定量下限値未満とした。有効数字は2桁までとし、その下の桁を四捨五入した。定量下限値の桁を下回る桁が残る場合は、定量下限値の下の桁で四捨五入した。

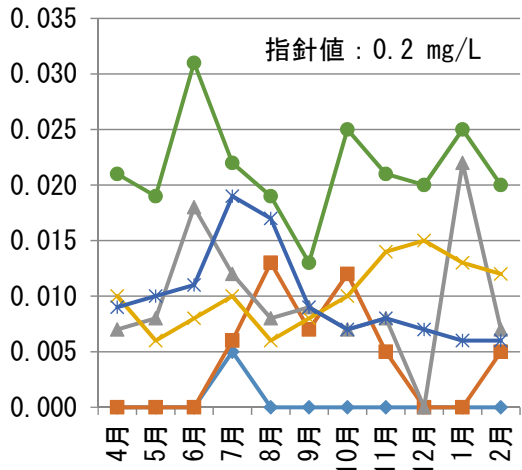


図2 通年調査地点のマンガン (Mn) の測定結果

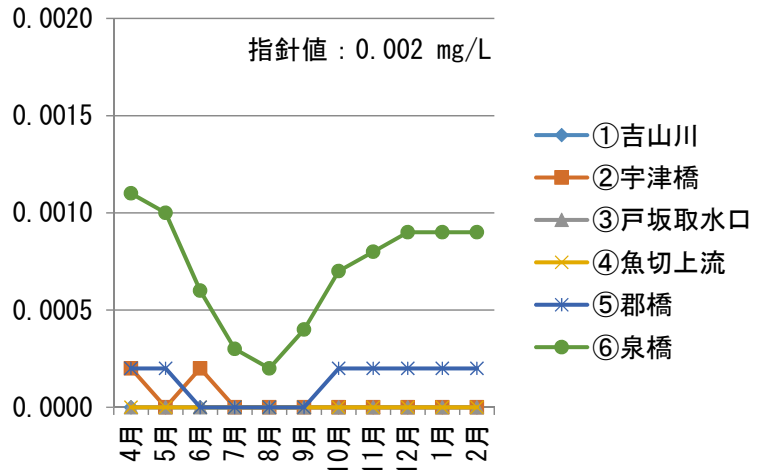


図3 通年調査地点のウラン (U) の測定結果