

平成28年度

広島市衛生研究所 業績発表会

発表要旨集

日時:平成29年3月10日(金) 13時30分～16時45分

場所:衛生研究所 1階 大会議室

広島市衛生研究所

## 平成 28 年度広島市衛生研究所業績発表会プログラム

開会挨拶 (石村所長)

業績発表 (発表・質疑時間合わせて 1 題につき 15 分程度)

ア 生活科学部 (座長：小中専門員) 13時35分～

<u>平成 28 年度アレルギー食品検査 (甲殻類) について</u>	田坂 葉子
<u>キャピラリーカラム・ECD 法による魚介類の PCB 測定の検討</u>	松木 司

イ 生物科学部 (座長：山本専門員) 14時5分～

<u>2016 年における不明熱患者から検出されたウイルスの検出状況及び遺伝子解析</u>	八島 加八
<u>ダニ媒介感染症の解析</u>	藤井 慶樹
<u>広島市のパレコウイルス検出状況</u>	則常 浩太

ウ 生物科学部 (座長：京塚専門員) 14時50分～

<u>2016 年に分離された腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析</u>	千神 彩香
<u>セレウス菌が検出された集団有症事例について</u>	竹原 佑美
<u>カンピロバクター分離株のギラン・バレー症候群 (GBS) 関連遺伝子の保有状況 (平成 27、28 年)</u>	池田 伸代

(休憩：5分)

エ 環境科学部 (座長：中島専門員) 15時40分～

<u>直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩 (LAS) の分析法の検討</u>	椋 佳奈
<u>広島湾における栄養塩類等の調査について</u>	竹井 秀夫
<u>有害大気汚染物質 (金属) の調査について</u>	原田 敬輔
<u>大気中の水銀およびフロン類の調査について</u>	村野 勢津子

閉 会

## 平成28年度アレルギー食品検査(甲殻類)について

生活科学部 田坂葉子

### 1 はじめに

平成13年4月、食物アレルギーを惹起する食品として、特定原材料等が定められ、患者数や症状の重篤度から、特にそのうちの5品目(卵、乳、小麦、そば、落花生)の特定原材料については容器包装への原材料表示が義務化された。

平成20年6月、甲殻類(えび・かに)が特定原材料に追加され、現在7品目が原材料表示を義務化、20品目が表示を推奨されている。

広島市では、特定原材料の混入について年に1品目ずつ収去検査している。平成28年度は甲殻類を対象とした検査を実施したのでその概要について報告する。

### 2 検査

#### (1) 試料

容器包装、表示された加工食品16食品を検査した。今回の検査では、甲殻類(えび・かに)表示がされている食品や、捕食や混獲の影響を受ける食品を検査の対象外とした。

#### (2) 試薬

「甲殻類」由来蛋白質(トホミソ)の抽出ならびに定量は、通知法<sup>1)</sup>に基づきニスイ製薬株式会社製「FAテストEIA-甲殻類 ニスイ」及び株式会社丸川に和食品社製「甲殻類キット丸川」を使用した。

#### (3) 機器

食品の粉碎・均質化にはSIBATA社製PERSONAL MILL SCM-40A及びPanasonic製MK-K81、遠心分離機はKUBOTA社製5100、吸光度の測定及び蛋白質の解析はBioTek社製Eonを使用した。

#### (4) 方法

通知法<sup>1)</sup>のとおり、抗原抗体反応を利用したサンドイッチ方式によるELISA法により3重測定でスクリーニング検査を実施した(定量試験)。吸光度の測定はプレートリーダー(主波長450nm、副波長650nm)で行い、4係数フィット曲線により作成した検量線からアレルギー蛋白質を定量した。通知法によるELISA法の陽性基準は10µg/gである。1度目の測定で8~12µg/gの数値を示した食品については、再度ELISA法を実施し、2回の測定結果の平均値により「陽性」を判断する。

### 3 検査結果

「甲殻類」のトホミソ蛋白質を対象とした検査結果は表のとおり、16食品全て10µg/g未満と陰性であった。「特殊かまぼこ」と「米菓」の2食品から定量値を超えるトホミソ蛋白質が検出された。

### 4 まとめ

今回の検査では通知法の基準は全て陰性であったが、そのうちの2食品から低い数値ではあるが、定量値を超えるトホミソ蛋白質が検出された。「特殊かまぼこ」は原材料に使用された魚肉「たら・えそ」由来の甲殻類、「米菓」は包装表示に製造施設で「えび」を使用している旨が注意喚起されており、製造施設における他の食品からのコンタミネーションが原因であると推察された。

トホミソ蛋白質が対象の検査には、魚介類による生息海域における甲殻類の「捕食」や、「混獲」の影響を受ける食品が非常に多く存在する。「いりこ」「じゃこ」等の稚魚製品、「牡蠣」「あさり」等の二枚貝等、捕食の影響を受ける食品は、製造工程がないため、トホミソ蛋白質量のコントロールは不可能であるが、製造工程のある「魚肉練製品」等は原材料の魚肉に用いる魚の種類やその取扱いにより、最終製

品のトホミオン蛋白質をある程度抑制することも可能ではないかと考える。

また、甲殻類の「えび」「かに」は、「バクテリ」や「イキ」という形態で、調味用としても、多くの食品に使用されている。蛋白質を酵素処理して製造されるイキ製品は、イキ法の「偽陰性」の対象である。このタイプのイキ製品が使用されている食品は、原材料の「えび・かに」表示に関わらず、その使用の有無をイキ法で確認することはできない。

今後は、今回検査対象外とした、甲殻類表示がある食品や、生息海域の捕食や混獲によりトホミオン蛋白質が検出される食品についても、検出される蛋白質の数値や、その抽出方法、偽陰性の有無等について検討していきたい。

表 平成 28 年度「甲殻類」検査結果

食 品	測定結果 ( $\mu\text{g/g}$ )		甲殻類の 取扱い		注意喚起 表示	
	FA テスト	EIA-甲殻類	えび	かに	えび	かに
	「ニッスイ」	甲殻類キット 「マルル」				
とろろ昆布		ND	×	×	×	×
おむすび用乾燥食品(ワカメ入)		ND	×	×	×	×
特種かまぼこ		ND(0.57)	×	×	×	×
さば缶詰(味付)		ND	×	×	×	×
茶わんむし		ND				
油揚げ麺セット品		ND				
フリーズドライ製品(丼物)		ND				
ハビ-フード(米飯類)		ND	×	×	×	×
乾燥スープ		ND		×	×	×
生菓子1		ND	×	×	×	×
生菓子2		ND	×	×	×	×
焼菓子		ND	×	×	×	×
米菓		ND(0.5)		×		×
せんべい		ND				
スナック菓子		ND				
菓子		ND		×		×
		ND < 8.0 $\mu\text{g/g}$	有	×	無	

カッコ内: 定量値

参考文献等

- 1) アレルギー物質を含む食品の検査方法について(平成22年9月10日消食表第286号)

# キャピラリーカラム・ECD 法による魚介類の PCB 測定 の 検討

生活科学部 松木 司

## はじめに

食品中の PCB に関しては、昭和 47 年に厚生省より「食品中に残留する PCB の規制について」が通知され、このうち魚介類については、遠洋沖合魚介類が 0.5ppm、内海内湾魚介類が 3ppm との暫定的規制値が示された。

この当時の機器測定は、パックドカラム・ECD 法のみであったが、現在は、これに加え、キャピラリーカラム・ECD 法、GC/HRMS、GC/QMS 等が、その検査目的に応じて使い分けられている。

公的な分析方法としては、平成 23 年に環境省が作成した「絶縁油中の微量 PCB に関する簡易定量法マニュアル」(以下、マニュアル)が最新のものであるが、この中のキャピラリーカラム・ECD 法を参考とし、魚介類の PCB 測定 の 検討 を行ったので報告する。

## 方 法

### 1 分析方法

当所の標準作業書により、アルカリ分解、シリカゲルカートリッジカラムによる精製等の前処理を行い、マニュアルで採用されているクリーンアップスパイク (PCB#189) とシリンジスパイク (PCB#209) を追加使用した。

### 2 定量方法

PCB 製品である KC-300、KC-400、KC-500 及び KC-600 の当量混合物 (以下、KCmix) を標準液とし、PCB 濃度 0.8ppm 標準液のクロマトグラムを図 1 に示す。定量方法は以下のとおりである。

(1) 定量基準点となる標準液の各ピークの高さ ( $H_0$ ) を求める。

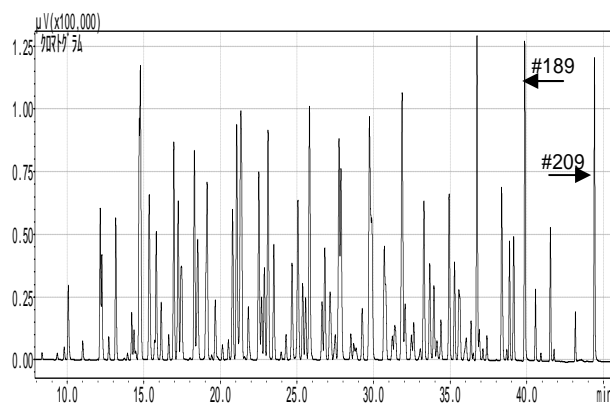


図 1 標準溶液のクロマトグラム

(2)  $H_0$  と各ピークの既知の PCB 成分存在率  $CB_0(\%)$  により次式で、各ピークの K 値を算出する。K 値は、各ピークの単位高さ当たりの重量相当量となる。

$$K = CB_0(\%) / H_0$$

(3) 測定試料溶液の各ピーク高さ ( $H_2$ ) を求め、次式により、各ピークの  $CB_2(\%)$  を算出する。 $CB_2(\%)$  は試料中の各ピークごとの重量相当量となる。

$$CB_2(\%) = K \times H_2$$

(4) 次式により、測定試料溶液の濃度 (ppm) を算出する。

$$\text{測定試料溶液の濃度} = \frac{\text{標準液濃度} \times CB_2(\%)}{CB_0(\%)}$$

### 3 添加回収試験

試料にマダイを用い、5 検体に各々 KCmix 0.8ppm 標準液を 2ml 添加の後、1 分析方法のとおり処理し、最終測定溶液は 2ml に定容した。定量には、KCmix 0.8ppm 標準液を使用した。

### 4 設定濃度に対する実測濃度

通常は、濃度の異なる数点の標準液の実測値により、検量線を作成し定量するが、当手法は標準液 1 濃度のピーク情報により定量する。そこで、0.1~0.7ppm の各 KCmix 標準液を作成し、0.4ppm を 1 点の定量基準点として、定量した値と比較し、設定濃度と実測濃度の関係を検証した。

## 結果と考察

### 1 添加回収試験

回収試験結果を表 1 に、クリーンアップスパイクの回収率を表 2 に示す。また、シリンジスパイクの高さと全ピーク高さの合計値の関係を図 2 に、全ピークの平均回収率を図 3 示す。

定量法 1 は、前述の定量法による絶対検量法である。定量法 2~4 は、定量法 1 を基に次の要素を付加したものである。定量法 2 は、シリンジスパイクによる感度補正を、定量法 3 は、クリーンアップスパイクによる感度と回収率の補正を行ったものである。定量法 4 は、クリーンアップスパイクの回収率より、回収率の補正のみを行ったものであり、マニュアルで採用されている手法である。

定量法 1 は、前処理過程における分析誤差と GC

定量法	回収率範囲(%)	平均回収率(%)	CV(%)
1	89.1 ~ 98.1	93.9	3.7
2	96.3 ~ 101	98.7	2.3
3	116 ~ 123	119	2.4
4	107 ~ 118	113	3.6

回収率範囲(%)	平均回収率(%)	CV(%)
82.0 ~ 85.2	83.0	1.3

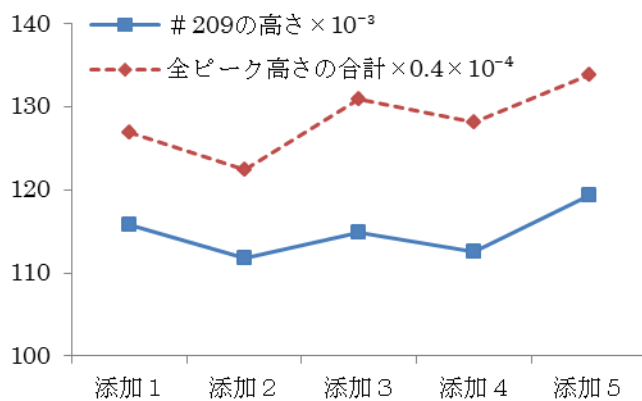


図2 添加試料ごとのシリンジスパイクの高さと全ピーク高さの合計値の関係

の感度変動を含む。定量法2により定量法1を感度変動補正することで、CV値が低下し回収率の範囲も狭くなった。また、図2より、GCの感度変動を示すシリンジスパイクの高さ変動に応じて、全ピーク高さの合計値が変動していることから、感度は、時系列的に随時変動しているのではなく、注入ごとに変動し1試料の測定中は一定であると思われる。このことより、シリンジスパイクによる感度補正の有効性が示唆された。

定量法3では、感度補正によりCV値は定量法2と同程度になったが、平均回収率は119%と大きくなった。図3により、各ピークごとの回収率には、ばらつきがあり後半に低下している。これらを1物質のクリーンアップスパイクで一律に回収率補正することは適切ではない。定量法3では、全ピークを一律に17%押し上げるような計算が生じ、高い平均回収率になったと考えられる。

定量法4は、同様に平均回収率が高くなり、感度補正が無いいためCV値は定量法1と同程度になったと考えられる。

## 2 設定濃度に対する実測濃度

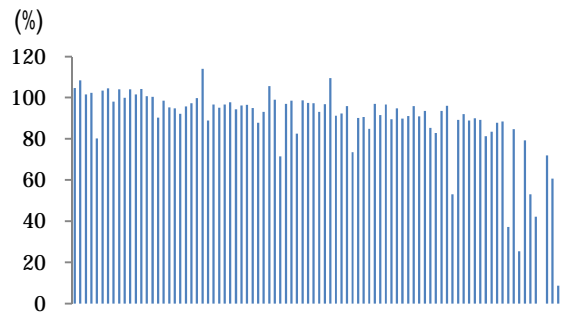


図3 全ピークの平均回収率 (n=5)

設定濃度と実測濃度の比を図4に示す。定量基準点の0.4ppmより低い設定濃度では実測濃度の方が設定濃度より高い値となり、0.4ppmより高い設定濃度では実測濃度の方が設定濃度より低い値となった。また、0.4ppmから離れるほど両値の差が大きくなっている。この現象は、本来、切片が存在する検量線での定量を、1点検量で定量した場合に生じる現象である。

この実測値の算出要素である  $CB_2(\%)$  と設定濃度の相関を図5に示す。設定濃度と  $CB_2(\%)$  は直線関係にあり、両値の相関式により  $CB_2(\%)$  から濃度を算出する手法が妥当である。

この手法をPCBの定量法として推奨する。

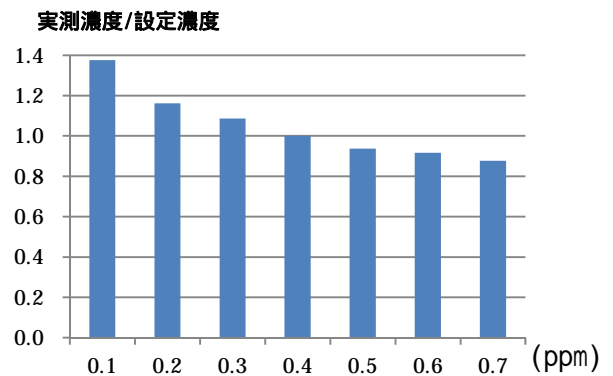


図4 設定濃度と実測濃度の比

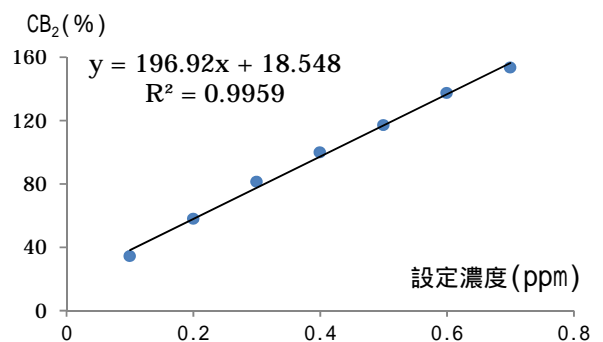


図5  $CB_2(\%)$  と設定濃度の相関図

## 2016年における不明熱患者から検出された

### ウイルスの検出状況及び遺伝子解析

生物科学部 八島 加八

#### はじめに

2015年度の業績発表会において、過去5年間における不明熱患者から検出されたウイルスの検出状況について報告した。昨年の結果では、不明熱患者は特に夏季(7~8月)に多く、冬季(10~3月)は少なかった。また、検出されたウイルスはエンテロウイルス(EV)、パレコウイルス(PeV)、ライノウイルス(Rhino)がほとんどを占め、EVとPeVの型は毎年異なっていた。そこで今回は、2016年においてもそれまでと同様の傾向が見られるかどうかを詳しく調査する目的で、不明熱患者からのウイルス検出状況と分離状況及び系統樹解析を行ったので報告する。

#### 方法

2016年1月から12月の1年間で広島市感染症発生動向調査事業の病原体定点医療機関を受診した患者から採取された検体を用い、不明熱の診断または症状が発熱のみであった患者58人からの68検体を不明熱の対象とした。検体はリアルタイムPCR法により遺伝子検査を行い、ウイルス分離は細胞培養法で行った。培養に使用した細胞は、HE、HEp-2、RD-18S、Vero、A549を用いた。培養により分離されたウイルスは中和試験により同定し、当所で1型しか中和試験ができないPeVや難中和株はシーケンスを用いて同定した。尚、シーケンスを行ったPeVについては系統樹解析を行った。

#### 結果

2016年の1年間で不明熱の対象となった患者58人から9種類のウイルスが検出された。不明熱患者は夏季に多く、ウイルスが検出された時期は6~9月で全体の82.9%を占め、12~3月にはウイルスが全く検出されなかった(図1)。

検出されたウイルスはPeVとEVが各々13人(各39.4%)と最も多く、残りはRhinoで7人(21.2%)となった(図2)。また、各ウイルスの内訳はEVでコクサッキーウイルスB5型(CB5)が7人と最も多く、次いでコクサッキーウイルスB3型が2人、残りはコクサッキーウイルスA9型、コクサッキーウイルスB2型、エコーウイルス18型、エコーウイルス25型が1人ずつであり、PeVでは12人が3型で1人が4型であった(図3)。

各ウイルスの分離状況は、EVが92.3%、PeVが84.6%、Rhinoは全て培養陰性であった(表1)。

系統樹に示す様にPeV3型は4つのサブクラスターを形成し、2014年のものとは更に別のクラスターに分類された(図4)。

#### 考察

不明熱患者から検出されたウイルスは過去5年と同様の結果となり、7月をピークにそのほとんどが夏季に検出されており、この傾向は今後も続くものと思われる。

今回検出されたウイルスは、EVとPeV及びRhinoのみであり、こちらも過去5年とほぼ同様の結果となった。EVとPeVはその年によって流行するウイルスの型が異なっており、2016年はEVがCB5、PeVは3型の流行が示唆された。また、今回当所の培養条件で最も多く分離されたのはEVで、1例を除いて全て分離されたが、Rhinoは全く分離されず、PeVはリアルタイムPCRによる検体のCt値が37.0以上になると分離されていないという違いが見られた。

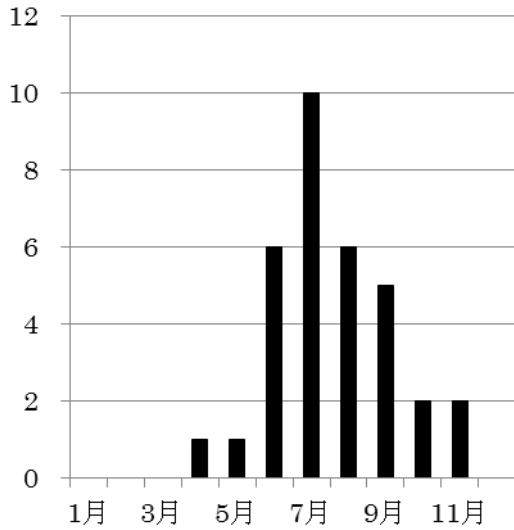


図1 月別ウイルス検出状況

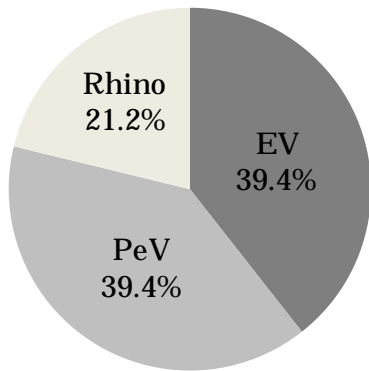


図2 検出ウイルスの割合

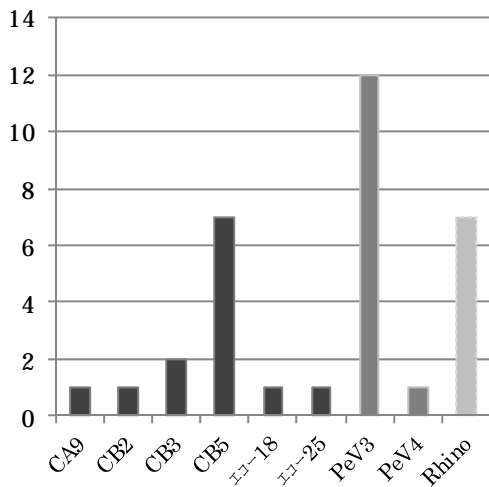
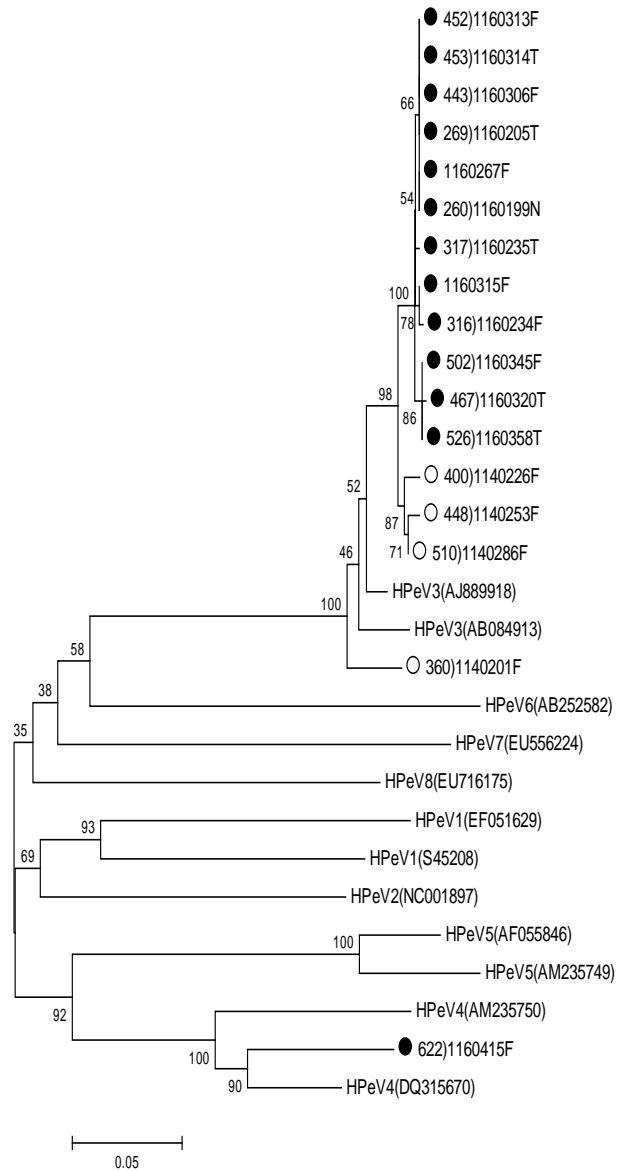


図3 検出ウイルスの内訳

表1 検出ウイルスの分離状況

	EV	PeV	Rhino
検出人数	13	13	7
分離人数	12	11	0
分離率	92.3%	84.6%	0.0%



● : 2016年、○ : 2014年

図4 PeV VP1領域 (アミノ酸) 系統樹



# ダニ媒介感染症の解析

生物科学部 藤井慶樹

## 1 はじめに

当所では保健センター及び保健医療課からの行政検査依頼に基づき、四類感染症である重症熱性血小板減少症候群(SFTS)、日本紅斑熱、つつが虫病等のダニ媒介感染症の検査を行っている。今回、2012年から2015年までの期間に当所で検査を実施したダニ媒介感染症疑い事例について後方視的な解析を行った。この結果を踏まえ、ダニ媒介感染症の特徴及び本市における発生状況等についてまとめたので報告する。

## 2 方法

2012年から2015年までの期間に、行政検査依頼に基づき当所で検査を行ったダニ媒介感染症疑い事例計65例を解析対象とし、患者調査票等を参考にして患者の発生時期、推定感染地、推定感染作業、臨床症状等の疫学情報についてまとめた。また、患者から検出されたつつが虫病リケッチア(*Orientia tsutsugamushi*以下、O.t)及びSFTSウイルス(以下、SFTSV)について遺伝子解析を実施し、本市及びその近郊に侵淫している病原体の特徴を調べた。

## 3 結果及び考察

### (1) ダニ媒介感染症疑い事例の検査結果

検査を行ったダニ媒介感染症疑い事例計65例のうち、17例(26%)がつつが虫病、7例(11%)が日本紅斑熱、4例(6%)がSFTSであった。一方で、病原体もしくは抗体検査陰性の不明例が37例(57%)と半数以上を占めた。不明例については、適切な検体が確保されていないことによる偽陰性の可能性、症状の類似した別疾患であった可能性、他の病原体が原因であった可能性などが推察された。

### (2) 患者の発生状況

月別の患者発生状況を図1に示した。つつが虫病患者は秋～初冬(10～12月)にかけて発生のピークが認められ、患者17人のうち16人がこの時期に発生していた。残る1人の患者は春先の4月に発生していた。日本紅斑熱、SFTS患者については、発生時期に特徴的なピークはなく、5～11月に発生していた。

### (3) 推定感染作業

ツツガムシあるいはマダニの刺咬を受けるきっかけとなった作業の推定内訳としては、つつが虫病、日本紅斑熱、SFTS患者ともに、畑・水田等での農作業が最も多く、次いで、山菜取り・レジャー等による山地での作業が続いた。日本紅斑熱、SFTSはマダニにより媒介される疾患であるが、これらの患者では平地での庭仕事や墓地での墓掃除等が原因と考えられた事例もあり、普段の生活の身近なところでもマダニ刺咬による感染の可能性があるかと推察された。

### (4) 患者の年齢層

患者の年齢層は60歳以上の高齢者が大多数を占めた。上述のとおり、農作業や山地での作業が推定感染作業として疑われる事例が多いことと関連していると考えられる。ただし、5歳未満の日本紅斑熱患者も発生しており、高齢者だけでなくあらゆる年齢層で発生し得る感染症であると認識しておく必要がある。

### (5) 推定感染地域の分布

日本紅斑熱、SFTS患者の推定感染地は本市及びその周辺に広く分布していた。両疾患はごく一部の病原体を保有するマダニにより媒介されると考えられるが、日本紅斑熱については一部地域での患者多発が報告されているため<sup>1)2)</sup>、本市における今後の状況についても注視していかなければいけない。

つつが虫病患者については、広島県内では太田川中流域が好発地として知られている<sup>3)</sup>が、市内でも各地で患者が発生していた。

### (6) 患者の臨床症状

患者の臨床症状を図2に示した。つつが虫病、日本紅斑熱は発熱、発疹、刺し口が3大主徴とされ、本市

で確認された患者においても8割以上でこれらの症状が認められた。SFTS患者では4人のうち1人に発疹が認められたものの、全身の発疹ではなく局所(足)の発疹であり、つつが虫病、日本紅斑熱と比べて発疹の頻度は低いと考えられる。その他、SFTS患者ではリンパ節腫脹が少ないこと、また、ウイルス感染症であるため、細菌(リケッチアを含む)感染時に上昇することの多いCRPが陰性、もしくは軽度上昇に留まることなども特徴と考えられた。一方で、血小板減少、白血球減少、肝機能の悪化等はいずれの疾患でも高率に認められた。患者の個人差等も加味すると、臨床症状や検査結果の数値のみで、これらの疾患を区別することは容易ではないと考えられる。

(7) 病原体の遺伝子解析

患者から検出されたSFTSV 4株のS分節遺伝子配列及びO.t 17株の56kDa外膜蛋白をコードする遺伝子配列に基づく系統樹解析を行った。SFTSVは遺伝子解析の結果から大きく中国系統と日本系統の2つの系統に分かれることが知られている<sup>4)</sup>。本市内及びその近郊での感染例から検出されたSFTSVはすべて日本系統に分類された。一方、県外(島根県)が推定感染地とされる患者からは中国系統のSFTSVが検出された。

O.tは17株中16株がKawasaki型に分類され、1株がKarp型に分類された。O.tにはKato、Karp、Gilliam、Kawasaki、Kuroki、Shimokoshiの6つの血清型が存在し、血清型により媒介するツツガムシの種類が決まっている。市内でのつつが虫病患者発生状況は10~12月がピークであり、当時期に発症した患者から検出されたO.tはすべてタテツツガムシが媒介するKawasaki型であった。

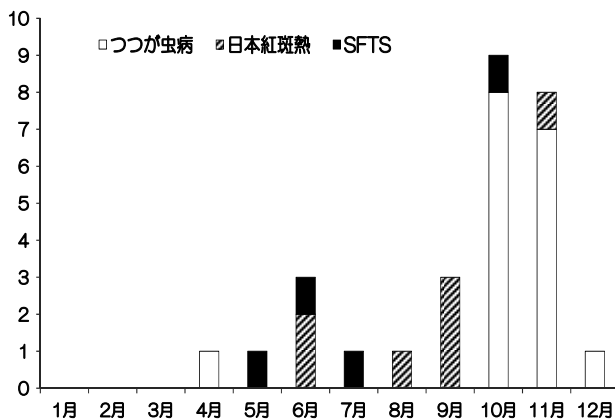


図1 月別患者発生状況

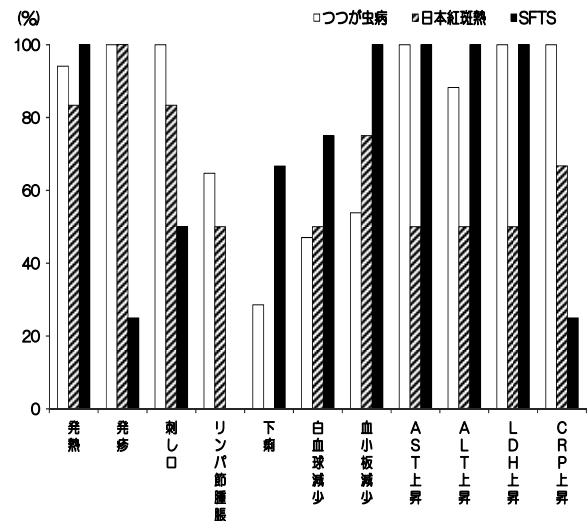


図2 患者の臨床症状

4 参考文献

- 1) 赤地重宏, 他, IASR 31: 129-130, 2010
- 2) 島津幸枝, 他, IASR 31: 131-132, 2010
- 3) 岩崎博道, 他, 感染症学雑誌 75: 365-370, 2001
- 4) 吉河智城, 他, IASR 37: 44-45, 2016

# 広島市のパレコウイルス検出状況

生物科学部 則常浩太

## 1 はじめに

現在、パレコウイルス(PeV)は 17 種類の血清型/遺伝子型が報告されている。日本では 1 型と 3 型の検出数が多く、主に胃腸炎や呼吸器疾患の小児患者から検出される。特に PeV-3 型は 2~3 年ごとに流行を繰り返し、発熱とともに呼吸器症状や下痢などの胃腸炎症状、発疹を呈するが、重症化した場合は、無呼吸状態や痙攣、敗血症性ショック、肺炎などを引き起こすことが知られている。本年は PeV が全国的に 2014 年に次ぐ流行となったことから、今回、2014 年から 2016 年までに細胞培養法にて分離された PeV の検出状況をまとめたので報告する。

## 2 材料及び方法

2014 年 1 月 1 日から 2016 年 11 月 25 日までに、細胞培養法で PeV が分離された 49 検体を検査対象とした。同定型別検査は、1 型を除き市販の抗血清がなく、中和法で血清型を決めることが困難であるため、6 種類の PeV 特異プライマーを用いて逆転写を行い、抗原性と相関のある VP1 領域を増幅する PCR 法を実施した。得られた増幅産物を用いてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、遺伝子型別分類を行った。また、感染症発生動向調査依頼票より得られた患者の臨床症状、年齢、ウイルス検出月等の情報について検証した。

## 3 結果及び考察

PeV の月別検出状況を図 2~4 に示した。2014 年は 13 人から PeV が検出され、PeV-3 型が最も多く 8 人検出された。2014 年の PeV は 6 月から出始め、8 月に最も多く 4 人検出された。2015 年は 6 人から PeV が検出され、PeV-1 型が最も多く 5 人検出された。6 月から 9 月にかけて散発的に検出されたが、2014 年、2016 年と異なり、PeV-3 型は検出されなかった。2016 年は 31 人から PeV が検出された。その内訳は PeV-3 型が最も多く 26 人、次に PeV-1 型が 3 人検出された。2016 年は 2 月受付の検体から PeV が検出され始め、7 月に最も多く 10 人から検出された。

症状は PeV-1 型では 11 人中 7 人に発熱、11 人中 6 人に胃腸炎症状がみられた。その他には 発疹、呼吸器症状などがみられた。PeV-3 型では 34 人全員に発熱がみられ、6 人に発疹、3 人に胃腸炎症状、同じく 3 人に呼吸器系症状がみられた。その他には関節痛、筋肉痛、痙攣、髄膜炎など多様な症状を示した。

患者の年齢は 0 歳が最も多く全体の 80%であった。続いて 1 歳で 6%であった。0 歳児をさらに細分化し、月齢で患者数を分類すると、特に PeV-3 型において全患者数の 85.2%が月齢 3 か月以下であった。

遺伝子型別分類の結果は、PeV-3 型が最も多く 34 人検出された。次に同 1 型が 11 人であった。その他は同 4 型 3 人、同 6 型 1 人であった。その系統樹を図 1 に示した。系統樹を見ると、PeV-3 型は、2014 年検出株と 2016 年検出株で多くが別のクラスターを形成した。

## 4 謝辞

広島市感染症発生動向調査事業にご協力頂きました定点医療機関の関係各位に深謝致します。

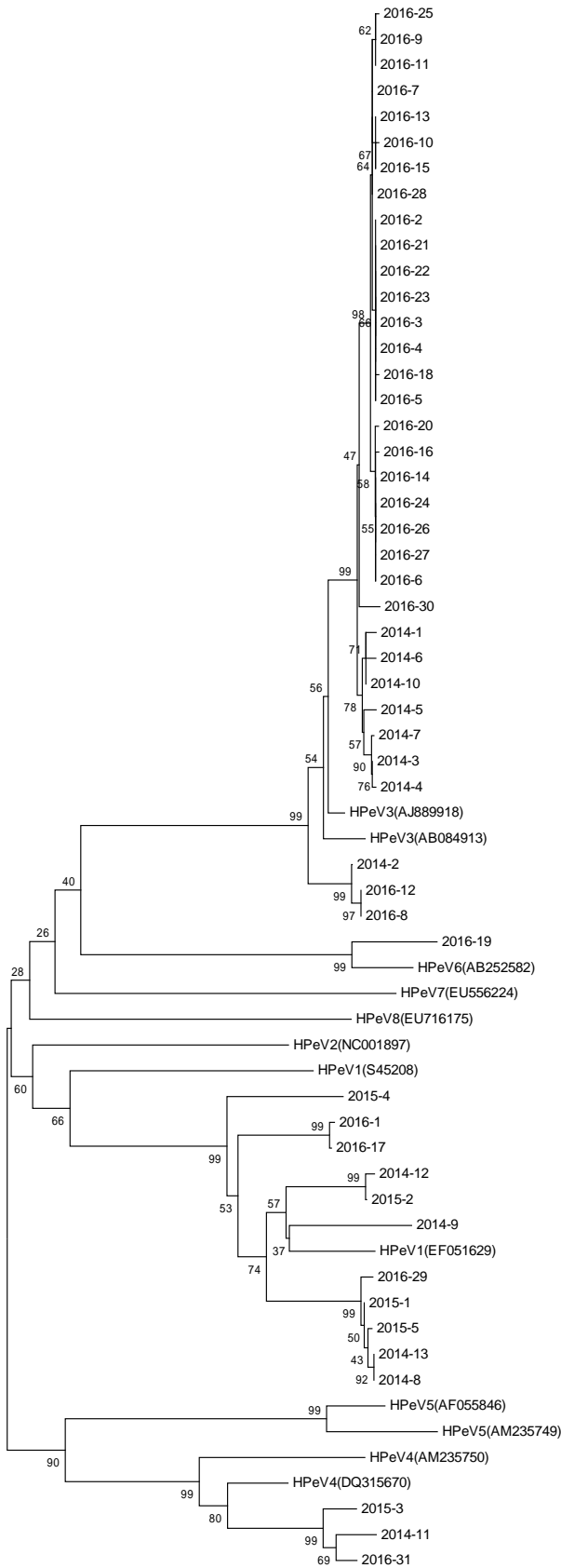


図1 VP1領域系統樹(704塩基)

## 2014年

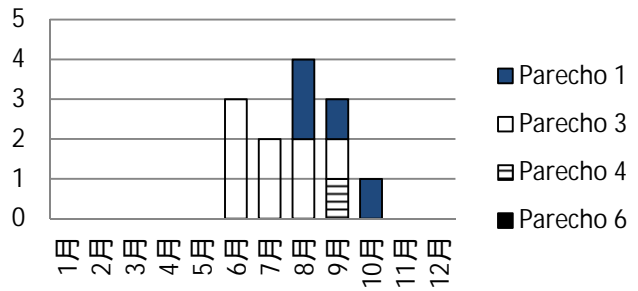


図2 月別患者発症数(2014年)

## 2015年

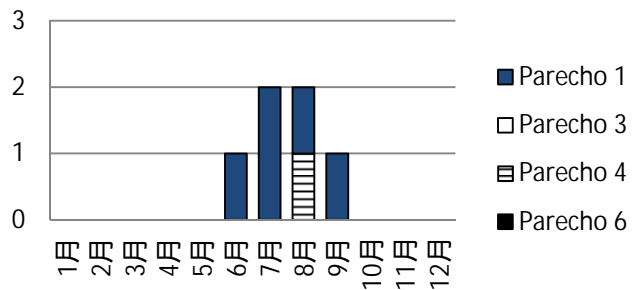


図3 月別患者発症数(2015年)

## 2016年

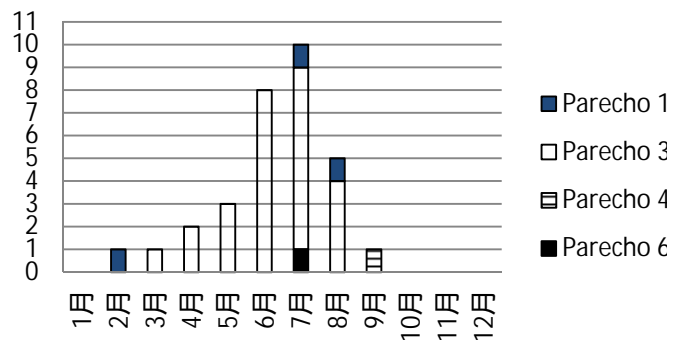


図4 月別患者発症数(2016年)

## 2016年に分離された腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析

生物科学部 千神 彩香

### 【目的】

分子疫学的解析法であるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法、IS-printing system<sup>®</sup> (IS)法及び Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法の 3 法を用いて、2016 年に広島市で分離された腸管出血性大腸菌 O157 株を解析し、感染事例間での疫学的関連性を検討するとともに 3 法間の型別能について検証した。

### 【材料】

2016 年に広島市内で発生した腸管出血性大腸菌 O157 感染症から分離された菌株 12 株を用いた。内訳は、散発事例患者由来 6 株、散発事例無症状病原体保有者由来 1 株、広域食中毒事例患者由来 1 株、広域食中毒事例食品由来 4 株である。事例と株の関係は表 1 に示した。

### 【方法】

#### 1 PFGE 法

制限酵素 *Xba*I 及び *Bln*I を用いて、国立感染症研究所で示された方法に準拠し実施した。なお、電気泳動はスミアバンド発生を防止するためチオ尿素を加えた 0.5 × TBE で行った。系統樹は、BioNumerics Ver. 7.5 (Applied Maths) を用いて解析を行い、Dice 法 (最適化: 0.0%、トレランス: 1.0%) による相似係数を算出し、平均距離法 (UPGMA) により作成した。

#### 2 IS 法

IS-printing system<sup>®</sup> (東洋紡) を使用し、添付のプロトコールに従い実施した。結果は、プライマーごとに増幅ありを「1」、なしを「0」と判定し、各セットとも増幅サイズの大きいバンドから順に 3 バンドごとに割り当てた

表 1 2016 年腸管出血性大腸菌 O157 型分離菌株の事例概要

事例番号	事例区分	菌株番号	診断の種類	由来	発症年月日	血清型	VT 型
1	散発	16004	無症状病原体保有者	便	20160621 <sup>*1</sup>	O157:HNM	VT1
2	散発	16007	患者	便	20160709	O157:H7	VT1VT2
3	散発	16008	患者	便	201607(日は不明)	O157:H7	VT1VT2
4	散発	16011	患者	便	20160718	O157:H7	VT1VT2
5	散発	16012	患者	便	20160730	O157:H7	VT1VT2
6	散発	16019	患者	便	20161002	O157:H7	VT1VT2
7	散発	16020	患者	便	20161008	O157:H7	VT2
		16027	患者	便	20161027	O157:H7	VT2
		16028		食品 <sup>*2</sup>		O157:H7	VT2
8	食中毒	16029		食品 <sup>*2</sup>		O157:H7	VT2
		16030		食品 <sup>*2</sup>		O157:H7	VT2
		16031		食品 <sup>*2</sup>		O157:H7	VT2

\*1: 無症状病原体保有者のため、発症年月日ではなく届出報告年月日を記載

\*2: 原因施設で保管されていた食品(そうざい半製品)

「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、1st set、2nd set の順に並べて12桁で表わしてISコードとした。

### 3 MLVA 法

MLVA 解析には 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)及び Gene Mapper (Applied Biosystems 社)を用い、9か所の領域について解析を行った。Fragment size marker は GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard, Ver. 2.0(Applied Biosystems 社)を使用した。

### 【結果】

2016年に分離された菌株12株のMLVAリポート数(MLVA RN)、ISコード及びPFGEバンドパターンの一致の有無を表2に、類似度95%以上を示したものを同一PFGEクラスター(点線内)とし、制限酵素 *Xba* で処理したものを図1に、*Bln* で処理したものを図2に示した。

#### 1 散発事例

事例3(16008)及び事例5(16012)において、MLVA RN、ISコード及びPFGEバンドパターンが全て一致した。事例2(16007)は事例3及び事例5とISコードが類似し、PFGEでも類似度97%の同一クラスターを示したが、MLVA法では5座位が異なった。他の事例は3法とも互いに異なった。

#### 2 広域食中毒事例

事例8の患者由来菌株(16027)、食品由来菌株(16028、16029、16030及び16031)において、ISコード及びPFGEバンドパターンは一致した。MLVAでは、5株とも8領域で一致したが、食品由来株(16028)が1座位(K10)で他の4株とRNが1違った。

### 【考察】

今回、2016年の散発感染症事例及び全国的な広域食中毒事例の一つとして広島市で発生した患者及び原因施設で保管されていたそうざい半製品から分離された腸管出血性大腸菌O157菌株について分子疫学的解析を行った。

散発事例由来株においては、事例3の16008株及び事例5の16012株において、PFGE法、IS法及びMLVA法の3法全てで一致した。この解析結果から、これら2株は同じ又は似かよった遺伝子を持つ可能性が高いと考えられる。一方で、疫学的に関連性のない事例間で偶然パターンの一致した株が検出された可能性も考えられるが、今回の事例の疫学調査からは事例間の関連性は認められなかった。

広域食中毒事例8の分離株5株においては、PFGE法及びIS法の2法ではパターンが完全に一致したが、MLVAでは食品由来1株(16028)のみ1座位(K10)でRNが1違った。これら5株は疫学情報から考慮しても全て同一食中毒事例の患者及び食品から分離された菌株であるため、5株とも関連性が高いと推察される。

3法の型別能を比較すると、MLVA法は、今回の適応例からも有用性が認められたことから、他の2法だけでなく、MLVA法も合わせて実施することで異なる遺伝子型であることを再確認できる場合があると考えられた。IS法については、今回の検討結果から、同一事例間の株には有用性が認められたが、関連性の不明な散発事例株での使用と結果の解釈には他の2手法との総合的な判断が必要であると考えられた。以上より、疫学情報を照らし合わせながら使用する手法を総合的に選択することが重要であると思われた。

表2 2016年分離菌株のMLVA RN、ISコード及びPFGEバンドパターン一致の有無

菌株番号	事例番号	血清型	VT型	MLVA RN								ISコード	PFGEバンドパターン 一致の有無	
				K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37			K10
16004	1	O157:HNM	VT1	5	10	11	11	7	6	6	6	38	317175 611755	無
16007	2	O157:H7	VT1VT2	5	13	8	10	7	4	7	6	35	317577 611757	無
16008	3	O157:H7	VT1VT2	5	8	10	10	7	6	6	6	46	317577 211757	16012 と一致
16011	4	O157:H7	VT1VT2	4	12	10	9	7	6	10	6	15	717557 611657	無
16012	5	O157:H7	VT1VT2	5	8	10	10	7	6	6	6	46	317577 211757	16008 と一致
16019	6	O157:H7	VT1VT2	4	10	9	8	8	6	8	5	18	106555 211457	無
16020	7	O157:H7	VT2	3	4	7	-	5	7	6	5	-	012057 214442	無
16027	8	O157:H7	VT2	5	8	7	12	4	7	10	6	18	305457 211642	16027、16028、 16029、16030、 16031 は一致
16028		O157:H7	VT2	5	8	7	12	4	7	10	6	19	305457 211642	
16029		O157:H7	VT2	5	8	7	12	4	7	10	6	18	305457 211642	
16030		O157:H7	VT2	5	8	7	12	4	7	10	6	18	305457 211642	
16031		O157:H7	VT2	5	8	7	12	4	7	10	6	18	305457 211642	

- : PCR 産物なし

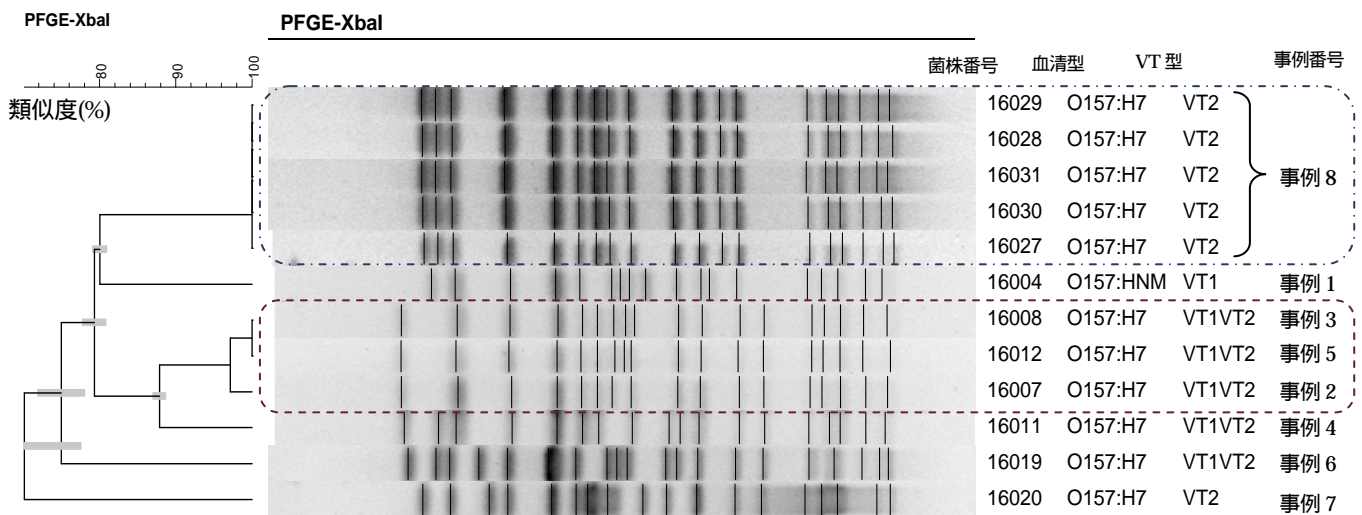
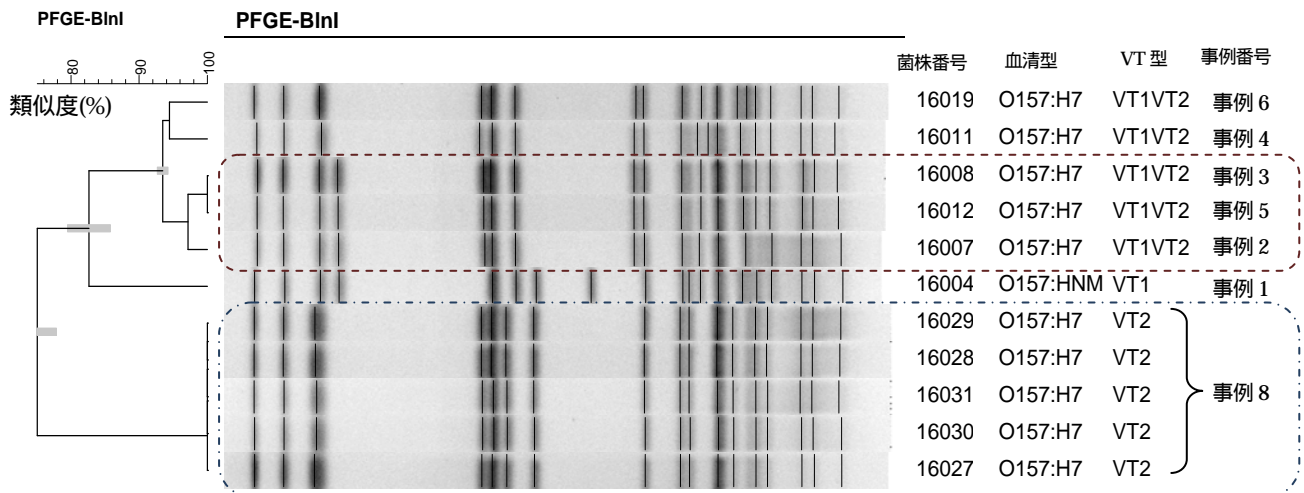


図1 2016年分離菌株のXbaI処理によるPFGEクラスター



16020はBlnIで切断されなかった。

図2 2016年分離菌株のBlnI処理によるPFGEクラスター

# セレウス菌が検出された集団有症事例について

生物科学部 竹原 佑美

## 1 はじめに

*Bacillus cereus*(以下 *B.cereus*)は、グラム陽性、通性嫌気性の芽胞形成桿菌である。環境細菌の一つであり、土壌・水中などの自然環境や農産物や飼料の他に、動物や人の消化管等広く分布し、一部の菌株は食中毒の原因菌となりうる。*B.cereus*による食中毒は主に穀類及び穀類加工品を原因食品とし、臨床症状により嘔吐型と下痢型に分類され、我が国ではほとんどが嘔吐型食中毒である。嘔吐型の潜伏時間は0.5～5時間、下痢型は8～16時間であり、日本の食中毒事件の中で *B.cereus* が原因菌である割合は、平成23年～27年において0.18%～1.74%と少ない。今回、*B.cereus* が検出された集団事例を2例経験したので報告する。その概要を表1に示した。

表1 事例概要

	事例1 飲食店A	事例2 飲食店B
喫食日	平成28年7月29日	平成28年7月30日
発症人数/グループ人数	7/7名、 2/2名	7/19名
症状	嘔吐 100% 下痢 33%	嘔吐 14% 下痢 100% 腹痛 43%
喫食から発症までの平均時間	1時間22分	14時間55分
	飲食店Aの料理を原因とする食中毒事例と断定	食中毒事例とは判断されず

## 2 方法

### 検査材料

事例1 患者嘔吐物2検体、患者便4検体、従事者便2検体、食品5検体、調理場等ふきとり10検体

事例2 患者便7検体、従事者便1検体、調理場等ふきとり10検体

### 分離同定試験

*B.cereus*の分離にはNGKG寒天培地(ニッスイ)を用いた。分離された *B.cereus* 菌株(事例1、12株(患者嘔吐物4株、患者便3株、食品1株、調理場等ふきとり4株))、(事例2、13株(患者便3株、従事者便1株、調理場等ふきとり9株))について、嘔吐毒(セレウリド)合成酵素(以下CRS)遺伝子検査は *Bacillus cereus*(CRS gene)PCR Detection Kit(Takara)、下痢毒(HBL)産生能試験はCREST-RPLA「生研」(デンカ生研)を用い、生化学性状試験は、VP反応、サッカロース、サリシン、エスクリン、マンノース、セロピオースの糖分解能試験に api50CHB と api20E、デンプン分解能試験に api50CHB と1%デンプン加普通寒天培地(デンプン(和光純薬)普通寒天培地(ニッスイ))を用いて実施した。また、事例1から分離された菌株については、セレウリド産生能の確認としてHEp-2細胞によるバイオアッセイを実施した。

## 3 結果及び考察

### 事例1



患者嘔吐物 2 検体中 2 検体、患者便 4 検体中 1 検体、食品 5 検体中 1 検体、調理場等ふきとり 10 検体中 4 検体から *B.cereus* が分離された。従事者便からは 2 検体ともに分離されなかった。CRS 遺伝子検査・HBL 産生能試験・生化学性状試験の結果は表 2 に記す。HE-p2 細胞を用いたバイオアッセイでは、CRS 遺伝子陽性株全株に、細胞の空胞化変性を認めた。

性状試験の結果、患者嘔吐物、食品、調理場等ふきとりから分離された菌株が CRS 遺伝子検査陽性となり、それらの菌株全てに HBL 産生性、生化学性状に均一性が認められ、この事例が *B.cereus* を原因とする嘔吐毒の食中毒事例であったことを示唆する結果となった。

### 事例 2

患者便 7 検体中 3 検体、従事者便 1 検体、調理場等ふきとり 10 検体中 5 検体から *B.cereus* が分離された。CRS 遺伝子検査・HBL 産生能試験・生化学性状試験の結果は表 3 に記す。

患者便から分離された菌株は性状が一致していた。一方、喫食残品がなく検査できなかったことや、患者便と、従事者便及び調理場等ふきとり検体から分離された菌株の性状が異なっていたため、原因の特定には至らなかった。

表2 事例1(集団嘔吐症事例)から分離された*B.cereus*の性状

検体	菌株No	PCR		CRET-RPLA(HBL)	生化学性状試験										小佐々らの生物型
		セリウリド	レシチナーゼ		NGKG寒天培地		api5 0 CHB					クリステンゼン尿素培地	ウレアーゼ		
				エンテロトキシン	レシチナーゼ	デンプン	VP	サッカロース	サリシン	エスクリン	マンノース			セロビオース	
患者嘔吐物	1	1	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	型不明
	2	2-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	型不明
		2-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	型不明
		2-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	型不明
患者便	3	3-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	型不明
		3-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	型不明
		3-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	型不明
食品	ラザニア	4	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	型不明
調理場等ふきとり	従事者の手	5	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	型不明
	冷蔵庫取っ手	6	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	型不明
	作業台	7	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	型不明
	冷蔵庫取っ手	8	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	型不明

表3 事例2(集団下痢症事例)から分離された*B.cereus*の性状

検体	菌株No.	PCR		CRET-RPLA(HBL)	生化学性状試験										小佐々らの生物型	
		セリウリド	レシチナーゼ		NGKG寒天培地		api5 0 CHB					クリステンゼン尿素培地	ウレアーゼ			
				エンテロトキシン	レシチナーゼ	デンプン	VP	サッカロース	サリシン	エスクリン	マンノース			セロビオース		型
患者便	1	1	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
	2	2	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
	3	3	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
従事者便	4	4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-		
調理場等ふきとり	包丁(肉野菜用・刺身用)	5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-		
	冷蔵庫	6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-		
	シンク・手洗い	7-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	型不明	
		7-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-		
		7-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-		
		7-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-		
	コンロ	8-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-		
		8-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	型不明	
生野菜保管用 タッパー	9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	型不明		

# カンピロバクター分離株のギラン・バレー症候群(GBS)関連遺伝子の保有状況(平成 27 年、28 年)

生物科学部 池田 伸代

## 1 はじめに

カンピロバクター・ジェジュニ(以下 *C. jejuni*)は発熱・腹痛・下痢等を主症状とする食中毒起因菌であり、広島市では最も事例数の多い細菌性食中毒となっている。カンピロバクター腸炎の予後は一般的に良好であるが、まれに難治性の自己免疫疾患であるギラン・バレー症候群(GBS)を続発することが知られている。GBSは急性に四肢筋力低下を示す神経・筋疾患で、先行感染の約30%が*C. jejuni*によると推定されている。

*C. jejuni*には、菌体外膜に存在するリポオリゴ糖(LOS)のなかにヒト末梢神経上のガングリオシドと類似したガングリオシド様LOSを保有するものがあることが明らかになっている。*C. jejuni*のガングリオシド様LOSの生合成には、シアル酸合成酵素(Cst-)、Nアセチルガラクトサミン転移酵素(CgtA)、及びガラクトース転移酵素(CgtB)が必要である。これら GBS 発症に関与しているとされる糖鎖合成遺伝子(*cst-*、*cgtA*、*cgtB*)の保有状況調査と血清型別を行ったのでその概要を報告する。

## 2 材料と方法

平成 27 年 1 月から平成 28 年 12 月までの 2 年間に当所で分離された鶏肉由来の *C. jejuni* 111 株及び同時期に分離された下痢症患者由来の *C. jejuni* 189 株の計 300 株を供試した。GBS 関連遺伝子の検出は、*cst-*、*cgtA*、*cgtB*領域を検出する PCR 法で行った。また血清型別は市販のカンピロバクター免疫血清(デンカ生研)を用いて Penner 群の血清型別を行い、判別不能の場合はさらに PCR 法を用いて型別を行った。

## 3 結果

表 1 に GBS 関連 3 遺伝子の血清型別検出結果を示した。

鶏肉由来の *C. jejuni* では、111 株のうち *cst-*、*cgtA*、*cgtB*のいずれも保有していたものは 37 株(33.3%)、*cst-*のみ保有していたものは 19 株(17.1%)、関連 3 遺伝子をいずれも保有していないものは 55 株(49.5%)であった。過去の調査では鶏肉由来 *C. jejuni* の 3 遺伝子保有状況は 14~63%との報告があり、このたびの調査でも鶏肉由来株の 3 割が 3 遺伝子すべてを保有していた。

血清型別の保有状況では、Penner A、B、D、I、O、R、UT 群で 3 遺伝子すべてを保有している株が確認され、B、C、D、E、G/HS17、UT 群では *cst-*のみ保有している株が確認された。鶏肉からは Penner B 群が 31 株(27.9%)と最も多く分離され、GBS 関連 3 遺伝子すべてを保有している株の割合も 61.3% (19 株)と高かった。

下痢症患者由来の *C. jejuni* では、189 株のうち *cst-*、*cgtA*、*cgtB*のいずれも保有していたものは 100 株(52.9%)、*cst-*のみ保有していたものは 28 株(14.8%)、関連 3 遺伝子をいずれも保有していないものは 61 株(32.3%)であった。過去の調査では、ヒト由来 *C. jejuni* の 3 遺伝子保有状況は 14~33%との報告があるが、このたびの調査では約 5 割と高い結果となった。

血清型別の保有状況では、Penner B、B・R、D、I、O、R、Z6、UT 群で 3 遺伝子すべてを保有している株が確認され、B、D、L/U、UT 群では *cst-*のみ保有している株が確認された。下痢症患者から分離株数の多かった Penner B 群(72 株、38.1%)及び O 群(20 株、10.6%)では、GBS 関連 3 遺伝子すべてを保有している株の割合は B 群 69.4%(50 株)、O 群 100.0%(20 株)と高かった。

表 2 に鶏肉由来 *C. jejuni* 株の 3 遺伝子血清型別検出結果を年別に示した。このたびの調査では、平成 27 年には Penner B 群株の 3 遺伝子保有率が 70.6%(12 株)と高く、平成 28 年には B 群の 3 遺伝子保有率は 50.0%(7 株)で、UT 群の 3 遺伝子保有率が 64.3%(9 株)と高かった。

表 3 に下痢症患者由来 *C. jejuni* 株の 3 遺伝子血清型別検出結果を年別に示した。このたびの調査では、平

成 27 年は Penner B 群株の 3 遺伝子保有率が 78.4% (40 株) と高く、平成 28 年には B 群株は 47.6% (10 株) で、0 群株と UT 株の 3 遺伝子保有率が 100.0% (16 株)、69.7% (23 株) と高かった。

GBS 患者から分離された *C. jejuni* においては、Penner 0 群が高率であるといわれている。このたびの調査で分離された下痢症患者由来 Penner 0 群株について、GBS 関連 3 遺伝子の保有率をみてみると、平成 27 年は 100.0% (4 株中 4 株)、平成 28 年も 100.0% (16 株中 16 株) と高いものであった。

表 1 GBS 関連 3 遺伝子の血清型別検出結果

Penner 血清群	鶏肉由来				下痢症患者由来			
	cst +, cgtA+, (%) 1 cgtB+	cst +, cgtA-, (%) 1 cgtB-	cst -, cgtA-, (%) 1 cgtB-	計 (%) 2	cst +, cgtA+, (%) 1 cgtB+	cst +, cgtA-, (%) 1 cgtB-	cst -, cgtA-, (%) 1 cgtB-	計 (%) 2
A	1 (14.3)		6 (85.7)	7 (6.3)			4 (100.0)	4 (2.1)
B	19 (61.3)	6 (19.4)	6 (19.4)	31 (27.9)	50 (69.4)	13 (18.1)	9 (12.5)	72 (38.1)
B,F							1 (100.0)	1 (0.5)
B,R					1 (100.0)			1 (0.5)
C		1 (33.3)	2 (66.7)	3 (2.7)			2 (100.0)	2 (1.1)
D	2 (18.2)	8 (72.7)	1 (9.1)	11 (9.9)	2 (16.7)	10 (83.3)		12 (6.3)
E		1 (100.0)		1 (0.9)				
F			2 (100.0)	2 (1.8)			3 (100.0)	3 (1.6)
G			3 (100.0)	3 (2.7)			3 (100.0)	3 (1.6)
G/HS17		2 (16.7)	10 (83.3)	12 (10.8)			4 (100.0)	4 (2.1)
I	2 (100.0)			2 (1.8)	1 (100.0)			1 (0.5)
J							1 (100.0)	1 (0.5)
K			1 (100.0)	1 (0.9)			4 (100.0)	4 (2.1)
L			2 (100.0)	2 (1.8)			1 (100.0)	1 (0.5)
L/U			1 (100.0)	1 (0.9)		1 (33.3)	2 (66.7)	3 (1.6)
O	1 (100.0)			1 (0.9)	20 (100.0)			20 (10.6)
R	2 (33.3)		4 (66.7)	6 (5.4)	1 (14.3)		6 (85.7)	7 (3.7)
Y			7 (100.0)	7 (6.3)			5 (100.0)	5 (2.6)
Z			1 (100.0)	1 (0.9)				
Z6			1 (100.0)	1 (0.9)	1 (100.0)			1 (0.5)
UT	10 (52.6)	1 (5.3)	8 (42.1)	19 (17.1)	24 (54.5)	4 (9.1)	16 (36.4)	44 (23.3)
計	37 (33.3)	19 (17.1)	55 (49.5)	111 (100.0)	100 (52.9)	28 (14.8)	61 (32.3)	189 (100.0)

1 各血清群の株数に対する割合

2 供試株数に対する割合

表2 GBS 関連 3 遺伝子の血清型別検出結果(鶏肉由来株、2年間)

Penner 血清群	平成27年				平成28年			
	cst +, cgtA+, (%) 1 cgtB+	cst +, cgtA-, (%) 1 cgtB-	cst -, cgtA-, (%) 1 cgtB-	計 (%) 2	cst +, cgtA+, (%) 1 gctB+	cst +, cgtA-, (%) 1 gctB-	cst -, cgtA-, (%) 1 gctB-	計 (%) 2
A			4 (100.0)	4 (6.9)	1 (33.3)		2 (66.7)	3 (5.7)
B	12 (70.6)	3 (17.6)	2 (11.8)	17 (29.3)	7 (50.0)	3 (21.4)	4 (28.6)	14 (26.4)
C			2 (100.0)	2 (3.4)	(0.0)	1 (100.0)		1 (1.9)
D	1 (20.0)	3 (60.0)	1 (20.0)	5 (8.6)	1 (16.7)	5 (83.3)		6 (11.3)
E						1 (100.0)		1 (1.9)
F			2 (100.0)	2 (3.4)				
G			3 (100.0)	3 (5.2)				
G/HS17			4 (100.0)	4 (6.9)		2 (25.0)	6 (75.0)	8 (15.1)
I	1 (100.0)			1 (1.7)	1 (100.0)	(0.0)		1 (1.9)
K			1 (100.0)	1 (1.7)				
L			2 (100.0)	2 (3.4)				
L/U			1 (100.0)	1 (1.7)				
O					1 (100.0)			1 (1.9)
R	2 (66.7)		1 (33.3)	3 (5.2)			3 (100.0)	3 (5.7)
Y			6 (100.0)	6 (10.3)			1 (100.0)	1 (1.9)
Z			1 (100.0)	1 (1.7)				
Z6			1 (100.0)	1 (1.7)				
UT	1 (20.0)		4 (80.0)	5 (8.6)	9 (64.3)	1 (7.1)	4 (28.6)	14 (26.4)
計	17 (29.3)	6 (10.3)	35 (60.3)	58 (100.0)	20 (37.7)	13 (24.5)	20 (37.7)	53 (100.0)

1 各血清群の株数に対する割合

2 供試株数に対する割合

表3 GBS 関連 3 遺伝子の血清型別検出結果(下痢症患者由来株、2年間)

Penner 血清群	平成27年				平成28年			
	cst +, cgtA+, (%) 1 cgtB+	cst +, cgtA-, (%) 1 cgtB-	cst -, cgtA-, (%) 1 cgtB-	計 (%) 2	cst +, cgtA+, (%) 1 cgtB+	cst +, cgtA-, (%) 1 cgtB-	cst -, cgtA-, (%) 1 cgtB-	計 (%) 2
A			1 (100.0)	1 (1.1)			3 (100.0)	3 (3.2)
B	40 (78.4)	5 (9.8)	6 (11.8)	51 (54.3)	10 (47.6)	8 (38.1)	3 (14.3)	21 (22.1)
B,F			1 (100.0)	1 (1.1)				
B,R	1 (100.0)			1 (1.1)				
C			1 (100.0)	1 (1.1)			1 (100.0)	1 (1.1)
D	1 (14.3)	6 (85.7)		7 (7.4)	1 (20.0)	4 (80.0)		5 (5.3)
F			2 (100.0)	2 (2.1)			1 (100.0)	1 (1.1)
G			1 (100.0)	1 (1.1)			2 (100.0)	2 (2.1)
G/HS17			1 (100.0)	1 (1.1)			3 (100.0)	3 (3.2)
I				0 (0.0)	1 (100.0)			1 (1.1)
J				0 (0.0)			1 (100.0)	1 (1.1)
K			4 (100.0)	4 (4.3)				
L							1 (100.0)	1 (1.1)
L/U		1 (33.3)	2 (66.7)	3 (3.2)				
O	4 (100.0)			4 (4.3)	16 (100.0)			16 (16.8)
R	1 (25.0)		3 (75.0)	4 (4.3)			3 (100.0)	3 (3.2)
Y			2 (100.0)	2 (2.1)			3 (100.0)	3 (3.2)
Z6					1 (100.0)			1 (1.1)
UT	1 (9.1)	2 (18.2)	8 (72.7)	11 (11.7)	23 (69.7)	2 (6.1)	8 (24.2)	33 (34.7)
計	48 (51.1)	14 (14.9)	32 (34.0)	94 (100.0)	52 (54.7)	14 (14.7)	29 (30.5)	95 (100.0)

1 各血清群の株数に対する割合

2 供試株数に対する割合

## 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩(LAS)の分析法の検討

環境科学部 椋 佳奈

### 1 はじめに

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩(LAS)とは洗剤に使われる界面活性剤の一種であり、ここでは炭素鎖 C10～14 の 5 成分を指す。図 1 に C10-LAS の構造式を示す。

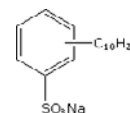
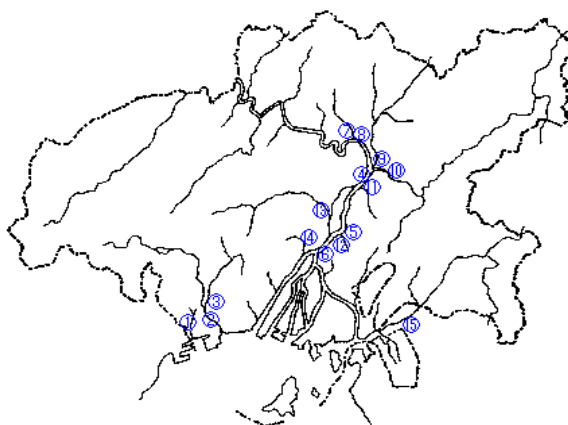


図 1 C10-LAS

広島市では河川水に混入する生活雑排水の影響を把握するため、昭和 55 年度から太田川のほか市内の中小河川における洗剤残存調査を行っている。図 2 に調査地点を、図 3 に平成 8 年度から 27 年度までの年次推移を示す(継続調査を行っている 2 地点)。

LAS の分析について従来は液体クロマトグラフ-蛍光法(LC 法)で分析してきたが、平成 25 年 3 月の環境省告示第 30 号により LAS が環境基準に追加され、分析法は液体クロマトグラフ-質量分析(LC-MS/MS)法が示されたことから、LC-MS/MS による分析法の検討を行った。

今回は、分析方法の検出下限値(MDL)及び分析方法の定量下限値(MQL)の算出について検討したので、結果を報告する。



地点番号	水域名	測定地点名
1	岡ノ下川	千同橋
2	八幡川	泉橋
3	石内川	石内川河口
4	太田川	太田川橋
5	太田川	戸坂上水道取水口
6	太田川	大芝水門
7	大毛寺川	灰川橋
8	帆待川	帆待川河口
9	根谷川	根の谷橋
10	三篠川	三篠川河口
11	落合川	落合川河口
12	戸坂川	戸坂川河口
13	安川	五軒屋
14	新安川	長束駅入口
15	瀬野川	日浦橋

図 2 洗剤残存調査地点

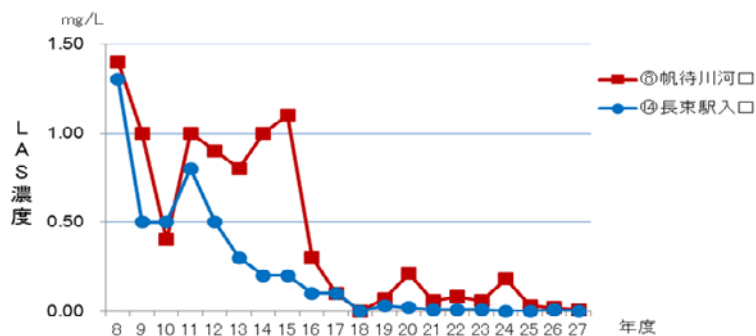


図 3 LAS 濃度の年次推移

## 2 方法

### (1)分析方法

「水質汚濁に係る環境基準」付表 12 LAS の測定方法 固相抽出-LC-MS/MS 法 に準拠した。操作フローを図 4 に、測定条件を表 1 に示す。

#### 固相抽出

カートリッジ(Waters PS-2) コンディショニング  
メタノール 10ml 超純水 10ml  
試料 300ml 通水 流速 20ml/min  
脱水 アルゴンガス 3min  
溶出 メタノール 6ml  
濃縮 アルゴンガスで乾固  
定容 内標準液(C8-LAS 1mg/L)50μg  
アセトニトリル/超純水(65 : 35)で 1ml に定容

#### LC-MS/MS 測定

図 4 操作フロー

### (2)MDL 及び MQL の算出

要調査項目等調査マニュアル(環境省)を参考にし算出した。

河川水試料に C10 ~ 14-LAS として各 0.05μg 添加した試料を 7 本調製し、図 4 の操作フローに従い測定した。

その標準偏差から MQL を求めた。

$$MDL = 2 \times s \times t \quad (t=1.943)$$

$$MQL = 10 \times s \quad (n=7, s: 標準偏差)$$

## 3 結果

算出した MDL 及び MQL を表 2 に示す。C10 ~ 14 の MQL 合計は 0.52μg/L となり、平成 28 年度広島県公共用水域等の水質測定計画の定量下限値 0.6μg/L を下回ることが分かった。回収率は 68 ~ 109%であった。

表 2 MDL 及び MQL 算出結果

	C10	C11	C12	C13	C14	計
平均値(μg/L)	0.20	0.26	0.21	0.17	0.11	-
標準偏差 s	0.008	0.017	0.013	0.009	0.005	-
MDL(μg/L)	0.03	0.07	0.05	0.03	0.02	0.20
MQL(μg/L)	0.08	0.17	0.13	0.09	0.05	0.52
回収率(%)	99	109	99	86	68	-

平均値は河川水に標準物質を添加した試料濃度である。

表 1 測定条件

LC 条件			
装置	島津製作所 NexeraX2 LC-30AD		
カラム	Shim-Pack XR-ODS ID 2.0mm x L 150mm, 2.2μm		
流速	0.2mL/min		
注入量	5μL		
カラム温度	40		
移動相	A ギ酸(0.1v/v%)・ギ酸アンモニウム水溶液(50mmol/L) B アセトニトリル		
グラジエント	なし A35% B65%		
MS 条件			
装置	島津製作所 LCMS8050		
イオン化モード	ESI-		
インターフェイス温度	150		
ネブライザーガス流量	3.0L/min		
DL 温度	250		
ヒートブロック温度	400		
	Q1(m/z)	Q3(m/z)	CE(V)
C8	269	183	35
C10	297	183/119	32/50
C11	311	183/119	34/52
C12	325	183/119	36/52
C13	339	183/119	37/55
C14	353	183/119	40/55

# 広島湾における栄養塩類等の調査について

環境科学部 竹井 秀夫

## 1 はじめに

瀬戸内海では、高度経済成長に伴い水質の悪化が顕著になり、赤潮被害等が多発していたことから、国は富栄養化対策として栄養塩類（窒素やリン等）の排出規制等を実施してきた。これらの取組によって、一定の水質改善等の成果が上がってきたが、一方で藻場・干潟の減少や底質改善の遅れ、漁獲量の減少等、依然として解決すべき課題が残っている状況である。

こうした中、平成 27 年 10 月 2 日に瀬戸内海環境保全特別措置法の一部を改正する法律が公布、施行され、「豊かな瀬戸内海」の実現を目指した取組へと国の瀬戸内海環境保全基本計画が変更された。これを受け、広島県は平成 28 年 10 月に「瀬戸内海の環境の保全に関する広島県計画」を変更し、多様な主体によって里海づくりが継続されることを目指している。

広島市は、広島湾において平成 25 及び 26 年にかきの採苗不調が続いたことから、その原因解析を進めていくため、広島湾内の栄養塩類等の調査を平成 28 年度から経済観光局水産課において実施している。当所では、その調査のうち、リン等の測定を実施したので、その結果を報告する。



図 1：採水地点図

## 2 調査内容

(1) 採水地点：広島湾内 4 地点（図 1 のとおり）

江波 カクマ南 三高 大黒神島中  
水深 2m で採水

(2) 採水回数：12 回（6 月～2 月、現時点）

(3) 分析項目及び分析方法：表 1 のとおり

表 1：分析項目及び分析方法

分析項目	分析方法（海洋観測指針（1990）JIS K0102 による）
全リン（TP）	ペルオキシ二硫酸カリウム分解 - モリブデン青吸光光度法
溶解性リン（DP）	孔径 0.45μm のフィルターでろ過 全リン（TP）と同じ
溶解性無機リン（DIP）	孔径 0.45μm のフィルターでろ過 モリブデン青吸光光度法
粒子性有機態リン（POP）	計算値（=全リン（TP）- 溶解性リン（DP））
溶解性有機態リン（DOP）	計算値（=溶解性リン（DP）- 溶解性無機リン（DIP））
ケイ酸態ケイ素	モリブデン青吸光光度法
クロロフィル a（全量）	吸光法
クロロフィル a（<5μm）	孔径 5μm のフィルターでろ過 クロロフィル a（全量）と同じ

### 3 結果と考察

#### (1) 栄養塩類等の濃度と河口域からの距離の関係について

各地点について、これまでの12回分の測定結果の平均値を比較したところ(表2)全リン(TP)、ケイ酸態ケイ素は太田川の河口域から近い順に高い値となっていた( > > > )。これは、これらの栄養塩類が河川水から供給されているためと考えられる。また、クロロフィルa(全量)についても、同様の結果( > > > )であり、栄養塩類が豊富な海域において植物プランクトンが繁殖している可能性が示唆された。

表2：各地点における分析項目ごとの平均値

分析項目	江波	カクマ南	三高	大黒神島中
全リン(TP) (mg/L)	0.035	0.029	0.027	0.025
溶解性リン(DP) (mg/L)	0.019	0.018	0.017	0.018
溶解性無機リン(DIP) (mg/L)	0.014	0.012	0.012	0.012
粒子性有機態リン(POP) (mg/L)	0.016	0.011	0.010	0.007
溶解性有機態リン(DOP) (mg/L)	0.005	0.005	0.005	0.005
ケイ酸態ケイ素 (mg/L)	0.7	0.6	0.5	0.3
クロロフィルa(全量) (mg/m <sup>3</sup> )	5.4	4.1	3.1	1.8
クロロフィルa(<5μm) (mg/m <sup>3</sup> )	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5

定量下限値未満の場合は定量下限値で計算

(ただし、クロロフィルa(<5μm)は全測定結果が定量下限値(0.5)未満のため<0.5とした)

#### (2) 栄養塩類濃度とクロロフィルa濃度の関係について

地点ごとのクロロフィルa(全量)濃度に対するケイ酸態ケイ素濃度を図2に示す。4地点とも、負の相関が得られた(ただし、6及び7月測定分を除く9測定分)。このことから、植物プランクトンの繁殖に伴い、ケイ酸態ケイ素が消費されている可能性が示唆された。

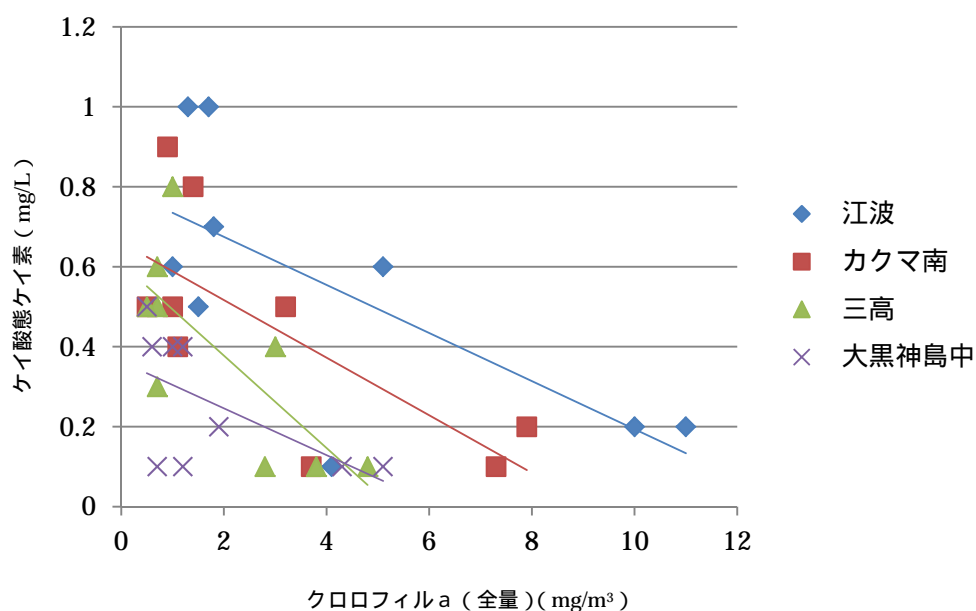


図2：クロロフィルa(全量)濃度に対するケイ酸態ケイ素濃度



# 有害大気汚染物質（金属）の調査について

環境科学部 原田 敬輔

## 1 はじめに

大気中には排気ガスや土壌の巻き上げ等により粒子状物質が浮遊しており、その中には人体に有害な金属が含まれている。

広島市では、有害大気汚染物質調査、浮遊粉じん調査を行っており、ベリリウム（Be）、クロム（Cr）、マンガン（Mn）、ニッケル（Ni）、ヒ素（As）、水銀（Hg）、鉛（Pb）、カドミウム（Cd）、銅（Cu）、亜鉛（Zn）、鉄（Fe）、バナジウム（V）、チタン（Ti）、アルミニウム（Al）、マグネシウム（Mg）、カルシウム（Ca）を測定・報告している。

今回、平成 22 年度から平成 27 年度までの測定結果について解析を行ったので報告する。

## 2 方法

いずれの調査も、有害大気汚染物質測定方法マニュアル<sup>1)</sup>に準拠し実施した。表 1 に調査方法の詳細を示す。

## 3 結果

有害大気汚染物質調査

### ア 濃度推移

いずれの金属も、横ばいから微増の傾向を示していた。代表例として図 1 に Mn の年平均値推移を示す。

### イ 金属間の相関

いずれの地点においても、Mn と粉じんの相関が高かったが、そのほかの金属元素については明確な傾向は見られなかった（表 2）。

浮遊粉じん調査

### ア 濃度推移

急激な増加や減少傾向を示す金属元素は無く、ほぼ横ばいの推移であった。代表例として図 2 に Mn の年平均値推移を示す。

### イ 金属間の相関

主に土壌に由来する金属のうち、Fe-Mn、Ti-Al、Ti-Mg、Mg-Al の相関が、高い傾向を示していた（表 3）。

### ウ 金属濃度比

各年の V/Mn 比の幾何平均は、冬季に低下していた。また、Pb/Zn 比は冬季、春季に高くなっていった。（図 3）

## 4 考察

### 濃度推移

今回の解析では、大気中金属濃度は横ばいから微増傾向であった。広島市内においては、Ni、Cr、Mn の排出事業所があるが、排出量は少ないため、発生源とその寄与率の検討を行うには更なるデータの蓄積が必要であると考えられた。

### 相関

今回解析対象とした金属は、主に土壌由来である Be、Fe、Mn、Ti、Al、Mg、主に石油燃焼由来である V、Ni、主に工業生産、廃棄物燃焼由来である Cr、Pb、Cd、Zn、Cu、Hg、As の 3 グループに分けられる。今回の解析では、いずれの金属も、既報<sup>2)</sup>と同様の傾向であり、発生源の傾向に変化はないと考えられた。

表1: 調査方法詳細

	有害大気汚染物質	浮遊粉じん
捕集方法	毎月1回・24時間サンプリング	年4回・72時間サンプリング
流量	800L/min	1000L/min
ろ紙	石英繊維ろ紙	平成25年まで石英繊維ろ紙、平成26年よりテフロンろ紙 サイクロンにて10μmカット
測定法	ろ紙分解-ICPMS (Hgについては捕集管捕集-金アマルガム加熱酸化原子吸光法)	
調査地点	井口小学校、比治山測定局、楠那中学校、安佐南区役所	伴小学校
解析対象物質	Be, Cr, Ni, Mn, As, Hg, 粉じん量	Ni, Mn, Pb, Cd, Cu, Zn, Fe, V, Ti, Al, Mg, Ca, 粉じん量
解析方法	濃度推移、金属間の相関	濃度推移、金属間の相関、V/Mn比、Pb/Zn比

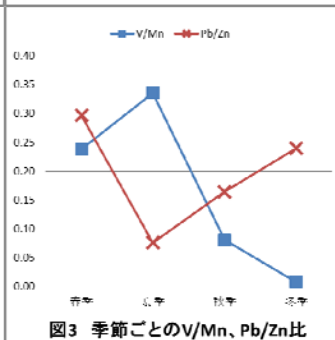
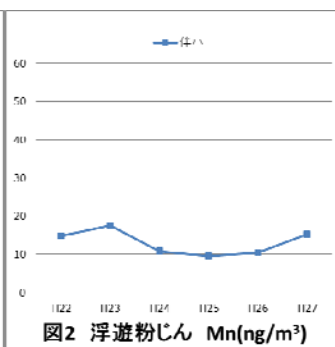
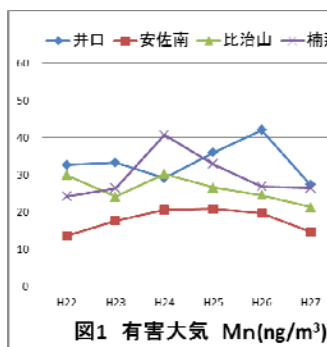


表2 金属間の相関係数(有害大気汚染物質調査)

安佐南	Hg	Ni	As	Be	Mn	Cr
Ni	0.28					
As	0.08	0.20				
Be	0.10	0.42	0.25			
Mn	0.24	0.69	0.38	0.72		
Cr	0.19	0.78	0.22	0.33	0.72	
粉じん	0.37	0.76	0.38	0.67	0.81	0.62
井口小	Hg	Ni	As	Be	Mn	Cr
Ni	0.46					
As	0.11	0.18				
Be	-0.15	-0.01	0.07			
Mn	0.07	0.33	0.29	0.79		
Cr	0.28	0.71	0.30	-0.05	0.23	
粉じん	0.23	0.28	0.19	0.75	0.72	0.11
比治山	Hg	Ni	As	Be	Mn	Cr
Ni	0.60					
As	0.34	0.21				
Be	0.17	0.26	0.29			
Mn	0.53	0.50	0.53	0.57		
Cr	0.48	0.60	0.25	0.28	0.61	
粉じん	0.61	0.61	0.51	0.55	0.80	0.58
楠那中	Hg	Ni	As	Be	Mn	Cr
Ni	0.35					
As	0.18	0.27				
Be	-0.02	0.57	0.13			
Mn	0.24	0.81	0.39	0.76		
Cr	0.02	0.45	0.09	0.28	0.44	
粉じん	0.35	0.80	0.24	0.74	0.82	0.42

0.7以上

V/Mn、Pb/Zn 比

既報<sup>2)</sup>では、中国では主に石炭を暖房燃料として使用しているため、冬季に V/Mn 比が低下し、この影響を受けて本市においても冬季の V/Mn 比が低下していた。また、中国の環境中鉛濃度は日本の環境中鉛濃度より高く、大陸からの越境汚染があると Pb/Zn 比が上昇すると考えられている<sup>3)</sup>。既報<sup>2)</sup>においては、春季及び冬季の Pb/Zn 比はいずれも 0.5 を上回っていた。今回の解析においても、程度は低いものの、冬季の V/Mn 比の低下、Pb/Zn 比の上昇がみられ、既報<sup>2)</sup>と同様に冬季は大陸からの影響が無視できないと考えられた。

5 まとめ

平成 22 年度から平成 27 年度までの大気中金属濃度について解析を行った。その結果、広島市域の大気中金属濃度は横ばいから微増で推移しており、また、過去の傾向と同じく冬季には大陸からの影響を受けていると推察された。

浮遊粉じん調査では平成 26 年度より参考元素としてさらに 17 種類の金属 (Be, Na, K, Sc, Cr, Co, As, Se, Rb, Mo, Sb, Cs, Ba, La, Ce, Sm, Th) を追加して測定しており、今後は参考元素についても新たに解析していく。

6 参考文献

- 1) 環境省 水・大気環境局  
大気環境課：有害大気汚染物質  
測定方法マニュアル (2008)
- 2) 広島市衛生研究所年報 No.32  
84-86(2013)
- 3) 日置正 他：降水中微量金属  
元素濃度比と鉛同位体比による  
長距離輸送と地域汚染の解析,  
大気環境学会誌, 43 (2) 100 ~  
111(2008)

表3 金属間の相関係数(浮遊粉じん調査)

	Pb	Cd	Zn	Cu	Ni	Fe	Mn	V	Ti	Ca	Al	Mg
Cd	0.54											
Zn	0.32	0.34										
Cu	-0.04	0.27	0.01									
Ni	0.32	-0.11	0.24	-0.41								
Fe	0.52	0.43	0.56	-0.10	0.41							
Mn	0.47	0.63	0.34	-0.03	0.20	0.78						
V	0.09	-0.22	0.07	0.20	0.30	0.17	-0.05					
Ti	0.34	0.08	0.38	-0.23	0.36	0.68	0.23	0.17				
Ca	0.27	-0.04	0.46	-0.13	0.47	0.65	0.10	0.36	0.79			
Al	0.26	0.04	0.50	-0.09	0.34	0.70	0.17	0.37	0.90	0.92		
Mg	0.27	0.00	0.37	-0.15	0.39	0.63	0.09	0.26	0.90	0.87	0.90	
粉じん	0.52	-0.10	0.34	-0.23	0.59	0.46	0.08	0.57	0.44	0.64	0.52	0.47
由来	工業・廃棄物	工業・廃棄物	工業・廃棄物	工業・廃棄物	工業・廃棄物	石油	土壌	土壌	石油	土壌	土壌	土壌

# 大気中の水銀およびフロン類の調査について

環境科学部 村野勢津子

## 1 はじめに

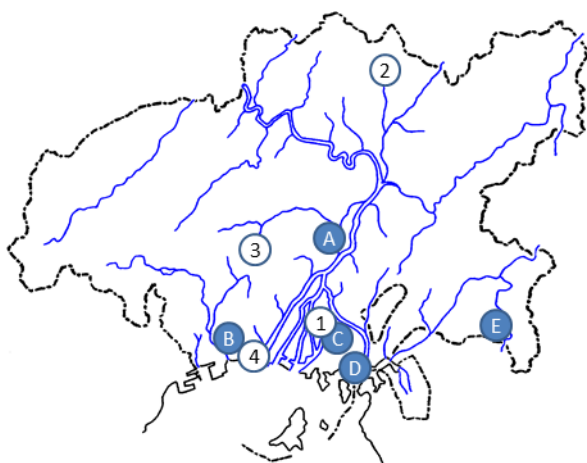
広島市では、有害大気汚染物質モニタリング調査（有害モニタリング）の一項目として、水銀による大気汚染状況を毎月測定している。今回、これまでの調査結果をとりまとめるとともに、環境省が実施するバックグラウンド（以下「BG」という）地点における測定結果と比較したので、その結果を報告する。詳細は、衛生研究所年報第35号資料編（平成28年11月発行）で報告した。

また、大気中フロン類調査の結果についてとりまとめるとともに、有害モニタリングにおけるフロン類測定結果および環境省が実施するBG地点における測定結果と比較したので、その結果を併せて報告する。

## 2 調査方法

### 2-1 調査地点

フロン類調査、有害モニタリングの調査地点を図1に示す。



調査地点名(略号)	[調査名]
1 広島市役所(CY)	[フロン類調査]
2 中電研修センター(CD)	"
3 五月が丘公民館(ST)	"
4 衛生研究所(EK)	"
A 安佐南区役所(AS)	[有害モニタリング]
B 井口小学校(IN)	"
C 比治山測定局(HJ)	"
D 楠那中学校(KS)	"
E 阿戸出張所(AT)	"

図1 調査地点

### 2-2 調査期間等

広島市の調査結果は、平成22年度から平成27年度までの6年間の結果を用いた。

水銀のBGデータは、『平成26年度大気中水銀バックグラウンド濃度等のモニタリング調査結果について(平成27年9月 環境省)』に記載されている沖縄県辺戸岬および秋田県男鹿半島における測定結果を引用した。

フロン類のBGデータは、『平成27年度 オゾン層等の監視結果に関する年次報告書(平成28年8月 環境省)』に記載されている北海道における測定結果(1989年～2015年)から引用した。

### 2-3 測定方法

『有害大気汚染物質測定マニュアル(平成23年3月改訂 環境省)』に準拠した。測定頻度は、有害モニタリングは1回/月の24時間/回測定である。フロン類調査は、2回/年(夏季および冬季)の24時間×3日連続測定である。

## 3 結果と考察

### 3-1 水銀濃度について

広島市における大気中水銀濃度について、環境省が実施したBG地点の濃度と比較した結果、最近6年間についてはBG地点の濃度と同程度で推移していた(図2)。しかし、月別平均による季節変動(図3)をみると広島市では6月から8月に濃度が高くなる傾向にあり、地点別の変動幅(図4)はBG地点が最も小さかった。水銀は、常温で液体である唯一の金属であり、揮発性が高いことから、季節変動は、気温の影響を受けたものであると考えられた。市内4地点の変動幅がBG地点よりも大きかったが、水銀は様々な排出源から環境中に排出されており、国内の大気排出量は年間17～22トン(自然由来を除く)と推計されていることから、広島市内ではこの排出の影響を受けている可能性も推測できる。

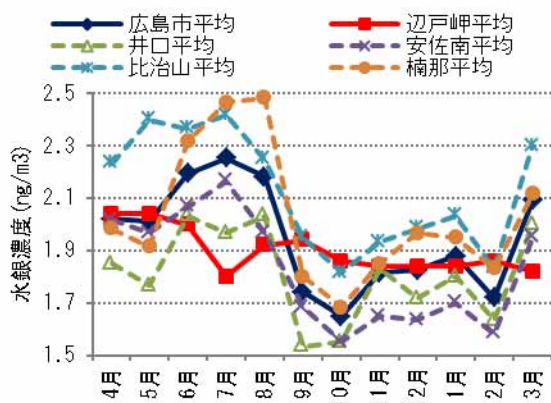


図3 水銀濃度の月別平均による季節変動

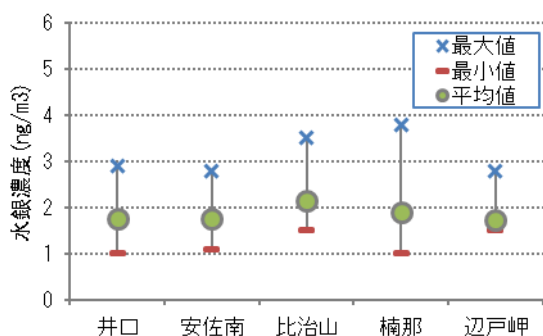


図4 水銀濃度の地点別の変動幅

### 3-2 フロン類濃度について

平成27年度の調査結果を図5に示す。特定フロンであるCFC-12は4地点すべてにおいて濃度が高い傾向であった。また、HFC-134aおよびHCFC-22は測定値にバラツキがみられた。

図6に同年度の有害モニタリング地点におけるフロン類濃度を示した。各物質の濃度は、フロン類調査

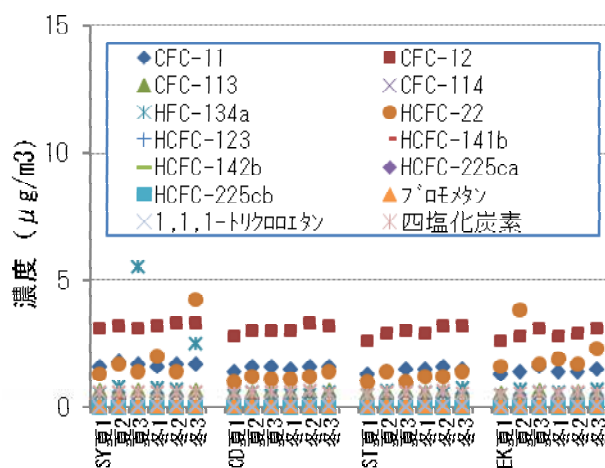


図5 平成27年度フロン類調査結果

地点とほぼ同程度であったが、HFC-134a および HCFC-22 においては、フロン類調査地点よりも変動が大きかった。

次に、特定フロンおよび代替フロンのうち、比較的濃度の高い物質(CFC-11, CFC-12, HCFC-22, HFC-134a)について、経年変化(平成22~27年度)をBG地点である北海道と比較した(図7)。

増減傾向については、BG地点と同様であったが、特に、代替フロンについて、広島市の値は高く、HCFC-134aの顕著な増加がみられた。

これまで、フロン類の調査は、年2回(各3日)行ってきたが、有害モニタリングの結果を活用すれば、年12回の結果を得ることが可能となり、季節変動などより詳細に把握できる。有害モニタリングの地点は、フロン類調査とは異なっているが、濃度の変動は、同様であるので、広島市のフロン類調査の継続性は保たれると考える。



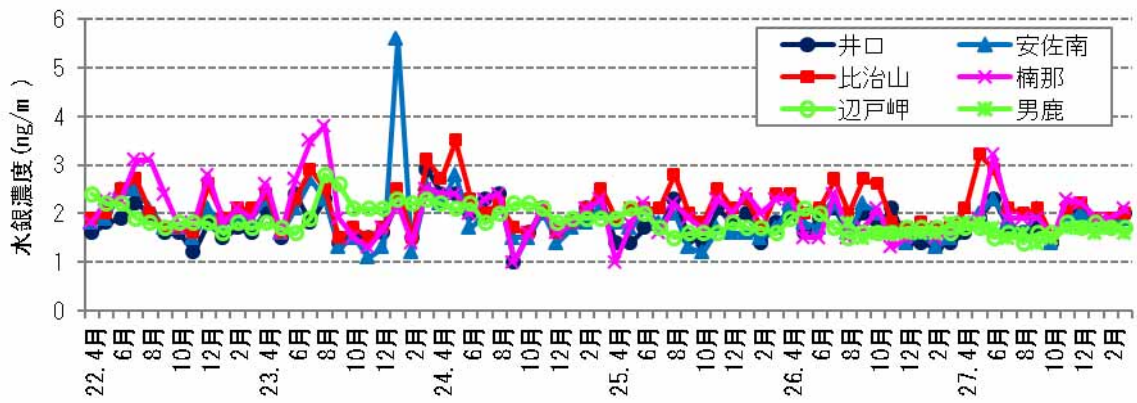


図2 大気中水銀濃度の経年変化

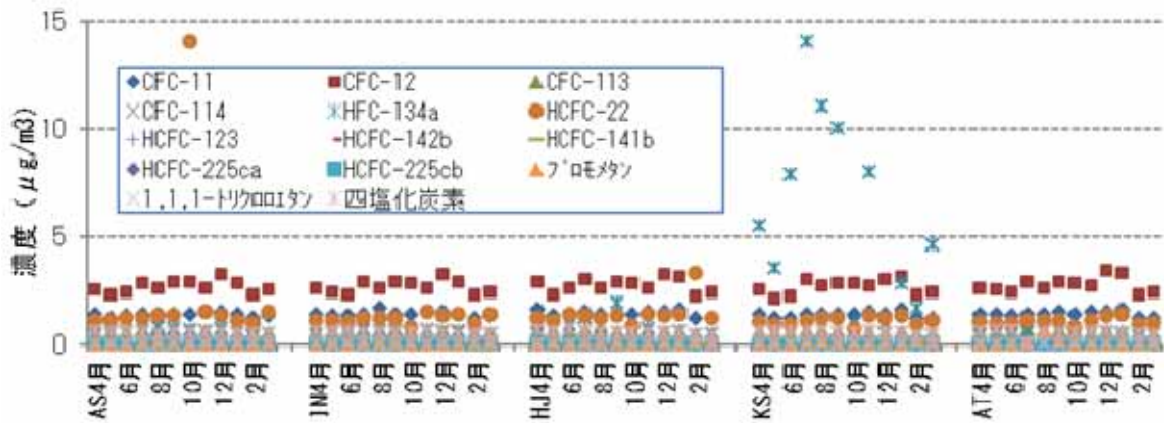


図6 地点別フロン類濃度（平成27年度有害モニタリング地点）

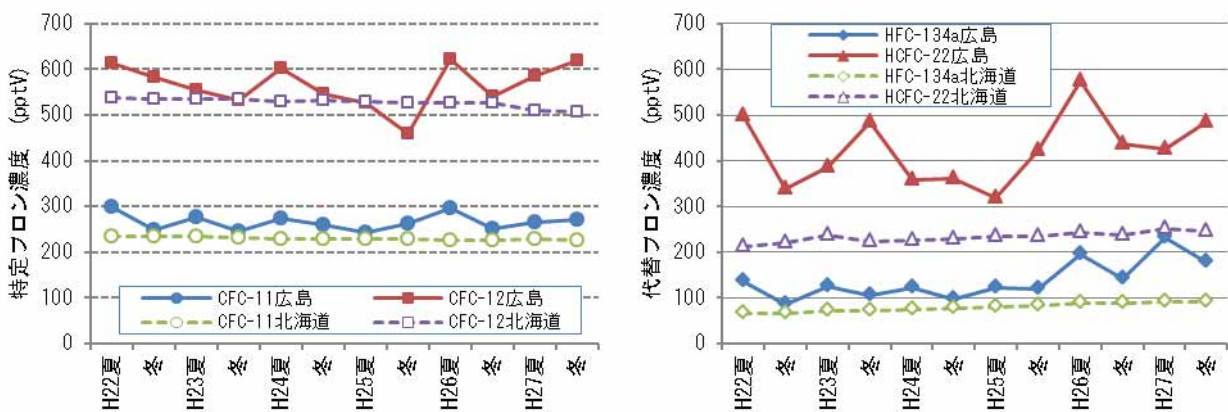


図7 フロン類の経年変化