

Shizuoka-Ken Kankyō Eisei Kagaku
Kenkyūsho Hōkoku 53(2010)
ISSN 1343-246X

静岡県環境衛生科学研究所報告

平成 22 年度

Bulletin
of
Shizuoka Institute of
Environment and Hygiene

No.53 2010

静岡県環境衛生科学研究所

平成23年3月11日の東日本大震災で亡くなられた方々、被害に遭われた方々に対しまして心から御悔み、御見舞い申し上げます。この震災により自然の脅威を改めて見せつけられたと同時に、我々が長年培ってきたあらゆる意味での安全・安心の概念を今一度見直すことの必要性を痛感させられました。被災地の皆様におかれましては、1日も早い復興をお祈り申し上げます。

さて、地球温暖化の進行や資源の枯渇の懸念、生物多様性の損失などが地球環境面での大きな課題になっている中、日本の象徴である富士山を有する本県では、「富国有徳の理想郷“ふじのくに”づくり」を県政運営の基本理念として、平成23年2月に静岡県総合計画を策定し、また、平成32年度までを計画期間とする「第3次静岡県環境基本計画」を定め、県民、事業者、行政などすべての主体が、「知っている」から「行動する」主体となって取り組むための基本的な方向性を示すことにより、持続可能な社会の実現を目指すことといたしました。

これら計画の目標達成に向け、当研究所では現在、環境関係においては「低炭素社会」、「循環型社会」、「自然共生社会」の3つの社会づくりを、保健衛生・消費生活関係においては「感染症・食中毒の未然防止と適切な医療」、「消費者の信頼確保」、「生産から流通・消費における食の安全や安心の確保」を目標に各種の試験検査や調査研究などを行っております。

このうち、調査研究ではファルマバレー構想関連創薬探索研究として「創薬の構造最適化等に関する研究」、県の新成長戦略研究として「富士山における水循環の解明と持続可能な地下水利用に関する研究」、「ノロウイルス不活化剤の探索とその実用化に関する研究」、共同研究として「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」、「沿岸海域環境の診断と地球温暖化の影響評価のためのモニタリング手法の提唱」など、県民生活に密着した行政課題や近年問題となっている課題、将来問題化しそうな課題について、学識経験者等からなる外部評価委員会の評価を受けながら、効果的・効率的に研究を推進しつつ、職員のレベルアップに努めております。

ここに、平成22年度の調査・研究の成果を「静岡県環境衛生科学研究所報告」No.53としてまとめましたので、御高覧の上、御批判、御指導をいただければ幸いです。

平成 23 年 8 月

静岡県環境衛生科学研究所長 松本昭司

目 次

論 文

環境科学部

- 1 伊豆における地熱資源調査と活用
…………… 今津佳子, 神谷貴文 …………… 1
- 2 室内におけるVOCs汚染源のオンサイトスクリーニング手法に関する研究
…………… 山下晶平, 久米一成 …………… 11

微生物部

- 3 リアルタイムPCR法による食中毒起因菌の一斉迅速スクリーニング法の検討
…………… 飯田奈都子, 高橋奈緒美, 廣井みどり, 八木美弥, 西尾智裕,
神田 隆, 杉山寛治 …………… 19
- 4 肉用鶏における基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の保菌実態調査
— 肉用鶏由来 ESBL 産生菌の分子遺伝学的性状解析(第1報) —
…………… 廣井みどり, 高橋奈緒美, 飯田奈都子, 野田佳宏, 八木美弥,
西尾智裕, 神田 隆, 杉山寛治,
静岡県立大学 大橋典男 …………… 25
- 5 肉用鶏における基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の保菌実態調査
— 農場内の肉用鶏における経時的な ESBL 産生菌出現状況(第2報) —
…………… 廣井みどり, 飯田奈都子, 野田佳宏, 高橋奈緒美, 八木美弥,
西尾智裕, 神田 隆, 杉山寛治,
畜産技術研究所 松井繁幸,
関東化学株式会社 久保亮一,
静岡県立大学 大橋典男 …………… 31
- 6 静岡県におけるオセルタミビル耐性インフルエンザウイルスの出現状況に関する調査研究
— H275Y 耐性マーカー検査と薬剤感受性試験の比較 —
…………… 山田俊博, 湊 千壽, 長岡宏美, 川森文彦, 杉山寛治 …………… 35
- 7 静岡県中西部におけるマダニの分布状況ならびに紅斑熱群リケッチア浸淫状況
…………… 川森文彦, 湊 千壽, 山田俊博, 長岡宏美, 杉山寛治 …………… 41

医薬食品部

- 8 栄養補助食品（サプリメント）の成分および品質等について
…………… 小林千恵, 横山玲子, 高橋一則 …………… 45
- 9 TLC一斉分析法による染毛剤の確認試験に関する検討
…………… 山本真也, 内田恭之, 宮本憲吾, 上村慎子, 前田有美恵, 高橋一則 …… 49
- 10 ファルマバレープロジェクト創薬探索研究における静岡化合物ライブラリーの構築と活用について
…………… 鈴木紳之, 小郷尚久, 前田有美恵, 高橋一則,
静岡県立大学大学院 浅井章良 …………… 53
- 11 医薬品等の規格試験法に関する問題点（第九報）
…………… 上村慎子, 山本真也, 尾藤孝弘, 水野くみ子, 内田恭之, 宮本憲吾,
栗田浩幸, 前田有美恵, 高橋一則, 西澤雅彦 …………… 59
- 12 溶出試験の自動化による変動要因に関する考察
…………… 内田恭之, 山本真也, 宮本憲吾, 上村慎子, 前田有美恵, 高橋一則 …… 63

大気水質部

- 13 静岡県内の砒素による地下水汚染の対応について
…………… 濱口浩太, 後藤裕康, 内山道春, 三好廣志, 杉本勝臣, 青木一永 …………… 65
- 14 富士山静岡空港開港に伴う大気環境影響に関する研究（第2報）
— 大気汚染物質の実態調査および航空機からの排出量の試算 —
…………… 石井 聖, 中西隆之, 太田良和弘, 深澤 均 …………… 71

他誌に発表した論文 …………… 79

学会・研究会の報告 …………… 81

表彰等 …………… 84

CONTENTS

PAPERS

Department of Environment Science

- 1 Research for Geothermal Resource and Utilization Possibility in Izu Peninsula
Yoshiko IMAZU and Takafumi KAMITANI 1
- 2 Study of On-site Screening Method for Emission Sources of VOCs in Indoor Environment
Shohei YAMASHITA and Kazunari KUME..... 11

Department of Microbiology

- 3 Study on Simultaneous Rapid Screening of Foodborne Pathogens Using Real-Time PCR
Analysis
Natsuko IIDA, Naomi TAKAHASHI, Midori HIROI, Miya YAGI,
Tomohiro NISHIO, Takashi KANDA and Kanji SUGIYAMA 19
- 4 Study of Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* of Broiler Origin
— Characterization of ESBL-producer from Broiler Feces (1st Report) —
Midori HIROI, Naomi TAKAHASHI, Natsuko IIDA,
Yoshihiro NODA, Miya YAGI, Tomohiro NISHIO,
Takashi KANDA, Kanji SUGIYAMA and Norio OHASHI 25
- 5 Study of Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* of Broiler Origin
— Longitudinal study of ESBL-producer from Broiler Feces (2nd Report) —
Midori HIROI, Shigeyuki MATSUI, Ryoichi KUBO, Natsuko IIDA,
Yoshihiro NODA, Naomi TAKAHASHI, Miya YAGI, Tomohiro NISHIO,
Takashi KANDA, Kanji SUGIYAMA and Norio OHASHI..... 31
- 6 Research on Oseltamivir-resistant Influenza in Shizuoka Prefecture
— Comparative Studies of H275Y Mutation Test between Chemical Sensitivity Test —
Toshihiro YAMADA, Chihiro MINATO, Hiromi NAGAOKA,
Fumihiko KAWAMORI and Kanji SUGIYAMA 35

- 7 Distribution of Ticks and Prevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in the Central and Western Parts of Shizuoka Prefecture
Fumihiko KAWAMORI, Chihiro MINATO, Toshihiro YAMADA,
Hiromi NAGAOKA and Kanji SUGIYAMA 41

Department of Drug and Food Science

- 8 Relating to Ingredients and Quality of Supplement
Chie KOBAYASHI, Reiko YOKOYAMA and Kazunori TAKAHASHI.... 45
- 9 Study on the Simultaneous Analytical Method by TLC for the Identification Test of Hair Dye
Masaya YAMAMOTO, Takayuki UCHIDA, Kengo MIYAMOTO,
Mitsuko KAMIMURA, Yumie MAEDA and Kazunori TAKAHASHI 49
- 10 Study on Construction and the Use of Shizuoka Chemical Library for the Drug Discovery in Fuji Pharma Valley
Nobuyuki SUZUKI, Naohisa OGO, Yumie MAEDA, Kazunori TAKAHASHI
and Akira ASAI 53
- 11 Study on the Specifications and Test Methods of Drugs (IX)
Mitsuko KAMIMURA, Masaya YAMAMOTO, Takahiro BITO,
Kumiko MIZUNO, Takayuki UCHIDA, Kengo MIYAMOTO,
Hiroyuki KURITA, Yumie MAEDA, Kazunori TAKAHASHI
And Masahiko NISHIZAWA 59
- 12 Study of Automation-induced variables on Dissolution Test
Takayuki UCHIDA, Masaya YAMAMOTO, Kengo MIYAMOTO,
Mitsuko KAMIMURA, Yumie MAEDA and Kazunori TAKAHASHI 63

Department of Pollution Control

- 13 Correspondence for Groundwater Contamination by Arsenic in Shizuoka
Kota HAMAGUCHI, Hiroyasu GOTO, Michiharu UCHIYAMA,
Hirosi MIYOSHI, Katsuomi SUGIMOTO and Katsunaga AOKI 65

14	Study of the Environmental Air in the Area of Mt.Fuji Shizuoka Airport(II) —Measurements of Air Pollutants and Calculations of airplane emissions— Satoru ISHII, Takayuki NAKANISHI, Kazuhiro OHTARA and Hitoshi FUKAZAWA	71
	SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS	79
	PRESENTATIONS AT CONFERENCES AND/OR SOCIETY MEETINGS	81
	COMMENDATION	84

伊豆における地熱資源調査と活用

環境科学部 環境科学班 今津佳子

神谷貴文*

Research on Geothermal Resource and Utilization Possibility in Izu Peninsula

Yoshiko IMAZU and Takafumi KAMITANI

伊豆地区の地熱資源のうち、地域社会と共存可能な温泉熱資源の活用法として、高温温泉水を浴用の温度に冷ます際に余剰となりうる熱のバイナリー発電による有効利用または前述の余剰熱および温泉排水が有する熱のヒートポンプによる有効利用の可能性を資源量およびその安定性の点から検討した。

その結果、静岡県内温泉地概況調¹⁾から得られた温泉地区ごとの平均湧出熱量(50°C基準)から考えた範囲では、伊豆地区の温泉地区中、過去9~17年間にわたり平均温度70°C以上を維持していた6地区では、3~10井程度を集中管理できれば、または熱量の突出した源泉があれば単独で、試験段階の50kW級のバイナリー発電施設に熱を供給できる可能性があると考えられた。

また、温泉排水などからのヒートポンプによる熱回収の可能性については、平均湧出・揚湯量をベースに検討したところ、50の温泉地区中20地区で有望と考えられた。

Key words: 伊豆半島, 地熱資源, 温泉, 再生可能エネルギー

Izu Peninsula, geothermal resource, hot spring, renewable energy

はじめに

自然界での生成に長期間を要したと考えられ枯渇が懸念されている化石燃料と異なり、地熱は、エネルギーの採取速度を自然界での生成速度以下に抑えても実用性を損なわないレベルで持続的に利用できる可能性を備えた「再生可能エネルギー」として有望な自然エネルギーである。我が国の地熱資源量はインドネシア、米国に次いで世界3位と推定されているものの、国内の地熱発電は総発電量の0.3%程度にとどまっている²⁾。理由としては、開発リスクやコスト(開発の準備期間の長さ、追加投資の必要性、調査・建設段階の支出が大など)³⁾に加え、地熱有望地域の多くが国立公園内にあること、地元に温泉枯渇の懸念があることなどが挙げられる。

伊豆地区は温泉源が豊富で地熱利用の可能性が大きい

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

*: 環境科学部 富士山地下水プロジェクトスタッフ

一方で、上記の理由により開発自体が困難な地域となっている。しかし近年、地熱資源の利用は、地熱発電のみならず、それほど高温高圧でない熱水を取り出して水より沸点の低い液体を加熱・気化させて発電するバイナリー発電など、必ずしも温泉資源と対立するものではない方法が開発されている。また発電だけでなく、温泉熱を利用したヒートポンプシステムなどの熱利用方法もある。

そこで、本研究では地域社会と共存できる温泉熱の活用の可能性について検討したので報告する。

調査方法

1 規制状況調査

伊豆地区(本研究では、熱海市、伊東市、下田市、伊豆市、伊豆の国市、東伊豆町、河津町、南伊豆町、松崎町、西伊豆町、函南町の5市6町および沼津市のうち旧戸田村の地域とする)の地熱開発に関する土地利用規制(自然公園法、森林法、文化財保護法等)による規制状況を把握し、温泉法等に基づく温泉の掘削に対する許可制度等について調べた。

2 地熱資源調査

1) 既存資料調査

これまで実施されてきた地熱資源調査の文献を収集し、整理した。

2) 温泉熱資源調査

県衛生課が静岡県温泉協会と連名で発行している温泉実態調査報告書⁴⁾および統計センターしずおかに登録された静岡県内温泉地概況調¹⁾をもとに、温泉熱資源についてまとめた。

3 地熱利用最新動向調査

1) 温泉熱を利用したバイナリー発電の動向

温泉熱を利用したバイナリー発電に関する最新動向を把握するため、地熱資源の専門機関である独立行政法人産業技術総合研究所(以下、産総研)へのヒアリング調査を実施した。

2) 温泉排水からのヒートポンプによる熱回収の事例

ヒートポンプシステム等の地熱利用に関する最新動向を把握するとともに、地域社会との共存にあたって必要な要素について探るため、導入主体である洞爺湖温泉利用協同組合へのヒアリング調査を実施した。

4 利用可能性の検討

伊豆地区には、後述のとおり各種の規制がかけられているため、新規の温泉の掘削などを伴わずに実施可能なバイナリー発電とヒートポンプによる熱回収の2点に絞って検討した。

なお、資源量を推定するためのデータは、アンケート調査等にはよらず、統計センターしずおかで公表されている1992~2001年および2003~2009年の静岡県内温泉地概況調¹⁾のデータを用いた。それは、調査主体が静岡県の委託を受けた静岡県温泉協会であり、伊豆地区全体で均質なデータが記載されているものと推測したためである。この統計資料では年により集計する地域が変わっている地区があるため、期間中の変動が比較検討できるよう原則として50地区にまとめなおして集計した。また、これらのデータは、各年の基準日(2月1日)前後1ヶ月に調査されており、季節変動を反映していないことと温度や湧出・揚湯量が計測されていない源泉(以下、欠測井)も湧出・揚湯源泉数に含まれているため、そこに誤差が生じていることに注意して検討した。

1) 湧出熱量から見たバイナリー発電の可能性

バイナリー発電について、温泉地区ごとの平均温度(熱量計算により算出されたもの、以下同じ)の推移と湧出・揚湯量から利用の可能性を調べた。カーナサイクルによるバイナリー発電では、実用性を考えると供給湯温は70℃以上が望ましいとされているため、まず、継続的に

平均温度70℃以上の温泉地区を選び出した。そしてそれらの地区について、統計上の温泉地区の平均温度から浴用に供給する50℃に冷ます過程で得られる熱量(50℃基準の湧出熱量)を調べた。温泉地区内の50℃基準の湧出熱量は、単独の源泉で必要な熱量を供給できるか調べるため、1井あたりの熱量と温泉地区あたりの熱量の両方を調べた。

2) ヒートポンプによる熱回収の可能性について

ヒートポンプによる熱回収について、温泉地区ごとの平均湧出・揚湯量から利用の可能性を調べた。北海道経済産業局の啓発資料⁵⁾に掲載された事例を参考に、継続的に平均湧出・揚湯量が100L/分を超える温泉地区を選び出した。そして、それらの温泉地区について、1井あたりの50℃基準の湧出熱量と温泉排水から得られる熱量を算出し、それらの熱量を得るのに必要なA重油の量に換算した。A重油量に換算する際の熱効率については、利用する温度帯を決める用途、熱源からの移送方法および距離等によって変化するため、任意の熱効率を乗じて試算することができるよう、熱効率100%の場合の結果を算出した。

温泉排水から得られる熱量の試算には、熱回収前の温度と熱回収後の温度を設定する必要がある。熱回収前の温度は35℃と設定した。この温度は、静岡県よりも平均気温が低い北海道内向けに作成された北海道経済産業局の啓発資料⁵⁾中のモデルプランを参考にしたため、年間を通じて熱量を過剰に見積もることはないと考えられる。熱回収後の温度は30℃と設定した。この温度は、2000~2009年度版の「静岡県公共用水域及び地下水の水質測定結果」から、当該期間中の伊豆水域の河川水の最高温度である30.5℃(2000年8月1日14:40青野川加畑橋にて測定)を参考にしたため、真夏であっても無理のない熱回収となると考えられる。(これら2種類の温度設定から算出される熱量は、過大評価になり難いと考えられる。)

3) 資源量の安定性の検討

4) 1)または2)で検討した温泉地区のうち、自然湧出・掘削自噴泉を有する温泉地区の資源量の安定性を検討した。

温泉資源が安定的に供給されるためには、温泉泉質に悪影響を与えない程度の適度な自然界からの水の供給や地熱源の能力が低下しないこと、生成能力以上に採取しないことなどが必要と考えられる。地質構造や温泉の泉質、地下水位など、考察すべき項目は他に多数あるが、統計資料として入手できる温泉の湧出・揚湯量から温泉資源採取状況を推測した報告の一つに、細谷⁶⁾が2つの温泉地域について集中管理前後の湧出・揚湯量の回復状況を検討するとともに、環境省が公表している「温泉利

用状況」総括表のデータを用いて都道府県毎に分類検討した例がある。コンサルタントとしての経験の中で着想を得たものであって地球物理学その他の裏づけは無いとのことだが、この方法では、環境省の都道府県別温泉利用状況（平成元年～15年）の表から1源泉当たりの平均湧出量の経年変化を調べ、①「非過剰採取型」、②「非過剰採取もどき型」、③「過剰採取ぎみ型」および④「過剰採取型」に分類している。そして、この条件下では、静岡県は④「過剰採取型」に分類された。しかし、温泉地区単位で見ると、対象地域内に自然湧出泉や掘削自噴泉が少なく湧出・揚湯量が機械揚湯量の変動に大きく影響されている場合は、需要の変動やデータ回収率の変動の影響を受けて平均湧出・揚湯量の値が変動する可能性がある。

一方、地熱資源に関する調査研究実績のある地方独立行政法人北海道立総合研究機構地質研究所（以下、地質研究所）で得た情報によれば、①源泉数、②総湧出・揚湯量および③平均湧出・揚湯量のそれぞれについて、自噴の場合と機械揚湯の場合に区分して経年変化をグラフ化し、増減の傾向を調べることができる。この方法で1980～2005年頃の静岡県全体のデータを処理すると、全体的に安定したグラフとなる。

後者の方法を伊豆地区の温泉地区単位で利用しようとする、自然湧出・掘削自噴／機械揚湯の別の欠測井数が公表されていないため、自然湧出・掘削自噴泉と機械揚湯泉とを分けた平均湧出・揚湯量を正確に算出することができない。しかし、伊豆地区では対島温泉地区を除き源泉数の変動が比較的小さい。そこで、自噴湧出量や機械揚湯量の変動と源泉数の変動を対比しながら検討した。

結果と考察

1 規制状況調査

地熱資源の多くが自然公園法に基づく国立、国定公園内等に存在し、工作物の設置や土石の採取等の開発行為が規制される。こうした規制は開発を進めるにあたっての大きな制約となっている。本研究で調査を行った法規制および伊豆地区内の指定状況について表1にまとめ、図1～2にその一部を示した。

温泉法に関しては、第3条に基づく温泉の掘削の許可や同法第11条に基づく温泉の湧出路の増掘又は温泉の湧出量を増加させる目的での動力の装置に対する許可について、同法第4条で許可の基準が定められている。静岡県では、より具体的な「温泉法による許可の基準に関する規則」¹⁶⁾を定め、その第3条で、「温泉法第4条第1項第1号（「当該申請にかかる掘削が温泉のゆう出量、温

表1 開発行為の規制に関する法令の一覧

法令等	状況	資料
自然公園法	半島周囲の沿岸部および内陸部の道路沿い等が指定されており、特別保護地域が天城山周辺及び八丁池周辺に広がっている（図1）。	7-8)
自然環境保全法	函南原生林（102ha）が指定されている。	9)
鳥獣保護及び狩猟の適正化に関する法律	天城地域等が保護区に指定されているが、野生動物の生息に支障をきたす恐れのある行為が規制される特別保護区は存在しない。	10-11)
森林法	天城地域に国有林の保安林が指定されている他、民有林の保安林が点在している（図2）。	12-13)
文化財保護法	伊豆西南海岸が国指定の名勝となっている他、植物・地質鉱物等の天然記念物が点在している。	14)
土砂災害防止法	狩野川の支流を中心に、多くの川沿いが砂防指定地となっている。	15)
地すべり等防止法	伊豆地区内には地すべり防止区域が10か所程度存在する。	15)
急傾斜地の崩壊による災害の防止に関する法律	伊豆地区内には急傾斜地崩壊危険区域が点在している。	15)

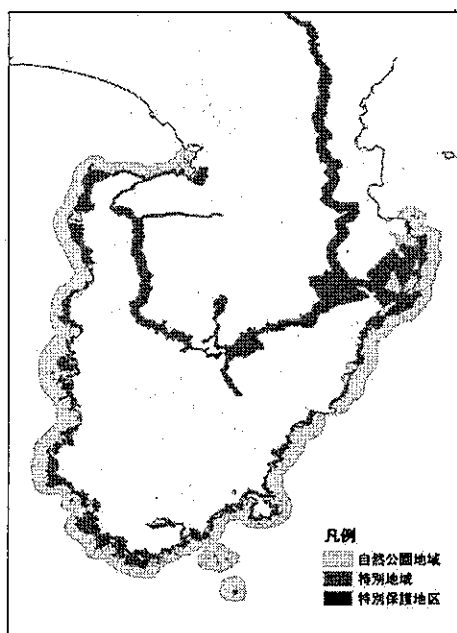


図1 自然公園法による規制区域⁷⁻⁸⁾

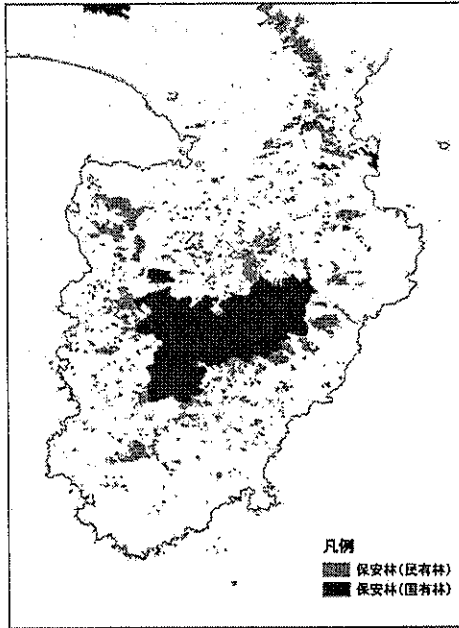


図2 森林法による規制区域¹²⁻¹³⁾

度又は成分に影響を及ぼすと認めるとき)または第3号(「前2号に掲げるもののほか、当該申請に係る掘削が公益を害するおそれがあると認められるとき)に該当する蓋然性が高い地点が地域的であるときは、その地域を温泉保護地域とする」と定めている。同規則第3条に基づき温泉保護地域は、熱海温泉保護地域をはじめとして、指定されている13地域のいずれもが伊豆地区内にある。また、当該規則に関して定められた静岡県温泉保護対策要綱¹⁷⁾では、温泉保護地域に準じた温泉保護を行う必要があると認められる地域として、伊豆地区のうち温泉保護地域を除く全域が温泉準保護地域に指定されている。

温泉保護地域内では、実質的に新規の掘削は認められておらず、温泉準保護地域内においても、「掘さくは、既設泉から水平距離で200メートル以上でなければならない。また、横掘および傾斜掘は認めない」と制限されている。

2 地熱資源調査

1) 既存資料調査

本地域ではこれまで国による「地熱開発促進調査」は実施されていない。地熱発電開発を目的とした調査としては地質調査所(現独立行政法人産業技術総合研究所地質調査総合センター)により、1973年の「全国地熱基礎調査No.4 伊豆南部」¹⁸⁾、1974年の「全国地熱基礎調査No.16 伊豆北部」¹⁹⁾において、地熱変質帯の分布や構造の調査、温泉水の成分と試料採取地点のデータの収集・整理、重力探査による重力異常の分布の調査により断層、破砕または構造線の存在など地下構造の推定を行って

る。

一方、静岡県では静岡大学に依頼して1968年に「伊豆半島の地熱開発に関する基礎調査報告書」²⁰⁾を作成しており、伊豆半島の地熱地帯の概況をまとめている他、熱川、稲取、河津、下賀茂等の現地調査も実施している。この報告書の中で、熱海、熱川、下賀茂の地熱地帯としての能力が大きく、地熱発電の可能性は十分であるとされている。また、1981年には静岡県他が「静岡県地域エネルギー開発利用調査報告書」²¹⁾を作成し、その中で伊豆地域の地熱エネルギー賦存量から発電出力を42万kwと算定している。また、発電以外にも温泉熱の有効利用を想定したエネルギー賦存量として 9.8×10^{11} kcal/年と推定している。1982年には南伊豆地区、天城湯ヶ島地区で、1986年に河津町で地域エネルギー開発利用事業化可能性調査の報告²²⁻²⁴⁾があるが、いずれも温泉熱の多目的利用に言及しており、種々の制約がある地熱発電に関する事業化可能性調査は行われていない。

2) 温泉熱資源調査

既存の温泉利用施設との両立を考えると、高温で湧出した温泉水の使用時との温度差によって、未利用となっている熱エネルギーや、環境との温度差による熱の利用が有望と考えられる。

静岡県の温泉実態調査報告書⁴⁾から、2009年2月現在の静岡県内の形態別源泉数を表2に引用した。県内の源泉の約90%が伊豆地区に存在することが分かる。

また、平均温度(0℃の水との温度差に相当)に総湧出・揚湯量を乗じて得た湧出熱量の高い温泉地区(温泉地区の区分は温泉実態調査報告書⁴⁾による82地区である)を表3にまとめた。これらは大部分伊豆半島の東側に位置している。表3に示した温泉地区のうち、熱川・北川温泉は欠測井の割合が15%、下賀茂・加納・湊・手石・青市温泉は欠測井の割合が26%を占め、相応のマイナスの

表2 静岡県の形態別源泉数(2009年2月現在)⁴⁾

形態(計算方法)	源泉数(井)	
	県全体	伊豆地区
自然湧出利用(①)	27	8
掘削自噴利用(②)	81	63
機械揚湯利用(③)	1,090	1,007
利用源泉計(④=①+②+③)	1,198	1,078
自然湧出・掘削自噴不利用(⑤)	54	36
湧出・揚湯源泉数計(⑥=④+⑤)	1,252	1,114
機械揚湯不利用・枯湯・埋没(⑦)	1,241	1,210
総源泉数(⑧=⑥+⑦)	2,493	2,324

表3 湧出熱量が高い温泉地区(2009年2月現在)

温泉地区(市町)	湧出熱量(kcal/分)
熱海 (熱海市)	634,000
熱川・北川 (東伊豆町)	624,000
岡 (伊東市)	619,000
下賀茂・加納・湊・手石・青市 (南伊豆町)	411,000
河内・蓮台寺・大沢・立野 (下田市)	302,000
対島 (伊東市)	279,000
片瀬 (東伊豆町)	240,000

誤差を含んでいると考えられ、実際の熱資源量は表3に示した以上であると推測できる。

3 地熱利用最新動向調査

1) 温泉熱を利用したバイナリー発電の動向

カーナサイクルによるバイナリー発電は、発電タービンを駆動する媒体として沸点の低いアンモニア水を用い、従来の地熱発電に比べ低い温度の熱源を利用できる。この方式では、供給される熱量の値の5%程度に相当する電力量が得られるとされている。熱をそのまま利用する場合に比べ送電線によって他の場所へ送ることができ、規模は実用上制限されるが蓄電池を使えば貯蔵もできる。また、タービン駆動後の媒体から熱を奪って液体に戻す必要があるが、需要があればその熱を他の用途に利用できる可能性もある²⁵⁾。平成23年2月の原子力安全・保安院電力安全課による資料「バイナリー発電設備に係る電気事業法関係規制の見直しについて」²⁶⁾で示されたように規制緩和の検討はされているが、電気事業法をはじめとした各種法令に基づき、電気主任技術者の選任義務等各種の規制がある。

従来の地熱発電設備は、熱源として熱水蒸気を用いる少なくとも数MW級のものであったが、地熱資源の専門機関である産総研で得た情報によれば、カーナサイクルを用いた方式では、120℃以下の熱水を利用することができ、施設規模500kW級のものが実用化されている。また、50kW程度の小規模な発電施設の実証試験が実施されている。その仕様では、供給する温泉水の温度98℃、熱を利用した後の温泉水の温度50℃、1kWあたりに必要な湯量を0.32t/時と想定している。正確には供給温度によって効率が異なるとされているが²⁷⁾、これらの設定値から計算すると、供給温度98℃、発電能力50kWの施設で必要な熱量は約900kJ/s、500kWでは約9,000kJ/sとなる。

2) 温泉排水からのヒートポンプによる熱回収の事例

北海道洞爺湖町の洞爺湖温泉利用共同組合では、温泉源の集中管理を行っており、現在では温泉排水から熱交換器およびヒートポンプで熱を回収して55℃の熱媒体(温水)を60℃まで加熱し、12井の源泉から混合して得た40℃の温泉水を熱交換器で加温して貯湯し、48~50℃に維持して関連施設に供給している²⁸⁾。昭和35年に発足した洞爺湖温泉利用協同組合による源泉の管理と温泉供給で蓄積したデータに基づき利用施設全体のエネルギー需要からシステムを計画し、施設規模の最適化、職員の中からメンテナンス技術者を育成し、汎用機器を採用して維持管理コストを低減するなど、効率の良い利用方法を継続的に検討し改良に努めている。

4 利用可能性の検討

1) 湧出熱量から見たバイナリー発電の可能性

1992~2009年の静岡県内温泉地概況調¹⁾で継続的に平均温度が70℃以上の6つの温泉地区について、期間中の平均温度および発電に利用できる可能性のある50℃基準の湧出熱量の変動範囲について表4にまとめ、2009年の温泉地区ごとの平均温度の状況を図3に示した。

検討の結果、基準温度50℃の平均熱量では実証試験中の小規模のバイナリー発電に必要な900kJ/s・井を超える温泉地が無かった。温泉地区あたりでは、検討した6地区とも900kJ/sを超えていた。これらの地区内に湧出熱量が突出した源泉があるか、あるいは、3~10井の源泉を集中管理することができれば、浴用の温泉として給湯する際に余剰となる50℃基準の湧出熱量を利用して、実証試験規模の50kW級のバイナリー発電に利用可能と考えられる(ただし、統計資料中地区あたりの欠測井の割合は最大で約30%である。)

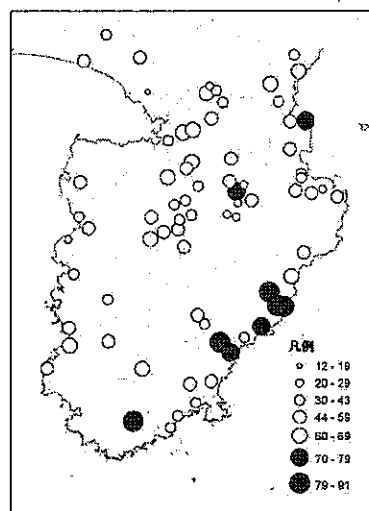


図3 温泉地区ごとの平均温度(℃)
(2009年2月現在)¹⁾

表4 平均温度が継続的に70℃以上で湧出熱量(50℃基準)が900kJ/s以上の温泉地区の湧出・揚湯源泉数, 平均温度及び湧出熱量等の1992~2009年(各年2月1日現在, 2002年を除く)の変動範囲

No.	温泉地区(市町)	湧出・揚湯源泉数	計測源泉数	平均温度(℃)	湧出熱量(50℃基準)		発電可能量計算値(※1)	
					地区あたり(kJ/s)	1井あたり(kJ/s・井)	地区あたり(kW)	1井あたり(kW/井)
1	熱川・北川(東伊豆町)	53~54	41~54	88~92	17,000~22,000	390~460	960~1,300	22 ~ 26
2	片瀬(東伊豆町)	23~25	19~25	84~92	6,000~8,700	270~360	340~490	15 ~ 20
3	白田(東伊豆町)	23~27	13~23	80~89	4,100~6,700	190~360	230~370	10 ~ 20
4	峰・田中・沢田・逆川(河津町)	15~17	11~16	83~90	3,500~5,900	220~390	200~330	12 ~ 22
5	下賀茂・加納・湊・手石・青市(南伊豆町)	66~68	45~62	75~86	8,600~15,000	170~260	480~830	10 ~ 14
6	網代(熱海市)(※2)	6~8	6~7	78~82	2,300~3,500	330~500	130~200	18 ~ 28

(※1) : カーリナサイクルを用いた実証試験発電設備の設定値(供給温度98℃, 排出温度50℃, 1kWあたり必要な温泉水量0.32t/時)及び実証試験の設備規模50kW(おおむね一般家庭20軒分の電力)から類推して発電可能量を算出した。ただし, 地区あたりの発電可能量については, ①地区内のすべての源泉を一元管理することができるとは限らないこと, ②欠測井による誤差, ③季節変動及び④実際の熱効率を考慮せずに算出しているため, 相応の誤差を含んでいる。

(※2) : 網代温泉地区は, 1992~1999年は他の温泉地区と併せて集計されているため(集計後の平均温度70℃未満), ここでは2000~2009年(2002年を除く)9年間の値のみを利用した。

2) ヒートポンプによる熱回収の可能性について

ヒートポンプによる熱回収では, 発電と異なり, 熱源となる温泉水以外に電力を外部から投入する必要があり, そこで電気の基本料金など使用量に関係なく費用が発生するが, 温泉排水などあまり高温でない熱媒体からも熱を奪い別の媒体に移動させることができる。汎用のヒートポンプでは, 使用した電力の持つエネルギーの約3倍の熱量を熱媒体間で移動できるとされている。熱媒体の移送や貯蔵の際に熱の放散や吸収が生じるため, 電力ほど遠隔地に送ったり保存したりすることができないが, 熱を熱として使用すべき需要が近隣にある場合には(上がり湯用水道水の加温や循環ろ過分の温泉水の再加熱, 施設の暖房といった施設内の用途から, 地域内の温室や養殖への利用など), 発電よりも効率よく熱資源を利用できると考えられる。

伊豆地区で平均湧出・揚湯量が継続的に100L/分・井以上である温泉地区の湧出熱量等を表5にまとめ, 2009年の温泉地区ごとの平均湧出・揚湯量の状況を図4に示した。1992~2009年(データが未掲載の2002年を除く)までで平均湧出・揚湯量100L/分・井以上の温泉地区は, 58地区中20地区であった。

50℃基準の湧出熱量と温泉排水から得られる熱量の両方を用いる場合には2系統以上のヒートポンプが必要となるが, 熱回収時や熱媒体移送時の損失を考慮せず, 効率100%とした場合A重油換算で29~690kL/年・井相当の

50℃基準の湧出熱量または温泉排水から回収可能な熱量があるという結果になった。

3) 資源量の安定性の検討

温泉熱利用施設については, 稼動中の期間にわたって得られる有形無形の便益が人件費や事故防止対策費用などを含めた総費用を上回るものと十分に推測される状況でなければ, 当該エネルギー利用施設は容易には普及しえないと考えられる。しかし, ある程度技術が普及し技術者が育てば, 相乗的に総費用が低減され, 利用範囲が広

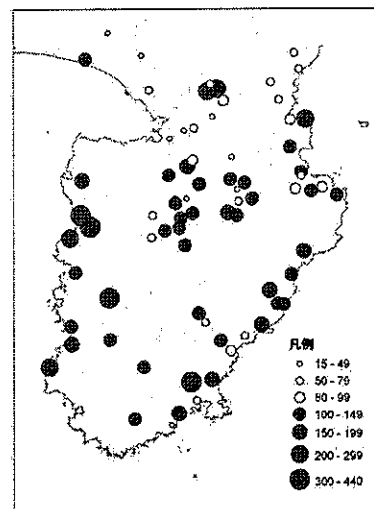


図4 温泉地区ごとの平均湧出・揚湯量(L/分・井) (2009年2月現在)¹⁾

表5 1992～2009年(2002年除く)に継続的に平均湧出・揚湯量100L/分以上の温泉地区の湧出熱量等

No.	温泉地区(市町)	平均湧出・揚湯量(L/分・井)	温度差に対応する熱量(kJ/s・井)		左記の熱量のA重油量換算値(kL/年・井, 熱効率100%の場合)	
			平均温度→50℃	35℃→30℃	平均温度→50℃	35℃→30℃
1	熱川・北川(東伊豆町)	140～160	390～460	48～57	310～370	39～46
2	稲取(東伊豆町)	150～170	160～320	53～61	130～260	43～49
3	梨本(河津町)	120～150	(平均温度<50℃)	40～53	(平均温度<50℃)	33～43
4	河内・蓮台寺・大沢・立野(下田市)	350～630	(平均温度<50℃)	120～220	(平均温度<50℃)	98～180
5	吉佐美(下田市)	100～200	(平均温度<50℃)	37～71	(平均温度<50℃)	29～57
6	雲見・石部・岩地(松崎町)	260～350	5～59	89～120	4～48	72～99
7	松崎(松崎町)	170～450	110～690	59～160	90～560	48～130
8	仁科・堂ヶ島(西伊豆町)	120～350	(平均温度<50℃)	43～120	(平均温度<50℃)	35～99
9	大沢里・田子(西伊豆町)	410～950	(平均温度<50℃)	140～330	(平均温度<50℃)	110～270
10	宇久須(西伊豆町)	140～480	(平均温度<50℃)	49～170	(平均温度<50℃)	39～140
11	宇佐美(伊東市)	120～130	43～98	41～47	35～79	33～38
12	小室(伊東市)	100～130	(平均温度<50℃)	36～44	(平均温度<50℃)	29～36
13	対島(伊東市)	150～170	(平均温度<50℃)	52～60	(平均温度<50℃)	42～48
14	大仁・熊坂(伊豆の国市・伊豆市)	120～180	(平均温度<50℃)	42～64	(平均温度<50℃)	34～51
15	土肥(伊豆市)	410～470	190～300	140～160	150～240	110～130
16	八木沢(伊豆市)	170～260	(平均温度<50℃)	60～91	(平均温度<50℃)	49～73
17	小土肥(伊豆市)	310～480	(平均温度<50℃)	110～170	(平均温度<50℃)	87～140
18	月ヶ瀬(伊豆市)	130～150	(平均温度<50℃)	44～51	(平均温度<50℃)	35～41
19	冷川(伊豆市)	110～180	44～320	37～64	35～260	30～52
20	戸田(沼津市)	170～250	12～43	59～87	10～30	47～70

注) A重油量換算値については、①欠測井による誤差、②季節変動による誤差及び③実際の熱効率を考慮せずに算出しているため、相応の誤差を含んだ値である。換算係数はA重油1Lあたり39.1MJとした。

がる可能性がある。初期の設置費用および維持管理費に見合うだけの便益を得るためには、熱利用施設の効率を左右する湯温の高さ、熱量や立地条件だけでなく、減価償却等に必要期間にわたって安定して熱資源が供給されることが必要である。

そこで、統計センターしずおかで公表されている1992～2009年の静岡県内温泉地概況調のデータ¹⁾(自然湧出・掘削自噴泉と機械揚湯利用泉との別で湧出・揚湯量が示されたデータは2000～2009年、2002年を除く)を用いて、4)1)及び2)で検討した温泉地区のうち、自然湧出・掘削自噴泉の湧出量データが継続的に公表され欠測井の割合が50%未満である11の温泉地区について、資源量の安定性について検討した。

自噴湧出量と機械揚湯量に分けられたデータが統計センターしずおかで公表されているのは、2000～2009年(2002年のデータを除く)の9年分である。1992～2009

年まで比較できるようにまとめた58の温泉地区のうち18地区で継続的に自噴湧出量データが得られており、その中には4)1)で検討した温泉地区のうち5地区、4)2)で検討した温泉地区のうち9地区、1地区が両方に該当するので全部で13地区が含まれている。そのうち欠測井の割合が50%未満の11地区について湧出・揚湯量の傾向を検討した。

図5に、代表として3つの温泉地区のグラフを示す。増減の傾向を知るため近似直線を表示したが、複数の源泉の集計結果であり、年によって欠測井の割合が異なるなどにより、相関性の指標である決定係数が1からかけ離れているものが多いため、グラフ全体を見て考察した。また、温泉地区単位の統計資料を用いているため、個々の源泉の泉質等のデータが不明で地質学的な検討を加えていないため、同じ温泉地区内だから機械揚湯量と自噴湧出量が相互作用していると断定はできない。

図5aに例1として示した熱川・北川温泉地区(表4のNo.1および表5のNo.1)では、機械揚湯量および平均湧出・揚湯量がやや増加傾向にあるものの、自噴湧出量が減少傾向にあり、今後の傾向に注意が必要であると考えられる。ただし、図示した期間中の欠測井の割合は、地区内の湧出・機械揚湯利用源泉数の11~24%まで変動があったので相応の変動および誤差が生じていると考えられる。欠測井の割合を別として、例1の傾向に類似している温泉地区は、片瀬温泉地区(表4のNo.2)、白田温泉地区(表4のNo.3)、仁科・堂ヶ島温泉地区(表5のNo.8)であった。また、対島温泉地区(表5のNo.13)も機械揚湯量が1992年の18井から2009年の38井に倍増し湧出・揚湯量が増加しており、自然湧出・掘削自噴泉が2~3井で比較が困難なものの、自噴湧出量がやや減少傾向にあり、例1に類似していると考えられる。

一方、図5bに例2として示した下賀茂・加納・湊・手石・青市温泉地区(表4のNo.5)では、機械揚湯量および自噴湧出量ともに減少傾向にあり、機械揚湯量は需要に左右されている可能性があるものの、例1以上に注意が必要と考えられる。ただし、図示した期間中の欠測井の割合は、地区内の湧出・揚湯源泉数の19~34%まで変動があった。欠測井の割合を別として、例2の傾向に類似している温泉地区は、松崎温泉地区(表5のNo.7)および冷川温泉地区(表5のNo.19)であった。また、機械揚湯量がない宇久須温泉地区(表5のNo.10)も自噴湧出量が減少していることから、例2に傾向が類似していると考えられる。

また、図5cに例3として示した峰・田中・沢田・逆川

温泉地区(表4のNo.4)では、機械揚湯量は減少傾向にあるが、自噴湧出量は維持または増加傾向にあり、需要が増加したときに注意が必要であるが、2009年2月現在の資源採取量であれば直ちには問題にならないと考えられる。ただし、図示した期間中の欠測井の割合は、温泉地区内の湧出・揚湯源泉数の6~35%まで変動があった。欠測井の割合を別として、例3の傾向に類似している温泉地区は、稲取温泉地区(表5のNo.2)であった。

まとめ

伊豆地区の地熱資源のうち、地域社会と共存可能な温泉熱資源の活用として、高温温泉水を浴用の温度に冷ます際に余剰となりうる熱のバイナリー発電による有効利用または前述の余剰熱および温泉排水が有する熱のヒートポンプによる有効利用の可能性を資源量およびその安定性の点から検討した。

その結果、静岡県内温泉地概況調りから得られた温泉地域ごとの平均湧出熱量(50℃基準)から考えた範囲では、伊豆地区の温泉地区中、過去9~17年間にわたり平均温度70℃以上を維持していた6地区では、3~10井程度を集中管理できれば、または熱量の突出した源泉があれば単独で、試験段階の50kW級のバイナリー発電施設に熱を供給できる可能性があると考えられた。

また、温泉排水などからのヒートポンプによる熱回収の可能性については、平均湧出・揚湯量をベースに検討したところ、50の温泉地区中20地区で有望と考えられた。

過去9~17年間にわたり平均温度70℃以上を維持して

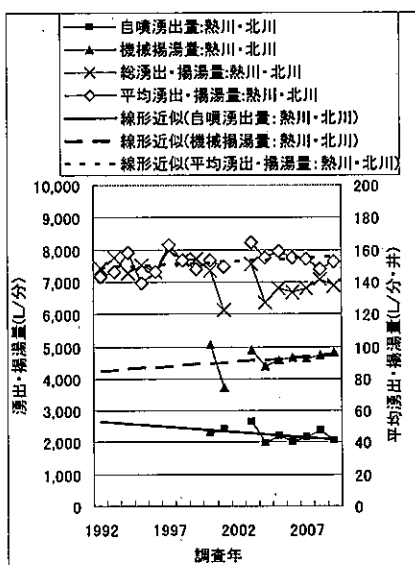


図5a 例1 熱川・北川温泉地区
(欠測井割合 11~24%)

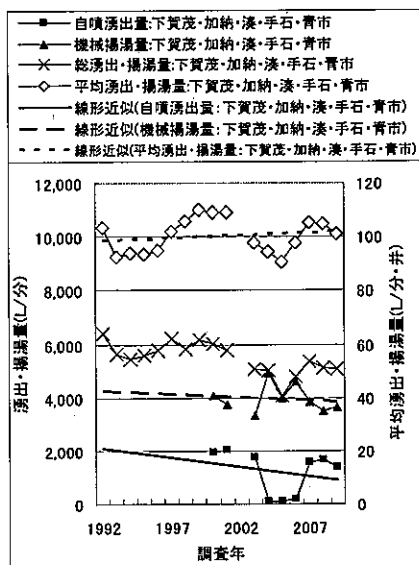


図5b 例2 下賀茂・加納・湊・手石・青市温泉地区
(欠測井割合 19~34%)

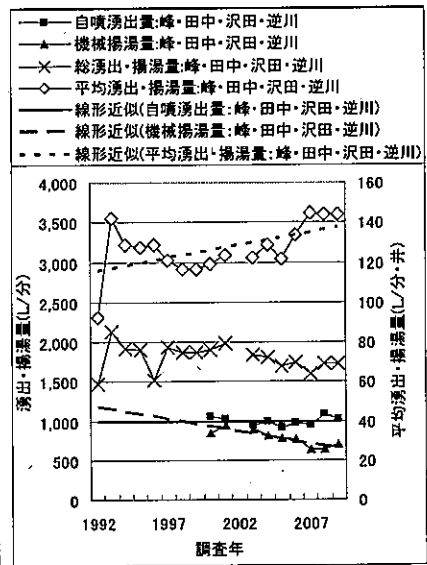


図5c 例3 峰・田中・沢田・逆川温泉地区
(欠測井割合 6~35%)

図5 自然湧出泉または掘削自噴泉を有する温泉地区の自噴・揚湯量の経年変化の例

いた6地区および温泉排水などからのヒートポンプによる熱回収が有望と考えられた20地区(1地区が両方の条件に該当するため計25地区となる)のうち、静岡県内温泉地概況調¹⁾で温泉地区単位の自然湧出・掘削自噴泉のデータが確認でき欠側井の割合が50%未満である11地区について資源量の安定性を検討したところ、稲取温泉地区及び峰・田中・沢田・逆川温泉地区では2009年2月現在の資源量を維持できる傾向が認められたが、下賀茂・加納・湊・手石・青市温泉地区、松崎温泉地区、宇久須温泉地区および冷川温泉地区では、温泉地区全体の資源量の推移に注意して利用する必要があると考えられた。

謝 辞

文末となりましたが、温泉熱利用施設の導入主体として視察を受け入れてくださった洞爺湖温泉利用協同組合の四宮博常務理事、事務局の皆様、また、温泉熱利用の現状と検討課題について御教示くださった地質研究所の秋田藤夫先生、高橋徹哉先生、地熱利用の最新動向について御教示くださった産総研の村岡洋文先生(現所属:弘前大学北日本新エネルギー研究所)、それぞれ御多忙の中の御協力・御指導について深く感謝いたします。

文 献

- 1) 静岡県:静岡県内温泉地概況調,統計センターしずおか,(1992-2001,2003-2009)
- 2) 江原幸雄:わが国の地熱エネルギー利用の現状と課題,日本地球惑星科学連合ニュースレター,5,3,6-7(2009)
- 3) 安達正敏:第2回地熱発電に関する研究会 資料3 地熱発電の経済性と開発リスク,4-7,(2009)
- 4) 静岡県ほか:温泉実態調査報告書 平成21年2月1日現在,19-26,静岡県温泉協会,静岡県(2010)
- 5) 経済産業省 北海道経済産業局資源エネルギー環境部エネルギー対策課:おんせんDEヒーボン!温泉ホテル省エネモデル集,10,経済産業省北海道経済産業局,北海道(2009)
- 6) 細谷昇:1源泉当りの平均湧出量の経年変化による温泉採取状況推測法の提案,温泉科学,55,4,195-203(2006)
- 7) 国土交通省:国土数値情報(自然公園地域データ),国土交通省,東京都(2007)
- 8) 環境省自然環境局:富士箱根伊豆国立公園(伊豆半島地域)区域及び公園計画図,環境省自然環境局,東京都(1996)
- 9) 国土交通省:国土数値情報(自然保全地域データ),国土交通省,東京都(2007)
- 10) 国土交通省:国土数値情報(鳥獣保護区データ),国土交通省,東京都(2010)
- 11) 静岡県:(平成21年度)静岡県鳥獣保護区等位置図,静岡県,静岡県(2009)
- 12) 国土交通省:国土数値情報(森林地域データ),国土交通省,東京都(2007)
- 13) 静岡県建設部森林局森林保全室(現交通基盤部森林局森林保全課):保安林ポリゴン,静岡県建設部森林局森林保全室,静岡県(2009)
- 14) 静岡県教育委員会文化課:ふるさと静岡県文化財マップ-改訂版-,静岡県文化財保全協会,静岡県(1995)
- 15) 静岡県建設部河川砂防局砂防室(現交通基盤部河川砂防局砂防課):砂防GIS砂防三法データ(砂防指定地,地すべり防止区域,急傾斜地崩壊危険区域),静岡県建設部河川砂防局砂防室,静岡県(2010)
- 16) 静岡県:温泉法による許可の基準に関する規則,静岡県,静岡県(昭和34年施行,平成20年一部改正)
- 17) 静岡県:静岡県温泉保護対策要綱,静岡県,静岡県(昭和34年施行,平成17年一部改正)
- 18) 通商産業省工業技術院地質調査所:昭和48年度全国地熱基礎調査報告書 No.4 伊豆南部,通商産業省工業技術院地質調査所,東京都(1974)
- 19) 通商産業省工業技術院地質調査所:昭和49年度全国地熱基礎調査報告書 No.16 伊豆北部,通商産業省工業技術院地質調査所,東京都(1975)
- 20) 静岡県:伊豆半島の地熱開発に関する基礎調査報告書,静岡県,静岡県(1968)
- 21) 静岡県他:静岡県地域エネルギー開発利用調査報告書,静岡県,静岡県(1981)
- 22) 静岡県他:南伊豆地区地域エネルギー開発利用事業化可能性調査報告書,静岡県,静岡県(1982)
- 23) 静岡県他:天城湯ヶ島地区地域エネルギー開発利用事業化可能性調査報告書,静岡県,静岡県(1982)
- 24) 静岡県河津町:河津町地域エネルギー開発利用事業化可能性調査報告書,静岡県,静岡県(1986)
- 25) 独立行政法人産業技術総合研究所ほか:第3回地熱発電に関する研究会 新技術の活用等によって増加可能な発電量の試算,12,経済産業省,東京都(2009)
- 26) 経済産業省原子力安全・保安院電力安全課:「バイナリー発電設備に係る電気事業法関係規制の見直しについて」,経済産業省,東京都(2011)
- 27) 独立行政法人産業技術総合研究所ほか:温泉発電を利用した発電技術,日本地熱学会,(2009)
- 28) 洞爺湖温泉利用協同組合:地球に優しい温泉街をめざして 洞爺湖温泉供給事業システム概要,3-5,洞爺湖温泉利用協同組合,北海道(2008)

室内におけるVOCs汚染源の オンサイトスクリーニング手法に関する研究

環境科学部 環境科学班 山下晶平, 久米一成

Study of On-site Screening Method for Emission Sources of VOCs in Indoor Environment

Shohei YAMASHITA and Kazunari KUME

近年、化学物質過敏症やシックハウス症候群が社会問題化し、揮発性有機化合物 (VOCs) との因果関係についても議論されている。本研究では、VOCs による室内空気汚染実態を明確にすることで居住環境中の VOCs 低減化対策の実施を推進するために、室内を構成する建材や家具等から放散する VOCs の主要汚染源をその場 (オンサイト) で簡易的かつ迅速に検索 (スクリーニング) する手法を開発し、学校施設内の一般教室において VOCs 汚染源を実際に検索した。

Key words: 揮発性有機化合物, 室内空気汚染, 汚染源, オンサイト測定
volatile organic compounds, indoor air pollution, pollutant source,
on-site measurement

はじめに

近年、化学物質過敏症やシックハウス症候群が社会問題化し、それらを引き起こす疑いのある物質のひとつとして、揮発性有機化合物 (VOCs) が指摘されている。また室内における VOCs の検出事例も多く報告されている^{1, 2)}。その汚染実態に関して研究が進められる一方で、実際には汚染源の特定が困難なことから VOCs の低減化についての対策が実施されるケースが非常に少ないことが、室内空気環境の改善が進展しない理由のひとつであると考えられている。従来の室内空気汚染調査方法としては、主に VOCs 捕集用サンプラーを用いて室内の VOCs 濃度測定を行う手法が主流であり、汚染源の特定に関しては、このようなサンプリングによる VOCs の分析結果と居住者に対する聞き取り調査とを併せて推定するパターンが圧倒的に多い。しかしながら、室内空気汚染源を直接的に特定するための手法はこれまでのところ確立されていない。

一方、当研究所ではこれまでに、VOCs の室内汚染源の検索 (スクリーニング) のために、化学物質の拡散原理を利用して捕集するパッシブサンプラーを利用した装置 (Emission cell for simultaneous multisampling, ECSMS) を開発し、その有効性を確認した³⁾。しかしながら、ECSMS を室内の様々な部位に設置することで VOCs 汚染源のスクリーニングは可能であるものの、この方法で捕集した試料は分析装置のある施設に持ち帰って分析する必要があり、作業量・作業時間等、効率面において課題が残されていた。

そこで本研究では、室内を構成する建材・家具等から放散する VOCs の主要汚染源を、その場で簡易的かつ迅速にスクリーニングする手法を開発し、室内空気汚染実態をより明確にすることで、室内の VOCs 低減化対策の実施を推進することを目的とした。そのために、既存のトータル VOC (TVOC) 計を用い、TVOC 測定値を指標とするスクリーニング手法を検討した。また開発した手法による実環境測定への適用性を検討するために、学校施設内の一般教室において実際に VOCs の汚染源調査を実施し、ECSMS による結果と比較することで評価した。

方法

1 VOCs 汚染源検索システム

図1にシステムの概要を示す。本システムは汚染源となる発生部位から放散するVOCsのみを捕集するために、ガスバッグ (Flek-sampler, 近江オドエアサービス(株)製) とポリプロピレン樹脂製容器 (容積 5.3L, 市販品) の二重構造を有する採取部を設け、ガスバッグ内にストックされたVOCsをTVOC計に導入することで、TVOC測定値から汚染源ごとのTVOC放散能の高さを判定する。TVOCの検出にはTVOC SENSOR (試作機) を用いた。これは従来から可燃性ガスの検出に広く用いられている接触燃焼式センサにガス濃縮機能を付与した吸着燃焼式センサを内蔵している。なお、これまでに同装置は室内空気中のTVOC測定用として、ppbレベルのTVOC測定への適用性について報告されている^{4,5)}。TVOC計の動作としては、電源を入れることにより、始めに装置内のガス流路のパーズが行われる。このとき装置に取り付けた活性炭フィルタにより清浄化された空気を用いて4分間パーズする。続いてTVOCsの測定が開始され、2秒ごとに検出を行い、約2.5分間における検出値の積算値を測定値として表示する。

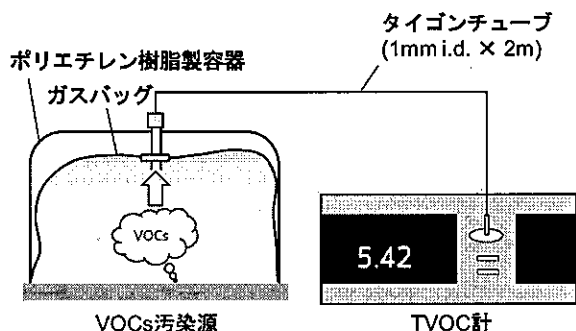


図1 VOCs 汚染源検索システム概要図

2 対象物質

基本的にはTVOC計により検出し得るVOCsが対象であるが、今回比較としてフラックスサンプラー (ECSMS) でVOCsを併行して捕集し、これをガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) により定量したため、このときに対象とした物質を以下に示す。

2-Butanone, Hexane, 1,2-Dichloroethane, 2,4-Dimethylpentane, 1,1,1-Trichloroethane, *n*-Butanol, Benzene, Tetrachloroethane, 1,2-Dichloropropane, Isooctane, Heptane, 4-Methyl-2-pentanone, Toluene, Chlorodibromomethane, *n*-Butylacetate,

Octane, Tetrachloroethylene, Ethylbenzene, *m*-および *p*-Xylene (合算値として定量), Styrene, *o*-Xylene, Nonane, α -Pinene, 1,3,5-Trimethylbenzene, 1,2,4-Trimethylbenzene, Decane, 1,4-Dichlorobenzene, 1,2,3-Trimethylbenzene, Limonene, Nonanal, Undecane, 1,2,4,5-Tetramethylbenzene, Decanal, Dodecane, Tridecane, Tetradecane, Pentadecane, Hexadecane.

世界保健機関 (World Health Organization, WHO) の定義によると、VOCsとは沸点が50℃~100℃から240℃~260℃の有機化合物をさし、実際の居住環境においてTVOC計で測定し得るVOCsは、この定義に該当するVOCsに概ね合致する。しかしながら、Formaldehyde等、より沸点が低いVOC (Very Volatile organic compounds) に対して、このTVOC計では感度が低く検出が難しいため、これらは今回対象外とし、VOCsと区別するためカルボニル化合物と表記した。ただし、これらの中でも特にFormaldehydeによる室内空気汚染が顕著であるケースが多く見られるため、特に以下の化合物については、室内汚染濃度調査に限り対象とした。

Formaldehyde, Acetaldehyde, Acetone, Acrolein, Propionaldehyde, Crotonaldehyde, *n*-および *i*-Butyraldehyde (合算値として定量), Benzaldehyde, *i*-Valeraldehyde, *n*-Valeraldehyde, *n*-Hexanal, 2,5-Dimethylbenzaldehyde

今回、VOCs汚染源検索システムを評価するために比較として、ECSMSを用いてVOCsを捕集し、GC/MSおよびHPLCで分析することとしたため、以下にECSMSによる調査に要した試薬、分析前処理方法、分析条件 (3~5) を示す。

3 試薬

VOCs混合標準液: 室内環境測定用 (関東化学(株)製), Toluene- d_8 : 標準原液: 室内環境測定用 (関東化学(株)製), 二硫化炭素: 作業環境測定用 (和光純薬工業(株)製), アセトニトリル: 高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業(株)製), 16種アルデヒド-DNPH混合標準液 (和光純薬工業(株)製) を用いた。

4 分析前処理

1) VOCs

アクティブサンプラー-Charcoal Tubes (JUMBO) お

よびパッシブサンプラー-PASSIVE GAS TUBES (有機溶剤用) (いずれも柴田科学 (株) 製) に充填された吸着剤を用いて吸着捕集した。捕集した VOCs はサンプラーカートリッジから取り出して、10 mL ねじ口試験管に移した。次に二硫化炭素 2 mL を加えて、2 時間振とう抽出したものを GC/MS 分析試料とした。

2) カルボニル化合物

アクティブサンプラー-Precep-C DNPH (Short) (和光純薬工業 (株) 製) およびパッシブサンプラー-DNPH PASSIVE GAS TUBES (アルデヒド・ケトン類用) (柴田科学 (株) 製) に充填された吸着剤を用いて吸着捕集した。捕集したカルボニル化合物は、サンプラーカートリッジから取り出して、10 mL 試験管に移した。次にアセトニトリル水溶液 2 mL を加えて 1 分間攪拌抽出した。抽出溶液をメンブレンフィルター DISMIC-13HP (孔径 0.20 μm, 東洋濾紙 (株) 製) で濾過したものを HPLC 分析試料とした。

5 装置および測定条件

1) GC/MS

VOCs の分析には JMS-Q1000GC/K9 (日本電子 (株) 製) を用いた。分析条件を表 1 に示す。

表 1 GC/MS 分析条件

Column	EQUITY-1 (Sigma-Aldrich Co.), 0.25 mm i. d. × 60 m, df:1.00 μm
Oven	35 °C, (5 min) to 100 °C at 3 °C/min to 250 °C at 8 °C/min (5 min)
Inj. Temp.	250 °C
Det. Temp.	MSD, scan range 35-350 amu, transfer line 250 °C
Flow	He, 1.0 mL/min, constant, set at 35 °C
Injection	1.0 μL, split 10:1
Liner	Single tapered
Source Temp.	220 °C

2) 高性能液体クロマトグラフィー (HPLC)

カルボニル化合物の分析には ACQUITY-Ultra Performance LC システム (Waters Co. 製) を用いた。分析条件を表 2 に示す。なお、分析に用いた水は、蒸留水を Milli-Q Gradient A10 (Millipore Co. 製) で精製したものを使用した。

3) 分析機器における定量下限値

表 3 に VOCs, 表 4 にカルボニル化合物の定量下限値および相対標準偏差を示す。なお定量下限値は標準偏差の 10 倍の値とした。

表 2 HPLC 分析条件

Column	ACQUITY UPLC BEH Phenyl, (2.1 mm i. d. × 100 mm, 1.7 μm; Waters Co.)
Wave length	360 nm
Oven Temp	35 °C
Flow	0.5 mL/min
Injection	2 μL
Eluent	A:Water B:10%Tetrahydrofuran/90%Acetonitrile(v/v)
Elution condition (v/v)	70%A and 30% B hold from 0.00 to 4.00min, 70%A down to 65% and 30%B up to 35% over 4.00 min to 5.00 min, 65%A down to 50% and 35%B up to 50% over 5.00 min to 10.00 min 50%A down to 40% and 50%B up to 60% over 10.00 min to 12.00 min, 70%A and 30%B hold from 12.01 min to 13.00 min

表 3 VOCs の定量下限値と相対標準偏差

VOCs ¹⁾	DL ²⁾ (ng)	RSD ³⁾ (%) (n=7)
2-Butanone	0.40	9.0
Hexane	0.30	7.3
1,2-Dichloroethane	0.48	7.9
2,4-Dimethylpentane	0.25	4.4
1,1,1-Trichloroethane	0.22	5.0
n-Butanol	0.05	2.7
Benzene	0.32	7.6
Tetrachloromethane	0.22	4.4
1,2-Dichloropropane	0.15	2.4
Isooctane	0.33	6.6
Heptane	0.25	5.0
4-Methyl-2-pentanone	0.17	3.8
Toluene	0.14	3.3
Chlorodibromomethane	0.08	2.0
n-Butylacetate	0.14	2.7
Octane	0.14	6.6
Tetrachloroethylene	0.17	3.9
Ethylbenzene	0.11	2.7
m-, p-Xylene	0.21	4.0
Styrene	0.01	2.0
o-Xylene	0.02	2.7
Nonane	0.06	1.4
α-Pinene	0.14	2.9
1,3,5-trimethylbenzene	0.09	2.4
1,2,4-trimethylbenzene	0.12	2.3
Decane	0.19	3.9
1,4-Dichlorobenzene	0.22	4.8

1, 2, 3-trimethylbenzene	0.17	4.5
Limonene	0.30	6.6
Nonanal	0.24	5.1
Undecane	0.14	3.4
1, 2, 4, 5-Tetremethylbenzene	0.51	11.7
Decanal	0.25	6.0
Dodecane	0.28	6.1
Tridecane	0.45	17.7
Tetradecane	0.24	6.5
Pentadecane	1.60	9.5
Hexadecane	0.43	9.9

- 1) 試料注入量: 0.5 ng/μl
- 2) 定量下限値
- 3) 相対標準偏差

表4 カルボニル化合物の定量下限値と相対標準偏差
(n=10)

Carbonyls ¹⁾	DL ²⁾ (ng)	RSD ³⁾ (%)
Formaldehyde	0.013	1.2
Acetaldehyde	0.029	3.0
Acetone	0.034	3.7
Acrolein	0.037	4.0
Propionaldehyde	0.063	6.5
Crotonaldehyde	0.038	3.7
n-, i-Butyraldehyde	0.047	2.3
Benzaldehyde	0.044	4.6
i-Valeraldehyde	0.043	4.5
n-Valeraldehyde	0.050	5.0
n-Hexanal	0.082	8.0
2, 5-Dimethylbenzaldehyde	0.077	8.7

- 1) 試料注入量: 0.2 ng/2 μL
- 2) 定量下限値
- 3) 相対標準偏差

6 汚染源検索システムによる VOCs 検出に関する検討

1) 木質材料を用いた VOCs の検出

実際の VOCs による室内空気汚染現場では、建材・家具が VOCs 汚染源となるケースが多く、さらにその大部分が木質材料を素材に用いているため、木質ボードを用いて、VOCs 汚染源検索システムによる VOCs 検出試験を行った。その際に以下の3種類の中比重繊維板を試験体として用いた。①本棚の部材 (厚さ 5 mm)、②市販の木質ボード (厚さ 9 mm)、③抽斗の部材 (厚さ 9 mm)。また、VOCs の放散がない材料としてガラス板を対照として用いた。さらにシステム採取部の開口部を開放することで、室内空気中の VOCs も測定した。

2) VOCs 採取部の設置時間の検討

VOCs 汚染源検索システムの VOCs 採取部を測定面に密着させると、測定面から放散した VOCs により採取部内部のガスバッグ内の VOCs 濃度が上昇し、最終的にこの濃度が定常状態となる。この濃度は、汚染源の VOCs 放散能に依存する。そこで、この採取部の設置時間による TVOC 計指示値の変化を調べ、検出のための濃度レベルと迅速測定のための許容時間という2つの観点から、最適な時間を検討した。その際に設置時間として 5, 10, 15, 20, 30 分後におけるそれぞれの TVOC 計の測定値を調べた。

7 汚染源検索システムを用いた実環境における汚染源調査

1) 調査地点

静岡県内の学校施設の一般教室を対象に 2010 年 8 月 17 日に室内空気汚染状況および汚染源調査を実施した。

2) 室内空気汚染状況調査

VOCs 濃度測定についてはアクティブサンプラー Charcoal Tubes (JUMBO) をミニポンプ (MP-Σ30) に接続して 200 mL/min で約 6 時間捕集した。また、カルボニル化合物濃度の測定についてはアクティブサンプラー Precep-C DNPH (Short) をミニポンプ (MP-Σ30) に接続して 500 mL/min で約 6 時間捕集した。なお、屋外の VOCs およびカルボニル化合物濃度測定については同様の方法で 1L/min で捕集した。調査時の温湿度はサーモレコーダー RTR-53 ((株) ティーアンドデイ製) を用いて 10 分間ごとに測定した。

3) 室内汚染源調査

室内空気汚染状況調査と併行して実施した。その際、VOCs 検索システムによるオンサイト測定および ECSMS によるサンプリングを併行して行った。

VOCs 検索システムを用いて、室内を構成する各部材の表面に同採取部を密着させ、所定時間放置した後に TVOC センサを起動させ、その場で測定値を得た。一方、ECSMS を VOCs 検索システムにより調べた全ての箇所と同時に設置し、約 6 時間後に回収し、GC/MS により VOCs 捕集量を物質ごとに定量した。一方、ECSMS セル内部に取り付けたパッシブサンプラーは PASSIVE GAS TUBES (有機溶剤用) (柴田科学 (株) 製) を用いた。なお VOCs 検索システムによる結果と比較するために、定量した各物質について Toluene のピーク面積を基準として換算し、その合算値を TVOC 測定値として比較した。

結果と考察

1 汚染源検索システムによる VOCs 検出に関する結果

1) 木質材料を用いた VOCs の検出

表5に各部材表面における VOCs 汚染源検索システムの測定値を示す。VOCsの放散のないガラス板が1.53であったが、室内空気の測定値も同様であったことから、測定直前に採取部内部に存在する空気の測定値であることが考えられた。一方3種類の木質材料に関しては、材料により表示値に明らかな差が認められたことから、実際の室内における VOCs 汚染源検索が可能であることが考えられた。

表5 各種材料から放散する TVOC 測定値

材料	TVOC 計測定値
本棚部材	1.81
市販ボード	7.37
抽斗部材	4.07
ガラス板	1.53
室内空気	1.55

次に表5の TVOC 計による各測定値と ECSMS による Formaldehyde の捕集量の相関を調べた。その結果を図2に示す。この結果、両者に有意な相関は認められず、Formaldehyde に対する TVOC 計の検出感度が相当低いことが示唆された。したがって VOCs 検索システムによる測定において、Formaldehyde は対象外とし、方法の2に示したカルボニル化合物以外の VOCs のみを対象とすることにした。

2) VOCs 採取部の設置時間

1) で用いた3種類のボードを用いて、汚染源検索システムの VOCs 採取部設置後の経過時間による TVOC 計による測定値について図3に示す。

この結果、5~30 分の間、TVOC 計による測定値は緩やかに上昇していることから、設置時間による測定感度への影響は低いことが判った。そこで、今回は採取部設置後15分経過時に TVOC 計で測定することとした。

2 汚染源検索システムを用いた汚染源調査結果

1) 室内空気汚染状況調査

学校施設内一般教室における VOCs およびカルボニル化合物の調査時の濃度を表6および表7に示す。なお、調査時の室温および相対湿度の平均はそれぞれ 35.6 °C, 54 %であった。

この結果、VOCs に関しては 1, 2, 4-Trimethylbenzen が 69 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、次いで *n*-Butanol が 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と相対

的に高かった。なお、屋外において α -Pinene が 550 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と高かったのは、付近に製材工場が稼働していたこと、Toluene が 39 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ については測定地点が駐車場に隣接していることによるものと推察された。一方、カルボニル化合物に関しては、Formaldehyde が 220 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と顕著に高く、厚生労働省による室内濃度指針値 (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) を超過していた。屋外濃度はおおむね室内濃度を大幅に下回っており、室内において高濃度で観測された物質については、汚染源が室内に存在することが推察された。

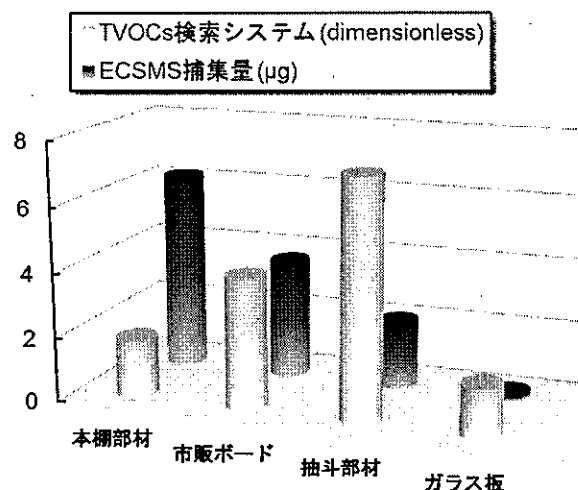


図2 TVOC 計測定値と ECSMS による Formaldehyde 捕集量

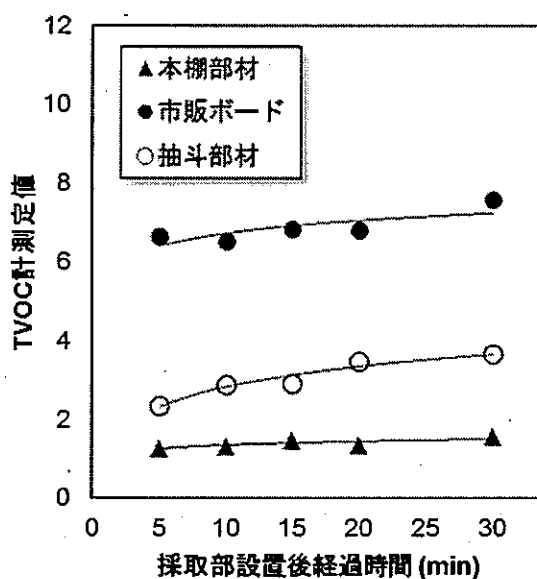


図3 採取部設置後経過時間による TVOC 計測定値

表6 一般教室内および屋外の VOCs 濃度

VOCs	Concentration (µg/m ³)	
	Classroom	Outdoor
2-Butanone	<15	N. D.
Hexane	<12	<1.6
Chloroform	N. D.	N. D.
1,2-Dichloroethane	N. D.	N. D.
2,4-Dimethylpentane	N. D.	N. D.
1,1,1-Trichloroethane	N. D.	N. D.
<i>n</i> -Butanol	20	<1.7
Benzene	N. D.	<1.2
Tetrachloromethane	N. D.	N. D.
1,2-Dichloropropane	N. D.	N. D.
Isooctane	N. D.	N. D.
Heptane	N. D.	N. D.
4-Methyl-2-pentanone	N. D.	N. D.
Toluene	8.1	39
Chlorodibromomethane	N. D.	N. D.
<i>n</i> -Butyl acetate	N. D.	<0.90
Octane	N. D.	N. D.
Tetrachloroethylene	N. D.	N. D.
Ethylbenzene	22	<2.4
<i>m-p</i> -Xylene	10	N. D.
Styrene	N. D.	N. D.
<i>o</i> -Xylene	1.7	N. D.
Nonane	3.7	<0.070
α -Pinene	5.8	550
1,3,5-trimethylbenzene	<7.3	N. D.
1,2,4-trimethylbenzene	69	N. D.
Decane	N. D.	N. D.
1,4-Dichlorobenzene	N. D.	<1.6
1,2,3-trimethylbenzene	3.9	N. D.
Limonene	N. D.	N. D.
Nonanal	N. D.	N. D.
Undecane	<9.5	<1.3
1,2,4,5-Tetremethylbenzen	N. D.	N. D.
Decanal	<17	N. D.
Dodecane	N. D.	N. D.
Tridecane	N. D.	<8.6
Tetradecane	<17	<2.3
Pentadecane	N. D.	N. D.
Hexadecane	N. D.	N. D.

2) 室内汚染源調査結果

室内の各部位からの VOCs の放散に関して、VOCs 検索システムによる測定値と ECSMS による TVOC 換算値の比較を図 4 に示す。この結果、両者において観測された TVOCs としての放散量の相関に関する決定係数 R² は 0.667 であった。この値は、オンサイ

表7 一般教室内および屋外のカルボニル化合物濃度

Carbonyls	Concentration (µg/m ³)	
	Classroom	Outdoor
Formaldehyde	220	18
Acetaldehyde	66	7.2
Acetone	31	13
Acrolein	0.85	0.15
Propionaldehyde	3.3	1.1
Crotonaldehyde	2.6	0.26
<i>n</i> -, <i>i</i> -Butyraldehyde	4.4	1.0
Benzaldehyde	11	5.0
<i>i</i> -Valeraldehyde	0.61	0.32
<i>n</i> -Valeraldehyde	3.3	0.44
<i>n</i> -Hexanal	6.7	0.41
2,5-Dimethylbenzaldehyde	1.7	3.1

トで簡便に VOCs 汚染源を検索する上では有効なレベルであると考えられた。したがって VOCs 検索システムにより部位ごとに TVOC 放散量を相対比較することができ、このケースの場合には床、壁（クロス）、天井の順で何らかの VOCs の放散能が高いことが推定できた。

ECSMS による VOCs 捕集量については、GC/MS による定性が可能であるため、図 5 に部位ごとの各 VOC についてトルエン換算値で示した。検出された物質は *n*-Butanol, 1,2,4-Trimethylbenzene, Decane, Nonanal, Undecane, Dodecane, Tetradecane の 7 物質であった。

全ての部位から同レベルの量が検出されている物質については、室内空気中に排出された後に各部位に再吸着された可能性が考えられた。そこで、Nonanal, Undecane, Dodecane は除外して、特に一

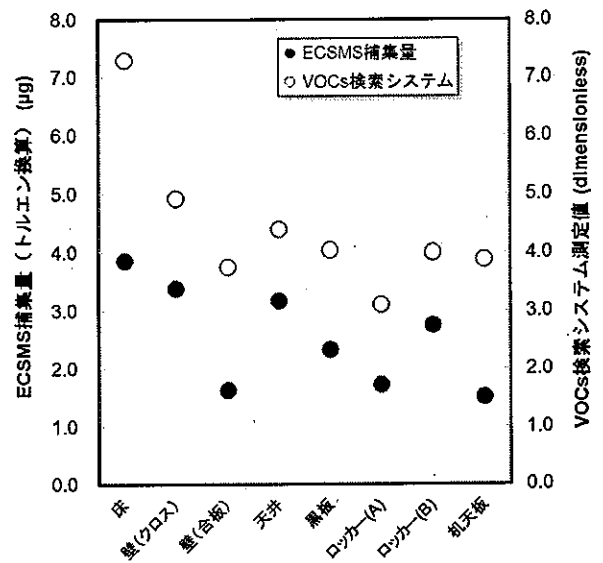


図 4 各部位からの放散による TVOC 測定値の比較

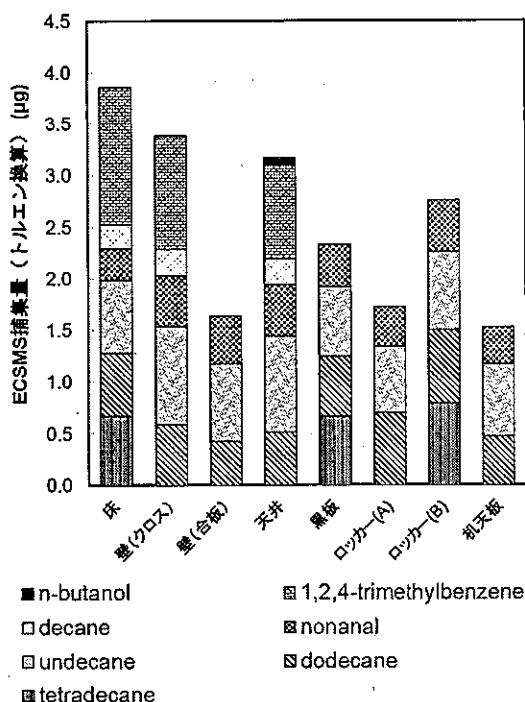


図5 ECSMSにより捕集されたVOCsの捕集量(トルエン換算)

部の物質からのみ検出されているものを抽出して図6に示した。この結果、*n*-Butanolは天井から、1,2,4-TrimethylbenzeneおよびDecaneは床、壁(クロス)、天井から、Tetradecaneは床、黒板、ロッカー(B)からそれぞれ検出されていることが明確になった。これらについても室内空気中のVOCsが再吸着したものを検出した結果でないとは断定できないが、少なくとも汚染源となる部位が絞られたことで低減化のための対策において有効なデータとなり得ることが考えられた。

特に1,2,4-Trimethylbenzeneは室内で比較的高濃度で検出されたことから、図5で検出された3箇所を中心に対策をすることが必要である。また、*n*-Butanolは天井においてのみ検出されており、天井の表面材あるいは下地材等を確認することが必要と考えられた。

まとめ

既存のTVOC計を用いたVOCs室内汚染源の検索手法を開発した。その適用性を評価するために学校施設の一般教室を対象としてVOCs汚染源を検索した。

その結果、TVOC放散量の高い箇所をスクリーニングすることが可能であることがわかった。室内汚染源を特定するために、ECSMSを用いた調査方法も

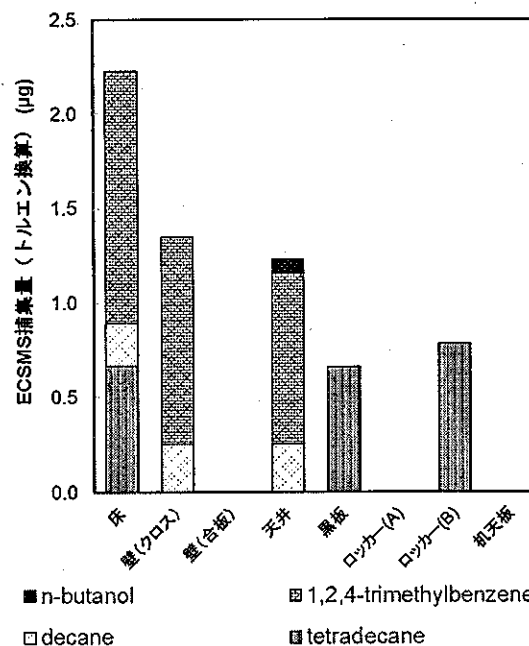


図6 ECSMSにより捕集されたVOCsの捕集量(データ抽出後、トルエン換算)

これまでに検討し有効であることが確認されている³⁾が、調査・分析に要する時間・コストには課題があり、現場において低コストかつ短時間でVOCs汚染源のスクリーニングが可能な本手法は、調査の第一段階として実施する有効な手段となり得ることが考えられた。

なお今回、厚生労働省による室内濃度指針値を超過したFormaldehydeについてはVOCs検索システムにおけるセンサ感度が十分でないため、検索することができなかったが、今後、吸着剤による濃縮機構の導入等を検討することで、その適用性を評価する必要がある。

謝辞

本研究の一部は(独)日本学術振興会平成22年度科学研究費(22922016号)の助成を受けたものである。

文献

- 1) Schneider P. et. al.: Indoor and outdoor BTX levels in German cities, *Sci. Total Environ.* 267, 41-51(2005)
- 2) Ohura T. et al.: Comparative study on indoor air quality in Japan and China: Characteristics of residential indoor and

outdoor VOCs, *Atmos. Environ.* **43**, 6352-6359
(2009)

- 3) Yamashita S. et. al: A simple method for screening emission sources of carbonyl compounds in indoor air, *J. Hazard. Mater.*, **178**, 370-376 (2010)
- 4) Sasahara T. , Development of ppb-level sensor based on catalytic combustion for total volatile organic compounds in indoor air, *Sens. Actuators B Chem.*, **126**, 365-543 (2007)
- 5) 豊田和弘ら, MEMS センサを用いた TVOC 検知器の開発 (その 3), 平成 20 年度室内環境学会総会講演集, 142-143 (2008)

リアルタイム PCR 法による食中毒起因菌の一斉迅速スクリーニング法の検討

微生物部 細菌班 飯田奈都子, 高橋奈緒美, 廣井みどり,
八木美弥, 西尾智裕, 神田 隆,
杉山寛治

Study on Simultaneous Rapid Screening of Foodborne Pathogens
Using Real-Time PCR Analysis

Natsuko IIDA, Naomi TAKAHASHI, Midori HIROI,
Miya YAGI, Tomohiro NISHIO, Takashi KANDA
and Kanji SUGIYAMA

細菌性食中毒検査の迅速化・省力化のため、リアルタイム PCR 法を用いた食中毒起因菌の一斉迅速スクリーニング法を確立した。本法は、食中毒患者の糞便検体から抽出した DNA 中から、食中毒起因菌の 16 種類の遺伝子を一斉に検索するものである。実際の食中毒事例の患者糞便検体に本法を試験的に導入したところ、培養法と同等の成績を約 3 時間で得ることができた。食品の検査にも応用したところ、リアルタイム PCR 法で原因となった食品の推定のみならず、短時間の増菌培養操作を加えることによって、検出感度向上の寄与および生菌と死菌とを選択的に検出できることが示唆された。本法は食中毒検査の迅速スクリーニングとして有用であり、煩雑な培養法の効率化や事件への迅速な対応を可能にすると期待される。

Key words: 食中毒起因菌, リアルタイム PCR 法, 一斉スクリーニング
foodborne pathogens, real-time PCR analysis, simultaneous screening

はじめに

食中毒事件では、再発・拡大防止のための衛生指導が重要であり、その原因を迅速に特定することが求められる。現在、細菌性食中毒の検査で用いられている培養法は、起因菌の確定までに日数を要し、検出対象の菌種ごとに培養条件や使用培地等が異なるため煩雑な作業を必要としている。さらに食品からの起因菌の検索では、煩雑で時間を要するにも関わらず、食品の加熱や保存により損傷を受けた菌や培養不能菌の検出は困難である。このため、検査時間の短縮や検査法の改良が試みられ、近年では食中毒起因菌の検出法として遺伝子検査法であるリアルタイム PCR 法が応用されるようになってきた¹⁻³⁾。本法を使うことにより、

食中毒起因菌を迅速に特定することができ、また、病原性の本体となる病原遺伝子等を直接検出するため、毒素産生性等の確認が必要な菌についても、迅速かつ的確な検出が可能である。そこで本研究では、食中毒起因菌の検索にリアルタイム PCR 法を用いた一斉検索システムを確立して、糞便検体に試験的に導入し、さらに食品の検査への応用について検討した。

材料および方法

1 リアルタイム PCR 法による食中毒起因菌の一斉迅速スクリーニング法の確立

1 つの反応系に 2 種類のプライマーを用いる duplex SYBR Green リアルタイム PCR 法を 96 穴のマイクロプレートで 8 反応系を同時に行い、16 種類の食中毒起因菌の遺伝子を一斉に検索する方法を確立した。対象とする遺伝子 (表 1) は、過去 10 年間に静岡県で発生し

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

表1 Duplex SYBR Green リアルタイム PCR 法による標的遺伝子 16 種類の一斉検索法

反応系	食中毒原因菌	標的遺伝子	プライマー名	Tm値	
A ○	1 <i>Clostridium perfringens</i>	ウエルシ菌	<i>cpe</i>	GAP-11 and GAP-12	75.9
	2 <i>Listeria monocytogenes</i>	リステリア菌	<i>hly</i>	Lm-hly-1 and Lm-hly-2	79.1
B ○	3 <i>Campylobacter jejuni</i>	カンピロバクター・ジェジュニ	specific DNA	AB-F and AB-R	77.0
	4 EHEC (Stx 2)	腸管出血性大腸菌(Stx 2)	<i>stx2</i>	JMS2-F and JMS2-R	80.4
C ○	5 EHEC and EPEC	腸管出血性大腸菌、病原性大腸菌	<i>eaeA</i>	eae-F2 and eae-R	78.1
	6 EIEC and <i>Shigella</i> spp.	赤痢菌、細胞侵入性大腸菌	<i>virA</i>	virA-F and virA-R	80.4
D ○	7 Emetic <i>Bacillus cereus</i>	嘔吐毒産生セレウス菌	<i>ces</i>	ces-TM-F and ces-TM-R	78.5
	8 ETEC (LT)	毒素産生大腸菌(LT)	<i>lt</i>	LT-1 and LT-2	80.4
E ○	9 TDH-positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	耐熱性溶血毒産生腸炎ビブリオ	<i>tdh</i>	Tdh199-F and Tdh199-R	79.3
	10 ETEC (ST)	毒素産生大腸菌	<i>st</i>	ST-f and ST-r	76.6
F ○	11 <i>Staphylococcus aureus</i>	黄色ブドウ球菌	<i>femB</i>	FemB-fw and FemB-rv	81.2
	12 <i>Y. enterocolitica</i> and <i>Y. pseudotuberculosis</i>	エルシニア菌	<i>yadA</i>	yadA-X-F and yadA-X-R	78.7
G ○	13 EAEC	腸管凝集接着性大腸菌	<i>astA</i>	EAST-1-S and EAST-1AS	83.5
	14 EHEC (Stx 1)	腸管出血性大腸菌 (Stx 1)	<i>stx1</i>	JMS1F and JMS1R	79.6
H ○	15 <i>Salmonella</i> spp.	サルモネラ菌	<i>invA</i>	invA139 and invA 141	85.0
	16 Enterotoxigenic <i>B. cereus</i>	下痢毒産生セレウス菌	<i>nheB</i>	SG-F3 and SG-R3	79.6

反応系A~Hには主要8食中毒菌のうち1菌種(○)が含まれる。

た食中毒事例を参考に選定した^{4,5)}。PCR 反応には福島ら⁶⁾、Bubert ら⁷⁾、Nguyen ら⁸⁾が報告したプライマーの中から、リアルタイム PCR 法に適した短い増幅産物が得られるものを選択した。また、複数遺伝子が同時に検出される場合を考慮し、8 反応系には主要な食中毒菌のうち 1 種類ずつを含み、PCR 反応で競合することがないように組み合わせを考えた。さらに、融解曲線分析を実施し、陽性コントロールとサンプルの Tm 値を比較して、得られた PCR 増幅産物の特異性の確認を行った。

2 患者糞便検体への試験的導入

1) 材料および DNA 抽出

2009 年~2010 年に、静岡県内で発生した細菌性食中毒 7 事例(表 2) の患者糞便(≦220mg)を対象とした。糞便中の PCR 反応阻害物質の除去に適した QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用い、DNA 抽出を行ったものをリアルタイム PCR 反応用の鋳型とした。

2) リアルタイム PCR 反応

反応液組成は、A~H の反応系についてそれぞれ、×2 SYBR Premix DimerEraser (TaKaRa) 10 μL, 2 種類のプライマー(10 μM) forward および reverse を 0.8 μL ずつ、ROX Reference Dye II 0.4 μL, 滅菌蒸留水 4.4 μL および DNA 抽出液 2 μL に調製し、PCR 反応液 20 μL を作製した。装置は 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems 社) を使用し、反応条件は、95°C30 秒加熱後、95°C5 秒、60°C34 秒を 30 サイクルで行い、さらに融解曲線分析で Tm 値を求めた。

3) 培養法との比較

本法に供試した検体について、県内保健所細菌検査課で行った培養法による検出結果と、本法による検出結果を比較した。

3 食品検体への応用(添加回収試験)

1) 菌株および被験食品

菌株は、主要食中毒菌である腸管出血性大腸菌 (*Escherichia coli* 0157:H7, VT1&2), 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*), サルモネラ属菌 (*Salmonella* Typhimurium), カンピロバクター (*Campylobacter jejuni*) および腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*, TDH+) を使用し、被験食品には 12 種類の市販食品を用いた(表 4)。

2) 試験方法

牛乳を除く被験食品に、9 倍量の 0.1% Tween80 加増菌培養液(カンピロバクターはプレストン培地、腸炎ビブリオは 2% NaCl 加アルカリペプトン水、その他は TSB 培地)を加えて stomacher で破碎混合した。牛乳あるいは食品の 10 倍希釈培養液に各菌を 1~30 cfu/mL (牛乳あるいは培養液)となるように添加し、37°C あるいは 42°C (カンピロバクターの場合)で培養した。24 時間まで経時的に培養液を採取し、培養法による菌数測定とリアルタイム PCR 法による遺伝子検出に供試した。

3) DNA 抽出法

培養液 2 mL から イージー・エクストラクト for DNA (SCAC) でジルコニアビーズを用いた物理破碎を含んだ

方法でDNA抽出(核酸精製)を行ったものを、リアルタイムPCRにおける鋳型として用いた。

4) リアルタイムPCR反応

調製したDNA試料液に対して、接種した菌が有する遺伝子のみを対象としたリアルタイムPCR法を実施した。反応液組成は、×2 SYBR Premix Ex Taq II 10 μL, 1種類のプライマー (10 μM) forwardおよびreverseを0.8 μLずつ, ROX Reference Dye II 0.4 μL, 滅菌蒸留水6 μLおよびDNA抽出液2 μLに調製し, PCR反応液20 μLを作製した。反応条件は、95°C30秒加熱後、95°C5秒, 60°C34秒を40サイクル反応し, 融解曲線分析を行った。装置は、前述と同様である。

結果

1 リアルタイムPCR法を活用した検出システムの確立と患者糞便検体への試験的導入

確立した方法は96穴のマイクロプレートを使用し、一回の反応で患者糞便9検体まで同時検索が可能であった(図1)。7事例の食中毒事例について患者糞便検体からDNAを抽出し、本法へ導入したところ、培養法とほぼ同等の結果を3~4時間で出すことが可能であり、混合感染と推測される菌の遺伝子についても検出が可能であった(図2, 表2)。病因物質としてカンピロバクターが検出

された食中毒事例(事例3)では、*Campylobacter jejuni*のプライマーを含む反応系Bでサンプルの増幅が見られ、融解曲線分析でカンピロバクターの陽性コントロールと近似したTm値を患者便6例で示していた(図3)。サンプルにおける検出結果を培養法とリアルタイムPCRとで比較したところ、*Campylobacter jejuni*の検出は両者で一致していた(表3)。

2 食品検体への応用(添加回収試験)

食品に食中毒菌(初発菌量1~30 cfu/mL)を添加して増菌培養操作を行い、経時的に採取してリアルタイムPCR法による検出を試みたところ、腸管出血性大腸菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラおよび腸炎ピブリオは多くの食品で6時間の増菌培養で検出が可能であり、カンピロバクターはささみおよび砂肝で8時間の培養で検出することができた(表4)。ハムに黄色ブドウ球菌を添加した試験では、リアルタイムPCR法で0および4時間では検出されなかったが、6および24時間では黄色ブドウ球菌の遺伝子が検出された(図4, 表5)。

さらに、増幅曲線では、培養時間による蛍光検出サイクル数に差がみられ、相対的な菌数の増加を観察することができた(図4a)。牛乳に添加した場合や、生レバーにカンピロバクターを添加した試験では、24時間後に

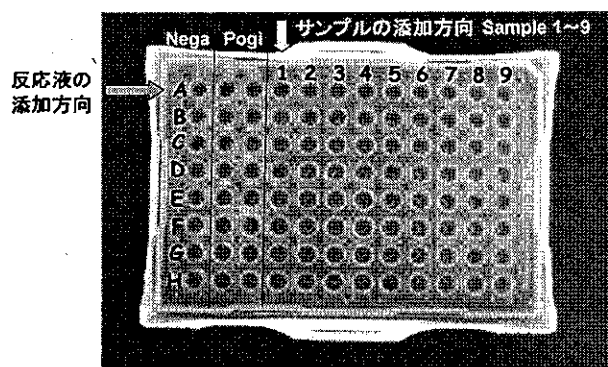


図1 96穴マイクロプレート配置図(9検体まで可能)

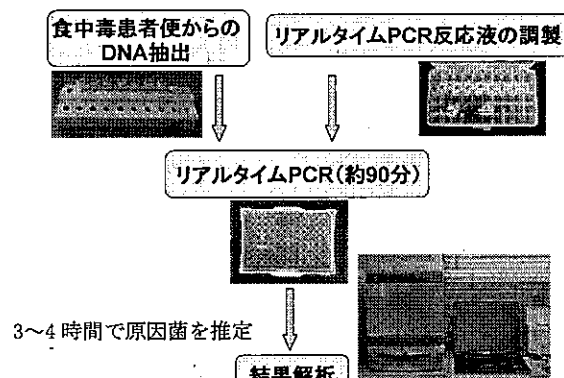


図2 検査の流れ

表2 リアルタイムPCR法による食中毒検査事例(静岡, 2009~2010)

事例	施設	原因食品	患者数/喫食者数	検出された細菌等	供試検体数	リアルタイムPCRでの遺伝子検出
1	病院	給食	34/277	ウエルシュ菌	7	cpe 6/7 (5/7)
2	食堂	会食料理	8/38	カンピロバクター	3	<i>C. jejuni</i> 1/3 (1/3) astA 2/3
3	食堂	会食料理	15/22	カンピロバクター	7	<i>C. jejuni</i> 6/7 (6/7) femB 1/2 astA 2/7
4	食堂	弁当	21/39	ウエルシュ菌	4	cpe 4/4 (3/4)
5	病院	給食	37/174	サルモネラ属菌	7	invA 7/7 (7/7) femB 2/7
6	旅館	旅館料理	23/72	腸炎ピブリオ	4	tdh 3/4 (3/4) astA 1/4
7	すし屋	仕出料理	8/18	カンピロバクター	6	<i>C. jejuni</i> 3/6 (3/6)

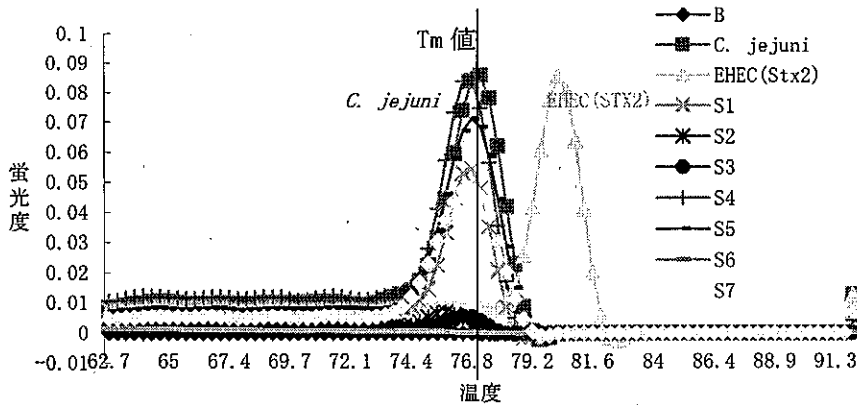


図3 融解曲線分析 (事例3)

表3 判定 (培養法との比較, 事例3)

検体	培養法との比較	
	C. jejuni 検出	リアルタイムPCR C. jejuni 種特異遺伝子
S1	+	+
S2	+	+
S3	+	+
S4	+	+
S5	+	+
S6	-	-
S7	+	+
判定	6/7	6/7

表4 食中毒菌の添加回収試験

	黄色ブドウ球菌	腸管出血性大腸菌	サルモネラ	カンピロバクター	腸炎ビブリオ
食肉・食肉製品					
ハム	6h (10 ⁴)	6h (10 ⁴)	6h (10 ⁶)	NT	NT
ハンバーグ	6h (10 ⁴)	6h (10 ⁴)	6h (10 ⁴)	NT	NT
ささみ (湯引き)	NT	NT	NT	8h (10 ³)	NT
鶏生レバー	NT	NT	NT	24h (10 ⁶)	NT
鶏生砂肝	NT	NT	NT	8h (10 ⁴)	NT
魚介類					
刺身	NT	NT	NT	NT	6h (10 ⁴)
加工食品					
ギョーザ	6h (10 ⁴)	6h (10 ³)	6h (10 ⁴)	NT	NT
グラタン	6h (10 ⁴)	6h (10 ⁴)	6h (10 ⁴)	NT	NT
卵製品					
卵焼き	6h (10 ⁴)	6h (10 ⁴)	6h (10 ⁴)	NT	NT
米飯 (おにぎり)	6h (10 ⁴)	6h (10 ⁴)	6h (10 ⁴)	NT	NT
ポテトサラダ	6h (10 ⁴)	6h (10 ⁴)	6h (10 ⁴)	NT	NT
牛乳	24h (10 ⁶)	24h (10 ⁸)	24h (10 ⁹)	NT	NT

検出時間を示す, ()内は培養法による菌数, NT: 試験せず

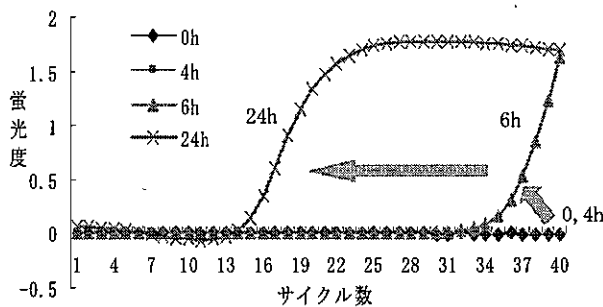


図4a 増幅曲線

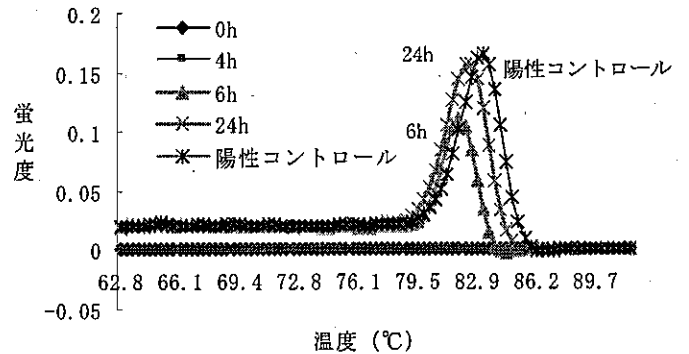


図4b 融解曲線分析

図4 添加回収試験 (ハムの10倍希釈培養液に黄色ブドウ球菌7.3 cfu/mL添加)におけるリアルタイムPCR法での femB 遺伝子の増幅曲線 (a) および融解曲線分析 (b)

表5 ハムに黄色ブドウ球菌を添加した添加回収試験における菌数変化およびリアルタイムPCR法による遺伝子検出

検出方法	培養時間			
	0h	4h	6h	24h
培養法 CHROMagar S. aureus使用	7.3	8.7×10^2	4.3×10^4	4.8×10^8
	cfu/ml 培養液			
リアルタイムPCR法 (<i>femB</i> 検出)	-	-	+	+

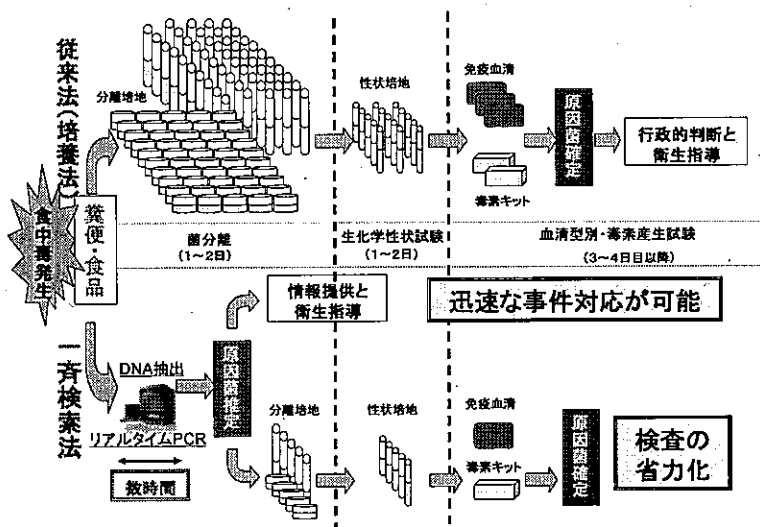


図5 従来法（培養法）と一斉検索法の比較

検出され、6時間や8時間では増菌培養やPCR反応に阻害を認めた。

考察

近年、食中毒起因菌の特定に原因菌の遺伝子を検出するPCR法が数多く開発されている。食中毒の検査では多くの菌種を対象とするため、網羅的かつ簡便で安価な方法が理想であるが、そのような現場の実情に即した方法は少ない。そこで本研究では、リアルタイムPCR法による食中毒起因菌の16種類の遺伝子を標的とした一斉迅速スクリーニング法を確立し、その有用性について検討を行った。

確立した一斉迅速スクリーニング法を実際の食中毒事例の患者糞便検体に試験的に導入したところ、従来法の培養法では結果を得るまでに3~4日以上要したが、本法では3~4時間で原因菌を推定し、培養法と同等の結果を出すことができた(表2)。本法の利点としては病原性の本体となる病原遺伝子等を直接検出するため、長期間培養を要する菌(カンピロバクター等)、毒素産生性等の確認が必要な菌(ウエルシュ菌や毒素産生性大腸菌等)についても迅速かつ確に検出できることがあげられる。また、リアルタイムPCR法によ

り短時間で原因菌をスクリーニングできれば、同時並行して実施する培養法における検査対象の絞り込みも可能である。これにより、培養法のための検査に比べて必要となる性状培地や器材、試薬等の量が少なくて済み、煩雑な検査をより迅速化・省力化できると思われる(図5)。

糞便を対象とした本法の検出感度は、検体はキットを使用したDNA抽出により最終的に約 10^3 倍希釈されるが、食中毒急性期の糞便には大量の病原体(通常約 10^6 cfu/g)が含まれるため、リアルタイムPCR法で十分検出が可能である。一方で保菌的な少量菌は検出しないため、この点で食中毒との鑑別は容易である。

市販食品を用いた食中毒菌の添加回収試験では、前処理として試料の増菌培養の工程を組み入れて、培養前と培養後のそれぞれで接種菌の遺伝子検出を行った。従来から、PCR法による微生物検出の問題点は、生菌と死菌由来のDNAを区別できないことにあると言われている⁹⁾。今回、増菌培養前、後に菌の遺伝子検査を行った結果、増幅曲線(図4a)の蛍光検出サイクル数が培養時間によって少なくなり、相対的な菌数の増加を観察することができた。つまり、これは、増菌培養前、後を比較することによって生菌を選択的に検出で

き、PCR法の死菌検出の問題を回避できることを示している。さらに、短時間の増菌培養による生菌数の増加は検出感度の向上にも寄与し、食品の汚染菌数が少ない場合においても有効であると思われた。

食品中の高濃度なタンパク質やDNaseはPCRに影響し、高感度な菌の検出を阻害する。そのため、今回、食品検体からの病原体のDNA抽出には、ジルコニアビーズによる物理破砕を含んだ核酸精製法を採用した。ジルコニアビーズによる物理破砕は界面活性剤や熱による破砕と比較して破砕能力が高く、グラム陽性菌、陰性菌の両方に適用できる。また、ジルコニアビーズはガラスビーズの2倍の密度があるため、破砕効率が2倍高い。そのため、食品由来の夾雑物を効果的に除去でき、検出感度も高い。さらに、ガラスビーズのように核酸を吸着させないという特徴もあるため、今回採用したジルコニアビーズを用いたDNA抽出法は食品検体からの効率的な核酸抽出法として有用であると思われる。しかし、一部で、食品成分によりPCR反応や増菌培養の阻害を認める場合があり、検体前処理のさらなる検討が必要であると思われた。Fukushimaら¹⁰⁾やArakiら¹¹⁾の方法を参考に、基礎的な検討として行ったPercollを用いた密度勾配遠心分離法(DGC)では、食品成分と細菌を密度に基づいて分けることができた。そして、菌が存在すると思われる画分を採取し、DNA抽出およびPCR反応を行ったところ、阻害がみられなかったため、Percollを使用したDGCは、培養やPCR反応の阻害となりうる食品成分の効果的な除去法の一つとして期待される。

今回確立した方法は細菌の遺伝子を対象としているが、寄生虫やウイルス等も一斉検索の対象として加えることが可能である。今後は、食中毒の病因物質となりうる病原体を幅広く網羅した方法の確立が求められるであろう。

食中毒事件の病因物質の特定において、リアルタイムPCR法を活用し、迅速に原因菌を推定することができれば、早い段階での情報提供や衛生指導が可能となる(図5)。本法は、食中毒事件へのより迅速な行政対応を可能にし、県民の健康危機管理の一端を担う方法として活用が期待される。

謝 辞

検体提供にあたり多大なご協力をいただきました、県内保健所の細菌検査課および衛生業務課の皆様へ深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Fukushima, H. et al. :Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools, J. Clin. Microbiol., 41, 5134-5146 (2003)
- 2) Matsuki, T. et al. :Use of 16 rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces, Appl. Environ. Microbiol., 70, 7220-7228 (2004)
- 3) Stephan, J. O. et al. :Quantification of intestinal Bacterial Populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora, J. Clin. Microbiol., 42, 2566-2572 (2004)
- 4) 静岡県健康福祉部:平成15年静岡県の食中毒 (2004)
- 5) 静岡県厚生部:平成20年静岡県の食中毒 (2009)
- 6) Fukushima, H. et al. :Comprehensive and rapid real-time PCR analysis of 21 foodborne outbreaks, Int. J. Micro., Article ID 917623, 13pages (2009)
- 7) Bubert, A. et al. :Isolation of catalase-negative strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR, J. Clin. Microbiol., 35, 179-183 (1997)
- 8) Nguyen, T. V. et al. :Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam, J. Clin. Microbiol., 43, 755-760 (2005)
- 9) Wang, R. F. et al. :A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods, J. Appl. Microbiol., 83, 727-736, (1997)
- 10) Fukushima, H. et al. :Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR, Appl. Environ. Microbiol., 73, 92-100 (2007)
- 11) Araki, E. et al. :Quantitative separation of viable microbial cells from non-filterable food by Percoll gradient centrifugation, Bokin Bobai, 38, 21-27 (2010)

肉用鶏における基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の保菌実態調査

- 肉用鶏由来 ESBL 産生菌の分子遺伝学的性状解析(第1報) -

微生物部 細菌班 廣井みどり, 高橋奈緒美, 飯田奈都子,
野田佳宏*, 八木美弥, 西尾智裕,
神田 隆, 杉山寛治
静岡県立大学 大橋典男

Study of Extended-spectrum β -lactamase-producing
Escherichia coli of Broiler Origin

-Characterization of ESBL-producer from Broiler Feces (1st Report) -

Midori HIROI, Naomi TAKAHASHI, Natsuko IIDA,
Yoshihiro NODA*, Miya YAGI, Tomohiro NISHIO,
Takashi KANDA, Kanji SUGIYAMA and Norio OHASHI

基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌は、院内感染起因菌で、第3世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示し、セファロスポリン系薬剤の使用が許可されていない肉用鶏での分離が報告されている。また、ESBL 遺伝子はプラスミド上にあり、菌から菌へ伝達しやすいことが知られており、鶏肉由来細菌からヒトの腸管内の細菌へ移行し、病院内で拡散される可能性が指摘されている。

本研究では、肉用鶏の保菌するセファロスポリン系薬剤耐性菌における ESBL 産生菌の出現状況を明らかにする目的で調査を実施したところ、採取検体全てから $1\mu\text{g/mL}$ のセフトキシム (セファロスポリン系薬剤) に耐性を示す大腸菌が分離され、肺炎桿菌1株も分離された。これらの株から ESBL 遺伝子が検出され、ESBL 遺伝子を含むプラスミドの制限酵素切断パターンを比較した結果、同じ起源と思われるプラスミドが、異なる菌種、遺伝子型および農場由来の株に存在し、水平伝播で拡散、分布することが示唆された。今後は、肉用鶏が ESBL 産生菌を高率に保菌する原因を解析し、環境やヒトへの拡散防止方法を検討することが公衆衛生上必要と考えられた。

Key words: 基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生大腸菌, 肉用鶏, プラスミド

extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, broiler, plasmid

はじめに

近年、多くの細菌で薬剤耐性化が進行しており、多剤耐性サルモネラなど家畜由来と考えられる薬剤耐性菌も医療現場で問題となってきている。家畜の腸管で増加した耐性菌が食物、環境などを経由して人に伝播し病気の治療や健康に影響を及ぼす危険性が指摘されており、WHO は 2000 年に食用

動物への抗生物質の慎重な使用を勧告している。第3世代セフェム系薬剤に耐性を示す基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (extended spectrum β -lactamase : ESBL) 産生菌は、院内感染起因菌として知られており、近年、世界各地で大腸菌、プロテウス属菌、肺炎桿菌など様々な菌種が分離されている。家畜からも分離されているが、日本においてセフェム系薬剤の使用が許可されていない肉用鶏から分離されるという因果関係の不明な現象が起きている。本研究では、肉用鶏の保菌するセフェム系薬剤耐性菌における ESBL 産生菌の出現率や遺伝的性状を明らかにする目的で調査を実施した。

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

*: 東部健康福祉センター

材料および方法

1 菌分離

2007年5月～8月に食鳥処理場において10農場由来の肉用鶏の腸管を各3検体採取した。直腸を切開し便を1μg/mLセフトキシム (CTX) 含有クロモカルト コリフォーム寒天培地 ES に塗抹し、35°Cで24時間培養後、青紫色を示す典型的な大腸菌のコロニーを1平板あたり最大3集落ずつ釣菌した。桃色のドーム状で光沢を有した、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) を疑う集落も釣菌し、菌種の同定は API ID 32E (Biomérieux) および生化学的性状の検査により行った。

2 ESBL 産生確認試験

ESBL 産生菌は、元来ペニシリン系薬剤を分解していたβラクタマーゼが変異して基質特異性を拡張し、第3世代セフェム系のCTXやセフトジジム (CAZ) までも分解することができるようになった酵素を産生する菌で、第3世代セフェム系薬剤に対するMICが2μg/mL以上を示し、βラクタマーゼ阻害剤であるクラブラン酸 (CVA) により産生酵素の作用が阻害されることが特徴であることから、選択分離培地により分離された大腸菌、肺炎桿菌および接合伝達試験で得られたトランスコンジュガントについて、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) の方法に従ってESBL産生菌の確認試験を行った。CTXに対するMICが2μg/mL以上の株について、CTX、CAZおよびそれらとCVAの合剤の阻止円を計測し、単剤の阻止円と比較して、βラクタマーゼ阻害剤のCVAとの合剤のディスクの阻止円が5mm以上拡大した場合をESBL産生株とした。なお、ディスクはBD Sensi-Disc (日本BD)、ESBLs-CTX/CVA '栄研' および ESBLs-CAZ/CVA '栄研' (栄研化学) を用いた。

加えて、セフポドキシム (CPDX) に対する耐性もディスク法により確認した。CPDXのディスクは、ESBLs-CPX/CVA '栄研' (栄研化学) を用いた。

3 βラクタマーゼ遺伝子の検出

ディスク法によりESBL産生菌と判定された肉用鶏由来の大腸菌41株と肺炎桿菌1株を供試した。Kojimaら¹⁾およびEckertら²⁾のプライマーを用い、基質特異性拡張型を含む9種類のβラクタマーゼ (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, SHV, TEM, CMY-1, CMY-2, PSE-1, FOX) をコードするβラクタマーゼ遺伝子 ($bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-9}$, bla_{SHV} , bla_{TEM} , bla_{CMY-1} , bla_{CMY-2} , bla_{PSE-1} , bla_{FOX}) の検出を行った。

4 βラクタマーゼ遺伝子の塩基配列の決定

βラクタマーゼ遺伝子には多数のバリエーションが存在するため、増幅産物が得られた場合はダイレクトシーケンシング法により塩基配列を明らかにした。PCR増幅産物は、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer によって分析した。ダイレクトシーケンシング法により判明した増幅産物の塩基配列から、βラクタマーゼのタイプを決定した。塩基配列はBLAST database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用い解析した³⁾。

5 接合伝達試験

接合伝達試験は *E. coli* INVαF' (Invitrogen) をリファンピシンを含有した普通寒天(日水)上で継代し、高度に耐性を付与した菌株を用い、液体培養法により行った⁴⁾。1夜培養のドナー、レシピエントの菌液をそれぞれ0.1mLずつ1mLのLBブロスに加えた。混合液を1夜培養した。混合液を1エーゼとり10分の1に区切った選択平板の1区画に塗抹した。以上の過程で混合液を塗抹した選択平板は24時間37°Cで培養し、トランスコンジュガントを得た。トランスコンジュガントを分離するための培地には、リファンピシン (50 μg/mL) およびCTX (1 μg/mL) 含有 BTB Lactose Agar (Merck) を使用した。平板上に発育した無色のコロニーを釣菌し、単離した後、ESBL産生確認試験およびPCR法によるESBL遺伝子の確認を行った。

6 プラスミドプロファイル

トランスコンジュガントの plasmid DNA は Kado&Liu の変法⁵⁾により抽出した。

7 プラスミドの制限酵素切断パターンによる比較

Kado&Liu の変法により抽出したトランスコンジュガントの plasmid DNA を、制限酵素 *Eco*R I, *Sph* I および *Cla* I (Takara) を用いて消化した。その後、1% SeaKem Gold Agarose で 40 V, 5 時間の条件で電気泳動した⁶⁾。ゲルをエチジウムブロマイド溶液で染色しトランスイルミネーター下で撮影した。得られた制限酵素切断パターンについて各株間で比較した。

8 サザンハイブリダイゼーション

前節において、プラスミドの制限酵素切断パターンの比較を行ったトランスコンジュガントについて、プラスミドプロファイルを行った際の、写真撮影後のゲルを用いて、サザンハイブリダイゼーションを行った。DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche Diagnostics) を用いた。Kojimaら¹⁾のプライマーを

用いてCTX-M-2遺伝子およびCTX-M-14遺伝子のDIGラベルされたプローブを合成した。ハイブリダイゼーションは、製品の使用説明書に従った。トランスコンジュガントの保有するプラスミド上にESBL遺伝子が存在することを確認した。

9 パルスフィールドゲル電気泳動法による解析

第7節において、プラスミドの制限酵素切断パターンによる比較を行った株について、PFGE法による遺伝子の構造解析を行った。Pulsnet protocol に準じ、泳動条件は、電圧6 V/cm, 12°C, スイッチタイム2.2-54.2秒で20時間とした。制限酵素としてXba Iを用い、サイズマーカーは、*Salmonella* Braenderup H9812のXba I切断断片を用いた。

得られたPFGEパターンについて、3つ以下のバンドの相違は関連がある株とし、3つより多いバンドの相違は関連がないとみなした⁷⁾。

結果および考察

1 菌分離状況

30検体全てから大腸菌合計90株と肺炎桿菌1株が分離された。CTXを1μg/mL含む培地に全ての検体で大腸菌の旺盛な発育が確認された(表1)。

2 ESBL産生確認試験結果

分離株のうち、確認検査でESBL産生菌と判定された株は、大腸菌90株中41株(7農場由来)、肺炎桿菌1株であった(表1)。培地での発育状況と、検出率が7割と高

いことから、保菌率および保菌菌数も高いことがうかがわれた。現在国内では養鶏でのセファロスポリン系薬剤の使用は認められていないため、このような保菌状況の原因は不明である。

また、選択分離培地から分離された菌株は、全てCPDXに耐性を示し、ESBL産生菌と判定されなかった菌株もESBL産生とは異なった耐性機構によってセファロスポリン系薬に対し耐性を獲得していることが考えられた。

3 検出されたβラクタマーゼ遺伝子型

ESBL産生と判定された株から $bla_{CTX-M-1}$ (3株)、 $bla_{CTX-M-2}$ (27株)、 $bla_{CTX-M-9}$ (5株)、 bla_{SHV} (10株)、 bla_{TEM} (8株)遺伝子がPCR法により検出され、そのうち12株が2種類の遺伝子を保有していた。一部の株の bla_{SHV} 用primerによる増幅産物のシーケンスの結果、ESBL遺伝子の bla_{SHV-12} であった。PCR法の結果から、農林水産省による調査で肉用鶏からの分離が報告されているCTX-M-2グループ型、CTX-M-9グループ型以外に、SHV型のESBL遺伝子が検出された。

4 βラクタマーゼ遺伝子のシーケンス解析結果

ESBL確認検査陽性株から得られたPCR増幅産物のシーケンスの結果、日本のヒト由来株で主に確認されている、CTX-M-15, 2, 14, 44やSHV-12型の遺伝子が検出され、国内の医療分野で報告されているESBL型が肉用鶏由来株でも検出されることが確認された。

表1 肉用鶏由来ESBL産生菌の由来農場別検出株数およびβラクタマーゼ遺伝子型別結果

農場	検体数	大腸菌分離株数	ESBL確認検査陽性株数	保有遺伝子型
A	3	9	0	
B	3	9	9	CTX-M-2, CTX-M-2+SHV-12
C	3	9	6	CTX-M-15+TEM-1, SHV-12
D	3	9	0	
E	3	9	4	CTX-M-14, CTX-M-14+SHV-12, SHV-12
F	3	9	0	
G	3	9	5	CTX-M-2
H*	3	9	8	CTX-M-2, TEM-1
I	3	9	4	CTX-M-44, CTX-M-14
J	3	9	5	CTX-M-2+TEM-1, CTX-M-2
合計	30	90	41	

* $bla_{CTX-M-2}$ と $bla_{SHV-108}$ 遺伝子を保有するESBL産生肺炎桿菌をH農場の肉用鶏から分離した。

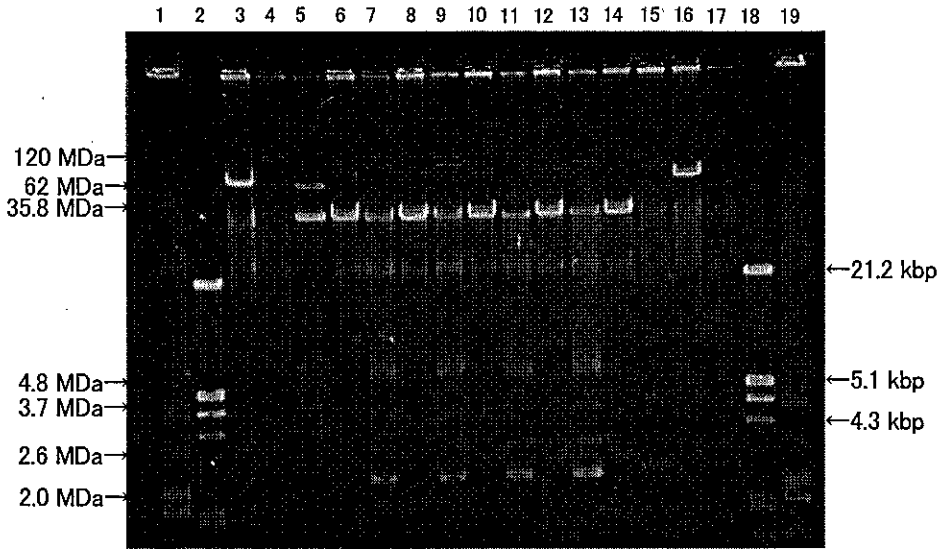


図1 CTX-M-2 遺伝子をコードするプラスミドのプラスミドプロファイル

Undigested plasmid profiles from 13-1k(lane 5), 7-1(lane 7), 7-4(lane 9), 7-7(lane 11), 7-8(lane 13) and transconjugants of 13-1k(lane 6), 7-1(lane 8), 7-4(lane 10), 7-7(lane 12), and 7-8(lane 14) respectively. Lanes 1-4, and 16-19, molecular weight marker. Lane 15, recipient strain (*E. coli* INV α F').

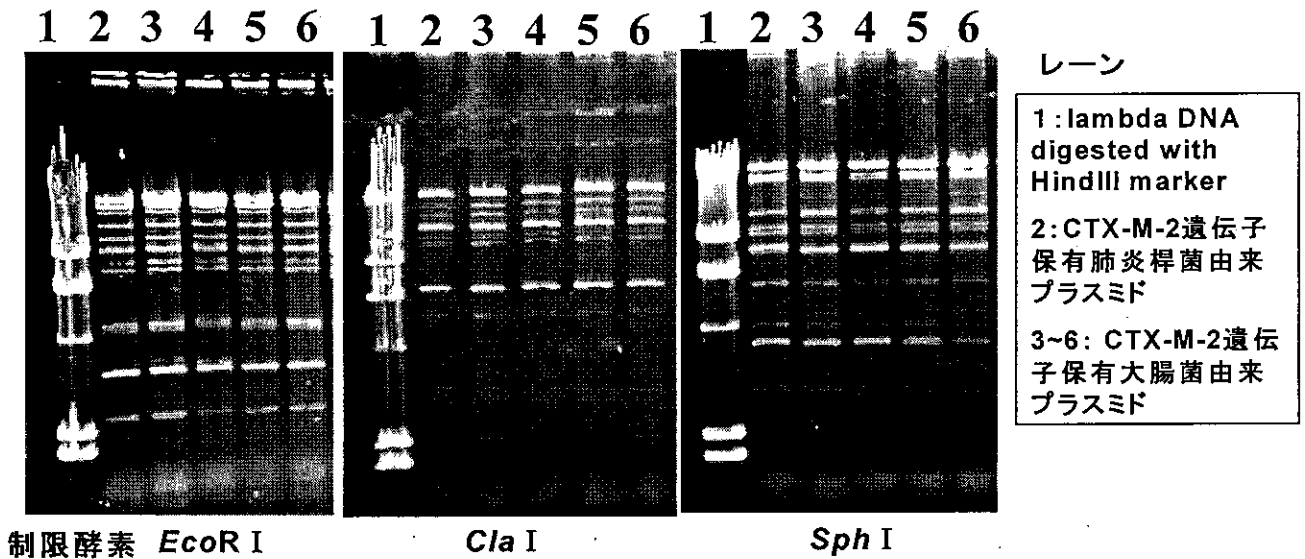


図2 ESBL 遺伝子を含むプラスミドの制限酵素切断パターンの比較

5 接合伝達試験の結果

肉用鶏由来の ESBL 産生大腸菌 41 株および ESBL 産生肺炎桿菌 1 株の接合伝達試験を行った結果、大腸菌 17 株と肺炎桿菌 1 株でトランスコンジュガントが得られた。トランスコンジュガントの ESBL 産生確認試験では全ての株で ESBL の表現型が確認された。PCR 法による ESBL 遺伝子確認でもドナーの保有する ESBL 遺伝子と一致した検出結果を示した。2 種類の ESBL 遺伝子を持つドナーか

ら得られたトランスコンジュガントは、どちらか1つもしくは2つの ESBL 遺伝子を保有する株が見られた。

6 プラスミドプロファイルによるプラスミドの確認

プラスミドプロファイルにより目的のプラスミドのみが確認されるトランスコンジュガントを選定した。ESBL 遺伝子をコードするプラスミドは、文献的に巨大プラスミドということが知られているが、今回の実験において

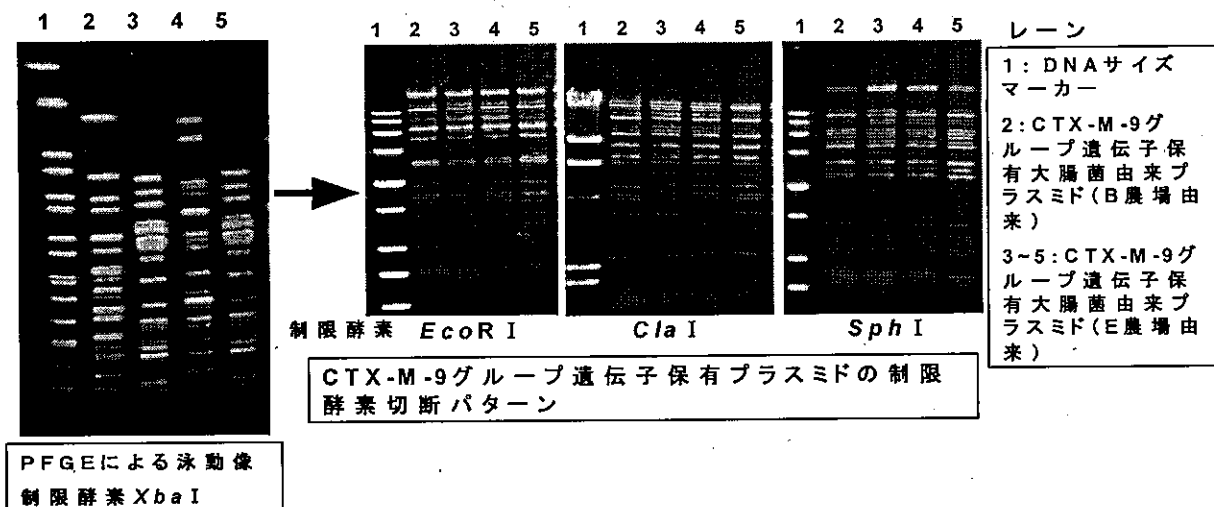


図3 ESBL 遺伝子を含むプラスミドの制限酵素切断パターンの比較

も、数十 MDa 以上あることが確認された。プラスミドの制限酵素切断パターンによる比較を行った株のうち代表的な株のプラスミドプロファイルを図1に示す。

7 プラスミドの制限酵素切断パターンによる比較およびパルスフィールドゲル電気泳動法による解析結果

トランスコンジュガントから抽出したプラスミド DNA の制限酵素による切断パターンでは、ESBL 遺伝子である *bla_{CTX-M-2}*、*bla_{CTX-M-14}*、*bla_{SHV-12}* を含むプラスミドの制限酵素切断パターンを比較した結果、*bla_{CTX-M-2}* を含むプラスミドの比較において、肺炎桿菌と大腸菌の保有するプラスミドが同様のパターンを示し、同一の起源と考えられる株が認められた (図2)。この肺炎桿菌と大腸菌は異なる農

場から出荷された肉用鶏由来であり、遺伝学的に関連のあるプラスミドが、菌種をこえて広く分布していることが考えられた。

また、CTX-M-9 グループ遺伝子をコードするプラスミドの比較においては、7-9、10-1、10-2、10-3 由来のトランスコンジュガント株間で、プラスミドの制限酵素切断パターンが同一であった。7-9 と 10-1~3 は異なる農場由来の菌株であり、異なる農場由来の株が遺伝学的に関連のあるプラスミドを保有することが確認された。また、同一農場内の異なる PFGE 型の株間でプラスミドの切断パターンが同一の株もみられた (図3)。これらの結果から、クローンの増殖以外にも、同じ起源のプラスミドが、異なる農場の異なる菌種および異なる遺伝子型の株に接

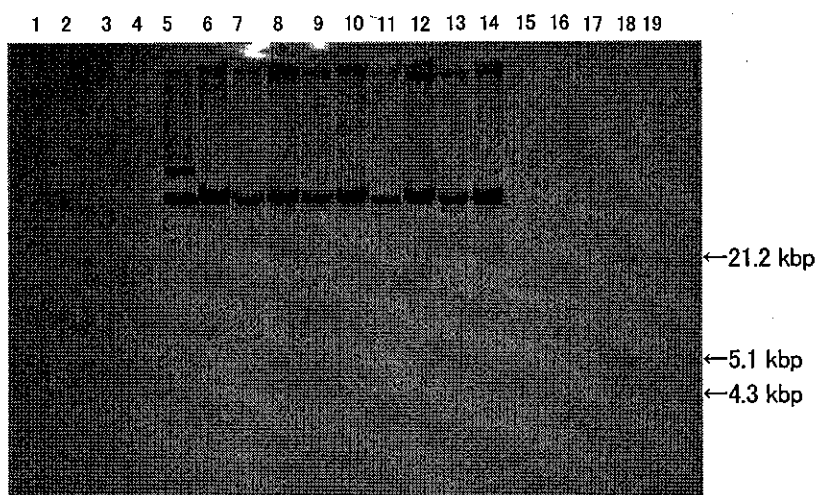


図4 CTX-M-2 遺伝子をコードしたプラスミドのサザンハイブリダイゼーション

Southern blot hybridization of undigested CTX-M-2 encoding plasmids from 13-1k (lane 5), 7-1 (lane 7), 7-4 (lane 9), 7-7 (lane 11), 7-8 (lane 13) and transconjugants of 13-1k (lane 6), 7-1 (lane 8), 7-4 (lane 10), 7-7 (lane 12), and 7-8 (lane 14) respectively. Lanes 1-4, and 16-19, molecular weight marker. Lane 15, recipient strain (*E. coli*/INV α F').

合伝達により水平伝播していると考えられた。

8 サザンハイブリダイゼーションによるプラスミド上の ESBL 遺伝子の確認

プラスミドの解析を行った株について、サザンハイブリダイゼーションによるプラスミド上の ESBL 遺伝子の存在を確認したところ、ドナーとトランスコンジュガントにおいて同一の大きさのプラスミド上に ESBL 遺伝子がコードされていることが確認された。プラスミド上の CTX-M-2 遺伝子を検出した写真を図4に示す。なお図1に示した撮画像に使用したゲルを用いて検出した。この結果から、CTX-M-2 遺伝子をコードしたプラスミドが接合伝達されたことが確認された。

大腸菌および肺炎桿菌はヒトの腸内常在菌であり、感染症起因菌でもある。当所の調査により肉用鶏糞便から ESBL 産生大腸菌を確認したのは 2005 年であるが、近年東京都⁸⁾や島根県⁹⁾の調査によっても鶏肉からの ESBL 産生菌の分離が報告されている。

Carattoli, A. は、食用動物から分離される ESBL 産生菌について、分離数は多くないものの、ヒトへの伝播を危惧している¹⁰⁾。しかし、今回の調査で肉用鶏糞便から高率に ESBL 産生大腸菌が分離されることが判明した。鶏肉や環境を介してヒトが ESBL 産生菌群を摂取し、ヒト腸管内での増殖や接合伝達によるプラスミドの水平伝播により拡散している可能性があり、食肉や環境を介したヒトへの伝播が一層危惧される状況であることが示唆された。一般に、薬剤耐性菌は薬剤の多用により増加するが、日本においては、牛や豚への治療でセファロsporin系薬剤の使用が承認されているが、肉用鶏に対しては承認されていない。しかし上述のように肉用鶏においてプラスミド伝達能を持つ ESBL 産生菌が多数存在することが明らかとなった。今後は、ヒト臨床分離株と肉用鶏由来株の比較解析とともに、出現状況や発生原因を解明する必要があると考えられた。

文 献

- 1) Kojima, A. et al.: Extended-spectrum- β -lactamase-producing from

Escherichia coli strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: Report

the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 3533-3537 (2005)

- 2) Eckert, C. et al.: Dissemination of CTX-M-type β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 1249-1255 (2004)
- 3) Altschul, S. F. et al.: Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410 (1990)
- 4) 中谷 林太郎 他著, 日本細菌学会教育委員会(編). R プラスミドの分子遺伝学的実験法 第1版. 根菜出版 (1983)
- 5) Sasakawa, C. et al.: Molecular Alteration of the 140-megadalton plasmid associated with loss of virulence and congo red binding activity in *Shigella flexneri*, *Infect. Immun.*, **51**, 470-475 (1986)
- 6) Kado, C. I. et al.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids, *J. Bacteriol.*, **145**, 1365-1373 (1981)
- 7) Tenover, F. C. et al.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing, *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2233-2239 (1995)
- 8) 松下 秀 他: 食品由来大腸菌におけるフルオロキノロン系薬剤耐性菌および基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生菌の動向, *モダンメディア*, **54**, 202-209 (2008)
- 9) 黒崎守人 他: 島根県における食肉の基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の汚染状況及び食肉由来株とヒト由来株との比較, *島根県保健環境科学研究所報*, **51**, 45-47 (2009)
- 10) Carattoli, A.: Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers, *Clin. Microbiol. Infect.*, **14**, 117-123 (2008)

肉用鶏における基質特異性拡張型βラクタマーゼ
(ESBL) 産生大腸菌の保菌実態調査
- 農場内の肉用鶏における経時的な ESBL 産生菌出現状況 (第 2 報) -

微生物部 細菌班 廣井みどり, 飯田奈都子, 野田佳宏*
高橋奈緒美, 八木美弥, 西尾智裕,
神田 隆, 杉山寛治
畜産技術研究所 松井繁幸
関東化学株式会社 久保亮一
静岡県立大学 大橋典男

Study of Extended-spectrum β-lactamase-producing
Escherichia coli of Broiler Origin
-Longitudinal study of ESBL-producer from Broiler Feces (2nd Report) -

Midori HIROI, Shigeyuki MATSUI, Ryoichi KUBO,
Natsuko IIDA, Yoshihiro NODA*, Naomi TAKAHASHI,
Miya YAGI, Tomohiro NISHIO, Takashi KANDA,
Kanji SUGIYAMA and Norio OHASHI

原因不明の ESBL 産生菌出現メカニズムを検討するため、養鶏農場内の肉用鶏における ESBL 産生菌の保菌状況を経時的に調査した。1つの鶏舎に抗菌剤含有飼料摂取区域（有薬区）と非含有区域（無薬区）を設置し、搬入から出荷までの肉用鶏の糞便から ESBL 産生菌を定量解析した。その結果、有薬区では 1 日齢のヒナの糞便から ESBL 産生菌は検出されなかったが、9 日齢のヒナ糞便からは 10^6 CFU/g 以上の ESBL 産生菌が検出され、その後も出荷時（49 日齢）まで $10^6 \sim 10^8$ CFU/g の菌数が維持された。無薬区の飼育においても、有薬区とほぼ同様の結果が得られ、抗菌剤非含有飼料摂取の肉用鶏においても搬入後 9 日齢以降には ESBL 産生菌が出現することが判明した。これは、薬剤の選択圧の有無に関わらず、鶏において ESBL 産生菌が増加することを示唆している。

そこで、環境汚染のない実験室内で肉用鶏の飼育を試みたところ、その肉用鶏からは ESBL 産生菌は検出されなかった。このことから、ESBL 産生菌の出現は、農場における ESBL 産生菌の汚染が関与するものと考えられた。

Key words: 基質特異性拡張型βラクタマーゼ産生大腸菌, 肉用鶏, ヒナ
extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli*, broiler, chick

はじめに

近年、多くの細菌で薬剤耐性化が進行し、加えて抗菌剤の開発も滞っており、多剤耐性緑膿菌、NDM-1 産生多剤耐性菌、多剤耐性アシネトバクター等の薬剤耐性菌が医療現場で問題となっている。また、発生源として医療

現場だけでなく、家畜の腸管で増加した耐性菌も問題視されている。

第 3 世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示す基質特異性拡張型βラクタマーゼ (extended spectrum β-lactamase: ESBL) 産生菌は、院内感染起因菌として知られており、近年、世界各地で様々な菌種が分離されている。家畜や食肉からも ESBL 産生菌は分離されており、ESBL 産生菌が鶏肉に付着し、鶏肉からヒトの腸管へ移行し、病院へ持ち込まれる可能性が指摘されている。

第 1 報で肉用鶏の ESBL 産生菌保菌率の高さが示された。日本においてセファロスポリン系薬剤は肉用鶏の飼育には使用されないため、薬剤の選択圧により発生するとは

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

*: 東部健康福祉センター

表1 糞便検体の採取日および飼料の種類

検体採取日(日齢)	11/4(1), 11/12(9), 11/24(21)	12/7(35), 12/14(42)	12/21(49)
区分	1~21日齢	22~42日齢	43~49日齢(出荷)
有薬区	特注の前期飼料(抗菌剤入り)*	全農の後期飼料(抗菌剤入り)**	全農の仕上げ飼料
無薬区	特注の前期飼料(抗菌剤なし)	全農の仕上げ飼料	

*特注の前期飼料…サリノマイシン 50 ppm、エンラマイシン 7 ppm含有

**全農の後期飼料…サリノマイシンナトリウム 50 gカ価/t、亜鉛バシトラシン 40万単位/t、硫酸コリスチン 5 gカ価/t 含有

考えにくい。肉用鶏におけるESBL産生菌発生機序を解明するため、本研究では、一農場において経時的に、1日齢から49日齢で出荷されるまでの肉用鶏糞便からのESBL産生菌の検出および菌数測定を行った。さらに実験室内で飼育した肉用鶏糞便からのESBL産生菌の検出も試みた。

材料および方法

1 農場の飼育状況および実験区

調査対象は県内の一農場で飼育されていたチャンキー種の雌で、1日齢で鶏舎へ入雛し、49日齢で出荷している。鶏舎はオールイン・オールアウト方式で洗浄、消毒が行われており、上水道の水が給水されている。糞便の採取は、入雛日を1日齢として49日齢で出荷されるまで合計6回行った。一つの鶏舎に抗菌剤含有飼料摂取区域(有薬区)および非含有飼料摂取区域(無薬区)を設置し、有薬区では疾病予防や成長促進を目的とした養鶏で一般的な抗菌剤を添加した飼料を給与した。無薬区では、49日齢まで一切抗菌剤を与えなかった。1区は4羽×4群とした(表1)。

2 菌分離および菌数測定

2009年11月~12月に第1節で示した実験区の糞便を各群から採取し、混合したものから1gを計量し菌数測定に用いた。糞便1gをPBS(-)で10倍乳剤にし、10倍段階希釈を行い、1μg/mLセフトキシム(CTX)含有クロモカルトコリフォーム寒天培地ES、薬剤無添加の同培地およびクロモアガーESBLに各段階2枚ずつ、1平板あたり100μL接種して37°C、24時間培養後、菌数を測定した。

また、大腸菌は1平板あたり1μg/mLCTX含有クロモカルトコリフォーム寒天培地ESでは4~9集落を釣菌した。

クロモアガーESBLでは4集落を分離し、クロモカルトコリフォーム寒天培地ESに塗抹し大腸菌であることを確認した後、両方の培地から分離した菌株についてPCR法によりESBL遺伝子の検出を試みた。計数された大腸菌数にESBL遺伝子陽性率を乗じてESBL産生大腸菌数を推定した。また、大腸菌以外の腸内細菌科と疑われる集落も各種代表的なものを釣菌し、市販の同定キットによる同定および生化学的性状試験を行い、保菌状況を確認した。

3 PCR法によるβラクタマーゼ遺伝子の検出

Lalら¹⁾、Fangら²⁾、Woodfordら³⁾およびKojimaら⁴⁾のプライマーを用いて、基質特異性拡張型を含む6種類のβラクタマーゼ(CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, SHV, TEM, CMY-2)をコードするβラクタマーゼ遺伝子(*bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY-2})の検出を行った。これらの遺伝子の検出には、multiplex PCR法を用いた。

4 ESBL産生確認試験

ESBL産生菌は、元来ペニシリン系薬剤を分解していたβラクタマーゼが変異して基質特異性を拡張し、第3世代セフェム系のCTXやセフトジジム(CAZ)までも分解することができるようになった酵素を産生する菌で、第3世代セフェム系薬剤に対するMICが2μg/mL以上を示し、βラクタマーゼ阻害剤であるクラブラン酸(CVA)により産生酵素の作用が阻害されることが特徴であることから、PCR法によりESBL遺伝子が検出された株について、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)の方法に従ってESBL産生菌の確認試験を行った。

5 実験室における肉用鶏の飼育

環境衛生科学研究所5階のモルモット・ウサギ室および

感染動物室 (A) で、2010 年 6 月～8 月に県内の一農場と同じロットのチャンキー種について飼育実験を行った。ヒナはふ卵場で農場へ配送されるものと当所へ配送されるものに分けた。

各試験区羽を 3 羽ずつに分け、飼料は、前期飼料にサリノマイシン 50 ppm, エンラマイシン 7 ppm を添加したもの、後期飼料にサリノマイシンナトリウム 50 g 力価/t, ゲンタマイシン 5 g 力価/t, 硫酸コリスチン 5 g 力価/t を添加したものを、仕上げ飼料には後期飼料から抗菌剤を除いたものを用いた。

動物性飼料成分の影響について調べるため、これらの飼料について、牛脂、魚粉を通常量配合したものと、牛脂を除いたもの、魚粉を除いたもの、牛脂および魚粉を除いたものの合計 4 種類の飼料を用いて飼育し、各試験区 (合計 4 区) のヒナから糞便を採取し、第 2 節に示した培地に塗抹、培養して ESBL 産生菌の保菌状況を調べた。また、同時に同じロットのヒナの一農場における保菌状況も調べた。

結果および考察

1 農場の実験区の検体からの菌分離状況

有薬区、無薬区の両区とも、1 日齢のヒナの糞便の直接塗抹から ESBL 産生菌は検出されなかった。CTX 感受性の大腸菌は搬入前のダンボールケースに付着した糞便および搬入後に飼料は給与されていないが飲水したヒナの糞便からも検出された。9～49 日齢の合計 5 回の検体採取では、両区とも、ヒナの糞便の直接塗抹からは $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ CTX 含有クロモカルト コリフォーム寒天培地 ES およびクロモアガー-ESBL の両培地に大腸菌の旺盛な発育が認められた。また、大腸菌以外には、*Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp., *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* などが分離された。このうち *Enterobacter cloacae*, *Salmonella* spp. は $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ CTX 含有クロモカルト コリフォーム寒天培地 ES でも確認されたが、大腸菌以外の菌については薬剤無添加の同培地でより多く分離された。

また、1 日齢のヒナの糞便から、CTX 感受性の大腸菌が検出され、CTX を添加していない培地から、CTX 感受性の大腸菌や腸内細菌科の細菌が分離されたため、1 日齢から 49 日齢の期間におけるセファロスポリン系薬剤の選択圧の存在の可能性は低いと考えられた。クロモアガー-ESBL からは、*Enterobacter cloacae* がメタリックブルー、*Pseudomonas putida* が白色のコロニーとして認められたが、ESBL 産生大腸菌以外の夾雑菌は少なく、大腸菌の赤色のコロニーは他のコロニーと明確に区別できた。

2 検出された β ラクタマーゼ遺伝子型

β ラクタマーゼ遺伝子のうち、*bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{TEM} および *bla*_{OXY-2} が検出された。クロモアガー-ESBL から分離された大腸菌は全て ESBL 遺伝子 (*bla*_{CTX-M-1} および *bla*_{CTX-M-2} の単独または同時保有) が検出され、ESBL 産生大腸菌の分離に有効と考えられた。分離培地別に推定されたヒナ糞便中の ESBL 産生大腸菌数を図 1 に示した。1 日齢では検出されなかった ESBL 産生菌が、9 日齢のヒナの糞便からは、有薬区では 10^6 オーダー、無薬区では 10^8 オーダーの菌数が検出され、その後も 49 日齢の出荷日まで有薬区では 10^7 オーダー、無薬区では 10^6 オーダーの菌数が維持されていた。

これらの結果から、抗菌剤の投与の有無に関わらず、肉用鶏が 9 日齢から出荷まで、ESBL 産生大腸菌を高い菌数で保菌し、薬剤の選択圧がない所でも容易に増殖する性質を示していることが確認された。

3 ESBL 産生確認試験結果

35 日齢のヒナから分離された株で PCR 法により遺伝子の検出を行った 11 株についてディスク法による ESBL 産生確認試験を行ったところ、*bla*_{CTX-M-1} および *bla*_{CTX-M-2} が検出された株は全て陽性と判定された。他の日齢でも代表株について ESBL 産生確認試験を行い、ESBL 遺伝子が検出された株は全て陽性と判定された。

4 実験室で飼育された肉用鶏からの ESBL 産生菌分離状況

当所の実験室で飼育したヒナからは 1～5 日齢、21 日齢、42 日齢、48 日齢で検体採取したところ、薬剤感受性の大腸菌は 2 日齢から 48 日齢まで検出されたが、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ CTX 含有クロモカルト コリフォーム寒天培地 ES およびクロモアガー-ESBL に発育する大腸菌は 48 日齢まで 4 試験区に全く見られなかった。このことから、実験室での飼育では、飼料に抗菌剤を添加しても、ESBL 産生菌が発生せず、動物性飼料成分の有無による影響もないことがわかった。

一方、一農場で飼育されたヒナからは、1 日齢から少数ではあるが ESBL 産生大腸菌が検出され、2 日齢では、クロモアガー-ESBL 培地上の菌数から 8.65×10^4 CFU/g に増加したと推測された。その後、21 日齢では 3.00×10^6 CFU/g となり、42 日齢で 2.90×10^5 CFU/g、48 日齢で 1.30×10^3 CFU/g 検出された。これらの結果から、ESBL 産生菌は、入雛直後は検出されないか、もしくは検出されても少数であるが、その後糞便中の菌数は増加し、出荷まで保菌されていることが確認された。これらのことから、鶏舎には ESBL 産生菌が入雛前から潜在していることが示唆され、

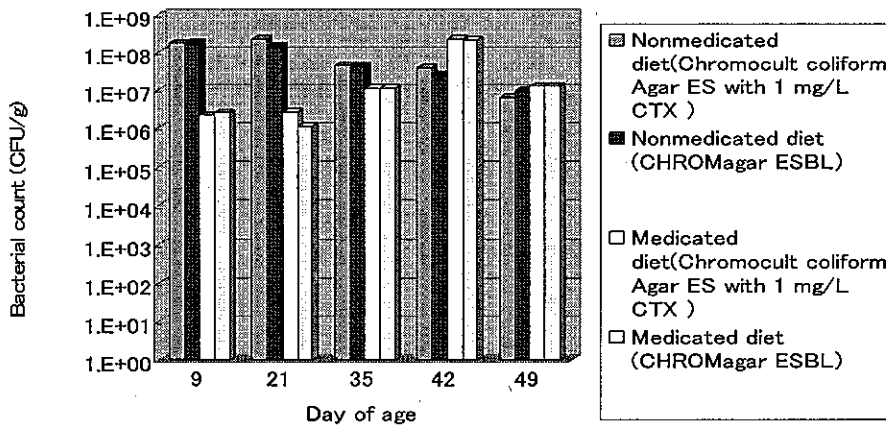


図1 ヒナ糞便中の ESBL 産生大腸菌数
CFU/g, CFU per gram of feces.

農場環境における ESBL 産生菌の汚染が ESBL 産生菌の発生に関与している可能性も考えられた。

また, Smet らは, 鶏の保菌する ESBL 産生菌は CTX の選択圧が存在しなくても増殖できると報告しており⁵⁾, 今回も同様の結果が得られた。このことは, 公衆衛生上注視すべきことと考えられる。

しかし, 実験室内飼育鶏からは CTX に対して感受性の ESBL 産生菌しか検出されなかったことから, 何らかの対策により, ESBL 産生菌の発生を防止できる可能性があると考えられた。また, 村瀬の報告⁶⁾によると, プロイラーの発育段階において, 抗菌剤未使用群では遺伝的に近縁とされた大腸菌株が発育段階を通じて分離されたが, 抗菌剤使用農場では, 耐性パターンの異なる菌株が分離され, Rプラスミドのような可動性因子が耐性パターンの差異に起因した可能性が示唆されている。今回の調査で分離した株からも PFGE 法などにより, 新たな情報が得られる可能性があるため, ESBL 産生菌とともに, CTX 感受性の ESBL 産生菌も加えて分析を進めていきたい。さらに, 農場環境の調査も行い, ESBL 産生菌の発生原因の一端を明らかにしていきたい。

文 献

- 1) Lal, P. et al.: Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. isolated from a tertiary care hospital. *Indian J. Med. Res.*, **125**, 173-178 (2007).
- 2) Fang, H. et al.: Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* isolates producing extended spectrum β -lactamases for identification of nosocomial outbreaks in Stockholm, Sweden. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5917-5920 (2004).
- 3) Woodford, N. et al.: Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 154-155 (2006).
- 4) Kojima, A. et al.: Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: Report from the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, (3533-3537) (2005).
- 5) Smet, A. et al.: In situ ESBL conjugation from avian to human *Escherichia coli* during cefotaxime administration. *J. Appl. Microbiol.*, **110**, 541-549 (2011).
- 6) 村瀬敏之: 鶏由来大腸菌における薬剤耐性の疫学, 動物用抗菌剤研究会報, **32**, 32-42 (2010)

静岡県におけるオセルタミビル耐性インフルエンザウイルスの 出現状況に関する調査研究

—H275Y 耐性マーカー検査と薬剤感受性試験の比較—

微生物部 ウイルス班 山田俊博, 湊 千壽, 長岡宏美,
川森文彦, 杉山寛治

Research on Oseltamivir-resistant Influenza in Shizuoka Prefecture
- Comparative Studies of H275Y Mutation Test between Chemical Sensitivity Test -

Toshihiro YAMADA, Chihiro MINATO, Hiromi NAGAOKA,
Fumihiko KAWAMORI and Kanji SUGIYAMA

静岡県で分離されたインフルエンザウイルス株について、オセルタミビルの H275Y 耐性マーカー検査と薬剤感受性試験により、本県における耐性インフルエンザウイルスの出現状況に関する調査研究を行った。インフルエンザ (H1N1) 2009 型において、H275Y 耐性マーカー検査が耐性であった 2 株は、薬剤感受性試験で感受性レファレンス株に比べ 107.7 倍と 212.6 倍の IC_{50} ratio を示し、本剤に対する感受性が著しく低下していた。また、H275Y 耐性マーカー検査が混合型であった 2 株のうちの 1 株は、感受性レファレンス株に比べ 38.2 倍の IC_{50} ratio を示し、本剤に対する感受性が低下していることが確認された。しかし、これらオセルタミビルに対し感受性が低下していた 3 株は、どれも散発的な発生であり耐性株の流行は認められなかった。今回の調査研究から、オセルタミビルのリアルタイム RT-PCR 法による H275Y 耐性マーカー検査と薬剤感受性試験を比較することにより、同マーカー検査の有用性と薬剤感受性を数値的に把握することの重要性が確認された。

Key words: インフルエンザ (H1N1) 2009, オセルタミビル, H275Y, 薬剤感受性試験
Influenza (H1N1) 2009, Oseltamivir, H275Y, chemical sensitivity test

はじめに

インフルエンザウイルスは、直径 80~120nm のエンベロープをもつ球状のウイルスであり、ウイルス粒子の内部蛋白である核蛋白 (NP) および膜蛋白 (M1) の抗原性の違いから A 型、B 型および C 型に分類される。A 型と B 型ウイルスの表面には、赤血球凝集素 (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の 2 種類の糖タンパクがスパイク状に形成されているが、C 型ウイルスには NA スパイクは存在しない¹⁾。2009 年に発生したブタ由来の A 型ウイルスは、これまでの季節性 A/H1N1 と同じ亜型ではあるが抗原性

は異なっており^{2,3)}、新型インフルエンザウイルス A/H1N1pdm に分類された (厚生労働省は、2011 年 4 月 1 日以降の新型インフルエンザ A/H1N1pdm の感染症法の位置付けを通常季節性インフルエンザと同じ扱いとし、名称も「インフルエンザ (H1N1) 2009」に変更した⁴⁾。したがって本文では、以降、この名称を用い、A/H1N1-2009 と略す)。

WHO では、A/H1N1-2009 の治療薬として NA 阻害剤であるオセルタミビルおよびザナミビルを推奨している⁵⁾。これら NA 阻害剤はウイルスが感染細胞からエンベロープを形成して出てくるのを抑制し封じ込める働きがある⁶⁾。A/H1N1-2009 株のほとんどは両薬剤に対して感受性であるが⁷⁾、散発的に、NA に特徴的なアミノ酸置換 (H275Y) をもつオセルタミビル耐性株が検出されている⁵⁻⁷⁾。日本は世界最大のオセルタミビル使用国であることから⁸⁾、

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

オセルタミビル耐性株が流行の主流になれば、医療機関における治療方針の見直しが必要となる。したがって、国内における薬剤耐性株の発生状況を迅速に把握し、自治体および医療機関に速やかに情報提供することは公衆衛生上極めて重要であると考えられる。

今回我々は、本県で分離されたインフルエンザ株について、オセルタミビル耐性の原因となる H275Y 耐性マーカー検査と本剤の薬剤感受性試験により、本県におけるオセルタミビル耐性インフルエンザウイルスの出現状況に関する調査研究を行った。

材料および方法

1 供試ウイルス株

検体は、2009/2010 シーズンおよび 2010/2011 シーズンに静岡県内のインフルエンザ感染症発生動向調査対象の医療機関を受診した患者と学校集団かぜ患者から得られた咽頭拭い液またはうがい液を検体として、MDCK 細胞により得られた分離株のうち、2009/2010 シーズンの A/H1N1-2009 型 11 株、2010/2011 シーズンの A/H1N1-2009 型 60 株、A/H3N2 型 5 株および B 型（ビクトリア系統）7 株を調査対象とした。

2 オセルタミビル H275Y 耐性マーカー検査

A/H1N1-2009 株について、リアルタイム One-step RT-PCR (TaqMan Probe 法) による H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出法実験プロトコール (国立感染症研究所 2010 年 11 月 ver. 1) に従い、H275Y 耐性マーカー検査を行うことにより NA 蛋白の 275 番目のアミノ酸変異を検出し、275H (感受性)、275Y (耐性) または 275H/Y (混合) を判定した。ウイルス株からの RNA 抽出は、キアゲン社の QIAamp Viral RNA Mini を用い、リアルタイム One-Step RT-PCR は、キアゲン社の QuantiTect Virus+Rox Vial kit およびアプライドバイオシステムズ社のリアルタイム

PCR システム 7500 を用いた。

3 オセルタミビル薬剤感受性試験

供試株について、アプライドバイオシステムズ社の NA-Star ノイラミニダーゼ阻害剤耐性インフルエンザ検出キットおよびプロメガ社の GloMax 96 Macroplate Luminometer を用いて、オセルタミビル薬剤感受性試験を行った。はじめに、各ウイルス株の NA 活性を測定し一定の NA 価 (noise ratio= 40:1) になるようにウイルス培養上清を希釈し、NA 阻害剤の希釈系列 (1000-0.03 nM) とインキュベートした後、IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) 値の算出によりノイラミニダーゼ阻害 (NI) 試験を行なった。NA 阻害剤は、F. Hoffmann-La Roche 社 (スイス) から供与を受けた活性型のオセルタミビル (D-tartrate salt of Oseltamivir carboxylate) を用いた。A/H1N1-2009 株のレファレンス株として、国立感染症研究所から分与を受けた A/CHIBA/1016/2009 (感受性株) と A/CHIBA/1017/2009 (耐性株) を使用した。

結果

1 オセルタミビル H275Y 耐性マーカー検査結果

2009/2010 シーズンの重症例から分離された A/H1N1-2009 型 11 株は、H275Y 耐性マーカー検査においてオセルタミビル感受性 (275H) が 9 株、混合 (275H/Y) が 1 株、耐性 (275Y) が 1 株であった (表 1)。2010/2011 シーズンに分離された A/H1N1-2009 型 60 株は、H275Y 耐性マーカー検査で感受性が 58 株、混合が 1 株、耐性が 1 株であった (表 2)。

2 オセルタミビル薬剤感受性試験結果

2009/2010 シーズンの重症例から分離された A/H1N1-2009 型 11 株は、オセルタミビル薬剤感受性試験において IC₅₀ 値は、感受性株が 0.61~1.28 nM、混合株が 32.62 nM、耐性株が 92.11 nM であった (表 1)。2010/2011

表 1 2009/2010 シーズンの重症例からの A/H1N1-2009 型分離株におけるオセルタミビル耐性検出結果

No.	ウイルス株名 (H1N1-2009)	H275Y Real-time RT-PCR	薬剤感受性試験			保健所	性別	年齢	症状
			NA活性	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ ratio (sample/reference)				
1	shizuoka1666/2009	275H(感受性)	32	0.61	0.7	西部	M	7	肺炎
2	shizuoka24/2010	275H(")	256	0.70	0.8	富士	M	8	肺炎
3	shizuoka1634/2009	275H(")	256	0.72	0.8	富士	M	11	意識障害
4	shizuoka1574/2009	275H(")	128	0.75	0.9	富士	M	6	肺炎
5	shizuoka1578/2009	275H(")	>256	0.75	0.9	西部	F	68	肺炎
6	shizuoka1630/2009	275H(")	>256	0.77	0.9	富士	M	6	肺炎
7	shizuoka1501/2009	275H(")	128	1.02	1.2	東部	M	6	肺炎
8	shizuoka1510/2009	275H(")	64	1.18	1.4	東部	F	10	意識障害
9	shizuoka1516/2009	275H(")	128	1.28	1.5	東部	F	13	意識障害
10	shizuoka1573/2009	275H/Y(混合)	32	32.62	38.2	西部	M	2	肺炎
11	shizuoka1380/2009	275Y(耐性)	32	92.11	107.7	富士	F	42	肺炎

表2 2010/2011シーズンのA/H1N1-2009型分離株におけるオセルタミビル耐性検出結果

No.	ウイルス株名 (H1N1-2009)	H275Y Real-time RT-PCR	薬剤感受性試験			保健所	性別	年齢	症状
			NA活性	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ ratio (sample/reference)				
1	shizuoka16/2011	275H(感受性)	256	0.47	0.5	中部	M	5	肺炎
2	shizuoka15/2011	275H(")	256	0.53	0.6	西部	M	20	上気道炎
3	shizuoka24/2011	275H(")	64	0.54	0.6	西部	M	8M	発熱のみ
4	shizuoka25/2011	275H(")	256	0.58	0.7	西部	F	62	発熱のみ
5	shizuoka3/2011	275H(")	128	0.67	0.8	西部	M	20	発熱のみ
6	shizuoka4/2011	275H(")	256	0.68	0.8	西部	M	28	頭痛
7	shizuoka10/2011	275H(")	256	0.69	0.8	西部	M	36	気管支炎
8	shizuoka32/2011	275H(")	128	0.74	0.9	西部	F	72	発熱のみ
9	shizuoka35/2011	275H(")	128	0.78	0.9	西部	M	38	発熱のみ
10	shizuoka8/2011	275H(")	128	0.82	1.0	西部	F	34	発熱のみ
11	shizuoka2/2011	275H(")	64	0.84	1.0	西部	M	32	頭痛
12	shizuoka22/2011	275H(")	128	0.85	1.0	中部	F	14	発熱のみ
13	shizuoka7/2011	275H(")	128	0.87	1.0	西部	F	32	上気道炎
14	shizuoka31/2011	275H(")	256	0.90	1.1	西部	F	83	気管支炎
15	shizuoka27/2011	275H(")	128	0.91	1.1	西部	F	30	発熱のみ
16	shizuoka21/2011	275H(")	128	0.91	1.1	中部	M	1	熱性痙攣
17	shizuoka6/2011	275H(")	256	0.92	1.1	西部	F	15	上気道炎
18	shizuoka K2/2011	275H(")	64	0.95	1.1	富士	F	8	上気道炎
19	shizuoka33/2011	275H(")	128	0.97	1.1	東部	F	6	脳症
20	shizuoka1/2011	275H(")	256	0.98	1.1	西部	F	52	上気道炎
21	shizuoka29/2011	275H(")	128	0.99	1.2	西部	F	30	上気道炎
22	shizuoka K1/2011	275H(")	128	1.03	1.2	富士	M	7	上気道炎
23	shizuoka30/2011	275H(")	256	1.09	1.3	西部	M	16	発熱のみ
24	shizuoka5/2011	275H(")	128	1.09	1.3	西部	F	22	頭痛
25	shizuoka23/2011	275H(")	64	1.10	1.3	中部	F	13	発熱のみ
26	shizuoka28/2011	275H(")	64	1.12	1.3	西部	M	3	発熱のみ
27	shizuoka14/2011	275H(")	64	1.15	1.3	東部	F	9	発熱のみ
28	shizuoka36/2011	275H(")	128	1.16	1.4	西部	M	25	発熱のみ
29	shizuoka11/2011	275H(")	128	1.18	1.4	西部	F	12	発熱のみ
30	shizuoka9/2011	275H(")	128	1.21	1.4	西部	M	20	上気道炎
31	shizuoka13/2011	275H(")	128	1.26	1.5	中部	M	7	発熱のみ
32	shizuoka19/2011	275H(")	64	1.27	1.5	富士	M	7	発熱のみ
33	shizuoka34/2011	275H(")	>256	1.28	1.5	西部	F	2	発熱のみ
34	shizuoka18/2011	275H(")	64	1.41	1.6	富士	M	7	発熱のみ
35	shizuoka12/2011	275H(")	32	1.49	1.7	西部	M	25	発熱のみ
36	shizuoka20/2011	275H/Y(混合)	64	4.37	5.1	御殿場	F	4	上気道炎
37	shizuoka37/2011	275Y(耐性)	64	181.79	212.6	西部	M	1	気管支炎

No.38~60についてはH275Y Real-time RT-PCR法のみ実施し、全て275H(感受性)であった。

シーズンに分離されたA/H1N1-2009型60株のうち37株について、同薬剤感受性試験を行ったところIC₅₀値は、感受性株が0.47~1.49 nM、混合株が4.37 nM、耐性株が181.79 nMであった(表2)。

A/H1N1-2009株においてH275Y耐性マーカー検査で感受性と耐性の混合が検出された2株は、感受性レファレンス株(0.86±0.20 nM)に比し38.2倍と5.1倍の

IC₅₀ratioを示した(表1,2)。また、H275Y耐性マーカー検査で耐性が検出された2株は、感受性レファレンス株に比し107.7倍と212.6倍のIC₅₀ratioを示した(表1,2)。

なお、2010/2011シーズンに分離されたA/H3N2型5株およびB型(ビクトリア系統)7株のオセルタミビル薬剤感受性試験では、それぞれ0.56~2.80 nM、0.94~3.68 nMであった(表3)。

表3 2010/2011 シーズンの A/H3N2 型と B 型(ビクトリア系統)分離株のオセルタミビル耐性検出結果

ウイルス型	No.	ウイルス株名	薬剤感受性試験		保健所	性別	年齢	症状
			NA活性	IC ₅₀ (nM)				
A/H3N2	1	shizuoka28/2010	32	0.56	西部	M	4	発熱のみ
	2	shizuoka29/2010	64	0.66	西部	M	4	上気道炎
	3	shizuoka33/2010	256	1.24	西部	M	26	上気道炎
	4	shizuoka26/2011	128	1.43	御殿場	M	5	上気道炎
	5	shizuoka44/2011	32	2.80	西部	F	76	頭痛
B型	1	shizuoka41/2011	>256	0.94	西部	F	4	発熱
	2	shizuoka40/2011	>256	1.05	西部	M	20	発熱
	3	shizuoka39/2011	>256	1.32	西部	M	4	気管支炎
	4	shizuoka43/2011	>256	1.37	西部	M	12	上気道炎
	5	shizuoka38/2011	>256	1.63	西部	M	7	発熱
	6	shizuoka42/2011	>256	1.70	西部	M	6	上気道炎
	7	shizuoka27/2010	>256	3.68	東部	M	7	肺炎

考 察

今回の我々の調査研究は、地方衛生研究所で通常行われている抗インフルエンザウイルス薬の感受性調査であるオセルタミビルの H275Y 耐性マーカー検査の結果と本剤の IC₅₀ 測定による薬剤感受性試験の結果を比較検討し、より精度の高いオセルタミビル耐性インフルエンザウイルスの出現状況の把握を目指した。

2009/2010 シーズンの厚生労働省の薬剤感受性サーベイランス調査では、インフルエンザウイルスの N1NA 遺伝子の H275Y をシークエンシングによる塩基配列決定法が行なわれた。当所においても A/H1N1-2009 型の 73 株において、N1NA 遺伝子のシークエンシングを行い 1 例のオセルタミビル耐性株を検出した。しかし、シークエンシングによる検出の欠点として、感受性と耐性の混合型を捉えにくいことが上げられ、2010/2011 シーズンからはリアルタイム RT-PCR 法による H275Y 耐性マーカー検査が採用された。当所においても、この新しい H275Y 耐性マーカー検査を用いることによって、シークエンシングでは検出できなかった 275H/Y の混合型を、A/H1N1-2009 株の 2009/2010 シーズン、2010/2011 シーズンでそれぞれ 1 株ずつ検出することが出来た。この 2 株のオセルタミビル薬剤感受性試験の結果では、2009/2010 シーズンの 1 株が感受性レファレンス株に比べ 38.2 倍の IC₅₀ ratio を示し、オセルタミビルに対する感受性が低下していることが確認された。この症例のオセルタミビル服薬状況について調査を行ったところ、コンプライアンスは良く 5 日間は完了したが症状は良くならず二次性の肺炎と診断された症例であり、本剤に対して耐性であったことが推測された。

次に、H275Y 耐性マーカー検査で耐性と判定された 2009/2010 と 2010/2011 シーズンのそれぞれ 1 株は、感

受性レファレンス株に比べ 107.7 倍と 212.6 倍の IC₅₀ ratio を示し、オセルタミビルに対する感受性が著しく低下していた。2009/2010 シーズンの 1 例は、タミフル服用後も肺炎が悪化した死亡例で、本剤に対して強い耐性があったことが考えられた。2010/2011 シーズンの 1 例は、タミフル未服用で対症療法のみで軽快した症例であり、耐性株の感染も考えられた。しかし、これらオセルタミビルに対し感受性が低下していた 3 例は、どれも散發的な発生であり耐性株の流行は認められなかった。

また、H275Y 耐性マーカー検査で感受性を示した A/H1N1-2009 型の 44 株は、全て低い IC₅₀ 値を示した。したがって、H275Y 耐性マーカー検査で感受性と判定された場合は、薬剤感受性試験による確認は必要ないものと考えられた。さらに、2010/2011 シーズンの A/H3N2 型 5 株および B 型 (ビクトリア系統) 7 株におけるオセルタミビル薬剤感受性試験では、それぞれの型の感受性レファレンス株との比較は出来なかったが、IC₅₀ 値から本剤に対し感受性が明らかに低下している株はないものと考えられた。

今回の調査研究から、オセルタミビルのリアルタイム RT-PCR 法による H275Y 耐性マーカー検査と薬剤感受性試験を比較することにより、同マーカーの有用性と、薬剤感受性を数値的に把握することの重要性が確認された。また、2010/2011 シーズンの静岡県での A/H1N1-2009 型におけるオセルタミビル耐性株の発生頻度は、1.67% (1/60 株) であり、耐性株の増加傾向が無いことが確認された。

さらに、オセルタミビル以外の抗インフルエンザ薬 (ザナミビル, ペラミビル, ラニナミビル) の薬剤耐性の監視については、現在、全国地方衛生研究所の分離株の一部において国立感染症研究所で実施されている。今後は当所でも、これらの薬剤耐性の調査にも対応できる測定

法を構築することが課題である。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、検出機器の使用の許可および御助言、御指導をいただきました静岡県立大学薬学部の鈴木隆教授ならびに左一八準教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 小田切孝人：インフルエンザのウイルス学，臨床と微生物，25，645-653 (1998)
- 2) Garten, RJ, et al. : Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans, *Science*, 325, 197-201(2009)
- 3) Smith, GJD, et al. : Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic, *Nature*, 459, 1122-1126 (2009)
- 4) MHLW, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou01/index.html>
- 5) WHO: Rapid Advice Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza (H1N1) 2009 and other Influenza Virus, WHO, http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_use_antivirals_200908020/en/index.html
- 6) 斎藤玲子：これからのインフルエンザ対策 薬剤耐性，臨床と微生物，37，539-547 (2010)
- 7) Nguyen, HT, et al. : Assessment of pandemic and seasonal influenza A (H1N1) virus susceptibility to neuraminidase inhibitors in three enzyme activity inhibition assays, *Antimicrob Agents Chemother*, 54(9); 3671-3677 (2010)
- 8) IASR, <http://idsc.nih.gov/iasr/rapid/pr3601.html>

静岡県中西部におけるマダニの分布状況ならびに 紅斑熱群リケッチア浸淫状況

微生物部 ウイルス班 川森文彦, 湊 千壽, 山田俊博
長岡宏美, 杉山寛治

Distribution of Ticks and Prevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae
in the Central and Western Parts of Shizuoka Prefecture

Fumihiko KAWAMORI, Chihiro MINATO, Toshihiro YAMADA,
Hiromi NAGAOKA and Kanji SUGIYAMA

静岡県中西部の63地点で4属13種, 2,076匹のマダニが採取され, 日本紅斑熱の媒介種と推定されている *Haemaphysalis flava*, *H. longicornis*, *Ixodes ovatus* などが優勢種であった。県東部で採取された *H. formosensis* が今回は採取されず, 県東部でみられなかった *H. japonica* が県中部で1匹確認された。マダニ464匹(11種)中89匹(19.2%)から紅斑熱群リケッチア(SFGR)の *gltA* 遺伝子がPCRにより検出された。PCR増幅産物についてRFLP解析を行ったところ7タイプに分類され, *I. ovatus* 2検体が *Rickettsia japonica* と同タイプとなった。また, マダニ350匹(10種)について培養細胞(L929, MEG-01)による分離を試みたところ, *I. ovatus* 6検体から *R. asiatica* が, *Amblyomma testudinarium* 6検体から *R. tamurae* が分離された。野ネズミ12頭からSFGRは検出されなかったが, 抗体検査を実施したアカネズミ10頭全頭から *R. japonica* に対する抗体が確認された。今回の調査により, 静岡県中西部に多様なSFGRが存在していることが明らかとなった。

Key words: 紅斑熱, リケッチア, マダニ, 野ネズミ
spotted fever, rickettsiae, tick, wild rodent

はじめに

日本紅斑熱(病原体: *Rickettsia japonica*)は, 1984年に馬原¹¹⁾により初めて報告されたマダニ媒介性の発疹を伴う熱性疾患であり, 四国や九州南部など温暖な地域で多発する傾向がみられ, 2008年以降, 全国で毎年100症例以上報告されている⁷⁾。本感染症は, 治療が遅れると重症化しやすく, これまでに死亡例も6例確認されている⁷⁾。また, 近年, *R. japonica* 以外の紅斑熱群リケッチア(spotted fever group rickettsiae; 以下SFGR)による紅斑熱患者の発生が相次いでおり, 2004年には *R. helvetica* による症例¹³⁾が福井県で, 2008年には *R. heilongjiangensis* による症例¹⁾が仙台

市で確認されている。静岡県では2000年に県東部で日本紅斑熱が1症例報告されていることから⁶⁾, 2008年から2009年にかけて県東部においてマダニおよび野ネズミを対象とした疫学調査を実施し, その研究成果を昨年度の当研究所報告に掲載した¹⁰⁾。今回は, 引き続き実施した静岡県中部から西部にかけての疫学調査結果を報告する。

材料および方法

1 マダニの採取調査

2009年4月から2010年6月にかけて, 静岡県中部29地点(標高30m~1,560m), 静岡県西部34地点(標高5m~1,260m), 合計63地点においてフラッキング法によりマダニ採取を実施した。採取したマダニを実体顕微鏡下で観察し, 形態的な特徴を基に同定を行った^{2, 14)}。

2 野ネズミの捕獲調査

2010年9月から11月にかけて県中部の4地点および県

表 1 静岡県中西部におけるマダニ採取状況

マダニの種類	成虫		若虫	幼虫	計 (%)
	♀	♂			
<i>H. flava</i>	185	157	801		1,143 (55.1)
<i>H. longicornis</i>	6	1	577		584 (28.1)
<i>H. megaspinosa</i>	3	4	56		63 (3.0)
<i>H. kitaokai</i>	27	27			54 (2.6)
<i>H. hystricis</i>		1			1 (0.05)
<i>H. japonica</i>			1		1 (0.05)
<i>I. ovatus</i>	108	71			179 (8.6)
<i>I. turdus</i>	2		10		12 (0.6)
<i>I. monospinosus</i>	5				5 (0.2)
<i>I. nipponensis</i>		3	1		4 (0.2)
<i>I. persulcatus</i>			1		1 (0.05)
<i>A. testudinarium</i>		2	25	1	28 (1.3)
<i>D. taiwanensis</i>	1				1 (0.05)
計	337	266	1472	1	2,076

西部の 14 地点においてシャーメントラップ (30~40 トラップ / 調査地) による野ネズミの捕獲を実施した。餌としてサツマイモと魚肉ソーセージを用い、一晩設置し、翌朝回収する方法で行った。

3 野ネズミからの PCR による SFGR 検出および抗 *R. japonica* 抗体の測定

既法¹⁰⁾に従い野ネズミにおける SFGR 検出および抗体価測定を実施した。すなわち、血液および脾臓から QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用い DNA 抽出を行い、SFGR の 17-kDa 蛋白質をコードする遺伝子を対象とした片山ら⁸⁾の PCR 法により SFGR の検出を試みた。また、生体で捕獲された野ネズミについては *R. japonica* に対する抗体価を間接蛍光抗体法により測定した⁹⁾。

4 マダニからの PCR による SFGR 検出および PCR-RFLP によるタイピング

実体顕微鏡下でマダニの唾液腺を摘出し、QIAamp DNA Mini Kit を用い、DNA の抽出を行ったものを PCR 用のテンプレートとした。PCR による *gltA* 遺伝子の検出と RFLP による PCR 増幅産物のタイピングは、既報¹⁰⁾に従い実施した。

5 マダニからの SFGR の分離

マダニから無菌的に取り出した唾液腺を分離材料とした。L929 細胞による分離および分離株の同定は、既報¹⁰⁾と同様の方法で実施した。なお、今回は、MEG-01 細胞 (培地: 牛胎児血清 10% 加 RPMI1640) による分離も併行して行った。

結 果

1 マダニ採取状況

表 2 地域別マダニ採取状況

マダニの種類	各地域で採取されたマダニ数 (%)		
	東部	中部	西部
<i>H. flava</i>	932 (42.3)	314 (51.8)	829 (56.4)
<i>H. longicornis</i>	541 (24.6)	142 (23.4)	442 (30.1)
<i>H. megaspinosa</i>	104 (4.7)	19 (3.1)	44 (3.0)
<i>H. kitaokai</i>	142 (6.4)	30 (5.0)	24 (1.6)
<i>H. hystricis</i>	28 (1.3)	0	1 (0.1)
<i>H. japonica</i>	0	1 (0.2)	0
<i>H. formosensis</i>	111 (5.0)	0	0
<i>I. ovatus</i>	164 (7.4)	86 (14.2)	93 (6.3)
<i>I. turdus</i>	91 (4.1)	1 (0.2)	11 (0.7)
<i>I. monospinosus</i>	2 (0.1)	5 (0.8)	0
<i>I. nipponensis</i>	1 (0.05)	0	4 (0.3)
<i>I. persulcatus</i>	47 (2.1)	1 (0.2)	0
<i>A. testudinarium</i>	35 (1.6)	7 (1.2)	21 (1.4)
<i>D. taiwanensis</i>	4 (0.2)	0	1 (0.1)
計	2,202	606	1,470

4 属 13 種、2,076 匹のマダニが採取された (表 1)。*Haemaphysalis flava* (1,143 匹)、*H. longicornis* (584 匹)、*Ixodes ovatus* (179 匹) などが優勢種であり、これらの種類はいずれも分布域は広がった。成虫と若虫の両方が採取された種類が多かったが、*I. ovatus* と *H. kitaokai* は成虫の採取数が多いにもかかわらず、若虫はまったく採取できなかった。また、*H. hystricis*、*H. japonica*、*I. persulcatus* および *Dermacentor taiwanensis* は、各々 1 匹ずつしか採取されなかった。

今回の県中西部の採取状況と 2008~2009 年の県東部の採取状況を比較すると、*H. hystricis*、*I. turdus* および *I. persulcatus* は、県東部での採取数が県中西部に比べ顕著に多かった (表 2)。また、県東部で確認された *H. formosensis* は、県中西部では採取されなかった。逆に、県東部ではみられなかった *H. japonica* が、県中部の標高約 700m の調査地で若虫が 1 匹採取された。

2 野ネズミにおける SFGR 検出状況および抗 *R. japonica* 抗体保有状況

県中部の藤枝市と県西部の 4 市 (掛川市、磐田市、浜松市北区、湖西市) で捕獲された野ネズミ 12 頭 (アカネズミ 11、ヒメネズミ 1) について PCR で SFGR の検出を試みたが、血液、脾臓とも全頭陰性であった。捕獲時に生存していたアカネズミ 10 頭全頭で *R. japonica* に対する抗体が確認されたが、ヒメネズミ 1 頭からは抗体が検出されなかった (表 3)。県中部の藤枝市では ≥ 640 の高い抗体価を有するアカネズミが 2 頭

表3 野ネズミにおける抗 *R. japonica* 抗体保有状況

捕獲地	野ネズミ種類	性別	体重(g)	抗体価
藤枝市	アカネズミ	♂	47.4	ND*
藤枝市	アカネズミ	♀	36.5	160
藤枝市	アカネズミ	♀	31.0	80
藤枝市	アカネズミ	♀	33.6	320
藤枝市	アカネズミ	♂	47.4	≥640
藤枝市	アカネズミ	♂	39.3	160
藤枝市	アカネズミ	♂	41.6	≥640
掛川市	アカネズミ	♀	47.2	160
磐田市	アカネズミ	♂	44.8	20
浜松市北区	ヒメネズミ	♂	17.2	<20
浜松市北区	アカネズミ	♂	53.0	40
湖西市	アカネズミ	♀	37.3	160

*ND:捕獲時死亡により血清が得られず、測定を行わなかった。

確認されたが、県西部で捕獲されたアカネズミ4匹は、全頭160倍以下の抗体価にとどまった。

3 マダニにおけるPCRによるSFGR検出状況およびPCR-RFLPによるタイピング結果

マダニ464匹(11種, 66地点)についてPCRを用いてSFGRの *gltA* 遺伝子の検出を試みたところ, 89匹(19.2%)が陽性となった。なお, *H. kitaokai*, *H. hystricis*, *I. turdus* および *D. taiwanensis* の検体は, すべて陰性であった。マダニ陽性検体のPCR増幅産物を4種類の制限酵素で処理したところ, 切断パターンは7タイプに分類された(表4)。

I. ovatus は, JAPタイプ(*R. japonica*と同一切断パター

ン)とASIタイプの2種類に分かれたが, 他の6種類のマダニにおいては, いずれも単一のRFLPタイプしか認められなかった。

4 マダニからのSFGRの分離結果

マダニ350匹(10種, 56地点)について培養細胞による分離を試みたところ, *I. ovatus* 6検体(中部1, 西部5)から *R. asiatica* が, *Amblyomma testudinarium* 6検体(西部6)から *R. tamurae* が分離された(表5)。今回は, 2種類の培養細胞を使用した, *R. asiatica* 陽性例はすべてMEG-01のみで分離された。また, *R. tamurae* が分離された6検体中4検体は両方の培養細胞で分離されたが, 2検体はMEG-01のみで分離された。

考察

1989~1991年の全県を対象としたマダニ採取調査では, 2属9種, 1,720匹が採取されているが⁹⁾, 2008年から実施したマダニ採取調査(東部:2008~2009年¹⁰⁾, 中西部:2009~2010年)では, 当時採取された種類はすべて確認され, 今回新たに *H. formosensis*, *H. hystricis*, *I. turdus*, *A. testudinarium* および *D. taiwanensis* の5種類が確認された。*I. turdus* は東北から南西日本の広範囲に生息するが, 他の4種類は, いずれも主に九州, 四国など温暖な地域に生息する種類であり, 近年の温暖化の影響で, これらの南方系の種類の生息分布域の拡大あるいは生息密度の上昇が起こっている可能性が考えられる。今回の調査で採取数の多かった *H. flava*, *H. longicornis* および *I. ovatus* は, 西日本での疫学調査^{3, 8, 12)} から日本紅斑熱の媒介種と考えられている。したがって, マダニ生息状況からは, まだ患者発生

表4 マダニからのPCRによる紅斑熱群リケツチア検出状況およびPCR-RFLPによる分類

マダニの種類	検体数 (中部:西部)	PCR陽性数 (%)	PCR-RFLPにより各タイプ*に分類された検体数(中部:西部)							
			JAP	PRI	HEL	ASI	LON	TAM	MON	
<i>H. flava</i>	164 (63:101)	8 (4.9)					8 (2:6)			
<i>H. longicornis</i>	98 (35:63)	47 (48.0)						47 (13:34)		
<i>H. megaspinosa</i>	21 (12:9)	2 (9.5)					2 (1:1)			
<i>H. kitaokai</i>	28 (19:9)	0								
<i>H. hystricis</i>	1 (0:1)	0								
<i>I. ovatus</i>	113 (61:52)	15 (13.3)	2 (1:1)				13 (4:9)			
<i>I. turdus</i>	2 (0:2)	0								
<i>I. monospinosus</i>	5 (5:0)	2 (40.0)			2 (2:0)					
<i>I. nipponensis</i>	3 (0:3)	2 (66.7)								2 (0:2)
<i>A. testudinarium</i>	28 (8:20)	13 (46.4)							13 (5:8)	
<i>D. taiwanensis</i>	1 (0:1)	0								
計	464	89 (19.2)	2	10	2	13	47	13		2

*:JAP(*R. japonica*と同一パターン), PRI(*Candidatus R. principis*と同一パターン), HEL(*R. helvetica*と同一パターン), ASI(*R. asiatica*と同一パターン), LON(LON typeと同一パターン), TAM(*R. tamurae*と同一パターン), MON(*R. monacensis*と同一パターン)

表5 マダニにおける紅斑熱群リケッチア分離状況

マダニの種類	検体数	分離陽性数 (リケッチア種類)
<i>H. flava</i>	110	0
<i>H. longicornis</i>	73	0
<i>H. megaspinosa</i>	21	0
<i>H. kitaokai</i>	28	0
<i>H. hystricis</i>	1	0
<i>I. ovatus</i>	88	6 (<i>R. asiatica</i>)
<i>I. turdus</i>	2	0
<i>I. monospinosus</i>	5	0
<i>I. nipponensis</i>	1	0
<i>A. testudinarium</i>	21	6 (<i>R. tamurae</i>)
計	350	12

がみられていない県中西部においても日本紅斑熱発生リスクは高いと考えられる。

今回、野ネズミから SFGR の検出はできなかったが、生体で捕獲されたアカネズミは全頭抗 *R. japonica* 抗体を保有していた。このことから、県中西部の広い範囲で *R. japonica* あるいは本菌種と交差反応がみられる SFGR の存在が推測される。特に高抗体価保有アカネズミの割合が高かった藤枝市においては、SFGR の浸淫度が高いと思われる。

今回、PCR-RFLP 法で JAP タイプとなった検体は藤枝市と磐田市で採取された *I. ovatus* であったが、県東部で JAP タイプとなった検体あるいは *R. japonica* が分離された検体は、*H. flava*, *H. formosensis*, *A. testudinarium*, *H. hystricis* および *D. taiwanensis* であった。また、県東部では、PCR-RFLP タイプが複数にまたがるマダニ種が多かったが、今回は *I. ovatus* 以外のマダニ種はいずれも RFLP タイプが単一であった。さらに、今回は、*A. testudinarium* の 46.4% (13/28) から TAM タイプ (*R. tamurae* と同一パターン) の SFGR が検出されたが、県東部では *A. testudinarium* 23 匹から TAM タイプは確認されなかった。これらのことから、富士川以東と以西でマダニにおける SFGR 保有状況が大きく異なることが示唆された。

今回の PCR-RFLP で 7 タイプの SFGR が検出されたが、培養細胞により分離された SFGR は *R. asiatica* と *R. tamurae* の 2 種類だけであった。なお、*R. asiatica* のヒトに対する病原性は確認されていないが、*R. tamurae* については蜂窩織炎を引き起こした症例が確認されている⁴⁾。また、今回、2 種類の培養細胞を分離に用いたが、細胞種により分離率が大きく異なった。今後、これらのことを踏まえ、さらに多くの種類の SFGR を分離できる培養方法を検討していく必要があるものと思われる。

今回の調査により、静岡県中西部においても多様な紅斑熱群リケッチアが存在していることが明らかとなった。*R. japonica* が推定される SFGR は、*I. ovatus* で少数確認されただけであったが、近年、本菌以外の SFGR による紅斑熱が相次いで発生していることや県東部の調査結果も踏まえ、静岡県における紅斑熱の発生に注意していく必要があるものと思われる。

文 献

- 1) 安藤秀二他：仙台市で確認された新しい紅斑熱リケッチア症，感染症誌，83，583-584 (2009)
- 2) 藤田博己他：ダニと新興再興感染症，53-68，SADI 組織委員会，東京 (2007)
- 3) 藤田博己他：ダニと新興再興感染症，129-139，SADI 組織委員会，東京 (2007)
- 4) Imaoka, K. et al. : The first human case of *Rickettsia tamurae* infection in Japan, Case Rep. Dermatol. 3, 68-73 (2011)
- 5) 海保郁男：紅斑熱群リケッチア症診断マニュアル，2-6，国立感染症研究所レファレンス委員会，東京 (2001)
- 6) 感染研感染症情報センター：つつが虫病/日本紅斑熱 2005 年 12 月現在，病原微生物検出情報，27，27-28 (2006)
- 7) 感染研感染症情報センター：つつが虫病・日本紅斑熱 2006~2009 年，病原微生物検出情報，31，120-122 (2010)
- 8) 片山 丘他：神奈川県，島根県及び高知県で採取されたダニ類からの紅斑熱群リケッチア DNA の検出，感染症誌，75，53-54 (2001)
- 9) 川森文彦：マダニの採取・同定法および静岡県における採取状況，技術情報，10，1-4 (1992)
- 10) 川森文彦他：静岡県東部におけるマダニの分布状況ならびにマダニ，野ネズミからの紅斑熱群リケッチアの検出，静岡県環境衛生科学研究所報告，52，1-6 (2009)
- 11) 馬原文彦他：わが国初の紅斑熱リケッチア感染症，感染症誌，59，1165-72 (1985)
- 12) 馬原文彦：日本紅斑熱の発見と臨床的疫学的研究，モダンメディア，54，32-41 (2007)
- 13) Noji, Y. et al. : The first reported case of spotted fever in Fukui prefecture, the northern part of central Japan, Jpn. J. Infect. Dis., 58, 112-114 (2005)
- 14) 高田伸宏：病原ダニ類図鑑，105-132，金芳堂，京都 (1990)

栄養補助食品（サプリメント）の成分および品質等について

医薬食品部 食品班 小林千恵, 横山玲子, 高橋一則

Relating to Ingredients and Quality of Supplement

Chie KOBAYASHI, Reiko YOKOYAMA and Kazunori TAKAHASHI

県民の食生活の向上および健康増進に役立てるため、利用者が多い錠剤、カプセル形状をした栄養補助食品に着目し、マルチビタミン、ビタミン B 群主成分の栄養補助食品について、ビタミン B₆量の測定および錠剤、カプセル剤の崩壊試験等を行った。その結果、ビタミン B₆含有量は、商品の栄養成分表示等に記載されているとおりの量が含まれていた。ビタミン B₆は、過剰摂取や医薬品との相互作用により健康への影響が懸念される成分であるが、耐容上限量の少ない子供や女性が習慣的に摂取した場合、過剰摂取となる量を含む銘柄があった。また、医薬品を服用している人については、医師に相談し、自己の判断で摂取しないように注意が必要と考えられた。一方、栄養補助食品の錠剤、カプセル剤の崩壊性は、銘柄により異なり、胃の中で溶けにくく生体への吸収が懸念される銘柄があった。

栄養成分は、毎日の食事からバランスよく取り入れるようにこころがけ、栄養補助食品は食生活を補足するものとして必要な時に摂取することが望ましいと思われた。

Key words: 栄養補助食品, ピリドキシン, 耐容上限量
supplement, pyridoxine, tolerable upper intake level

はじめに

現在、消費者の健康志向は高く、栄養補助食品は、栄養補給等を目的に多くの人に利用されている。栄養補助食品は、特定の栄養成分を自己判断で手軽に摂取することが可能であるが、医薬品とは異なり、購入時に医師や薬剤師の意見を聞くことはほとんどない状況であるため、過剰摂取等による健康への影響が懸念されている。

今回、県民に栄養補助食品の摂取に関する留意点について情報提供するため、ビタミン・ミネラル含有栄養補助食品の利用状況調査結果から多くの人に飲用経験があるマルチビタミン、ビタミン B 群主成分の栄養補助食品に着目した。

そして、過剰摂取や医薬品との相互作用により健康への影響が懸念されるビタミン B₆の含有量調査および医薬品の品質評価手法である崩壊試験を行い、栄養補助食

品の品質等について検討を行った。また、小学生の子供をもつ親を対象に、子供用栄養補助食品の利用状況を調査したので併せて報告する。

試料および方法

1 試料

平成 21 年度に実施した静岡県職員を対象としたサプリメントの利用状況調査結果から、マルチビタミン、ビタミン B 群主成分の栄養補助食品の利用者が多く、ドラッグストアで購入している人が最も多いことがわかった。そこで、静岡市内のドラッグストアを中心にマルチビタミンおよびビタミン B 群主成分の栄養補助食品 11 検体、結果を比較するため、錠剤形状のビタミン B₆含有医薬品 3 検体を購入し、調査対象とした(表 1)。

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

表1 購入したサプリメントおよび医薬品

銘柄No.	サプリメントの種類	形状	購入方法
1		錠剤	ドラッグストア
2		錠剤	インターネット
3	マルチビタミン	錠剤	インターネット
4		錠剤	ドラッグストア
5		錠剤	ドラッグストア
6		錠剤(フィルムコート錠)	ドラッグストア
7		錠剤	ドラッグストア
8		錠剤	ドラッグストア
9	ビタミンB群	錠剤(フィルムコート錠)	ドラッグストア
10		錠剤	ドラッグストア
11		ハードカプセル	ドラッグストア
12		錠剤(フィルムコート錠)	ドラッグストア
13	医薬品	錠剤(糖衣錠)	ドラッグストア
14		錠剤(フィルムコート錠)	ドラッグストア

2 試薬

ピリドキシリン塩酸塩標準品 ((財)日本公定書協会),
ピリドキサール二塩酸塩 (和光純薬工業(株)), ピリド
キサミン塩酸塩(和光純薬工業(株))

その他の試薬は、特級またはそれ以上のものとした。

3 方法

1) 表示

商品に記載されている栄養成分等について調査した。

2) 栄養補助食品に含まれるビタミンB₆の分析

①試料の調製

日本薬局方の各条に記載されている定量法を参考に、
形状が錠剤のものについては、20錠をすりつぶして均一
にしたものを試料とした。また、ハードカプセルについ
ては、20カプセル中の内容物をとりだし均一にしたもの
を試料とした。

②試験溶液の調製

「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法につ
いて」(「27 ビタミンB₆」の高速液体クロマトグラフ法)
に準じた。対象化合物は、ビタミンB₆活性を有するピ
リドキシリン、ピリドキサール、ピリドキサミンとした。

①により調製した試料1.0gを精密に量り、0.05mol/L
過塩素酸40mLを加えて30分間振とう抽出後、0.05mol/L
過塩素酸で適宜希釈し、メンブランフィルター(0.45μ
m)でろ過したものをHPLC用試験溶液とした。

③HPLC測定条件

カラム: Mightysil RP-18 Aqua (4.6mm×150m, 関東
化学(株)), 移動相: 0.05mol/L 過塩素酸, カラム温度:
40°C, 流量: 1.2mL/min, 検出器: 蛍光検出器(Ex 295nm,
Em 405nm)

3) 栄養補助食品の崩壊試験

栄養補助食品には溶けやすさに関する基準等がないた
め、錠剤、カプセル剤の溶けやすさに規定がある医薬品

の試験法を参考にした。第十五改正日本薬局方「6.09 崩
壊試験法」に準じ、水に対する試験を行った。試験時間
は、崩壊試験法の規定に準じ、錠剤30分、カプセル剤
は20分、フィルムコート錠および糖衣錠60分とした。
崩壊しなかった銘柄については、第十四改正日本薬局方
で使用が認められていた補助盤を用い、同様の試験時間
で再度試験した。

4) 子供用栄養補助食品の利用状況調査

平成21年度に実施したビタミンA、βカロテン含有栄
養補助食品の調査から、子供がお菓子感覚で噛み砕いて
摂取できる栄養補助食品の過剰摂取による健康への影響
が懸念された。そのため、商品テスト実習講座(平成22
年7月~8月)に参加した小学生の子供をもつ親を対象に、
子供用栄養補助食品の利用状況調査を実施した。

結果および考察

1 表示

1) 栄養機能食品の表示

No.4~7, 9~11には、栄養機能食品である旨の表示が
されており、健康増進法の栄養表示基準に従い、当該栄
養成分の名称と機能、注意喚起表示等についての記載が
されていた。なお、No.6と9は、成分分析の対象成分で
あるビタミンB₆の栄養機能食品であった。

2) 子供に対する「使用上の注意」の記載

No.1, 4, 5には、「乳幼児・小児は、本品の摂取をさ
けてください」と記載されていた。また、No.6, 7, 9, 10
には、「小さなお子様の手の届かないところに置いてく
ださい」と記載されていた。

2 栄養補助食品に含まれるビタミンB₆の分析

栄養補助食品 (No.1~11)については、表示に記載さ
れている一日摂取目安量(一日に摂取する錠剤またはカ
プセルの個数)あたりのビタミンB₆の分析値、医薬品
(No.12~14)については、15歳以上の一日服用量(一日
に服用する錠剤の個数)あたりのビタミンB₆の分析値を
銘柄ごとにグラフに示した(図1)。

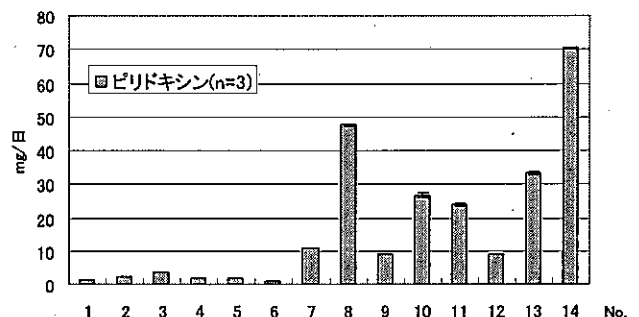


図1 1日摂取目安量あたりのビタミンB₆含有量

全ての銘柄において、ビタミン B₆はピリドキシンとして含有され、ピリドキサール、ピリドキサミンは定量下限値 (0.1 μg/mL) 未満であった。栄養補助食品のビタミン B₆含有量は、栄養成分表示に記載されておりであり、表示値との差は、健康増進法で規定されている許容範囲 (-20%~+80%)であった。また、医薬品についても商品に記載されているとおりの量が含有されていた。

マルチビタミン(No. 1~6)のビタミン B₆含有量は、1.06mg/日~3.63mg/日であったが、ビタミンB群主成分の栄養補助食品(No. 7~11)には、8.90mg/日~47.5mg/日と、マルチビタミンよりビタミン B₆を多く含み、銘柄により含有量に差が見られた。また、No. 2と3は子供用栄養補助食品であるが、ビタミン B₆含有量は、他のマルチビタミン(No. 1, 4~6)と同程度であった。

ビタミン B₆は、過剰摂取による感覚神経障害などの健康障害が報告されている^{2~4)}ことから、日本人の食事摂取基準(2010年版)では、耐容上限量(健康障害をもたらすリスクがないとみなされる習慣的な摂取量上限)が策定されている。ビタミン B₆耐容上限量は、18歳以上の場合、ピリドキシンとして男性 55~60mg/日、女性 45mg/日とされ、年齢が若くなるほど少なくなり、6~7歳の子供では男女ともに 20mg/日である。今回対象とした栄養補助食品の一日摂取目安量を摂取することにより、成人男性が耐容上限量を上回ることはないと思われる。しかし、子供については、No. 8, 10, 11, 大人であっても女性は、No. 8のように含有量の多い銘柄を摂取すると耐容上限量を上回るので、習慣的な摂取はさけるべきであると考えられた。また、子供用栄養補助食品であるNo. 2と3は、味が甘くお菓子感覚で噛み砕いて食べることができるが、子供は耐容上限量が少ないため、食べ過ぎないように注意が必要と考えられた。

平成 19 年国民健康栄養調査報告によると、国民がビタミン B₆補助食品摂取者および非摂取者ともに通常の食品からほぼ推奨量(18歳以上の場合、男性 1.4mg/日、女性 1.1mg/日)を摂取している状況が示されている。しかし、ビタミン B₆補助食品摂取者は、摂取の必要がないにもかかわらず、栄養補助食品から推奨量の約 10 倍のビタミン B₆を摂取している。このことから、毎日のバランスのよい食事から栄養成分を充足することを心がけ、栄養補助食品は、栄養の不足時に補足として上手に利用することが大切と思われた。さらに、ビタミン B₆は、レボドパ等の医薬品との相互作用に注意が必要な成分でもあるため、医薬品を服用している場合は医師に相談し、自己の判断で栄養補助食品を摂取することのないように注意することが必要だと思われた。

3 栄養補助食品の崩壊試験

第十五改正日本薬局方に準じ、補助盤を使用せずに試験したところ、錠剤 5 銘柄 (No. 1, 2, 5, 6, 10) とカプセル剤 1 銘柄 (No. 11) については崩壊しなかった。崩壊しなかった 6 銘柄について、補助盤を用いて再度試験したところ、5 銘柄は崩壊したが、錠剤 1 銘柄 (No. 10) は、崩壊しなかった (表 2)。

表 2 日本薬局方「6.09 崩壊試験法」における水に対する試験結果

銘柄No.	形状	結果	
		補助盤なし	補助盤あり
1	錠剤	×	○
2	錠剤	×	○
3	錠剤	○	-
4	錠剤	○	-
5	錠剤	×	○
6	錠剤(フィルムコート錠)	×	○
7	錠剤	○	-
8	錠剤	○	-
9	錠剤(フィルムコート錠)	○	-
10	錠剤	×	×
11	ハードカプセル	×	○
12	錠剤(フィルムコート錠)	○	-
13	錠剤(糖衣錠)	○	-
14	錠剤(フィルムコート錠)	○	-

○:規定時間内に崩壊した

×:規定時間内に崩壊しなかった

医薬品 (No. 12~14) は、フィルムコート錠および糖衣錠であったため試験時間 60 分の規定であるが、補助盤の使用がなくても 25 分以内に 3 銘柄とも速やかに崩壊した。しかし、フィルムコートされている栄養補助食品 (No. 6) は、補助盤を使用しても崩壊時間は 50 分であり、医薬品と異なり崩壊は速やかではなかった。

錠剤、カプセル剤の崩壊性は、医薬品で規定時間の半分以下の時間で速やかに崩壊したが、栄養補助食品では、銘柄により崩壊性は異なっていた。

第十五改正日本薬局方では、補助盤の使用を原則的に禁止している⁵⁾。補助盤を使用せずに崩壊した 5 銘柄は、現在求められている医薬品と同等の崩壊性があると考えられるが、補助盤を使用することで崩壊した 5 銘柄については、医薬品と比較すると崩壊性に優れていないと考えられた。さらに、第十五改正日本薬局方では、無胃酸の人の胃内での崩壊性を評価できるように試験液は水となっている⁵⁾。水における試験で補助盤を使用しても崩壊しなかった 1 銘柄 (No. 10) は、試験液を pH1.2 の崩壊試験第 1 液 (人工胃液に相当) に変更して試験したところ、補助盤を使用しても崩壊しなかった。そのため、No. 10 は胃の中での溶解やすさに問題があると考えられ、生体吸収への影響が懸念された。

4 子供用栄養補助食品の利用状況調査

小学生の子供を持つ親を対象として、子供用栄養補助食品の利用状況について調査を実施したところ、80人から回答が得られた。アンケートの結果から、子供に栄養補助食品を飲ませている（以前飲ませていた）親は、回答者の15%であった（図2）。また、その利用目的は、子供の栄養不足や偏食による栄養の偏りを心配する場が67%と多かった（図3）。

近年、インターネット等により子供用の栄養補助食品が数多く販売されている。しかし、子供で安全性を評価した栄養補助食品はほとんどないことから⁹⁾、大人と同じように考えて利用することは、決して望ましいことではないと考えられた。子供に偏食があっても、栄養補助食品を利用する前に他の食材で栄養を補うように工夫することが大切だと考えられた。

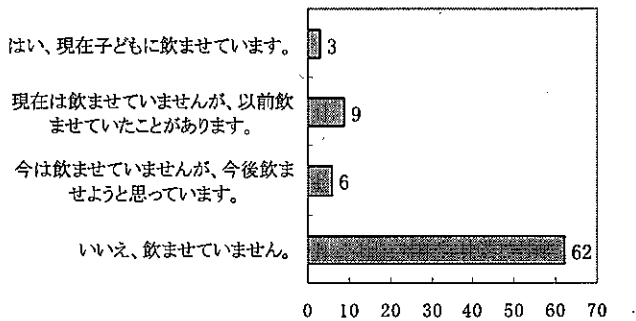


図2 親を対象とした子供用栄養補助食品の利用状況調査結果 (回答者80人)

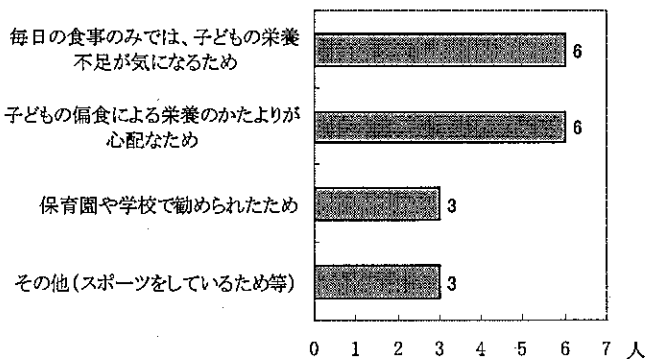


図3 子供に栄養補助食品を飲ませようと思う理由 (回答者18人)

まとめ

1 ビタミン B₆含有栄養補助食品の摂取について

- 1) 栄養補助食品に含有されるビタミン B₆は、商品に記載されているとおりの量が含まれていることがわかった。
- 2) 耐容上限量の少ない女性や子供が、ビタミン B₆含有量の多いビタミン B 群主成分の栄養補助食品を習慣的に摂取しないように注意することが必要と考えられた。
- 3) 医薬品を服用している人は、栄養補助食品に含ま

れるビタミン B₆と医薬品成分との相互作用により治療の妨げにならないように、医師に相談し自己の判断で摂取しないように注意することが大切と考えられた。

2 栄養補助食品の胃の中での溶けやすさ(崩壊性)について

今回調査した栄養補助食品は、ほとんどの銘柄が医薬品に規定されている崩壊試験に適合したが、胃の中での溶けやすさに問題があると思われる銘柄もあった。

3 子供用栄養補助食品について

- 1) 小学生の子供をもつ親を対象にした子供用栄養補助食品の利用状況調査から、回答者の15%が子供に栄養補助食品を飲ませている（飲ませていたことがある）ことがわかった。
- 2) 子供用栄養補助食品には、味が良くお菓子感覚で食べられるものがあるため、子供が食べ過ぎることにより栄養成分を過剰に摂取しないように注意が必要と考えられた。
- 3) 子供の偏食等により栄養不足が気になった場合、栄養補助食品を利用する前に他の食材で栄養を補うようにすることが望ましいと考えられた。

以上のことから、栄養成分は、毎日の食事からバランスよく取り入れるように心がけ、栄養補助食品は、食事バランスガイド（厚生労働省と農林水産省が決定）を参考に食生活を見直し、必要な時に摂取することが望ましいと考えられた。

文献

- 1) 莊村多加志：栄養表示のための成分分析のポイント、302-303、中央法規出版(株)、東京（2007）
- 2) 安斉正郷：日本人の食事摂取基準（2010年版）、157-158、第一出版(株)、東京（2009）
- 3) Herbert S, et al: Sensory Neuropathy from Pyridoxine Abuse, The New England Journal of Medicine, 309(8), 445-448 (1983)
- 4) (社)静岡県薬剤師会：スキルアップのためのサプリ・トクホ相談Q&A、36-37、(株)南山堂、東京（2008）
- 5) (財)日本公定書協会：日本薬局方技術情報 2006 JPTI 2006、216-217、(株)じほう、東京（2006）
- 6) 国立健康・栄養研究所ホームページ：サプリメントと子どもの食事

TLC一斉分析法による染毛剤の確認試験に関する検討

医薬食品部 医薬班 山本真也, 内田恭之, 宮本憲吾,
上村慎子, 前田有美恵, 高橋一則

Study on the Simultaneous Analytical Method by TLC
for the Identification Test of Hair Dye

Masaya YAMAMOTO, Takayuki UCHIDA, Kengo MIYAMOTO,
Mitsuko KAMIMURA, Yumie MAEDA and Kazunori TAKAHASHI

染毛剤の確認試験で多用される TLC 一斉分析法について検討した。静岡県での承認申請事例の多い7成分の TLC における展開溶媒および検出法を検討したところ、イソプロピルエーテル/アセトン/2-プロパノール混液および酢酸エチル/シクロヘキサン混液を用いた多重展開により各成分を良好に分離できた。また、ヨウ素蒸気による発色での特異的な検出が可能となった。

Key words : 染毛剤, 規格試験法, 製造販売承認申請書, 審査, 薄層クロマトグラフィー
hair dye, specification and test method, application for marketing approval,
examination, thin layer chromatography

はじめに

医薬品, 医薬部外品, 医療機器の製品として最も重要なことは, 有効性, 安全性および品質の確保である。製品の規格及び試験方法は, これらを確保する上で大変重要な意義を持つ。

当研究所では, 県薬事課からの依頼により, 都道府県知事に委任された医薬品および医薬部外品の製造販売承認申請書のうち, 規格や試験方法に関わる内容の妥当性について, 技術的な面から検討している。製造販売業者に対する技術的な支援を行うとともに審査の効率化や標準化を図ることを目的に, 当所では平成19年に静岡県で申請の多い軟カプセル剤をモデルとした審査ガイドブック¹⁾を作成し, 審査に活用している。

しかしながら, 医薬部外品の染毛剤の承認申請の審査においては, 平成19年度に報告²⁾したように, 多成分を対象とした薄層クロマトグラフィー(以下, TLC)による有効成分の確認試験に関する指摘や指導, 照会事項が

特に多い。

そこで, 静岡県内の申請で多く使用される有効成分(7成分)に関して TLC による一斉分析法を検討したので報告する。

方法

1 試薬等

1) 標準物質:

- ①パラフェニレンジアミン(和光純薬工業㈱, 和光一級)
- ②塩酸トルエン 2,5-ジアミン(三井化学ファイン㈱, 外原規適合)
- ③硫酸メタフェニレンジアミン(東京化成工業㈱, 98.0%以上)
- ④パラアミノフェノール(和光純薬工業㈱, 和光一級)
- ⑤メタアミノフェノール(和光純薬工業㈱, 和光一級)
- ⑥オルトアミノフェノール(和光純薬工業㈱, 試薬)
- ⑦レゾルシン(和光純薬工業㈱, 試薬特級)

2) ブランク試料:

有効成分を除いた第一剤(県内の染毛剤製造販売業者からの提供品)

3) 薄層板:

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

シリカゲル薄層板(Merck, シリカゲル 60)

4) 展開溶媒:

①イソプロピルエーテル/アセトン/2-プロパノール混液(10:1:1)

②酢酸エチル/シクロヘキサン混液(4:1)

それぞれの試薬は特級またはクロマトグラフ用

5) スポット量:

1 μ L (試料溶液2は1 μ Lまたは5 μ L)

6) 展開距離:

10cm

7) 発色試薬:

ヨウ素蒸気

2 標準溶液の調製

各有効成分 10mg に 2-プロパノール/水/強アンモニア水混液(9:3:1)5mL を加えて溶解し, 0.1g の亜硫酸水素ナトリウムを加えて振り混ぜて放置した後, それぞれの上清を標準溶液とした(2 μ g/mL).

3 試料溶液の調製

試料 1:

ブランク試料に各有効成分を最終濃度 2%

(20mg/g)となるように加えたもの

試料 2:

ブランク試料に有効成分①, ③, ⑤, ⑦を最終濃度①

2%, ③0.1%, ⑤1%, ⑦1%となるように加えたもの

試料 1 または 試料 2 約 1g に 2-プロパノール/水/強アンモニア水混液(9:3:1)10mL を加えて溶解し, 0.1g の亜硫酸水素ナトリウムを加えて振り混ぜて放置した後, それぞれの上清を試料溶液とした。(試料溶液 1, 2).

また, ブランク試料約 1g について同様の操作を行いブランク溶液とした。

4 試験操作

各標準溶液, 試料溶液 1, 2 およびブランク溶液を薄層板にスポットし、展開溶媒①で展開後、風乾した後、展開溶媒②で展開した。再び薄層板を風乾し、ヨウ素蒸気で呈色させた。

結果および考察

展開溶媒①および②を用いて展開した TLC クロマトグラムを図1および図2に、各有効成分の Rf 値を表1に示した。

医薬部外品原料規格(以下、外原規)³⁾や衛生試験法・注解2010⁴⁾に記載されている展開溶媒①で展開したとこ

表1 各有効成分の Rf 値一覧

成分	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
図1	0.12	0.15	0.16	0.28	0.39	0.49	0.59
図2	0.12	0.15	0.23	0.32	0.45	0.50	0.58
図3	0.21	0.26	0.34	0.47	0.62	0.70	0.78

レノNo. 1 2 3 4 5 6 7 T1 T2 B 1 2 3 4 5 6 7 T1 B T2 1 2 3 4 5 6 7 T1 B T2 T3

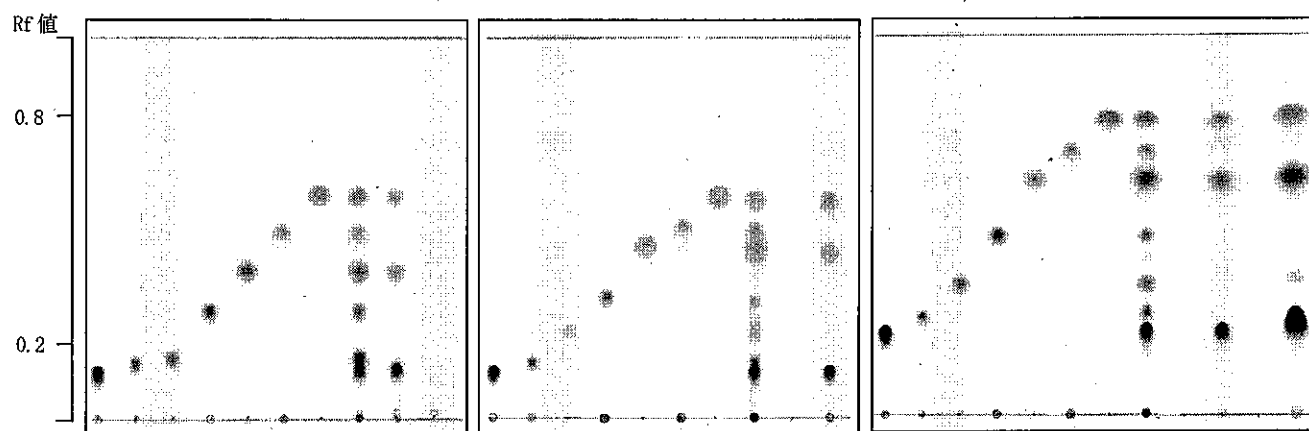


図1 展開溶媒①で展開した結果

図2 展開溶媒②で展開した結果

図3 展開溶媒①で展開後、展開溶媒②で展開した結果

展開溶媒①: イソプロピルエーテル/アセトン/2-プロパノール混液(10:1:1)

展開溶媒②: 酢酸エチル/シクロヘキサン混液(4:1)

スポット量はT3を除き1 μ L, T3は5 μ L

1: 標準溶液① (パラフェニレンジアミン)

5: 標準溶液⑤ (メタミノフェノール)

T1: 試料溶液1

2: 標準溶液② (塩酸トルエン2,5-ジアミン)

6: 標準溶液⑥ (オルトアミノフェノール)

T2: 試料溶液2

3: 標準溶液③ (硫酸メタフェニレンジアミン)

7: 標準溶液⑦ (レゾルシン)

T3: 試料溶液2 (5 μ L)

4: 標準溶液④ (パラアミノフェノール)

B: ブランク溶液

る、有効成分④～⑦のRf値は0.2～0.8の範囲にあり、特異性および再現性の点で問題なく、各スポットの分離も良好であった。一方、有効成分①～③のRf値は0.2未満であり、それぞれのスポットの分離ができなかった(図1)。

一方、展開溶媒②で展開したところ、有効成分①と③の分離は良好であったが、有効成分①と②の分離は不十分であった(図2)。

そこで、多重展開の手法を用い、展開溶媒①で展開後、展開溶媒②で展開したところ、検討した7成分すべてがRf値0.2～0.8の範囲となり分離も良好であった(図3)。

また、ヨウ素蒸気による発色は成分によって強弱があるが、色調は成分固有で特異性も良好であった。なお、試料溶液2を1 μ Lスポットした場合は成分③の検出ができなかった(図3T2)が、スポット量を5 μ Lに増やすことで検出が可能となった(図3T3)。

まとめ

医薬部外品のような多数の有効成分を有する試料のTLCによる一斉分析では、隣接する(Rf値の近い)スポットの十分な分離が必要である。しかし、隣接する有効成分のそれぞれの濃度が大きく異なる場合、濃度の高い有効成分が他の有効成分のスポットを妨害して確認が困難な場合がある。また、有効成分③、⑤および⑦は他の成分より呈色しにくいので隣接成分との分離に注意し、試料溶液の濃度を高く調製するか、スポット量を増やす必要があると考えられた。

そこで、実際に審査の際に指摘した染毛剤の処方参考として、試料溶液2(成分①の濃度は成分③の20倍)を調製し、試験を行った。試料溶液2の成分③は、スポット量1 μ L(成分量として0.1 μ g)では検出することはできないが、スポット量を5 μ L(成分量0.5 μ g)に増やす

と検出できた(図3)。

以上の結果から、染毛剤のTLCによる確認試験法を検討する場合において、外原規³⁾のパラフェニレンジアミン等の確認試験で多用されている展開溶媒①が多くの有効成分の分離に適用できるため、第1選択とすべきと考えられる展開溶媒と考えられた。この展開溶媒で分離が不十分な有効成分①～③が同時に処方されている製品にあつては、さらに展開溶媒②で多重展開することで良好な結果が得られた。

また、TLCへのスポット量としては0.5 μ g未満では検出が難しい成分もあるので、配合量の少ない成分は試料調製の際に注意する必要がある。各有効成分のスポット量が、数 μ g～10 μ gとなるように試料溶液を調製するのが望ましいと考えられた。

謝辞

試験法の検討にあたり、標準品やブランク試料等を提供していただきました静岡県内の染毛剤製造販売業者に深謝します。

参考文献

- 1) 医薬品等知事承認審査のための「規格及び試験方法」に関するガイドブック—軟カプセル剤—, 静岡県環境衛生科学研究所ホームページ, http://www6.shizuokanet.ne.jp/eikanctr/b/iyakusyokuhin/iyaku_top1.htm
- 2) 上村真子他: 染毛剤の知事承認申請資料における規格及び試験方法の設定の考え方, 静岡県環境衛生科学研究所報告, 50, 33-35 (2007)
- 3) 医薬部外品原料規格2006, 薬事日報社, 東京(2006)
- 4) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解2010, 698-699, 金原出版, 東京(2010)

ファルマバレープロジェクト創薬探索研究における 静岡化合物ライブラリーの構築と活用について

医薬食品部 医薬班 鈴木紳之, 小郷尚久, 前田有美恵,
高橋一則
静岡県立大学大学院 薬学研究科 創薬探索センター 浅井章良

Study on Construction and the Use of Shizuoka Chemical Library
for the Drug Discovery in Fuji Pharma Valley

Nobuyuki SUZUKI, Naohisa OGO, Yumie MAEDA,
Kazunori TAKAHASHI and Akira ASAI

静岡県のファルマバレープロジェクトの一環として、創薬探索研究に取り組んでいる。創薬探索研究においては、研究ソースとして、新しい薬の“たね”となる化合物ライブラリーが必要不可欠である。そのための化合物ライブラリーを独自に構築し、この静岡化合物ライブラリーの質についての検証を行った。また、この静岡化合物ライブラリーの有効活用の一例として、抗インフルエンザウイルス活性を有する化合物を見出した。静岡化合物ライブラリーは、日本国内のアカデミアを含む公的機関において、最大級の規模である。

Key words: 創薬, 化合物ライブラリー, 分子標的薬, 抗インフルエンザ, 医薬品化学
drug discovery, chemical library, molecular targeted drug, anti influenza,
medicinal chemistry

はじめに

静岡県は医薬品・医療機器の生産金額が全国トップクラスであり、これらの多くの企業や研究所が集積している。さらには、世界トップクラスのがん診療拠点である静岡がんセンターが開院し、静岡がんセンター研究所が開設した。この恵まれた環境を生かし、世界一の健康長寿県の形成を目指して、医療からウエルネスまで世界レベルの研究開発を進めるとともに、医療健康関連産業の振興と集積を図り、特色ある地域の発展を目指す「富士山麓先端健康産業集積（ファルマバレー）プロジェクト」を推進している¹⁻³⁾。

このプロジェクトの戦略の1つとして、患者・県民の

視点に立った研究開発に取り組んでおり、患者が必要とする、がんや感染症、難病などを中心とした新しい薬を創出するための創薬探索研究を推進している。

医薬品が基礎研究から承認・販売されるまでの研究開発は、10～15年にもおよぶ非常に長い研究開発期間を必要とする（図1）。

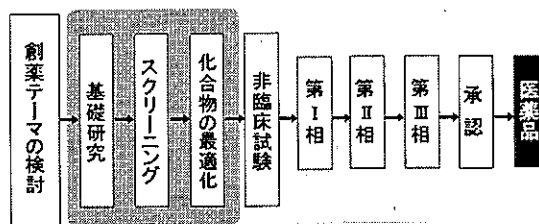


図1 医薬品の研究開発の流れ

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東 4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

静岡県では、プロジェクトの中核支援機関である財団法人しずおか産業創造機構ファルマバレーセンターの包括的支援による創薬システムを構築している。すなわち、創薬シーズを薬につなげるスクリーニングセンターとし

て、静岡県立大学に創薬探索センターを新設した。また、化合物ライブラリーの構築と管理、化合物の最適化に関しては、静岡県環境衛生科学研究所に創薬化学研究室を新設した。この静岡創薬システムと全国の大学や公的研究機関および製薬企業との共同研究により、日本独自の創薬シーズを薬につなげる創薬探索研究を行っている(図2)。

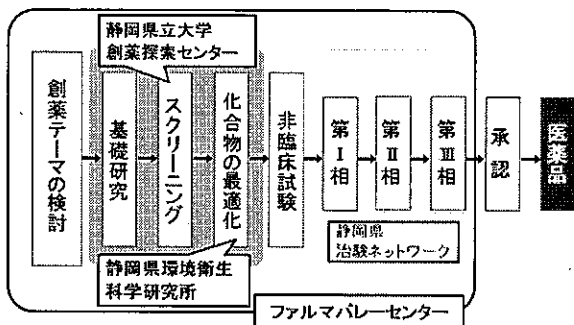


図2 ファルマバレープロジェクトにおける創薬探索研究

ところで、医薬品の研究はよく鍵と鍵穴の関係に例えられる。

近年の医学、生物学の発展により、さまざまな疾患の原因分子が明らかとなってきたことで、新たな標的(鍵穴)が数多く見出されている。

新たな鍵穴に対応できる優れた鍵のもととなる集合体、すなわち、スクリーニングソースである化合物ライブラリーの構築が、新たな医薬品を見出すために不可欠である。

そこで、創薬を指向した静岡化合物ライブラリーを構築し、このライブラリーを用いた化合物評価の一例の概要を報告する。

方法

1 静岡化合物ライブラリーの構築

1) 静岡化合物ライブラリー構成化合物

日本国内ではノーベル化学賞を受賞するような世界的にも認められる有機化学の研究が行われている。これらの研究によって生み出された有機化合物の多くは、反応の新規性や有用性の研究もしくは目的とする天然有機化合物の全合成が達成された後、特に大学等においては、活用されずにそのまま保管されていることが多い。また、化学メーカーにおいても、機能性材料、香料等の研究開発のために化合物を合成しているが、これらの化合物は医薬品としての研究がなされていないことがある。このような化合物をライブラリーとして整備することで、化合物の新たな用途、すなわち、医薬品としての可能性についての研究に活用することとした。

さらに、既に医薬品として使用されており、その鍵穴

が判明している化合物をリファレンス(対照)ライブラリーとして化合物ライブラリーに組み込むこととした。

2) 静岡化合物ライブラリーデータベース(DB)の構築
ライブラリー化合物の分子構造情報を一元的に管理することは、スクリーニングにより見出された化合物を迅速に同定したり、類似化合物を化合物ライブラリーの中から迅速に見出したりするため、創薬研究において必須となる。そこで静岡化合物ライブラリーDBの作成を行った。

DBを作成する際の電子ファイルフォーマットとしては、分子構造情報のみならず、物性情報、スクリーニング評価結果等の化合物に付随するデータを併せて管理できるStructure-Data(SD)ファイルを採用することとした。このSDファイルは、DB間やDBを基にしてコンピュータ上で鍵と鍵穴の関係について計算を行う*in silico*解析ソフトなど他の解析ツールへのデータ転送も容易に行うことが可能である。また、汎用性のあるファイルフォーマットとして最も認知されているため、他機関との共同研究の際にも情報の受け渡しが容易である。

3) 静岡化合物ライブラリー管理システムの構築

2)で作成した静岡化合物ライブラリーDBの情報とリンクした、秤量や溶液調製から残量まで一括して管理できるシステムを構築することとした。

まず、DBから分子量と原末量を抽出し、そのデータを基に、一定のモル濃度のジメチルスルホキシド(DMSO)溶液を調製した。この作業は、残量管理のexcelファイルと連動した秤量天秤およびバーコードリーダー等の機器を用いることにより、ヒューマンエラーを極力防止するようにした(図3)。



図3 バーコードによる化合物管理

DMSO溶液は、含水等による化合物変性の可能性を極力避けるため、不活性ガス(アルゴン)の封入等を施し、冷凍保存した(図4)。また、解凍する際には、専用のデシケータ(除湿機能付)を用いて行った。

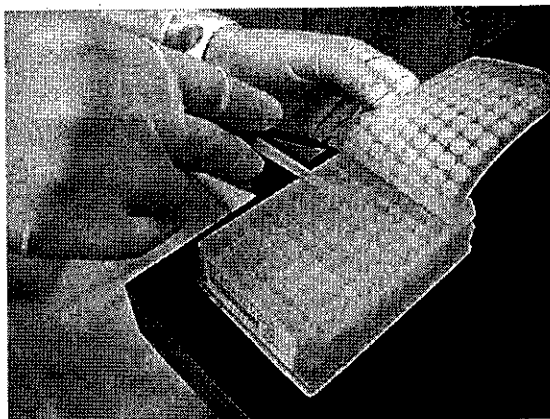


図4 不活性ガス(アルゴン)の封入

2 静岡化合物ライブラリーの創薬探索研究活用例

静岡化合物ライブラリーの創薬探索研究における有用性評価の一例として、抗インフルエンザウイルス剤の探索研究を行った。具体的には、MDCK 細胞を用いたインフルエンザウイルス A/PR/8/34 (H1N1 型) 添加による細胞死を抑制するスクリーニング系を構築し、静岡化合物ライブラリーを評価することで、抗インフルエンザウイルス活性を有する化合物の探索を行った⁴⁾。また、見出した抗インフルエンザウイルス活性を有する化合物については、動物モデル (*in vivo*) 等の試験のためのサンプル合成を指向した合成方法を検討することとした。さらに、活性化化合物の構造に着目したフォーカスライブラリーの作成と評価を行うこととした。

結果および考察

1 静岡化合物ライブラリーのプロファイリング

前述の方法により、著者らは、約9万3千化合物を有する静岡化合物ライブラリーを構築した(図5)。

一般的に創薬探索研究において、化合物ライブラリーの質は、スクリーニングにおけるヒット率や後に続く化合物の最適化研究などにも大きく関係するため、非常に重要である。

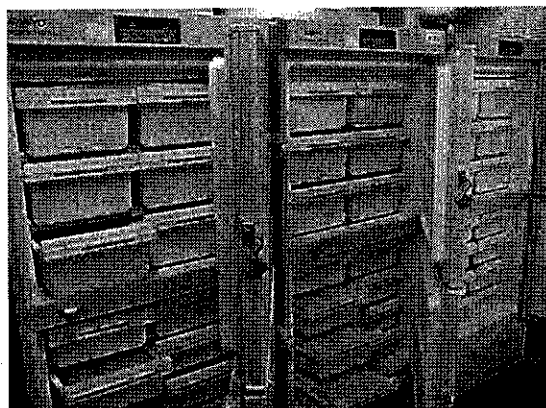


図5 静岡化合物ライブラリー保管の様子

そこで、既存の医薬品の調査に基づき、医薬品らしい化合物の物理化学的性質を系統的にとらえた経験則として提唱された Rule of Five⁵⁾ により、静岡化合物ライブラリーの検証を行うこととした。

Rule of Five では、分子量: 500 未満, cLogP (疎水性の指標): 5 未満, 水素結合供与体の数: 5 以下, 水素結合受容体の数: 10 以下の化合物が医薬品らしいとされている。これらの指標を基に検証した結果を図6~9に示した。なお、図中の破線は、Rule of Five が提唱する値を示す。

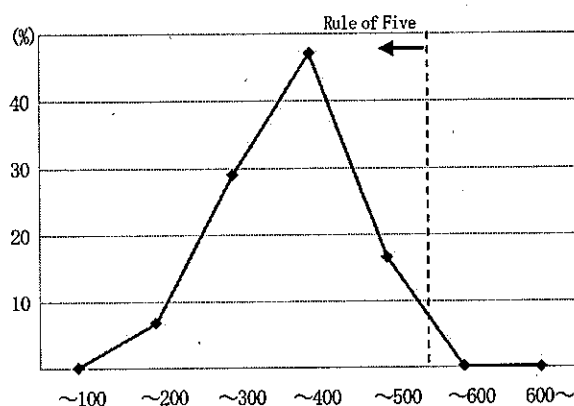


図6 静岡化合物ライブラリー構成化合物の分子量の割合

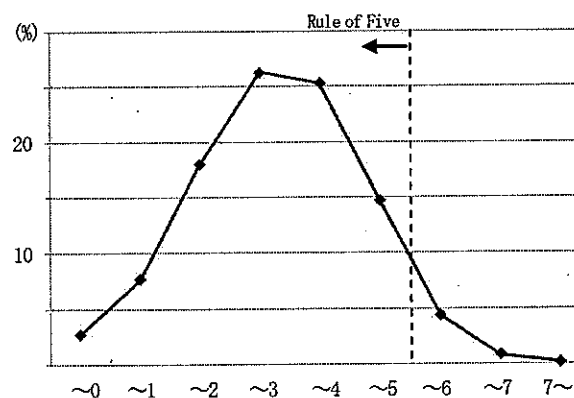


図7 静岡化合物ライブラリー構成化合物の cLogP の割合

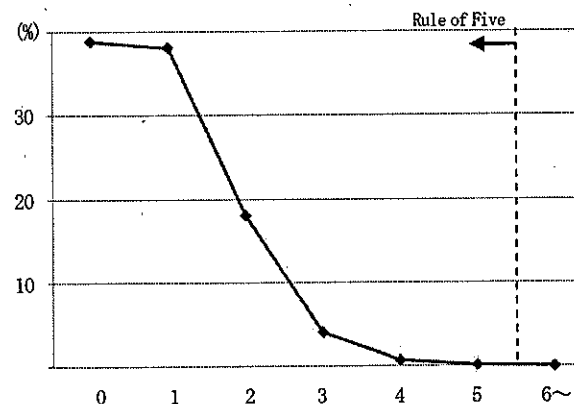


図8 静岡化合物ライブラリー構成化合物の水素結合供与体数の割合

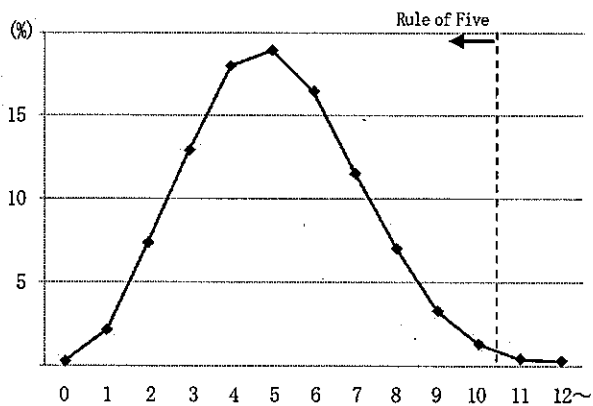
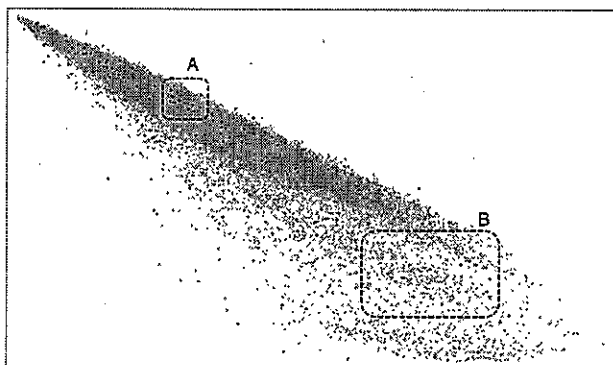


図9 静岡化合物ライブラリー構成化合物の水素結合受容体数の割合

静岡化合物ライブラリーより無作為に抽出した約3万化合物について調査を行った。分子量については99%の化合物が500未満だった。疎水性の指標であるcLogPについては95%の化合物が5未満であった。また、水素結合供与体の数が5以下の化合物、水素結合受容体の数が10以下の化合物の割合は、ともに99%だった。

以上のように、構築したライブラリーを構成する化合物は、どの指標に対しても、条件を満たす医薬品らしい化合物であるといえる。

様々な標的(鍵穴)に対応するためには、できる限り多様性のある化合物であるほうがよりよいと考えられている。しかしながら、医薬品として適した性質を示す化合物とそうでない化合物が存在する。そこで、現在市販されている各疾患の代表的医薬品であるリファレンスライブラリーと静岡化合物ライブラリーについて、ケミカルスペース上での比較を行った(図10)。このケミカルスペースは、個々の化合物のclogP、分子量など様々な物性要因から1化合物を二次元上の1つの点で表して視覚化したものである。それぞれの点が近いほど、類似した化合物であることを示している。



●: 各疾患の代表的医薬品, ●: 静岡化合物ライブラリー

図10 静岡化合物ライブラリーと代表的医薬品のケミカルスペース

ケミカルスペース上では、代表的医薬品を示す点が複数ある周囲に数多くのライブラリー化合物を示す点が存

在する領域が多くある(例えば図10中A)。このことから、静岡化合物ライブラリーは医薬品らしい化合物を多く含むことが示唆される。また、既存薬を示す点がまばらな部分でも、ライブラリー化合物を示す点が存在する領域もある(例えば図10中B)。これは、既存薬とはあまり似ていない化合物ではあるが、未だ見出されていない全く新しい化学構造を有する医薬品になる可能性も期待できるといえる。

2 静岡化合物ライブラリーの創薬探索研究活用例

静岡化合物ライブラリーを用いて行った抗インフルエンザウイルス活性を有する化合物の探索では、スクリーニングの結果、対照薬としたザナミビル(Zanamivir, 販売名: リレンザ)よりも強い抗ウイルス活性を有するSPRM1を見出した(図11)。この化合物は、細胞毒性を示すことなく薬物濃度依存的に抗ウイルス活性を示し、そのEC₅₀は0.18 μMであった。

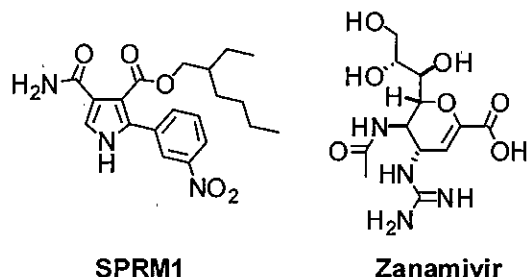


図11 SPRM1と抗インフルエンザ薬Zanamivir

このSPRM1は、感光材料中間体として既知化合物であったが、抗インフルエンザウイルス活性についてこれまで報告はなく、著者らは抗ウイルス剤としての特許を出願した⁶⁾。

さらに、SPRM1の動物モデル(*in vivo*)試験のためのサンプル合成を指向して、市販入手可能なピロールジエステル体を出発原料とした新規合成ルートを検討した(図12)。

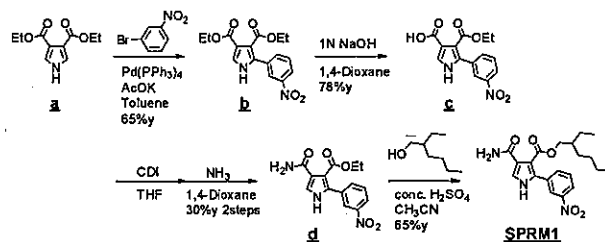


図12 動物モデル(*in vivo*)試験を指向したSPRM1新規合成ルート

出発原料であるピロールジエステル体aにテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウムと酢酸カリウムを用いたカップリング反応によって、ピロール2位への選択的なアリル基の導入を行いbを得た(a→b, 収率: 65%)。次にジエステルカップリング体bに対して、ジオ

キサンを溶媒とした1N水酸化ナトリウムを用いて4位選択的加水分解反応を行い**c**を得た ($b \rightarrow c$, 収率: 78%). さらに, カルボキシジイミダゾール (CDI) とアンモニアを用いてモノカルボン酸体**c**のアミド化を行うことにより**d**を得た ($c \rightarrow d$, 収率: 30% (2工程)). 最後にアミド体**d**に対し, 濃硫酸を触媒とした3位エステル変換反応を行うことにより **SPRM1** を合成した ($d \rightarrow \text{SPRM1}$, 収率: 65%).

以上のように, ハロゲン化アリルのパラジウムによるカップリングを鍵反応とした **SPRM1** の新規合成ルートを確認した (5工程, 全収率: 10%).

さらに, **SPRM1** の構造活性相関研究としてピロロール環に着目したフォーカスライブラリーの作成と評価を行った. 具体的には静岡化合物ライブラリーDBを基に, ピロロール環を部分構造に持つ化合物を抽出して, 同様に抗インフルエンザ評価を行った (図13).

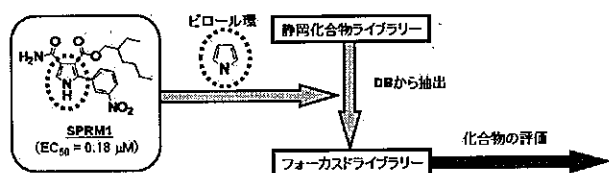


図13 フォーカスライブラリーの作成と評価

フォーカスライブラリーの評価の結果, ピロロ [1,2-a] ピリミジン-4-オン骨格を有する化合物 (**e**) が薬物濃度依存的に抗インフルエンザウイルス活性を示し, その EC_{50} は $0.31 \mu\text{M}$ であった (図14).

本結果により, 系統的にライブラリーを構築することが, 効率的にヒット化合物同定をするために効果的であることが証明できた.

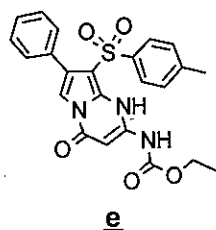


図14 抗インフルエンザウイルス活性有する化合物 (**e**)

まとめ

著者らは, 創薬探索研究を目的とした約9万3千化合物を有する静岡化合物ライブラリーを独自に構築した. 静岡化合物ライブラリーは, 国内のアカデミアを含む公的機関において最大級であり, 内外の研究者から注目を集めている. 本研究によって, 構築した静岡化合物ライブラリーの質については, 医薬品らしい化合物が多く含まれる化合物群であることが科学的にも検証されたとい

える.

また, スクリーニングにより抗インフルエンザ活性を有する **SPRM1** を見出すとともに, **SPRM1** の新規合成ルートを確立できた. さらに, **SPRM1** のピロロール環に着目した DB から抽出したフォーカスライブラリーより抗インフルエンザ活性を有する化合物 (**e**) を見出した. 今後, これらのヒット化合物は, 動物モデルでの評価や他のインフルエンザウイルスでの評価を進める予定である.

今後も, 静岡化合物ライブラリーの更なる充実を図りながら, この静岡化合物ライブラリーを活用して, 積極的に大学, 研究機関や企業との共同研究を行い, 効果的な運用を図っていく. すなわち, 静岡県が推進するファルマバレープロジェクトとして, ベッドサイドのニーズに応える“ものづくり”のための創薬探索研究を行っていく.

謝辞

本研究は, 財団法人しずおか産業創造機構ファルマバレーセンターの創薬探索研究事業の支援を受けて実施した研究成果であり, 同センターに深謝いたします.

また, 本研究の実施にあたり協力いただいた, 池谷知佐子氏, 加藤公子氏, 吉村千絵氏およびこれまでの研究補助員の方々に感謝いたします.

参考文献

- 1) 静岡県ファルマバレープロジェクトホームページ, <http://www.pref.shizuoka.jp/sangyou/sa-580/pharma/index.html>
- 2) ファルマバレーセンターホームページ, <http://www.fuji-pvc.jp/>
- 3) 井上謙吾他: ファルマバレー構想 先端的医療産業創生・育成を目指す静岡県のユニークな挑戦 創薬探索センター新設と治験ネットワーク (Fuji-CTSG), ファルマシア, 41(2), 161-165 (2005)
- 4) 小郷尚久他: 新規抗インフルエンザウイルス剤の探索, 日本薬学会第130年会, 岡山 (2010)
- 5) Lipinski, C. A. et al.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, Adv. Drug Del. Rev., 23, 3-25 (1997)
- 6) 浅井章良他: 抗ウイルス剤, 特願2008-019558

医薬品等の規格試験法に関する問題点 (第九報)

医薬食品部 医薬班 上村 慎子, 山本 真也, 尾藤 孝弘^{*1},
水野 くみ子^{*1}, 内田 恭之, 宮本 憲吾,
栗田 浩幸^{*2}, 前田 有美恵, 高橋 一則,
西澤 雅彦^{*3}

Study on the Specifications and Test Methods of Drugs (IX)

Mitsuko KAMIMURA, Masaya YAMAMOTO, Takahiro BITO,
Kumiko MIZUNO, Takayuki UCHIDA, Kengo MIYAMOTO,
Hiroyuki KURITA, Yumie MAEDA, Kazunori TAKAHASHI
and Masahiko NISHIZAWA

平成20年度から平成22年度の収去検査において、医薬品および医薬部外品の製造販売承認書の規格及び試験方法に問題があると考えられる事例があった。医薬品では崩壊試験に適合しなかった事例、沈殿生成による確認試験で製造販売承認書の規格どおりの結果が得られなかった事例、吸光度測定による確認試験で光路長の変更が必要であった事例があり、承認不要医薬部外品の確認試験においては沈殿の呈色が認められなかった事例があった。また、試験検査の手順書に具体的な試液量が規定されているためにかえって期待される結果が得られなかった事例や、試験法に規定されている目的成分以外の成分の除去操作を行わず、その配合量を係数として差し引いて算出した結果を代替試験結果としていた事例があり、試験検査の手順書の作成や、代替試験法の設定において問題があると考えられた。

Key words : 医薬品, 試験検査, 規格試験法, 製造販売承認書, 品質管理
drug, analysis and testing, specification and test method, marketing approval,
quality control

はじめに

医薬品は人の健康や生命に大きく関わることから、その有効性や安全性を保証するため、品質の規格が定められ、試験検査が行われている。当研究所では、県内で製造、流通される医薬品等の品質確保を目的とした収去検査により、最終製品の品質評価を行っている。その品質

評価の実施において、各品目の製造販売承認書の「規格及び試験方法」や品目によって定められた規格に従って試験検査を行っても、期待された結果が得られない場合がある。

当研究所では収去検査等で明らかとなった問題事例について、これまでも報告^{1~8)}してきたが、今回は平成20年度から平成22年度の収去検査の結果を基に問題と考えられる事例を紹介する。

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

*1 東部健康福祉センター

*2 暮らし・環境部環境局廃棄物リサイクル課

*3 健康福祉部生活衛生局薬事課

試験検査の方法

1 検体

県内製造医薬品, 県内流通医薬品および県内製造医薬部外品

2 医薬品等の試験検査

各品目の製造販売承認書の「規格及び試験方法」、第十五改正日本薬局方（以下、日局）⁹⁾、医薬品等製造販売業者の試験検査手順書等に従って実施した。

結果および考察

今回報告する事例について、その概要を表1に示した。

1 糖衣錠の崩壊試験における問題事例

糖衣錠について、医薬品製造販売承認書に従い日局一般試験法の崩壊試験法により試験した。水を試験液として検体6個について崩壊試験を行ったところ、試験終了時（60分後）に1個が原形をとどめていた。さらに12個について試験を行った結果、合計18個中13個が崩壊し、5個が原形をとどめていた。日局の崩壊試験では、6個の試験で1個が原形をとどめた場合、さらに12個の試験を行い、合わせて18個中16個以上が崩壊するとき適合とされる。従って、本検体は規格に適合しなかった。なお、「原形をとどめる」とは、「外皮の糖衣は剥離するが、プレコートした剤皮が完全に残存し、内容物の一部に硬いものがある場合」とした。

当該製品については、平成18年に改正された日局に対応するため医薬品製造販売承認書の記載整備届が製造販売業者において提出されていたが、品質管理部門では、依然として承認当時の日本薬局方（第十四改正）¹⁰⁾に従って補助盤を使用した崩壊試験を実施し、適合と判定していた。日本薬局方の第十四改正では、崩壊試験において補助盤の使用が規定されていたが、第十五改正では、補助盤を使用する場合は各条で規定するよう改正された。

製造販売業者は、一部変更や記載整備を含む承認申請の際には日本薬局方の改正に注意し、品質管理部門との連携の重要性を再認識するべき事例であると考えられた。

2 外用剤の確認試験における問題事例

外用軟膏剤について、医薬品製造販売承認書に従い試

験を行ったところ、確認試験の1項目で期待される結果が認められないものがあつた。規格及び試験方法は「試験液に臭素試液1mLおよび8N水酸化ナトリウム試液1mLを加えるとき、液は白色沈殿を生じるとともに、だいたい赤色を呈する」であるが、両試液を加えたところ、液はだいたい赤色を呈したが、白色沈殿の生成は確認できなかった。

製造販売業者の品質管理部門では、試験液に臭素試液を加えたとき、液が黄色の濁り液となる様子を「白色沈殿」と判断し、その後、水酸化ナトリウム試液を加えたとき、液がだいたい赤色を呈することを確認しているとのことであつた。しかし、試験液、同濃度の有効成分を含む陽性対照および試薬ブランクの陰性対照に臭素試液を加えたとき、いずれも液は黄色の濁りを生じたことから、この濁りの生成は有効成分の存在によるものではないと考えられた。また、これらの液を遠心分離（3000rpm、5分間）したところ、試験液、陽性対照および陰性対照のいずれも下層として分離したのは少量の茶色の液層であり、白色沈殿の生成は認められなかった。当該製品の承認書は、昭和60年に、規格及び試験方法の確認試験を当時の日本薬局方に合わせる目的で一部変更された。しかし、白色沈殿に関する記載は日本薬局方ではなく、承認書の変更時に独自に追加されたものと思われた。なお、他の確認試験項目と有効成分の定量値に問題はなかった。

承認規格設定の際は、試料と試液の化学反応の判定について明確な記載が重要となる。特にこの事例のように、複数の試液を加える場合には、1液ごとの判定か、あるいはすべての試液を添加後の判定かに関する情報が必要であり、また、液の濁りと沈殿の区別、さらにその色調について、解釈に人的相違が生じないように記載が必要と考えられた。

3 外用液剤の確認試験における問題事例

外用液剤について、医薬品製造販売承認書に従い試験を行ったところ、吸光度測定による確認試験において、

表1 医薬品等の試験方法等に問題があると考えられる事例（平成20～22年度）

検体の種類	試験項目	試験結果（不適切な点）	問題の生じた原因
1 糖衣錠（医薬品）	崩壊試験	崩壊数が適合条件に満たない	日本薬局方の改正と承認変更の不整合
2 外用軟膏剤（医薬品）	確認試験	沈殿の生成が認められない	規格設定と試験結果判定の不明確さ
3 外用液剤（医薬品）	確認試験	吸収の極大を確認できない	承認書の試験方法の設定または記載不備
4 清浄綿（医薬部外品）	確認試験	沈殿の呈色が認められない	綿への吸着による濃度低下
5 内用液剤（医薬品）	確認試験	沈殿の染色が認められない	試験検査手順書の不備
6 パーマネント・ウェーブ用剤（医薬部外品）	システイン定量	除去すべき成分の配合量を計算で差し引きした	試験の実施と試験法の代替についての認識不足

極大吸収が観察されないものがあつた。当該製品は、メタノールやエタノールとは混和するが、水とは製品に対し10分の1容量以上では混和せず白濁するという性状である。ところが、確認試験における試験溶液は塩酸試液で希釈調製することが規定されている。そのため、試験溶液は白濁し、溶液全体の吸光度の増大により、吸光度測定可能な範囲を超えてしまい適切な吸収スペクトルの測定ができなかった。

そこで試験溶液を塩酸のエタノール溶液で希釈調製したところ、試料溶液は白濁せず、吸光度は測定可能な範囲にあり、規格に示された3つの極大吸収を検出することができた。一方、医薬品製造販売承認書に従って調製した試料溶液について、測定セルの光路長を通常の1cmから3mmに変更して測定したところ、規格の3つの極大吸収波長を読み取ることができた。

一般に紫外可視吸光度測定法で使用する溶媒は、測定波長付近に吸収がないことが条件のひとつであるが¹¹⁾、その溶媒を用いて調製した試料溶液に試験の支障となる吸収が生じる場合には、その溶媒は適切でないと考えられる。そのため、溶媒を変更するか、あるいは、前処理等により測定の妨害となる物質を除去する必要があると考えられた。また、日局一般試験法の紫外可視吸光度測定法においては、測定セルの光路長は1cmが標準とされているため、測定条件を変更する場合は、医薬品製造販売承認書において規定する必要があると考えられた。

4. 清浄綿の確認試験における問題事例

清浄綿について、承認不要医薬部外品基準に従い試験を行ったところ、確認試験の1項目で期待される結果が得られなかった。当該製品は、0.02%のグルコン酸クロルヘキシジン液を脱脂綿に湿潤させて個包装後、滅菌した清浄綿である。当該基準の確認試験は、検体から搾り出した液を試験液として「試験液に硫酸銅試液0.5mLを加えるとき、液中に白色の沈殿物が生じる。この沈殿物は沸騰するまで加熱するとき、淡紫色を呈する。」という2段階である。これは日局各条グルコン酸クロルヘキシジン液の確認試験と同様の試験である。ただし、清浄綿に湿潤させるグルコン酸クロルヘキシジン液の濃度は日局各条品の1/50である。

本製品の試験では、前半の「白色の沈殿物」は少量であるが生成し、遠心分離(3000rpm, 5分間)して試験管の底部に集めると確認しやすくなった。しかし後半の「沈殿物が淡紫色を呈する」ことの確認では、ろ過してろ紙上に残った沈殿物も、遠心分離して底部に集めた沈殿物もほぼ白色で、淡紫色とは認められなかった。これに対し、清浄綿への湿潤液と同濃度の0.02%グルコン酸クロ

ルヘキシジン液(陽性対照)では、規格のとおり結果が得られた。沈殿物の量は試験品よりも多く得られ、淡紫色の呈色も十分確認できた。

有効成分のグルコン酸クロルヘキシジンは、脱脂綿に強く吸着することが報告されており¹²⁾、清浄綿から搾り出した液中の濃度は、湿潤する前に比べ大きく低下したため沈殿物の生成量が減少し、呈色反応が十分に起きなかったと考えられた。この事例からグルコン酸クロルヘキシジンを適切に確認できる試験方法の設定が必要と考えられた。

5. 内用液剤の確認試験における問題事例

マグネシウム塩を有効成分とする内用液剤の医薬品において、医薬品製造販売承認書に規定された確認試験は日局一般試験法の定性反応を準用するものであるが、製造販売業者から提出された試験検査手順書に従い試験を実施したところ、期待される結果が得られなかった。日局の定性反応は「検液に水酸化ナトリウム試液を加えるとき白色のゲル状の沈殿を生じ、沈殿の一部にヨウ素試液を加えるとき、沈殿は暗褐色に染まる」であり、試液の量は示されていないが、手順書には「検液2mLに水酸化ナトリウム試液5mLを加える」と記載されていた。本製品の試験では検液2mLに対し、水酸化ナトリウム試液を数滴加えたところで、白色のゲル状の沈殿を生じ、この時点で沈殿の一部にヨウ素試液を加えると、沈殿は暗褐色に染まった。しかし、手順書に記載されたとおりの量で実施するとヨウ素試液を加える前に水酸化ナトリウムが過剰となってしまう、「ヨウ素試液を加えるとき、沈殿は暗褐色に染まる」ことが確認できなかった。

試験検査に用いる手順書は、品質管理のための重要文書であり、運用する上でその内容についても製造販売業者において精査する必要があると考えられた。

6. パーマネント・ウェーブ用剤のシステインの定量における問題事例

パーマネント・ウェーブ用剤について、医薬部外品製造販売承認書に従い、パーマネント・ウェーブ用剤承認基準およびパーマネント・ウェーブ用剤品質規格により試験した。当該品はシステインを有効成分とし、添加剤としてチオグリコール酸アンモニウムを配合するコールド二浴式パーマネント・ウェーブ用剤であるため、承認基準により総還元力が規定され、品質規格によりシステイン含量が規定されている。品質規格のシステイン定量法は、陽イオン交換カラムによる前処理により安定剤として配合されているチオグリコール酸アンモニウムを除去し、システインのみの還元力からその定量を行う。総

還元力の試験は、前処理省略によりシステインを含めたすべての成分についてシステイン定量法と同様の方法で還元力を測定する。

試験実施に当たり製造販売業者から提出された試験成績書を確認したところ、システイン定量の項に目的の不明な係数が記載されていた。このことについて、製造販売業者に問い合わせたところ、規定された試験方法を変更して、前処理を省略した総還元力の試験結果から、チオグリコール酸アンモニウム配合量に相当する係数を計算により差し引いて、システイン含量を算出する方法を代替試験方法としているとの回答を得た。配合量から試験成績を算出する方法では、最終製品の品質を客観的に評価することができないため、製品の試験検査の目的に適わないものとなる。そのため、パーマネント・ウェーブ用剤品質規格の試験方法に従って試験を実施することの必要性について製造販売業者に対する指導が必要と考える。

まとめ

医薬品および医薬部外品の品質確保において、品質規格や試験方法の適切な設定はきわめて重要である。当研究所で実施した医薬品等の試験検査において、規格設定や試験方法の設定に問題があると考えられる事例があった。社内での部門間の連携不足や品質管理に対する根本的な考え方に問題があると考えられる事例もあった。これらの事例については、製造販売業者等に対して指摘、指導を行うとともに、可能な限り公表することで、医薬品等の規格及び試験方法の設定や製造所での品質管理において有効に活用されることを期待する。

参考文献

- 1) 山本政利他：医薬品等の規格試験法に関する問題点，静岡県衛生環境センター報告，31，97-101（1988）
- 2) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点（第二報），静岡県衛生環境センター報告，38，71-77（1995）
- 3) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点（第三報），静岡県環境衛生科学研究所報告，43，21-24（2000）
- 4) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点（第四報），静岡県環境衛生科学研究所報告，45，19-24（2002）
- 5) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点（第五報），静岡県環境衛生科学研究所報告，46，19-22（2003）
- 6) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点（第六報），静岡県環境衛生科学研究所報告，47，23-26（2004）
- 7) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点（第七報），静岡県環境衛生科学研究所報告，48，23-26（2005）
- 8) 小和田和宏他：医薬品等の規格試験法に関する問題点（第八報），静岡県環境衛生科学研究所報告，50，25-28（2007）
- 9) 厚生労働省：第十五改正日本薬局方，平成18年3月31日付厚生労働省告示第285号
- 10) 厚生労働省：第十四改正日本薬局方，平成13年3月30日付厚生労働省告示第111号
- 11) 第十五改正日本薬局方解説書，B-192-B-210，廣川書店，東京（2006）
- 12) Y's Letter, vol. 2, No. 7, 吉田製薬(株)（2005）

溶出試験の自動化による変動要因に関する考察

医薬食品部 医薬班 内田恭之, 山本真也, 宮本憲吾,
上村慎子, 前田有美恵, 高橋一則

Study of Automation-induced variables on Dissolution Test

Takayuki UCHIDA, Masaya YAMAMOTO, Kengo MIYAMOTO,
Mitsuko KAMIMURA, Yumie MAEDA and Kazunori TAKAHASHI

経口製剤の溶出試験の実施においては、試験液採取など溶出試験の一連の処理を自動で行う自動溶出試験装置が広く利用されている。当該装置で行った溶出試験において、日本薬局方に示される溶出試験と同等の結果が得られることを確認するため、自動化による溶出試験結果への影響について検討した。その結果、自動測定では手動測定に比べ溶出率が低下し、自動測定における吸光度測定時の試験液の希釈および手動測定における試験液採取時の溶出の亢進が原因と考えられた。

Key words : 日本薬局方, 溶出試験, 自動化

Japanese Pharmacopoeia, dissolution test, automation

はじめに

溶出試験は、経口製剤について溶出試験規格に適合しているかどうかを判定するために行うものであるが、併せて著しい生物学的非同等性を防ぐことを目的としている¹⁾。現在、多くの医薬品製剤において溶出規格が設定されている。しかし、溶出試験は結果に影響を及ぼす変動要因の多いことが知られており²⁾、溶出試験結果が試験機関によって異なる場合が認められるが、その要因は必ずしも明確ではない。

溶出試験装置は複数のメーカーから販売されており、溶出試験における一連の工程（試験液の脱気、試験液のベッセルへの注入、薬剤の投入、試験液の採取・測定）を自動で行う機種も存在する。一方、日本薬局方¹⁾（日局）の溶出試験法は各操作を手動で行うことを想定しており、当所において、溶出試験の全工程を自動で行う自動測定と日局に従う手動測定の両方法で溶出率を比較すると自動測定の結果の方が低くなる傾向を報告しているが、その原因は解明できていない³⁾。

本稿では、試験液の採取・測定操作において、自動測定と手動測定を比較し、試験の自動化が溶出試験結果に及ぼす影響について検討を行ったので報告する。

実験方法

1 試料

プレドニゾン標準品 (USP) ; Lot. 00G356
プレドニゾン錠標準製剤 (USP) ; Lot. POE203

2 試験装置

溶出試験装置 ; RT-3 (大日本精機製)
分光光度計 ; UV-1600 (島津製作所製)
メンブランフィルター (ポアサイズ 0.45 μ m)
自動測定 ; ロボディスク (大日本精機製)
手動測定 ; クロマトディスク 25A (クラボウ製)

3 試験条件

方法 ; 日局溶出試験法パドル法
試験液 ; 水, 試験液量 ; 500mL
回転数 ; 50rpm, 温度 ; 37.0 $^{\circ}$ C
時間 ; 30分
試験液採取容量 ; 20mL
測定波長 ; 242nm (セル長 ; 10mm)

4 標準溶液の調製

プレドニゾン標準品をエタノールに溶解後、水で最終濃度 10mg/L に調製した。

5 操作方法

1) プレドニゾン錠による検討 (方法1)

RT-3 を自動測定モードとし、プレドニゾン錠投入後の試験液採取時間を 30 分に設定し自動測定を行った。また投入後 30 分に同じベッセルから手動で試験液を採取し、それぞれの溶液はメンブランフィルター (MF) でろ過後、

ろ液の吸光度を測定した。

2) 均一溶液による検討 (方法2)

標準溶液を各ベッセル内へ500mL入れた後、RT-3を自動測定モードとし、プレドニゾン錠の投入は行わず、試験液採取時間を30分に設定し試験を行った。30分における自動採取時に同じベッセルから手動で試験液を採取し、それぞれの溶液はMFでろ過後、ろ液の吸光度を測定した。

結果および考察

これまでに、当所では自動測定で溶出試験を行うと手動測定に比べ溶出率が低くなる傾向があることを報告している³⁾。この原因は解明できていないが、ブランク測定時、または前回の測定時のベッセルから分光光度計までの配管に残る溶液が循環するためにベッセル内溶液が希釈される影響が考えられていた。今回はその影響を排除するため、配管内の溶液循環後に同じベッセルから自動と手動で試験液を採取する方法(方法1)により検討を行った。

その結果、自動測定の溶出率は手動測定に比べ有意に低かった(t検定; $p < 0.01$) (表1)。

表1 プレドニゾン錠の溶出率

	溶出率(%)	標準偏差
自動測定	35.2	1.86
手動測定	36.8	1.61

(n = 6)

測定方法による溶出率の差異の原因として、①MFへの薬剤吸着の差、②自動測定の吸光度測定時における試験液の希釈、もしくは③手動測定の試験液採取時における溶出亢進の3つの可能性が考えられたため、以下の検討を行った。

1 MFへの薬剤吸着

一部の医薬品については、ろ過の際にMFへ薬剤が吸着することが知られている⁴⁾。今回は自動測定と手動測定で異なるMFを使用しているため、プレドニゾン標準溶液をそれぞれのMFでろ過し、ろ液中の標準溶液に対するプレドニゾン濃度を測定した。その結果、いずれのMFにもプレドニゾンが著しく吸着することはなかったことから(自動測定MF; 99.24% 手動測定MF; 99.48%)、MFの違いが溶出率の差異の原因とは考えられなかった。

2 試験液の希釈および溶出の亢進

方法2に示した均一なプレドニゾン溶液を使用した検討を行ったところ、自動測定と手動測定で採取液の対標準溶液濃度に差異がみられた(t検定; $p < 0.01$) (表2)。

なお、通常自動測定では試料投入前のベッセル内溶液を

循環しブランクとして測定するが、本検討ではベッセル内溶液ではなく、水をブランクとした。ブランク測定後の水はベッセル内に流入するため、ベッセル内溶液の対標準溶液濃度は低下した。

表2 均一溶液の測定結果

	対標準溶液(%)	標準偏差
自動測定	95.2	0.11
手動測定	96.0	0.32

(n = 6)

自動測定と手動測定で採取液の対標準溶液濃度に差異がみられたことから「自動測定における試験液の吸光度測定時に、試験液が希釈される可能性」が認められた。しかし、その差は方法1の溶出率の差を説明できる程の大きさではないことから「手動測定における試験液の採取時に溶出が進む可能性」も示唆された。

本機種種の自動測定では、採取時間前から分光光度計に接続する配管に少量ずつ採取液を循環させ始め、設定した時間におけるフローセル内溶液の吸光度を測定する。一方、手動測定では、規定時間にディスポザブルシリンジで20mLを一気に採取しており、この採取方法の違いが溶出率に影響を与える可能性が高いと考えられた。

まとめ

これまで、自動溶出試験装置を利用した溶出試験において溶出率が低くなる原因として配管内の残留液による希釈が考えられていたが、今回の検討から、試験液の測定時に試験液が希釈される可能性、さらには、試験液の採取方法が溶出率に影響を与える可能性が示唆された。

溶出試験には、多くの要因が試験結果に影響を及ぼす可能性があるため、自動溶出試験装置の使用にあたっては今回の検討で明らかになった特性を考慮した上で、溶出試験を行うことが望ましいと考えられた。

文献

- 1) 第十五改正日本薬局方(厚生労働省告示第285号), 105-109(2006)
- 2) 四方田千佳子: 溶出試験の変動要因に関する研究, 厚生科学研究費補助金医薬安全総合研究事業 平成13年度総括研究報告書, 6-27, 45-57, 78-99(2002)
- 3) 小和田和宏他: 医薬品溶出試験の信頼性に関する研究(第2報) - 溶出試験の変動要因に関する検討 -, 静岡県環境衛生科学研究所報告, 44, 27-30(2001)
- 4) 梶村計志他: 医薬品成分のメンブランフィルターへの吸着に関する研究, 医薬品研究, 33, 413-422(2002)

静岡県内の砒素による地下水汚染の対応について

大気水質部 水質環境班 濱口浩太, 後藤裕康, 内山道春,

三好廣志, 杉本勝臣, 青木一永*¹

Correspondence for Groundwater Contamination by Arsenic in Shizuoka

Kota HAMAGUCHI, Hiroyasu GOTO, Michiharu UCHIYAMA,

Hiroshi MIYOSHI, Katsuomi SUGIMOTO and Katsunaga AOKI*¹

本県では現在袋井市や牧之原市など6地域に地下水の砒素汚染が認められている。それら地域の砒素汚染は土壌からの溶出による自然的要因であると推測されているが、その要因は不明な部分があり、今後他の地域でも砒素が環境基準を超過することが考えられる。そこで、県内の汚染地域の地質・水質特性および過去の砒素汚染の事例を調査し、今後の砒素汚染への対応について検討した。

汚染地域の地質は後期更新世-完新世の新しい地層で、水質の変化により砒素が溶出しやすい地層であった。水質特性は砒素検出群では未検出群に比べてpH、鉄、 Na^+ 、 HCO_3^- 、 F^- および PO_4^{3-} が高値であり、 DO 、 SO_4^{2-} および NO_3^- は低値であった。これらの結果から、砒素溶出要因の多くは鉄酸化物の還元による砒素の脱離溶解であると推察された。今後の砒素汚染への対応については、従来の調査項目に加えて今回砒素溶出に関連がみられた項目を追加して調査するとともに、現在の監視井戸との関連性を検討して監視井戸を整理することなどにより効率的なモニタリングをしていく必要があると考えられた。

Key words : 砒素, 地下水
arsenic, groundwater

緒言

本県では水質汚濁防止法に基づく地下水の水質常時監視規定により、毎年地下水のモニタリング調査を行っている。調査項目に砒素があり、その環境基準(以下、基準)は0.01mg/L以下である。県の担当地域内では2011年3月現在袋井市や牧之原市など6地域に砒素汚染が認められており、これまでに確認された汚染地域については継続監視調査(以下、定点モニタリング)により砒素濃度の推移を毎年監視している。

本県では地下水汚染が判明した場合、基準を超過した井戸を中心として半径500m以内の井戸を調査

する汚染井戸周辺地区調査を実施して汚染範囲を推定している。

これまでに判明した砒素汚染事例は周辺の砒素汚染発生源の有無などから、土壌からの溶出による自然的要因であると推測されているが、その溶出要因は不明であり、砒素汚染された地下水の水質特性については十分に検討されていない。土壌からの砒素溶出の原因としては、(1)酸化環境下での高pHによる脱離、(2)還元環境への変化による脱離と溶解、(3)含水鉄酸化鉱物の粒度・構造変化による脱離、(4)鉱物の溶解に伴う溶出、(5)競合イオンによる脱離、(6)鉱物の沈殿に伴う共沈などが知られている(1~3)。

砒素汚染が自然的要因である場合、今後他の地域においても砒素が基準を超過することが考えられるので、県内の汚染地域の地質と水質の特性、過去の砒素汚染の事例を調査し、今後の砒素汚染への対応について検討した。

静岡県環境衛生科学研究所
(〒420-8637, 静岡市葵区北安東4-27-2)
Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

*1: 経済産業部水産局水産振興課

調査方法

1 地質データ

独立行政法人産業技術総合研究所(以下、産総研)地質調査総合センターの Web 上に公開されている日本シームレス地質図および海と陸の地球化学図内の全国の主要河川を対象とした土壌調査データから、県内の地質的概観、土壌中の砒素と鉄の濃度を取得した。

2 水質調査

1) 対象井戸

県の「平成 22 年度公共用水域および地下水の水質測定計画」に基づくモニタリング地点から、概況調査(以下、環境モニタリング)34 地点、定点モニタリング 70 地点の井戸を対象とした。

2) 調査時期

環境モニタリングは 5 月下旬～6 月上旬、定点モニタリングは 9 月下旬～10 月上旬に採水した。

3) 調査項目

井戸区分(浅井戸/深井戸/湧水)、砒素、水温、pH、EC、DO、鉄、陽イオン(Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 NH_4^+)、アルカリ度(HCO_3^-)、陰イオン(F^- 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-})を測定した。

4) 分析方法

水質分析は JIS. K. 0102 に準拠し、各項目の分析方法は表 1 に示した。

表 1 分析方法一覧

項目	分析方法
砒素	水素化物発生フレイム原子吸光法
pH	pH メーター
EC	EC メーター
DO	ウインクラー変法
鉄	ファーンズ原子吸光法
陽イオン (Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 NH_4^+)	イオンクロマトグラフ法
HCO_3^-	酸消費量(pH4.8)
陰イオン (F^- 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-})	イオンクロマトグラフ法

3 過去の砒素汚染の事例について

現在砒素の定点モニタリングの対象となっている地域の過去の砒素汚染の事例について調査し、その中で汚染井戸周辺地区調査が実施された地域の一部についてはその結果を再解析して、砒素溶出要因を検討した。

4 解析方法

今年度の調査結果について、砒素とその他の項目との関連を砒素検出群(0.001mg/L 以上)と未検出群

(0.001mg/L 未満)に群分けし、2 群間で各調査項目の中央値を比較した。

過去の汚染井戸周辺地区調査の結果についてはデータを標準化し、ユークリッド距離とウォード法によるクラスター解析を行った。また、砒素検出群(0.005mg/L 以上)と未検出群(0.005mg/L 未満)に群分けして、2 群間で各調査項目の中央値を比較した。

検出下限値未満の数値についてはその項目の最小値の 2 分の 1 とし、再解析において井戸深度が不明であった地点については浅井戸 5m および深井戸 50m、区分不明 25m として解析を行った。

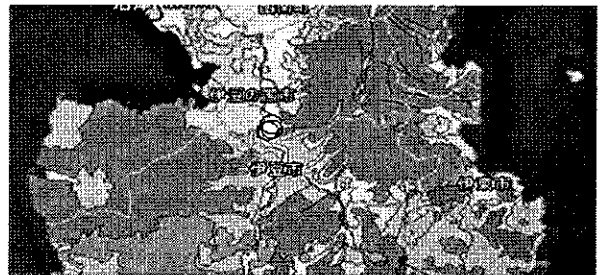
統計解析ソフトウェアには R2.12.1 を使用した。

結果・考察

1 地形・地質的概観

産総研の日本シームレス地質図によると、砒素の環境基準を超過した地域の地質的概観は、伊豆の国市・吉田町・牧之原市・袋井市は後期更新世-完新世、岩相は堆積岩類(海成および非海成層)で、約 1 万 8000 年前～現在までに形成された最も新しい時代の地層であった。また、掛川市・袋井市の一部(海岸沿い)は後期更新世-完新世、岩相は砂丘で、同様に約 1 万 8000 年前～現在までに形成された地層であった(図 1 および図 2)。

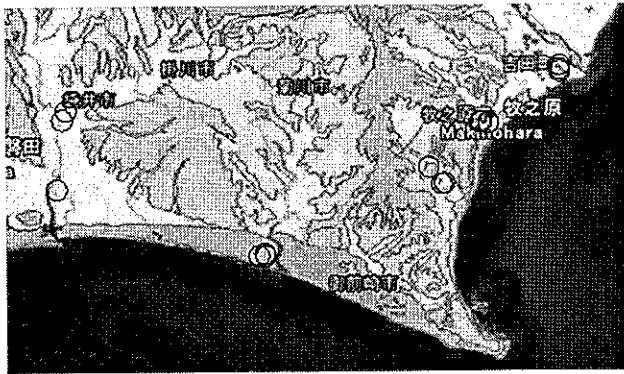
砒素が溶出している地域にみられる地質は年代の新しい地層であり、それらの地層は続成作用があまり進行していないため比表面積が大きく、鉱物や有機物が不安定な状態で存在している²⁾。そのため、水質の変化により砒素が溶出しやすい環境であると考えられる。



(出典:産総研「日本シームレス地質図」を一部改変)

図 1 地質的概観(伊豆の国市) ○:定点モニタリング地点

産総研の土壌調査のデータによると県内の土壌中の砒素濃度は 0~27mg/kg であり、他の自治体と比較して特出して高いわけではなかった(図 3)。また、土壌中の鉄濃度については汚染地域が他の地域と比較して特に濃度が高いという傾向はみられなかった(図 4)。



(出典:産総研「日本シームレス地質図」を一部改変)

図2 地質的概観(吉田町・牧之原市・掛川市・袋井市)

○: 定点モニタリング地点

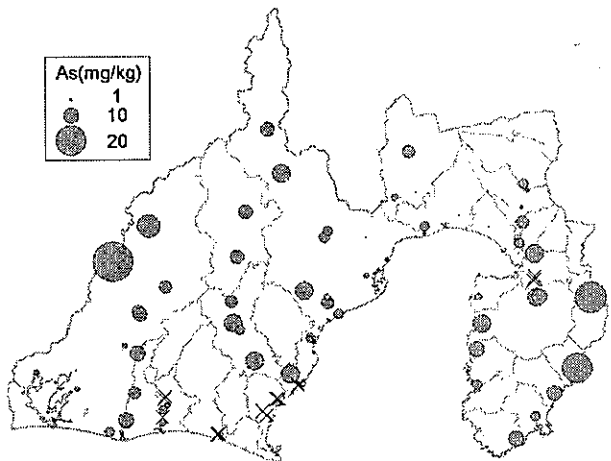


図3 県内土壤中砒素濃度分布 ×: 定点モニタリング地点

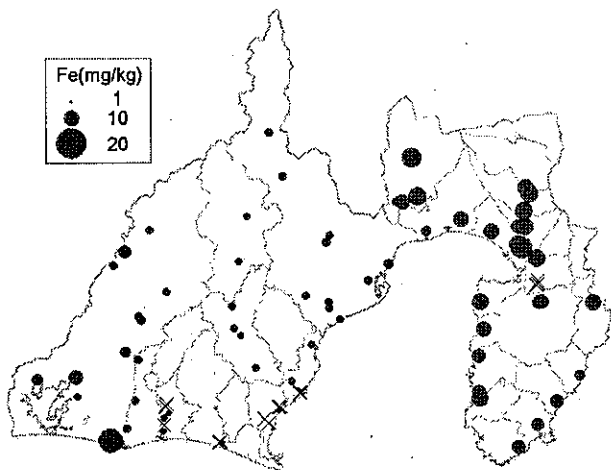


図4 県内土壤中鉄濃度分布 ×: 定点モニタリング地点

2 水質調査結果

砒素が検出(0.001mg/L以上)された地点は104地点のうち17地点であった。砒素検出群と未検出群の2群に分け中央値を比較した結果を表2に示した。また、各群の調査項目の箱ひげ図を図5に示した。

表2 砒素検出群および未検出群の中央値

(mg/L)	検出群 ≥ 0.001	未検出群 < 0.001	検出/未検出
井戸数	17	87	
井戸区分	1(浅井戸)	1(浅井戸)	1.00
水温(°C)	20.20	18.40	1.10
pH	7.03	6.70	1.05
DO	2.87	6.06	0.47
EC(mS/cm)	0.25	0.22	1.12
鉄	0.07	0.01	8.56
Na ⁺	21.68	10.50	2.06
K ⁺	4.21	2.09	2.01
Mg ²⁺	3.59	4.54	0.79
Ca ²⁺	17.85	15.39	1.16
NH ₄ ⁺	0.13	0.07	1.84
HCO ₃ ⁻	98.43	53.25	1.85
F ⁻	0.13	0.05	2.64
Cl ⁻	11.88	8.35	1.42
SO ₄ ²⁻	19.73	22.73	0.87
NO ₂ ⁻	0.03	0.03	1.00
NO ₃ ⁻	3.37	6.24	0.54
PO ₄ ³⁻	0.29	0.05	5.82

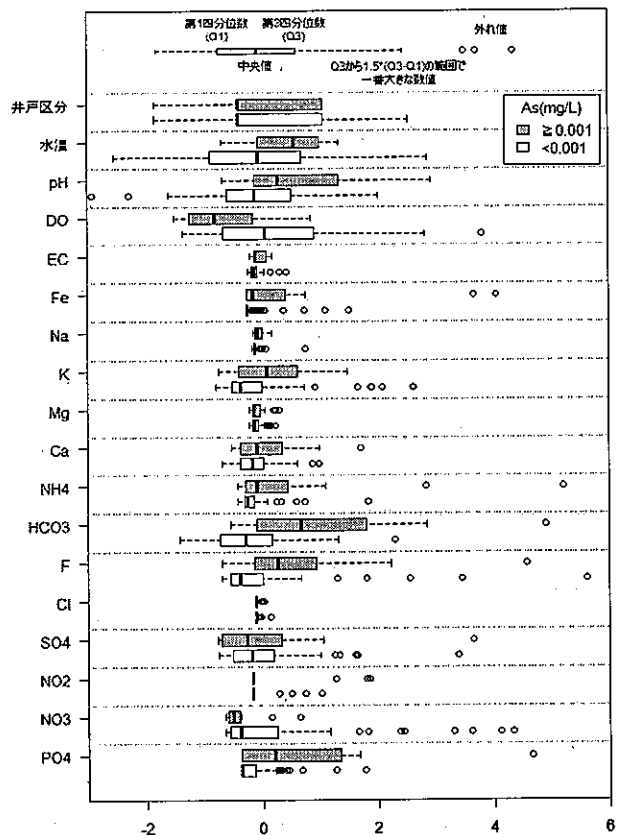


図5 各群の調査項目の箱ひげ図
(県内104地点, 横軸: データ標準化後の数値)

砒素検出群では未検出群に比べて pH, 鉄, Na⁺, K⁺, NH₄⁺, HCO₃⁻, F⁻および PO₄³⁻が高値であり, DO, SO₄²⁻および NO₃⁻は低値であった. HCO₃⁻が高く, Ca²⁺に比べて Na⁺が高いのは Na-HCO₃型の地下水であり, 還元的で停滞型の深層地下水であることを示している¹⁾. これらの結果から, 県内では砒素の溶出要因が鉄酸化物の還元による脱離溶解である地域が多いと推察された.

なお, 他の自治体で実施された調査でも, 地質は新しい年代の堆積層, 地下水の特性は硬度が低く, 微アルカリ性で, 鉄, F⁻, HCO₃⁻および PO₄³⁻などの項目と正の相関を示していた事例が多かった^{4~6)}.

3 県内の砒素汚染の事例

汚染が判明した地域の過去の砒素汚染事例を以下に示す. なお, 汚染井戸周辺地区調査が実施された地域の一部については調査項目を再解析した.

1) 伊豆の国市(旧大仁町)大仁

1990 年度の環境モニタリングにより基準超過が判明し, 汚染井戸周辺地区調査が実施された. その結果, 50 地点のうち 2 地点で基準を超過した. 翌年度より定点モニタリング(汚染井戸 1 地点, 対照井戸 2 地点)に追加され現在までモニタリングを継続している.

2) 掛川市(旧大東町)国安

1999 年度の環境モニタリングにより基準超過が判明し, 汚染井戸周辺地区調査が実施された. その結果, 12 地点のうち 3 地点で基準を超過した. 2001 年度より超過が確認された井戸を定点モニタリング(汚染井戸 1 地点, 対照井戸 2 地点)に追加し, 現在までモニタリングを継続している. なお, 対照井戸 2 地点のうち 1 地点はモニタリングしている中で基準を超過したため 2008 年度から汚染井戸としてモニタリングしている.

3) 吉田町川尻

2000 年度の環境モニタリングにおいて基準超過が判明し, 汚染井戸周辺地区調査が実施された. その結果, 17 地点のうち 3 地点が基準を超過した. また, 土壌調査も実施されており, 土壌中砒素濃度は最大で 0.005mg/L, 鉄濃度は最大で 1.6mg/L であった. 周辺で砒素を取り扱っている事業所を調査した結果, 過去に使用していた事業所が 1 件該当したため, 使用井戸(8 地点)を調査したが, 基準超過は確認されなかったため, この地域の砒素汚染は自然的要因と推定された. また, 基準を超過した井戸は浅井戸であったため, 砒素の溶出は不透水層より上

層からの溶出と推定され, 翌年度から定点モニタリング(汚染井戸 1 地点, 対照井戸 2 地点)に追加された. この地域については今年度までモニタリングを行ったが, 汚染井戸が環境基準値を 5 年以上連続して下回ったためモニタリングを終了する予定である.

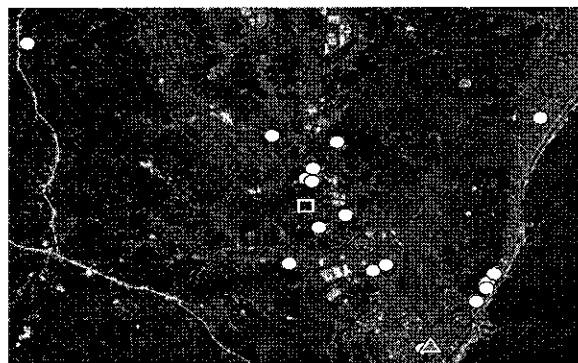
4) 牧之原市(旧相良町)静波

2001 年度の環境モニタリングにより基準超過が判明し, 吉田町と合わせて土壌調査が実施された. 土壌中砒素濃度は調査した深度すべてにおいて 0.002mg/L 未満であり, 鉄濃度は最大で 3.3mg/L であった. 翌年度から定点モニタリング(汚染井戸 1 地点, 対照井戸 2 地点)に追加され, 現在モニタリングを継続している.

5) 牧之原市(旧相良町)菅ヶ谷

1998 年度の環境モニタリングにより基準超過が判明し, 2000 年度から定点モニタリング(汚染井戸 1 地点, 対照井戸 2 地点)に追加された. 2001 年度に汚染井戸周辺地区調査が実施された. その結果, 12 地点すべてが基準以下であった. 同地域では 2006 年度の環境モニタリングにより再度基準超過が判明し, 汚染井戸周辺地区調査が実施された. その結果, 7 地点のうち 1 地点が基準を超過した. そのため, 既存の定点モニタリング地点に 2006 年度に超過した井戸を 1 地点追加し, 現在までモニタリングを継続している(図 6).

今回 2007 年度調査(7 地点)の陽・陰イオンの結果と今年度調査した同地域の井戸 2 地点の計 9 地点の調査結果を再解析し, 井戸の分類を行った. その結果, 砒素が超過している井戸は他の井戸とは異なるグループに分類された(図 7). このことからこの地域の汚染の広がり比較的狭い地域に限定されることが推察された.



○ As<0.005 ▲ 0.005<As≤0.010 ■ 0.010<As (mg/L)

図 6 調査地点(牧之原市菅ヶ谷 21 地点)

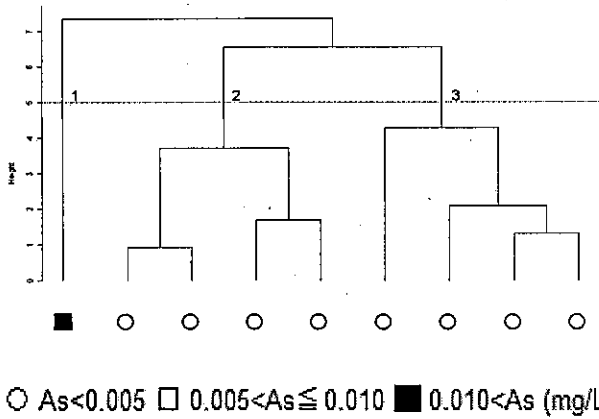


図7 クラスタ解析の結果(デンドログラム)

6) 袋井市南部

2000年度の環境モニタリングにより基準超過が判明し、汚染井戸周辺地区調査を実施した。その結果、5地点のうち1地点が基準を超過した。周辺に砒素を取り扱う事業所がないことなどから自然的要因であると推定された。同地域は翌年度から定点モニタリング(汚染井戸1地点、対照井戸2地点)に追加されモニタリングされていたが、汚染井戸が環境基準を5年以上連続して下回ったことにより2005年度にモニタリングを終了した。しかし、2006年度に他の地点で汚染が判明したため、2007年度から定点モニタリング(汚染井戸1地点、対照井戸2地点)に追加された。同地域では2007年度の環境モニタリングでも新たな基準超過が判明し、汚染井戸周辺地区調査が計4回実施された。その結果、1回目は13地点のうち3地点が基準超過、2回目は16地点のうち9地点が基準超過、3回目は29地点のうち10地点が基準超過、4回目は5地点のすべてが基準以内であった。翌年度からは既存の定点モニタリングの汚染井戸1地点、対照井戸1地点に2007年度に汚染が判明した汚染井戸1地点を追加し、現在までモニタリングを継続している(図8)。

2007年度調査(65地点)の陽・陰イオンの結果を再解析し、井戸の分類を行った。その結果、砒素検出群(0.005 mg/L以上)と未検出群では陽・陰イオンの傾向に差がみられた(図9)。また、クラスタ解析を行ったところ調査井戸は6グループに分類され、砒素が検出された井戸24地点のうち20地点が同じグループに属することが分かった(図10)。調査対象の井戸は深井戸が多く、水質は K^+ 、 Mg^{2+} 、 SO_4^{2-} が低値であった。この地域の地質は前述の通り後期更新世-完新世の新しい年代の地層であり、深井戸、低 SO_4^{2-} などの特徴から、砒素溶出要因は鉄

酸化物の還元による砒素の脱離溶解である可能性が示唆された。

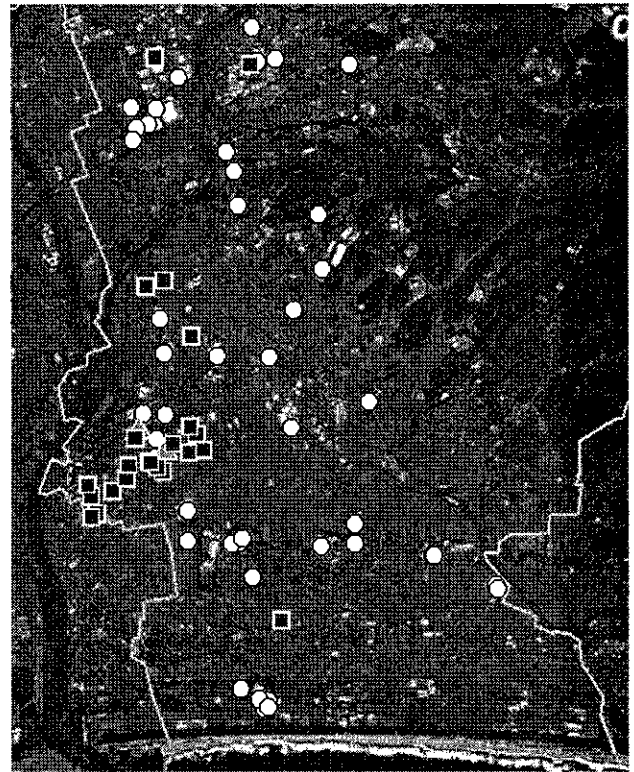


図8 調査地点(袋井市南部 65地点)

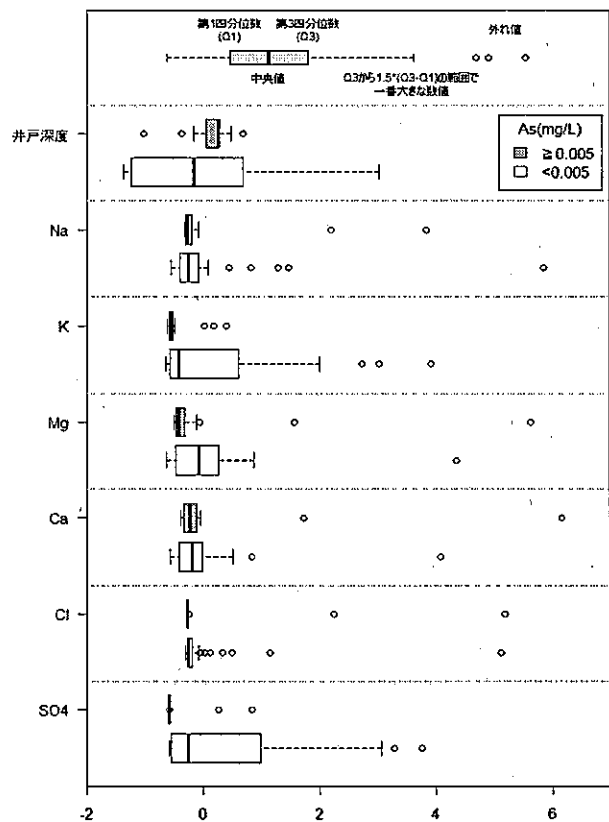


図9 2群の各調査項目の箱ひげ図(袋井市南部 65地点)

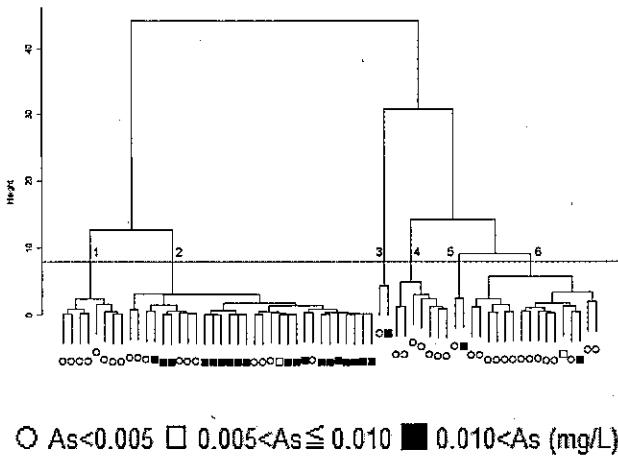


図 10 クラスタ解析の結果(デンドログラム)

4 今後の砒素汚染への対応について

地方自治体による地下水汚染事例への対応について調査した環境省の資料⁷⁾によると、各自治体は汚染が判明した場合、砒素を含む重金属等の汚染井戸調査は73%が「実施」・「調査中」・「調査実施予定」であった。重金属等の汚染が確認された地域の継続的な監視については75%が「実施中」・「実施予定」・「終了した」であった。また、全国における砒素の汚染原因としては自然的要因と推定される事例が大半(約90%)を占めており、自然的要因による汚染と判断した根拠としては「周辺に発生源が存在しないこと」が一番多く、次いで「文献や過去の調査報告から自然的要因による汚染地域であることが以前からわかっていた」、「水質の解析や土壌ガスの解析により判断」であった。

本県の今後の砒素汚染への対応については、他の地方自治体と同様に汚染が判明した場合には調査を実施し、汚染地域については継続監視していく必要があると考える。それに加えて、現在継続監視している井戸は今回の調査で関連がみられた項目(pH, 鉄, 陽・陰イオン, アルカリ度など)を追加し、水質の経時的な変化を監視していく必要があると考える。

また、現在砒素汚染が判明している地域で基準超過が判明した場合には、その井戸の pH, 鉄, 陽・陰イオンなどの項目を調査し、監視井戸の水質と類似性が確認された場合は既存の汚染井戸の地下水と同一水系とみなし、その地域の汚染井戸周辺地区調査は実施せず、必要に応じて監視井戸の整理などを実施することにより、効率的なモニタリングを行っていく必要があると考える。

参考文献

- 1) 島田允堯：ヒ素に汚染された地下水の起源と問題点, 資源地質, 53(2), 161-172(2003)
- 2) 吉村尚久, 赤井純治：土壌および堆積物中砒素の挙動と地下水汚染-総説-, 地球科学, 57, 137-154(2003)
- 3) 吉村尚久, 赤井純治：地質起源の地下水ヒ素汚染, 新潟応用地質研究会誌, 71, 9-20(2008)
- 4) 千葉県地下水汚染対策連絡会他：地下水砒素濃度分布図(1999)
- 5) 清野茂他：宮城県東松島市(旧鳴瀬町)野蒜地区における砒素汚染地下水の解析事例, 宮城県保健環境センター年報, 24, 101-104(2006)
- 6) 佐々木正人他：岐阜県下における砒素汚染地下水の水質特性事例, 岐阜県保健環境研究所報, 17, 12-16(2009)
- 7) 平成20年度地下水汚染事例に関する実態把握調査の結果について, 環境省ホームページ, <http://www.env.go.jp/water/report/h22-01/index.html>

富士山静岡空港開港に伴う大気環境影響に関する研究 (第2報)

— 大気汚染物質の実態調査および航空機からの排出量の試算 —

大気水質部 大気騒音環境班 石井 聖, 中西隆之^{*1}, 太田良和弘^{*2},
深澤 均

Study of the Environmental Air in the Area of Mt. Fuji Shizuoka Airport (II)
— Measurements of Air Pollutants and Calculations of airplane emissions —

Satoru ISHII, Takayuki NAKANISHI, Kazuhiro OHTARA
and Hitoshi FUKAZAWA

富士山静岡空港の開港に伴う大気環境影響を把握するため、開港後の大気環境調査を実施した。その結果、大気汚染物質等の大気中濃度は、オキシダント(Ox)を除いた全ての項目で環境基準を達成していた。また、開港前に実施した調査結果と比較したところ、大気汚染物質等の濃度は開港前に比べて同等か低い値であった。大気中の濃度が開港後に減少したのは広域的な現象と考えられ、周辺に設置された大気常時監視測定局の測定結果からも同様な傾向が確認された。また、航空機から排出される大気汚染物質の排出量を試算した結果、窒素酸化物(NO_x)の排出量は周辺市町の固定発生源からの排出量の約0.9%程度と試算され、航空機からの排出量が占める割合は低かった。以上の結果から空港開港に伴う大気環境への影響は軽微と推察された。しかし、今後の航空機離発着数の増加によっては、空港周辺の大気環境への影響が大きくなるおそれもあることから、空港の利用状況を注視し、必要に応じて実測調査や大気拡散シミュレーションを実施する必要があると考えられた。

Key words: 富士山静岡空港, 光化学オキシダント (Ox), 揮発性有機化合物 (VOCs)

Mt. Fuji Shizuoka Airport, photochemical oxidant, volatile organic compounds (VOCs)

はじめに

調査方法

富士山静岡空港は、牧之原市と島田市にまたがる地方管理空港として2009年6月4日に開港した。空港開港に伴う大気環境影響を調査するため、開港前の2004~2006年度に空港建設地周辺において事前調査が実施されている¹⁾。また、空港開港後の大気環境を把握するため、2009年度には空港周辺地域における大気汚染物質および揮発性有機化合物の実態調査を実施した²⁾。

今回、開港から1年が経過した空港周辺地域において大気環境の実態調査を実施し、開港前の調査結果および開港直後の調査結果と比較した。また、航空機からの大気汚染物質の排出量を試算し、空港開港に伴う環境影響について検討したので併せて報告する。

1 大気汚染物質の実態調査

1) 大気環境測定車による調査

大気自動測定機を搭載した大気環境測定車を設置し、大気汚染物質の1時間値を連続測定した。

① 調査場所

吉田町片岡 (表1, 図1を参照)

② 調査期間

春期: 2010年4月26日~5月31日

夏期: 2010年7月5日~8月9日

秋期: 2010年11月5日~11月30日

冬期: 2010年12月1日~12月24日

③ 調査項目

二酸化硫黄(SO₂), 浮遊粒子状物質(SPM), オキシダント(Ox), 窒素酸化物(NO₂, NO, NO_x), 一酸化炭素(CO), 炭化水素(NMHC, CH₄, THC), 風向風速(WD, WS)

2) キャニスターによる調査

ステンレス製のキャニスターへ、大気を1週間減圧採

静岡県環境衛生科学研究所

(〒420-8637, 静岡市葵区北安東4-27-2)

Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

(4-27-2, Kita-ando, Aoi-ku, Shizuoka, 420-8637, Japan)

*1 (財)しずおか産業創造機構 ファルマバレーセンター

*2 ぐらし・環境部環境局生活環境課

取し、GC-MSによって分析した。

① 調査場所

空港周辺7ヶ所(表1, 図1を参照)

② 調査時期

春期: 2010年5月24日~5月31日

夏期: 2010年7月26日~8月2日

秋期: 2010年9月27日~10月4日

冬期: 2010年12月10日~12月17日

③調査項目

揮発性有機化合物(以下:VOCs)9種(塩化ビニルモノマー, 1,3-ブタジエン, アクリロニトリル, ジクロロメタン, クロロホルム, 1,2-ジクロロエタン, ベンゼン, トリクロロエチレン, テトラクロロエチレン)

3)パッシブサンプラーによる調査

N式パッシブサンプラーを2~4週間暴露させ、イオンクロマトグラフによって分析した。

① 調査地点と内容

空港周辺6ヶ所(表1, 図1を参照)

② 調査時期

春期: 2010年5月24日~6月24日

夏期: 2010年7月12日~8月11日

秋期: 2010年10月22日~11月18日

冬期: 2010年11月18日~12月17日

③ 調査項目

二酸化硫黄(SO₂), オキシダント(Ox), 窒素酸化物(NO₂, NO, NOx)

2 気象特性の調査

調査期間中の気象状況については、大気環境測定車を設置した吉田町片岡(小山城駐車場)の平均風速, 風向出現頻度等の気象解析を実施し、空港周辺の気象特性について調査した。

3 航空機からの大気汚染物質排出量の試算

航空機のメインエンジンから排出される大気汚染物質の総量を調査するため、実際に運行されている機種や離発着数を調べた。その結果とICAO(国際民間航空機関)の

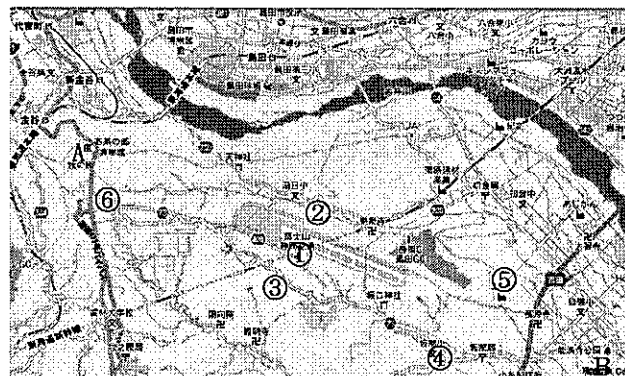


図1 調査地点

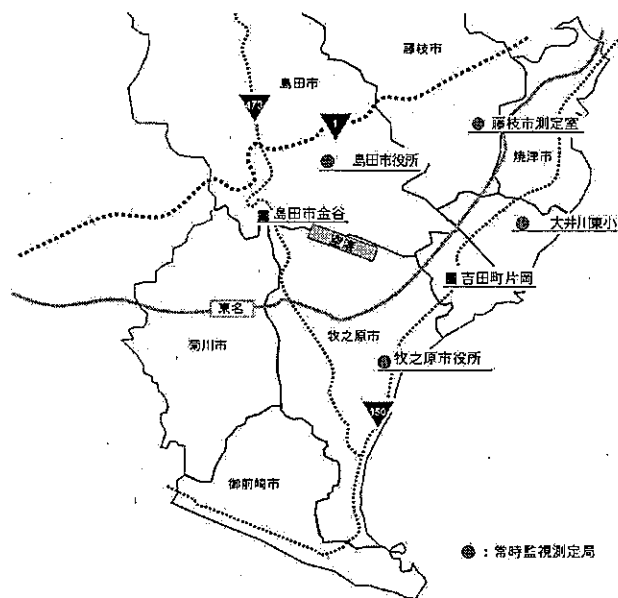


図2 空港周辺の大気常時測定局

データベース³⁾から得られたエンジンの排出係数を用いて、航空機からの排出量を試算した。

調査結果および考察

1 大気汚染物質の実態調査

1)大気環境測定車による調査

吉田町片岡に設置した大気環境測定車の測定結果と空

表1 調査内容

記号	地点名	地点概要	距離(Km)	標高(m)	調査内容
①	空港駐車場	空港消防庁舎横	0	170	パッシブサンプラー(SO ₂ , NOx, Ox), VOCs
②	島田市下湯日	旧ビジターセンター	0.7	80	パッシブサンプラー(SO ₂ , NOx, Ox), VOCs
③	牧之原市坂口	空港榛原連絡事務所	0.7	80	パッシブサンプラー(SO ₂ , NOx, Ox), VOCs
④	牧之原市坂部	坂部区民センター	3.0	20	パッシブサンプラー(SO ₂ , NOx, Ox), VOCs
⑤	島田市南原	南原公民館	3.6	30	パッシブサンプラー(SO ₂ , NOx, Ox), VOCs
⑥	島田市獅土居	民有地(お茶工場)	4.2	200	パッシブサンプラー(SO ₂ , NOx, Ox), VOCs
A	島田市金谷	お茶の郷博物館	4.6	200	2009年の大気環境測定車等調査地点
B	吉田町片岡	小山城駐車場	6.1	20	大気環境測定車(全項目), VOCs

港開港前の 2004 年度に実施した同地点での測定結果を表 2 に示す。開港後の調査地点における大気環境は、Ox を除いた全ての項目で大気環境基準を達成していた。また、2004 年度に実施した同地点での測定結果を比較したところ大気汚染物質の期間平均値は、SO₂、SPM、NO、NO₂、NOx で濃度の減少が見られ、CO、Ox、NMHC で濃度の上昇が見られた。

空港周辺に設置された大気常時監視測定局(図 2)の測定結果を表 3 に示す。その結果、吉田町片岡における大気環境は、周辺の大気環境と比較して概ね同一レベルで推移していた。

空港開港前後における大気汚染物質の濃度推移を比較するため、2010 年度に調査を実施した吉田町片岡と 2009 年度に調査を実施した島田市金谷の開港前後の濃度相対較差を図 3 に示した。その結果、吉田町片岡の大気環境は開港前に比べて SO₂ で-78%、NO で-60%、NOx で-43%と顕著な濃度の減少が見られた一方、CO では 56%、Ox では 15%、NMHC では 63%の濃度の上昇が見られた。島田市金谷で実施された調査の結果からも開港後の SO₂ および NOx

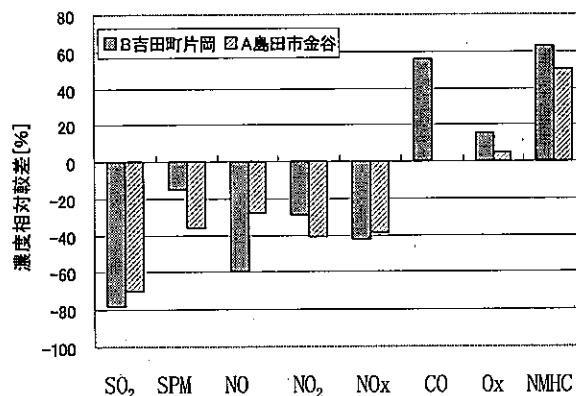


図 3 開港前後の濃度相対較差

等の顕著な濃度減少や Ox および NMHC の濃度上昇など、同様の傾向が確認された。

今回調査を実施した吉田町片岡や 2009 年度に調査を実施した島田市金谷における、開港前後の SO₂、NOx、SPM 等の濃度減少については、近年の自動車や工場からの排出抑制による広域的な濃度の減少と考えられ、空港周辺

表 2 大気環境測定車の測定結果(4 期間平均)

調査期間	項目	SO ₂	SPM	NO	NO ₂	NOx	CO	Ox	NMHC
		ppb	μg/m ³	ppb	ppb	ppb	ppm	ppb	ppmC
開港前(2004)	期間平均値	6	22	8	14	23	0.2	28	0.10
	日平均最高値	28	46	51	37	81	0.5	61	0.37
	時間最高値	86	99	133	58	173	0.9	144	1.59
開港後(2010)	期間平均値	1	19	3	10	13	0.3	32	0.16
	日平均最高値	4	53	16	23	32	0.5	66	0.26
	時間最高値	16	82	74	40	96	0.7	121	0.60
大気環境基準の達成状況*(2010)		○	○	-	○	-	○	×	-

* SO₂:1 時間値の 1 日平均値が 0.04ppm 以下であり、かつ、1 時間値が 0.1ppm 以下であること。
 SPM:1 時間値の 1 日平均値が 0.10mg/m³以下であり、かつ、1 時間値が 0.20mg/m³以下であること。
 NO₂:1 時間値の 1 日平均値が 0.04ppm から 0.06ppm までのゾーン内又はそれ以下であること。
 CO:1 時間値の 1 日平均値が 10ppm 以下であり、かつ、1 時間値の 8 時間平均値が 20ppm 以下であること。
 Ox:1 時間値が 0.06ppm 以下であること。

* ○=達成、×=未達成、-=基準なし

表 3 周辺測定局との期間平均値の比較

	SO ₂	SPM	NO	NO ₂	NOx	CO	Ox	NMHC
	ppb	μg/m ³	ppb	ppb	ppb	ppm	ppb	ppmC
吉田町片岡 (大気環境測定車)	1	19	3	10	13	0.3	32	0.16
島田市役所	2	23	5	14	20	-	28	0.13
牧之原市役所	-	-	4	12	16	-	30	-
大井川東小学校	1	-	4	12	15	-	-	-
藤枝市測定室	4	20	4	11	15	0.3	26	0.14

* 周辺測定局の平均値は 2010 年 4 月 26 日~12 月 24 日の測定値

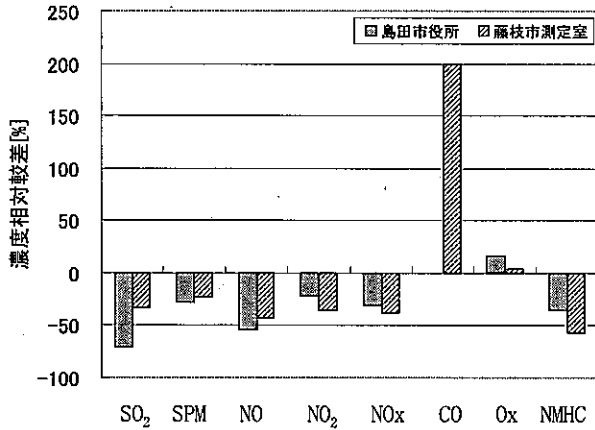


図4 開港前後の濃度相対較差

に設置された大気常時監視測定局の測定結果と比較しても同様の傾向が確認された(図4)。

一方、O₃の濃度上昇については全国的な傾向であり、従来の都市型の汚染に加え、大陸からの越境汚染が影響しているといわれている⁴⁾。また、COについて日平均最高値に変化は無く、時間最高値は減少していることから、開港に伴う影響は軽微と考えられた。NMHCに関しては開港後の濃度上昇が確認されている上、周辺測定局よりも比較的高い値を示すなど、調査地点における特異的な濃度上昇が確認された。なお、日平均最高値や時間最高値は減少していることから開港前と比較して、高濃度の発生事例は減少していた。

2) キャニスターによる調査

キャニスターにより捕集、分析したVOCsの測定結果を表4、表5に示す。調査地点7ヶ所におけるVOCsの大気中の濃度はいずれも環境基準値および環境指針値を大幅に下回っており、全国的一般環境調査の結果と比較しても概ね同一レベルであった。

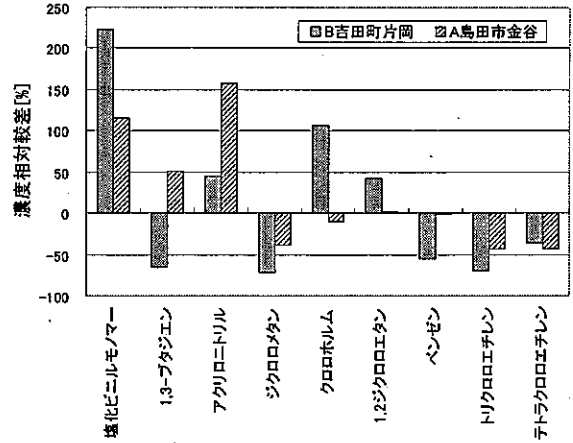


図5 開港前後の濃度相対較差

調査地点間の比較をした結果、塩化ビニルモノマーが③牧之原市坂口で0.13 μg/m³、1,3-ブタジエンが①空港駐車場で0.21 μg/m³と他地点と比較して高い値を示した。上記2物質については、いずれも検出下限値以下のデータ含む上、春期の高い値の影響を受けていた。

また、ジクロロメタンについては④牧之原市坂部で1.7 μg/m³と他地点より高い値を示しているが、これについては4期間を通じて他地点より高い傾向があった。

クロロホルムについては、吉田町片岡で0.37 μg/m³と比較的高く、特に夏期に高い値を示していた。その他の物質については、地点間の差は僅かであった。

航空機の排ガスに含まれるVOCsとして、ベンゼン、1,3-ブタジエン等がある⁵⁾が、ベンゼンについては各地点間で大きな差は見られず、1,3-ブタジエンについては①空港駐車場で比較的高い値を示した。しかし、これらの物質は自動車等の排気ガス中にも含まれるため、空港駐車場の自動車等の影響も考えられた。

空港開港前の2004年度に実施された、吉田町片岡にお

表4 VOCs 調査結果(4期間平均^{*1)})

								(μg/m ³)			
	①	②	③	④	⑤	⑥	B	B(2004)	全国 ^{*2}	基準値等 ^{*3}	
塩化ビニルモノマー	0.047	0.046	0.13	0.046	0.053	0.049	0.048	0.015	0.053	10 G	
1,3-ブタジエン	0.21	0.045	0.054	0.049	0.082	0.059	0.052	0.15	0.18	2.5 G	
アクリロニトリル	0.034	0.048	0.047	0.042	0.055	0.043	0.061	0.042	0.093	2 G	
ジクロロメタン	0.75	0.76	0.74	1.7	0.90	0.72	0.97	3.4	2.3	150 S	
クロロホルム	0.22	0.23	0.23	0.31	0.21	0.33	0.37	0.18	0.22	18 G	
1,2-ジクロロエタン	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.15	0.11	0.16	1.6 G	
ベンゼン	0.63	0.57	0.55	0.60	0.72	0.64	0.62	1.4	1.4	3 S	
トリクロロエチレン	0.10	0.11	0.10	0.11	0.14	0.10	0.12	0.40	0.65	200 S	
テトラクロロエチレン	0.12	0.11	0.13	0.11	0.16	0.15	0.13	0.20	0.23	200 S	

*1 春夏秋冬の4期間を平均し、検出下限値以下のデータは検出下限値の1/2として平均した。

*2 全国平均は平成20年度データ

*3 S:環境基準項目, G:環境指針項目

表5 VOCs 調査結果(各期間別)

($\mu\text{g}/\text{m}^3$)

【春期】(2010.5.24~5.31)	①	②	③	④	⑤	⑥	B
塩化ビニルモノマー	0.031	0.027	0.33	0.026	0.041	0.038	0.035
1,3-ブタジエン	0.67	0.038	0.051	0.051	0.077	0.080	0.050
アクリロニトリル	0.055	0.10	0.068	0.063	0.090	0.080	0.10
ジクロロメタン	1.4	1.4	1.5	2.3	2.0	1.3	1.6
クロロホルム	0.50	0.31	0.40	0.42	0.37	0.53	0.34
1,2-ジクロロエタン	0.15	0.15	0.17	0.14	0.14	0.15	0.15
ベンゼン	0.93	0.78	0.89	0.78	1.2	1.0	0.92
トリクロロエチレン	0.20	0.18	0.20	0.18	0.30	0.24	0.20
テトラクロロエチレン	0.24	0.22	0.26	0.22	0.40	0.34	0.26
【夏期】(2010.7.26~8.2)	①	②	③	④	⑤	⑥	B
塩化ビニルモノマー	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,3-ブタジエン	ND	ND	ND	0.014	ND	0.023	ND
アクリロニトリル	0.056	0.064	0.09	0.051	0.097	0.070	0.11
ジクロロメタン	0.42	0.44	0.23	2.4	0.35	0.38	0.65
クロロホルム	0.11	0.31	0.17	0.45	0.21	0.44	0.72
1,2-ジクロロエタン	0.094	0.096	0.073	0.094	0.11	0.088	ND
ベンゼン	0.085	0.14	ND	0.17	0.031	0.18	0.12
トリクロロエチレン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.051
テトラクロロエチレン	0.052	0.056	0.064	0.049	0.069	0.059	0.065
【秋期】(2010.9.27~10.4)	①	②	③	④	⑤	⑥	B
塩化ビニルモノマー	ND	ND	0.12	ND	0.11	ND	ND
1,3-ブタジエン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
アクリロニトリル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ジクロロメタン	0.68	0.66	0.76	1.2	0.72	0.77	1.0
クロロホルム	0.14	0.15	0.17	0.22	0.13	0.24	0.15
1,2-ジクロロエタン	0.098	0.095	0.10	0.088	0.093	0.10	0.098
ベンゼン	0.64	0.60	0.54	0.64	0.72	0.58	0.61
トリクロロエチレン	0.14	0.14	0.15	0.16	0.14	0.12	0.14
テトラクロロエチレン	0.12	0.11	0.13	0.11	0.11	0.13	0.12
【冬期】(2010.12.10~12.17)	①	②	③	④	⑤	⑥	B
塩化ビニルモノマー	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,3-ブタジエン	0.085	0.064	0.086	0.069	0.098	0.072	0.078
アクリロニトリル	0.017	0.020	0.020	0.045	0.025	0.012	0.025
ジクロロメタン	0.51	0.55	0.48	1.0	0.53	0.42	0.64
クロロホルム	0.13	0.13	0.18	0.13	0.12	0.12	0.28
1,2-ジクロロエタン	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
ベンゼン	0.85	0.74	0.77	0.82	0.92	0.79	0.84
トリクロロエチレン	0.053	0.082	0.046	0.072	0.081	0.036	0.089
テトラクロロエチレン	0.063	0.061	0.062	0.066	0.062	0.068	0.059

ける調査結果との比較を図5に示す。その結果、塩化ビニルモノマーで223%, アクリロニトリルで46%, クロロホルムで107%, 1,2-ジクロロエタンで42%の濃度の増加が確認され、その他の項目については開港前に比べて濃度が減少していた。

また、空港開港直後の2009年度に実施した島田市金谷での調査結果では、開港前の2006年度の調査結果との比較から、塩化ビニルモノマーで116%, 1,3-ブタジエンで51%, アクリロニトリルで157%の濃度の増加が確認されていた²⁾。

なお、県内の一般環境中におけるVOCs濃度の経年変化は、クロロホルム以外の測定項目については緩やかな減少傾向にあった。

3) パッシブサンプラーによる調査

各調査地点における2009,2010年度のパッシブサンプラーの測定結果を図6に示す。2010年度はOx, NOx, SO₂の各項目とも①空港駐車場, ④牧之原市坂部, ⑥島田市獅土居で他地点より比較的高い値を示していた。また、2009年度の測定結果も同様に、各項目とも①空港駐車場, ④牧之原市坂部, ⑥島田市獅土居の値が比較的高い値を示していた。特に2010年度の⑥島田市獅土居では、全ての項目で高い値を示していた。その理由として、同地点は国道473号と空港-東名牧之原ICを結ぶアクセス道路の交差点に位置し、交通量の多い地点であると考えられ、自動車の影響が大きいと思われた。また、NOxの濃度が二番目に高かった①空港駐車場については、空港利用客や従業員等の自動車や航空機、作業車等の影響による濃度上昇と思われた。

なお、空港直近の②島田市下湯日, ③牧之原市坂口での値は空港から距離のある他地点より濃度が低いことから、空港本体からの周辺環境への影響は軽微と考えられた。

2 気象特性の調査

調査期間中の吉田町片岡の風配図を図7に示す。4期間を通して南西の風が卓越しており、平均風速は4.7m/sであった。各期間別の最多風向と平均風速を表6に示す。4期間ともに南西の風の出現頻度が高く、秋期については、南西の風に加え北西の風の出現頻度も高くなった。

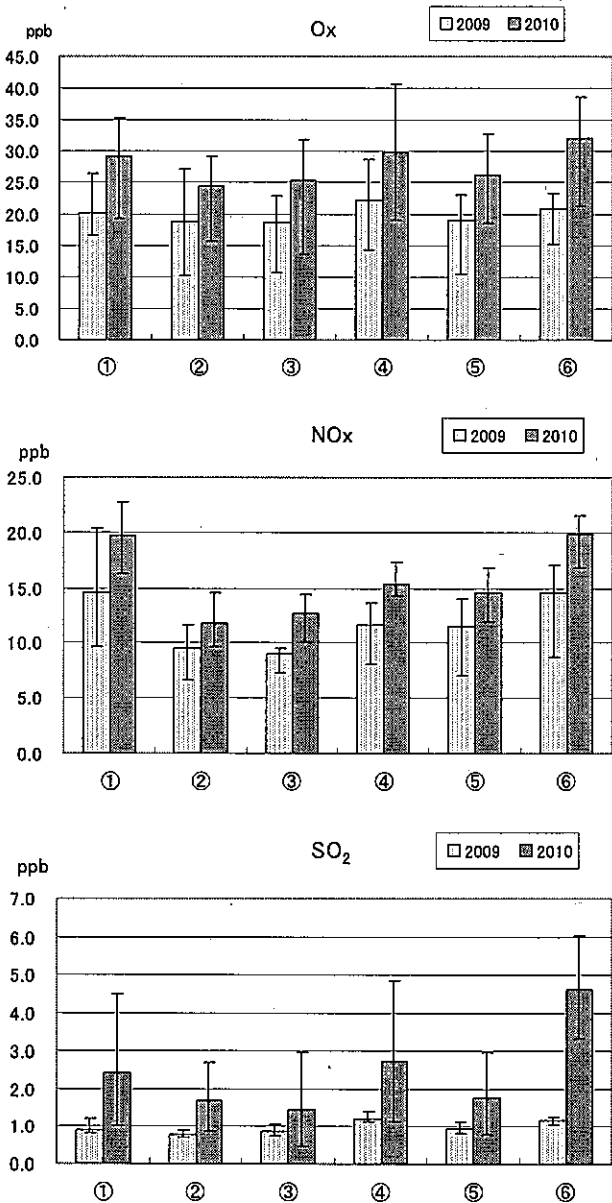


図6 パッシブサンプラーによる測定結果

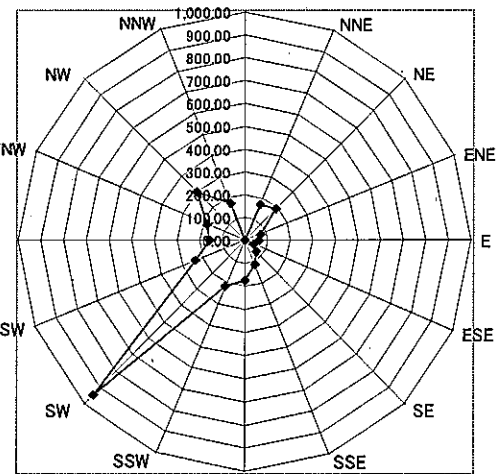


図7 調査期間中の風配図(吉田町片岡)

表6 期間別最多風向と平均風速(吉田町片岡)

	春期	夏期	秋期	冬期
最多風向 (出現頻度)	南西 (23%)	南西 (42%)	南西 (24%)	南西 (37%)
平均風速 (m/s)	5.2	4.9	3.7	5.0

3 航空機からの大気汚染物質排出量の試算

航空機からの大気汚染物質排出量の試算は、LTO(Landing and Take Off)サイクルによる高度約 1000メートルまでの離発着にともなう排出量を対象としている。LTO サイクルはテイクオフ、クライム、アプローチ、アイドルの4つの運転モードに区分され、それぞれの運転モードにおけるエンジン出力、所要時間および各メインエンジンからの排出係数をもとに排出量が試算されている。今回の調査では、ICAO(国際民間航空機関)の資料⁹⁾をもとに試算を行なった。

静岡空港を利用している各航空機からの排出量を表 9 に示した。空港へは定期便、臨時便、個人利用等の航空機が離発着しているが、特に影響が大きいと想定されるジェット機については、機種別に示した。一方、プロペラ機は Beech King Air を、ヘリコプターについては R44 を代表する機種として仮定した。

試算の結果を表 10 に示す。静岡空港における航空機からの大気汚染物質の排出量は HC で 1.89t/年、NOx で 34.44t/年、CO で 27.62t/年であった。各航空機別に見ると、ジェット機からの排出量が多くなり、次いでプロペラ機からの排出が多くなっていた。なお、プロペラ機として仮定した Beech King Air は双発のターボプロップエンジンを搭載しているため排出量は高めに計算される一方、ヘリコプターの R44 は単発のピストンエンジンであるため低めに計算されている。

平成17年度大気汚染物質排出量総合調査結果⁹⁾をもとに空港周辺市町の固定発生源からの大気汚染物質排出量を試算したところ、NOx 排出量は 3833t/年だった。静岡空港全体を固定発生源とした場合、離発着する航空機か

らの NOx 排出量が占める割合は約 0.9%程度と試算され、その影響は軽微と推察された。

なお、航空環境研究センターが 2000 年に実施した調査⁷⁾によると、国内の主要な空港である東京国際空港の平成 9~10 年の年間の排出量は、HC で 659.5t/年、NOx で 2658.2t/年、CO で 2524.1t/年であった。また、各種実測結果、シミュレーション結果から、空港周辺における航空機からの大気汚染物質排出量の寄与度は、空港敷地内に比べて低く影響は少ないものとされていた。

表 10 航空機からの大気汚染物質排出量 (t/年)

	HC	NOx	CO
ジェット機	1.66	34.34	25.56
プロペラ機	0.22	0.10	1.01
ヘリコプター	0.01	0.00	1.05
合計	1.89	34.44	27.62

*2009年8月~2010年7月の離発着数を利用

まとめ

空港開港後の空港周辺における大気汚染物質の濃度は、Ox を除く全ての項目で環境基準を達成していた。また、開港前後の比較では各項目とも著しい濃度の上昇は確認されなかったが、NMHC に関しては吉田町片岡で濃度の上昇が確認され、島田市金谷においても濃度の上昇が確認された。同 2 地点については、周辺の大気常時監視測定局の測定結果より比較的高い値を示しており、特異的な濃度の上昇が確認された。

VOCs の濃度については、2009、2010 年度ともに全ての項目で環境基準値や環境指針値を大幅に下回っており、

表 9 各航空機の大気汚染物質排出量

航空機	エンジン	排出量(kg/機)			燃料流量 (kg/s)	離発着機数 (機/年) ^{*1}	
		HC	NOx	CO			
ジェット機	A319	CFM56-5A5	0.59	8.73	6.35	730	36
	A320	CFM56-5A1	0.57	9.01	6.19	770	139
	A321	CFM56-5B3/P	1.42	16.72	7.55	956	300
	B737-700	CFM56-7B22	0.86	9.12	8.00	780	725
	B737-800/900	CFM56-7B26	0.72	12.30	7.07	882	418
	B767-300	PW4060	1.19	28.19	14.47	1774	44
	MD-81	JT8D-209	2.09	6.95	10.15	938	3
	MD-90	V2525-D5	0.06	10.76	5.53	874	274
	ERJ-170	CF34-8E5	0.04	4.44	4.13	482	2655
	C525/560 ^{*1}	PW545A	3.35	0.74	34.07	340	9
プロペラ機 ⁹⁾	Beech King Air	PT6A-42	0.64	0.30	2.97	70	340
ヘリコプター ⁹⁾	R44	HI0-540	0.12	0.02	8.79	9	119

*1 臨時便の A330, A300 は A321 として、E190 は ERJ-170 として、B737-400 は B737-700 としてカウントした。

全国の一般環境調査と比較しても概ね同一レベルであった。また、空港開港前後の比較では、塩化ビニルモノマーやアクリロニトリル等で濃度の上昇が見られたが、検出下限値以下のデータを含むなど低濃度である上、春期の高い値の影響を受けていた。

航空機からの大気汚染物質排出量について試算した結果、空港全体ではHCで1.89t/年、NOxで34.44t/年、COで27.62t/年であった。航空機別ではジェット機からの排出量が全体の約9割を占め、次いでプロペラ機、ヘリコプターの順で排出量が多かった。

以上の結果から、空港周辺の大気環境は開港前と比較して同等か清浄であり、周辺の一般環境と比較しても概ね同一レベルで推移するなど、空港開港に伴う大気環境への影響については軽微と推察された。しかし、今後の航空機離発着数の増加等によっては、大気環境への影響が大きくなる恐れもあることから、空港の利用状況を注視し、状況に応じて実測調査や大気拡散シミュレーションを実施する必要があると考えられた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、調査地点の選定や調査場所の提供等に御尽力いただいた関係各位、ならびに県空港関係部署の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 太田良和弘：富士山静岡空港環境事前調査について、静岡県環境衛生科学研究所報告，49，103-108(2006)
- 2) 太田良和弘：富士山静岡空港開港に伴う大気環境影響に関する研究(第1報)，静岡県環境衛生科学研究所報告書，52，97-102(2009)
- 3) International Civil Aviation Organization (ICAO)：ICAO Engine Exhaust Emissions Databank
<http://www.icao.int/>
- 4) 光化学オキシダント・対流圏オゾン検討会報告書中間報告，光化学オキシダント・対流圏オゾン検討会(2007)
- 5) 橋本弘樹：航空機から排出される揮発性有機化合物の採取と測定，航空環境研究センター研究報告，11，31-36(2007)
- 6) 環境省：平成17年度大気汚染物質排出量総合調査
- 7) 橋本弘樹：東京国際空港およびその周辺における航空機排出物の影響実態調査と大気拡散シミュレーションによる環境影響評価，航空環境研究，4，30-44(2000)
- 8) International Civil Aviation Organization (ICAO)：Airport Air Quality Guidance Manual(2007)
- 9) Federal Office of Civil Aviation (FOCA), Swiss: Guidance on the Determination of Helicopter Emissions(2009)

他誌に発表した論文

環境科学部

1) A simple method for screening emission sources for carbonyl compounds in indoor air

Shohei Yamashita, Kazunari Kume, Toshiyuki Horiike,
Nobuyuki Honma, Masahiro Fusaya, Takeshi Ohura,
Takashi Amagai

Journal of Hazardous Materilas 178 (2010) 370-376

Volatile organic compounds (VOCs) emitted from building and furnishing materials are frequently observed in high concentration in indoor air. In such cases, nondestructive analytical methods are necessary for screening the emission sources by determining main parameters influencing indoor concentration of the chemical substances. For this objective, we have developed a new flux sampler (emission cell for simultaneous multi-sampling; ECSMS) which is used for screening indoor emission sources of VOCs and estimating the emission rates of them. Because ECSMS is based on passive sampling technique, it can be easily used on-site at a low cost. Among such VOCs, the low molecular weight carbonyl compounds including formaldehyde are frequently detected in high concentration in indoor environment. In this study, we have determined reliability of ECSMS for the collection of formaldehyde and other carbonyl compounds emitted from wood-based composites of medium density fiberboards (MDFs) and particle boards (PBs). We then predicted concentration of formaldehyde emitted from a shelf in a large chamber from the ECSMS measurement data. Simultaneously, the concentration was measured directly by active sampling method. The values from the two methods were quite similar, suggesting that ECSMS measurement is an effective method for screening primary sources influencing indoor concentration for the carbonyl compounds.

微生物部

1) モノクロラミン消毒による浴槽レジオネラ属菌の衛生対策

杉山寛治, 小坂浩司, 泉山信司, 縣 邦雄, 遠藤卓郎
保健医療科学 Vol.59 No.2 109-115 (2010)

循環ろ過式浴槽モデルにおいて、モノクロラミンを浴槽水へ投入して、入浴を伴った実験で消毒効果を確認した。2週間にわたるモノクロラミン濃度 (3 mg/L) の維持で、期間内の浴槽水、ろ過器内水のレジオネラ属菌、アメーバを不検出に、従属栄養細菌数もほぼ不検出と良好な衛生状態であった。ろ過材、ヘアーキャッチャー、配管におけるバイオフィーム形成もほとんどみられず、レジオネラ属菌、アメーバも不検出であった。また、モノクロラミン消毒によってカルキ臭が生じない利点が確認された。浴槽水のモノクロラミン消毒は次亜塩素酸ナトリウムに替わる新しい消毒方法として期待できる結果が得られた。

2) 2009~2010年に静岡県で発生したノロウイルス集団胃腸炎事例について

長岡宏美, 湊 千壽, 山田俊博, 川森文彦, 杉山寛治
病原微生物検出情報 Vol.31 No.11 320-321 (2010)

2009~2010年に発生したノロウイルス (NoV) 起因集団胃腸炎の54事例から検出されたNoVの遺伝子型について解析を行った。検出されたNoVのgenogroup (G) は、GIが7事例、GIIが45事例で、2事例からはGIとGIIの両方が検出された。NoV集団胃腸炎事例の87%から検出されているGIIの遺伝子型は、2009年はそれ以前から主流となっていたGII/4が58%の事例で確認されたのに対し、2010年はGII/2が全事例の54%を占め、GII/4は13%にとどまった。このような、遺伝子型の推移が、NoVの流行に関与していることが推測される。

3) ノロウイルスの流行と遺伝子型の変遷

長岡宏美

平成22年静岡県の食中毒 静岡県厚生部監修 82-87 (2011)

ノロウイルス (NoV) 患者数は、2006/2007年シーズンと2010/2011年シーズンに大幅に増加したが、大流行する年は、感染症発生動向調査の感染性胃腸炎患者数の立ち上がりは早くなる傾向が認められた。2010/2011年シーズンは、NoVによる集団胃腸炎事例が大幅に増加したが、検出されたNoVの遺伝子型を解析したところ、2009/2010年シーズンまでは感染の主流がgenogroup (G) II/4であったが、2010/2011年シーズンは感染の主流が前半はGII/2、後半はGII/3へと遺伝子型が変遷したことが確認された。2010/2011年シーズンはNoVの流行株が、多くの人が免疫を獲得していない遺伝子型のNoVに推移したことが、流行の拡大に結びついたことが推測される。

4) A survey of β -lactamase-producing *Escherichia coli* from farm animals and raw retail meat in Shizuoka prefecture, Japan.

Hiroi, M., Harada, T., Kawamori, F., Takahashi, N.,
Kanda, T., Sugiyama, K., Masuda, T., Yoshikawa, Y.
and Ohashi, N.

Jpn. J. Infect. Dis. 64. 153-155 (2011)

We surveyed β -lactamase-producing *Escherichia coli* from farm animals (chickens, pigs, and cattle) and raw retail meat in Shizuoka prefecture, Japan. In total 305 *E. coli* isolates, 15 isolates collected from broilers, beef cattle, chicken meat, and pork meat, were found to contain β -lactamase genes encoding CTX-M-2, CTX-M14, CMY-2, SHV-2, and/or TEM-1, whereas 7 possessed mutations in the *ampC* promoter region. The findings suggest that broilers are more important than other farm animals with regards to the surveillance of β -lactamase-producing *E. coli* in this region.

医薬食品部

1) 次世代有糸分裂阻害剤：CENP-E 阻害剤の創製と抗腫瘍効果

小郷尚久

ファルマシア, Vol. 47, No. 2, 166-167 (2011)

近年、抗がん剤開発において標的となるタンパク質に選択的に作用する分子標的薬の研究開発が注目されている。その中でも特に、従来の抗がん剤（パクリタキセルやビンクリスチンなどの有糸分裂阻害剤）と同様の治療効果が期待でき、且つ骨髄毒性、中枢・末梢神経障害などの副作用が低減できると注目されているキネシンモータータンパク質 Centromere-associated protein E (CENP-E) とその阻害剤の開発状況について概説した。

学会・研究会の報告

環境科学部

- 1) 富士地域における化学物質の環境中濃度に関する研究
中川寛基, 久米一成, 神谷貴文
第19回環境化学討論会
2010. 6. 21~23 (春日井)
- 2) 静岡県におけるヤンバルトサカヤスデの発生状況と生態特性に関する予備的考察
神谷貴文, 飯田奈都子
第33回日本土壌動物学会大会
2010. 5. 29~30 (京都)
- 3) 富士山の地下水と湧水保全
村中康秀, 渡邊雅之, 神谷貴文
日本景観学会
2010. 11. 6(三島)
- 4) 富士山周辺域の地下水・湧水の水質の特徴と地域特性
神谷貴文, 渡邊雅之, 村中康秀, 申基澈, 中野孝教
日本地下水学会 2010 年秋季講演会
2010. 11. 11~13 (和歌山)
- 5) 粒子状多環芳香族炭化水素の季節及び空間的濃度変動に関する研究
久米一成
平成 22 年度国立環境研究所とのミーティング
2010. 12. 03(つくば)
- 6) 室内環境汚染問題における現状と課題について
久米一成
平成 22 年度東海地区環境試験研究機関会議化学物質分科会
2010. 12. 21 (各務原)
- 7) 静岡県に生息する外来不快感虫ヤンバルトサカヤスデの生態特性について
神谷貴文, 飯田奈都子
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡)
- 8) 静岡県における外来種 (フロリダマミズヨコエビ) の生態調査
久米一成
第 26 回全国環境研究所交流シンポジウム
2011. 2. 17(つくば)
- 9) 外来不快感虫ヤンバルトサカヤスデの生態特性
神谷貴文, 飯田奈都子
第 58 回日本生態学会大会
2011. 3. 8~12 (札幌)

微生物部

- 1) Multiplex リアルタイム PCR による「つつが虫病」および「紅斑熱」の迅速診断
川森文彦, 長岡宏美, 杉山寛治, 山本正悟, 大橋典男
第 84 回日本感染症学会総会
2010. 4. 5 (京都)
- 2) 食鳥処理場および養鶏農場の肉用鶏から分離された基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生菌群の解析
廣井みどり, 山崎史恵, 松井繁幸, 神田 隆, 杉山寛治, 大橋典男
平成 22 年度日本獣医公衆衛生学会 (中部)
2010. 9. 4~5 (長野)
- 3) 清涼飲料水の開封・口飲みでの汚染微生物の挙動
神田 隆, 金澤裕司, 小沢一弘, 後藤慶一, 大西貴弘, 小沼博隆, 杉山寛治, 工藤由紀子
第 100 回日本食品衛生学会学術講演会
2010. 9. 16 (熊本)
- 4) 循環ろ過式浴槽モデルにおけるモノクロラミンの消毒効果
杉山寛治, 神田 隆, 西尾智裕, 八木美弥, 田栗利紹, 泉山信司, 八木田健司, 倉 文明, 小坂浩司, 遠藤卓郎
第 37 回日本防菌防黴学会年次大会
2010. 9. 29 (東京)
- 5) EMA-qPCR による浴槽中のレジオネラ生菌検出法の検討
神田 隆, 高橋奈緒子, 八木美弥, 西尾智裕, 杉山寛治, 泉山信司, 常 彬, 倉 文明, 遠藤卓郎
第 37 回日本防菌防黴学会年次大会
2010. 9. 29 (東京)
- 6) 静岡県におけるマダニ採取状況およびマダニから検出された紅斑熱群リケッチア DNA の解析
川森文彦, 湊 千壽, 山田俊博, 長岡宏美, 杉山寛治
第 25 回 地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部ウイルス研究部会研究会
2010. 10. 8 (横浜)
- 7) 日本における腸炎ビブリオ食中毒の発生と二枚貝のビブリオ汚染状況
西尾智裕, 田中廣行, 中川 弘, 八尋俊輔, 山崎省吾, 齊藤志保子, 大友良光, 岩出義人, 大塚佳代子, 杉山寛治, 小沼博隆, 熊谷 進, 小西良子, 工藤由紀子
第 31 回日本食品微生物学会学術総会
2010. 11. 11~12 (滋賀)

- 8) 循環ろ過式浴槽モデルにおけるモノクロラミン消毒の
効果
神田 隆, 高橋奈緒美, 八木美弥, 西尾智裕,
杉山寛治, 泉山信司, 遠藤卓郎
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡)
 - 9) 肉用鶏の基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産
生菌群保菌状況調査
廣井みどり, 松井繁幸, 野田佳宏, 久保亮一,
飯田奈都子, 高橋奈緒美, 八木美弥, 西尾智裕, 神田 隆,
杉山寛治, 大橋典男
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡) (誌上発表)
 - 10) リアルタイムPCR法による細菌性食中毒起因菌の迅速
スクリーニング法の検討
飯田奈都子, 高橋奈緒美, 廣井みどり, 八木美弥,
西尾智裕, 神田 隆, 杉山寛治
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡)
 - 11) 外来不快害虫ヤンバルトサカヤスデのミトコンドリ
ア DNA 解析～侵入起源解明のための予備的検討～
飯田奈都子, 神谷貴文, 村上 賢
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡)
 - 12) 2009～2010 年に静岡県で発生した集団胃腸炎事例か
ら検出されたノロウイルスの遺伝子解析
長岡宏美, 湊 千壽, 山田俊博, 川森文彦, 杉山寛治
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡)
 - 13) 静岡県におけるマダニ採取状況およびマダニの紅斑
熱群リケッチア保有状況
川森文彦, 湊 千壽, 山田俊博, 長岡宏美, 杉山寛治
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡)
 - 14) 食鳥処理場および養鶏農場の肉用鶏から分離された
基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生菌群の解析
廣井みどり, 山崎史恵, 松井繁幸, 神田 隆,
杉山寛治, 大橋典男
平成 22 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会
2011. 2. 12 (岐阜)
 - 15) 静岡県内のネコにおける毒素産生 *Corynebacterium*
ulcerans の分離状況
高橋奈緒美, 飯田奈都子, 廣井みどり, 八木美弥,
西尾智裕, 神田 隆, 杉山寛治, 保科麻衣子,
小宮貴子, 高橋元秀
平成 22 年度地研全国協議会関東甲信静支部細菌研
究部会 総会・研究会
2011. 2. 18 (栃木)
 - 16) リアルタイムPCR法による食中毒起因菌一斉迅速スク
リーニング法の検討
飯田奈都子, 高橋奈緒美, 廣井みどり, 八木美弥,
西尾智裕, 神田 隆, 杉山寛治
平成 22 年度地研全国協議会関東甲信静支部細菌研
究会
2011. 2. 18 (栃木)
- 医薬食品部
- 1) 日本薬局方 *L*-メントール試験法の問題点について—GC
法の適用—
上村慎子, 尾藤孝弘, 水野くみ子, 上野千恵,
山本真也, 宮本憲吾, 前田有美恵, 高橋一則
第 47 回全国衛生化学技術協議会年会
2010. 11. 11～12 (兵庫)
 - 2) 動物用医薬品標準液の長期保存における経時変化につ
いて
浅賀彦人, 相曾いずみ, 影山知子, 堀池あずさ,
高橋一則
第 47 回全国衛生化学技術協議会年会
2010. 11. 11～12 (兵庫)
 - 3) 医薬部外品「染毛剤」の知事承認申請に関するガイド
ブック作成
山本真也, 内田恭之, 宮本憲吾, 上村慎子,
前田有美恵, 高橋一則
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡)
 - 4) ガスクロマトグラフィーによる日本薬局方 *L*-メントール
試験法の検討
上村慎子, 尾藤孝弘, 水野くみ子, 上野千恵,
山本真也, 宮本憲吾, 前田有美恵, 高橋一則
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡)
 - 5) カビ毒の分析～イムノアフィニティカラム法の検討～
影山知子, 浅賀彦人, 相曾いずみ, 堀池あずさ,
前田友幸, 高橋一則
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡)
 - 6) 動物用医薬品標準液の長期保存における経時変化につ
いて
影山知子, 浅賀彦人, 相曾いずみ, 堀池あずさ,
中島美穂, 高橋一則
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡)
 - 7) サプリメントの成分および品質等について
小林千恵, 横山玲子, 高橋一則
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡)

- 8) 血清中のトランス脂肪酸の分析について
相曾いずみ, 浅賀彦人, 影山知子, 堀池あずさ,
高橋一則, 井上広子, 桑野稔子
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡)
 - 9) 染毛剤の知事承認申請に関する審査の問題点(TLCを用いた確認試験等について)
山本真也, 内田恭之, 宮本憲吾, 上村慎子,
前田有美恵, 高橋一則
平成 22 年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部理化学研究部会研究会
2011. 2. 18 (横浜)
 - 10) GC-FID による血清中のトランス脂肪酸の分析法の開発
相曾いずみ, 浅賀彦人, 影山知子, 堀池あずさ,
高橋一則, 井上広子, 桑野稔子
日本薬学会第 131 年会
2011. 3. 30 (静岡)
- 大気水質部
- 1) AODによる静岡県内河川の水質評価
内山道春, 清水直美, 濱口浩太, 青木一永, 小池 明
平成 22 年度全国環境研協議会関東甲信静支部水質部会
2010. 10. 29 (東京)
 - 2) 魚を用いた新たな水質評価法(AOD)について
内山道春, 清水直美, 濱口浩太, 青木一永, 小池 明
静岡県研究機関成果発表会
2010. 10. 30 (静岡)
 - 3) 富士山麓ブナ林の生理活性と大気環境調査
石井 聖, 中西隆之, 太田良和弘, 深澤 均,
篠原英二郎, 萱沼広行, 鈴木守正
C 型「ブナ林生態系における環境・生物モニタリングシステム」に係る検討会
2010. 11. 11 (鳥取)
 - 4) AOD法(水族環境診断法)による新たな水質評価方法の検討
濱口浩太, 内山道春, 清水直美, 青木一永, 小池 明,
鈴木守正
第 37 回環境保全・公害防止研究発表会
2020. 11. 16 (浦和)
 - 5) 石綿除去現場等における繊維状物質漏洩の迅速な確認方法について
石井 聖, 中西隆之, 篠原英二郎, 萱沼広行,
鈴木守正
第 47 回静岡県公衆衛生研究会
2011. 2. 10 (静岡)
 - 6) 静岡県における光化学オキシダントによるアサガオの被害調査
上野千恵, 中西隆之, 太田良和弘, 篠原英二郎,
萱沼広行, 鈴木守正
C 型「植物のオゾン被害とストレス診断に関する研究」ワークショップ
2011. 2. 25 (つくば)

表彰等

環境科学部

- 1) (独) 日本学術振興会 平成 22 年度科学研究費補助金 (奨励研究)
「室内における VOCs 汚染源のオンサイトスクリーニング手法の開発」
平成 22 年 6 月 16 日
山下晶平

- 2) 全国環境研協議会 会長表彰
平成 23 年 2 月 1 日
久米一成

微生物部

- 1) 地方衛生研究所全国協議会 関東甲信静支部長表彰
平成 22 年 7 月 15 日
長岡宏美
- 2) 大同生命厚生事業「地域保健福祉研究助成」
「ヒトおよび肉用鶏から分離された基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生菌の関連性の調査」
平成 22 年 10 月 13 日
廣井みどり

- 3) 平成 22 年度日本獣医三学会中部地区学会会長賞
「食鳥処理場および養鶏農場の肉用鶏から分離された基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生菌群の解析」
平成 22 年 9 月 5 日
廣井みどり
- 4) 第 47 回静岡県公衆衛生研究会第 3 分科会優秀賞
「リアルタイム PCR 法による細菌性食中毒起因菌の迅速スクリーニング法の検討」
平成 23 年 2 月 10 日
飯田奈都子

医薬食品部

- 1) 独立行政法人医薬基盤研究所 「保健医療分野における基礎研究推進事業」 研究助成 (平成 19 年度～平成 22 年度)
「化合物ライブラリーの管理とデータベースの構築及びリード化合物の合成に関する研究」
平成 21 年 4 月 1 日
小郷尚久
- 2) 独立行政法人医薬基盤研究所 「保健医療分野における基礎研究推進事業」 研究助成 (平成 21 年度～)
「Aggrus を標的とした低分子化合物の開発研究」
平成 21 年 4 月 1 日
小郷尚久

学位取得

環境科学部

- 博士 (環境科学) 静岡県立大学
「居住環境における有害化学物質のオンサイト測定法及び装置の開発に関する研究」
平成 23 年 3 月 22 日
山下晶平

微生物部

- 博士 (食品栄養科学) 静岡県立大学
「家畜腸内および食肉中に存在する抗生物質耐性菌に関する研究:特に肉用鶏糞便から分離した基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生大腸菌の微生物学的・分子遺伝学的性状解析」
平成 23 年 3 月 22 日
廣井みどり

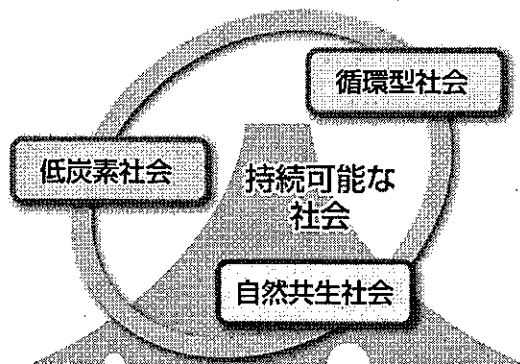
編集委員会

久米 一成 (委員長)
橋本 守
杉山 寛治
坂根 弓子
鈴木 恒雄
小和田 和宏
渡邊 雅之
神田 隆
影山 知子
後藤 裕康

静岡県環境衛生科学研究所報告
(第 53 号)
平成 23 年 8 月

編集発行 静岡県環境衛生科学研究所
静岡市葵区北安東 4 丁目 27-2
電話 (054) 245-7655
E-mail kanki@pref.shizuoka.lg.jp
インターネットホームページ
[http:// www6.shizuokanet.ne.jp/eikanctr](http://www6.shizuokanet.ne.jp/eikanctr)

印刷所 有限会社東海美術社
静岡市葵区古庄 2 丁目 3-21
電話 (054) 263-1700 (代)



環境の理想郷“ふじのくに”の創造