

(1) 報 文

- 1) 2008/09インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザ (A/H1N1)
オセルタミビル耐性株 (H275Y*) の県内発生状況 19
- 2) 河川水中のダイオキシン類濃度特性について 21

2008/09インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザ (A/H1N1) オセルタミビル耐性株 (H275Y*) の県内発生状況

加藤聖紀, 中尾龍之介*, 本田颯子, 人見徹

Report of Influenzavirus(A/H1N1) oseltamivir-resistant strain in the 2008/09 season in Oita

Miki kato, Ryunosuke Nakao, Akiko Honda, Toru Hitomi

Key words : インフルエンザ Influenza (A/H1N1)
オセルタミビル耐性株 oseltamivir-resistant strain

要 旨

今シーズン (2008/09) は, A/H1N1 ウイルスが 2 シーズン続けての流行であった。また, 昨シーズンの後半より, オセルタミビル (商品名タミフル) 耐性の A/H1N1 亜型 (ソ連型) インフルエンザウイルスが全国的に蔓延している。大分県でも同様の傾向が見られ, 今シーズンに分離された A/H1N1 ウイルスは全て耐性株であるという結果が得られた。

は じ め に

EU諸国では, ノイラミニダーゼ (NA) 蛋白の275番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシン (H275Y) に置換し, オセルタミビルに対して耐性となるA/H1N1亜型ウイルスが, 2007年11月頃から高頻度で検出されるようになった。さらに昨シーズンの後半からは, 世界各地で高頻度に検出されるようになり, 医療機関における抗インフルエンザ薬の選択に大きな影響が出ている。これまでの世界各国における耐性株の発生頻度は, 2007年後半~2008年3月期は16%, 2008年4月~9月期は44%, 2008年10月~12月期は92%と, 耐性株が急速に世界中に広がっている¹⁾。

今回は, 感染症発生動向調査事業の中で, 今シーズン (2008/09) 及び昨シーズン (2007/08) に分離されたA/H1N1亜型インフルエンザウイルスについて, NA遺伝子の塩基配列を解析し, 耐性の遺伝子マーカーH275Yの有無を調べたので, その結果を報告する。

材 料 及 び 方 法

1. 遺伝子の抽出

試料として, 今シーズン (2008/09) の分離株33株中32株, 昨シーズン (2007/08) の分離株50株中29株を用いた。

RNAの抽出には, QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を使用した。

2. DNase処理

抽出したRNAを1U/ μ l DNase I (TaKaRa) で37°C30分, 75°C 5分処理した。

3. 逆転写反応

DNase 処理RNAは, 次のような混合液を作成し, 37°Cで15分, 85°Cで5秒反応させ, 4°Cで保存した。

5×PrimeScript Buffer (for Real Time)	2.0 μ l
PrimeScript RT Enzyme Mix 1	0.5 μ l
Random 6 mers (100 μ M)	0.5 μ l
DNase 処理RNA	7.0 μ l
Total	10 μ l

*大分臨床検査技師専門学校

4. PCR

逆転写反応で作成したc-DNAは次のとおり反応混合液を作成し, 94℃ 3分×1, (94℃30秒, 55℃30秒, 72℃1分)×40, 72℃7分×1で反応させた。プライマーは国立感染症研究所紹介プライマー²⁾及び広島県保健環境センター開発プライマー³⁾を用いた。

水	13.5 μl
10×緩衝液	2.0 μl
2.5mM dNTP	1.6 μl
25 μM Sence primer *	0.4 μl
25 μM Anti sence primer *	0.4 μl
5 U/μl Ex-Taq(Takara)	0.1 μl
c-DNA	2.0 μl
Total	20 μl

5. シーケンス

PCR産物を, MinElute PCR Purification Kit(QIAGEN)で精製し, BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit(ABI)でサイクルシーケンス反応を行なった。反応産物をCENTRI-SEP(PRINCETON)で精製後, Applied Biosystems Genetic Analyzer 3103xlにより塩基配列を決定した。

表1 結果

年	分離株数	検体数	PCR陽性数	遺伝子解析可能数	耐性株数	耐性株発生頻度 (%)
2008/2009	33	32	30	30	30	100
2007/2008	50	29	28	26	1	3.8

参 考 文 献

- 1) <速報>インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザ (A/H1N1) オセルタミビル耐性株 (H275Y*) の国内発生状況 [第2報], 病原微生物検出情報, 30, 101-106 (2009)
- 2) 川上千春 他: 国内で最初に確認されたA/H1N2

結 果

今シーズン (2008/09) の分離株33株中32株のうち, PCRでバンドの得られた30株について遺伝子解析を行ったところ, 30株全てが耐性株であった。昨シーズン (2007/08) の分離株50株中29株のうち, PCRでバンドの得られた26株について遺伝子解析を行ったところ, 1株 (3.8%) のみが耐性株であった (表1)。

考 察

昨シーズンは耐性株が3.8%であったのに対して, 今シーズンは100%となった。昨シーズンに検出された耐性株は, 2008年2月に採取された検体であったことより, 昨シーズン後半から耐性株が急激に増加したといえる。このことは全国の状況とも一致している。

今年5月, 新型インフルエンザAH1pdmが国内で確認されて以来, その流行も継続しており, 耐性株も確認されていることから, 今後も引き続き監視する必要があるといえる。

型インフルエンザウイルスの分離—横浜市, 病原微生物検出情報, 23, 198-199 (2002)

- 3) 高尾信一 他: RT-PCR法を用いたヒトA型インフルエンザウイルス分離株のノイラミニダーゼ (NA) サブタイプの同定, 病原微生物検出情報, 23, 287-288 (2002)

河川水中のダイオキシン類濃度特性について

上田精一郎, 長野真紀, 二村哲男

Characteristics of Dioxins in river waters

Seiichiro Ueda, Maki Nagano, Tetsuo Futamura

Key words : ダイオキシン類 dioxins, 毒性等量 toxicity equivalency quantity,
河川水 river water

要 旨

調査した4河川において、田植え時期に河川水中のダイオキシン類濃度が一時的に上昇傾向を示すことが認められ、同族体組成比パターンは、水田農薬由来のパターンに類似していることが認められた。また、毒性等量の最高値は0.21pg-TEQ/Lと2003~2004年度に調査した犬丸川に比べて非常に低い値だった。早期米で知られる木立地区を流域に含む木立川においては、ダイオキシン類濃度の極大が4月に見られたことから、その田植え時期に対応していることが示唆された点が特徴的だった。

はじめに

河川水中のダイオキシン類濃度の田植えによる一時的な上昇、または過去に使われた除草剤に不純物として含まれていたダイオキシン類が河川水のダイオキシン類濃度に寄与しているという報告は、以前からいくつもなされている¹⁻³⁾。

当センター年報においても犬丸川において田植え時期に、河川水中のダイオキシン類濃度が一時的に上昇傾向を示すことを報告した⁴⁾。

2008年度以降は、他の河川において田植え時期に河川水中のダイオキシン類濃度がどのように変動するか、その特性を明らかにすることにより、行政施策を講ずるうえでの参考資料を得ることを目的として調査を行うこととし、2008年度は4河川において調査を行った。

方 法

1 調査地点及び頻度

表1に示すように4河川において感潮域直上流の地点を各河川1地点ずつ選定し、2008年5月から10月の6か間に毎月1回、河川水を採取した。なお、木立川と堅田川については特に木立川流域において早期米の田植え時期が例年4月であることを考慮し

て、3月から調査を開始した。調査地点は図1に示した。

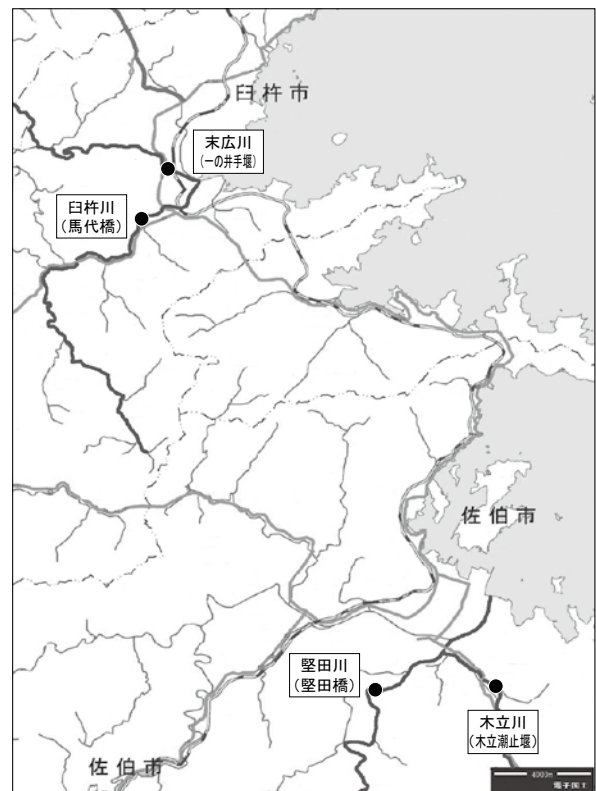


図1 調査地点図

2 分析方法

ダイオキシン類は、「工業用水・工場排水中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定方法」(JIS K 0312)に定める方法により分析測定し、ダイオキシン類を定量解析した。また、併せて水素イオン濃度 (pH) , 浮遊物質量 (SS) , 電気伝導率 (EC) を測定した。

結 果

1 毒性等量及びSSとの相関

調査した4河川における毒性等量の最高値は、白杵川(馬代橋)の0.21pg-TEQ/L(6月)と環境基

準値以下であった。調査期間中における河川別の最高値及び最低値は、それぞれ白杵川(馬代橋)は0.21pg-TEQ/L(6月), 0.056pg-TEQ/L(9月), 末広川(一の井手堰)は0.19pg-TEQ/L(7月), 0.043pg-TEQ/L(9月), 木立川(木立潮止堰)は0.081pg-TEQ/L(4月), 0.030pg-TEQ/L(7月)及び堅田川(堅田橋)は0.044pg-TEQ/L(6月), 0.026pg-TEQ/L(9月)であった(表1, 表2, 図2)。なお、毒性等量とSSの相関については、白杵川と末広川においてはほとんど相関関係は認められなかった(図3)。また、木立川と堅田川は期間を通してSSは全て1mg/L未満であったため相関関係は評価できなかった(図4)。

表 1 調査結果概要

調査地点	調査月日	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月
		2008.3.17	2008.4.14	2008.5.7	2008.6.19	2008.7.15	2008.8.12 2008.8.26	2008.9.10	2008.10.10
白杵川 (馬代橋)	毒性等量 (pg-TEQ/L)	—	—	0.092	0.21	0.12	0.088	0.056	0.064
	SS(mg/L)	—	—	3.5	4.2	5.7	8.5	5.7	1.4
	pH	—	—	8.3	7.3	8.9	7.2	8.2	7.5
	EC(μ S/cm)	—	—	174.9	128.3	177.7	405	216	167.7
末広川 (一の井手堰)	毒性等量 (pg-TEQ/L)	—	—	0.079	0.15	0.19	0.060	0.043	0.055
	SS(mg/L)	—	—	3.4	4.5	5.1	4.8	4.8	1.2
	pH	—	—	7.4	7.3	7.3	7.3	7.2	7.5
	EC(μ S/cm)	—	—	219	122.9	276	190	446	164.5
木立川 (木立潮止堰)	毒性等量 (pg-TEQ/L)	0.037	0.081	0.035	0.031	0.030	0.031	0.031	0.043
	SS(mg/L)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	pH	7.0	6.6	6.7	6.7	6.7	6.7	6.8	6.7
	EC(μ S/cm)	82.8	81.0	75.6	74.4	79.0	86.1	91.6	88.9
堅田川 (堅田橋)	毒性等量 (pg-TEQ/L)	0.027	0.028	0.032	0.044	0.027	0.028	0.026	0.027
	SS(mg/L)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	pH	7.0	7.1	7.5	7.0	7.1	6.9	6.9	7.1
	EC(μ S/cm)	81.1	76.9	78.0	69.7	80.0	86.4	88.6	81.2

備考 8月の調査日は白杵川と末広川は8月12日, 木立川と堅田川は8月26日

表 2 同族体別毒性等量

単位: pg-TEQ/L

調査地点	調査月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月
白杵川 (馬代橋)	PCDDs	—	—	0.071	0.19	0.099	0.073	0.045	0.054
	PCDFs	—	—	0.015	0.021	0.013	0.011	0.0074	0.0088
	コプラナー PCBs	—	—	0.0057	0.0035	0.0046	0.0036	0.0036	0.0015
	ダイオキシン類	—	—	0.092	0.21	0.12	0.088	0.056	0.064
末広川 (一の井手堰)	PCDDs	—	—	0.059	0.13	0.15	0.048	0.033	0.042
	PCDFs	—	—	0.013	0.017	0.025	0.0076	0.0068	0.0087
	コプラナー PCBs	—	—	0.0067	0.0016	0.0098	0.0046	0.0036	0.0037
	ダイオキシン類	—	—	0.079	0.15	0.19	0.060	0.043	0.055
木立川 (木立潮止堰)	PCDDs	0.028	0.070	0.027	0.023	0.022	0.023	0.024	0.034
	PCDFs	0.0070	0.0099	0.0071	0.0064	0.0070	0.0059	0.0058	0.0069
	コプラナー PCBs	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015
	ダイオキシン類	0.037	0.081	0.035	0.031	0.030	0.031	0.031	0.043
堅田川 (堅田橋)	PCDDs	0.019	0.020	0.024	0.034	0.020	0.019	0.019	0.019
	PCDFs	0.0064	0.0069	0.0068	0.0081	0.0057	0.0067	0.0057	0.0072
	コプラナー PCBs	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015
	ダイオキシン類	0.027	0.028	0.032	0.044	0.027	0.028	0.026	0.027

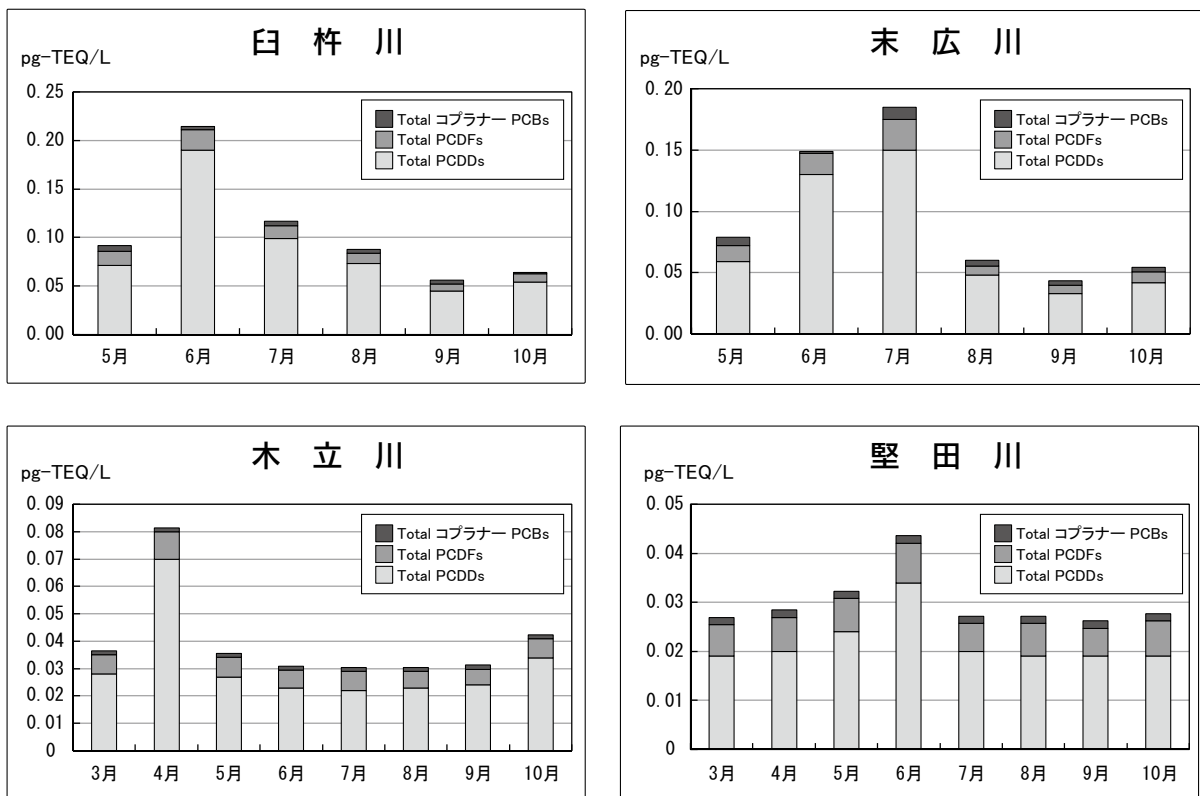


図 2 毒性等量

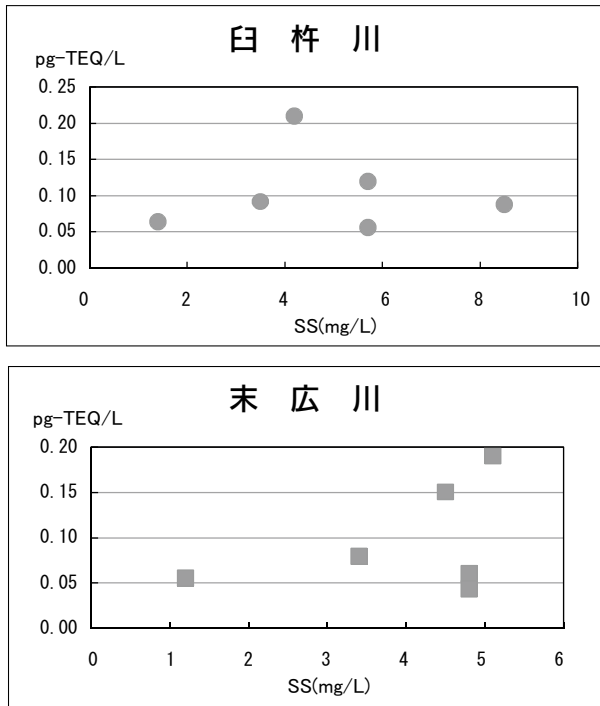


図 3 毒性等量と SS との相関

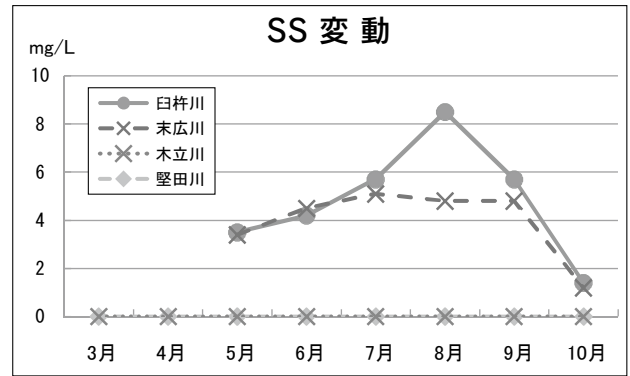


図 4 SS 変動

2 濃度

ダイオキシン類濃度 (Total PCDDs+Total PCDFs+Total Co-PCBs) の最高値は、白杵川の 120pg/L (6月) 及び末広川の 120pg/L (7月) であった。調査期間中における河川別の最高値及び最低値は、それぞれ白杵川は 120pg/L (6月), 45pg/L (10月), 末広川は 120pg/L (7月), 30pg/L (9月), 木立川は 68pg/L (4月), 11pg/L (7月, 10月) 及び堅田川は 16pg/L (6月), 3.9pg/L (9月) であった (表 3, 表 4, 図 5)。

同族体別の濃度はダイオキシン類濃度の最高値を示した月において 4 河川とも OCDD の濃度上昇が顕著だった (図 6)。

表 3 同族体別濃度 (1)

単位: pg/L

調査地点	調査月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月
白杵川 (馬代橋)	PCDDs	—	—	52	120	71	62	46	40
	PCDFs	—	—	2.2	4.3	2.0	2.4	1.5	1.7
	コプラナー-PCBs	—	—	6.7	0.21	3.9	4.4	3.5	2.8
	合計	—	—	61	120	76	68	51	45
末広川 (一の井手堰)	PCDDs	—	—	26	94	110	37	25	44
	PCDFs	—	—	1.1	2.9	4.2	1.2	0.83	1.5
	コプラナー-PCBs	—	—	6.4	3.3	11	5.6	3.9	7.6
	合計	—	—	34	100	120	44	30	53
木立川 (木立潮止堰)	PCDDs	21	65	12	12	9.9	12	15	9.5
	PCDFs	0.62	2.0	0.22	0.42	0.15	0.16	0.31	0.26
	コプラナー-PCBs	2.2	1.7	0.77	0.061	0.63	0.31	1.1	1.4
	合計	24	68	13	13	11	13	16	11
堅田川 (堅田橋)	PCDDs	5.2	6.2	5.9	15	6.2	5.4	3.5	4.1
	PCDFs	0.15	0.18	0.095	0.41	0.13	0.031	0.064	0.049
	コプラナー-PCBs	1.6	1.0	0.57	0.039	0.40	0.012	0.34	0.36
	合計	7.0	7.4	6.6	16	6.8	5.5	3.9	4.5

表 4 同族体別濃度 (2)

単位: pg/L

調査地点	調査月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月
白杵川 (馬代橋)	TeCDDs	—	—	13	25	18	16	12	10
	PeCDDs	—	—	1.4	3.7	2.1	2.0	1.4	1.2
	HxCDDs	—	—	0.81	2.2	1.4	1.2	0.62	0.41
	HpCDDs	—	—	3.9	7.8	6.3	5.3	3.8	2.5
	OCDD	—	—	33	79	42	38	29	26
	TeCDFs	—	—	0.79	1.2	0.66	0.62	0.44	0.49
	PeCDFs	—	—	0.25	0.48	0.17	0.22	0.20	0.20
	HxCDFs	—	—	0.30	0.63	0.23	0.25	0.17	0.14
	HpCDFs	—	—	0.46	1.1	0.54	0.58	0.43	0.39
	OCDF	—	—	0.42	0.97	0.37	0.70	0.27	0.48
	合計	—	—	54	122	72	65	48	42
末広川 (一の井手堰)	TeCDDs	—	—	5.7	21	27	9.6	6.2	12
	PeCDDs	—	—	0.73	2.9	4.1	1.1	0.72	1.2
	HxCDDs	—	—	0.60	1.6	2.3	0.78	0.42	0.52
	HpCDDs	—	—	2.3	6.2	10	3.3	2.5	3.1
	OCDD	—	—	17	62	64	22	16	28
	TeCDFs	—	—	0.45	0.96	1.3	0.55	0.33	0.57
	PeCDFs	—	—	0.11	0.29	0.52	0.15	0.13	0.21
	HxCDFs	—	—	0.18	0.35	0.59	0.09	0.10	0.18
	HpCDFs	—	—	0.22	0.69	1.1	0.21	0.18	0.30
	OCDF	—	—	0.16	0.62	0.73	0.18	0.10	0.25
	合計	—	—	27	97	112	38	27	46
木立川 (木立潮止堰)	TeCDDs	2.6	7.0	1.9	1.8	2.0	2.0	2.7	2.3
	PeCDDs	0.33	1.3	0.24	0.30	0.26	0.28	0.37	0.28
	HxCDDs	0.25	0.55	0.15	0.17	0.15	0.17	0.10	0.060
	HpCDDs	1.5	4.0	0.80	0.61	0.66	0.74	0.89	0.47
	OCDD	17	52	8.8	9.3	6.8	9.0	11	6.4
	TeCDFs	0.25	0.41	0.059	0.14	0.045	0.056	0.14	0.096
	PeCDFs	0.090	0.16	0	0.040	0	0	0.040	0.060
	HxCDFs	0.080	0.16	0	0.11	0	0	0	0.030
	HpCDFs	0.11	0.55	0.10	0.050	0.060	0.050	0.080	0.070
	OCDF	0.10	0.68	0.070	0.080	0.040	0.050	0.050	0
	合計	22	67	12	13	10	12	15	9.8
堅田川 (堅田橋)	TeCDDs	0.63	1.0	0.88	3.0	1.3	1.1	0.65	0.73
	PeCDDs	0.053	0.11	0.078	0.36	0.16	0.11	0.065	0.094
	HxCDDs	0.060	0.080	0.090	0.18	0.10	0.080	0	0.060
	HpCDDs	0.33	0.33	0.32	0.83	0.41	0.31	0.24	0.18
	OCDD	4.2	4.7	4.5	11	4.3	3.9	2.6	3.0
	TeCDFs	0.10	0.078	0.062	0.15	0.075	0	0.012	0.049
	PeCDFs	0.010	0	0	0.020	0	0	0.030	0
	HxCDFs	0	0	0	0.070	0	0	0	0
	HpCDFs	0.030	0.070	0.030	0.10	0.050	0	0.030	0
	OCDF	0	0.040	0	0.080	0	0.030	0	0
	合計	5.5	6.4	6.0	16	6.4	5.5	3.6	4.1

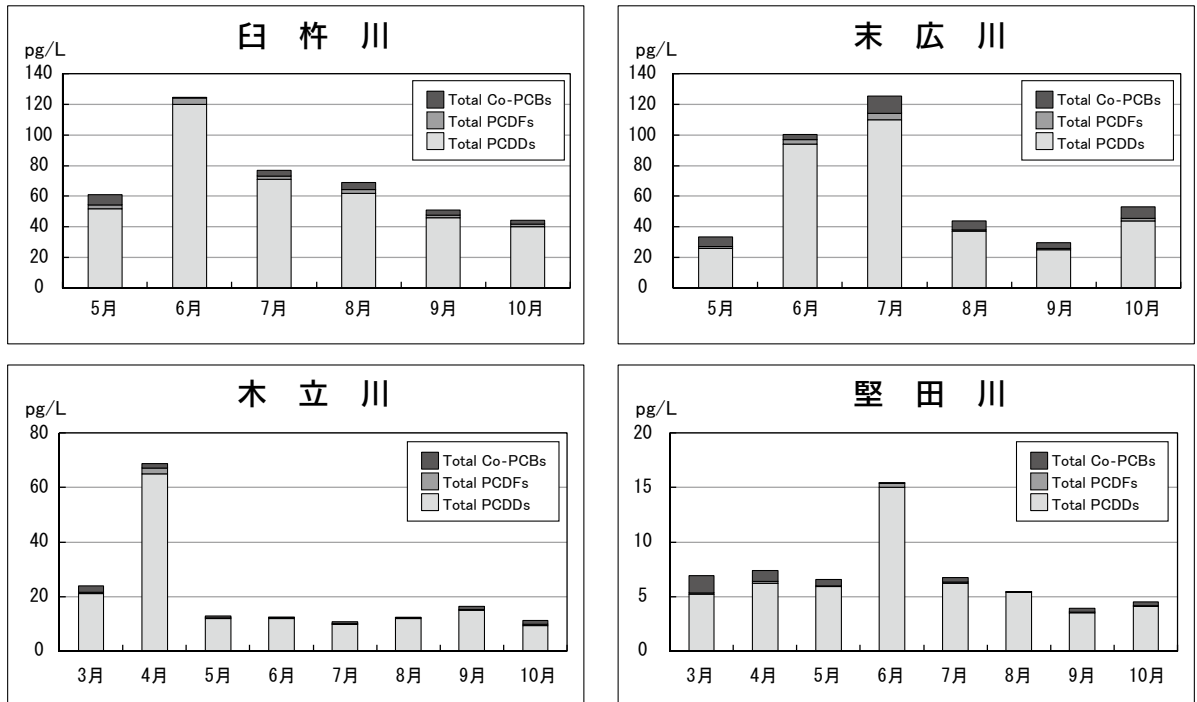


図 5 ダイオキシン類濃度

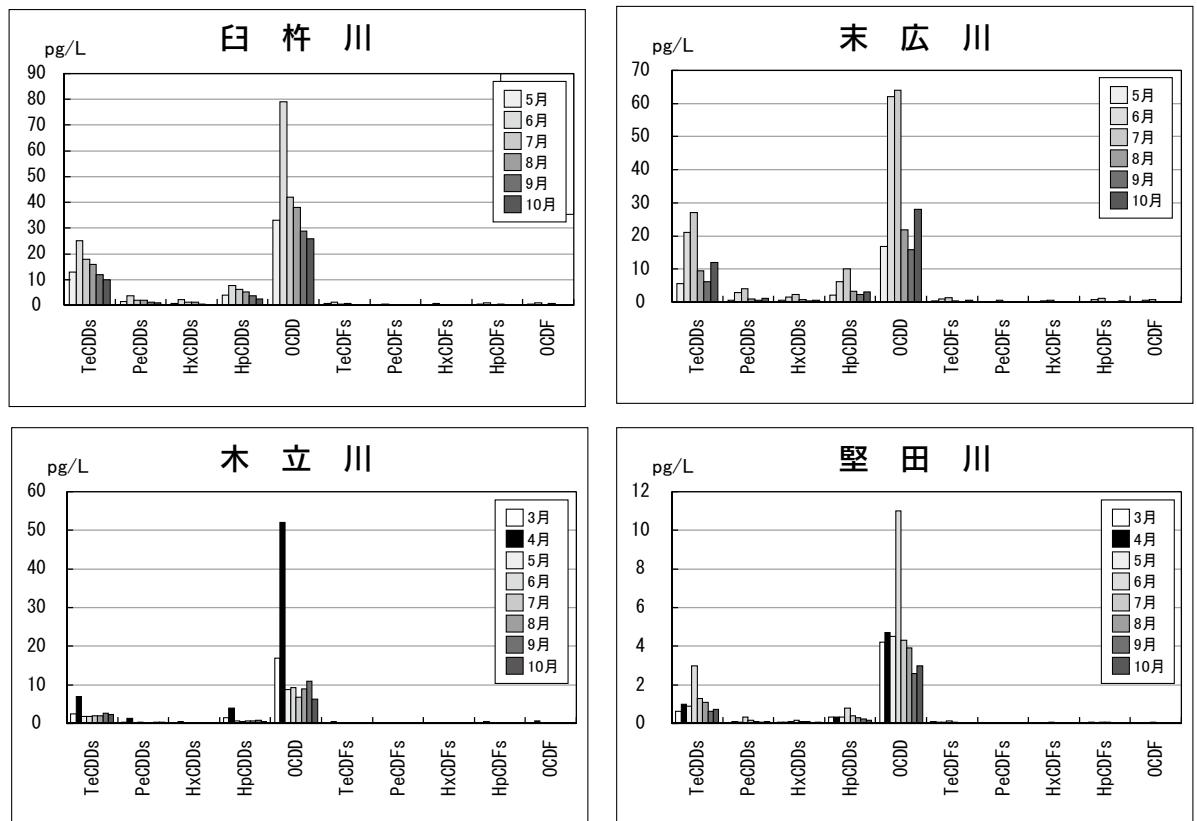


図 6 同族体別 PCDDs, PCDFs 濃度

3 同族体組成

同族体組成比は4河川とも月ごとの顕著な変動はほとんど認められず、OCDDが60~70%と最も比率が高く、次いでTeCDDsが20%程度と高かった(図7)。

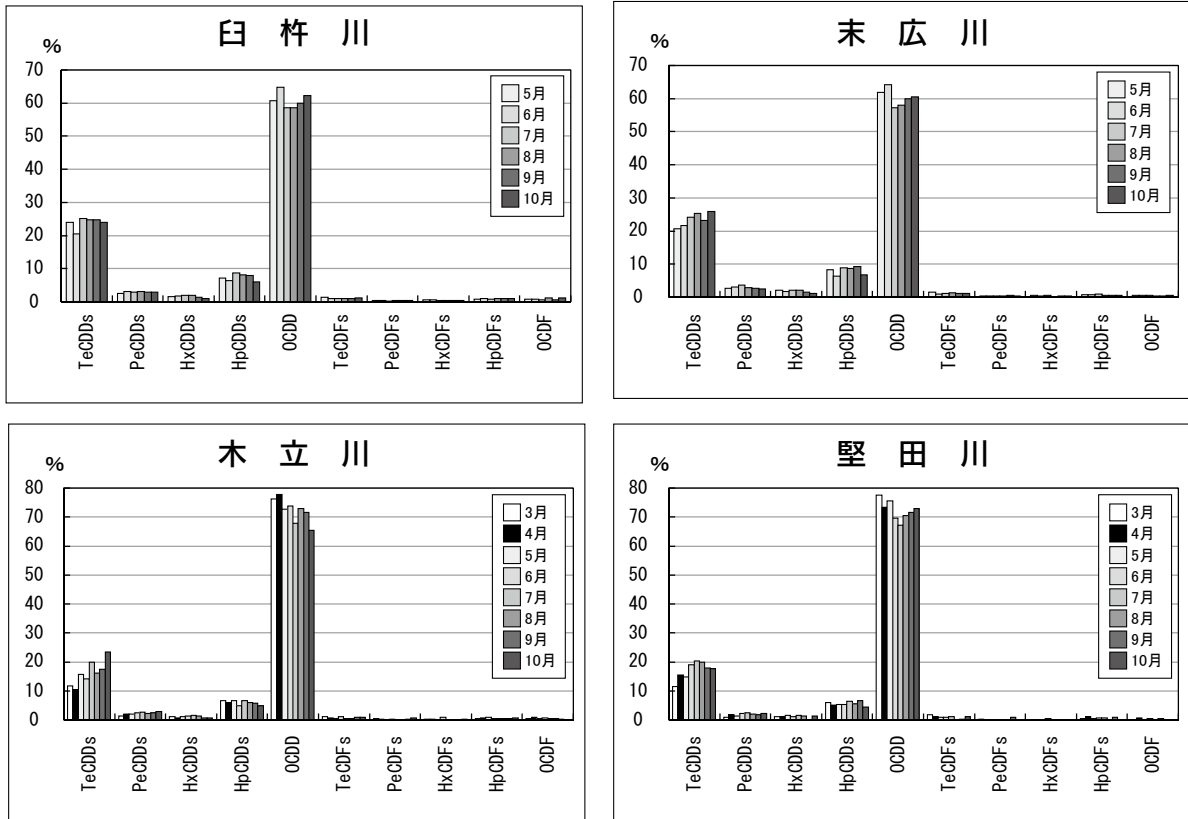


図7 同族体組成比パターン

考 察

毒性等量及びダイオキシン類濃度は、調査した4河川とも田植え時期に一時的に上昇傾向を示した。特に、木立川流域では4月に早期米の田植え時期を迎えることから、これに対応して毒性等量及びダイオキシン類濃度とも4月に極大を示しているのが特徴的だった(図2, 5, 6)。

また、PCDDs及びPCDFs同族体別濃度を比較すると、4河川とも田植え時期にOCDDの濃度上昇が顕著に見られた(図6)。

毒性等量とSSの相関については、白杵川と末広川においてはほとんど相関関係は認められなかった(図3)。また、木立川と堅田川は期間を通して

SSは全て1mg/L未満であったため相関関係は評価できなかった(図4)。

同族体組成比パターンは環境省が2001年度に実施した田植え時期の水田排水調査の同族体組成比パターンと類似しており⁵⁾、組成比は調査期間を通して顕著な変動は見られなかった(図7)。

4河川における同族体組成比の特徴については、白杵市を主な流域とする白杵川と末広川は組成比パターンは類似しており、OCDDは60%程度、TeCDDsは20~25%程度を占めていた。一方、佐伯市を主な流域とする木立川と堅田川は組成比パターンは類似しており、OCDDは70%程度、TeCDDsは10~20%程度を占め、地域差があることを示唆している(図7)。

以上のことから、2003~2004年度にかけて犬丸川

で行った調査結果と同様に、過去に使用された水田除草剤に不純物として含まれていたダイオキシン類が、田植え時期に流出し、ダイオキシン類濃度の極大を示す原因ではないかとの示唆を得た。

参 考 文 献

- 1) 飯田勝彦, 加藤陽一: 水田土壌中のダイオキシン類の河川水への影響, 神奈川県環境科学センター業務報告, 67-69(2004)
- 2) 吉澤正ら: 千葉県公共用水域ダイオキシン類常時監視結果の特徴と問題点, 千葉県環境研究センター年報, 3, 171-175(2003)
- 3) 安田裕, 村瀬秀也, 大平武俊: 岐阜県内河川環境中のダイオキシン類, 岐阜県保健環境研究所報, 11, 9-14(2003)
- 4) 上田精一郎, 二村哲男, 久枝和生, 佐々木清: 大分県衛生環境研究センター年報, 河川水中のダイオキシン類濃度について, 19-22(2004)
- 5) 環境省環境管理局水環境部土壌環境課農薬環境管理室: 水田等農用地を中心としたダイオキシン類の排出実態調査結果について(2002)