
短報

散発下痢患者から分離された大腸菌 の血清型について

垣田雅史¹⁾, 沖津忠行¹⁾, 佐多 辰¹⁾,
鈴木理恵子¹⁾, 山井志朗²⁾

Studies on the serotype of *Escherichia coli* isolated from patients with sporadic diarrhea

Masashi KAKITA, Tadayuki OKITSU,
Shin SATA, Rieko SUZUKI
and Shiro YAMAI

はじめに

病原大腸菌は現在、その発症機序の違いから毒素原性大腸菌 (ETEC), 組織侵入性大腸菌 (EIEC), 腸管出血性大腸菌 (EHEC), 腸管病原性大腸菌 (EPEC), 腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC) の 5 カテゴリーに分類されている^{1,2,3)}. これらヒトに下痢や腸炎などを引き起こす病原大腸菌は、その分離・同定検査において通常の生化学的検査のみで非病原性大腸菌と区別することは難しい. 病原大腸菌の各カテゴリーの中で、ETEC, EIEC, EHEC の病原因子は各々腸管毒素, 組織侵入因子, ベロ毒素が主要な因子として明らかにされ^{1,2)}, 検査法も確立されている. しかし EPEC および EAggEC に関しては病原性関連因子の提案はあるが研究段階であり、その検査法が日常検査に導入されるには至っていない. 一方、病原大腸菌はそれぞれのカテゴリーごとに一定の血清型に属することが示されており³⁾, 市販の病原大腸菌 O (菌体抗原) および H (鞭毛抗原) 免疫血清による血清学的診断法が本菌の検査に一般的に用いられている. しかしながら、本検査法においても EPEC および EAggEC の血清型と病原因子との関係については未だ不明な点が多い^{4,5)}.

今回、急性期の下痢患者便から直接培養法で分離され下痢起因菌として有意と思われる大腸菌について、本菌のカテゴリーのうち特に分離頻度の高い EPEC の血清型スキームを検討するために、それらの血清型および病原因子または病原性関連因子などの病原性関連遺伝子保有状況を調査した.

材料および方法

1. 材料

2000 年 1 月から 2001 年 12 月までの 2 年間に、神奈川県内の医院に来院した急性期下痢患者から採取され、感染性胃腸炎の病原体検査を依頼された 209 名の散発下痢患者便を検体とした.

2. 散発下痢患者からの病原大腸菌の分離

検体は綿棒で採取後、直ちにキャリーブレア培地入り採便管に保存され輸送されたものを使用した. キャリーブレア培地から採取便の付着した綿棒を取り出し、滅菌生理食塩液 1mL に入れた混釀液（およそ 5 ~ 10 倍希釀に相当）を試料とした. 本試料について病原大腸菌の検査を他の腸管病原菌の検査と共に直接分離培養法で行なった. すなわち病原大腸菌に関しては、試料の一白金耳量を DHL 寒天培地（栄研）および CT サプリメント添加ソルビトールマッコンキー (CT-SMAC) 寒天培地 (OXIOD) に塗抹し、36 °C, 18 ~ 24 時間培養後、DHL 寒天培地上に優勢に認められ且つ大腸菌が疑われるレンガ紅色コロニー、また CT-SMAC 寒天培地上のソルビトール非分解性大腸菌 O157 が疑われる乳白色コロニーを釣菌し各々 TSI, SIM, VP およびリジン脱炭酸試験用培地（以上、栄研）の各確認培地に接種した. 次いで 18 ~ 24 時間培養後、これらの確認培地の所見による生化学的性状から大腸菌が否定できない分離株は病原大腸菌 O 免疫血清（デンカ生研）による凝集試験を実施した. さらに本試験で何らかの O 血清に凝集した分離株は、必要に応じて簡易同定キット ID-EB20（日水）等により生化学的性状の追加試験を行い大腸菌であることを同定した.

3. 血清型別試験

病原大腸菌 O および H 免疫血清（デンカ生研）を用いて血清型別試験を行った. O 型別試験は、菌株をハートインフュージョン (HI) 寒天培地（栄研）で 18 ~ 24 時間培養後、菌苔を生理食塩液に濃厚に浮遊させ、100 °C 1 時間加熱した菌液を抗原としてスライド凝集反応法を行った. H 型別試験は、SIM 寒天培地で運動性を認めた菌株について、クレイギー管を入れた 0.3 % 寒天加 HI 寒天培地を用い、常法⁶⁾によって運動性を増強

1 神奈川県衛生研究所 細菌病理部
〒241-0815 横浜市旭区中尾 1-1-1
2 前神奈川県衛生研究所 細菌病理部

後、HI プイヨン培地（栄研）で 18～24 時間培養した培養液を抗原として試験管内凝集反応法で行った。なお、SIM 寒天培地で運動性を認めなかった菌株の H 型は非運動（non motility, NM）とした。

4. PCR 法による遺伝子の検出

血清型が確定した菌株について、ベロ毒素（VT）遺伝子、易熱性腸管毒素（LT）遺伝子、耐熱性腸管毒素（ST）遺伝子、腸管組織侵入性遺伝子（*invE* 遺伝子）および EPEC または EAEC の病原性への関与が示唆されている *eaeA* 遺伝子^{1,2,4,5)} および *aggR* 遺伝子^{4,5)} を対象とした。PCR は伊藤ら⁷⁾による VT, LT, ST および *invE* 遺伝子検出のための 4 種混合プライマー法、小林ら⁸⁾による *eaeA* および *aggR* 遺伝子検出のための 2 種混合プライマー法で、HI 寒天培地上の純培養菌の微量を精製水 100 μL に懸濁後、100 °C 10 分間加熱した溶液の上清を鋳型 DNA とし、Taq DNA Polymerase (Takara) を使用して行った。反応条件は、4 種混合プライマー法では 94 °C 30 秒、46 °C 30 秒、72 °C 30 秒のサイクルを 25 回、2 種混合プライマー法では 94 °C 90 秒、55 °C 30 秒、72 °C 90 秒のサイクルを 35 回行った。增幅 DNA は 2 % アガロースゲル電気泳動を行

い EtBr 染色後 UV ランプ下で目的のバンドを確認した。

結果および考察

散発下痢患者 209 名中 47 名（22.5 %）から 48 株の病原大腸菌が分離された。該患者 47 名中 *Campylobacter jejuni* が 3 名から、*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* および *Klebsiella oxytoca* が各 1 名から分離されたが、41 名からは病原大腸菌以外の既知腸管病原菌は分離されなかった。大腸菌の血清型は O 群および H 型の組み合わせで示されるが、検査手技の容易さから日常検査では O 診断用血清のみの使用が一般的で、症例の重要性に応じて H 診断用血清が使用されることが多い。現在、市販の病原大腸菌 O 免疫血清は 43 種類、H 免疫血清は 22 種類あるが、今回分離された大腸菌株はそれらのうち O 群 16 種類、H 型 11 種類に分類され、H 型では他に非運動性（non motility, NM）および型別不能（untypable, UT）株が各々 9 株、10 株であった。大腸菌分離株の血清型を由来患者の年齢別に（表 1）、また各血清型株の一覧および血清型に占める O 群の割合を示した（表 2）。

表 1 散発下痢患者から分離された病原大腸菌血清型の年齢別分離状況

年齢(才)	株数 小計	血清型		株数
		O群	H型	
0	4	15	UT	1
		27	NM	1
		86	UT	1
		18	20	1
1	5	1	20	1
		6	12	3
		148	28	1
2	2	1	7	1
		1	18	1
3	4	1	NM	2
		25	42	1
		63	6	1
5	1	159	11	1
6	3	1	NM	2
		1	UT	1
7	2	6	12	1
		25	UT	1
8	2	1	7	1
		1	18	1
9	2	25	20	1
		158	21	1
10	1	18	12	1

年齢(才)	株数 小計	血清型		株数
		O群	H型	
11	2	146	21	1
		164	12	1
12	1	25	UT	1
		1	NM	1
14	2	1	UT	1
		1	12	2
18	2	1	UT	1
		25	4	1
33	2	18	UT	1
		25	NM	1
35	2	1	1	1
		7	1	1
36	1	25	NM	1
		1	1	1
37	1	1	7	1
		12	1	1
40	2	126	UT	1
		1	1	1
48	1	112	NM	1
		1	19	1
50	2	8	19	1
		1	7	1
51	1	146	42	1
		6	1	1
72	1	42	48	1
		1	1	1
75	1	1	1	1
		1	1	1
合計		48	48	

NM:運動性なし UT:型別不能

表2 散発下痢患者から分離された病原大腸菌の血清型およびそのO群の占める割合

血清型	株数	O群の割合(%)
O1:H7	4	
O1:H12	4	
O1:H18	2	41.7
O1:H20	1	
O1:NM	5	
O1:UT	4	
O6:H12	4	10.4
O6:H42	1	
O8:19	1	2.1
O15:UT	1	2.1
O18:H12	1	
O18:H20	1	6.3
O18:UT	1	
O25:H4	1	
O25:H20	1	
O25:H42	1	14.6
O25:NM	2	
O25:UT	2	
O27:NM	1	2.1
O63:H6*	1	2.1
O86:UT	1	2.1
O112:NM	1	2.1
O126:UT**	1	2.1
O146:H7	1	4.2
O146:H21	1	
O148:H28	1	2.1
O158:H21	1	2.1
O159:H11	1	2.1
O164:H12	1	2.1

* eaeA遺伝子保有 ** aggR遺伝子保有

病原大腸菌の年齢別検出状況では、1歳児からの分離例（5株）が最も多く、次いで0歳児および3歳児が各4株、6歳児が3株といったように、本菌が乳幼児における主要な下痢原因菌であることを示唆するものであった。一方、血清型は多岐にわたりばらつきが顕著であったが、O群に関しては若干の偏りが認められた。最も多く分離されたO群はO1で、全分離株48株中20株（41.7%）を占めた。木村ら⁹は健常者および散発下痢患者から最も多く分離される大腸菌のO群はO1であったと報告しており、今回の我々の結果もこれに一致した。このことは、病原大腸菌の同定を本菌O免疫血清のみに依存できないことを示しており、病原大腸菌の同定には病原因子の確認が必要になる。しかし病原大腸菌のカテゴリーのうちEPECおよびEAEC、特にEPECの病原因子診断法は確立されていないことから、これらに関しては少なくともO・H

の組み合わせによる血清型の確認が必要で、このことがEPEC血清型スキームの確立が必要な理由である。

ETECとLT、ST両遺伝子、EIECとinvE遺伝子、EHECとVT遺伝子との間には深い関連があることは周知の事実である^{1,2,3)}。一方、EPECは乳幼児の胃腸炎の原因菌として知られ^{2,3)}、その多くは培養細胞に対して局在性に付着する^{2,3,4,5)}。また腸管病理像として腸管上皮細胞への接着と微繊毛の破壊（attaching and effacing, A/E）が起こると考えられている^{1,2,3,4,5)}。さらに、A/Eに関与する外膜タンパク質のIntiminの存在が示唆されており^{1,2,5)}、eaeA遺伝子がIntiminをコードしていることが発見されている^{1,5)}。EAECは南米、東南アジアの乳幼児下痢症の原因菌として知られ^{2,3)}、その多くが培養細胞に対して凝集性に付着する^{2,3,4,5)}。病原因子として、凝集性接着線毛（AAF/I）とその発現に関与するaggR遺伝子が明らかにされている⁵⁾。これらのことからeaeA遺伝子およびaggR遺伝子は各々EPECまたはEAECの病原性関連因子と考えられている^{1,2,4,5)}が、EPECおよびEAECの血清型と病原因子との関係については未だ不明な点が多い⁵⁾。

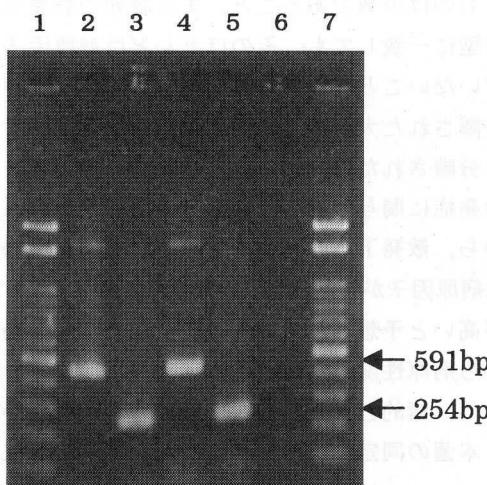


図1 PCR法によるeaeAおよびaggR遺伝子増幅DNAの電気泳動像

- レーン1,7：分子量マーカー(100bp Ladder)
- レーン2：分離株(O63:H6)
- レーン3：分離株(O126:HUT)
- レーン4：陽性対照(eaeA, 591bp)
- レーン5：陽性対照(aggR, 254bp)
- レーン6：陰性対照

今回の分離株の血清型について、成書³⁾に記載された下痢患者便から分離され得るETEC, EIEC, EHECおよびEPECの血清型と比較したところ、O25 : NM (2株), O25 : H42 (1株), O27 : NM (1株)およびO148 : H28 (1株)がETEC, O112 : NM (1株)がEIEC, O1 : NM (5株), O1 : H7 (4株), O25 : NM (2株)およびO146 : H21 (1株)がEHECにそれぞれ該当し、EPECに該当した血清型はなかった。なお、EAggECに関しては特定の血清型に限定されることはないといわれている⁵⁾。一方、分離株48株についてPCR法により病原性関連遺伝子の有無を試験した結果、O63 : H6 (1株)から`eaeA`遺伝子, O126 : HUT (1株)から`aggR`遺伝子が検出されただけであった(表2, 図1)。`eaeA`遺伝子が検出されたO63 : H6は成書³⁾に記載のEPEC血清型に該当しておらず、逆にETEC, EIECおよびEHEC血清型に該当した株は各々のカテゴリーに一致する遺伝子を保有していないかった。さらにEAggECには特定の血清型は存在しないと考えられていることから、現段階では血清型から病原大腸菌のカテゴリーを推測することは困難であると思われた。

以上のことから、下痢患者から分離された大腸菌の血清型は多岐にわたり既知の病原大腸菌の血清型に一致するものは少数であること、また既知の病原大腸菌の血清型に一致しても、そのほとんどは病原因子を保有していないことが明らかとなった。しかしながら、今回分離された大腸菌はいずれも急性期下痢患者から優勢に分離されたものであり、少なからず下痢または腸炎の発症に関与した病原大腸菌であると思われる。すなわち、散発下痢患者から分離される病原大腸菌の多くは病原因子が特定されていないEPECに属する可能性が高いと予想された。一方、今回の病原大腸菌分離株から病原性関連遺伝子の検出数が少数であった理由として、標的とした当該遺伝子の種類が少なかったこと、本菌の同定に血清学的診断法を優先した点など

が考えられる。今後は病原性関連遺伝子の検出を優先した検査法を実施することによって、大腸菌の血清型と病原性の関係についてさらに追求していきたい。

(平成14年7月24日受理)

文献

- 1) 渡辺治雄：細菌感染の分子医学－その新展開，初版，24-34，羊土社，東京（1995）
- 2) 厚生省生活衛生局：下痢原性大腸菌，食中毒予防必携，初版，58-64，日本食品衛生協会，東京（1998）
- 3) Cheryl.A.B.,Frances.W.B.,Joy.G.W.,and Nancy.A.S, Escherichia,Shigella, and Salmonella, Manual of Clinicalmicrobiol.7th, 459-474 (1999)
- 4) Nataro JP, Kaper JB : Diarrheagenic Escherichia coli, J.Clin.Microbiol.Rev, 11, 142-201 (1998)
- 5) 森屋一雄, 角典子, 中尾昌弘, 山崎貢, 齊藤眞, 伊藤健一郎：散発下痢症患者及び健常乳幼児由来大腸菌における局在性及び凝集性付着大腸菌(EPEC, EAgyEC)関連遺伝子,`eaeA,aggR,astA`の保有状況について, 感染症誌, 74, 134-141 (2000)
- 6) 伊藤武:下痢原性大腸菌の検査法,検査と技術,20, 981-987 (1992)
- 7) 伊藤文明,荻野武雄,伊藤健一郎, 渡辺治雄：混合プライマーを用いたPCRによる下痢原性大腸菌の病原遺伝子の同時検出法,日本臨床特別号, 52, 343-347 (1992)
- 8) 小林一寛：細胞付着性大腸菌の実態把握とその検査法の確立に関する共同研究, 平成11, 12年度 厚生科学研究費補助金健康科学総合研究事業報告, 1-14 (2001)
- 9) 木村晋亮, 小崎明子, 佐々木富子, 小松原彰：散発下痢症患者および健常者から分離された糞便由来大腸菌O抗原血清型の比較と地域差, 感染症誌, 73, 53-60 (1999)

短報

HCV 抗体検査導入による保健所 HIV 抗体検査希望者層への影響

嶋 貴子, 近藤真規子, 斎藤隆行,
渡邊寿美, 今井光信

Impact assessment of HCV antibody testing for voluntary and anonymous HIV testing program

Takako SHIMA, Makiko KONDO,
Takayuki SAITO, Sumi WATANABE
and Mitsunobu IMAI

はじめに

神奈川県下の保健所では1987年2月から HIV 抗体検査を実施している。HIV 抗体検査希望者数は1992年をピークに年々減少傾向にあり¹⁾, 2000年の HIV 検査希望者数は1992年度の約1/3程度となった。しかし2001年は4月25日～10月31日までの間, C型肝炎ウイルス検査を希望する人に対して, HIV 抗体検査と同時に受けることで HCV 抗体検査が無料で受けられる「HIV 抗体, HCV 抗体同時検査」が実施されたことにより, 前年度より検査数の増加が見られた。この事業は旧厚生省内に設置された「肝炎対策に関する有識者会議」の提言を受けて出された, 平成13年4月24日付健疾発第32号厚生労働省健康局疾病対策課長通知「保健所における HCV 抗体検査の実施に係るエイズ対策促進事業費の活用について」に基づき実施されたものである。今回は HIV 抗体検査, HCV 抗体検査の実施結果とともに, HCV 抗体検査導入により HIV 抗体検査希望者が増加した要因について, 検査数等の動向から解析を試みたので報告する。

神奈川県衛生研究所 ウィルス部
〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1

方法

1 HIV 抗体検査

神奈川県域の各保健福祉事務所から依頼された HIV 抗体検査希望者血漿について検査を実施した。保健福祉事務所での HIV の検査・相談はすべて匿名で行われており, プライバシーの保護に配慮されている。

抗体スクリーニング検査法としては, ゼラチン粒子凝集法(以下 PA 法: ジェネディア HIV-1/2ミックス PA, 富士レビオ社)を用いた。大和保健福祉事務所では厚生労働省「HIV 検査法・検査体制研究班」との協力により, HIV 核酸增幅検査(NAT 検査)を導入している。HIV 抗体検査希望者でウイルス検査も希望した人については PA 法と HIV 核酸增幅検査(NAT 検査)を同時に行つた。抗体スクリーニング検査法で陽性であった検体については, 確認検査法としてウエスタンプロット法(WB 法: ラブ・プロット1, 2, 富士レビオ社)を実施した。

2 HCV 抗体検査

2001年4月25日(実際には5月2日から検体搬入)～10月31日までの間, HCV 抗体検査を希望した人に対して, HIV 抗体検査と HCV 抗体検査を同時に実施した。HCV 抗体検査には第2世代の検査キットである PA 法(オーソ HCV Ab PA テストII, オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス社)を使用した。PA 法で陽性となつた検体については, 追加試験として PA 値の測定を行うとともに, 第3世代の検査キットであるイムノクロマト法(オーソ クイックチェイサー HCV Ab, オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス社)でも測定を行つた。

3 データ解析

HCV 抗体検査導入による HIV 抗体検査希望者数の増加要因を調べるために, 以下の解析を行つた。

(1) 2000年5～10月, 2001年5～10月の HIV 抗体検査実施数から, 保健福祉事務所別の前年比較を行つた。

(2) (1) から, 検査数の増加が大きかった保健福祉事務所と検査数にあまり増加がみられなかつた保健福祉事務所を選択した。選択した保健福祉事務所の2000年5～10月(HIV 抗体検査のみ実施期間), 2001年5～10月(HCV 抗体検査導入期間)の HIV 検査希望者の性別, 年齢階層データから解析を行つた。

結果および考察

1 HIV 抗体検査実施結果

神奈川県域(川崎, 横浜, 横須賀, 相模原市を除く)における2000年度の HIV 抗体検査数は1112件, 2001年

度は1550件であり、2001年度は2000年度より検査数が1.4倍増加した(図1)。2001年5～10月のHCV抗体検査導入期間では、HIV抗体検査のみ実施期間である2000年5～10月に比べ1.9倍(1051件/564件)の増加が見られた。2001年度でもHCV抗体検査が実施されなかった2001年4月、11月～2002年3月では、前年度の同月と比べほとんど変化が見られなかった。このことからHCV抗体検査の導入がHIV抗体検査希望者数の増加に関与したことが分かった。HIV抗体陽性数は2000年は0件、2001年は2件(HIV抗体検査のみ実施期間(4月)：1件、HCV抗体検査導入期間(5月)：1件)であった。2001年度のHIV陽性率は0.13%であり、神奈川県域のHIV陽性率は全国保健所等検査機関の陽性率(0.29%)²⁾と比べ低い傾向であった。またHIV抗体検査のみ実施期間のHIV陽性率は0.20%であったのに対し、HCV抗体検査導入期間のHIV陽性率は0.10%であった。このことからHCV抗体検査の導入がHIV抗体陽性数の増加に、積極的に関与したとは言えないことが分かった。

2 HCV抗体検査実施結果

2001年5～10月までのHCV抗体検査導入期間のHCV抗体検査数は837件であり、約8割がHIV抗体検査とHCV抗体検査を同時に受けている。HCV抗体陽性数は32件(陽性率3.8%)であった。年齢層別の陽性数をみたところ、29件(90.6%)は40代以上であったが、残りの3例(9.4%)は20代であった。HCVは血液による感染が主であり、性感染は少ないと考えられている³⁾。現在では水平感染は減少し、一般健常者集団での新たな感染によるC型肝炎ウイルスキャリアの発生は低率に抑えられている⁴⁾⁵⁾。しかし日赤においてHCV抗体検査が陰性であった献血血液のHCV-NAT検査を実施した結果、HCV-NAT陽性検体が少数ではあるが検出されており(30万人あたり1人)、また陽性者は10～30代の若年者が77%を占めていた⁶⁾。このことは現在でも新規感染が特に若年層を中心に存在することを示しており、今後感染経路の解明も含め、若年者のHCV感染の動向については注意が必要であると思われる。

3 HCV抗体検査導入によるHIV抗体検査希望者数の増加要因の解析

2000年5～10月、2001年5～10月のHIV抗体検査数から、保健福祉事務所別の前年比較を行った(図2)。すべての保健福祉事務所で検査数の増加が見られ、また検査件数が前年比2倍以上を示した保健福祉事務所は11ヶ所中7ヶ所あった。この結果に基づいて、解析可能なデータが得られた保健福祉事務所の中から、検査数の増加が大きく、比較的検査数が多い秦野保健福祉事務所(前年

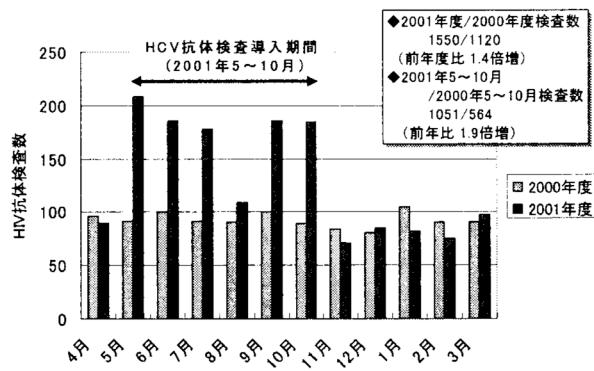


図1 HIV抗体検査数 年度比較 (2000年度, 2001年度)

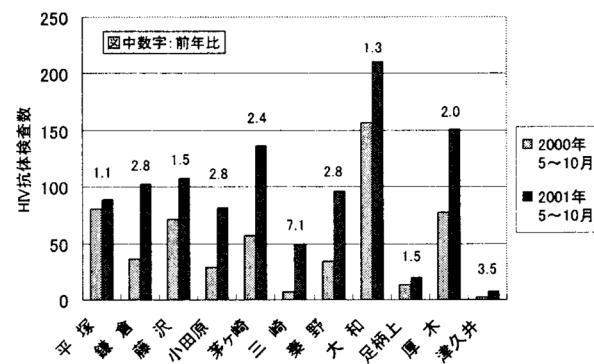


図2 保健福祉事務所別 HIV抗体検査数比較
(2000年5～10月/2001年5～10月)

比2.8倍増)と検査数の増加が小さかった大和保健福祉事務所(前年比1.3倍増)を選択し、各保健福祉事務所の2000年5～10月(HIV抗体検査のみ実施期間)、2001年5～10月(HCV抗体検査導入期間)のHIV検査希望者の性別データを用いて解析を行った(図3)。秦野保健福祉事務所では、2000年5～10月では女性が32%であったのに対し、2001年5～10月では49%に増加した(図3-A)。それに対し、大和保健福祉事務所では2000年5～10月と2001年5～10月で男女比に大きな差は見られなかった(図3-B)。また性別と年齢階層別データを合わせて解析を行ったところ(図4)、秦野保健福祉事務所では、2000年5～10月は検査数の約60%が20、30代男性であったが、2001年5～10月では20代女性が前年比2.8倍、40代以降女性が前年比11.0倍、40代以降男性が前年比8.0倍と検査数の増加が顕著に見られた(図4-A)。大和保健福祉事務所では2001年5～10月で30代男性が20代男性を上回り、また50代女性に増加がみられたが、傾向としてはあまり変化が見られなかった(図4-B)。これらの結果から、検査数の増加が見られた保健福祉事務所では、女性の検査希望者の増加、40代以降の検査希望者の増加が

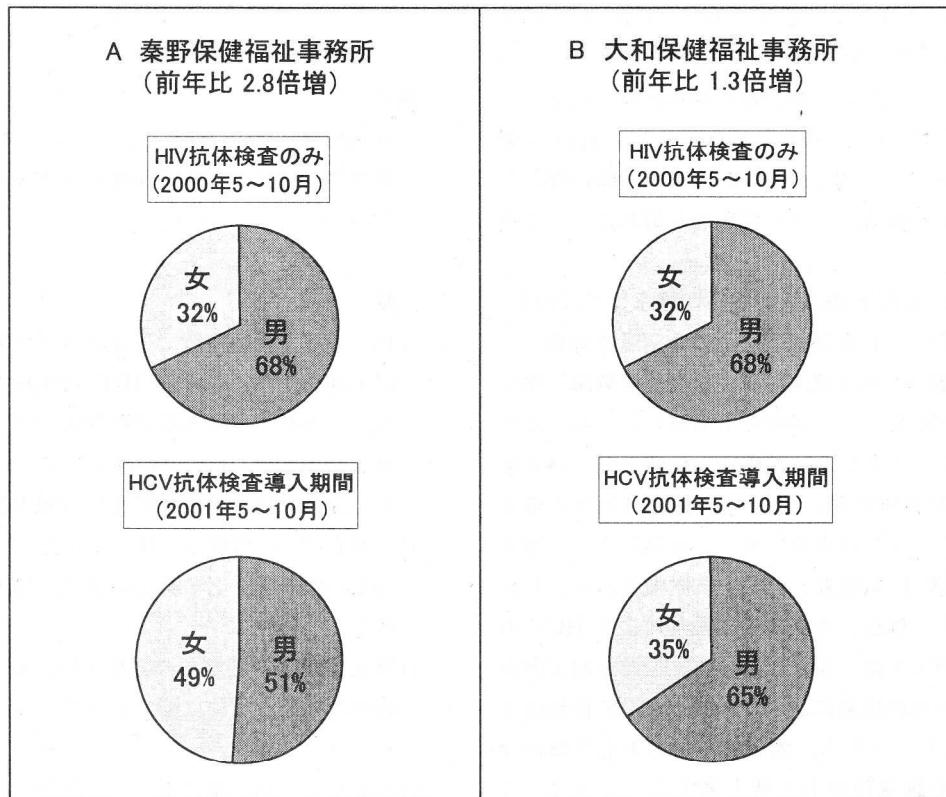


図3 HCV 抗体検査導入による検査希望者の性別割合の変化

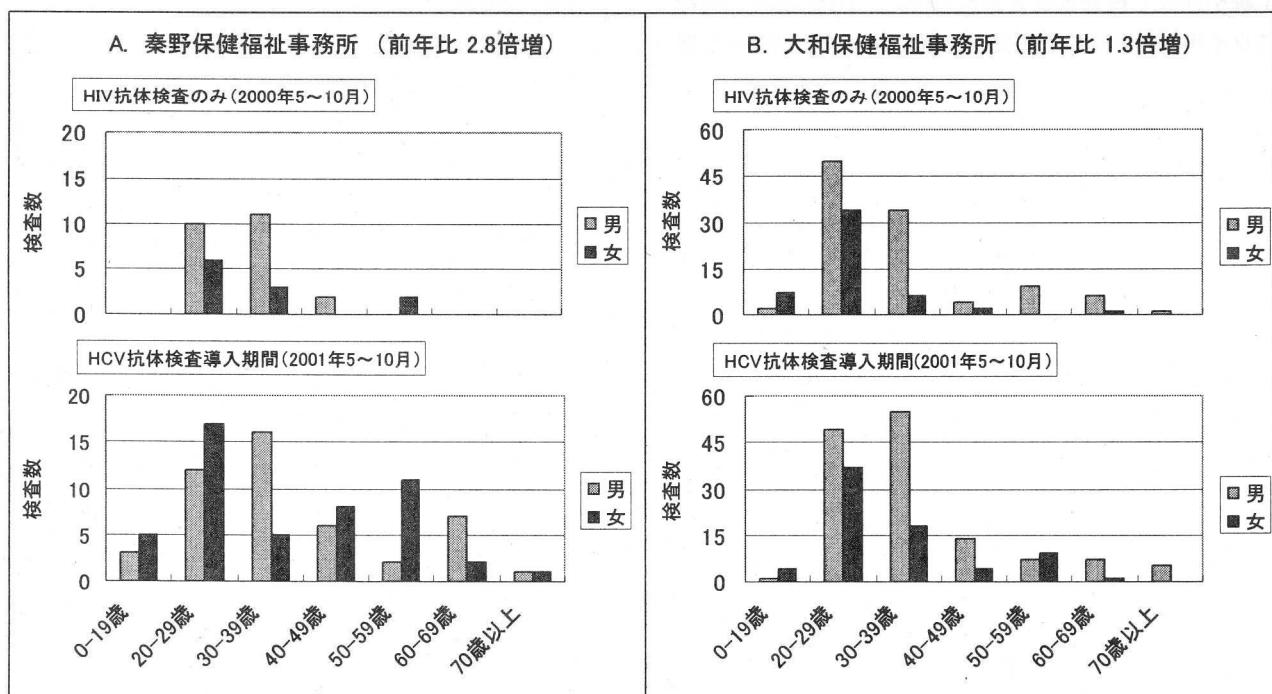


図4 HCV 抗体検査導入による検査数への影響 (年齢層別・性別)

要因であることが分かった。増加した検査希望者は HCV 感染リスク層（40代以上）が主であり、HIV 感染のリスク層である20, 30代男性の増加にはあまり寄与しなかった。しかし20代女性にも検査数の増加が見られたことは、HIV 感染のリスクを感じながらも今まで HIV 検査が受けづらかった人に対し、HCV 検査が同時に受けられることで HIV 検査に対する抵抗感が薄れたことが考えられる。

厚生労働省は2002年度より40歳～70歳までの5歳刻みの「節目」年齢の人および40歳以上の希望者を対象に、老人保健法に基づく基本健康診査、政府管掌健康保険の検診での C 型肝炎ウイルス検査を実施している。また平成14年3月27日付厚生労働省健康局長通知の「特定感染症検査等事業実施要綱」により、HIV 抗体検査事業でもウイルス性肝炎の検査を希望する40歳以上の希望者を対象に、HCV 抗体検査と HBs 抗原検査が受けられるようになった。輸血、血液製剤の投与による HCV の感染リスクに対しては、現状において充分な体制が敷かれたが、今回当所の検査において20代の HCV 抗体陽性者を3例経験したことから、若年者を中心とした新たな感染者に対する検査体制も必要と考える。また今まで HIV 感染のリスクを感じながらも検査を受けにくかった層に対し、他の検査項目と一緒に受けることで、HIV 検査を受けやすくなることも示唆されたことから、今後、年齢条件なく検査希望者全員に対し、HIV 検査と同時にウイルス性肝炎検査が受けられるような体制作りが期

待される。

(平成14年7月24日受理)

謝辞

貴重なデータを頂きました県衛生部保健予防課、大和保健福祉事務所、秦野保健福祉事務所の方々に深謝いたします。

文献

- 1) 林 孝子、斎藤隆行、近藤真規子、渡邊寿美、今井光信：神奈川県における HIV 抗体検査の動向に関する解析、神奈川県衛生研究所報告、29, 32-35(1999)
- 2) 厚生労働省「HIV の検査法と検査体制を確立するための研究」班：平成13年度研究報告書、18 (2002)
- 3) 今井光信、三代俊治：性感染症としての hepatitis virus 感染症、化学療法の領域、16, 2056-2060 (1999)
- 4) 厚生労働省「肝がんの発生予防に資する C 型肝炎検診の効果的な実施に関する研究」班：中間報告書、2 (2001)
- 5) 吉沢浩司：病因論に基づいた肝炎・肝がん対策、Ortho HCV Frontier, No. 1 (2001)
- 6) 厚生労働省「HIV の検査法と検査体制を確立するための研究」班：平成13年度研究報告書、22, 24, 114-121 (2002)

短報

玄米中のオキサジクロメホン及びフェノキサニルの残留分析法について

佐藤久美子, 岸 美智子, 佐藤修二

Analysis method for Oxaziclofone and Fenoxanil in Brown rice

Kumiko SATO, Michiko KISHI, Shuji SATOH

はじめに

オキサジクロメホンは除草剤であり、フェノキサニルは殺菌剤である。2つの農薬とも比較的新しく、オキサジクロメホンは2000年8月17日、フェノキサニルは2000年12月21日環境省で残留試験法が告示されている。作物残留にかかる基準値において、オキサジクロメホンは米0.1ppm、フェノキサニルは米1ppmと定められている。環境省の残留試験法における精製法ではオキサジクロメホンはC₁₈ミニカラムとフロリジルミニカラムが、フェノキサニルはシリカゲルミニカラムが用いられている^{1,2)}。ミニカラムにおける精製は、溶媒量を減らすことができる利点があるが、ロットにより精製効率にばらつきが見られることが多く問題もある。今回、食品衛生法の試験法で従来から用いられている、液液分配とオープンカラムを用いた方法で検討を行い、良好な結果を得ることができたので報告する。

方 法

1 試料

玄米は、こしひかり3ロット(茨城産、新潟産、魚沼産)、ひとめぼれ1ロット(宮城産)について検討を行った。

神奈川県衛生研究所食品薬品部

〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1

2 試薬

オキサジクロメホンは和光純薬工業社製残留農薬試験用をフェノキサニルは日本農薬社製残留農薬試験用を用いた。アセトン、n-ヘキサン、ジエチルエーテル及び無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業社製残留農薬試験用を用いた。

カラムクロマトグラフィーに用いた担体は、和光純薬工業社製フロリジル PR を用い、開封後130°Cで12時間加熱後デシケーターで風乾後使用した。

3 抽出法

抽出法については図1に示した。粉碎した試料10gに20mlの水を加え2時間放置した後、アセトンにて抽出を行い、濃縮、n-ヘキサン転溶、アセトニトリル分配による脱脂を行い抽出溶液とした。

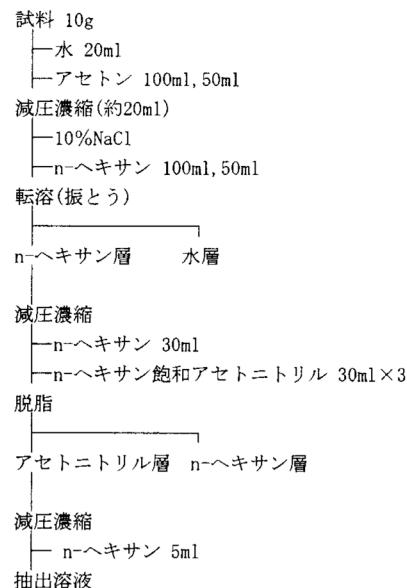


図1 オキサジクロメホン及びフェノキサニル抽出法

4 精製法

精製法については図2に示した。カラムについてはフロリジル PR5g を内径15mm、長さ300mmのガラスカラムにn-ヘキサンにて湿式充填を行い、その上に無水硫酸ナトリウムを5g 積層して調製した。n-ヘキサン5mlで溶解した抽出溶液を負荷した後、エーテル・n-ヘキサン(15:85)50mlで洗浄し、アセトン・n-ヘキサン(15:85)100mlで溶出し、溶出液を濃縮後、アセトンで4mlに定容し、試験溶液とした。

5 測定法

5・1 定性及び定量

熱アルカリ型検出器付きガスクロマトグラフ(以下GC-FTDとする)を用いた。ピーク面積法、絶対検量線法により測定を行った。

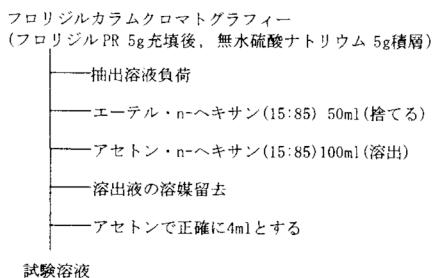


図2 オキサジクロメホン及びフェノキサニル精製法

装置：島津製作所製 GC-17A

カラム：J & W社製 DB-17

(内径0.25mm, 長さ30m, 膜厚0.25μm)

注入口温度：220°C 検出器温度：280°C

ガス流量：キャリヤーガス(He) 2.4ml／分

水素：1.5ml／分 空気：160ml／分

マイクアップガス(He)：30ml／分

カラム温度(昇温分析)：

50°C(2分)→15°C/分→180°C(2分)→20°C/分→
280°C(10分)

注入方式：スプリットレス法 注入量：2μl

5・2 確認試験

ガスクロマトグラフ質量分析計(以下 GC/MS とする)
を用いてオキサジクロメホン及びフェノキサニルの確認を行った。

装置

ガスクロマトグラフ：アジレント社製 HP-6890

質量分析計：日本電子社製 Automass150

カラム：J & W社製 DB-5

(内径0.25mm, 長さ30m, 膜厚0.25μm)

カラム温度：50°C(1分)→20°C/分→280°C(5分)

注入口温度：220°C

インターフェイス温度：250°C

イオン源温度：200°C

イオン化電圧：70eV

キャリヤーガス(He)：1.2ml／分

注入方式：スプリットレス法 注入量：2μl

5・3 定性・定量下限

(玄米) 定性下限(S/N=5) 定量下限(S/N=10)

オキサジクロメホン 0.01ppm 0.02ppm

フェノキサニル 0.005ppm 0.01ppm

6 添加回収試験

細切均一化した玄米10gに対し、オキサジクロメホン及びフェノキサニルを各1μg添加し、3回繰り返し試験を行った。

結果及び考察

1 検討結果について

抽出時の再抽出溶媒、脱脂操作、精製時の溶媒について検討を行った。(検討結果の回収率は以降、n=3、平均値±標準偏差とした)

再抽出溶媒については含窒素系農薬、有機リン系農薬で一般的に用いられる n-ヘキサンと酢酸エチル・n-ヘキサン(1:4)混液で比較検討を行ったところ、回収率が n-ヘキサンはオキサジクロメホン101.4±13.4%、フェノキサニル94.1±7.3%、酢酸エチル・n-ヘキサン(1:4)混液ではオキサジクロメホン106.9±7.8%、フェノキサニル103.3±4.3%で、いずれも良好な回収率を得ることができたが、実際に農産物に適用するにあたり、抽出後の妨害物質が少ないと考えられる n-ヘキサンを採用することとした。

脱脂操作については n-ヘキサン30mlに対する n-ヘキサン飽和アセトニトリル30ml の抽出回数について検討を行った(n=3)。1回目の抽出操作ではオキサジクロメホン79.2±6.6、フェノキサニル94.7±3.6%、2回目オキサジクロメホン6.4±0.9%、フェノキサニル3.9±0.4%で、3回目ではいずれも不検出であり、脱脂操作についてはいずれも2回の操作でアセトニトリル層に移行することがわかった。実際の操作では夾雑物等の原因によるエマルジョン生成の可能性等を考慮して、通常行われる3回抽出としたが、場合によっては回数を少なくすることも可能と考えられた。

精製操作についてはフロリジル PR を用い検討を行った。いずれもジエチルエーテル・n-ヘキサン混液では溶出せず、アセトン・n-ヘキサン混液で溶出された(表1)。

表1 フロリジルPRカラムによるオキサジクロメホン及びフェノキサニルの溶出パターン

	回収率(%)	
	オキサジクロメホン	フェノキサニル
F1(エーテル・ヘキサン 15:85)	ND	ND
F2(エーテル・ヘキサン 30:70)	ND	ND
F3(アセトン・ヘキサン 5:95)	101.3±2.2	ND
F4(アセトン・ヘキサン 15:85)	ND	105.6±4.5
F5(アセトン・ヘキサン 30:70)	ND	ND

(ND:不検出)

ガスクロマトグラフ条件については、いずれも含窒素農薬であるため窒素系化合物に選択性のある、GC-FTD の測定条件を検討した。オキサジクロメホンは注入口で熱分解し DCIM(N-methylene-1-(3,5-dichlorophenyl)-1-methylamine)を生じる³。今回測定した GC 条件下、標準溶液の測定時に生じた DCIM のピークは定量的であり、検量線も原点を通る直線性を示し、DCIM として測定することについて問題ないと考えられた。フェノキサニルも原点を通る直線性を示し、測定上問題ないと考えられた。GC 測定に用いるキャピラリーカラムは環

境省告示法に従い中極性の DB-17 を用いたところ、いずれもピーク形状、再現性ともに良好であった(図3)。

オキサジクロメホンが熱分解して生じた DCIM 及びフェノキサニルの GC/MS において得られたマススペクトルは DCIM においては $m/z=161, 189$ 、フェノキサニルにおいては $m/z=162, 189, 298, 328$ 等に特有なイオンが検出された(図4, 5)。

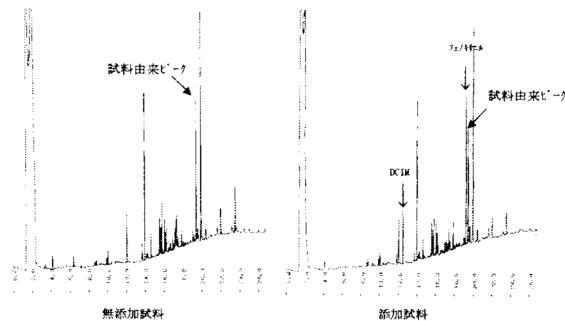


図3 玄米（新潟産コシヒカリ）のガスクロマトグラム

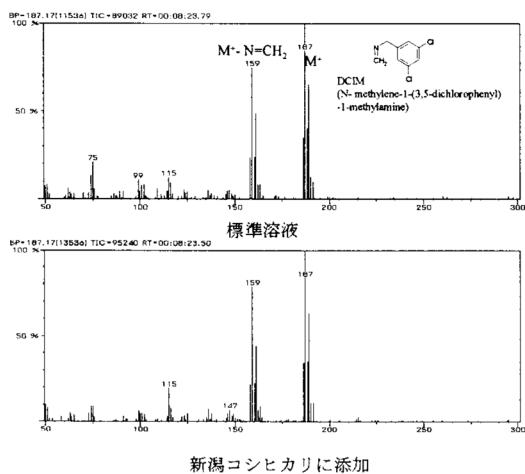


図4 DCIMのマススペクトル

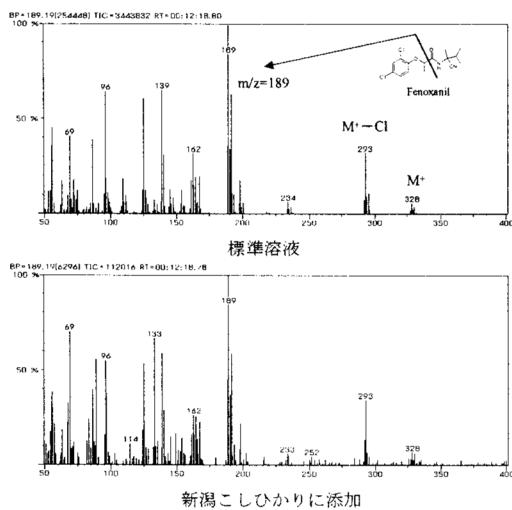


図5 フェノキサニルのマススペクトル

添加回収試験結果については米4ロットともに80%以上の良好な回収率を示した(表2)。無添加プランクについてはいずれの農薬も不検出であった。オキサジクロメホンについてはロットによって回収率に差が見られた。

表2 玄米におけるオキサジクロメホン及びフェノキサニルの添加回収試験結果

品目	回収率(%)	
	オキサジクロメホン	フェノキサニル
玄米(茨城産コシヒカリ)	92.9±0.8	98.5±0.9
玄米(魚沼産コシヒカリ)	87.6±2.1	99.4±3.3
玄米(新潟産コシヒカリ)	113.5±1.6	92.5±3.4
玄米(宮城産ひとめぼれ)	84.0±7.6	95.2±6.0

回収率が比較的高かったものについては、無添加プランクについて妨害ピークが見られなかったため、妨害ピークが重なったとは考えにくい。ピークに出ないマトリックス成分の影響も考えられた。オキサジクロメホンについては、今回ガスクロマトグラフを用い、オキサジクロメホンが熱分解して生じた DCIM を測定する方法を検討したが、検量線、添加回収率が良好なため、測定可能であると考えられる。フェノキサニルは添加回収試験においていずれのロットもばらつきの少ない良好な値を示した。直前に試料由來のピークが見られるため、カラムのコンディションには注意する必要があるものの、測定には問題ないと考えられた。

まとめ

アセトン抽出、n-ヘキサン転溶、アセトニトリル・n-ヘキサン脱脂、フロリジルカラムによる精製操作(ジエチルエーテル・n-ヘキサン洗浄、アセトン・n-ヘキサン溶出) GC-FTD 測定によって、玄米中のオキサジクロメホン及びフェノキサニルは妨害の見られない良好なクロマトグラムを示し、添加回収試験も全てのロットで80%以上の回収率で良好であった。本試験法は、玄米について残留試験法として適用可能である。

文献

- 1) 改訂3版農薬登録保留基準ハンドブック2000年追録、化学工業日報社「今日の農業」編集室 pp19-21(2001)
- 2) 藤崎 隆、菱田和己、佐藤信子、小松一裕：環境省より告示された農薬の作物残留分析法、第24回農薬残留分析研究会要旨集、p102(2001)
- 3) 上路雅子、小林裕子、中村幸二編：2002年度版残留農薬分析法、pp387-388、ソフトサイエンス社(2001)

短報

食品添加物製剤中の単糖類および二糖類の分析

山田利治

Determination of monosaccharides and disaccharides in food additive preparations

Toshiharu YAMADA

はじめに

食品添加物製剤は添加物单品ではなく、2種類以上の添加物を配合したり、水や食品素材で希釈したりして食品加工の際に使用しやすくしたものもいい、食品衛生法では成分の名称や配合割合などの表示が義務付けられている。しかし、確立された分析法がなく成分の含量許容範囲も定められていない。そこで、製剤が表示通りに正しく配合されているかどうか確認、分析する必要がある。製剤には多種類の成分が配合されているため、適切な前処理、抽出溶媒の選択、共存物質の影響、モデルサンプルによる回収率などについて検討し、分析法を確立することが大切である¹⁻³⁾。前報⁴⁾に引き続き、今回は糖製剤中の単糖類、二糖類を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて分析する方法を検討したので報告する。

実験方法

1 試料

県内製造所より入手した製剤を使用した。

2 試薬及び標準溶液

フルクトース(Fru)、グルコース(Glu)、スクロース(Suc)、ラクトース(Lac)、マルトース(Mal)は和光純薬製特級品を、ペクチン、カラギナン、カロブビーンガム(ローカストビーンガム)はSigma社製を、アセトニトリルは和光純薬製HPLC用をもちいた。

混合標準原液：Fru, Glu, Suc, Mal および Lac の各50mgを正確に量り、全ての糖を水に溶解し、正確に50mL(各1000μg/mL)とし、混合標準原液とした。

混合標準溶液：混合標準原液 5mLをとり、アセトニトリル 5mLを加えて混合標準溶液(各500μg/mL)を作製した。

3 HPLC 装置および測定条件

装置：HITACHI L-6000型ポンプ、L-3350 RI検出器、L5030カラムオーブン、D-2520クロマトデータ処理装置。カラム：Asahipak NH2P-50 4E(4.6mmID×250mm)昭和電工製、カラム温度：30°C、移動相：アセトニトリル・水(75:25)、流速 0.7mL/min、注入量：20μL。

4 試験溶液の調製

試料 0.2gを精秤し、約30mLの水をいれた50mLのメスフラスコ中に少量づつ攪拌しながら加えて溶解し、水を加えて50mLとする。0.45μmのミリポアフィルターでろ過した後、この1mLをとり、水1mLおよびアセトニトリル2mLを加えて(4倍希釈)試験溶液とした。

結果及び考察

1 抽出法の検討

3種類の糖製剤の表示内容を表1に示した。

表1 糖製剤の組成表示

製剤235	
ペクチン	65%
クエン酸(無水)	13%
食品素材(グラニュー糖)	22%
	100%

製剤236	
カラギナン(A)	17.5%
カラギナン(B)	17.5%
カロブビーンガム	36.0%
クエン酸三ナトリウム	8.0%
食品素材(乳糖)	21.0%
	100.0%

製剤245	
炭酸ナトリウム(無水)	20.0%
炭酸カリウム(無水)	10.0%
フマル酸	3.0%
カゼインナトリウム	0.5%
食品素材(糖)	66.5%
	100.0%

食品素材が糖類であるという内容にもとづいて、抽出には水を用いた方法を検討した。ペクチン、カラギナン等の多糖類を含む製剤は水を一度に加えると塊を生じ、目的成分が抽出されにくくなるため、試料を水に少量づつ攪拌しながら加えて溶解させ、水で一定量にした。濁りを生じたならば $0.45\mu\text{m}$ のミリポアフィルターを通することで透明な抽出液が得られた。水を用いるだけの簡易な操作で抽出することが可能であった。

2 HPLC 条件の検討

糖類のHPLC分析にはカラムとしてアミノ基結合型(分配)が用いられており、各社から市販されている。本分析法では Asahipak NH2P-50 4E を選択し、各糖の分離能とカラム圧等を考慮して移動相はアセトニトリル・水(75 : 25)、カラム温度は 30°C 、流量は $0.7\text{mL}/\text{min}$ とした。

標準溶液および試験溶液を水溶液にして本条件下でHPLCに注入したとき、SucとLacのピークがそれぞれ割れる現象が生じたため、50%アセトニトリル溶液にしたところ単一のピークが得られた。

糖類の標準品クロマトグラムと製剤236のクロマトグラムを図1に示した。本条件下での保持時間は Fru 10.3分、Glu 13.1分、Suc 17.8分、Lac 20.1分、Mal 21.4

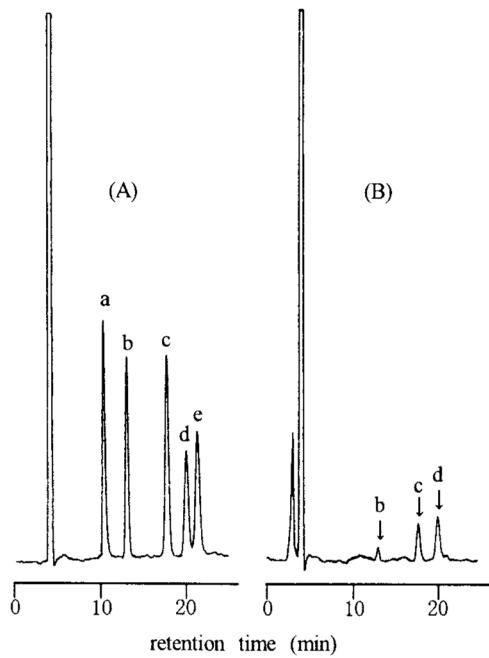


図1 糖類の標準溶液および製剤236のHPLCクロマトグラム

(A) 標準溶液($500\mu\text{g/mL}$)、(B) 製剤236試料溶液
a:フルクトース、b:グルコース、c:スクロース、
d:ラクトース、e:マルトース
HPLC条件:実験方法3に記載

分であった。各製剤はいずれも妨害となるピークは認められなかった。

3 検量線

混合標準溶液 0.2 , 0.4 , 0.8 , 2.0 および 4.0mL を正確にとり、それぞれに50%アセトニトリル溶液を加えて 4.0mL とし、HPLCに注入して得られたピーク面積により検量線を作成した。 25 ~ $500\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性を示した。

4 市販糖製剤の分析

検討した方法を用いて市販製剤を分析した結果を表2に示した。

表2 糖製剤中の糖類の分析結果

試料名	検出された糖(%)				
	フルクトース	グルコース	スクロース	ラクトース	マルトース
製剤235	ND	8.5 *	13.5	ND	ND
製剤236	ND	3.7 *	10.7 *	21.0	ND
製剤245	6.0 #	14.0 #	ND	26.5 #	ND

ND:不検出(2.5%以下)

*:表示のなかったもの

#:糖の固有名表示のなかったもの

試験結果より糖製剤の表示に問題のあることがわかつた。すなわち、製剤235からは表示がない Glu が検出され、製剤236からは Glu と Suc がそれぞれ検出された。また、製剤245は「食品素材(糖)」の表示のみで具体的な糖の名称の表示がなく、Fru, Glu, Lac の3種類が検出された。この原因を明らかにするため、製剤とともに製造所より同時に入手しておいた配合成分の添加物単品原料すべてについて、糖の分析を実施した。その結果、製剤235の場合はペクチン中から Glu 14.2%, 製剤236の場合はカラギナン(B)中から Glu 17.6%, カロブビーンガム中から Suc 25.5%が検出定量され、いずれも単品原料に由来することが明らかとなった。また、製剤245の「食品素材(糖)」の糖は Fru 8.2%, Glu 21.2%, Lac 41.0%であった。

一般にペクチン、カラギナン等の天然添加物はゲル化剤、増粘安定剤として食品に使用されるが、原料の性状が不安定なため、力価の安定をはかるためにこれらの糖を加えて調整し、一定品質に保つために使用されるといわれている⁵⁾。

5 添加回収実験

市販製剤の分析結果をもとに製造所より入手した原料および市販試薬を用いて、3種類の製剤について表示と同じ割合に実験室でモデル製剤を調製し、確立し

た分析方法を用いて各糖の添加回収率を求めたものを表3に示した。

表3 モデル製剤による糖類の添加回収率

モデル製剤	成分名	配合割合(%)	回収率(%)*
製剤235'	グルコース	8.5	95.4±0.7
	スクロース	13.5	95.1±0.6
製剤236'	グルコース	3.7	96.6±0.3
	スクロース	10.7	95.9±0.5
製剤245'	ラクトース	21.0	98.9±0.2
	フルクトース	6.0	96.0±0.6
	グルコース	14.0	98.5±0.3
	ラクトース	26.5	98.7±0.5

* 平均値±S.D. (n=3)

それぞれ3回繰り返し測定したところ、いずれも95%以上の回収率を示し、標準偏差は0.7以内であり、良好な結果が得られた。

まとめ

食品添加物の糖製剤について分析法を検討し、HPLCによる方法を確立した。製剤中の糖成分の抽出には水を用いる簡易な方法ができることがわかった。また、配合成分の添加物単品原料を製造所より入手し、表示と同じ配合割合に実験室でモデル製剤を調製し、確立した分析法を用いて添加回収率を求めたところ、い

ずれの糖も95%以上の良好な結果を得ることができ、この分析方法の有益性が示された。

市販糖製剤を分析した結果、表示にない糖類が検出されたもの、「食品素材（糖）」という一般的な表示のみで具体的な糖名が記載されていなかったものなど、現行の食品衛生法の添加物全面表示の観点からは問題の残るものがあり、表示に対する適正な判断が望まれる。

(平成14年7月24日受理)

文献

- 1) 岸 弘子, 川名清子, 谷 孝之: 食品添加物製剤中の有機酸の分析, 神奈川衛研報告, 28, 43-46 (1998)
- 2) 中島和男, 高橋巖, 広門雅子, 植松洋子, 松井敬子, 風間成孔: 食品添加物製剤中の天然物の分析, 東京衛研年報, 39, 147-150 (1988)
- 3) 風間成孔: 食品添加物および食品添加物製剤の分析法, FFI ジャーナル, 157, 28-41 (1993)
- 4) 山田利治, 川名清子: 食品添加物製剤の主成分分析－酸化防止剤－, 神奈川衛研報告, 31, 100-102, (2001)
- 5) 食品化学新聞社編: 天然添加物と新食品素材, 食品化学新聞社, p63-65 (1988)

短報

化粧品中のフェノキシエタノールの高速液体クロマトグラフィーによる分析

土井佳代

The Analytical Methods of Phenoxyethanol in Cosmetics by High Performance Liquid Chromatography

Kayo Doi

はじめに

化粧品にはその品質を保持するために、防腐剤等多くの成分が配合されている。従来は配合禁止成分、表示成分等が規定されていたが、平成12年9月に化粧品基準¹⁾が施行され、配合全成分表示等義務付けられると共に、防腐剤、紫外線吸収剤、タル色素以外の成分の配合禁止及び防腐剤、紫外線吸収剤、タル色素の配合の制限が定められた。フェノキシエタノール(2-phenoxyethanol, PE)は従来から化粧品や医薬部外品に防腐剤及び酸化防止剤として使用されているが、表示成分には指定されていなかった。今回の化粧品基準では、PEは、すべての化粧品に100gあたり1g以下の配合が認められた成分である。そこで、クリーム及び化粧水中のPEの定量方法について高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析条件の検討を行い、良好な結果が得られたので報告する。

方法

(1) 試薬及び標準溶液の調整

試薬はすべて和光純薬製 試薬特級品を用い、標準品

神奈川県衛生研究所 食品薬品部

〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1

としたPEについてはHPLCによる不純物ピーク含量比による純度を試験し、PEのピーク保持時間の6倍では0.05%以下であることを認めた。

PE約0.1gを精密に量り取り、メタノールで正確に100mLとし、標準原液とする。標準原液5mLを取り、メタノールで正確に25mLとした液を1%配合用の標準液とし、標準原液2mLを正確に取り、メタノールで正確に100mLとし0.1%配合用の標準液とした。なお、定量範囲等の試験には4段階に希釈した各標準液について注入量5～40μLで試験した。

(2) 試料

試験に供した化粧水及びクリームは、表1に示した配合成分および配合量で調製した0.1%PE配合及び1%PE配合品を用いた。

(3) 試料溶液の調製

化粧水は、試料約1gを精密に量り取り、メタノールで正確に50mLとする。この液を孔径0.45μm、口径

表1 試験に用いた化粧水及びクリームの処方

化粧水		
成分	0.1%PE	1%PE
PHENOXYETHANOL	0.1	1
ALCOHOL	15	15
PEG-60 HYDROGENATED CASTOR O	0.5	0.5
GLYCERIN	3	3
BUTYLENE GLYCOL	5	5
CITRIC ACID	0.05	0.05
SODIUM CITRATE	0.15	0.15
METHYLPARABEN	0.1	0.1
WATER	76.1	75.2

クリーム		
成分	0.1%PE	1%PE
PHENOXYETHANOL	0.1	1
GLYCERYL STEARATE SE	1	1
GLYCERYL STEARATE	1	1
CETYL ALCOHOL	3	3
MINERAL OIL	15	15
PETROLATUM	3	3
OCTYLDODECYL MYRISTATE	6	6
SODIUM CETYL SULFATE	2.4	2.4
GLYCERIN	3	3
BUTYLPARABEN	0.1	0.1
METHYLPARABEN	0.2	0.2
WATER	65.2	64.3

13mmのメンブランフィルターによりろ過し、最初のろ液2mLを捨て、次のろ液を試料溶液とした。

クリームは、水/メタノール(1:1)およびメタノールに分散する方法について行った。

水/メタノール(1:1)に分散する方法は、試料約1gを精密に量りとり、水/メタノール(1:1)を30mL程度加えて、超音波に5分間かけて分散する。室温になるまで放置後正確に50mLとする。この液を孔径0.45μm、口径25mmのメンブランフィルターによりろ過し、最初のろ液2mLを捨て、次のろ液を試料溶液とした。

メタノールで抽出する方法は、試料約1gを共栓試験管に精密に量りとり、メタノール20mLを加えて良く

振り混ぜた後、超音波洗浄機により 5 分間抽出する。No. 6 のろ紙を用いてろ過し、残分についてメタノール 10mL で同様に 2 回行う。ろ紙をメタノールで洗い、全ろ液及び洗液を合わせてメタノールで正確に 50mL とする。この液を孔径 0.45μm、口径 13mm のメンブランフィルターによりろ過し、最初のろ液 2mL を捨て、次のろ液を試料溶液とした。

(3)HPLC による分析

HPLC 測定機器には、ウォーターズ社の M996PDA-32 のフォトダイオードアレイ検出器を付したアライアンス 2690 システムを用いた。カラムは Inertsil ODS 4.6x150mm (5μm, GL サイエンス製)を用いた。移動相に水／アセトニトリル(7:3)を流量 1mL/min で流し、10 ~ 20μL 注入し、検出は紫外外部吸光光度計（測定波長 270nm）で行った。

結果

(1) HPLC 測定条件

PE は、メチルパラベン(MPABA)と保持時間が接近していることが知られている²⁾。そこで PE と MPABA の分離及び他のパラベンとの保持時間の関係を、ODS 系カラムにおける移動相の違いについて検討を行った。パラベン類に関する HPLC 分析法の報告は多く³⁻⁵⁾、これらの移動相を参考に、水、アセトニトリル、メタノール、塩化トリメチルアンモニウムおよびリン酸緩衝液等の配合による保持時間への影響を測定した。その結果、水／アセトニトリル(7:3)を移動相として用いた場合、PE と MPABA の分離がよく、保持時間が長いブチルパラベンが約 36 分と比較的短い結果が得られた。また、検出は PE の吸収極大の 270nm によることとした。本条件による PE の理論段数は 11900、シンメトリー係数は 1.1、MPABA の理論段数は 11400、シンメトリー係数は 1.2 で、PE と MPABA の分離度は 4 であった。標準液 50ng 及び 100ng 相当量の 6 回繰り返し注入によるピーク面積の変動係数は 1 % 以下であった。

本条件における PE の定性下限値を S/N 比 3.3 以上で求めた結果 2ng で、定量下限値を S/N 比 10 以上で求めた結果 10ng 以上であった。

(2)検量線の作成

10ng ~ 40μg の範囲で PE のピーク面積と PE 量 (ng)より検量線を作成した結果、相関係数 0.999 以上で直線性が認められた。3 回検量線を作製した結果、傾き 581.79 ± 1.45 Y 切片・6700 ± 957 と変動は小さかった。なお、定量には Y=581.55X-7514.5 の回帰式を

用いた。

(2)試料溶液の調製方法の検討

化粧水はメタノールにより澄明に溶解したことから、試料約 1g を精密に量り取り、メタノールで正確に 50mL とし試料溶液とした。クリームは、メタノールでは不溶分が認められた。水／メタノール(1:1)では白濁状態で分散した。そこで、水、水／メタノール(3:1)、水／メタノール(1:1)、水／メタノール(1:3)及びメタノールによる懸濁での比較を 1%PE 配合クリームについて行った。その結果、表 2 に示したようにメタノール量が増えるに従って若干増加する傾向が見られた。ただし、

水／メタノール(1:3)及びメタノールでは不溶分を認めた。そこで、溶解液を水／メタノール(1:1)とする方法とメタノール抽出による方法について試験を行った。次に、材質がナイロン、ポリプロピレン、ポリビニリデンフロリド、ポリエーテルスルホン、ポリテトラフロロエチレン及びポリプロピレン、ポリテトラフロロエチレンあるいはナイロンとガラスフィルターの 2 重構造の 8 種類のメンブランフィルターについて吸着の

表 2 溶解液の違いによる PE の定量結果

溶解液	PE 量 mg/g
水	9.54
水／メタノール(3:1)	9.68
水／メタノール(1:1)	9.74
水／メタノール(1:3)	9.81
メタノール	9.90

有無をみた結果、PE 標準液についてはいずれのフィルターでも最初のろ液 0.5mL から PE 量に変動を認めなかつた。試料溶液では、最初のろ液 0.5mL では PE 量の低いものが認められたが、いずれのフィルターもその倍の 1mL あるいは 2mL を捨てれば吸着は無視できることがわかった。

(3)試験結果

1%PE 配合化粧水及び水／メタノール(1:1)に分散する方法による 0.1% 及び 1%PE 配合クリームより得られたクロマトグラムを図 1 に、また各 6 回試験を行った結果を表 3 に示した。

まとめ

化粧品に防腐剤等として配合される PE の定量方法について試作のローションおよびクリームについて検討を行った。まず、PE は防腐目的で頻用されている MPABA と HPLC の保持時間が接近していることから、HPLC 溶離条件を検討し、水／アセトニトリル(7:3)で

表3 各試料6回繰り返し試験結果

試料	化粧水		クリーム		メタノール抽出	
	0.1%PE配合	1%PE配合	0.1%PE配合	1%PE配合	0.1%PE配合	1%PE配合
平均値(%)	0.1052	1.0149	0.1055	0.9994	0.1037	0.9794
S.D.	0.0002	0.0040	0.0003	0.0059	0.0009	0.0083
CV値	0.2249	0.3960	0.3102	0.5931	0.8911	0.8468

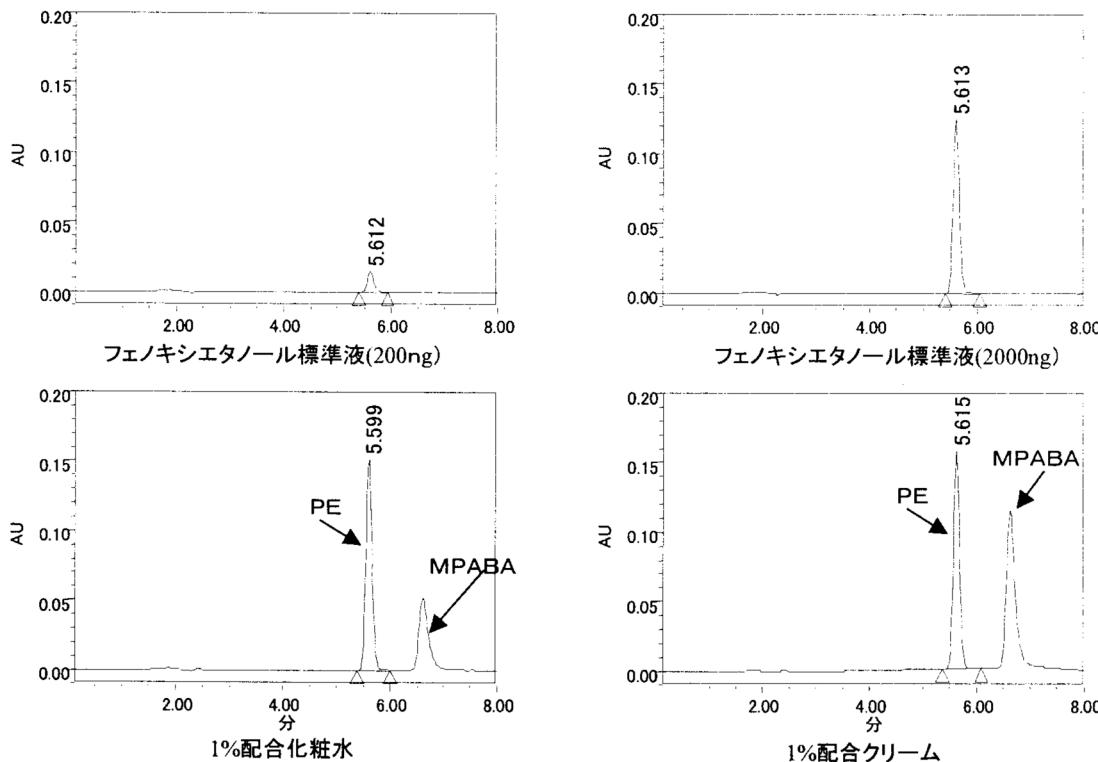


図1 フェノキシエタノール標準品及び化粧品のクロマトグラム

分離度が高く、他のパラベン類の測定でも長時間を要しない結果が得られた。試料溶液の調製では、ローションはメタノールで希釈するだけで測定が可能であったが、クリームは、メタノールのみでは不溶分が認められたことから水／メタノールの溶解液あるいはメタノールで抽出する方法について検討を行った。その結果、水／メタノール(1:1)の溶解液で、99%以上の回収率が得られ、メタノール抽出でも98%以上の回収率が得られた。また、各6回繰り返しの結果も1%以下と良好な結果が得られた。クリームの配合成分により調整方法を選択することが可能と思われる。

(平成14年7月24日受理)

文献

1) 平成12年9月厚生省告示第330号および厚生省

告示331号

- 2) 前田有美恵、小和田宏、山本政利、佐野智子、増井俊夫: フェノキシエタノールを含有する化粧品中のパラベン類の分析、静岡県環境衛生センター報告、32,33-36(1989)
- 3) 日本薬学会編、衛生試験法・注解、658-660、金原出版、東京(2000)
- 4) 斎藤恵美子、木嶋敬二、武田明治:高速液体クロマトグラフィーによるアイライナー中のパラオキシ安息香酸エステル類の定量、衛生試験所報告、106,97-101(1988)
- 5) 三上栄一、藤井裕子、河村典久、早川順子:アイライナーカードに含まれるパラオキシ安息香酸エステル類の定量及びその実態調査、愛知衛所報、43,29-33(1993)

短報

黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン遺伝子保有とその產生について

尾上洋一, 古川一郎, 寺西 大, 長谷川幸江

Production of Enterotoxins and Detection of Genes for Enterotoxins in *Staphylococcus aureus*

Yoichi ONUUE, Ichiro FURUKAWA, Hiroshi TERANISHI and Yukie HASEGAWA

はじめに

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はヒトや動物などに広く分布していることから、各種食品は *S. aureus* に汚染される機会が多く、食品中に產生されるブドウ球菌エンテロトキシン (staphylococcal enterotoxin, SE) により食中毒が発生する。*S. aureus* の SE 產生能のこれまでの確認方法は、培養液中の SE 產生量を逆受身ラテックス凝集反応法 (RPLA 法) を用いて測定することにより行われてきた。近年、polymerase chain reaction (PCR) 法による SE 遺伝子の検出法が報告され¹⁾、また、プライマーも市販されるようになったが、SE 遺伝子の保有と SE 產生の関係が十分に明らかになっていない。そこで、SE 產生基準菌株、食中毒原因食品および市販食品から分離された *S. aureus* 菌株を用いて、SE 遺伝子の検出と SE 產生性との関わりを検討した。また、*S. aureus* の鑑別に特徴的な生化学性状を調べた。

材料および方法

1 供試菌株

S. aureus は Dr. Bergdoll より分与された SE 產生基

神奈川県衛生研究所食品獣疫部

〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1

準菌株である *S. aureus* 100(SEA 產生), 196E(SEA), 243(SEB), S-6(SEB), 137(SEC), 361(SEC) の6菌株、わが国の食中毒原因食品より分離された7菌株および市販食品から分離された12菌株を用いた。

2 生化学性状試験

各供試菌株を卵黄加マンニット食塩寒天培地 (MSEY 培地; 日水) および Baird-Parker 寒天培地 (BP 培地; Difco) に塗抹し、35°C、48時間培養後、MSEY 培地においてはマンニットの分解性と卵黄反応の有無を、BP 培地においては亜テルル酸の還元による集落の黒色化と卵黄反応の有無を調べた。また、ウサギプラズマ (栄研) を用いてコアグラーーゼ試験を行った。

3 SE 遺伝子の検出および SE 產生性

Johnson らの報告¹⁾に基づき4種のプライマーセットを作成した。各プライマーおよび増幅サイズは SEA 1&2(120bp), SEB 1&2(478bp), SEC 1&2(257bp), SED 1&2(317bp) である (表 1)。試料調製は BHI 培地 (Difco) にて 35°C、24時間培養した菌体懸濁液を TE buffer を加え 95°C、10分間加熱することにより行った。

表1 *S. aureus* のエンテロトキシン遺伝子検出用プライマー

プライマー	検出遺伝子	増幅DNA
SEA 1&2	sea	120bp
SEB 1&2	seb	478bp
SEC 1&2	sec-1	257bp
SED 1&2	sed	317bp

PCR の条件は熱変性 94°C、1分、アニーリング 55°C、1分、伸長反応 72°C、1 分で 35 サイクル行った。増幅産物は、アガロースゲル電気泳動後、エチジウムプロマイド染色により確認した。SE 產生量の測定は *S. aureus* を BHI 培地に接種し、35°C、24時間培養後の遠心上清を用い、添付の希釈液で 2 倍階段希釈し、RPLA 法 (ブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット、SET-RPLA、デンカ生研) により行った。RPLA 法による SE の検出感度は 2ng/mL であることから、その產生量を求めた。

結果および考察

1. 供試 *S. aureus* の生化学性状

SE 產生基準菌株6菌株は MSEY 培地においては、すべてマンニット分解陽性であり、卵黄反応は陽性 4、陰性 2 菌株であった。欧米で多用されている BP 培地においては6菌株すべてが亜テルル酸を還元して黒色集落を形成し、卵黄反応は陽性 4、弱陽性 1、陰性 1 菌株であった (表 2)。わが国の食中毒原因食品由来 7 菌株およ

表2 *S. aureus* のエンテロトキシン遺伝子保有状況とエンテロトキシン産生性

由来	菌株	生化学性状					検出遺伝子				エンテロトキシン産生量(ng/ml)			
		マンニット 分解	コアグラーゼ	卵黄反応 MSEY培地	卵黄反応 BP培地	亜テルル 酸還元	sea	seb	sec-1	sed	SEA	SEB	SEC	SED
SE産生 基準菌株	100	+	+	+	+	+	+	-	-	-	320	-	-	-
	196E	+	+	-	-	+	+	-	-	+	640	-	-	80
	243	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	20,480	-	-
	S-6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	320	640	-	-
	137	+	+	-	+w	+	-	-	+	-	-	-	640	-
	361	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	160	320
食中毒原因 食品(日本)	T6119	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	5,120	-
	T7436	+	+	+	+	+	+	-	+	-	640	-	2,560	-
	K858	+	+	+	+	+	+	+	-	-	320	640	-	-
	A 13	+	+	+	+	+	+	+	-	-	160	80	-	-
	A 14	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	320	-	-
	A 15	+	+	+	+	+	+	-	-	-	640	-	-	-
	A 17	+	+	+	+	+	+	-	-	-	640	-	-	-
市販食品 (日本)	B 18	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	20	-
	B 21	+	+	+	+	+	+	+	-	-	640	320	-	-
	B 23	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	640	-	-
	B 25	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	B 26	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	10,240	-
	B 28	+	+	+	+	+	+	+	-	-	640	640	-	-
	B 29	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	B 31	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	B 33	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	320
	B 34	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	1,280	-
	B 36	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	2,560	-	-
	B 37	+	+	+	+	+	+	+	-	-	640	-	-	-

MSEY培地、卵黄加マンニット食塩培地; BP培地、Baird-Parker寒天培地

+w.弱陽性

び市販食品由来12菌株は MSEY 培地および BP 培地上において、それぞれ定型的かつ明瞭な卵黄反応を示す集落を形成した。SE 産生基準菌株中には卵黄反応陰性や弱陽性の菌株が見いだされたが、わが国の食品に由来する菌株はすべて卵黄反応陽性であった。これは、わが国では *S. aureus* の分離に際して MSEY 培地が広く用いられ、卵黄反応陽性の定型的な集落のみを釣菌していることによると考えられる。コアグラーゼ試験はすべての菌株が陽性であった。

2 SE 遺伝子保有状況および SE 産生

SE 産生基準菌株6菌株においては *S. aureus* 100は sea, 196E は sea および sed, 243は seb, S-6は sea および seb, 137は sec-1, 361は sec-1および sed の遺伝子を保有していた(表2)。

食中毒原因食品由来7菌株では、複数の遺伝子を保有するものは sea および seb 保有の2菌株, sea および sec-1 保有の1菌株が見いだされ、単独保有菌株は sea 保有2菌株, seb, sec-1 保有はそれぞれ1菌株ずつであった。*S. aureus* による食中毒事例の大多数が SEA によって起こっていることが報告されている²⁾が、sea 遺伝子を保有していた菌株は今回の食中毒7事例においても5事例を占めていた。

市販食品由来12菌株における保有遺伝子は sea および seb の複数の遺伝子を保有するものが2菌株あり、単独保有菌株は sea 1菌株, seb 2菌株, sec-1 3菌株, sed 1菌株であり、SE 遺伝子保有が認められなかったも

のは3菌株であった。

S. aureus 各菌株の SE 産生量を RPLA 法により求めたところ、SEA 160~640ng/mL, SEB 80~20,840 ng/mL, SEC 20~10,240ng/mL, SED 80~320ng/mL であり、SEB および SEC 産生量の高いものが認められた。

これは SE 別の産生量について寺山らが菌株による違いもさることながら SE 型により大きな違いがみられ、SEB, SEC は大量に産生されるが、SEA はその1/10程度であり、SED はさらに産生量が低いと報告していることと一致していた²⁾。寺山²⁾, 尾上ら³⁾は、市販食品では SE 産生量の高い SEB, SEC 産生菌が多く分離されるにもかかわらず食中毒事例に SEA 産生菌株が多い要因として、水分活性を低くした培地では SEB, SEC の産生が抑制されるのに対して SEA の産生は影響されにくいことを見いだし、食品中においても同様の現象が起きるため、SEA による食中毒発生に結びつくと推察している。

SE 産生性と SE 遺伝子保有状況との関連を比較すると RPLA 法による SEA ~ SED 産生性と PCR による sea ~ sed 遺伝子保有のパターンは26菌株すべてで一致し、Johnson らのプライマーの有用性が確認された。

SE 遺伝子を保有しながら SE 産生量が RPLA の検出限界である2ng/mL 以下を示す菌株の存在も想定されたが、本実験においては SE 遺伝子を保有している *S. aureus* は BHI 培地で20ng/mL 以上の SE を産生し、SE 遺伝子の存在と SE 産生とは密接にリンクしていること

が示唆された。また、*S. aureus* 培養上清について RPLA 法による SE 産生量の測定を行うことにより、食品中の SE 産生能が推測可能となり、この方法の有用性は遺伝子解析が普及しても変わらないと考える。

(平成14年7月24日受理)

文 献

- 1) Johnson, W. M., Tyler, S. D., Ewan, E. P., Ashton, F. E., Pollard, D. R. and Rozee, K. R. : Detection of genes for enterotoxin, exfoliative toxins and toxin shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29, 426-430(1991)
- 2) 寺山 武：*Staphylococcus*，食水系感染症と細菌性食中毒，坂崎利一編，p336-359，中央法規，東京(1991)
- 3) 尾上洋一，高橋孝則，森 実：水分活性と pH との相乗作用によるブドウ球菌エンテロトキシン産生の抑制効果について，日細菌誌，42, 751-755(1987)

短報

オキシテトラサイクリンの消長に影響する要因について

寺西 大

Influential Factors of Titer Decrement in Oxytetracycline

Hiroshi TERANISHI

はじめに

抗生素質は、ヒトの感染症の治療ばかりでなく、家畜の生産性向上の為、現在非常に広く利用されており、その生体時における代謝・排泄のメカニズム及び消長動態については、かなり良く研究されているが、家畜が薬剤の残留したまま屠殺された場合、屠体中におけるその後の薬剤の消長については殆ど調査されていない。したがって、食肉が流通している間の薬剤濃度の変動は不明である。また、食品検査における信頼性確保(GLP)が法制化されるにあたり、検体中の薬剤の変動に関するデータが必要とされていた。従来、抗生素質の検査は抗菌活性を応用したマイクロバイオアッセイによる定性的な検査が公定法¹⁾であったが、平成8年7月より平成7年12月26日付厚生省告示第218号に基づくオキシテトラサイクリン(OTC)の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使用した定量分析が導入された。このことにより成分規格が設定され、一定量の残留が容認されるようになった。今後、抗生素質の化学分析による定量試験は対象が順次増加することが見込まれている。GLPでは、分析試験については試薬管理から分析手順の確認に至るまで、項目ごとに非常に細かい規定があるが、検体の保存条件や検査のタイミングについては詳細な規定はない。以上のことから、包括的な意味での信頼性確保を言うならば分析に関するもののみでなく、検体中にお

ける検査対象物質の消長動態について把握したうえで、保存条件等検体の取り扱いに関する規定が必要である。そこで、家畜に汎用される抗生素質の1つであるOTC濃度の検体中の変動を想定し、試験管内における基礎的な検討を行ったので報告する。

材料及び方法

OTC 標準品：高速液体クロマトグラフ用オキシテラサイクリン塩酸塩標準品（和光純薬）を使用した。

OTC 標準溶液：オキシテラサイクリン10.0 mg(力値)に相当する塩酸オキシテラサイクリン標準品を少量の0.1M 塩酸に溶解した後、精製水を加えて10mlとした。

1M イミダゾール緩衝液：イミダゾール（試薬特級 和光純薬）68.08g、酢酸マグネシウム（試薬特級 和光純薬）10.72g、EDTA 2Na（試薬特級 和光純薬）0.37gを約800mlの精製水に溶解し、酢酸（試薬特級 和光純薬）を加えてpHを7.2に調整後、さらに精製水を加えて1,000mlとした。

測定装置：pH メーターは pH METER D-21（堀場製作所）を使用した。HPLC は HP1100 SERIES 及び蛍光検出器は1046A (HEWLETT PACKARD) を使用した。

OTC の食肉中での消長を検討する目的で、屠殺後の時間経過に伴うウシ筋肉中におけるpHの変動²⁾を考慮し、0.1M リン酸緩衝液³⁾を用いて5.7, 6.1, 6.3, 6.5, 6.9及び7.3までの6段階のpHを設定した。また、一般的に食肉が流通する場合や、食肉が検体として保存されるときの条件と考えられる-25, 4, 10及び25°Cまでの4段階の温度群を設定した。これらの条件下でのOTCの消長を公定法の検量線の中間濃度であり力価定量の信頼性が高いと考えられる0.4μg/mlの初期添加量で1, 3, 7及び14日目の時間経過時に測定した。なお、測定は、平成7年12月26日付厚生省告示218号に準拠して行った。

HPLC 測定条件：カラムは YMC Pack ODS-AM AM-312 6mmID × 150mm (YMC)，移動相は1M イミダゾール緩衝液：メタノール (77:23)，流速1.0ml/min，測定波長 励起380nm, 蛍光520nm，カラム温度40°Cで行った。

統計解析：実験はそれぞれの条件で3検体ずつを使用して3回繰り返し行い、各条件下で得られたデータは、一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合に、測定時に調製した標準溶液を対照として Dunnett の多重比較検定⁴⁾を行って、どのポイントで平均値の有意な差が認められたかを検討した。統計解析には Windows上で作動する SPSS Ver. 11.0J を使用した。

神奈川県衛生研究所 食品獣疫部

〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1

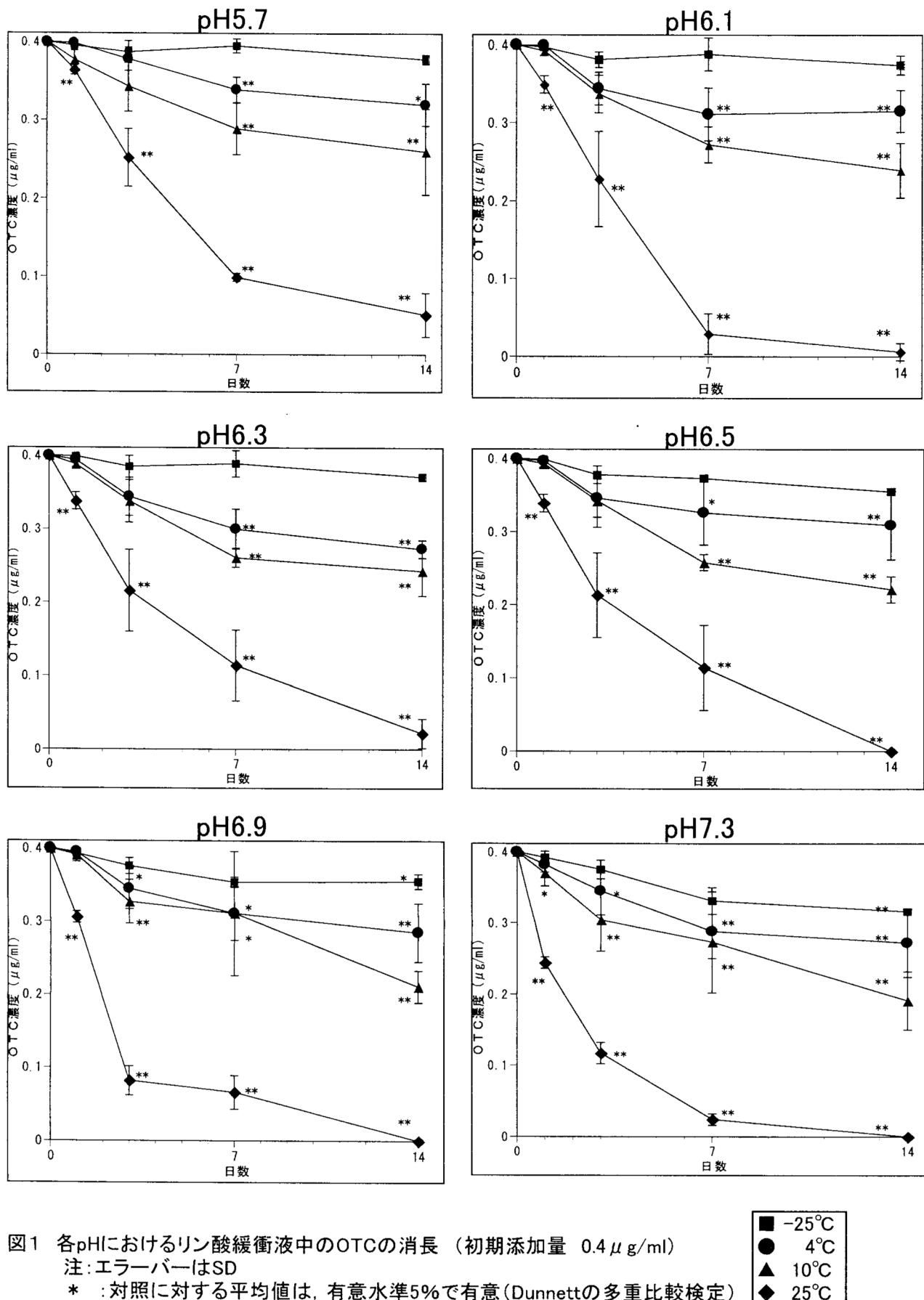


図1 各pHにおけるリン酸緩衝液中のOTCの消長（初期添加量 0.4 μg/ml）

注: エラーバーはSD

*: 対照に対する平均値は、有意水準5%で有意(Dunnettの多重比較検定)

**: 対照に対する平均値は、有意水準1%で有意

結果及び考察

設定した温度条件下では、OTCはpHが高くなるにつれ、残存力価の低下が早まることが確認された。また、設定温度が高いほど残存力価の低下が早まることが判明した(図1)。

各pH条件で経過日数ごとに一元配置分散分析を行ったところ、すべての条件下において有意水準1%で有意となった。対照の標準溶液と各温度群の平均値が、どのポイントで有意な差が認められるかを検証するためにDunnettの多重比較検定を行った結果、pH5.7の場合、経過1日目及び3日目では-25~10°Cの温度群まで有意差を認めなかつたが、25°Cの温度群では1日目からすでに有意水準1%で有意差が認められた。7日目以降4°C及び10°Cも有意水準1%で有意差が認められた。14日間の保存期間すべてで有意差を認めなかつたのは、-25°Cの温度群のみであった。pH6.1の場合にも1日目及び3日目では-25~10°Cの温度群まで有意差を認めなかつたが、25°Cの温度群では1日目からすでに有意水準1%で有意差が認められた。pH5.7の場合と同様に14日間の保存期間すべてで有意差を認めなかつたのは、-25°Cの温度群のみであった。pH6.3及び6.5の条件でも有意差出現のパターンは同様であった。ただし、pHが高くなるにつれ残存力価の低下が早まる傾向が認められた。pH6.9では、1日目では-25°C~10°Cの温度群で有意差を認めなかつたが、3日目において4°Cの温度群で有意水準5%で有意な差が検出された。10°Cでは有意水準1%で有意差が認められた。7日目も同様であったが、10°Cの温度群での有意水準は5%であった。-25°Cでは7日目まで有意差は認められなかつたが、14日目には有意水準5%で有意差が認められた。25°Cの温度群ではすべての保存期間で有意水準1%で有意であった。pH7.3の場合には1日経過後に有意差を認めない温度群は-25°C及び4°Cのみであり、3日目からは4°Cにおいても有意差が認められた。-25°Cでは

7日目まで有意差が認められなかつたが、14日目では有意水準1%で有意差が認められた。

以上のことをまとめると、Dunnettの多重比較検定によりpH5.7~6.5までの各群では-25°Cの温度群では14日目まで有意差を認めなかつた。4°C及び10°Cでは、3日目まで有意差が認められなかつた。25°Cでは1日目からすでに有意差が認められた。また、pH6.9及びpH7.3の各群では-25°Cの温度群では7日目まで有意な差を認めなかつたが14日目には有意差が認められた。4°Cの温度群では3日目以降有意差が認められた。25°Cでは1日目からすでに有意差が認められた。

したがって、検体中のOTCの減少はpHや、保存温度条件の影響を強く受けることから、定量試験は出来る限り速やかに行う必要があり、この結果を食肉等の検体にそのまま当てはめることはできないが、ほぼ同様な減少パターンが認められると仮定するならば、保存は-25°Cで行い、pHの条件によっては7日目以降に有意差が認められることを考慮し、可及的速やかに定量試験を実施する必要があると思われた。

今後は、残留物質本体ばかりでなく、その中間代謝産物の毒性調査や定量も視野に入れた検討も必要と考えられる。

(平成14年7月24日受理)

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜産物中の残留物質検査法 第1集, (1977)
- 2) 佐藤 信監修：食品の熟成, 555-559, 光琳, (1984)
- 3) 泉 美治, 中川八郎, 三輪谷俊夫：生物化学実験のてびき, 2タンパク質の分離・分析法, 101, 化学同人, (1985)
- 4) Jerrord H. Zar : Biostatistical Analysis, Third edition, 220-222, Prentice Hall, (1996)

短報

市販食肉及び食肉製品から分離された *Yersinia enterocolitica* の性状について

古川一郎, 寺西大, 長谷川幸江, 尾上洋一

Characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from retailed meats and meat products

Ichiro FURUKAWA, Hiroshi TERANISHI,
Yukie HASEGAWA, Yoichi ONUUE

緒 言

Yersinia enterocolitica は小児下痢症, 腸間膜リンパ節炎, 假性虫垂炎などの原因菌として知られ, 我が国では1970年代から14件の集団感染事例が確認されており¹⁾, 1982年に食中毒起因菌として指定された。本菌は自然環境中や水, 食品等に広く分布し, 食品では特に豚肉から高率に分離される^{2・3)}。さらに5°C以下でも増殖可能なことから, 食品の低温輸送が発達している今日において注目すべき病原菌の一つである。*Y. enterocolitica* の病原株による食中毒では原因食品が特定できない事例が多く¹⁾, 感染源や感染経路の解明に疫学的解析法の確立が待たれている。

今回著者らは, 食肉および食肉製品における *Y. enterocolitica* の汚染実態を把握し, さらに本菌の分子疫学的解析におけるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)の有用性を検討する目的で, 市販豚肉を中心に *Y. enterocolitica* の分離を試み, 分離菌株を用いて PFGEを行ったので報告する。

材料と方法

検査対象: 1998年5月から1999年2月に神奈川県内で

神奈川県衛生研究所 食品獣疫部

〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1

市販された豚肉78検体, 生ハム12検体, 生ワインナー7検体, および牛肉2検体の合計99検体の食肉および食肉製品を検査材料とした。

分離および同定: 増菌培養は検体25 gを1/15Mリソ酸緩衝液(PBS, pH7.6) 225mLと混和後, 4°Cで2週間から4週間行い, 0.4% KOH 加生理食塩水2mLと培養液1mLを30秒間混和処理した液の1白金耳量をCIN 寒天培地(Difco)に塗抹した。寒天平板上のマンニトール分解性の定型的集落を釣菌し, TSI 寒天, LIM 培地, シモンズのクエン酸ナトリウム培地, 尿素培地, 胆汁エスクリン寒天培地を用いた予備同定試験の後, Barsikow 培地によるラムノース, メリビオースおよびサリシンの糖分解試験により *Y. enterocolitica* のスクリーニングを行い, 菌種の同定には簡易同定キット API 20E(bio-Merieux)を使用した。

血清型別および生物型別: 血清型は市販診断用血清(デンカ生研)を用いて決定した。生物型別は Wauters の分類を元に, レシチナーゼ産生能, インドール反応, 硝酸塩還元, オルニチン加水分解, β-ガラクトシダーゼ活性, Barsikow 培地によるキシロースおよびトレハロースの糖分解について試験を行い, 全て陽性の場合を1型, レシチナーゼ産生陰性の場合を2型, レシチナーゼ産生およびインドール反応が陰性の場合を3型とした^{1・4)}。

病原性評価試験: 分離された *Y. enterocolitica* は, カルシウム依存性試験⁴⁾ および自己凝集性試験⁵⁾ から病原性の評価を行った。

染色体DNAの制限酵素切断パターン: 分離菌株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行い, 菌株間における染色体DNAの制限酵素切断パターンを比較検討した⁶⁾。供試菌株の制限酵素処理には *Xba* I (Takara)を用い, 電気泳動装置は CHEF DR-II (Bio-Rad)を使用した。200V 定電圧下, パルスタイムは4 s から8 s で10 h, 8 s から50 s で8 h の条件で泳動を行い, アガロースゲルは PFC Agarose (Bio-Rad)を使用した。泳動終了後, エチジウムプロマイドでゲルを染色し, 紫外線照射下で切断パターンを観察した。

結果および考察

Y. enterocolitica は99検体中55検体で陽性となり, 食品別では, 豚肉は78検体中49検体, 生ワインナーは7検体中5検体から分離され, 陽性率はそれぞれ62.8%, 71.4%であった。生食用ハムからは12検体中1検体から分離され, 牛肉2検体からは分離されなかった(表1)。豚肉の陽性検体のうち4検体から異なる血清型あるいは生

表 1 食品別の *Y. enterocolitica*陽性率および分離菌株の型別

品名	検体数	陽性検体数(陽性率)	血清型:生物型(分離菌株数)
豚肉	78	49(62.8%)	○ 3:1(1), ○ 5:1(14), ○ 8:1(6), ○ 9:1(1), ○ UT*:1(27), ○ UT:2(4)
生ハム	12	1(8.3%)	○ UT:1(1)
生ウィンナー	7	5(71.4%)	○ 5:1(2), ○ UT:1(1), ○ UT:2(1), ○ UT:3(1)
牛 肉	2	0	

* UT: ○ 1,2,○ 3,○ 5,○ 8,○ 9の各抗血清に凝集せず

表 2 *Y. enterocolitica*分離菌株の主な性状

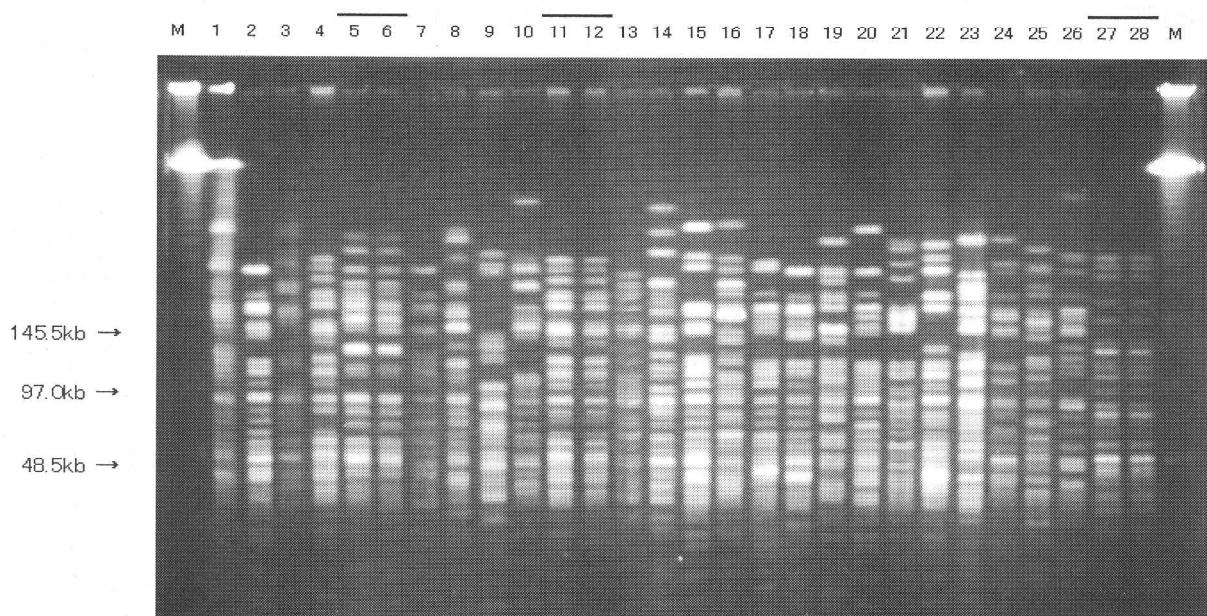
	血清型 O3	O5	O8	O9	OUT*	OUT	OUT
生物型	1	1	1	1	1	2	3
Ca依存性増殖 (37°C)	—	—	—	—	—	—	—
自己凝集性	—	—	—	—	—	—	—
エスクリン加水分解	+	+	+	+	+	+	—
サリシン	+	+	+	+	+	+	—
レシチナーゼ	+	+	+	+	+	—	—
インドール	+	+	+	+	+	+	—
菌株数	1	16	6	1	29	5	1

* UT: ○ 1,2,○ 3,○ 5,○ 8,○ 9の各抗血清に凝集せず

物型の菌株が重複して分離された。

市販血清に凝集を示した分離菌株の生物型は全て1型となり、非凝集を示した菌株からは生物型2および3が分離された。国内の集団事例における原因菌と同一の血清型および生物型の組み合わせ¹⁾は確認されなかつ

た。病原株の指標となる性状は、37°Cにおけるカルシウム依存性増殖および自己凝集性陽性であるが、分離菌株はカルシウム依存性増殖試験が全て陰性であり、また自己凝集性試験も陰性を示したため非病原株に該当した(表2)。

図 1 制限酵素 *Xba*I 处理による分離菌株染色体DNAのPFGEパターン

M: 分子量マーカー, 1~28: *Y. enterocolitica*分離菌株, —: 同一パターンを示すレーンの組

今回病原株は分離されなかつたが、福島は非病原株の増殖力が病原株より高いため、病原株が分離平板上で検出困難になることを指摘している⁷⁾。さらに市販豚肉からの *Y. enterocolitica* 病原株の分離率は⁸⁾、ブタからの分離率⁹⁾より低い値を示していることから、食品中における病原株の挙動や、高感度な病原株検出法が今後の検討課題であろう。

分離された *Y. enterocolitica* 59菌株のうち、市販血清に凝集を示した菌株を中心に合計28菌株について PFGE を行ったところ、25種類の制限酵素切断パターンが認められた。22菌株は菌株ごとに切断パターンが異なっていたが、切断パターンの一一致したものが3例確認された(図1)。この3例は、各々同一施設でサンプリングされた豚肉からの分離菌株であり、同一汚染源に由来している菌株であると推測された。

PFGE の結果から、同じ血清型あるいは生物型においても多くの切断パターンに分けられた。PFGE を用いた制限酵素切断パターンの解析により、共通の食品汚染源の存在が推測されたことから、今後病原株について検討する必要はあるが、*Y. enterocolitica* の食中毒事例における疫学的解析に PFGE が有効であることが示唆された。

(平成14年7月24日受理)

文 献

- 1) 杉山寛治：*Yersinia enterocolitica*, 防菌防黴, 26, 161-166(1998)
- 2) Doyle, M. P. and Hugdahl, M. B. : Improved procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats, Appl. Environ. Microbiol., 45, 127-135(1983)
- 3) Fukushima, H. : Direct isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from meat, Appl. Environ. Microbiol., 50, 710-712(1985)
- 4) Wauters, G., Kandolo, K. and Janssens, M. : Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*, Contr. Microbiol. Immunol., 9, 14-21(1987)
- 5) Gemski, P., Lazere, J. R. and Casey, T. : Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*, Infect. Immun., 27, 682-685(1980)
- 6) Laird, W. J. and Cavanaugh, D. C. : Correlation of autoagglutination and virulence of *yersiniae*, J. Clin. Microbiol., 11, 430-432(1980)
- 7) Buchrieser, C., Buchrieser, O., Kristl, A. and Kasper, C. W. : Clamped homogeneous electric fields(CHEF) gel-electrophoresis of DNA restriction fragments for comparing genomic variations among strains of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia* spp., Zbl. Bakt., 281, 457-470(1994)
- 8) 福島博：エルシニア・エンテロコリチカ，防菌防黴，29, 797-806(2001)
- 9) 金子誠二，丸山努，小久保彌太郎，神保勝彦，松本昌雄：市販豚肉における *Yersinia enterocolitica* およびその他の *Yersinia* 属菌の分布，東京衛研年報，37, 136-140(1986)
- 10) Christensen, S. G. : *Yersinia enterocolitica* in Danish pigs, J. Appl. Microbiol., 48, 377-382(1980)

短報**GC/MS 分析による防水スプレー
中溶剤の一斉定量**

長谷川一夫, 宇都宮暁子, 森康明

Simultaneous Determination of Solvents in Waterproof Spray by GC/MS AnalysisKazuo HASEGAWA, Akiko UTSUNOMIYA
and Yasuaki MORI**はじめに**

1992～1993年の冬に咳、呼吸困難等を主症状とする防水スプレーによる中毒事故が多発した。厚生省はこれらの事故の主原因が、防水スプレーに含まれる 10μm 以下のはつ水剤によるものと報告した¹⁾。しかしながら、防水スプレーにははつ水剤以外に溶剤及び噴射剤が含まれており、溶剤の多くは多量に暴露されるとめまい、吐き気等の症状を起こすことが知られている²⁾。また、溶剤は屋内に放出されると屋内空気汚染の原因になることが懸念されている³⁾。そこで我々は、家庭用品で規制されているメタノール、トリクロロエチレン及びテトラクロロエチレン⁴⁾、溶剤の中で我が国や WHO で飲料水の基準値またはガイドライン値が設定されているもの^{5)～7)}あるいは化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律で規制されているもの^{8)、9)}、防水スプレーに使用される可能性のあるもの等を測定対象物質と考え、GC/MS を用いて 47 物質の溶剤の一斉分析法を検討したので報告する。

方法**1. 試料**

1995 年、1996 年及び 1997 年の 1～2 月に県内にお

神奈川県衛生研究所 生活環境部
〒241-0815 横浜市旭区中尾 1-1-1

いて購入した防水スプレー 71 試料を用いた。

2. 試薬

ジクロロメタン、ベンゼンは和光純薬工業の残留農薬試験用、ヘキサンとオクタンは東京化成工業の標準試薬、1,2,3-トリメチルベンゼンは関東化学の 1 級試薬、デカン酸メチル、デカン酸エチル、オクタン酸エチル、2,4,4-トリメチル-2-ペンテン、2,4,4-トリメチル-1-ペンテン、1,3,5-トリメチルベンゼン、2,2,4,6,6-ペンタメチルヘプタンは東京化成工業の 1 級試薬、フロン 113 はジーエルサンエンスの試薬、その他の試薬は東京化成工業または和光純薬工業の特級試薬を用いた。

3. 装置

GC/MS：ヒュレットパッカード社製 HP5890 型ガスクロマトグラフに同社製質量選択検出器 (MSD) HP 5971 A を装備したものを使用した。

3. 測定方法**3. 1 定性分析**

塩化ナトリウム：氷（33：100）の寒剤を用いて約 -20 ℃ に冷却した三角フラスコ内にノズルを付けた防水スプレーを噴射し、内溶液を捕集した。三角フラスコ内に捕集した試料 0.5g を 50mL のメスフラスコに量り取り、メタノールまたはデカン酸メチルでメスアップした後、その一定量を注射筒にとり、0.45μm のフィルター（ジーエルサイエンス社製 GL クロマトディスク非水系13N）でろ過した。この溶液を GC/MS に注入し、標準物質の保持時間とマススペクトルから溶剤の同定を行った。

3. 2 定量分析

定性分析と同様の方法で三角フラスコ内に捕集した試料 0.5g を、内部標準溶液（4-プロモフルオロベンゼン 1000mg/L デカン酸メチル溶液）5mL 及びデカン酸メチル約 40mL を入れた 50mL のメスフラスコに精密に秤取り、直ちにデカン酸メチルでメスアップした後、定性分析に用いた方法と同様にろ過を行った。この溶液を直接及び 4-プロモフルオロベンゼン 100mg/L デカン酸メチル溶液で 10 倍希釈したものを 2 回ずつ GC/MS に注入し、SIM 法を用いて 47 物質の測定を行い、検量線から試料中の濃度 (W/W%) を算出した。検量線は測定対象物質の濃度が各々 1.0～1000mg/L (0.0001～0.1W/V%) となるように調製し、同様に操作して作成した。

3. 3 GC/MS 測定条件

カラム①：DB-1 (60m×0.32mm×1.0μm)，注入口温度：260 ℃、カラム温度：40 ℃で 7 分、5 ℃/分で 120 ℃、20 ℃/分で 260 ℃まで昇温、260 ℃で 6 分、キャリヤーガス：He 1.0mL/分、注入量：1μL、スプリット比

表1 定量対象物質と測定イオン

No.	物質名	測定イオン (m/z)			No.	物質名	測定イオン (m/z)		
1	methanol	31	29	30	25	cyclopentane	70	55	42
2	trichloroethylene	132	130	134	26	2-methylpentane	71	43	42
3	tetrachloroethylene	166	129	164	27	3-methylpentane	57	56	43
4	dichloromethane	86	84	49	28	hexane	86	57	56
5	trans-1,2-dichloroethylene	96	61	98	29	methylcyclopentane	84	69	56
6	cis-1,2-dichloroethylene	96	61	98	30	1-butanol	56	55	41
7	chloroform	85	83	—	31	1-methoxy-2-propanol	75	45	57
8	1,2-dichloroethane	62	64	98	32	cyclohexane	84	69	56
9	1,1,1-trichloroethane	119	117	97	33	2,2,4-trimethylpentane	99	57	56
10	benzene	78	77	—	34	heptane	100	71	70
11	carbon tetrachloride	119	117	82	35	2,4,4-trimethyl-1-pentene	112	97	69
12	1,4-dioxane	88	58	43	36	4-methyl-2-pentanone	100	85	58
13	1,1,2-trichloroethane	132	134	97	37	methylcyclohexane	98	83	55
14	toluene	92	91	—	38	2,4,4-trimethyl-2-pentene	112	97	69
15	ethylbenzene	106	91	77	39	octane	114	85	84
16	m-xylene	106	91	77	40	3-ethyltoluene	120	105	106
17	p-xylene	106	91	77	41	4-ethyltoluene	120	105	106
18	styrene	104	103	78	42	1,3,5-trimethylbenzene	120	105	119
19	o-xylene	106	91	77	43	2-ethyltoluene	120	105	106
20	ethanol	45	46	43	44	1,2,4-trimethylbenzene	120	105	119
21	2-propanol	45	39	43	45	decane	142	85	99
22	1,1-dichloro-1-fluoroethane	101	81	83	46	2,2,4,6,6-pentamethylheptane	155	99	113
23	pentane	72	57	43	47	1,2,3-trimethylbenzene	120	105	119
24	Freon113	151	101	153	IS	4-bromofluorobenzene*	174	176	95

*:内部標準物質

1 : 30), SCAN範囲 : 35 ~ 350m/z (又は 20 ~ 200m/z),

カラム② : HP-624 (60m×0.32mm×1.8μm), 注入口温度 : 250 °C, カラム温度 : 40 °Cで 7 分, 5 °C/分で 120 °C, 20 °C/分で 260 °Cまで昇温, 260 °Cで 6 分, キャリヤーガス : He 1.2mL/分, 注入量 : 1μL, スプリット比(1 : 30), SCAN範囲 : 35 ~ 500m/z,

デカン酸メチルを測定溶媒として使用した場合は、デカン酸メチルが溶出する直前から、MS 検出器保護のため MS 検出器を OFF とした。

3. 4 定量対象物質及び測定イオン

表1に測定対象物質名と測定イオンを示す。一般に溶剤として使用する恐れのある物質中で家庭用品で規制されている物質が No.1 ~ 3⁴⁾, 我が国や WHO で飲料水の基準値またはガイドライン値等が設定されている物質が No.2 ~ 11 と No.13 ~ 19^{5)~7)}, 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律で規制されている物質が No.2, 3, 7, 8, 10 ~ 12^{8), 9)}, 規制の法律等がないが今回用いた試料中に同定された物質が No.20 ~ 47 である。測定イオンは各物質のマススペクトルからイオン強度の大きいものを選択した。表に示したイオンを用いて測定を行い、2個のイオンの定量値が一致することで定量対象物質を確認した。

結果および考察

1. 内標準物質の検討

表2に絶対検量法と水道水中の揮発性有機化合物測定で使用されている 4-プロモフルオロベンゼン¹⁰⁾を内部標準物質に用いた時の 47 物質それぞれの測定値の変動をまとめて示した。濃度が 1000mg/mL 及び 10mg/L ともに内部標準法を用いる方法が、絶対検量線法と比較して測定値の変動が小さく精度良く測定することができたので、4-プロモフルオロベンゼンを内部標準物質として使用し定量することにした。

表2 4-プロモフルオロベンゼンを使用した内部標準法と絶対検量線法による47物質の測定値変動の比較

方法	測定値(47物質)の変動係数(%)		
	1000mg/L		10mg/L
	[n=10]	[n=3]	
内部標準法	範囲	0.2~3.2	0.2~3.2
	平均値	0.9	1.0
絶対検量線法	範囲	9.4~12.0	3.0~10.8
	平均値	11.6	8.0

2. 試料を溶解する溶媒の検討

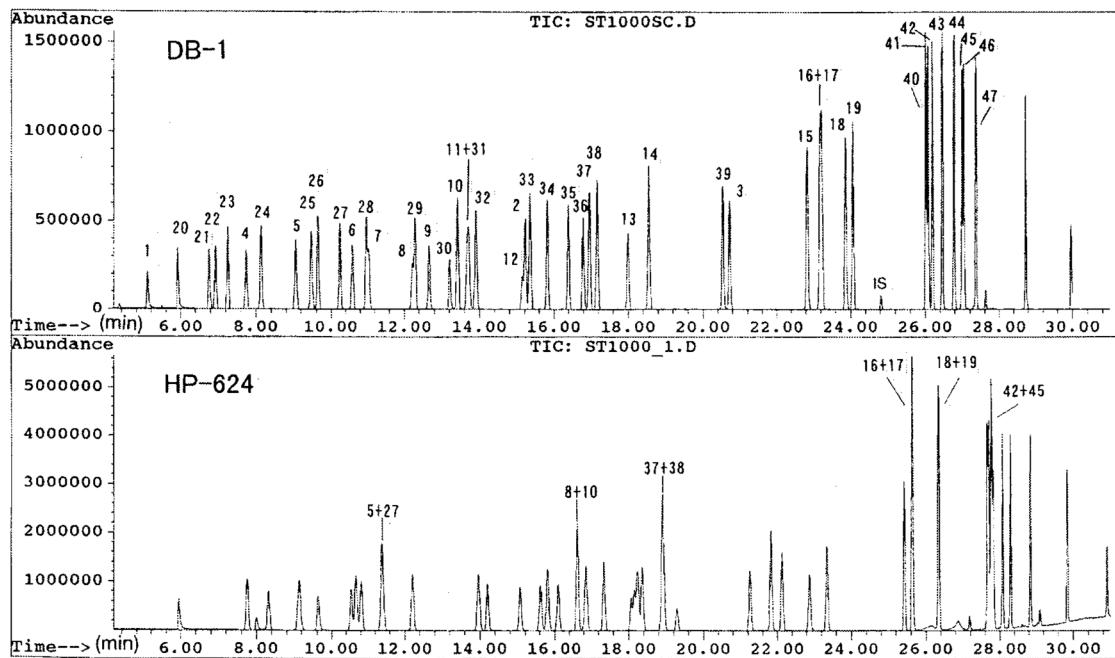


図1 標準物質のトータルイオンクロマトグラム（ピーク番号に相当する物質名は表1を参照）

家庭用エアゾール製品中の溶剤を分析する方法として、観ら¹¹⁾が報告している試料をメタノールに溶解して測定する方法は、メタノール以後に溶出する試料中の溶剤を定量する方法には適しているが、家庭用品ではメタノールが規制対象物質であるのでメタノールも含めた溶剤の定量分析に適さない。最初に試料をメタノールに溶解して定性分析を行った結果、試料中には1,2,3-トリメチルベンゼン以後の保持時間（27.4分）に同定された物質がなかった。そこで、1,2,3-トリメチルベンゼン以後の保持時間に溶出する溶媒を用いて測定する方法について検討を行った。オクタン酸エチル、デカン酸メチル、デカン酸エチルについて比較した結果、オクタン酸エチルは1,2,3-トリメチルベンゼンのピークの前後に大きな妨害ピークが見られた。デカン酸エチル及びデカン酸メチルはほとんど妨害ピークが見られなかつたが、より沸点の低いデカン酸メチルに試料を溶解することにした。デカン酸メチルを使用すると、注入直後からスペクトルの測定が可能となるので、定性分析において試料中の溶剤成分以外に噴射剤の確認をすることも可能であった。

3. キャピラリーカラムの検討

DB-1とHP-624の2種類のキャピラリーカラムを用いて、測定対象物質の最適分離条件を検討した。図1にそのトータルイオンクロマトグラムを示した。HP-624は飲料水中の揮発性物質測定用のカラムであるが¹²⁾、6ヶ所でクロマトの重なりが見られた。この中でo-キシレンとスチレンの重なりは、o-キシレンの濃度が高い場

合にはo-キシレンのm/z104, 103, 78のイオンがスチレンの定量に影響を与える可能性があった。DB-1はm-キシレンとp-キシレン、四塩化炭素と1-メトキシ-2-プロパノールの2ヶ所でクロマトの重なりが見られた。m-キシレンとp-キシレンは異性体であり類似スペクトルを持つことから分離定量が不可能であるので合計量でm(p)-キシレンとして定量した。四塩化炭素と1-メトキシ-2-プロパノールは相互に妨害とならないイオンを選択（表1）することにより定量できた。これらの検討結果から、使用するキャピラリーカラムはHP-624よりDB-1が適していると考えられた。

4. 試料の捕集温度

家庭用エアゾール製品中のメタノール等の公定試験方法では試料の捕集条件が約0℃の氷冷となっているが、低沸点の溶剤をより効率良く捕集するために、捕集温度は塩化ナトリウム：氷（33:100）の寒剤を用いて-20℃の条件とした。-20℃では、0℃の条件でメスフラスコに秤取る操作が困難な試料も容易に秤取ることができた。-20℃と0℃の条件ではLPGを噴射剤として使用しているエアゾール製品で測定結果に差ができる可能性を考えられたので、これらの表示がある試料について二つの捕集温度条件で溶剤の主成分濃度を測定した。その結果表3に示すように、ジクロロメタン、2-メチルペンタンおよびシクロペンタンは0℃より-20℃でわずかに低い値を示した。また、トルエン、エチルベンゼン、m-(p-)キシレンは-20℃で明らかに低い値を示した。この原因として0℃ではほとんど捕集できないLPGが-20℃で

は効率良く捕集され、秤量されるため相対的に測定成分

の割合が減少したと考えられた。

表3 試料捕集温度の違いによる測定値の比較

試料*	試料捕集温度 (°C) **	濃度 (W/W%) ***				
		ジクロロ メタン	トルエン	エチル ベンゼン	m-(p-) キシレン	2-メチル ペンタン
A	0	37.5±2.4	13.7±0.3	7.68±0.22	5.52±0.16	<0.05
	-20	35.1±1.6	11.9±0.3	6.58±0.16	4.72±0.10	<0.05
B	0	<0.005	<0.01	<0.005	<0.005	22.4±1.1
	-20	<0.005	<0.01	<0.005	<0.005	36.2±1.3
-20						

* : 噴射剤としてLPG表示あり

** : 0°Cは氷で、-20°Cは塩化ナトリウムと氷33対100の寒剤で冷却

*** : 平均値±標準偏差 (n=3~5)

5. 検量線、定量下限値

測定対象物質の濃度が各々 1.0, 10, 100, 1000mg/L の溶液を調製し検量線を作成した結果、1-メトキシ-2-プロパノールが 1000 ~ 100mg/L, メタノール、エタノール、2-プロパノール、1-ブタノールが 1000 ~ 10mg/L の範囲で、低濃度になるに従って著しくピーク面積が減少する二次曲線の検量線となった。1,4-ジオキサン、2,2,4-トリメチルペンタン、2,2,4,6,6-ペンタメチルペンタンが 1000 ~ 10mg/L、その他の物質は 1000 ~ 1.0mg/L (試料濃度として 10 ~ 0.01W/W%) の範囲で良好な直線性が認められた。定量下限値は検量線の最小濃度または最小濃度の 1/2 の濃度としたが、試料中の妨害イオンの影響を考慮した結果、表 4 に示すように検量線の最小濃度より高い濃度に設定しなければならなければならない物質が多くあった。

6. 防水スプレー中の分析結果

本法を適用して試料を測定した結果を表 4 に、検出数と濃度範囲で示した。分析した 47 物質中テトラクロロエチレン除く 46 物質が検出された。メタノールおよびトリクロロエチレンは家庭用品の基準値以下であるが、それぞれ 0.1 ~ 0.3, 0.005 ~ 0.072W/W% 検出された。微量に検出されたクロロホルム、トリクロロエチレン、四塩化炭素等の有機塩素化合物は 1,1,1-トリクロロエタンを主成分とする試料で検出された。

まとめ

防水スプレー中に含まれる可能性がある溶剤の定量法を検討した。デカン酸メチルに溶解後、内部標準物質として 4-ブロモフルオロベンゼンを添加し、0.45μm のフ

ィルターでろ過後適当な測定イオンを選択したガスクロマトグラフ質量分析法を用いることにより、47 物質の溶剤を精度良く一斉に分析することが可能となった。この方法を用いて防水スプレー 71 試料を分析した結果、テトラクロロエチレンを除く 46 物質が検出された。

(平成14年7月24日受理)

文献

- 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室：防水スプレーによる健康被害の防止に関する研究報告について、平成 6(1994)年 5 月 23 日
- 後藤稠、池田正之、原一郎：産業中毒便覧（増補版）、医歯薬出版、東京(1981)
- 齋藤育江、瀬戸博：室内空気の化学物質汚染、日本薬剤師会雑誌、51, 1623 - 1629(1999)
- 厚生省：厚生省令第 34 号「有害物質を含有する家庭用品に規制に関する法律施行規則」、昭和 49(1974)年 9 月 26 日
- 厚生省：厚生省令第 69 号「水道水質基準に関する省令」、平成 4(1992)年 12 月 21 日
- 厚生省生活衛生局水道環境部長：衛水第 264 号「水道水質に関する基準の制定について」、平成 4(1992)年 12 月 21 日
- WHO 飲料水水質ガイドライン（第 2 版）、日本水道協会、東京(1995)
- 政令第 202 号「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律施行令」、昭和 49(1974)年 6 月 7 日
- 厚生省：厚通告第 10 号「化学物質の審査及び製造等

表4 防水スプレー中の溶剤47物質の測定結果と定量下限値

No.	物質名	検出数 (n/71)	検出濃度範囲 (W/W%)	定量下限値 (W/W%)
1	methanol	5	0.1~0.3	0.1
2	trichloroethylene	8	0.005~0.072	0.005
3	tetrachloroethylene	0	-	0.005
4	dichloromethane	1	34.6	0.005
5	trans-1,2-dichloroethylene	2	0.010~0.030	0.005
6	cis-1,2-dichloroethylene	2	0.005~0.009	0.005
7	chloroform	2	0.007~0.009	0.005
8	1,2-dichloroethane	5	0.02~0.06	0.01
9	1,1,1-trichloroethane	21	0.02~93.4	0.01
10	benzene	1	0.01	0.01
11	carbon tetrachloride	5	0.006~0.015	0.005
12	1,4-dioxane	13	1.35~2.38	0.1
13	1,1,2-trichloroethane	4	0.03~0.16	0.01
14	toluene	9	0.01~14.7	0.01
15	ethylbenzene	17	0.005~34.7	0.005
16+17	m-(p)-xylene*	18	0.005~24.0	0.005
18	styrene	1	0.010	0.005
19	o-xylene	16	0.005~8.12	0.005
20	ethanol	5	19.2~94.7	0.1
21	2-propanol	21	0.1~95.7	0.1
22	1,1-dichloro-1-fluoroethane	7	0.05~7.81	0.05
23	pentane	3	0.16~0.40	0.05
24	Freon113	9	0.05~0.40	0.05
25	cyclopentane	3	35.6~36.1	0.1
26	2-methylpentan(isohexane)	18	0.11~25.1	0.05
27	3-methylpentane	19	0.10~14.5	0.05
28	hexane	18	0.06~45.0	0.05
29	methylcyclopentane	18	0.05~22.9	0.05
30	1-butanol	9	1.0~17.8	0.1
31	1-methoxy-2-propanol	1	86.7	0.5
32	cyclohexane	12	0.05~75.1	0.05
33	2,2,4--trimethylpentane(isooctane)	7	1.65~29.2	0.1
34	heptane	18	0.25~63.8	0.05
35	2,4,4-trimethyl-1-pentene	1	52.3	0.05
36	4-methyl-2-pentanone(MIBK)	7	1.33~2.37	0.05
37	methylcyclohexane	11	0.14~11.1	0.05
38	2,4,4-trimethyl-2-pentene	1	14.6	0.05
39	octane	4	0.12~11.9	0.05
40	3-ethyltoluene	6	0.07~9.57	0.05
41	4-ethyltoluene	4	0.05~4.18	0.05
42	1,3,5-trimethylbenzene	5	0.05~5.77	0.05
43	2-ethyltoluene	3	0.15~2.90	0.05
44	1,2,4-trimethylbenzene	8	0.05~24.8	0.05
45	decane	12	0.3~3.0	0.2
46	2,2,4,6,6-pentamethylheptane	9	0.2~79.6	0.2
47	1,2,3-trimethylbenzene	4	0.05~4.54	0.05

*:分離できないので合計濃度で表す。

の規制に関する法律第二条第四項の規定に基づく指定
化学物質」,昭和 62(1987)年 5月 25 日
10)上水試験方法, 日本水道協会, 東京 (2001)
11)観照雄, 中村義昭, 岸本清子, 山野辺秀夫, 中村弘
: GC/MS 法による家庭用エアゾル製品中の溶剤の分
析, 第 31 回全国水道研究発表会講演集, 150-151

(1994)
12)長谷川一夫, 宇都宮暁子, 節田節子 : 液化炭酸ガス
クライオフォーカスを用いたページトラップ GC/MS
による水中揮発性有機化合物の分析, 神奈川衛研報告,
28, 54-58(1998)

短報

ゴルフ場使用農薬による地下水汚染

 伊藤伸一¹, 上村 仁¹, 生活衛生課²

**The Ground Water Pollution
by Agricultural Chemicals
used in Golf Course**

Shin-Ichi Itoh, Hitoshi Uemura
and Kanagawa Pref. Environmental
Health Division

はじめに

1988年（昭和63年）奈良県山添村等の住民運動に端を発したゴルフ場使用農薬による環境汚染問題は、日本中を巻き込む大きな社会問題になった。この背景には飲用水源が存在する自然の中に、多くのゴルフ場が乱立している実態がある。我々は平成3年度から今日まで12年間、ゴルフ場使用農薬による井戸水及び湧水の汚染実態を把握する目的で調査を行ってきたので、その概要を報告する。

方法
1 調査期間

平成3年度から平成14年度。

2 調査対象

神奈川県下のゴルフ場周辺の井戸水及び湧水24水源。

3 調査項目

表1に示した。

4 分析方法¹⁾

固相抽出法を用いて前処理を行い、GC/MS(SIMモード), HPLC(UV)又はLC/MS/MSで定量した。

結果と考察

12年間、24水源についてゴルフ場使用農薬34種による汚染状況を調査したところ、基準値又は暫定的目標値を超える農薬が検出された水源は存在せず、当初心配されていたような地下水汚染は確認されなかった。しかしながら、平成3年度から平成14年度まで、7井戸から濃度は低いものの長期に渡り難分解性のテルブカルプが検出された。テルブカルプは、水質目標が20μg/Lに設定されている。表2に示したように、特にP地区から平成3年度及び平成4年度前に目標値の1/10をわずかに上まわる2.1及び2.3μg/Lのテルブカルプが検出されたが、図1に示したように、平成3年度から平成14年度の12年間で、全体的に濃度の減少傾向が認められた。テルブカルプのような難分解性の農薬は、使用を中止しても土壤中に残存したものが、年月を経て地下水を汚染することが示唆された。

また1湧水からフルトラニルがわずかに検出された。フルトラニルは、水質目標が200μg/Lに設定されている。表2に示したように、平成7年まで、H地区で断続的に検出され(0.1~0.2μg/L)、その後7年間検出されなかった。

表1 調査項目

農薬	調査年度				
	3(前期)	3(後)~11	12	13	14
殺虫剤					
1 イソキサチオン	○	○	○	○	○
2 イソフェンホス	○	○	○	○	○
3 クロリビリホス	○	○	○	○	○
4 ダイアジン	○	○	○	○	○
5 ドクロルホン(DEP)	○	○	○	○	○
6 ピリダフェンチオン	—	○	○	○	○
7 フニットチオン(MEP)	○	○	○	○	○
8 アセフトート	—	—	○	—	○
9 イソプロチオン	○	○	○	○	○
10 イブロ ²⁾ オン	○	○	○	○	○
殺菌剤					
11 エトジアゾール	—	○	○	○	○
12 オキシジン鋼(有機銅)	○	○	○	○	○
13 キヤクシ	○	○	○	○	○
14 クロタコール(TPN)	○	○	○	○	○
15 クロホネ	—	○	○	○	○
16 チウラ(チラム)	○	○	○	○	○
17 トルクロホスメチル	○	○	○	○	○
18 フルトラニル	○	○	○	○	○
19 ベンシクリン	—	○	○	○	○
20 メブロル	—	○	○	○	○
21 メラキシル	—	—	○	○	○
除草剤					
22 アショラム	○	○	○	○	○
23 シマンジ(CAT)	○	○	○	○	○
24 テルブカルプ(MBPMC)	—	○	○	○	○
25 ナブロバミド	○	○	○	○	○
26 ブタホス	○	○	○	○	○
27 フロビサミド	○	○	○	○	○
28 ベンスリド(SAP)	○	○	○	○	○
29 ベンフルラリ(ベスロジン)	—	○	○	○	○
30 ベンディカルソ	○	○	○	○	○
31 メコフロップ(MCPP)	—	○	○	○	○
32 メチルタノム	—	○	○	○	○
33 ジチオビル	—	—	○	○	○
34 ピリブチカルプ	—	—	○	○	○
項目数	21	30	34	33	34

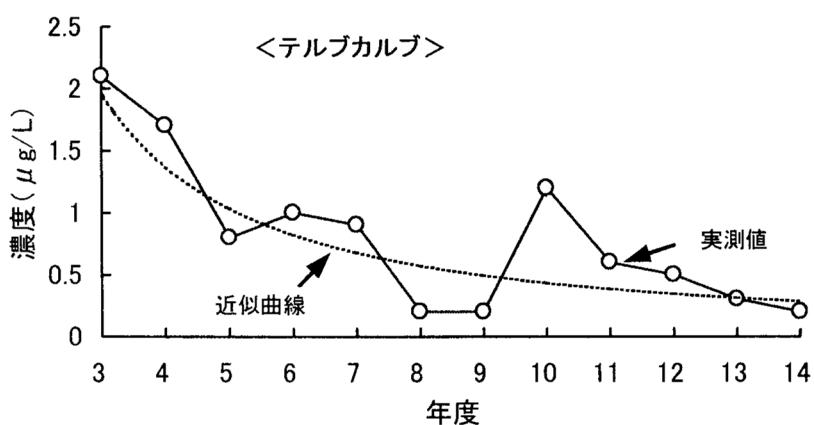
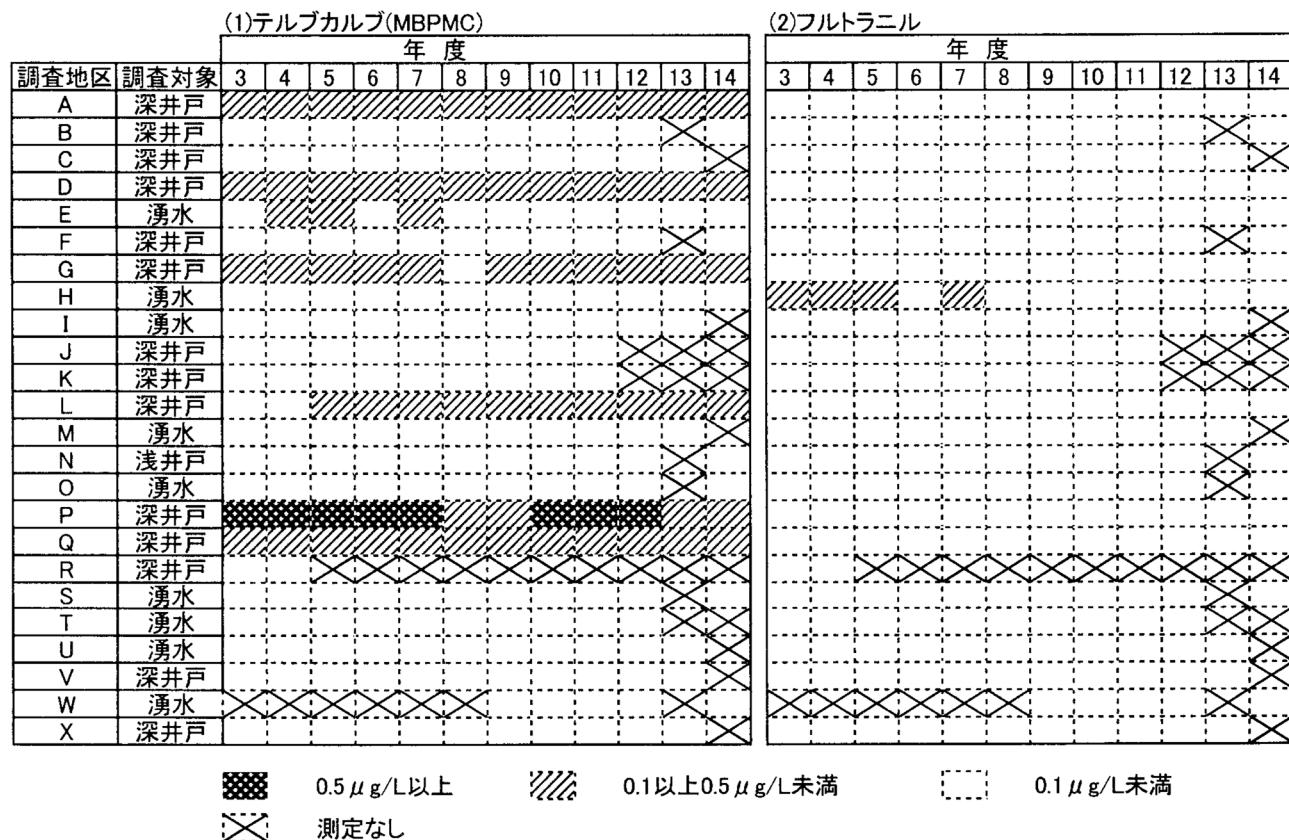
1 神奈川県衛生研究所 生活環境部

〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1

2 神奈川県衛生部

〒231-8588 横浜市中区日本大通り1

表2 経年変化



注) 年2回測定した年度は、2回の平均値を示した。

図1 P地区（深井戸）の経年変化

まとめ

12年間に渡る調査の結果、調査した井戸水及び湧水について当初心配されていたような大きな汚染は認められなかった。しかしながら、テルブカルブのような難分解性の農薬が、微量ながら検出され続けている井戸がある実態が、明らかになった。テルブカルブについては、今後とも長期に渡って監視して行く必要がある農薬と思わ

れる。

(平成14年7月24日受理)

文献

- 厚生省生活衛生局水道環境部監修：上水試験方法、日本水道協会(1993)

資料

神奈川県における河川水および下水からの腸管病原菌検出状況

鈴木理恵子¹⁾, 沖津忠行¹⁾, 佐多辰¹⁾, 浅井良夫¹⁾,
渡辺祐子¹⁾, 黒木俊郎¹⁾, 岡崎則男¹⁾, 垣田雅史¹⁾,
松島章喜²⁾, 山井志朗²⁾

Enteropathogenic bacteria isolated from river water and sewerage water in Kanagawa Prefecture

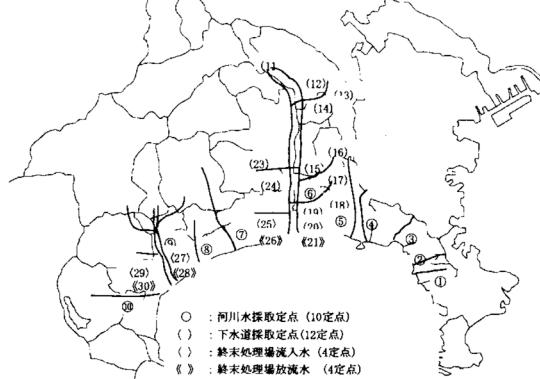
Rieko Suzuki, Tadayuki Okitsu, Sin Sata,
Yoshio Asai, Yuko Watanabe, Toshiro Kuroki,
Norio Okazaki, Masashi Kakita,
Akiyosi Mstushima and Shiro Yamai

近年、腸管出血性大腸菌 O157, サルモネラ、腸炎ビブリオ等による感染症あるいは食中毒の広域的な発生が問題視され、その予防対策の進め方が行政上の課題となっている。

我々は 1998 年 4 月から 2001 年 3 月までの 3 年間、神奈川県における感染症発生動向調査事業の一環として、河川水、下水道水、終末処理場流入水および放流水を対象に腸管病原菌汚染調査を実施した。本調査は、地域住民のし尿および生活雑排水の影響が直接あるいは間接に反映される材料を調査することにより、特定地域の腸管感染症患者および保菌者等を広域的にスクリーニングし、腸管病原菌の汚染実態を明らかにすることを目的とした。

供試試料は、相模湾に流入する主要河川 10 定点 (No. 1 ~ 10) から採取した河川水、下水道 12 定点 (No. 11 ~ 19, No. 22 ~ 24) から採取した下水道水、終末処理場流入口 4 定点 (No. 20, 25, 27, 29), 放流口 4 定点 (No. 21, 26, 28, 30) から採取した流入水および放流水とした (図1)。

図1 河川水・下水道水等の調査定点



調査は、河川水に関しては 1998 年 4 月～ 2001 年 3 月の間に毎月 1 回 (計 36 回), 下水道水、流入水および放流水に関しては 1998 年 5 月～ 2001 年 3 月の間に毎月 1 回 (計 35 回), 各々採取された試料について採取日当日に実施した。なお、下水道水、流入水および放流水は採取を依頼した。

調査対象とした腸管病原菌は表1に示した 16 種とした。

表1 調査対象とした腸管病原菌

コレラ菌 O1 (<i>Vibrio cholerae</i> O1)
コレラ菌 O139 (<i>Vibrio cholerae</i> O139)
チフス菌 (<i>Salmonella</i> Typhi)
パラチフス A 菌 (<i>Salmonella</i> Paratyphi A)
赤痢菌 (<i>Shigella</i> spp.)
腸管出血性大腸菌 O157 (<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i> O157)
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1, O139
腸炎ビブリオ (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)
<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Vibrio fluvialis</i> / <i>furnissii</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>sobria</i>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>
サルモネラ (<i>Salmonella</i> spp.)
<i>Campylobacter jejuni</i> / <i>coli</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>
病原血清型大腸菌 (<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>)

病原菌の検索は増菌培養法を用いて定法¹⁾により行った。腸管出血性大腸菌 O157 の検索には免疫磁気ビーズ法を用いた。分離培地上に発育した疑わしい集落は、それぞれの病原菌に応じた確認試験により菌種および血清型を決定した。また、コレラ菌 O1, O139 についてはコレラ毒素遺伝子、腸管出血性大腸菌 O157 についてはペロ毒素遺伝子 (VT) の有無を PCR 法で確認した。

腸管病原菌の検出頻度を試料の種類別 (表 2), 各定点別 (表 3) に示した。

1 神奈川県衛生研究所 細菌病理部

〒241-0815 横浜市旭区中尾 1-1-1

2 前神奈川県衛生研究所 細菌病理部

表2 河川水・下水道水等からの腸管病原菌検出頻度

検出菌	1998年4月～2001年3月				
	河川水 (n=360)	下水道水 (n=420)	処理場 流入水 (n=140)	処理場 放流水 (n=140)	
コレラ菌O1	0.6 *	0	0	0	
コレラ菌O139	0	0.2 *	0	0	
チフス菌	0	0	0	0	
パラチフスA菌	0	0	0	0	
赤痢菌	0	0	0	0	
腸管出血性大腸菌 O157	0	0.4 **	0	0	
Vibrio cholerae non-O1, O139	41.9	52.4	73.6	7.1	
腸炎ビブリオ	12.5	0.5	0	0	
Vibrio mimicus	22.8	3.8	4.3	0	
Vibrio fluvialis / furnissii	6.1	21.2	18.6	1.4	
Aeromonas hydrophila / sobria	89.2	38.1	40.0	81.4	
Plesiomonas shigelloides	13.1	11.2	11.4	0.7	
サルモネラ	2.8	72.9	72.9	2.1	
Campylobacter jejuni / coli	0.6	26.2	29.3	0	
Yersinia enterocolitica	0.8	0	0	0	
病原血清型大腸菌	33.9	43.3	41.4	25.7	

* : コレラ毒素非產生株

** : O157 : NM VT2產生

河川水からの検出菌は *A. hydrophila / sobria* (89.2%), *V. cholerae* non-O1, O139 (41.9%), 病原血清型大腸菌 (33.9%) が全定点より高頻度に検出され、*V. mimicus* および *P. shigelloides* も全定点から検出された。また、コレラ菌 O1 が 1 定点 (2 検体) より検出されたがコレラ毒素非產生株であった。サルモネラは 11 株 (4 血清型) 検出され、*S. Typhimurium* (63.6%), *S. Oranienburg* (18.2%) 等であった (表 4)。

下水道水からはサルモネラ (72.9%), *V. cholerae* non-O1, O139 (52.4%), 病原血清型大腸菌 (43.3%) が全定点より高頻度に検出され、*V. fluvialis / furnissii*, *A. hydrophila / sobria*, *P. shigelloides* および *C. jejuni / coli* も全定点から検出された。またコ

レラ菌 O139 (コレラ毒素非產生株) および腸管出血性大腸菌 (血清型 O157:NM VT2 產生) が 1 定点 (各 1 検体) より検出された。サルモネラの血清型は、本菌分離株 395 株中 327 株が 56 種類の血清型に型別された。主な血清型は *S. Oranienburg* (16.5%), *S. Enteritidis* (11.9%), *S. Agona* (8.7%), ついで *S. Typhimurium* (6.1%), *S. Montevideo*, *S. Hader*, *S. Infantis* および *S. Thompson* (各 4.8%) であった (表 4)。

流入水では *V. cholerae* non-O1, O139 (73.6%), サルモネラ (72.9%), 病原血清型大腸菌 (41.4%) が全定点より高頻度に検出された。*V. fluvialis / furnissii*, *A. hydrophila / sobria*, *P. shigelloides* および *C. jejuni / coli* も全定点から検出され、検出菌は下水道水と同様である。サルモネラの血清型は本菌分離株 134 株中 113 株が 29 血清型に型別された。主な血清型は下水道水と同様 *S. Oranienburg* (20.1%), *S. Agona* (8.2%) , *S. Enteritidis* (7.5%) であった (表 4)。

放流水からは *A. hydrophila / sobria* (81.4%) が全定点から高頻度に検出され *V. cholerae* non-O1, O139 および病原血清型大腸菌も全定点から検出された。下水道水および流入水から高頻度に検出されたサルモネラは 3 定点各 1 回のみの検出であった。

病原血清型大腸菌は全定点 (30 定点) より 487 株 (河川水 147 株, 下水道水等 340 株 (下水道水 228 株, 流入水 71 株, 放流水 41 株)) が検出された。河川水および下水由来株間での血清型に大きな相違は認められず、主要血清型は O6, O18, O1, O25 および O8 等であった (表 5)。これらの大腸菌は LT, ST, VT および invE の各病原因子遺伝子を保有していないかった。

表3 定点別腸管病原菌検出頻度

調査対象腸管病原菌	河川水 (10定点)										下水道水 (12定点)														終末処理場流入水 (4定点)				終末処理場放流水 (4定点)					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30				
コレラ菌O1	0	5.6*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
コレラ菌O139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
チフス菌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
パラチフスA菌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
赤痢菌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
腸管出血性大腸菌 O157	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Vibrio cholerae non-O1, O139	44.4	38.9	30.6	25.0	47.2	38.9	63.9	66.7	36.1	27.8	31.4	80.0	57.1	68.6	57.1	42.9	34.3	31.4	57.1	62.9	54.3	51.4	68.6	88.6	62.9	74.3	2.9	8.6	14.3	2.9				
腸炎ビブリオ	11.1	25.0	30.6	33.3	19.4	0	0	0	5.6	0	0	0	0	2.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Vibrio mimicus	27.8	19.4	30.6	27.8	36.1	8.3	22.2	11.1	5.6	38.9	8.6	2.9	6.7	0	0	0	2.9	2.9	8.6	5.7	0	5.7	8.6	2.9	0	0	0	0	0	0				
Vibrio fluvialis / furnissii	5.6	2.8	13.9	16.7	5.6	2.8	2.8	8.3	0	2.8	25.7	31.4	20.0	5.7	20.0	20.0	20.0	2.9	42.9	11.4	28.6	25.7	20.0	20.0	17.1	17.1	2.9	2.9	0	0				
Aeromonas hydrophila / sobria	86.1	83.3	97.2	77.8	94.4	91.7	83.3	88.9	94.4	94.4	45.7	51.4	42.9	40.0	34.3	40.0	42.9	34.3	28.6	22.9	31.4	42.9	40.0	57.1	34.3	28.6	80.0	88.6	91.4	65.7				
Plesiomonas shigelloides	11.1	8.3	13.9	8.3	16.7	11.1	19.4	13.9	22.2	5.6	2.9	20.0	20.0	14.3	8.6	17.1	8.6	8.6	8.6	5.7	8.6	11.4	14.3	0	0	2.9	0							
サルモネラ	2.8	2.8	2.8	5.6	8.3	0	0	2.8	0	2.8	57.1	80.0	74.3	82.9	91.4	77.1	62.9	28.6	88.6	68.6	85.7	77.1	94.3	77.1	60.0	60.0	2.9	0	2.9	2.9				
Campylobacter jejuni / coli	0	0	0	0	2.8	2.8	0	0	0	0	34.3	31.4	28.6	17.1	25.7	22.9	17.1	34.3	20.0	28.6	22.9	31.4	28.6	22.9	34.3	31.4	0	0	0	0				
Yersinia enterocolitica	0	0	0	0	0	2.8	0	2.8	2.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
病原血清型大腸菌	27.8	41.7	30.6	30.6	38.9	27.8	27.8	30.6	30.6	52.8	40.0	37.1	57.1	40.0	40.0	40.0	40.0	48.6	40.0	45.7	48.6	37.1	45.7	42.9	34.3	42.9	45.7	11.4	37.1	20.0	34.3			

* : コレラ毒素非產生株 * * : VT2產生株

表4 サルモネラの血清型別分離株数（頻度）

血清型	河川水	下水道水	処理場 流入水	処理場 放流水	計
Aberdeen			1 (0.7)	1 (0.2)	
Agona	29 (8.7)	11 (8.2)	1 (33.3)	41 (7.6)	
Albany	1 (0.3)			1 (0.2)	
Amsterdam	1 (0.3)			1 (0.2)	
Anatum	7 (1.8)	3 (2.2)		10 (1.8)	
Augustenborg	1 (0.3)			1 (0.2)	
Bardo	1 (0.3)			1 (0.2)	
Bareilly	2 (0.5)	2 (1.5)		4 (0.7)	
Bllokley		1 (0.7)		1 (0.2)	
Bovismorbificans	1 (0.3)			1 (0.2)	
Braenderup	7 (1.8)	2 (1.5)		9 (1.7)	
Bredeney		1 (0.7)		1 (0.2)	
Chester	9 (2.3)	3 (2.2)		12 (2.2)	
Corvallis		2 (1.5)		2 (0.4)	
Derby	3 (0.8)	2 (1.5)		5 (0.9)	
Enteritidis	39 (11.9)	10 (7.5)		49 (9.0)	
Give	1 (0.3)			1 (0.2)	
Hadar	1 (9.1)	17 (4.3)	3 (2.2)	1 (33.3)	22 (4.1)
Haifa	1 (0.3)			1 (0.2)	
Havana	1 (0.3)			1 (0.2)	
Heidelberg		1 (0.7)		1 (0.2)	
Hvittingfoss	1 (0.3)			1 (0.2)	
Infantis	17 (4.3)	7 (5.2)		24 (4.4)	
Istanbul	1 (0.3)			1 (0.2)	
Kallo	1 (0.3)			1 (0.2)	
Korbol	1 (0.3)			1 (0.2)	
Kottbus	2 (0.5)			2 (0.4)	
Kotte	1 (0.3)			1 (0.2)	
Lexington	1 (0.3)			1 (0.2)	
Lezenes	2 (0.5)			2 (0.4)	
Litchfield	7 (1.8)	2 (1.5)		9 (1.7)	
Ljubljana	1 (0.3)			1 (0.2)	
Lockleze	1 (0.3)			1 (0.2)	
London	1 (0.3)			1 (0.2)	
Mbandaka	1 (9.1)	5 (1.3)		6 (1.1)	
Meleagridis		1 (0.3)		1 (0.2)	
Mkamba	1 (0.3)			1 (0.2)	
Montevideo	19 (4.8)	6 (4.5)		25 (4.6)	
Muenchen	2 (0.5)			2 (0.4)	
Muenster	1 (0.3)	1 (0.7)		2 (0.4)	
Newport	7 (1.8)	6 (4.5)		13 (2.4)	
Nigeria	1 (0.3)			1 (0.2)	
Oranienburg	2 (18.2)	54 (16.5)	27 (20.1)	83 (15.3)	
Orion	2 (0.5)	1 (0.7)		3 (0.6)	
Panama	1 (0.3)			1 (0.2)	
Paratyphi B	3 (0.8)	1 (0.7)		4 (0.7)	
Potsdam	1 (0.3)	1 (0.7)		2 (0.4)	
Rideau	1 (0.3)			1 (0.2)	
Rissen	2 (0.5)	1 (0.7)	1 (33.3)	4 (0.7)	
Saintpaul	8 (2.0)	3 (2.2)		11 (2.0)	
Schwarzengrund	2 (0.5)			2 (0.4)	
Senftenberg	2 (0.5)			2 (0.4)	
Singapore	4 (1.0)	1 (0.7)		5 (0.9)	
Tennessee	4 (1.0)	2 (1.5)		6 (1.1)	
Thompson	17 (5.2)	4 (3.0)		21 (3.9)	
Typhimurium	7 (63.6)	20 (6.1)	5 (3.7)	32 (5.9)	
Virchow	6 (1.5)	3 (2.2)		9 (1.7)	
Virginia	2 (0.5)			2 (0.4)	
Westhampton	1 (0.3)			1 (0.2)	
Wilhelmsburg	1 (0.3)			1 (0.2)	
Zanzibar	1 (0.3)			1 (0.2)	
O4群	15 (3.8)	3 (2.2)		18 (3.3)	
O7群	11 (2.8)	6 (4.5)		17 (3.1)	
O8群	24 (6.1)	7 (5.2)		31 (5.7)	
O9群	2 (0.5)	2 (1.5)		4 (0.7)	
O3,10群	3 (0.8)	1 (0.7)		4 (0.7)	
O1,3,19群		1 (0.7)		1 (0.2)	
O11群	2 (0.5)			2 (0.4)	
O13群	4 (1.0)			4 (0.7)	
O18群	1 (0.3)	1 (0.7)		2 (0.4)	
O21群	1 (0.3)			1 (0.2)	
Salmonella spp.		5 (1.3)		5 (0.9)	
計	11	395	134	3	543

今回の調査で下水道水および流入水からの検出菌は河川水と比較し、サルモネラ、*Campylobacter*等、病原性を有する菌の割合が高く、本調査は特定地域における

病原菌の汚染実態を把握する手段として有用であることが示唆された。一方、放流水の病原菌検出頻度は流入水と比べ *Aeromonas* 以外では顕著に減少していた。*Aeromonas* の検出頻度は高かったが、菌の有無による検出頻度の高低がそのまま汚染菌量の多少に結びつくものではない。河川水における *Aeromonas* の検出頻度 (89.2%) からも明らかなように本菌は淡水域の常在菌であり、放流水の安全性に関して危惧されることはないと思われた。

(本調査を実施するにあたり、多大なご協力を戴いた衛生部保健予防課および関係者の皆様に御礼申し上げます。)

(平成14年7月24日受理)

表5 河川水・下水道水等から分離された病原大腸菌血清型

O抗原	河川水	下水道水等
O1	12	44
O6	20	112
O8	16	31
O15	1	4
O18	15	42
O20	5	4
O25	4	21
O26	1	3
O27	7	3
O28	1	3
O29	0	2
O44	1	2
O55	0	2
O63	0	1
O78	0	1
O86a	2	5
O112ac	4	5
O114	3	1
O115	1	0
O116	2	0
O117	0	1
O119	4	2
O122	0	1
O124	0	1
O126	0	1
O127a	2	9
O128	10	3
O136	1	3
O142	1	0
O146	3	6
O148	1	2
O152	2	2
O153	9	5
O157	2	1*
O158	3	1
O159	5	6
O164	1	0
O166	1	4
O167	2	2
O168	1	2
O169	4	2
計	147	340

* : VT2産生株 (株数)

文献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法注解

資料

BSEスクリーニング検査試料の プロテイナーゼK処理に 関する検討結果

斎藤隆行¹, 秋山雅彦², 高橋壯一郎²,
沢谷広志², 今井光信¹

Investigation on Treatment of Materials with ProteinaseK for BSE Screening Test

Takayuki SAITO¹, Masahiko AKIYAMA²,
Soichiro TAKAHASHI²,
Hiroshi SAWAYA² and Mitsunobu IMAI¹

2001年9月10日千葉県白井市の酪農家で飼育されていた乳用牛1頭が、日本で初めての牛海绵状脑症 (bovine spongiform encephalopathy; BSE) 感染牛であることが確認された（最終確認は9月21日英國獣医研究所によりなされた）。これを受け、農林水産省および厚生労働省それぞれにBSE 対策本部が設置され、その対応策が検討された。その中で、食肉処理場に搬入される牛すべてを対象としたBSEスクリーニング検査が、10月18日より全国一斉に開始される運びとなった（平成13年10月16日付け食発第307号）。

BSEスクリーニング検査にはプラテリアBSEキット (Bio-Rad社)を使用している。このプラテリアBSEキットは、BSEを引き起こす原因と考えられている異常型プリオントン蛋白を精製するBSE精製キットと、酵素結合抗体免疫アッセイ (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)により、精製した異常型プリオントン蛋白を検出するBSE検出キットとに分かれる。

ELISAは非常に感度がよく、陽性のものを陰性と判定することはほとんどないとされている。しかし、正常型プリオントン蛋白と異常型プリオントン蛋白を区別して検出できることや非特異反応によってBSEに感染していないのに陽性と判定されてしまう（偽陽性）ケースがある。したがって、精製過程での正常型プリオントン蛋白を分解するプロテイナーゼK (PK) 処理が最も重要となる。そこで、精製過程のPK処理による正常型プリオントン蛋白の分解に関する検討を行った。

プラテリアBSEキットの操作手順は次のとおりである。

1. 検査試料の精製

- (1) ウシ延髄かんぬき部を350±40mg採取する。
- (2) 採取試料をマイクロビーズと均質化液（ブドウ糖50mg/mL）の入ったグライディングチューブに入れ、細胞破碎機にかけ乳剤にする。
- (3) 乳剤を500μLを取り、別に用意した1.5mL容量のマイクロチューブに移す。
- (4) マイクロチューブに、PK希釈液（試薬A；尿素0.12g/mL）で250倍に希釈調整したPK溶液(3.6μL/mL)を500μL加え、よく混和する。
- (5) ヒートブロックに置き、37±1°Cで10±1分間インキュベーションする。
(この操作で、正常型プリオントン蛋白は分解されるが、異常型プリオントン蛋白は分解されない。)
- (6) 試薬B（第三ブタノール）を500μL加え、よく混和する。（PKの反応を止める。）
- (7) 20000gで5分間、または15000gで7分間遠心する。
- (8) 上清を廃棄し、吸水紙の上にマイクロチューブを逆さにして、5分間静置する。
- (9) 溶解液（尿素0.36g/mL）を50μL加え、ヒートブロックに置き、100±1°Cで5±1分間インキュベーションする。（異常型プリオントン蛋白の溶出）
- (10) ボルテックスでよく混和し、希釈液（リン酸カリウム2.7mg/mL、リン酸二カリウム13.96mg/mL）250μL加え、よく混和する。

2. 異常型プリオントン蛋白の検出

- (1) 抗ヒトプリオントン蛋白マウスモノクローナル抗体(0.5μg/ウェル)を固相化したマイクロプレートのA1～D1の4ウェルに陰性コントロール（リン酸緩衝液）を100μL分注する。
- (2) E1およびF1の2ウェルに陽性コントロールを100μL（ヒトプリオントン蛋白合成ペプチド0.05μg相当）分注する。
- (3) G1以降のウェルに精製した試料（1～(10)）を100μL分注する。

1 神奈川県衛生研究所 ウイルス部
〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1
2 神奈川県食肉衛生検査所
〒259-1215 平塚市寺田縄38-2
(現〒243-0022 厚木市酒井892-1)

- (4) シーリングフィルムでウェルを覆い、37±1°Cで75±15分間インキュベーションする。
- (5) シーリングフィルムをはずし、各ウェル中の溶液を吸引した後、洗浄液（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩12.1mg/mL, 0.01%チメロサール含有）で3回洗浄する。その後、吸水紙の上でマイクロプレートを逆さまにして、軽く叩き、ウェル内に残った洗浄液を除く。
- (6) 洗浄液で10倍に希釈調整した酵素標識抗体（ペルオキシターゼ標識抗ヒトプリオン蛋白マウスモノクロナル抗体 $1\mu\text{g/mL}$ ）を $100\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注する。
- (7) シーリングフィルムでウェルを覆い、2~8°Cで60±5分間インキュベーションする。
- (8) シーリングフィルムをはずし、各ウェル中の溶液を吸引した後、洗浄液で5回洗浄する。その後、吸水紙の上でマイクロプレートを逆さまにして、軽く叩き、ウェル内に残った洗浄液を除く。
- (9) 基質緩衝液（0.01%過酸化水素）と発色液（テトラメチルベンチジンニ塩酸塩2.5mg/mL）を10:1の割合で混合調整した基質発色液（透明であることを確認する）を $100\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注する。
- (10) 暗箱等で遮光し、室温（18~22°C）で30分間反応させる。
- (11) 反応停止液（硫酸0.5mol/L）を $100\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注する。
- (12) 反応停止液添加後30分以内に、主波長450nm、副

波長620nmにおける吸光度を測定する。

3. 判定方法

- (1) 隣性コントロール（4ウェル）の平均吸光度+定数（0.210）をカットオフ値とする。
- (2) 隣性コントロールの吸光度<0.150および陽性コントロールの吸光度≥1.000の条件を満たしていることを確認する。
- (3) 試料の吸光度<カットオフ値のとき、陰性と判定、試料の吸光度≥カットオフ値のとき、陽性と判定する。ただし、陽性を見逃すことがないよう万全を期す意味で、カットオフ値-10%以内の吸光度を示すものまで陽性の対象とする。
- (4) カットオフ値-10%以上の吸光度を示した試料については、残っている乳剤から精製、検出を再度実施する。再検査時のELISAでは、同じ試料について2ウェルを使用する。2ウェルの両方あるいはどちらかの吸光度がカットオフ値-10%以上を示した場合、スクリーニング検査陽性と判定し、確認検査（ウェスタンプロット法および免疫組化学検査）を実施する。

PK処理による正常型プリオン蛋白の分解に関する検討は図1のとおり実施した。

通常のBSEスクリーニング検査を実施した後、陰性であった試料から残った延髄かんぬき部乳剤をプールし、PK処理の条件を変えて、正常型プリオン蛋白の分解を行った。

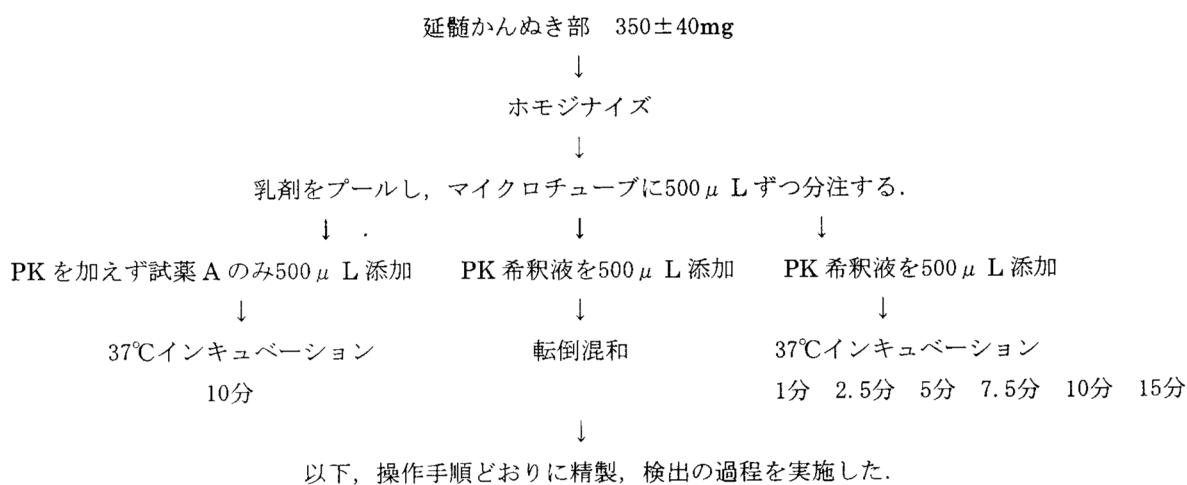


図1 プロティナーゼK(PK)処理による正常型プリオン蛋白の分解に関する検討方法

その結果（表1），延髄かんぬき部をホモジナイズし乳剤とした後，PKを添加せずに正常型プリオントロールの平均吸光度1.857とほぼ同じ値を示した。すなわち、延髄かんぬき部には、陽性コントロールと同等の正常型プリオントロールが含まれていると考えられる。

PKを添加し、転倒混和後37℃のインキュベーションを行わなかった試料の吸光度は、0.193とカットオフ値-10%に非常に近い値を示した。陽性と判定されないものの、正常型プリオントロールの平均吸光度0.025に近い値を示した。

以上のように、ウシ延髄かんぬき部にはプラテリアBSEキットに添付の陽性コントロールと同等の正常型プリオントロールが含まれており、PK処理による正常型プリオントロールの分解が不十分であったときには陽性と判定される可能性がある。標準操作は、PK希釈液添加後37℃で10分間インキュベーションとなっているので、正常型プリオントロールの分解は十分に行われるを考えられるが、延髄をおおっている脳軟膜や血液の混入は極力避けるべきであり、検体の採取およびヒートブロックの温度管理やインキュベーション時間など慎重に行うべきである。

偽陽性例の出現により、再検査や確認検査に時間や労

力を要し、また、酪農家や消費者に対する不安感を持たせることにもなるので、今後、異常型プリオントロールを特異的に検出できる検査法の開発が待たれるところである。

表1 延髄かんぬき部のプロティナーゼK(PK)による正常型プリオントロールの吸光度

PKの添加	インキュベーション	吸光度
無	37℃ 10分	1.798
有	転倒混和	0.193
有	37℃ 1分	0.034
有	37℃ 2.5分	0.041
有	37℃ 5分	0.027
有	37℃ 7.5分	0.028
有	37℃ 10分	0.070
有	37℃ 15分	0.035

陰性コントロールの平均吸光度=0.025

陽性コントロールの平均吸光度=1.857

カットオフ値 = 0.235

カットオフ値-10% = 0.211

(平成14年7月24日受理)

資料

神奈川県における恙虫病の発生状況 (平成13年度)

古屋由美子¹, 片山丘¹, 原みゆき¹, 今井光信¹,
吉田芳哉²

Occurrence of Tsutsugamushi Disease in Kanagawa Prefecture (2001)

Yumiko FURUYA¹, Takashi KATAYAMA¹,
Miyuki HARA¹, Mitsunobu IMAI¹ and Yoshiya
YOSHIDA²

恙虫病は秋田県、山形県および新潟県の特定河川流域で夏期にアカツツガムシが媒介する古典型と、非アカツツガムシが媒介する新型が知られているが、1951年をピークに1960年代後半には発生数が一桁になりほぼ制圧されたと思われていた。しかし1980年代になり各地で新型恙虫病患者が急増し、1984年には約1,000名の患者発生に至った。その後徐々に減少しているが2001年に全国で約500名の患者発生がみられている。神奈川県でも1990年に112名の患者発生がみられたが、その後減少傾向を示し、1996年、1997年には9名まで減少した。しかし1998年より増加傾向に転じ、1999年35名、2000年42名の患者発生となつたが、2001年には再び7名と減少した(図1)。

神奈川県では、1990年から1992年の3年間に神奈川県希少感染症対策事業として、県保健予防課、足柄上保健福祉事務所、足柄上医師会、衛生研究所が協力して恙虫病の検査体制の整備、地域の医療機関および住民への啓発を行つた。検査体制は、衛生研究所での、恙虫病の polymerase chain reaction (PCR) による迅速診断法の検討結果をうけて、1994年より小田原、厚木保健福祉事務所の衛生検査課で PCR を導入して、保健所での迅速診断、衛生研究所での PCR による迅速診断および感染株の型別、immunofluorescence assay (IF) による

血清診断を行い、医療機関に早期に診断結果の報告が行われ、医療現場への検査・研究の還元が行われている。

2001年10月から2001年12月に恙虫病を疑われた患者は、足柄上保健福祉事務所管内9例、秦野保健福祉事務所管内1例の合計10例であった。これらの検体について検査結果を表1にまとめた。IF による急性期・回復期の血清抗体価の上昇により7例が恙虫病患者と診断された。急性期の血液のみの搬入で IF で判定保留が1例あり、他の2例は抗体が検出されず陰性であった。

また PCR による急性期の血液を用いた *Orientia tsutsugamushi* (*O. tsutsugamushi*) DNA の検出では、IF で陽性であった7例は DNA が検出され早期に診断が可能であった。しかし IF で判定保留の1例および IF で陰性の2例は PCR で DNA は検出されず、陰性と判定された。このように IF と PCR の検査を併用することにより、IF で判定保留の例についても診断が可能になった。

PCR により *O. tsutsugamushi* DNA の検出された7例について、型別用のプライマーを用いた PCR を行い、神奈川県内で発生している恙虫病の感染株について検索を行つた(表1)。この結果、今年度県内で感染が見られた株は、Karp, Kawasaki 及び Kuroki の3株であり、それぞれ2例 (28.6%), 4例 (57.1%) および1例 (14.3%) であり、その大部分が Kawasaki 株による感染であることが判明した。

これらの患者より聞き取り調査で得られた感染推定場所は、山北町、秦野市であり、ほとんどの感染は、山北町に集中している。

恙虫病血液からの病原体の分離は検体の状態により分離に適さないものが多い。

今年度、細胞培養により病原体 *O. tsutsugamushi* が1例分離された。この例は、12月に秦野市の浅間山で感染したと思われる患者である。分離された *O. tsutsugamushi* は Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki および Kuroki の5株にそれぞれ特異的に反応するマウスモノクローナル抗体を使用した IF で、Karp 株特異的モノクローナル抗体と1:3200倍以上の反応性が示され、Karp 株と考えられた。また、PCR による型別においても IF 同様 Karp 株に特異的プライマーにより DNA の増幅が見られ Karp 株と同定され、恙虫病患者から病原体が確認された例である。

恙虫病と確定診断された患者の発生時期は10月から12月がほとんどで、11月が70%を占めていた。また感染時の行動は、畑、田圃などの農作業が多く、次に山菜取りなどの山作業で日常生活での感染の機会が多かつた。

恙虫病は適切な薬剤投与により完治する病気である

1 神奈川県衛生研究所 ウイルス部

〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1

2 神奈川県衛生研究所 企画指導室

が、適切な治療が行われないと死亡する例もあり、早期に確定診断することが重要である。今後も PCR と IF を併用し恙虫病の診断をより確実にする必要があると思われた。

最後になりましたが、患者情報の収集に御協力いただ

きました各医療機関の先生方に深謝いたします。さらに迅速診断や衛生研究所への迅速な検体輸送に御尽力いただきました各保健福祉事務所、県保健予防課の方々に深謝いたします。

(平成14年7月24日受理)

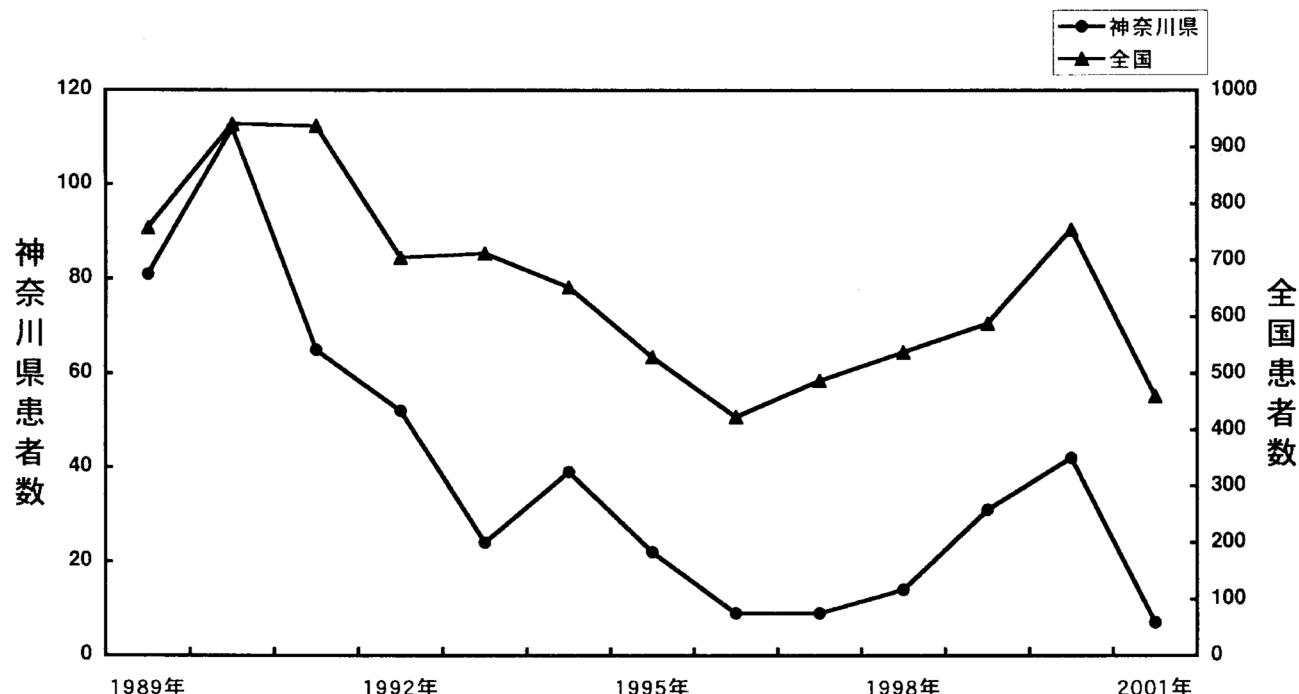


図1 惹虫病患者発生状況

表1 惹虫病患者のIFとPCRによる検査結果

検体番号	性別	年齢	採血日	Gilliam		Karp		Kato		Kawasaki		Kuroki		IF判定	PCR結果	総合判定	
				IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG				
1	男	38	2001.10.10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2001.10.23	160	40	320	20	640	40	2560	160	1280	160	160			
2	男	12	2001.10.12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2001.10.25	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10			
3	男	45	2001.10.23	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kp)	陽性
			2001.11.6	<10	<10	320	160	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10			
4	男	47	2001.10.26	<10	40	<10	40	<10	40	<10	40	<10	40	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2001.11.7	160	320	<10	160	<10	320	1280	1280	<10	640	<10			
5	男	37	2001.10.31	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2001.11.10	<10	320	<10	320	<10	40	5120	640	<10	<10	<10			
6	男	65	2001.10.31	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陰性	陰性	陰性
			2001.11.26	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10			
7	男	47	2001.11.2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kr)	陽性
			2001.11.9	160	<10	160	<10	160	<10	160	<10	160	<10	20			
8	女	67	2001.11.5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	陽性	陽性(Kw)	陽性
			2001.11.12	160	<10	<10	<10	<10	<10	<10	1280	<10	<10	<10			
9	男	53	2001.12.12	20	<10	80	80	40	<10	20	<10	40	<10	<10	陽性	陽性(Kp)	陽性 分離陽性
			2002.1.9	1280	320	1280	1280	640	20	80	1280	640	160	20			
10	男	39	2001.12.12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	保留	陰性	陰性

資料

食品汚染物残留調査結果 (平成13年度)

藤巻照久¹, 佐藤久美子¹, 渡邊裕子¹, 渡辺貞夫¹,
岸 美智子¹, 佐藤修二¹, 生活衛生課²

Investigation on the Residual Levels of Foods Chemical Contamination in Kanagawa Prefecture (2001)

Teruhisa FUJIMAKI, Kumiko SATO,
Hiroko WATANABE, Sadao WATANABE,
Michiko KISHI, Shuji SATOH
and Kanagawa Pref. Environmental Health Division.

食品の安全性を確認し、継続的に安全を確保するため農薬、動物用医薬品および環境汚染物の食品への残留調査を実施している。平成13年度の調査結果を報告する。

① 残留農薬調査結果

食品衛生法では、穀類、豆類、果実、野菜、茶等130種類以上の農産物について、残留を許容できる農薬の種類とその濃度を、人が一生涯の間毎日摂取しても健康上影響をもたらさないことを基準に順次審議し、各食品ごとの成分規格として定めている。平成13年4月現在215種の農薬に残留基準が設定されている。我々は平成2年度より、外国では収穫後使用農薬（ポストハーベスト農薬）として使用が認められていながら、残留基準が未設定の農薬および農産物加工食品における農薬残留の状況について市場調査を実施している。本年度の調査結果を表1、表2にまとめた。

1 神奈川県衛生研究所食品薬品部

〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1

2 神奈川県生活衛生課

〒231-8588 横浜市中区日本大通り1

輸入果実3種および輸入野菜1種の計10検体（アメリカ産、南アフリカ産およびオーストラリア産）についてポストハーベスト農薬を含む未規制農薬19種類の調査を行ったところ、オーストラリア産のりんご1検体からジフェニルアミン0.01ppmが検出された。ジフェニルアミンは殺菌を目的にアメリカなどでポストハーベスト農薬として使用されているが、我が国では使用が許可されていない。ADI（一日許容摂取量）は0.08mg/kg/dayであり¹⁾、検出された濃度は直ちに安全衛生上の問題が生じる濃度ではないと思われた。その他の輸入果実および野菜について農薬は検出限界（定量限界）以下であった。一方、国内産野菜4種の計12検体について未規制農薬2種類の調査を行ったところ、春菊1検体からクロロタロニル(TPN)0.03ppmが、ピーマン2検体からプロシミドン0.02ppm、0.09ppmが検出された。環境省の農薬登録保留基準²⁾によれば春菊は第二葉菜類に属しクロロタロニルは2ppmの基準値が設定されている。また、プロシミドンは平成14年4月1日から食品衛生法の規格基準値がピーマンにおいて5ppmが適用された。従って、検出された濃度は基準値以下であり、安全上問題はなかった。先行調査としておこなった国内産のレタス、ほうれんとうについては農薬残留は認められなかった（表1）。

表1 輸入農産物等の未規制農薬残留実態調査結果

検体名	検体数	検出頻度(検出数/検体数)			有機リン系*1
		メタチオノクロロタロニル	プロシミドン	オクタフルオロトリアジメノル	
アメリカチェリー	3	0/3	0/3	—	0/3
輸入ブロッズリー	3	—	—	—	0/3
グレープフルーツ	3	0/3	—	—	—
輸入りんご	1	—	—	—	0/1
ピーマン	3	—	—	2/3 *2	—
レタス	3	—	—	0/3	—
春菊	3	—	—	1/3 *3	0/3
ほうれんそう	3	—	0/3	—	—

*1:代謝物ジフェニルアミンの結果も含む

*2:有機リン系農薬:13農薬(EPN, クロルピリホス, ジクロロビス, ダイアジノン, フェニトロオゾン, マラチオン, エトプロロホス, ジメトエート, クロルピリホスメチル, ピリホスメチル, プロオホス, トルクロホスメチル, オキオホス)

*3:検出した濃度:ジフェニルアミン:0.01ppm;プロシミドン:0.02ppm及0.09ppm;クロロタロニル:0.03ppm

定量限界:オクタフルオロトリアジメノル:0.03ppm

メタチオノ等有機リン系農薬:クロロタロニル, ピリホスメチル, プロオホス, ジフェニルアミン:0.01ppm

加工食品の残留農薬調査として22検体22農薬について調査を行った（表2）。

表2 加工食品の農薬残留調査結果

検体名	検体数	検出頻度(検出数/検体数)			有機リン系*1
		カーボマート系	ヒレロイド系	クロルプロファムヒペロムトキシマダリル	
ポテト加工品	4	0/4	—	—	0/4
ドライフルーツ	3	—	—	—	0/3
オレンジマーマレード	2	1/2 *1	—	—	—
りんごジュース	2	0/2	1/2 *2	—	—
トマトジュース	2	0/2	0/2	—	—
食パン	4	0/4	—	—	—
小麦粉	5	2/5 *3	—	—	—

*1:クロルピリホス(0.03ppm)

*2:カーボマート(0.02ppm)

*3:クロルピリホスメチル(0.008, 0.009ppm)

有機リン系農薬:13農薬(EPN, クロルピリホス, ジクロロビス, ダイアジノン, フェニトロオゾン, マラチオン, エトプロロホス, ジメトエート,

クロルピリホスメチル, ピリホスメチル, プロオホス, トルクロホスメチル, オキオホス)

カーボマート系農薬:3農薬(カルハリル, フラブカルブ, メオカルブ)

ヒレロイド系農薬:3農薬(シロヒリジン, シルベトリリン, ベルトリリン)

国産オレンジマーマレード1検体からクロルピリホスが0.03ppm検出された。加工食品についての残留基準は設定されていないが、オレンジの食品衛生法におけるクロルピリホスの残留基準は0.3ppmであることから、安全上の問題はないと考えられた。国産りんごジュース1検

体からカルバリルが0.02ppm 検出された。りんごについての食品衛生法における残留基準は1ppm であり、検出された値は規格基準の50分の1の値であり、食品衛生上問題はないと考えられた。りんごについてはカルバリルの検出事例も見られる^{3) 4)}ことから、加工時に消失せずに残留したものと考えられた。小麦粉（原産地不明）5検体中2検体からクロルピリホスメチルが検出(0.008, 0.009ppm)された。クロルピリホスメチルについては食品衛生法における規格基準は設定されていない。環境省の農薬登録保留基準²⁾の野菜 0.03ppm に比較し、問題ないと考えられた。他の加工食品から農薬は検出されなかった。

②食肉の残留動物用医薬品検査結果

食品衛生法では食肉中に残留する動物用医薬品について肉の種類ごとに残留基準を定め、安全性の確保を図っている。平成13年10月現在、22品目（トレントロンアセテート、ゼラノール、イベルメクチン、オキシテトラサイクリン、クロサンテール、フルベンダゾール、オキシテトラサイクリン／クロルテトラサイクリン／テトラサイクリン、アルベンダゾール、イソメタミジウム、チアベンドゾール、スルファジミジン、カルバドックス、トリクラベンダゾール、モキシデクチン、スピラマイシン、ベンジルペニシリン、ジクラズリル、ナイカルバジン、チルミコシン、セフチオフル、エプリノメクチン及びレバミゾール）の残留基準が設定されている。当所では、平成13年度はアメリカ、ニュージーランド、オーストラリア、ブラジルから輸入された牛肉4検体、鶏肉3検体および羊肉1検体についてスピラマイシン（抗生物質）、トレントロンアセテート（ホルモン剤）、ゼラノール（ホルモン剤）及びモキシデクチン（寄生虫駆除剤）の検査を実施した。また、国内産牛肉6検体及び鶏肉4検体についてスピラマイシンの検査を実施した。その結果、全ての検体において、当該品目は検出されなかった（表3）。

表3 動物用医薬品残留検査結果

検体名	検体数	内訳		検出頻度（検出数/検体数）		
		輸入	国内	スピラマイシン*1	トレントロンアセテート*2	ゼラノール
牛肉	10	4	6	0/10	0/4	0/4
鶏肉	7	3	3	0/7	—	—
羊肉	1					

*1:スピラマイシン及びオスピラマイシンの和として測定、*2:β-トレントロンとして測定
定量限界：スピラマイシン、オスピラマイシン:0.05ppm、モキシデクチン:0.005ppm
β-トレントロン、ゼラノール:0.002ppm

③海産魚介類の環境汚染物質の残留調査結果

神奈川県では、漁網や船底塗料に使用された有機スズ化合物による魚介類の汚染が食品衛生上問題とされた昭和60年代から、TBTO（ビストリブチルスズオキジド）およびTPT（トリフェニルスズ）の汚染実態調査を行っている⁵⁾。平成6年度以降は、代謝産物であるDBT（ジ

ブチルスズ）を調査項目に加え、平成13年度においても、県内産および県内流通品について調査を実施した。試験法は衛乳第20号（平成6年）に準じて行った。20検体中TBTOは2検体から0.02, 0.03ppm, TPTは不検出、DBTは3検体から0.02～0.03ppmが検出された（表4）。

表4 海産魚介類中の有機スズ化合物調査結果

検体名	検体数	TBTO(ppm)		TPT(ppm)		DBT(ppm)	
		検出頻度	検出濃度	検出頻度	検出濃度	検出頻度	検出濃度
マアジ	4	0/4	ND	0/4	ND	1/4	0.02
サバ	3	0/3	ND	0/3	ND	0/3	ND
カマス	2	0/2	ND	0/2	ND	0/2	ND
ソーダガツオ	1	0/1	0.03	0/1	ND	1/1	0.03
ブリ	1	0/1	ND	0/1	ND	1/1	0.02
イワシ	1	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND
ヒラゴ *1	1	1/1	0.02	0/1	ND	0/1	ND
コアジ	2	0/2	ND	0/2	ND	0/2	ND
ワラサ	1	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND
ダツ	1	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND
メダイ	1	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND
コダイ	1	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND
アオリイカ	1	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND

*1:コイワシ

検出頻度:検出数/検体数 ND:不検出

定量限界 TBTO,TPT,DBTとも(=)0.02ppm

TPTおよびDBTは、それぞれTPTC（塩化トリフェニルスズ）、DBTC（塩化ジブチルスズ）とし

海産魚介類中の有機スズの残留量は、塗料中の混入が法的に規制された時期以降減少し、現在では直ちに食品衛生上問題となる濃度ではない。しかしながら経年に減少傾向にあったDBTは平成13年度においても検出されており、平成13年度に不検出であった検体においても痕跡程度のTBTOおよびDBTが確認されている。今後、有機スズ化合物は外因性内分泌かく乱物質として注目されている汚染物であり、引き続き調査する必要があると考えられた。

（平成14年7月24日受理）

文献

- Tomlin, C. D. S.:diphenylamine, The Pesticide Manual 12th Ed., pp323-324, British Corp Protection Council, Farnham (2000)
- 「今日の農業」編集室編:TPN, 改訂3版農薬登録保留基準ハンドブック, p. 990, 化学工業日報社, 東京 (1998)
- 厚生省生活衛生局食品化学課: 平成9年度 食品中の残留農薬検査結果、食品中の残留農薬（修正版）p. 108, 厚生労働省, 東京 (2000)
- 厚生労働省医薬局食品保健部基準課: 平成10年度 食品中の残留農薬検査結果、食品中の残留農薬, p. 104, 厚生労働省, 東京 (2001)
- 佐藤久美子, 藤巻照久, 渡辺貞夫, 貫山道子, 谷孝之, 中岡正吉: 神奈川県内流通魚介類中の有機スズ化合物 (TBTO, TPT) 汚染実態調査 (1985年～1996年), 神奈川県衛生研究所報告, 27, 63-67 (1997)

資料

薄層クロマトグラフ法による酸化染料の検出限界

熊坂謙一, 大森清美, 小島尚, 土井佳代,
佐藤修二

The Detection Limits of Oxidative Dyes by Thin Layer Chromatography

Kenichi KUMASAKA, Kiyomi OMORI,
Takashi KOJIMA, Kayo DOI, Shuji SATO

医薬部外品及び医薬品等の一部の製造(輸入)承認は都道府県知事に委譲されている。衛生研究所薬事毒性科では県薬務課の依頼に基づき製造(輸入)承認申請書の規格及び試験方法の審査を担当している。近年の当科における審査品目の大半は医薬部外品に該当する染毛剤である。これはいわゆる“おしゃれ染め”的流行を反映しているものと思われる。

染毛剤には一時染毛剤、半永久染毛剤及び永久染毛剤がある。永久染毛剤は、毛髪への染色力も強く、一時染毛剤及び半永久染毛剤より持続性もあることから、染毛剤の中では広く使用されている。この永久染毛剤には1剤形と2剤形がある。通常、液体またはクリーム状の製品である2剤形は、有効成分である酸化染料及びアンモニア水などのアルカリ剤を含む第1液と酸化剤として数パーセントの過酸化水素を含む第2液から成り、使用時に混合し酸化染料を酸化させて毛髪を染毛するものである。第1液に含まれる酸化染料は主に芳香族アミノ化合物であり、パラフェニレンジアミンやパラアミノフェノール等多くの種類がある。これらは皮膚アレルギーを引き起こす可能性もあり、染毛剤等医薬部外品において「表

示成分」に規定されている成分でもある。また、平成6年3月15日付厚生省薬務局審査課長通知により、染毛剤の製造(輸入)承認申請において有効成分である酸化染料の確認試験等の設定が必須となっており、その規格及び試験方法を適切に設定することが重要となる。

酸化染料の分析方法として薄層クロマトグラフ法が衛生試験法・注解¹⁾に収載されている。その他、ガスクロマトグラフ法²⁾及び高速液体クロマトグラフ法³⁾等が報告されている。薄層クロマトグラフ法による分析試験は、他の手法に比べて比較的簡便であるため汎用されている。

本来であれば、すべての申請書の試験方法について実地試験を行い、その妥当性について検証する必要がある。しかしながら、審査件数は年間100件以上ありその業務量、及び条例により審査期間が定められていることから、迅速に審査を行うため、大半は机上での書類審査となる。その過程において、薄層クロマトグラフ法による染毛剤中の酸化染料類の確認試験では、試験成績書に添付されている試験時の薄層板写真の鮮明度合い及びその信憑性が問題となる場合がある。特に配合量の少ない酸化染料が含まれている場合、実際には確認されていても添付されている写真では確認しづらいこともある。または、低濃度であっても予想以上に鮮明に確認されることもあり、申請された試験方法と実際に行われた試験方法が異なる可能性も考えられる。このような場合、申請された試験方法及び添付された試験成績書の妥当性について判断する根拠、即ち、薄層クロマトグラフ法により検出できる最低限量の酸化染料を予め検討しておくことにより、試験方法上の指摘事項について速やかに判断することが可能となり、また、申請者への疑義照会の回数を減らすことにより、審査期間の短縮及び業務の効率化にもつながる。

そこで、薄層クロマトグラフ法による各酸化染料のおよその検出限界量と試験上の問題点について検討した。

試験方法は衛生試験法・注解¹⁾を参考とした。本検討では製品に汎用されている酸化染料14種類を試験に用いた。その詳細を表1に記す。試験溶液の調製は、各酸化染料約0.05gを精密に量り、2-プロパノール・水・アンモニア水混液(9:3:1)を加えて溶かし正確に100mLとし0.5mg/mLの原液を調製した。この原液をさらに希釈し0.1mg/mLの溶液を調製し、以下希釈し0.01mg/mL毎の溶液を調製した。この希釈液5mLに対して亜硫酸水素ナトリウム0.1gを加えて混和し、その上清を試験溶液とした。試験溶液は調製後直ちにその2μLを薄層板にスポットした。なお、薄層板は蛍光剤入りシリカゲル薄

表1 試験に用いた酸化染料標準品

酸化染料	規格	メーカー	純度
パラフェニレンジアミン	—	ALDRICH	99%以上
パラアミノフェノール	1級	和光純薬	98.0%以上 ¹⁾
メタアミノフェノール	1級	和光純薬	99.0%以上 ²⁾
オルトアミノフェノール	—	和光純薬	97%以上
5-アミノオルトクレゾール	1級	和光純薬	97.0%以上
4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン	—	ACROS	98%
塩酸メタフェニレンジアミン	特級	東京化成	99.0%以上
2-ニトロ-1,4-フェニレンジアミン	—	東京化成	94%以上
レゾルシン（レゾルシノール）	特級	和光純薬	99.0%以上
α -ナフトール	特級	和光純薬	99.0%以上
2,6-ジアミノピリジン	1級	和光純薬	98.0%以上
ピクラミン酸	特級	東京化成	98%以上
硫酸トルエン-2,5-ジアミン	1級	東京化成	98%以上
塩酸2,4-ジアミノフェノキシエタノール	外原規 ³⁾	— ⁴⁾	95%以上

1)薄層クロマトグラフ用パラアミノフェノール：医薬部外品原料規格、試薬・試液に従い再結晶を行った。

2)薄層クロマトグラフ用メタアミノフェノール：医薬部外品原料規格、試薬・試液に従い再結晶を行った。

3)医薬部外品原料規格適合品

4)インターナショナル・トイレツリース株式会社より供与された。

層板(Silica Gel 60 F₂₅₄, MERCK)を用いた。展開溶媒としてクロロホルム・酢酸エチル・エタノール混液(7:2:1)または2-プロパノール・酢酸・水混液(8:1:1)を用い、各展開溶媒で約10cm 展開後薄層板を風乾する。酸化染料のスポットの検出は、まず紫外線254nm 及び366nm 照射により確認する。さらに0.5% パラジメチルアミノベンズアルデヒド10%塩酸溶液(発色液)を噴霧し、レゾルシン及び α -ナフトールは噴霧3時間後、他の酸化染料は30分後に蛍光灯照射下でスポットの Rf 値及びその色調を確認した。なお検出限界の判定は、試験を同様に3回繰り返して行い、いずれの試験でも適切な Rf 値及び色調を持つスポットが確認された最大量を検出限界とした。

各酸化染料のスポットの Rf 値、色調及びおおよその検出限界を表2に示す。薄層クロマトグラフ法においてスポットの Rf 値は約0.2~0.8の範囲内に入るようにすべきとされていることから⁴⁾、展開溶媒は2,6-ジアミノピリジン、ピクラミン酸、硫酸トルエン-2,5-ジアミン及び塩酸2,4-ジアミノフェノキシエタノールでは2-プロパノール・酢酸・水混液(8:1:1)とし、他の酸化染料ではクロロホルム・酢酸エチル・エタノール混液(7:2:1)とした。また、紫外線照射のみで発色液より高感度あるいは同程度の検出限界を持つ場合は併せて記載した。

表2に示したように、酸化染料はスポットした絶対量として最低限約80~140ng 程度あれば発色液噴霧により

検出されることが明らかとなった。また、この時試験間で約±20ng 程度の変動が見られた。 α -ナフトール、硫酸トルエン-2,5-ジアミン及びピクラミン酸は検出感度が多少劣る結果となった。また、酸化染料のスポットの発色に関して、ほとんどの酸化染料は発色液噴霧後30分以上室温放置すれば充分発色したが、 α -ナフトール及びレゾルシンは他の酸化染料と比較して充分な発色に長時間を要した。ここでは詳細な検討はしていないものの、およそ3時間以上室温放置すればその後の発色程度は変化しなかったため、検出確認を3時間後と設定した。 α -ナフトール及びレゾルシンの検出に問題が生じる原因として、これらは他の酸化染料とは異なりフェノール性化合物であることから、検出に使用した発色液がおそらくこのようなフェノール性化合物に対して感度が劣るためであり、塩化鉄が含まれる他の発色液を用いれば高感度かつ短時間に検出できるものと予想される⁵⁾。しかし実際の製品では、配合される酸化染料の大半はフェニレンジアミン類及びアミノフェノール類等であり、フェノール性化合物はレゾルシンまたは α -ナフトールのいずれかが配合されていることが多いため、製品の確認試験では本発色液を用いる方が簡便である。よって、本実験条件において、 α -ナフトールを含む染毛剤の確認試験を設定する場合は、感度を増すために薄層板での展開に影響を及ぼさない範囲でスポット量を多くする必要があ

表2 各酸化染料の検出限界

酸化染料類	Rf 値	発色液 ¹⁾		紫外線254nm 照射		紫外線366nm 照射	
		色調	検出限界(ng)	色調	検出限界(ng)	色調	検出限界(ng)
展開溶媒①²⁾							
パラフェニレンジアミン	0.18	黄赤色	80	黒色(吸収)	60	黄色蛍光	40
パラアミノフェノール	0.28	黄色	120	黒色(吸収)	120	>200	>200
メタアミノフェノール	0.35	黄色	40	>200	>200	>200	>200
オルトアミノフェノール	0.38	黄赤色	60	>200	>200	>200	>200
5-アミノオルトクレゾール	0.30	黄色	80	黒色(吸収)	60	>200	>200
4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン	0.31	黄色	80	黒色(吸収)	80	黒色(吸収)	100
メタフェニレンジアミン	0.18	黄色	40	>200	>200	淡黄色蛍光	200
2-ニトロ-1,4-フェニレンジアミン	0.37	帶赤黄色	100	黒色(吸収)	100	黒色(吸収)	200
レゾルシン	0.45	紫色	80	黒色(吸収)	80	黒色(吸収)	80
α -ナフトール	0.57	紫色	140	黒色(吸収)	100	>200	>200
展開溶媒②³⁾							
2,6-ジアミノピリジン	0.62	青紫色	80	青色蛍光	80	青色蛍光	<20
ピクラミン酸	0.82	黄赤色	140	黒色(吸収)	100	黒色(吸収)	120
硫酸トルエン-2,5-ジアミン	0.55	黄赤色	140	黒色(吸収)	80	赤色	40
塩酸2,4-ジアミノフェノキシエタノール	0.48	黄色	80	黒色(吸収)	100	黄緑色蛍光	60

1) 発色液は0.5% p-ジメチルアミノベンズアルデヒド10%塩酸溶液を用いた。

2) 展開溶媒①: クロロホルム、酢酸エチル及びエタノール混液(7:2:1)

3) 展開溶媒②: 2-プロパノール、酢酸及び水混液(8:1:1)

り、また、レゾルシン、 α -ナフトール等フェノール系化合物を含む場合は、発色液噴霧後検出確認までの時間を長くするか、場合によっては衛生試験法・注解に記載されているように60°C10分間加温し発色を促進する等の操作が必要である。しかし、検出確認までの時間を長くしすぎると、フェニレンジアミン類、アミノフェノール類等の他の酸化染料のスポットの発色が徐々に退色してしまうため、60°C10分間加温による発色が確実であった。

また、発色液による検出よりも紫外線照射のみで高感度に検出されるものがあった。特に2,6-ジアミノピリジン及び硫酸トルエン-2,5-ジアミンは紫外線366nm 照射によりそれぞれ青色蛍光、赤色の特異的なスポットを呈して高感度に確認されることから、これらの酸化染料を迅速かつ高感度に検出する方法として有用であると考えられた。他にも検出感度は同等であるが塩酸2,4-ジアミノフェノキシエタノールのスポットは特異的な黄緑色蛍光を呈していた。また、 α ナフトール及びピクラミン酸は紫外線254nm 照射により黒い吸収を示し、発色液による検出よりも高感度に検出されていた。 α ナフトールは発色液の場合、検出感度も比較的悪く、また、検出までに時間がかかることから、紫外線照射による検出は有効であると考えられた。しかしながら、紫外線254nm 照射の場合、酸化染料以外にも黒い吸収を呈する物質が

多いことから、紫外線254nm 照射が有用であるか否かは、製品に配合される成分により異なると考えられる。

パラアミノフェノールの検出感度も他の酸化染料に比べて多少劣る傾向にあった。試験溶液調製後時間が経過したものをスポットして展開を行った場合、分解物と思われる、原点に残る成分が増えることから、経時変化による分解がおきたと考えられる。そのため、試料溶液調製後速やかに試験を行うことが必要であると考えられた。

また、発色液は調製後1週間以上経過したものを使用した場合、調製直後のものに比べ発色が悪くなる傾向が見られた。よって発色液は数日内に使用する、あるいは用時調製するのが望ましいと思われた。

製造(輸入)承認申請書「規格及び試験方法」に規定される「確認試験」は、製品に有効成分が確実に含まれていることを確認する重要な試験項目である。よって、今回示した薄層クロマトグラフ法による酸化染料の検出限界及び試験上の問題点等さらに情報を蓄積し、製造(輸入)承認書審査業務においてその妥当性を的確かつ迅速に検証する上での判断基準として活用し、更に申請者が試験方法を適切に設定する際の有用な参考資料になるとを考えている。

謝辞

本実験にご協力頂きました麻生順子氏に感謝申し上げます。また、酸化染料標準品「塩酸2,4-ジアミノフェノキシエタノール」はインターナショナル・トイレツリース株式会社より御供与頂きました。お礼申し上げます。

(平成14年7月24日受理)

参考文献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2000, 653-654, 金原出版, 東京(2000)
- 2) Tokuda, H. Kimura, Y. and Takano, S :

Determination of dye intermediates in oxidative hair dyes by fused-silica capillary gas chromatography, J. Chromatogr 367, 345-356 (1986)

3) 鈴木助治, 池田一夫, 岸本清子, 中村弘, 渡辺四男也 : 高速液体クロマトグラフィーによる染毛在中の酸化染料の定量, 東京衛研年報, 41, 70-74 (1990)

4) (財)日本薬剤師研修センター編集：医薬品承認申請ガイドブック 2000, 49, 薬事日報社, 東京(2000)

5) 山口一孝 : 植物成分分析法 上巻, 110-111, 南江堂, 東京(1958)

他 誌 掲 載 論 文 抄 錄

(平成13年6月～平成14年5月)

Identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* possessing insertionally inactivated Shiga toxin gene

[挿入不活性化された志賀毒素遺伝子を保有する志賀毒素産生性大腸菌の同定]

沖津忠行（神奈川衛研，細菌病理部），楠本正博（東洋紡・敦賀バイオ研）鈴木理恵子，佐多 辰（神奈川衛研，細菌病理部），西矢芳昭，川村良久（東洋紡・敦賀バイオ研），山井志朗（神奈川衛研，細菌病理部）
Microbiol. Immunol., **45**, 319-322 (2001)

我々は志賀毒素 (*stx*) 遺伝子の全長を増幅する PCR 法を用いて志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 分離株を調査し、挿入配列 (IS) の挿入により不活性化された *stx2* 遺伝子を発見した。本 IS の配列は既報の *stx2* 遺伝子に挿入されていた *IS1203v* と同一であり、挿入位置も同一であったが、*stx2* 遺伝子の配列は異なっていた。本結果は各 *stx2* 遺伝子への *IS1203v* の挿入が独立して起こったことを示し、挿入不活性化された *stx2* 遺伝子を保有する STEC 株が広く存在する可能性を示唆する。*stx* 遺伝子全長の増幅は IS の挿入位置とは無関係に、しかも IS の挿入を増幅産物の大きさに反映させて検出できることから、*stx* 遺伝子の検出に効果的な方法のひとつである。

Characteristics of Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* Strains Isolated from Patients and Induced with Erythromycin In Vitro

[患者由来および試験管内作成マクロライド耐性肺炎マイコプラズマの遺伝子変異]

岡崎則男（神奈川衛研，細菌病理部），成田光男（札幌鉄道病院），泉川欣一（栄和会泉州病院），佐々木次雄（国立感染研）
Microbiol. Immunol., **45**, 617-620 (2001)

試験管内において、141株の肺炎マイコプラズマ分離株から11株 (7.8%) のエリスロマイシン耐性株を作成できた。これらの株は他のマクロライド (Mac) およびリンコマイシンにも耐性を示した。また、23S rRNA 遺伝子の2063位あるいは2064位に点変異を起こしており、変異位置によりマクロライドに対する耐性パターンが異なった。即ち、2063位変異株 (A → G) は14員環 Mac に高度耐性 (MIC; 200~≥400 μg/ml) を示し、2064位変異株 (A → C または G) はこれらに加えて16員環 Mac にも高度

耐性を示した。クリンダマイシンが奏功しなかった患者から分離された肺炎マイコプラズマの遺伝子変異を調べたところ、2063位に変異 (A → G) を起こしており、上記同様の耐性パターンを示した。臨床分離株においてこのような変異株が分離されたのは本邦では最初である。

肺炎マイコプラズマ感染症における臨床的クリンダマイシン耐性について

成田光男，中山雅之（札幌鉄道病院），山田 諭（北海道医療大学），岡崎則男（神奈川衛研，細菌病理部），佐々木次雄（国立感染研）
臨床小児医学, **48**, 123-127 (2001)

平成12年秋、札幌市北区あいの里地区を中心にクリンダマイシンが奏功しない肺炎マイコプラズマ感染症患者が続発した。これらの患者の内5例の咽頭から肺炎マイコプラズマの分離に成功し、抗生素耐性を調べた結果、クリンダマイシン以外にもクラリスロマイシンおよびエリスロマイシン等の14員環マクロライドに対し高度耐性 (MIC; ≥400 μg/ml) を示した。一方、ジョサマイシンおよびスピラマイシンをはじめとした16員環マクロライドにも一定レベルの耐性 (MIC; 6.25~12.5 μg/ml) は示したが、高度耐性ではなかった。これらの菌株は23S rRNA 遺伝子2063位に点変異 (A → G) を起こしていた。

***Mycoplasma pneumoniae* 分離株の試験管内におけるエリスロマイシン耐性獲得と遺伝子変異**

岡崎則男（神奈川衛研，細菌病理部），佐々木次雄（国立感染研）
日本マイコプラズマ学会誌, **28**, 84-87 (2001)

肺炎マイコプラズマ分離株より作成したエリスロマイシン (EM) 耐性株11株につき、23S rRNA 遺伝子の解析を実施した。その結果、2063あるいは2064位に点変異を起こしており、2063位変異株は14員環マクロライドに、2064位変異株はこれらに加えて16員環マクロライドにも高度耐性を示した。耐性獲得株の親株4株を段階別濃度に EM を含む液体培地において培養したところ、いずれの株も広範囲の EM 濃度において耐性化し、殊に、3株からは異なる点変異を有する複数の耐性株が得られた。更に、点変異を有せずに軽度のマクロライド耐性を示す1株が得られ、耐性獲得メカニズムが点変異以外にもあり得ることが示唆された。

HIV感染症のウイルス診断

今井光信（神奈川衛研、ウイルス部），総合臨床，50, 2698-2703, (2001)

HIV 感染症においては、臨床症状からの診断は困難であり、診断は全て血清診断により行われる。通常は、患者の血中に存在する抗 HIV 抗体を検出し、証明することで行われるが、感染初期においてはウイルスの遺伝子検査も抗体検査を補完する有効な診断法である。本稿では、HIV の抗体検査と遺伝子検査およびその検査体制について解説した。

A novel recombinant Adeno-Associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to Human immunodeficiency virus

[アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いたHIVリコンビナントワクチンによるHIV免疫の誘導]

Ke-Qin Xin, Jun Yang, Kenji Hamajima, Tomoyuki Saito, Kenji Okuda (横浜市大医学部), Masashi Urabe, Kazuo Nomiyama, Hiroko Nomiyama, Hiroaki Mizukami, Keiya Ozawa (自治医大), Mitsunobu Imai (神奈川衛研、ウイルス部), John Monahan (Avigen, Inc.) Katsuji Okuda (東京歯科大学), Human gene therapy, 12, 1047-1061, (2001)

リコンビナントのアデノ随伴ウイルス (AAV) はDNA治療やDNAワクチン開発のためのベクターとして注目されている。本研究では、AAVを用いてAAV-HIVベクターを作製し、HIV-1のenv, tat, rev等の遺伝子を発現させた。Balb/Cマウスを用いた免疫実験でIgG抗体、IgA抗体とともに効率よく産生され、本ベクターがDNAワクチン用ベクターとして有望であることがわかった。

マイクロプレート法による HIV-1 抗体、HIV-2 抗体および HIVp24 抗原検出用キット (HIV 抗原抗体同時検出キット) の検討

嶋 貴子、近藤真規子、斎藤隆行（神奈川衛研、ウイルス部）、川田かおる、伊藤 章（横浜市大病院）、坂本光男、相楽裕子（横浜市民病院）、今井光信（神奈川衛研、ウイルス部）感染症誌, 75, 1014-1024, (2001)

EIA 法を測定原理とするマイクロプレートを用いた HIV 抗原抗体同時検出キット（ジェンスクリーン HIV Ag·Ab）について、他の HIV 抗原抗体同時検出キット2法との比較検討を行った。本キットの感度は100%，特異性は99.7%であった。HIV 感染初期セロコンバージョンパネル血清を用いた検討では、本キットは他の抗原抗体同時検査キットと比較して、ほぼ同時期あるいは1~

2採血日早く陽性となることが分かった。従って本キットは十分な感度、特異性を有しており、ウインドウ期についても、他の抗原抗体同時検査キットと比較して同等あるいは短縮が可能なため、HIV スクリーニング検査法として有用であることが分かった。

イムノクロマトグラフィー法によるA, B型インフルエンザウイルス迅速診断キットの検討

川上千春（横浜市衛研）、清水英明（川崎市衛研）、渡邊寿美（神奈川衛研、ウイルス部）、七種美和子、宗村徹也（横浜市衛研）、三田村敬子、菅谷憲夫（日本鋼管病院小児科）、今井光信（神奈川衛研、ウイルス部）、感染症誌, 75, 792-799, (2001)

イムノクロマトグラフィー法を用いて A, B 型インフルエンザウイルスを検出する迅速診断キット QuickVue Influenza test (Quidel Corporation, USA) について基礎および臨床的検討を行った。本キットの検出限界は、 $3.0 \times 10^5 \sim 6.0 \times 10^5$ pfu/ml であった。また、感度および特異度は、ウイルス分離と比較した場合それぞれ75.5%，93.0%，RT-PCR と比較した場合それぞれ72.2%，97.4%であった。本キットは、ワンステップで A, B 型インフルエンザウイルスを迅速に検出でき、従来の迅速キットと同等の感度と特異度を有しているので、臨床診断に有用と考えられた。

イムノクロマトグラフィー法によるインフルエンザウイルス迅速診断キットの臨床的検討

山崎雅彦（秦野赤十字病院小児科）、三田村敬子（日本鋼管病院小児科）、木村和弘（伊勢原協同病院小児科）、蘿澤真理（日本鋼管病院小児科）、込山修、市川正孝、山本敬一（伊勢原協同病院小児科）、染谷研一、中野孝子（秦野赤十字病院小児科）、橋本洋子、萩原紀子、前澤民子（伊勢原協同病院細菌検査室）、渡邊寿美（神奈川衛研、ウイルス部）、清水英明（川崎市衛研）、菅谷憲夫（日本鋼管病院小児科）、感染症誌, 75, 1047-1053, (2001)

A 型と B 型のインフルエンザウイルスが検出可能な、イムノクロマトグラフィー法による迅速診断キット QuickVue Influenza test (QUIDEL, USA) について検討した。対象は、2001年1月から3月のインフルエンザ様疾患患者で、鼻腔吸引液184検体、鼻腔拭い液140検体、咽頭拭い液101検体を採取した。ウイルス分離と比較した本キットの感度は87.7%，特異度は91.9%となった。検体毎の感度は、鼻腔吸引液で92.6%，鼻腔拭い液で92.6%，咽頭拭い液で76.5%となり、従来の酵素免疫法による迅速診断キットと同様の傾向を示した。大きな特

徴は、簡便性に優れている点であった。本キットは、A型とB型の区別はできないが、2つのウイルスを同時に検出できることから、外来治療におけるノイラミニダーゼ阻害剤の投与に際しての補助診断として有用である。

Detection of *Coxiella burnetii* antibody by immunofluorescence technique and enzyme-linked immunosorbent assay

[IFおよびELISAによる*Coxiella burnetii* 抗体検出]

古屋由美子、片山丘、原みゆき、吉田芳哉、今井光信（神奈川衛研、ウイルス部）、荒島康友、加藤公敏（日大医学部）小川基彦、萩原敏旦（国立感染研）
Jpn. J. Infect. Dis., 54, 75-76 (2001)

*Coxiella burnetii*に対する抗体の測定は主にphase II抗原を用いた間接蛍光抗体法(IF)により行われているが、IFは観察者の熟練度や主観に影響されることもある。そこで酵素抗体法(ELISA)によるphase Iおよびphase II抗原、IFによるphase II抗原に対する呼吸器疾患患者および健常人血清中の*C. burnetii*抗体検出を行い、IFとELISAの抗体検出状況を調べた。

IF抗体価16倍以下ではELISAとの不一致例が多く、非特異反応や交差反応の可能性を否定できない。IF抗体価32倍以上ではELISAとの結果が良く一致し、呼吸器疾患患者および健常人の抗体保有率は14.6%、0.5%であった。

IFで血清診断を行うには、急性期および回復期のペア血清を用いて抗体価の有意上昇がみられた場合に患者と診断する必要がある。ELISAは血清診断法として有用と思われるが、さらに例数を加えた検討が必要である。

Analysis of plasticizers in cap-sealing resins for bottled foods

[瓶詰食品のキャップシーリング材における可塑剤の分析]

平山クニ（神奈川衛研、食品薬品部）、田中宏子（大妻女子大）、川名清子、谷孝之（神奈川衛研、食品薬品部）、中澤裕之（星稟大）Food Additives and Contaminant, 18, 357-362 (2001)

瓶詰食品のキャップシーリング材における可塑剤の使用実態を調査した。国産品と輸入品では使用されている可塑剤に違いが見られた。輸入品ではフタル酸ジイソデシルが検出されるものが多かったが、国産品では検出されるものはなかった。また、国産品にはグリセロールジアセチルラウロイルが検出されたが、輸入品では検出されるものがなかった。これまでの調査において検出されることが多かったフタル酸ジ-2-エチルヘキシルは、全

体的には使用されない方向にあることが明らかになった。

イオン交換クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーによる食品中のスクラロースの分析

岸弘子、川名清子（神奈川衛研、食品薬品部）食衛誌, 42, 133-138 (2001)

イオン交換クロマトグラフィー(AEC)及び逆相HPLCによる食品中のスクラロースの分析法を検討した。食品中のスクラロースは水又はメタノールで抽出し、Sep-Pak C₁₈及びSep-Pak Alumina Nによりクリーンアップを行った。AECは、カラムにCarboPac PA1、移動相に100mmol/L水酸化ナトリウム-50mmol/L酢酸ナトリウム溶液、検出はパルスドアンペロメトリー検出器を用いた。HPLCは、カラムにInertsil ODS-3V、移動相にメタノール・水(25:75)、検出は示差屈折検出器を用いた。AECによる添加回収率は80.6~102.0%，定量限界はチューインガムが2μg/g、その他の食品が0.5μg/g、HPLCによる添加回収率は80.2~121.2%，定量限界はチューインガムが20μg/g、その他の食品が5μg/gであった。

メラトニン含有サプリメントの品質における問題点

小島尚、土井佳代、岸美智子（神奈川衛研、食品薬品部）、関田節子、佐竹元吉（国立衛研、生薬部）医薬品研究, 32, 111-117 (2001)

メラトニン含むサプリメントのメラトニン含有量、重量偏差、崩壊・溶出試験等の品質を検討するため、液剤1検体、徐放剤1検体、カプセル剤4検体及び錠剤12検体を個人輸入、土産物及び通信販売により購入した。メラトニン含有量は、1検体でメラトニンの含有が確認されず、表示量に対して0~100%と検体間にばらつきがあり、含有量の平均は76±24%であった。カプセル剤は崩壊及び溶出試験にいずれも適合したが、錠剤は12検体中4検体で崩壊試験に適合せず、これらの検体では溶出試験にも適合しなかった。以上の結果から、メラトニン含有サプリメントでは含有量不足(50%以下)あるいは崩壊・溶出試験(溶出率2時間75%以上)に適合しないものが18検体6検体みられ、品質に問題のある製品があった。

フュアオイを含む健康茶に含まれるセンノシドの由来

小島尚、岸美智子（神奈川衛研、食品薬品部）、関田節子、佐竹元吉（国立衛研、生薬部）食衛誌, 42, 202-205 (2001)

健康茶に含まれるフュアオイの基原植物である*Malva verticillata* L.にセンナの指標成分であるセンノ

シドは含まれるか、更に、形態学的にセンナと類似するかを明らかにし、フュアオイを原料と表示された健康茶に含まれるセンノシドの由来を検討した。その結果、*Malva verticillata* L. にはセンノシド A 及び B は含まれないこと、更に、形態学的にもセンナ葉と区別できることが明らかになった。すなわち、フュアオイを原料と表示された健康茶に含まれるセンノシドはフュアオイに由来するものではなく、混入したセンナに由来するものであることが確認された。

Occurrence of clostridia in commercially available curry roux

[市販のカレールーにおける *Clostridium* 属菌の検出状況]

藤澤倫彦、相川勝弘、高橋孝則、山井志朗（神奈川衛研、食品獣疫部）、上田成子（女子栄養大学）食衛誌、42, 394-397 (2001)

市販の国産カレールー60検体についてボツリヌス菌およびウェルシュ菌を含めた *Clostridium* 属菌の検出状況を平板培養法、パウチ法ならびに増菌培養法の3種類の方法を用いて調査した。その結果、カレールー60検体中37検体（62%）より *Clostridium* 属菌が分離された。用いた検出法による検出率はそれぞれ平板培養法が0%，パウチ法が5%，増菌培養法が62%であった。このように用いた検出法の比較では、増菌培養法での検出率が他の検出法での検出率と比較してはるかに高かった。また、今回の調査ではボツリヌス菌は検出されなかったが、7検体（12%）からエンテロトキシン非産生性のウェルシュ菌が分離された。

Influence of butyric and lactic acids on the β -glucuronidase activity of *Clostridium perfringens*

[*Clostridium perfringens* の β -グルクロニダーゼ活性におよぼす酪酸および乳酸の影響]

藤澤倫彦、相川勝弘、高橋孝則、山井志朗（神奈川衛研、食品獣疫部）、渡辺浩一、窪田良彦、宮岡正明（東京医科大学第四内科）Lett. Appl. Microbiol., 32, 123-125 (2001)

ヒトの腸管由来 *Clostridium perfringens* の β -グルクロニダーゼ活性におよぼす酪酸および乳酸の影響を検討した。その結果、胆汁酸の存在しない条件下ではこれら有機酸の酵素活性におよぼす影響はみられなかったが、胆汁酸の存在下においてこれら両有機酸はインタクトセルの酵素活性を低下させた。このことは、高脂肪食の摂取によって引き起こされる大腸ガンの発生を有機酸が阻止することを示唆するものである。

河川水中のエストロゲン及びその抱合体の分析

伊藤伸一、上村 仁（神奈川衛研、生活環境部）、水道協会雑誌、70, 33-37 (2001)

都市河川に生息する魚類等の生殖異変の原因物質として、人畜由来の女性ホルモン（エストロゲン）に着目し、実態調査を行った。調査河川は、神奈川県内の鶴見川、境川、渋田川及び金目川の4河川で、女性ホルモンとして天然エストロゲンのエストロン（E₁）、17 β -エストラジオール（E₂）及びエストリオール（E₃）の3種を分析した。

E₁は<5～80ng/L、E₂は<5～11ng/L検出された。しかしE₃は全ての調査地点で検出されなかつた（10ng/L以下）。E₁とE₂が同時に検出された地点では、E₁がE₂の平均で約4.2倍量認められた。また、E₁及びE₂の存在形態は約80%が遊離体として存在し、残り約20%が抱合体であった。

外部精度管理実施機関における共通試料の品質管理について

伊藤伸一（神奈川衛研、生活環境部）、水道協会雑誌、71, 42-44 (2002)

水道水の安全性を保証するため、水質検査を実施する機関に対しては、正確で信頼性の高い検査データを出すことが要求されている。このため各検査機関は、計画的に自己精度管理及び内部精度管理を実施し、また外部精度管理を受け入れている。今回、外部精度管理における外部精度管理実施機関（実施機関）の役割の一つとして、精度管理用共通試料（共通試料）の品質管理の必要性を検討した。

共通試料は、調製直後から実施期間中（全参加機関が測定を終了するまでの期間）、一定の条件下で安定であることが求められているが、多くの場合、「安定だ」という漠然的な前提のもとで、精度管理が実施されていると考えられる。しかしながら、共通試料が途中で変化しないという保証はない。また変化したような場合には、参加機関が測定時点でいくら精度の高い測定を行っても、極端な場合、測定値が異常値として扱われ、参加機関の分析技術が低く評価される恐れも予想される。こうしたこと防ぐ一つの対策として、実施機関による共通試料の品質管理の実施を提案した。

津久井湖水中の窒素起源推定への安定同位体比の利用

上村 仁（神奈川衛研、生活環境部）、水道協会雑誌、71, 36-41 (2002)

窒素安定同位体比を用いて津久井湖水中の窒素の発生

源を推定する手法の開発を試みた。湖水中の窒素は湖水をロータリーエバポレーター及び凍結乾燥機で濃縮、乾固した後、封管燃焼法または EA/IRMS 法で測定することが可能であった。こうして測定された各試料の $\delta^{15}\text{N}$ 値を用いて津久井湖水中の窒素の供給源としての堆積物の寄与を算出したところ、27.4~64.8%となり、堆積物由來の窒素が湖の富栄養化に対して少なからず影響していることが示唆された。

BALB/3T3細胞を用いたコロニー形成試験法の河川水質評価への応用

浜村哲夫（神奈川環境科学セ），伏脇裕一，森 康明（神奈川衛研），水環境学会誌，24, 389-392 (2001)

河川水の汚染評価におけるコロニー形成試験の有用性について検討した。コロニー形成試験では実際の環境試料に対して良好な用量反応関係が得られた。Ames 変異原性試験との比較から、河川水中には細胞毒性とフレームシフト型の直接変異原性を合わせ持つ汚染物質が多く存在することが明らかとなった。また、化学的性状の異なる固相吸着剤を連結し河川水中の細胞毒性物質を分離吸着させることで、河川水中に存在する細胞毒性物質の化学的特性の一端を明らかにすることが可能となった。

Adsorption of pesticides and their biodegraded products on clay minerals and soils

[粘土鉱物及び土壤中への農薬及びその分解代謝物質の吸着特性]

伏脇裕一（神奈川衛研），浦野紘平（横浜国大），Journal of Health Science, 47, 429-432 (2001)

環境中での農薬の運命変化を予測するための基礎研究として、10種類の農薬及びその分解代謝物質について土壤及び粘土鉱物への吸着特性を検討した。それぞれの吸着等温線はフロイントリッヒの吸着等温式で整理することが可能であった。ペンタクロロニトロベンゼン、CNP 及びその分解代謝物質は土壤への吸着性は高かったが、イソプロチオランの吸着性は低かった。また、黒ぼく土壤やモンモリロナイトへの吸着性は高かったが、アロフェンやカオリナイトへの吸着性は低かった。

Trace Analysis of Microcystins in Environmental Samples

[環境試料中のミクロシスチンの微量分析]

原田健一（名城大），近藤文雄（愛知衛研），辻 清美（神奈川衛研，生活環境部）Journal of AOAC International, 84, 1636-1642 (2001)

従来用いられている ODS カートリッジによるクリーンアップ法では 肝臓組織や湖水等の複雑なマトリックス中の微量ミクロシスチンの分析は困難であった。そこで、イムノアフィニティーと ODS カートリッジを組み合わせてクリーンアップを行ったところ、複雑なマトリックスが効果的に除去され、肝臓中の微量ミクロシスチンの分析が可能となった。また、底質等固形試料中のミクロシスチンはオゾン酸化— GC/MS を用いることにより容易に分析できることが判明した。これらミクロシスチン分析法は様々な環境試料に十分適用し、環境中のミクロシスチンの挙動を正確に把握するためには有用な方法と考られた。