

神奈川県衛生研究所研究報告

第33号 (平成15年9月)

目次

総説

リケッチア感染症特につつが虫病診断法の現状と問題点

吉田芳哉

短報

2000-2002における手足口病、ヘルパンギーナ患者の発生動向およびウイルス検出状況

嶋 貴子, 石田裕子, 近藤真規子,
斎藤隆行, 渡邊寿美, 今井光信

ウイルス性食中毒の発生状況 (平成14年度)

原みゆき, 古屋由美子, 片山 丘, 今井光信

へい死野鳥の農薬分析法について

藤巻照久, 佐藤久美子, 岸美智子

農産物における残留農薬; メチダチオン・ピラゾホス・プロパルギッドの同時分析法について

渡邊裕子, 佐藤久美子, 藤巻照久,
渡辺貞夫, 岸美智子

食品中のサイクラミン酸分析法の比較と改良

山田利治, 土屋久世

水道原水への内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) 供給源としての底泥の評価

上村 仁, 辻 清美, 伊藤伸一

資料

ウエストナイルウイルスの検査体制について

斎藤隆行, 佐藤利明, 古屋由美子, 今井光信

最近10年間に実施した害虫獣等の検査結果

稲田貴嗣, 竹田 茂

食品汚染物残留調査結果 (平成14年度)

渡邊裕子, 佐藤久美子, 藤巻照久,
岸美智子, 佐藤修二, 生活衛生課

遺伝子組換え食品の分析結果 (平成14年度)

大森清美, 土屋久代, 岸弘子, 山田利治,
平山クニ, 佐藤修二, 生活衛生課

有症苦情に係るダイエット用健康食品の検査結果について

熊坂謙一, 宮澤真紀, 小島 尚, 土井佳代, 佐藤修二

他誌掲載論文抄録

研究報告編集委員会（平成15年度）

委員 長

益川 邦彦 （所 長）

委 員

白石 富夫 （副 所 長）

石渡 節子 （管 理 課）

長田 幸郎 （企画情報部）

尾上 洋一 （微 生 物 部）

佐藤 利明 （微 生 物 部）

藤巻 照久 （理 化 学 部）

桑原千雅子 （理 化 学 部）

日比 和美 （地域調査部）

神奈川県衛生研究所研究報告（略称：神奈川衛研報告）は、当所における研究業績の発表機関誌で原則として年1回発行しています。

この出版物に関するお問い合わせは、下記へお願いします。

〒 253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋 1-3-1
神奈川県衛生研究所 研究報告編集委員会
電話 0467-83-4400
FAX 0467-83-4457

総説

リケッチア感染症診断法の現状と問題点**—特に恙虫病について—**

吉田 芳哉

**The Current Situation of Diagnostic Technology of the Rickettsiology and Problem.
— Particularly, the Tsutsugamushi Disease —**

Yoshiya YOSHIDA

緒言

リケッチアは、かつてウイルスと細菌の中間的な微生物と考えられていたが、現在は、細胞寄生性のグラム陰性菌に近似している細菌と位置づけられている。しかし、リケッチアの多くは、無細胞の人工培地で増殖することはできず、シラミ、ノミ、マダニなどの節足動物を自然宿主として共生している。そしてこれらの動物を介して哺乳動物、鳥類、ヒトなどに感染する。リケッチアのうちおよそ10種類がヒトに病原性をもち、感染した場合に頭痛、発疹、リンパ節腫脹などを伴う熱性疾患いわゆるリケッチア症 (rickettsiosis) を惹き起す。これらのリケッチアは種特異的抗原の免疫学的解析によって発疹チフス群、紅斑熱群、恙虫病群の3群に分けられている。

現在、わが国に発生しているリケッチア症は、恙虫病、日本紅斑熱と最近発生が確認された発疹熱があるが、圧倒的に患者数が多いのは恙虫病で1990年には年間941人、1991年937人、をピークに徐々に減少しており、2002年では329人の患者が報告されている。ここではリケッチア症のうち恙虫病について述べる。

恙虫病患者の診断は、従来から臨床診断および病原体である *Orientia tsutsugamushi* (*O. tsutsugamushi*) の分離同定あるいは患者血清中の特異抗体の検出により行われてきた。*O. tsutsugamushi* 分離同定にはマウスや細胞を用いて多くの日数が必要であるため、免疫蛍光法、免疫酵素法、補体結合反応法など血清学的方法が主に診断に使

われてきた。著者らはこの *O. tsutsugamushi* の56kDa ポリペプチドをコードする遺伝子の塩基配列の一部を利用して、polymerase chain reaction (PCR) による *O. tsutsugamushi* DNA の検出および型別を可能にし、恙虫病の診断に利用できるようにした^{1,2,3)}。この方法により *O. tsutsugamushi* の分離ができなかった保存材料や、臨床症状から恙虫病を疑いながら、血清抗体が証明されず血清学的には診断できなかった血液から *O. tsutsugamushi* DNA が証明でき、恙虫病の診断が可能になった。またPCRは長期間保存された患者血液や急性期で抗体の認められない血液からも効率よく *O. tsutsugamushi* DNA が検出でき、本病の診断に有効である。

そこで、現在広く行われている、恙虫病患者の実験室診断法の現状について記述するとともに、当衛生研究所において実施しているDNA診断法の詳細について述べる。

感染と症状

O. tsutsugamushi の感染はリケッチアを保有しているツツガムシの幼虫が人に吸着し、口吻を通してリケッチアが注入された時にのみ成立し、ヒトからヒトへの感染は起こらない。この感染部位では、リケッチアが局所的に増殖し、発赤、水泡形成、痂皮化、潰瘍と変化する。この病変部がいわゆる刺し口といわれるもので、普通は一つであるが、まれに複数のこともあり、その出現部位は全身にわたる。しかし多くは柔らかい部位で下腿、陰部にあり、頭髮の中にみられることもある。リケッチアは刺し口の支配するリンパ節に到達し、リンパ節腫脹を起こし、各所で血管内膜炎を起こす。感染 (吸着) 後約7

～10日後から、全身倦怠、頭痛、食欲不振、関節痛などが起こり、39～40℃の高熱が続き、発熱に少しおくれ、身幹、顔面などに、不定形発疹があらわれる。適切な治療が行われないときは、往々にして播種性血管内凝固症候群（DIC）に陥り、死亡するおそれもある。治療には感染症治療薬の主流であるβ-ラクタム系やアミノ配糖体系の薬剤はまったく無効であるが、テトラサイクリン系薬剤かクロラムフェニコールはきわめて有効である。

このように恙虫病は感染初期に診断さえできれば確実に治る病気であり、早期診断治療が重要である。

検査の目的

恙虫病は病原体保有ツツガムシの吸着により感染し、日本紅斑熱は同じく病原体保有のダニ類によって感染するが、発疹の出現部位や刺口の形状は酷似し、病状経過などから確実な診断を下すことはできない。そこで、患者血液からのリケッチアの分離と同定、血清中の特異抗体の検出、患者血液からリケッチア特異的DNAの検出を行うことにより、確定診断が可能である。

検査法

a. 血清学的診断

リケッチア感染症の診断には、一般に患者血清中の特異抗体の検出が行われている。血清学的な診断としては、かつて補体結合反応（CF）⁴⁾とワイルフェリックス反応（WFR）が利用されていたが、現在では免疫蛍光法（IF）⁵⁾や免疫ペルオキシダーゼ法（IP）⁶⁾がこの目的のために多くの研究者によっておもに行われている。また最近ではビオチンアビジン蛍光抗体法⁷⁾、酵素抗体法（ELISA）⁸⁾、ドットプロット法⁹⁾などの方法も様々な研究者によって報告されている。

リケッチア症では臨床症状が現われるまでの潜伏期間は7～10日くらいと考えられ、血清中の抗体価の上昇は通常感染後10～14日後に認められる。このため急性期の抗体価は低い場合が多いので、確定診断には急性期の採血から1～2週間後に再び採血し、抗体価の上昇を比較確認する必要がある。さらに、IgM抗体とIgG抗体それぞれの定量を行うことを薦めたい。

紅斑熱群や発疹チフス群はそれぞれ群特異的な強い共通抗原が存在するので、それぞれ代表の1つの株で診断可能である。しかし、恙虫病群リケッチアは群特異的な抗原性よりも株特異的な抗原性が強く表現される傾向にあるため、少なくともGilliam, Karp, Katoの標準3株以外にその地方で流行している分離株¹⁰⁾の使用を薦める。

1) ワイル・フェリックス反応（WFR）

WFRは、変形菌であるプロテウス菌のO抗原を用い

た凝集反応である。この反応系は、後に述べる特異的血清反応法がまだ確定していなかった時代から、広くリケッチア感染症の診断に利用されてきた血清診断法である。これに使用する抗原は、購入することが可能である。

a) 術式

生理食塩水で10倍希釈した非働化被検血清を2倍階段希釈し、それぞれ等量の抗原を加えて、37℃で2時間反応、4℃で一晩静置したものを肉眼で判定する。

b) 判定と問題点

凝集像の強さを対照の陰性血清と比較して表わす。原理的には発疹チフス群の多糖体抗原とプロテウス菌の間にある共通抗原と理解されているが、*O. tsutsugamushi*は多糖体を持たず、OXKとは共通抗原が無いことが判明した¹¹⁾。このように、WFRの結果を過信すべきではないが、操作が簡単なことから、スクリーニングテストの1つとして利用する意味はあると思われる。

2) 補体結合反応（CF）

CFは、リケッチア症の血清診断法として重要な方法として位置づけられていたが操作が複雑で感度が低く、かつIgM抗体の測定ができないことなどから、その主役をIFやIPに譲らざるを得なかった。CFに用いる抗原は、わが国では*O. tsutsugamushi*に限って市販品があるがそれ以外のリケッチア抗原は、自家製に頼らざるを得ない。

a) 術式

非働化した被検血清25μl、調整した抗原液25μl、補体50μlをよく混合し、4℃で1晩静置し、溶血素50μlを加えて37℃30分間反応させて溶血度を測定する。

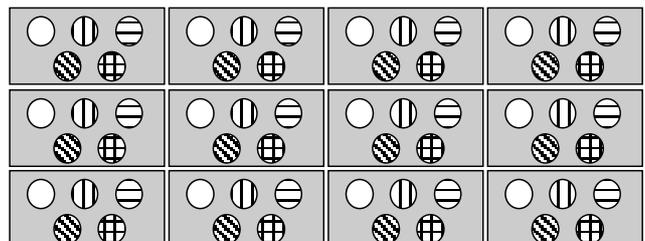
b) 判定と問題点

判定は、吸光度などで客観的に測定可能であるが、抗補体反応などが判定を狂わせる場合がある。

3) 免疫蛍光法（IF）と免疫ペルオキシダーゼ法（IP）

この方法は、抗体検査では最も確実で迅速な方法である。また、現在わが国で流行しているリケッチア症の全ての診断に有効である。

抗体検出のためのIFあるいはIP用の抗原作成は、マウス腹膜あるいは感染細胞の塗抹抗原を使用する方法が



Pattern of spotted prototype antigens on slide glass.
○: Gilliam, ⊕: Karp, ⊖: Kato, ⊙: Kawasaki, ⊕: Kuroki
Fig. 1 *Orientia tsutsugamushi* antigen slide for IF.

ある。ここでは、われわれが日常業務で行っている、培養細胞を用いた感染細胞の塗抹抗原を用いた方法を説明する。この方法は、容易に多量の抗原が得やすく、1枚のスライドガラス上に複数の抗原を塗布できることから、一度に複数の抗原に対する反応が同時に観察できるなどの利点がある(図1)。リケッチアの培養には株化細胞のL-929またはVero細胞を使用し、感染細胞が90%以上に達したものを塗抹標本とする。スライドガラス上に複数の抗原を塗抹して、冷風で乾燥後、冷アセトンで10分間固定し、標本箱に入れ使用時まで -80°C に保存する。この塗抹標本は、1年間は使用可能である。

a) 術式

- ① 凍結保存した抗原塗抹スライドガラスを取り出し冷風で乾燥する。PBS(-)で10倍希釈した被検血清を2倍階段希釈し、各々の希釈についてIgM抗体、IgG抗体用の抗原塗抹標本に約10-20 μl ずつ載せ、湿潤箱に入れて 37°C 40分間反応する。
- ② 反応後、PBS(-)でスライドガラス上の血清を洗い流し、染色壺に入れて約10分間ずつPBS(-)を交換して3回洗浄する。
- ③ 乾燥後に最適比に希釈した抗ヒトIgGおよびIgM蛍光色素(FITC)標識抗体またはペルオキシダーゼ標識抗体(ウサギまたはヤギ)をそれぞれ20 μl 載せ、湿潤箱に入れて 37°C 40分間反応する。
- ④②の操作を繰り返す。
- ⑤ IFはグリセリン緩衝液(pH9.5炭酸緩衝液:グリセリン=1:9)を適量滴下し、カバーガラスで封入する。

IPはスライドガラスを蒸留水で洗浄後ジアミノペンチジン四塩酸塩に過酸化水素を加えた酵素反応基質液に入れて水洗、乾燥してダイアテックで封入する。

- ⑥ IFは蛍光顕微鏡のUV励起で細胞内の蛍光を発するリケッチアを、またIPは光学顕微鏡下で細胞外にある褐色をしたリケッチアをそれぞれ200~400倍で観察する。

b) 判定及び問題点

各々の抗原で陽性と判定できた血清の最高希釈倍数をその検体の抗体価とする。原則的には急性期と回復期の抗体価で4倍以上の上昇を認めた場合に陽性とするが、急性期でもIgM抗体価が40-80倍以上ある場合には、陽性と判断できることもある。IF、IPいずれの方法でも観察者の主観が入る上に、判定には熟練を要する。これらの検査で得られた結果は、免疫学的状態から以下のように判定する。

- ① IgG抗体とIgM抗体のいずれも陰性の場合;リケ

ッチアに感染していないか、感染の初期である。

- ② IgM抗体が低く、IgG抗体が陰性の場合;感染初期の可能性はある。もしその後抗体の上昇がない場合は、非特異抗体と考える。
- ③ IgG抗体とIgM抗体がともに高い場合;最近のリケッチア感染を示している。
- ④ IgM抗体が低く、IgG抗体が高い場合;感染初期に上昇したIgM抗体が低下し、IgG抗体のみが持続している場合かあるいは再感染の可能性はある。
- ⑤ 中程度のIgG抗体がありIgM抗体が陰性の場合;過去においてリケッチアに感染した可能性がある。

b. リケッチアの分離

リケッチア症の確定診断には血清抗体価の測定以外にリケッチアの分離をする方法がある。分離に使う材料は、患者の急性期の血液か剖検の脾臓、肝臓、リンパ節などの材料がよい。得られた新鮮な材料をマウスに接種し、感染増殖させ細胞で増殖する方法が効率的である。しかし、リケッチアの分離は、バイオハザードの設備が必要であり無い場合は実験出来ない。

1) マウスを用いた分離法

治療前の有熱期の患者血液を有毛マウスの腹腔内に接種し、リケッチアの分離を行う。しかし、ほとんどのリケッチアはマウスに対して弱毒であり、症状を現わすことは稀である。このため、リケッチアの分離率を高める目的で、ヌードマウス¹²⁾や免疫抑制剤¹³⁾(サイクロフォスファミド等)処理を施した有毛マウスを用いる。

リケッチアが増殖した場合には、接種後1週間前後にマウスの行動は緩慢となり、うずくまるようになる。また腹部が膨れて下痢を伴う。そのまま放置すれば2週間ほどで死亡するので、時期をみて増殖したリケッチアの同定を行う必要がある。また、発症しない場合でも2週間ごとに接種マウスの臓器を継代培養すると分離効率が上がる。

2) 培養細胞による増殖法

マウスで分離したリケッチアは、様々な実験に供するために、できるだけ細胞での増殖を行うと便利である。感染を起こしたマウスの脾臓、肝臓を無菌的に取り出し、乳鉢でよくすりつぶし、予め準備したL-929、Veroなどの株化細胞に接種してリケッチアの増殖を行う。

3) 免疫学的同定法

マウスや細胞で培養したリケッチアの増殖状態や型別は、特異的な抗体を用いたIF、IPにより調べる。最近では各種リケッチアに対する群特異的、型特異的なモノクローナル抗体¹⁴⁾が入手できるので、同定が容易となった。また、分離したリケッチアを免疫原としてモノクローナル抗体を作成し、より詳細な抗原性の解析¹⁰⁾も可能となった。

c. DNA 診断法

1) PCR

a) プライマー

Gilliam 株と Karp 株の 56kDa のポリペプチドをコードした DNA 塩基配列より、相同性が高く、約 1,000 base pair (bp) の DNA の合成が可能と思われる配列部分を一对選び、プライマー 34 (p34) とプライマー 55 (p55) を合成した。

この p34 と p55 によって合成される DNA 塩基配列から、Gilliam 株と Karp 株に変異の著しい領域をはさむように、2 株に相同性のある一对のプライマー 10 (p10) とプライマー 11 (p11) を合成し、*O. tsutsugamushi* DNA 検出の nested PCR (2nd PCR) に用いた。

型別用のプライマーは、*O. tsutsugamushi* Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki の 5 株の DNA 塩基配列を比較検討して、それぞれの株に特異的と思われる配列部分を選別合成した。Gilliam 株特異的なプライマー G と p10, Karp 株特異的なプライマー KP と p10, Kato 株特異的なプライマー KT と p10, Kawasaki 株特異的なプライマー KW と p11, Kuroki 株特異的なプライマー KR と p10 の 5 対のプライマーを型別用のプライマーとして 2nd PCR を行った。

b) PCR 条件と増幅 DNA 検出

反応容量は 50 μ l を標準とした。反応液の組成は 10mM Tris \cdot HCl (pH8.8), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.2mM dGTP, 0.2mM dATP, 0.2mM dTTP, 0.2mM dCTP, 0.2 μ M の各プライマー, 1.25 unit Taq ポリメラーゼでこれを PCR mixture とし、5 μ l の鋳型 DNA を加えた。DNA 増幅反応は熱変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒, アニール 57 $^{\circ}$ C 2 分, 相補鎖の合成 70 $^{\circ}$ C 2 分を 1 サイクルとし、30 サイクルを行った。2nd PCR は、1st PCR 産物 5 μ l を PCR mixture に加えさらに 30 サイクルを行った。PCR によって増幅された DNA は 1.5% アガロースゲルによる電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色により検出した。

2) ジゴキシゲニン標識プローブを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法

a) ジゴキシゲニン標識プローブの作製

精製 *O. tsutsugamushi* Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki 株から DNA を抽出し、鋳型として各株特異的な型別プライマーにより PCR を行った。基質としては 0.2mM の dGTP, dATP, dCTP, 0.13mM dTTP, 0.07mM ジゴキシゲニン標識 dUTP を用いた。PCR 産物をエタノール沈澱させ、乾燥し、Tris \cdot HCl-EDTA (10mM Tris \cdot HCl, 1mM EDTA : TE) 緩衝液 (pH8.0) 100 μ l に溶解しプローブとした。

b) サザンブロットハイブリダイゼーション法

PCR 産物を電気泳動により分画後、ナイロン膜に移し、

変性溶液を加え振とうさせ、中和溶液で 2 回洗浄し、紫外線で DNA をナイロン膜上に固定した。膜をシールドバック中にいれ、ハイブリダイゼーション溶液を加え、68 $^{\circ}$ C で 4 時間プレハイブリダイゼーションした。プローブを 95 $^{\circ}$ C 10 分間熱変性させハイブリダイゼーション溶液に加え、68 $^{\circ}$ C で 18 時間ハイブリダイゼーションさせた。反応後ナイロン膜を洗浄し、続いて酵素標識抗体 (抗ジゴキシゲニン, アルカリホスファターゼ標識抗体) を反応させ、Nitroblue tetrazolium chloride と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate を基質として発色反応を行った。

3) 培養 *O. tsutsugamushi* からの DNA 検出と型別

a) 試料の調整

それぞれ L929 細胞で継代した *O. tsutsugamushi* Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki 株, *Rickettsia. rickettsii* (*R. rickettsii*), *Rickettsia sibirica* (*R. sibirica*) および L929 細胞浮遊液 1ml に 10% SDS, プロテナー K (2mg/ml), 10 倍濃度 Tris \cdot HCl-EDTA (100mM Tris \cdot HCl, 10mM EDTA : pH8.0) 緩衝液をそれぞれ 1/10 量加えて 55 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、タンパク質を分解した。この反応液にフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 混合液を等量加え除タンパク操作を 2 回繰り返したのち、上清にクロロホルム : イソアミルアルコール (24 : 1) 混合液を等量加えフェノールを除き、上清に 1/20 量の 3M 酢酸ナトリウム及び 2 倍量の冷エタノールを加え、-80 $^{\circ}$ C で 30 分間静置させた。その後 15,000rpm で 10 分間遠心し、上清を吸引除去し、デシケーターで乾燥後 TE 緩衝液 100 μ l で溶解したものを鋳型 DNA 溶液とした。

b) DNA の検出と型別

培養 *O. tsutsugamushi* 5 株からそれぞれ抽出した DNA を鋳型として PCR を試みたところ、p34 と p55 による 1st PCR の 30 サイクルで、Gilliam 株 1003bp, Karp 株 1030bp, Kato 株 1003bp, Kawasaki 株 1003bp, Kuroki 株 1026bp の PCR 産物が検出され、さらにこれらの 1st PCR 産物を鋳型として p10 と p11 を用いて 30 サイクル PCR を行ったところ、Gilliam 株 481bp, Karp 株 507bp, Kato 株 495bp, Kawasaki 株 481bp, Kuroki 株 501bp の PCR 産物が検出された (図 2)。しかし *R. rickettsii*, *R. sibirica*, L929 細胞で DNA の増幅は認められなかった。この検出用プライマーにより *O. tsutsugamushi* 5 株の検出が可能であることが判明した。

また検出用のプライマーを用いて検出感度を検討した。p34 と p55 によって増幅した DNA 断片を様々な濃度に調整し鋳型として p10 と p11 の検出限界を算定したところ、2 コピーの *O. tsutsugamushi* DNA が試料中に存在すれば 2nd PCR で検出可能であることが示された。

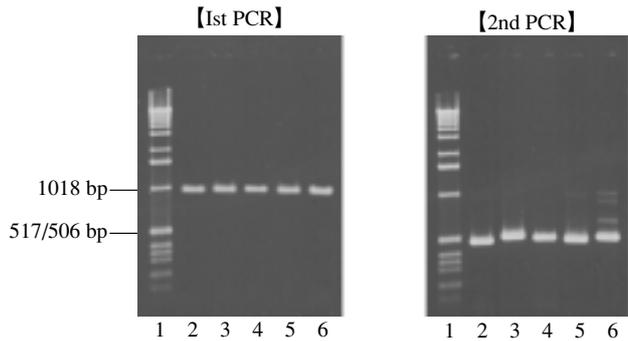


Fig. 2 The detection of *Orientia tsutsugamushi* DNA by PCR
 1.5% agarose gel electrophoresis
 lane 1: 1-kb DNA Ladder lane 2: Gilliam strain
 lane 3: Karp strain lane 4: Kato strain
 lane 5: Kawasaki strain lane 6: Kuroki strain
 1st PCR is common region primers, 2nd PCR is nested PCR

p34, p55のプライマーを用いて1st PCRで増幅させた *O. tsutsugamushi* 5株のPCR産物を鋳型として型別用プライマー5対による2nd PCRでGilliam株は407bp, Karp株は230bp, Kato株は242bp, Kawasaki株は523bp, Kuroki株は220bpのそれぞれに特異的なDNAが増幅された(図3). これらの株特異的に増幅されたDNAは、ハイブリダイゼーション法により各株特異的なプローブのみがハイブリダイズし、株特異的であることが示された. 型別プライマーを使用することにより、感染株の型別が可能であった.

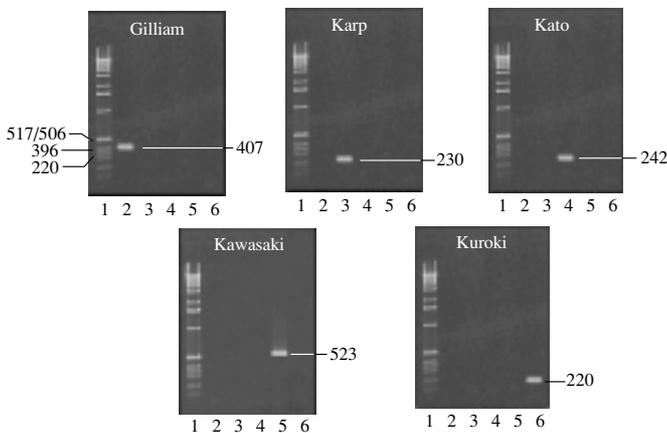


Fig. 3 Amplified DNA by nested PCR with serotype specific primer using template DNA from *Orientia tsutsugamushi* strains

4) 患者血液からのDNA検出および型別

a) 試料の調整

約0.5mlの血液から得られた血ぺいに精製水0.25mlを加えホモジナイザーでよくすりつぶした. この溶液を前記の細胞浮遊液と同様にタンパク質分解, 除タンパク, エタノール沈澱の操作を行い, 乾燥後TE緩衝液50 μ lで溶解したものを鋳型DNA溶液とした.

b) DNAの検出と型別

*O. tsutsugamushi*が分離同定された患者血ぺい7検体からDNAを抽出しPCRを行ったところ, 1st PCRではすべての検体においてDNAの増幅は認められなかったが, 2nd PCRにより *O. tsutsugamushi* DNAの増幅が7検体すべてに認められた. また健常人の血ぺい3検体では2nd PCRでも *O. tsutsugamushi* DNAの増幅は認められなかった. この結果より2nd PCRにより患者血ぺいから *O. tsutsugamushi* DNAの検出が可能であることが示された.

また患者血ぺい7検体から *O. tsutsugamushi*の型別を行ったところ, Kawasaki型5例, Kuroki型2例に型別され, 分離同定した株と一致した.

このように患者血ぺいから *O. tsutsugamushi* DNAをPCRで高感度に検出し, 型別できることが証明できた.

表1は, 1997年から1999年までの3年間の患者の血清診断法についてIFとPCRとの成績を示したものである. このように, IFの診断で81例中54例が陽性と確定でき, PCRによりさらに5例の患者が陽性となり, 合計59例(73%)の患者の陽性が確定できた.

Table. 1 Number of patients as to the examination

Year	Number of examination	Detection number of Positive			Number of confirmed patients
		Only IF	IF and PCR	Only PCR	
1997	17	3	6	0	9
1998	21	4	10	1	15
1999	43	5	26	4	35
Total	81	12	42	5	59

おわりに

PCRを利用した *O. tsutsugamushi*の型別は病原体の分離ができない施設環境においてはもちろん, 分離が困難と思われる微量な検体や長期間保存した検体からも簡便に型別できる有効な診断法である.

また *O. tsutsugamushi*を媒介するツツガムシの一虫体よりPCRにより *O. tsutsugamushi* DNAを直接検出できることを見いだした. このことは *O. tsutsugamushi* 陽性のコロニーを短時間にかつ高感度に検出でき, 恙虫病の予防対策に役立つと考えられる.

著者らは恙虫病の患者の血液を利用したDNA診断により, 感染 *O. tsutsugamushi*の株を正確に解析する手段を確立した. この技術と免疫学的方法を組み合わせることにより, 恙虫病の診断及び予防に寄与できるものと思われる.

(平成15年8月14日受理)

謝辞

神奈川県衛生研究所における恙虫病の診断技術向上と新技術の確立に助言をいただき, 多大な貢献をいただき

した古屋由美子博士，片山 丘博士に心より謝意を申し上げます。

文 献

- 1) Furuya, Y., Yoshida, Y., Katayama, T., Kawamori, F., Yamamoto, S., Ohashi, N., Tamura, A. & Kawamura, A. Jr. : Specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29** : 2628-2630, 1991.
- 2) Furuya, Y., Yoshida, Y., Katayama, T., Yamamoto, S., & Kawamura, A. Jr.: Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **31** : 1637-1640, 1993.
- 3) 吉田芳哉, 古屋由美子, 片山丘, 海保郁男, 山本正悟. Nested PCRによる *Rickettsia tsutsugamushi* DNAの検出と型別, *感染症誌*, **68**, 601-606, 1994.
- 4) Shishido A, et al : Strain variation of *Rickettsia tsutsugamushi* in complement fixation test. *Japan J. Med. Sci. Biol.* **17** : 59-72, 1964.
- 5) 山本正悟 : つつが虫病の臨床と診断.血清診断の各種—その特性と評価, 蛍光抗体法.臨床とウイルス, **12** : 270-274, 1984.
- 6) 須藤恒久 : わが国における最近のつつが虫病の現状と早期迅速診断—特に免疫ペルオキシダーゼ反応による三型 IgG, IgM 抗体の完全同時測定法について—. *臨床とウイルス* **11** : 23-30, 1983.
- 7) Yamamoto S et al : Indirect immunofluorescence and avidin-biotin complex method. Meeting of the task force on the serological diagnosis of Tsutsugamushi disease (scrub typhus). Reginal Office for the Western Pacific, W. H. O., Manila, Philippines. pp.30-31, 1987.
- 8) Furuya Y et al: Use of monoclonal antibodies against *Rickettsia tsutsugamushi* Kawasaki for serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **29** : 340-345, 1991.
- 9) 多村憲ほか : ドットブロット法による恙虫病診断法の検討. *感染症学雑誌* **64** : 704-714, 1990.
- 10) 兼光望ほか : つつが虫病リケッチアに対するモノクローナル抗体の性状と抗原の解析. **61** : 819-829, 1987.
- 11) Amano K et al : Deficiency of peptidoglycan and lipopolysaccharide components in *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect. Immun* **55** : 2290-2292, 1987.
- 12) Murata M, Kawamura A : Restoration of infectivity of *Rickettsia tsutsugamushi* to susceptible animals by passage in athymic nude mice, *Jpn. J. Exp. Med* **47** : 385-391, 1977.
- 13) Tachibana Y, Kobayashi Y : Effect of cyclophosphamide on the growth of *Rickettsia sennetsu* in experimentally infected mice, *Infect. Immun.* **12** : 625-629, 1975.
- 14) Murata M et al : Production and characterization of monoclonal strain-specific antibodies against prototype strains of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Microbiol. Immunol.* **30** : 599-610, 1986.

短報

2000—2002年における 手足口病，ヘルパンギーナ患者の 発生動向およびウイルス検出状況

嶋 貴子¹，石田裕子²，近藤真規子¹
斎藤隆行¹，渡邊寿美¹，今井光信¹

Sentinel Surveillance Reports and Isolation of Viruses from Hand, Foot and Mouth Disease and Herpangina Cases Which Prevailed in Kanagawa Prefecture from 2000 to 2002

Takako SHIMA¹，Yuko ISHIDA²，
Makiko KONDO¹，Takayuki SAITO¹，
Sumi WATANABE¹，and Mitsunobu IMAI¹

はじめに

手足口病およびヘルパンギーナは，4歳位までの幼児を中心としたウイルス性疾患であり，毎年流行のピークが夏季に見られる。手足口病は口腔粘膜および手や足などに現れる水疱性発疹を主症状としており，A群コクサッキーウイルス16型（CA16）またはエンテロウイルス71型（EV71）感染が主な病因となっている¹⁾。ヘルパンギーナは口腔粘膜に現れる水疱性発疹と発熱を特徴とする急性ウイルス性咽頭炎であり，流行性のもはA群コクサッキーウイルス（CA）感染が主な病因となっている²⁾。どちらの疾患も年によって流行するウイルスが入れ換わり，流行規模にも変化が見られる。

神奈川県感染症情報センターでは1999年4月に施行された「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」に基づいて行なわれている感染症発生動向調査において，手足口病およびヘルパンギーナともに4類定点把握疾患として定点医療機関から患者発生報告を受け，流行状況の解析を行なっている。また衛生研究所微生物部では，定点医療機関から得られた患者検体を用いて起因ウイルスの分離・型別を行ない，流行ウイルスの調査を行なっている。今回，神奈川県域（以下県域と

略）における2000—2002年の患者発生動向調査（横浜市，川崎市を除く）およびウイルス検出状況（横浜市，川崎市，横須賀市，相模原市を除く）のデータを解析すると共に，全国データを用いて流行状況の比較を行ったので報告する。

調査方法

1 患者発生動向調査

神奈川県感染症発生動向調査における定点医療機関からの患者報告数を「定点あたり報告数」として週別に集計した。全国における定点あたり報告数データは，国立感染症研究所感染症情報センター発行の感染症週報（IDWR）から引用した。

2 ウイルス分離・同定

県域の小児科定点等医療機関から得られた手足口病およびヘルパンギーナ患者の咽頭拭い液をRD-18s，HeLa，GMK，HEp-2細胞および哺乳マウスに接種し，ウイルス分離を実施した。分離ウイルスの同定は中和用抗血清および免疫腹水を用いて，中和反応または補体結合反応により行なった。全国におけるウイルス検出状況は，国立感染症研究所感染症情報センター発行の病原微生物検出情報（IASR）から引用した。

結果および考察

1 手足口病患者の発生動向および患者からのウイルス検出状況

県域における手足口病患者の定点あたり報告数の週別推移を図1-Aに，全国における週別推移を図1-Bに示した。県域では，2000年に大規模な流行が見られたが，2001年の流行は極めて小さく，2002年に再び大きな流行が見られた。一方全国では，2000年は県域同様，大規模な流行が見られ，2001年にも中規模の流行があり，2002年の流行は小規模であった。即ち，県域における流行と全国での流行状況に違いが見られることから，手足口病の流行には地域性のある可能性が示唆された。

県域において手足口病患者検体から分離されたウイルス株数を表1，分離ウイルス株の割合を図2-A，全国での分離ウイルス株の割合を図2-Bに示した。分離ウイルス株の割合を見ると，2000年は県域，全国ともにEV71が多く分離されており，2000年の主流ウイルスはEV71であることが分かった。一方，2001年と2002年には，県域，全国ともにCA16が最も多く分離された。上記のように2002年は全国の流行が小規模であったのに対し，県域での流行は大規模であったが，その主流ウイルスはCA16であり，前年に全国で見られた中規模程度の流行の主流ウイルスと同じであることが分かった。県域にお

1 神奈川県衛生研究所 微生物部

〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

2 神奈川県衛生研究所 管理課（元企画指導室）

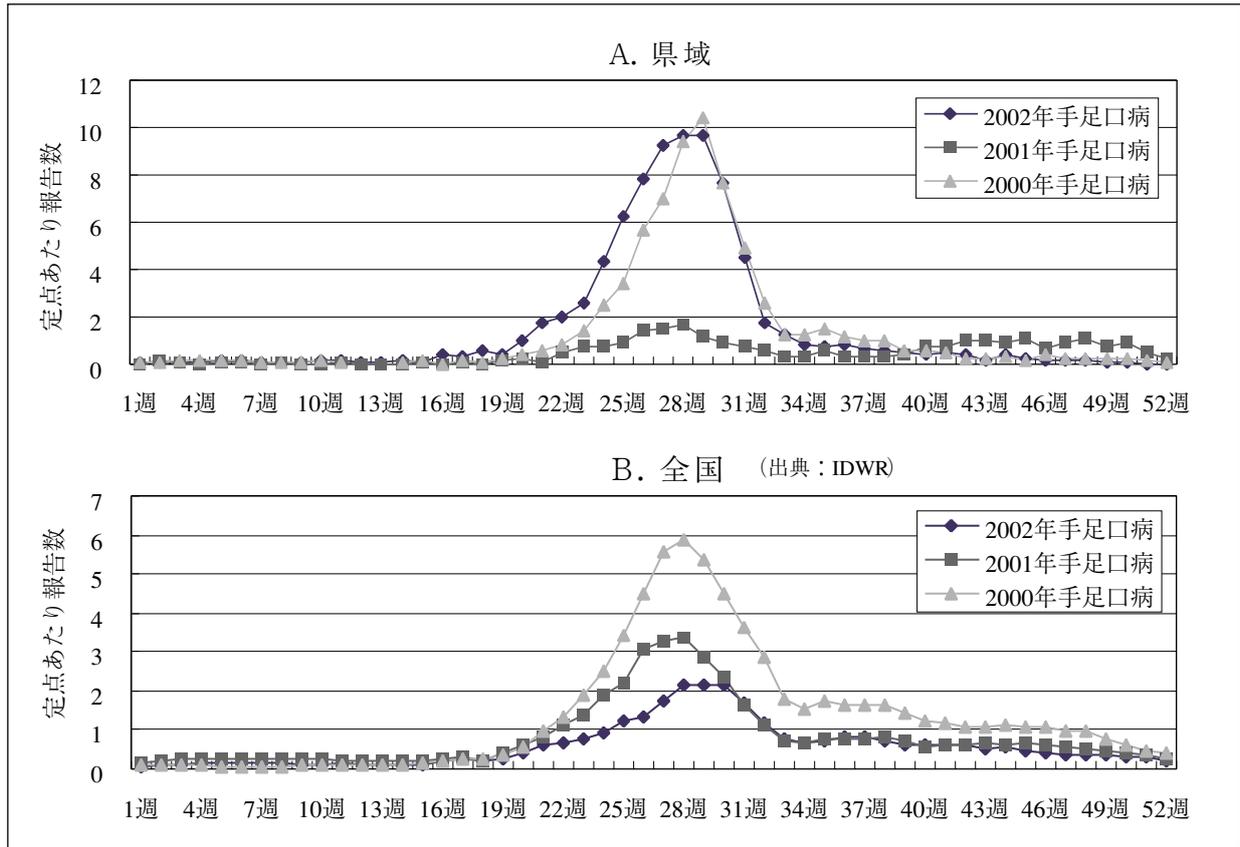


図1 2000－2002年 手足口病 定点当たり報告数週別推移

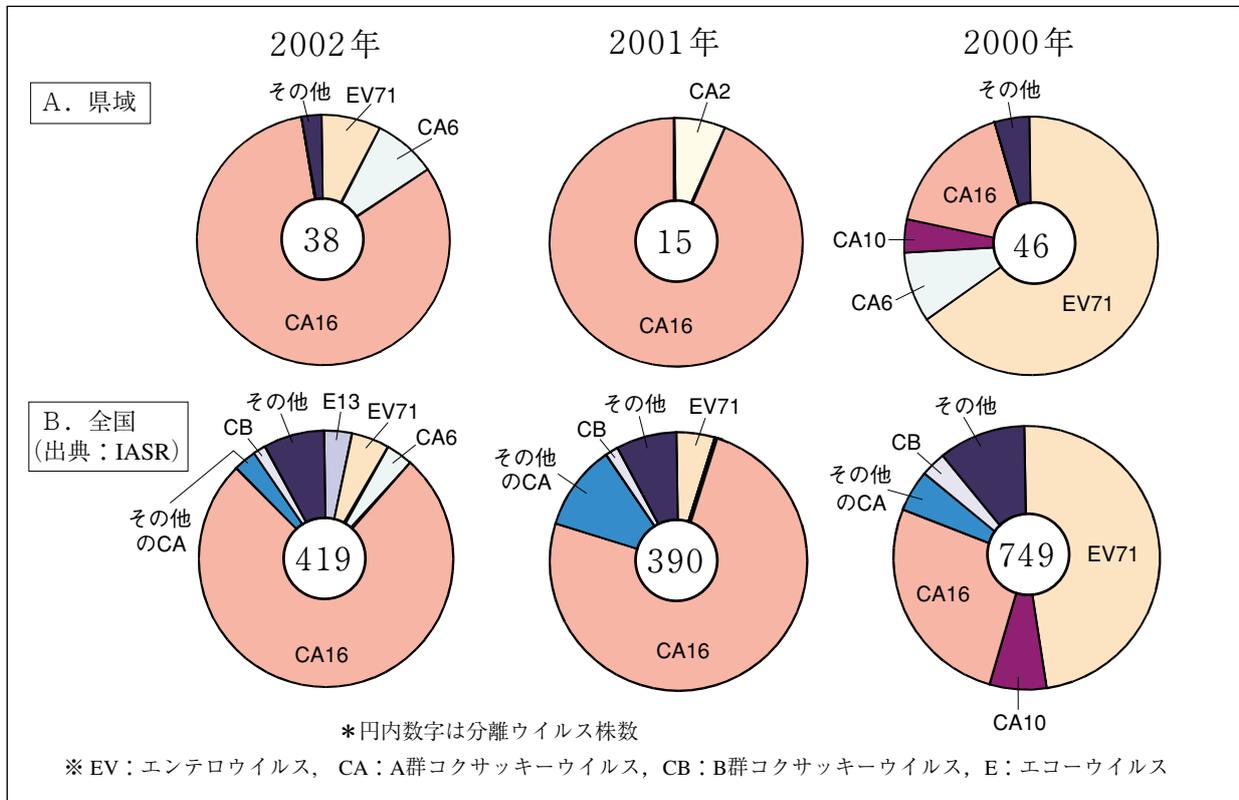


図2 手足口病患者から分離されたウイルス

いては、2001年の流行が全国に比べ小規模であったため、CA16に対する抗体を持った幼児の割合が少なくなっていたと推測され、このことが2002年の県域でのCA16による流行につながったものと考えられた。

表1 手足口病患者検体から分離されたウイルス株数(県域)

分離ウイルス	2002年	2001年	2000年
EV71	3		30
CA16	31	14	8
CA10			2
CA2		1	
CA6	3		4
E13	1		
Ad2			1
Ad5			1
-----	-----	-----	-----
分離数	38	15	46
陰性	14	9	22
検体数	52	24	68
分離率(%)	73	63	68

※EV：エンテロウイルス CA：A群コクサッキーウイルス
E：エコーウイルス Ad：アデノウイルス

2 ヘルパンギーナ患者の発生動向および患者からのウイルス検出状況

県域におけるヘルパンギーナ患者の定点あたり報告数の週別推移を図3-Aに、全国におけるヘルパンギーナ患者の定点あたり報告数の週別推移を図3-Bに示した。県域、全国ともに、2000年と2001年は大規模な流行、2002年は中程度の流行と、同様の流行状況を示した。

県域におけるヘルパンギーナ患者検体からの分離ウイルス株数を表2、分離ウイルス株の割合を図4-A、全国での分離ウイルス株の割合を図4-Bに示した。2000年では、県域での分離ウイルスはCA6、CA4が多かったのに対し、全国ではCA10が最も多かった。2001年では、県域ではCA4、CA5、CA2の順に多かったのに対し、全国ではCA4、CA2、CA8の順に多かった。2002年では県域、全国ともにCA4、CA6が多かった。県域と全国において流行株が異なる年があるが、ヘルパンギーナの病因となるCAの血清型が多いことから、地域によって毎年、主流ウイルスの血清型が入れ替わっているものと思われる。また2002年においては、一度ヘルパンギーナを罹患した幼児が、再度ヘルパンギーナを罹患する例が4例見られ、うち1例からはCA16とCA4が検出された。このことから血清型の異なるウイルスに感染することにより、同一人が複数回ヘルパンギーナを発症することが示唆された。ヘルパンギーナの場合には、毎年一定規模以上の流行がみられるが、その要因の一つとして上記の理由が考えられた。

表2 ヘルパンギーナ患者検体から分離されたウイルス株数(県域)

分離ウイルス	2002年	2001年	2000年
CA2		6	
CA4	4	7	8
CA5		7	2
CA6	3		9
CA8	1		
CA10			6
CA16	2		
CB2	1		
CB5		4	
E13	1		
Ad1	(1)*		1
HSV-1	1	2	2
Polio1+2		1	
-----	-----	-----	-----
分離数	13(1)	27	28
陰性	15	1	9
検体数	28	28	37
分離率(%)	46	96	76

※CA4との重複感染

※CA：A群コクサッキーウイルス

CB：B群コクサッキーウイルス

E：エコーウイルス Ad：アデノウイルス

HSV：単純ヘルペスウイルス Polio：ポリオウイルス

まとめ

手足口病およびヘルパンギーナは基本的には予後が良好な疾患であるが、手足口病を引き起こすEV71は無菌性髄膜炎を併発することもあり、死亡例も報告されている³⁾。また急性脳症患者からCA16やCA6とみられるウイルス株が検出されたという例も報告されており^{4) 5)}、毎年の流行状況および流行株の解析は、疾病の流行を監視する上で極めて重要である。今後も感染症発生動向調査およびウイルス分離調査を継続し、経年的な流行状況の把握に努めていきたい。

(平成15年8月14日受理)

謝辞

本調査を実施するにあたり、多大なご協力を頂きました各医療機関の先生方および県衛生部保健予防課、また貴重なデータを頂きました国立感染症研究所感染症情報センターの皆様に深謝いたします。

文献

- 1) 国立感染症研究所 感染症情報センター：感染症の話「手足口病」, 感染症発生動向調査感染症週報, **3** (27), 8-10 (2001)
- 2) 谷口清洲：感染症の話「ヘルパンギーナ」, 国立感染症研究所 感染症発生動向調査感染症週報, **5** (8), 10-11 (2003)

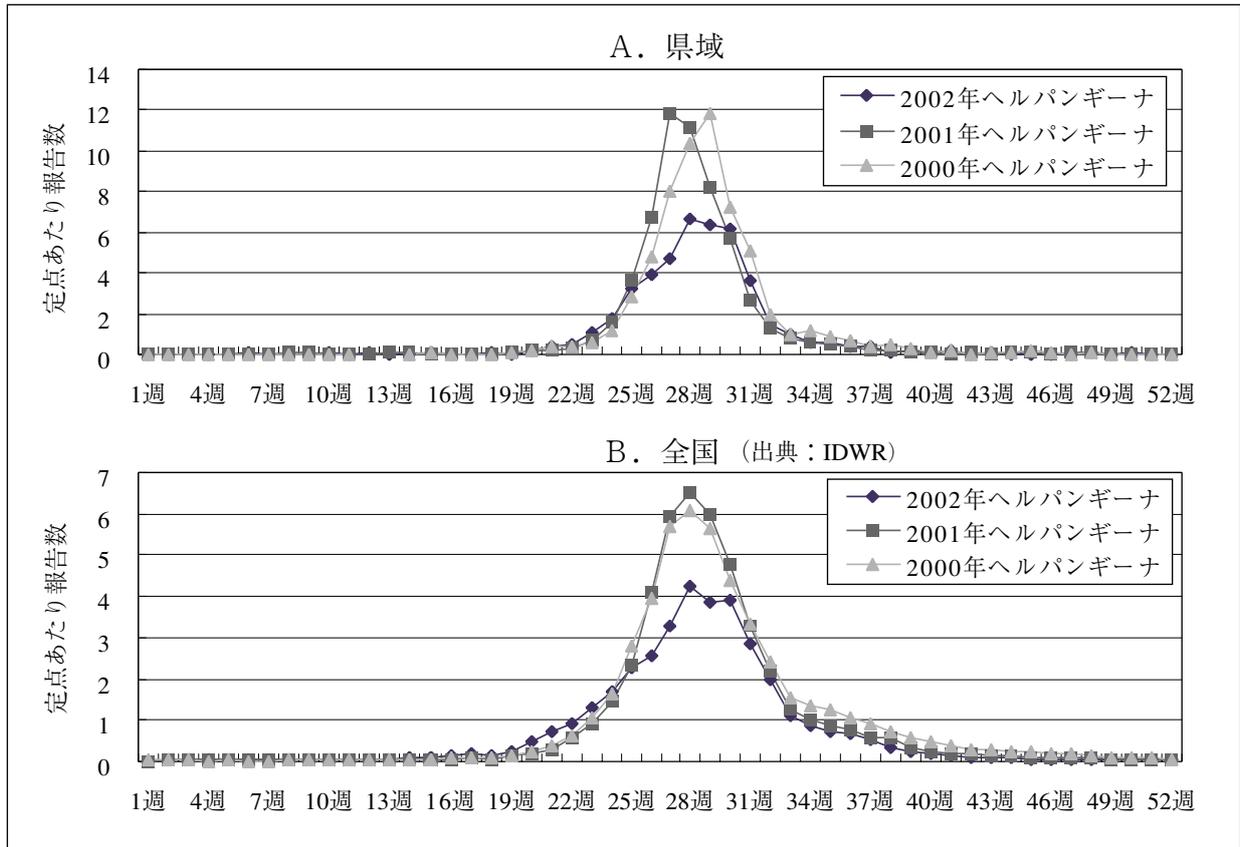


図3 2000-2002年 ヘルパンギーナ 定ポイントあたり報告数週別推移

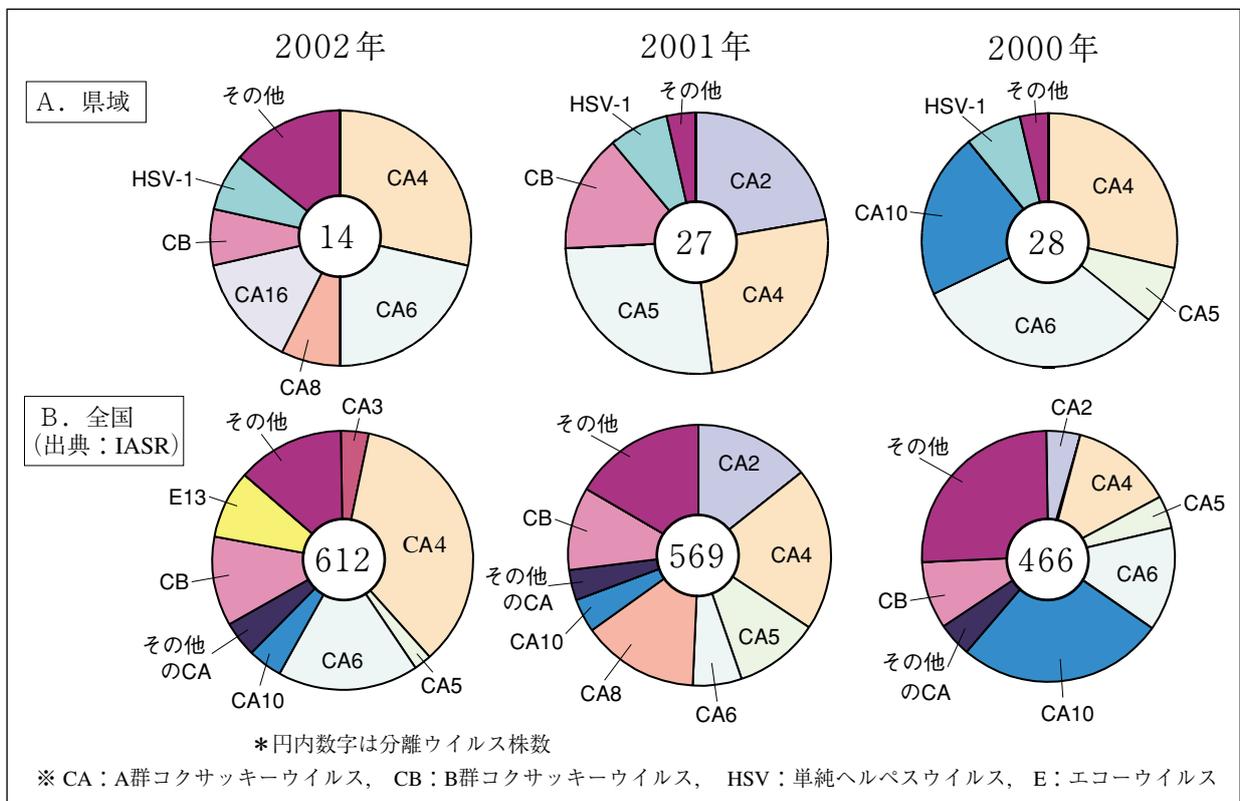


図4 ヘルパンギーナ患者から分離されたウイルス

- 3) 篠原美千代, 内田和江, 島田慎一, 瀬川由加里, 星野庸二: 埼玉県における2002年のエンテロウイルス71型分離株について, 感染症学雑誌, **75**, 490-494 (2001)
- 4) 梅垣康弘, 宇野典子, 近野真由美, 唐牛良明: 急性脳症と診断された10歳男児髄液からのコクサッキーウイルスA16型の検出, 病原微生物検出情報, **23**, 173-174 (2002)
- 5) 藤本嗣人, 近平雅嗣, 増田邦義 他: 脳症患者の咽頭ぬぐい液および髄液から検出されたA群コクサッキーウイルス, 病原微生物検出情報, **23**, 174 (2002)

短報

ウイルス性食中毒の発生状況 (平成14年度)

原みゆき, 古屋由美子, 片山 丘, 今井光信

Occurrence of Epidemic Gastroenteritis Caused by Viral Agents in Kanagawa Prefecture (2002)

Miyuki HARA, Yumiko FURUYA, Takashi KATAYAMA and Mitsunobu IMAI

はじめに

毎年冬期を中心にウイルス性食中毒が多く発生している。ウイルス性食中毒の原因は大部分がノーウォークウイルスによるものであり、このウイルスに汚染された魚介類を生あるいは加熱不足の状態ですべて摂取することによって発生すると考えられている。このウイルス性食中毒が増加する12月から2月にかけては、カキのシーズンであり生カキを食べる機会が増えることも冬期にウイルス性食中毒を増加させる要因と思われる。

しかし平成14年度は、老人ホームや保育園のような集団生活の場所での発生が多く、発生の拡大を防ぐためにも原因調査などの早期の行政対応が重要となっている。

そこで平成14年4月から平成15年3月にかけて、県内で発生したウイルス性食中毒あるいは感染性胃腸炎の集団発生事例について、ウイルス学的原因調査を行ったので報告する。

材料と方法

1. 検査材料

平成14年4月から平成15年3月に発生した、ウイルス性食中毒あるいは感染性胃腸炎が疑われた19事例の集団発生より得られた患者便143検体、従事者便203検体および生カキ6検体を用いた。

2. ノーウォークウイルスの遺伝子検出法

便は滅菌リン酸緩衝液 (PBS (-)) で10%乳剤とし、

攪拌後10,000rpm 10分間遠心後上清をRNAの抽出に使用した。RNAの抽出はQIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen社製) を用いて行い、抽出RNAはDNase I で処理後、random hexamer (Amersham社製) およびSuper Script II RT (Invitrogen社製) を用いて42℃ 1時間逆転写反応を行いcDNAを作製した。リアルタイムPCRは影山らの方法¹⁾に従って、TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI社製) を用いて、Genogroup I (GI) はプライマー: COG1F/COG1R, プローブ: RING1-TP (A) RING1-TP (B), Genogroup II (GII) はプライマー: COG2F, ALPF/COG2R, プローブ: RING2AL-TPを使用し、GI, GIIのそれぞれについてウイルス遺伝子の定量を行った。

生カキは中腸線1gを用いた。滅菌PBS (-) で10%乳剤とし、攪拌後3,000rpm 20分間遠心後上清を30%シヨ糖溶液に重層し、40,000rpm 2時間遠心した。沈査を滅菌PBS (-) で再浮遊し、RNAの抽出に用いた。抽出、逆転写反応およびリアルタイムPCRは便と同様に行った。

3. 電子顕微鏡観察

便は滅菌PBS (-) で10%乳剤とし、攪拌後3,000rpm 20分間遠心後上清を30%シヨ糖溶液に重層して40,000rpm 2時間遠心した。沈査を滅菌PBS (-) で再浮遊し、2%リンタンゲステン酸ナトリウムでネガティブ染色後40,000倍で検鏡した。

4. A群ロタウイルス検出用酵素抗体法

A群ロタウイルス検出用キットである、ロタクロン (TFB社製) を用いて定法に従い便からのA群ロタウイルスの検出を行った。

結果および考察

平成14年度に発生した19事例のうち16事例 (84.2%) から遺伝子検出法でノーウォークウイルスが検出され、そのうち8事例 (42.1%) からは電子顕微鏡でもウイルス粒子が確認された (表1)。この検出されたノーウォークウイルスの遺伝子型はすべてGIIであり、昨年度全国で検出されたノーウォークウイルスの遺伝子型の多くがGIIであることに一致していた²⁾。リアルタイムPCRの結果、ノーウォークウイルスが検出された検体では検体1g当たり、10⁵個以上のウイルスが含まれていたことがわかった。ノーウォークウイルス感染症は100個程度のウイルスが体内に侵入した場合に発症する可能性がある³⁾ため、患者を介護する家族や患者の発生した施設内の人が二次感染を起こす可能性が考えられた。また今回調査したなかでノーウォークウイルスが検出されなかった事例が3事例あった。そのうちの1つ、事例No.10は飲食店で発生した事例であるが、検体として従事者便だけし

か得られず、患者便が得られなかった事例であった。他の事例では事例No.14が3月に老人ホームで発生した事例でA群ロタウイルスが原因であった。残りの事例である事例No.2は最終的にいずれの検体からもウイルスは検出されず原因が特定できなかった。

ノーウォークウイルスが検出された16事例ではカキが原因であったものは5事例（31.3%）あり、4事例の原因食品が生カキで、1事例の原因食品はカキフライであった。このうちで摂食したカキが残っていたのは1事例のみであり、この事例のカキからはノーウォークウイルスは検出されなかった。カキを摂食していない11事例（68.8%）のうち、8事例が保育園や病院、老人ホーム等の集団生活の場所で発生していた。これらの事例の原因食品や感染経路は不明であった。これらのうち7事例では従事者からもノーウォークウイルスが検出されており、施設内でノーウォークウイルス感染症が発生していたことが推察された。この感染症は従事者から患者に感染した場合と患者から従事者が感染した場合の両方の可能性が考えられた。

ノーウォークウイルスが検出された事例の発生場所は小田原保健福祉事務所管内が6事例で最も多く、次が茅ヶ崎、藤沢保健福祉事務所管内がそれぞれ3事例で、秦野、鎌倉、厚木、平塚保健福祉事務所管内がそれぞれ1事例であった。最も発生が多かった小田原保健福祉事務所管内での発生事例は、保育園で2事例、入学前の児童の通園施設で1事例、箱根の旅館で2事例、病院で1事例が発生しており、いずれの事例も原因食品は特定でき

ずカキによるウイルス性食中毒は含まれていなかった。カキが原因のウイルス性食中毒は茅ヶ崎保健福祉事務所管内で2事例、秦野、藤沢、鎌倉保健福祉事務所管内で各1事例ずつ発生しており、発生地域による差はみられなかった。これらのことから平成14年度のウイルス性食中毒を疑われた事例では、保育園等の施設内での発生が多く、これらの事例は原因食品や感染経路など不明な点が多いことから、今後はこのような事例に関する原因解析を行っていくことが重要と考えている。

またウイルス性食中毒の主な原因であるカキについても、発生施設で摂食したカキが残っていない場合が多いことから、今後は摂食した食材を確保していくことが感染経路の解明のために必要であると思われる。

最後になりましたが衛生研究所への迅速な検体搬入や情報提供にご尽力いただきました各保健福祉事務所、県生活衛生課の方々に深謝いたします。

（平成15年8月14日受理）

文 献

- 1) 影山努, 小嶋慈之, 福士秀悦, 片山和彦: 蛍光プローブを用いたNorwalk virus (NV) の高感度検出法の開発, *Vita*, **18**, 14-17 (2001)
- 2) ウイルス検出状況・2003年3月25日現在, 病原微生物検出情報, **24**, 21-24 (2003)
- 3) 西尾治, 西香南子, 福田伸治, 西田知子, 篠原美千代, 沖村容子ほか: ウイルス性食中毒の病因, 臨床とウイルス, **31**, 163-169 (2003)

表1 平成14年度発生事例におけるノーウォークウイルス検出結果

事例 No.	発生年月	管轄保健 福祉事務所	原因施設	原因食品	検体名	検体数	RT-PCR 陽性数	遺伝子型	電顕 陽性数
1	H14.4	小田原	通園施設	不明	患者便	12	10	GII	2
					従事者便	10	1	GII	0
2	H14.4	三 崎	老人ホーム	不明	患者便	8	0		0
					従事者便	16	0		0
3	H14.4	小田原	保育園	不明	患者便	12	9	GII	2
					従事者便	9	2	GII	0
4	H14.10	小田原	病 院	不明	患者便	29	23	GII	3
					従事者便	32	9	GII	4
5	H14.11	秦 野	小売店	生カキ	患者便	2	2	GII	0
					従事者便	6	0		0
6	H14.12	茅ヶ崎	温泉施設	不明	患者便	1	1	GII	0
					従事者便	6	0		0
7	H14.12	藤 沢	小売店	カキフライ	患者便	1	1	GII	0
					従事者便	0			
8	H14.12	平 塚	老人ホーム	不明	患者便	10	9	GII	0
					従事者便	11	3	GII	0
9	H14.12	茅ヶ崎	飲食店	生カキ	患者便	12	9	GII	1
					従事者便	25	0		0
					生カキ	6	0		
10	H14.12	茅ヶ崎	飲食店	不明	患者便	0			
					従事者便	5	0		0
11	H15.1	藤 沢	小売店	不明	患者便	6	4	GII	0
					従事者便	11	2	GII	0
12	H15.1	鎌 倉	飲食店	生カキ	患者便	9	9	GII	0
					従事者便	2	0		0
13	H15.2	厚 木	飲食店	不明	患者便	4	3	GII	0
					従事者便	13	2	GII	0
14	H15.3	鎌 倉	老人ホーム	不明	患者便	8	0		0
					従事者便	11	0		0
15	H15.3	茅ヶ崎	小売店	生カキ	患者便	3	3	GII	1
					従事者便	0			
16	H15.3	藤 沢	飲食店	不明	患者便	3	1	GII	0
					従事者便	8	1	GII	0
17	H15.3	小田原	保育園	不明	患者便	11	11	GII	2
					従事者便	3	1	GII	1
18	H15.3	小田原	旅 館	不明	患者便	6	6		1
					従事者便	16	5	GII	2
19	H15.3	小田原	旅 館	不明	患者便	6	6	GII	0
					従事者便	19	9	GII	2

短報

へい死野鳥の農薬分析法について

藤巻照久, 佐藤久美子, 岸美智子

Analysis Method for Agricultural Chemicals which are Causes of Wild Bird's Death

Teruhisa FUJIMAKI, Kumiko SATO
and Michiko KISHI

はじめに

近年, 神奈川県内において野鳥の大量死や毒餌によると思われる不審死が相次いで発見された. このような事例に対して本県では平成14年度から地域住民の安全確保のためウエストナイル症を含めた感染症関連検査, 消化器官内容物の毒性検査及び農薬を含めた理化学検査を当所で定めたマニュアルに従って, 検体搬入時から一連の作業を行っている. まず, 搬入された検体は外観の観察と放射能測定を行う. ついで安全キャビネット内で検体解剖を行い, 感染症の危険性の有無を目視で確認する. 臓器を摘出し, 消化器官内容物を採取した後, 所内で検査方針の検討がなされ, 必要に応じ感染症検査, 毒性検査及び理化学検査が実施される.

今回, 平成14年度に起きた野鳥不審死の原因究明のため, 実際に行った農薬分析について報告する.

方 法

1 試 料

添加回収実験用として横浜市内のスーパーマーケットで購入した鶏肉

- (1) 平成14年10月3日, 県立保土ヶ谷公園内で死亡したハト2羽のそ嚢, 筋胃内容物及び付近に散乱していたペットフード
- (2) 平成14年10月15日, 綾瀬市本蓼川墓園で発生した大量死のカラス2羽の消化管内容物及び肝臓
- (3) 平成15年2月6日, 横浜市神奈川区齊藤分町付近で死亡したヒヨドリ, ツグミ各1羽の筋胃内容物及び吐物様物質

2 試 薬

農薬標準品: ジクロロボス (DDVP), エトプロホス, ダイアジノン, クロルピリホスメチル, トルクロホス

メチル, フェニトロチオン, マラチオン, フェンチオン, パラチオン, フェントエート, メチダチオン, プロチオホス, フェンスルホチオン, エディフェンホス, EPN, ホサロン, チオメトン, テルブホス, エチルチオメトン, メチルパラチオン, ピリミホスメチル, クロルピリホスメチル, ホスチアゼート, α -クロルフェンビンホス (α -CVP), β -クロルフェンビンホス (β -CVP), キナルホス, ブタミドホス, エチオン, ピリダフェンチオン, ピラクロホス, シアノホス (以上, 有機リン系農薬)

α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, デイルドリン, pp'-DDE, op'-DDD, pp'-DDD, op'-DDT, pp'-DDT, シハロメトリン, ベルメトリン, シベルメトリン, デルタメトリン, ヘプタクロール, α -エンドスルファン, β -エンドスルファン, エンドスルファンスルフェート, フルシトリネート, フルバリネート (以上, 有機塩素系及びピレスロイド系農薬)

エプタム (EPTC), イソプロカルブ, クロロプロファム, ピリミカーブ, メトリブジン, アラクロール, エスプロカルブ, トリアジメホン, ピリフェノックスZ, キノメチオネート, ピリフェノックスE, フルトラニル, ミクロブタニル, メプロニル, プロピコナゾール, ジフルフェニカン, ピリブチカルブ, テブフェンピラド, メフェナセット, ビテルタノール, ジフェノコナゾール, チオベンカルブ, ベンディメタリン, トリアジメノール, パクロブタノール, ヘキサコナゾール, フルシラゾール, シプロコナゾール, レナシル, テニクロール, ピリダベン (以上, 含窒素系農薬) は, 和光純薬工業 (株) 及び林純薬工業 (株) 製の残留農薬試験用標準試薬を用いた.

その他の試薬: 残留農薬試験用又はそれに相当する試薬を用いた.

Sep-Pak フロリジルカートリッジカラム: Waters 社製

有機リン系農薬混合液A: DDVP, エトプロホス, ダイアジノン, クロルピリホスメチル, トルクロホスメチル, フェニトロチオン, マラチオン, フェンチオン, パラチオン, フェントエート, メチダチオン, プロチオホス, フェンスルホチオン, エディフェンホス, EPN, ホサロンを各々 $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度となるようアセトンで調製した.

有機リン系農薬混合液B: チオメトン, テルブホス, エチルチオメトン, メチルパラチオン, ピリミホスメチル, クロルピリホスメチル, ホスチアゼート, α -CVP, β -CVP, キナルホス, ブタミドホス, エチオン, ピリダフェンチオン, ピラクロホスを各々 $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度となるようアセトンで調製した.

シアノホスは $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度となるようアセトンで調製した.

有機塩素系・ピレスロイド系農薬混合液A: α -BHC,

β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, デイルドリン, pp'-DDE, op'-DDD, pp'-DDD, op'-DDT, pp'-DDT, シハロメトリン, ペルメトリン, シペルメトリン, デルタメトリンを各々 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となるようアセトンで調製した。

有機塩素系・ピレスロイド系農薬混合液 B : ヘプタクロール, α -エンドスルファン, β -エンドスルファン, エンドスルファンスルフェート, フルシトリネート, フルバリネートを各々 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となるようアセトンで調製した。

含窒素系農薬混合液 A : EPTC, イソプロカルブ, クロプロフロアム, ピリミカーブ, メトリブジン, アラクロール, エスプロカルブ, トリアジメホン, ピリフェノックス Z, キノメチオネート, ピリフェノックス E, フルトラニル, ミクロブタニル, メプロニル, プロピコナゾール, ジフルフェニカン, ピリブチカルブ, テブフェンピラド, メフェナセット, ビテルタノール, ジフェノコナゾールを各々 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となるようアセトンで調製した。

含窒素系農薬混合液 B : チオベンカルブ, ベンダイメタリン, トリアジメノール, パクロブタノール, ヘキサコナゾール, フルシラゾール, シプロコナゾール, レナシル, テニクロール, ピリダベンを各々 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となるようアセトンで調製した。

3 分析法

3・1 試料の調製法

試料の調製法を図 1 に示す。

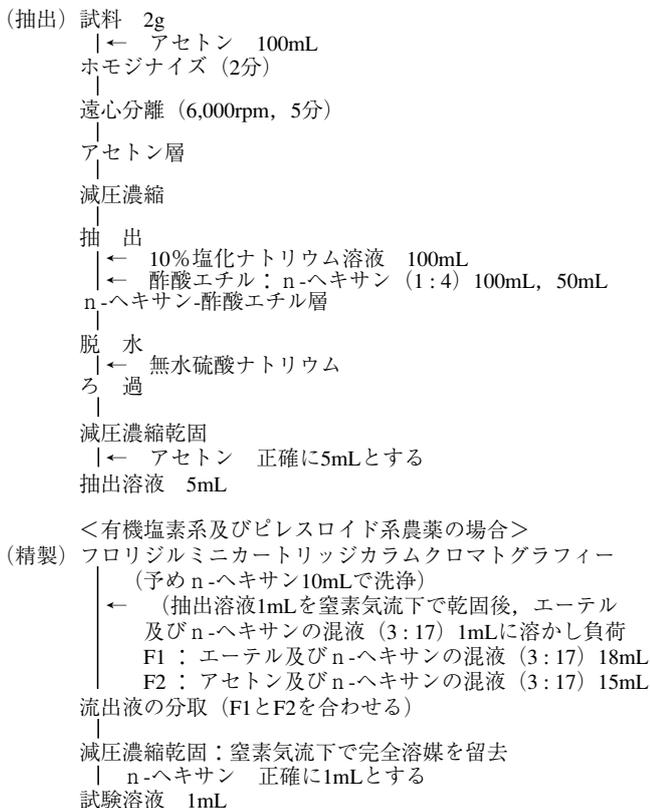


図 1 へい死野鳥等試料の調製法

3・2 定性及び定量試験

有機リン系農薬については炎光光度計型検出器付きクロマトグラフ (以下 GC-FPD とする) を用いた。

装置 : 島津製作所製 GC-2010i

カラム : J&W 社製 DB-5

(内径 0.25mm, 長さ 30m, 膜厚 0.25 μm)

注入口温度 : 220 $^{\circ}\text{C}$ 検出器温度 : 280 $^{\circ}\text{C}$

カラム温度 : 50 $^{\circ}\text{C}$ (2分) - 15 $^{\circ}\text{C}$ 昇温/分 - 180 $^{\circ}\text{C}$ (2分) - 4 $^{\circ}\text{C}$ 昇温/分 - 240 $^{\circ}\text{C}$ (2分) - 20 $^{\circ}\text{C}$ 昇温/分 - 280 $^{\circ}\text{C}$ (10分)

キャリアーガス (He) : 2.4mL/分

注入方式 : スプリットレス法 注入量 : 2 μL

装置 : アジレント社製 HP-6890

カラム : J&W 社製 DB-5

(内径 0.25mm, 長さ 30m, 膜厚 0.25 μm)

注入口温度 : 235 $^{\circ}\text{C}$ 検出器温度 : 250 $^{\circ}\text{C}$

カラム温度 : 60 $^{\circ}\text{C}$ (2分) - 30 $^{\circ}\text{C}$ 昇温/分 - 180 $^{\circ}\text{C}$ (0分) - 5 $^{\circ}\text{C}$ 昇温/分 - 230 $^{\circ}\text{C}$ (12分)

キャリアーガス (He) : 1.2mL/分

注入方式 : スプリットレス法 注入量 : 2 μL

有機塩素系及びピレスロイド系農薬については電子捕獲型検出器付きクロマトグラフ (以下 GC-ECD とする) を用いた。

装置 : アジレント社製 HP-6890

カラム : J&W 社製 DB-5

(内径 0.25mm, 長さ 30m, 膜厚 0.25 μm)

注入口温度 : 220 $^{\circ}\text{C}$ 検出器温度 : 280 $^{\circ}\text{C}$

カラム温度 : 50 $^{\circ}\text{C}$ (2分) - 20 $^{\circ}\text{C}$ 昇温/分 - 280 $^{\circ}\text{C}$ (10分)

キャリアーガス (He) : 1.2mL/分

注入方式 : スプリットレス法 注入量 : 2 μL

含窒素系農薬については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。

装置 : 島津製作所製 GC-17A

カラム : J&W 社製 DB-5

(内径 0.25mm, 長さ 30m, 膜厚 0.25 μm)

注入口温度 : 220 $^{\circ}\text{C}$ 検出器温度 : 280 $^{\circ}\text{C}$

カラム温度 : 50 $^{\circ}\text{C}$ (2分) - 15 $^{\circ}\text{C}$ 昇温/分 - 180 $^{\circ}\text{C}$ (2分) - 4 $^{\circ}\text{C}$ 昇温/分 - 240 $^{\circ}\text{C}$ (2分) - 20 $^{\circ}\text{C}$ 昇温/分 - 280 $^{\circ}\text{C}$ (10分)

キャリアーガス (He) : 2.4mL/分

注入方式 : スプリットレス法 注入量 : 2 μL

各々, ピーク面積法, 絶対検量線法により測定を行った。定量下限値 (S/N \geq 10) は試料濃度で 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ とした。

3・3 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0.25 μ m)

カラム温度：50℃(1分) - 20℃昇温/分 - 280℃(5分)

注入口温度：220℃

インターフェイス温度：250℃

イオン源温度：200℃

イオン化電圧：70eV

キャリアーガス (He)：1.2mL/分

注入方式：スプリットレス法 注入量：2 μ L

4 添加回収試験

細切均一化した添加回収用鶏肉2gに対して各々標準溶液10 μ g/mLを1mL添加した。

結果及び考察

鶏肉を用いた添加回収実験の結果及びガスクロマトグラムの保持時間は表1に示した。保持時間の近接したピークの重なりを避けるため、有機リン系農薬、有機塩素系・ピレスロイド系農薬及び含窒素系農薬は各々、標準溶液を混合溶液A及びBに分けた。表1に示した回収率は有機リン系農薬で61.2～158.6%，有機塩素系・ピレ

スロイド系農薬で47.9～117.9%，含窒素系農薬で25.3～121.8%であった。野鳥へい死の原因農薬の検体濃度は、数十～数百 μ g/gが想定されるため野鳥不審死等の危機管理におけるスクリーニング試験を行う場合は、本分析法で大きな問題はないと考える。

(1) 県立保土ヶ谷公園管理事務所から発見されたハトは、嘔吐を繰り返し、唾液を口から流して死亡したという情報が提供された。また、急性毒性試験の結果、ペットフードの試験溶液においてマウスにアセチルコリン様中毒症状の発現及び死亡例が認められたため有機リン系農薬が原因物質であることが疑われた。ハトから採取した筋胃内容物、そ嚢内容物(パンくず、ペットフード)、現場より採取したペットフードを検体として有機リン系農薬の分析を行った結果、いずれからも有機リン系農薬のDDVPと同じ保持時間にピークが認められた。分析値の詳細は表2にまとめた。GC-FPDクロマトグラムは図2に示した。GC/MSによる確認試験の結果、いずれの試験溶液からもDDVP標準品溶液と同じ保持時間に同様のマススペクトルが検出され、DDVPであることが確認された。濃度の低いハトA筋胃内容物から得られた抽出溶液のトータルイオンクロマトグラム(TIC)及びマススペクトルを図3に示した。

表1 鶏肉における農薬の添加回収実験結果及びガスクロマトグラムの保持時間

有機リン系農薬※1			有機塩素系・ピレスロイド系農薬			含窒素系農薬		
農薬名	保持時間(分)	回収率(%)	農薬名	保持時間(分)	回収率(%)	農薬名	保持時間(分)	回収率(%)
DDVP	5.82	86.5	α -BHC	7.21	47.9	EPTC	9.97	29.5
エトプロホス	8.03	87.4	β -BHC	7.62	65.4	イソプロカルブ	11.82	31.6
ダイアジノン	9.43	82.8	γ -BHC	7.73	54.9	クロルプロファミン	13.31	107.5
クロルピリホスメチル	10.43	93.1	δ -BHC	8.13	67.5	ピリミカール	16.56	36.8
トリクロホスメチル	10.53	85.5	pp'-DDE、デイルドリン※2	12.34	117.9	メトリブジン	17.09	48.5
フェントロチオン	11.04	99.3	op'-DDD	12.57	85.7	アラクロール	17.62	104.6
マラチオン	11.29	106.1	pp'-DDD	13.54	81.0	エスプロカルブ	18.49	52.4
フェンチオン	11.50	97.1	op'-DDT	13.63	72.6	トリアジメホン	19.31	96.6
パラチオン	11.57	89.0	pp'-DDT	14.83	111.5	ピリフェノックスZ	20.57	115.3
フェントエート	12.70	102.2	シハロトリン	20.56,21.19	82.6	キノメチオネート	21.26	76.9
メチダチオン	13.04	121.7	ペルメトリン	23.06,23.45	88.8	ピリフェノックスE	21.60	117.0
プロチオホス	13.85	72.6	シベルメトリン	25.54,25.81,25.97,26.09	93.1	フルトラニル	23.18	109.5
フェンスルホチン	15.11	94.1	デルタメトリン	28.85,29.30	94.8	マイクロプタニル	25.15	81.4
エディフェンホス	16.16	158.6	ヘプタクロル	9.06	66.8	メプロニル	25.91	110.6
EPN	18.31	90.9	α -エンドスルファン	11.65	59.5	プロピコナゾール	26.17	116.9
ホサロン	19.98	113.1	β -エンドスルファン	13.20	68.2	ジフルフェニカン	26.99	77.5
チオメトン	8.70	61.2	エンドスルファンスルフェイト	14.60	30.4	ピリブチカルブ	27.67	80.7
テルブホス	9.25	82.8	フルシトリネート	26.14,26.32,26.64	91.3	テブフェンピラド	28.89	109.4
エチルチオメトン	9.55	62.5	フルバリネート	28.24,28.42	93.6	メフェナセツト	30.31	121.8
メチルパラチオン	10.42	104.7				ビテルタノール	31.81,31.96	88.5
ピリミホスメチル	11.08	89.1				ジフェノコナゾール	36.05,36.20	99.0
クロルピリホスメチル	11.55	86.4				チオベンカルブ	18.74	91.1
ホスチアゼート	11.97,12.04	144.6				ベンディメタリン	20.41	43.5
α -CVP	12.30	96.0				トリアジメノール	20.95	94.8
β -CVP	12.61	93.9				バクプロタゾール	21.63	96.9
ブタミドホス	13.69	91.8				ヘキサコナゾール	22.41	104.3
エチオン	15.45	94.6				フルシラゾール	23.32	68.4
ピリダフェンチオン	18.12	99.0				シプロコナゾール	23.74	70.0
ピラクロホス	22.63	136.2				レナシル	26.11	25.3
シアノホス	9.25	102.5				テニクロール	26.61	101.0
						ピリダベン	32.11	80.7

※1：有機リン系農薬の保持時間と添加回収率の測定はアジレント社のHP6890を用いた。

※2：pp'-DDE、デイルドリンはピークが重なったため合算した総量から回収率を算出した。

表2 ヘイ死野鳥の消化管内容物及び臓器等の分析結果

検体採取試料	試料量 (g)	分析使用量 (g)	検出成分名	分析値 (μg/g)	総検出量 (μg)
ハトA筋胃内容物	4.00	1.27		333	1330
ハトBそ嚢内容物	10.20	3.40		—	16980
パン屑	7.86	2.02	DDVP	1013	7960
ペットフード	2.34	1.38		3855	9020
ペットフード	—	2.00		5078	—
カラスA筋胃内容物	1.20	1.20	不検出	—	—
カラスA腸管内容物	4.12	2.11	不検出	—	—
カラスA肝臓	4.30	2.20	不検出	—	—
カラスB筋胃内容物	0.60	0.60	不検出	—	—
カラスB腸管内容物	3.03	1.51	不検出	—	—
カラスB肝臓	4.80	2.18	不検出	—	—
ヒヨドリ筋胃内容物	1.47	1.47		70	103
ツグミ筋胃内容物	0.60	0.60	シアノホス	319	191
吐物様物質	1.05	1.05		5	5

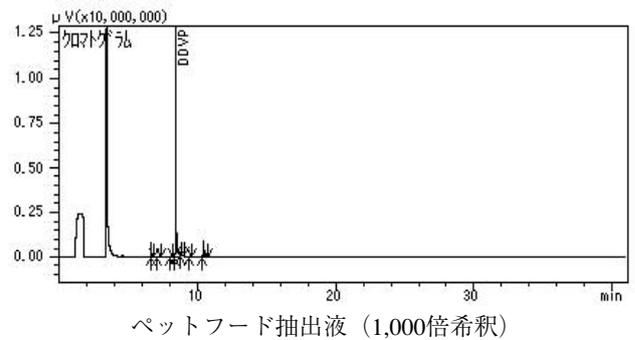
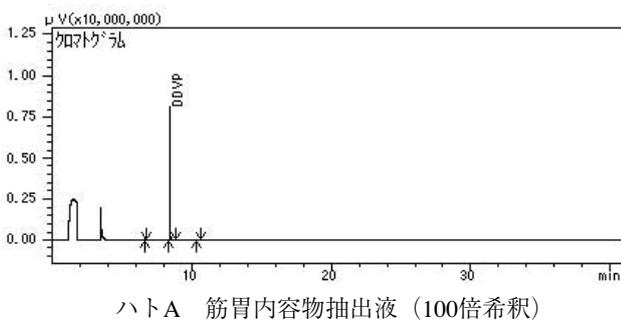
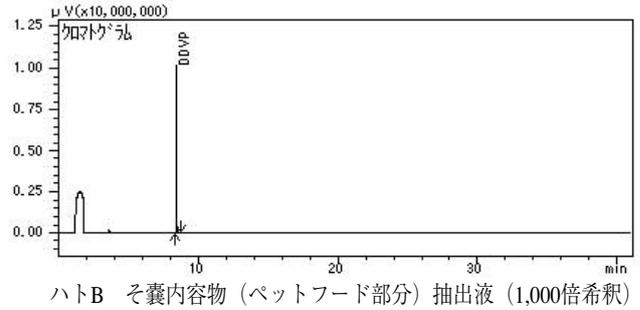
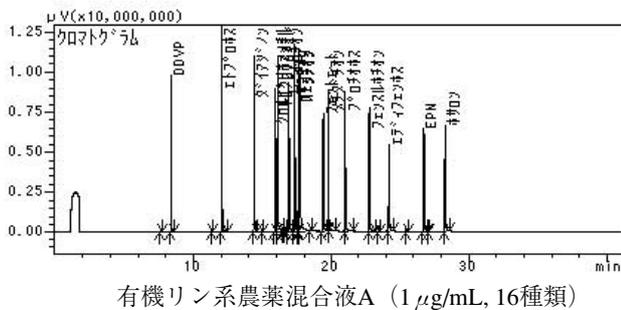
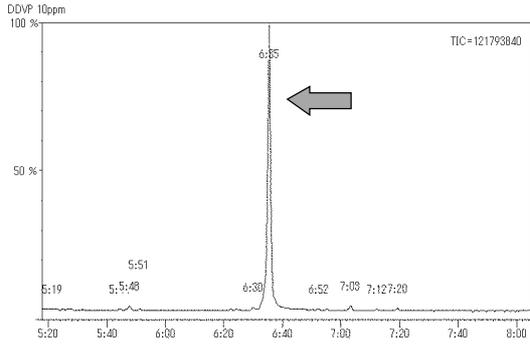


図2 ハトの消化管内容物及びペットフード抽出液のGC-FPDクロマトグラム

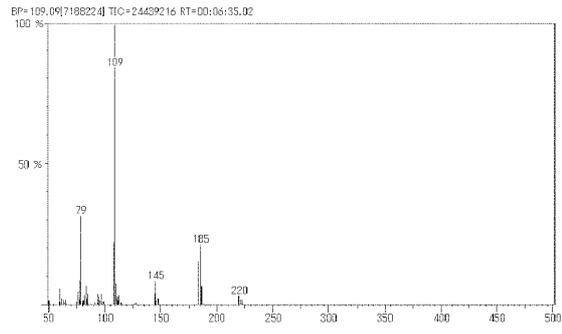
一般的に有機リン化合物の毒性は、ほ乳類よりも鳥類に対して強いことが知られている。今回、検出されたDDVPの量から体重263.4gのハトBのそ嚢中含有量を体重 (kg) あたりで算出すると約64.5mg/kgとなる。DDVPの鳥類 (ウズラ) に対する急性毒性値24mg/kg²⁾ であることから、本検体のそ嚢内容物中のDDVP量は致死量に達していた。また、ペットフードから約5mg/gのDDVPが検出されたことから、約300gのハトがこの餌を約1.5g食べると、致死量のDDVPを摂取することになる。また、イヌやネコに対する急性毒性値

は不明であるが、ラットの急性毒性値が56～140mg/kg³⁾を参考にすると、このペットフードを体重10kgのイヌが食べたとして致死量に至るには約300g以上、摂食する必要がある。付近に散乱していたペットフードの餌を摂食した場合は死亡に至らなくとも何らかの被害があると思われるため、注意が必要であると考え。

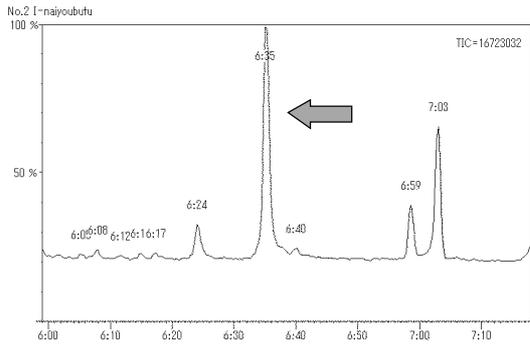
(2) カラスA, Bの筋胃内容物, 腸管内容物及び肝臓について有機リン系農薬30種類, 有機塩素系・ピレスロイド系農薬20種類, 含窒素系農薬31種類の合計81



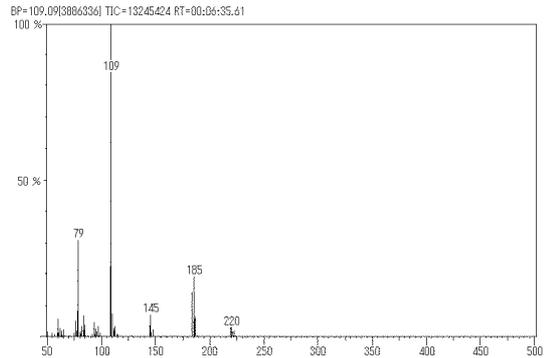
DDVP (1 μg/mL) のトータルイオンクロマトグラム (TIC)



DDVP (1 μg/mL) のマススペクトルグラム

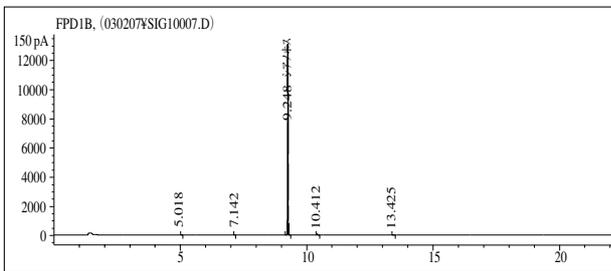


ハトA筋胃内容物のTIC

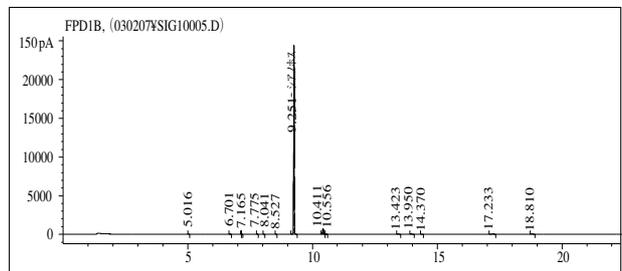


ハトA筋胃内容物のマススペクトル

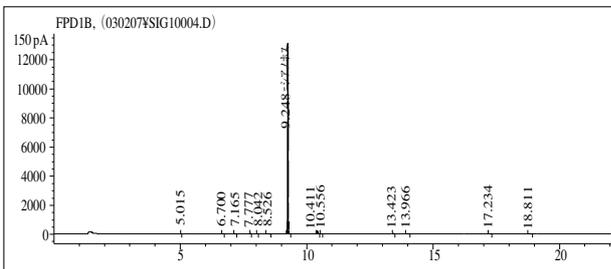
図3 ハトのA筋胃内容物のTIC及びマススペクトルグラム



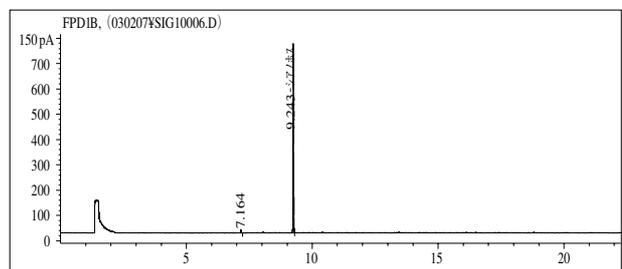
有機リン系農薬シアノホス標準溶液 (1 μg/mL)



ツグミ筋胃内容物抽出液 (100倍希釈)



ヒヨドリ筋胃内容物抽出液 (100倍希釈)



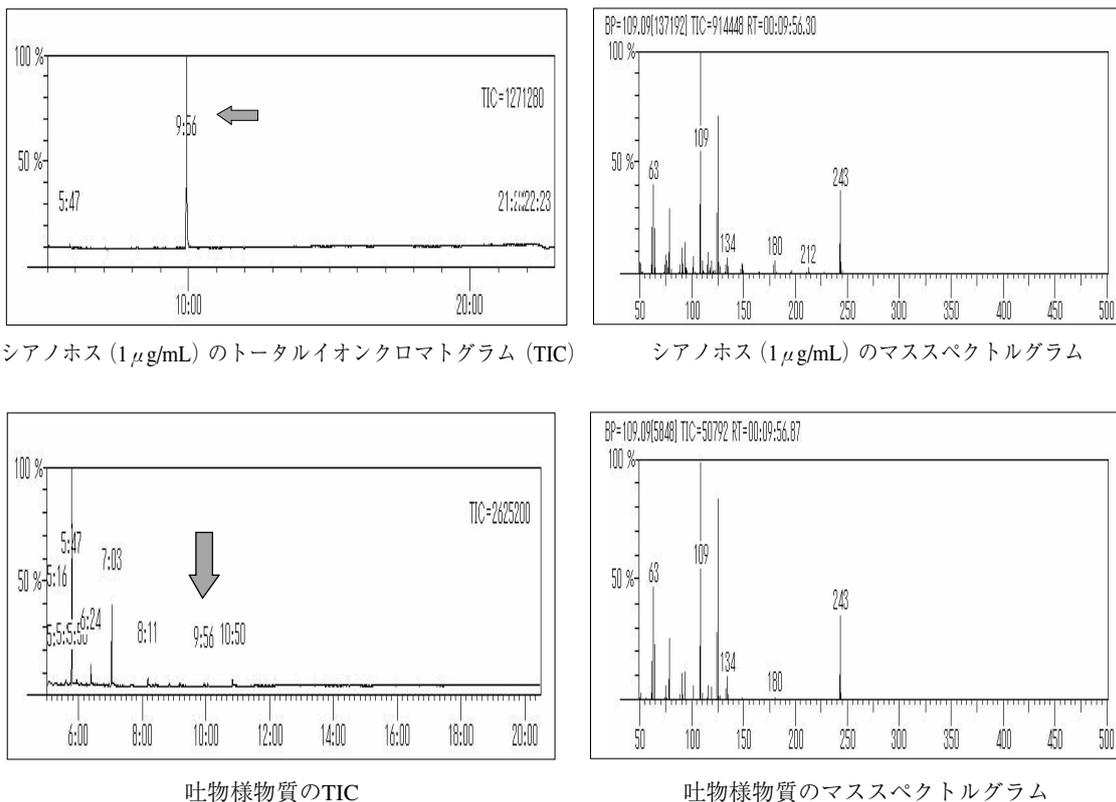
吐物様物質抽出液 (100倍希釈)

図4 ヒヨドリ、ツグミ筋胃内容物及び吐物様物質抽出液のGC-FPDクロマトグラム

種類の農薬を分析したが、すべて不検出であった。

(3) 剖検の結果、ヒヨドリ、ツグミともに臓器の色調は良好で死後変化がほとんどなく、死亡直前まで健康体

であることが窺えた。そのため感染症等の可能性がないと思われることから毒物による中毒死を想定した。試料調製法 (図1) に従い、筋胃内容物及び吐物様物



シアノホス (1 µg/mL) のトータルイオンクロマトグラム (TIC)

シアノホス (1 µg/mL) のマススペクトルグラム

吐物様物質のTIC

吐物様物質のマススペクトルグラム

図5 吐物様物質抽出液のTIC及びマススペクトルグラム

質の抽出を行った。有機リン系農薬30種について検討したところ、いずれの抽出液からも標準品のシアノホスと同じ保持時間にピークが認められた(図4)。分析値の詳細は表2にまとめた。検出されたこれらのピークはGC/MSでによりシアノホスであることを確認した。濃度の低い吐物様物質から得られた抽出溶液のトータルイオンクロマトグラム(TIC)及びマススペクトルを図5に示した。

シアノホスは一般的に果樹、アブラナ科野菜、マメ科作物の害虫防除に使用される¹⁾。通常の使用法³⁾は40%水和剤を使用した場合、1000倍希釈液(400 µg/mL)を作製し、その1L(400 µg/mL × 1000mL = 400mg)を10m²に散布する。散布された場合の単位面積当たりの量は400mg/10m² = 40000 µg/100000cm² = 4 µg/cm²であるから農産物の表面積1平方センチメートル当たり4 µgのシアノホスが付着している。仮に野鳥が1gの農産物を食べる場合に1平方センチメートルの表面積を深さ1cmまで食べたと仮定しても4 µgの摂取量となる。表2から胃内総検出量(胃内残存量)がヒヨドリで103 µg、ツグミで191 µgであった。このことから今回の野鳥の不審死が自然の状態では農産物を摂取した結果、農産物表面に付着した農薬で死亡したとは想定しにくい。また、冬季の農薬の散布は考

えにくい。以上のことからヒヨドリとツグミの死因はシアノホスの毒餌等による中毒死の可能性が極めて高いと考える。

まとめ

平成14年度に起きた野鳥不審死原因究明のため、実際に行った農薬の分析結果を報告したが、原因が特定できた事例は3例中2例であった。2例に共通していることは、筋胃内容物の濃度が極めて高く、分析装置で測定する際に希釈する必要があった。さらに死亡した野鳥は、いずれも外傷がなく、急性中毒死は短時間に起きたため死亡直前まで健康体であったことが容易に想像された。

また、今回の事例から野鳥の不審死等の原因究明において本法が農薬分析に適用可能であることがわかった。

(平成15年8月14日受理)

文献

- 1) 上路雅子, 小林裕子, 中村幸二編: 2002年度版残留農薬分析法, ソフトサイエンス社 (2001)
- 2) Tomlin, C.D.S.: The Pesticide Manual 12th Ed., British Crop Protection Council, Farnham (2000)
- 3) 農薬ハンドブック2001年版, 社団法人日本植物防疫協会 (2001)

短報

農産物における残留農薬；メチダチオン、ピラゾホス、プロパルギットの同時分析法について

渡邊裕子，佐藤久美子，藤巻照久，
渡辺貞夫，岸美智子

Simultaneous Determination of Residual Pesticides ; Methidathion, Pyrazophos and Propargite in Agricultural Products

Hiroko WATANABE, Kumiko SATO,
Teruhisa FUJIMAKI, Sadao WATANABE,
and Michiko KISHI

はじめに

農薬や動物用医薬品などの規格基準はその設定にあたり、試験法の検討および農産物や畜産物における残留実態を把握し、その根拠としている。本研究においても同様に農産物の輸入先である欧米等で規格基準が設定され、使用されているが、日本で規格基準の設定されていないメチダチオン、ピラゾホス、プロパルギットの3農薬について、正確で迅速な検査を目的として検討を行った。メチダチオン¹⁾、ピラゾホス²⁾、プロパルギット³⁾の3農薬はそれぞれ個別な試験法が示されているため、これを同時分析法に改良を行い、21農産物についてその適応を検討し、さらに市販農産物において残留実態調査を行った。メチダチオンは有機リン系殺虫剤、ピラゾホスは有機リン系殺菌剤、プロパルギットはフェノキシ系殺虫、殺菌剤として使用されている⁴⁾。

材料および方法

市販の21輸入農産物（小麦，とうもろこし，ばれいしよ，キャベツ，たまねぎ，トマト，きゅうり，レモン，オレンジ，グレープフルーツ，ライム，マンゴー，バナナ，もも，プルーン，おうとう，クランベリー，ブドウ，アーモンド，クルミ，茶）を用いて試験法の検討および

農産物への適応を検討した。また、各農産物について4検体（1検体500g以上）を試料として、残留実態を調査した。

21農産物の原産国は表2に示したとおりである。対象農薬の標準品を以下に示す。

メチダチオン：別名；DMTP

化学名：O,O-ジメチル-S-(5-メトキシ-2-オキソ-1,3,4-チアジアゾリン-3イルメチル)ジチオホスファート

和光純薬製，ロットNo.HCK9405，純度98%

ピラゾホス：

化学名：エチル 2-ジエトキシチオホスホリルオキシ-5-メチルピラゾロ(1,5-a)ピリミジン-6-カルボキシラート

Riedel-de-Haen 製 ロットNO.2783，純度99%

プロパルギット：別名 BPPS

化学名：2-(4-tert-ブチルフェノキシ)シクロヘキシル2-プロピニルスルファイト

関東化学製 ロットNO.204G78，純度98%

その他の試薬は、残留農薬試験用あるいはそれに相当する試薬を用いた。

クリーンアップには、シリカゲル（MERCK社製 カラムクロマトグラフィ用 キーゼルゲル60）を用いた。

試験溶液の調製

環境庁の農薬登録保留基準の試験法⁴⁾を改良し、同時分析法とした。下記の（試験溶液の調製）に従って操作し、必要に応じてシリカゲルカラムによるクリーンアップ操作を行った。

抽出操作

＜果実・野菜・茶＞

試料20.0g：

汎用天秤を用いて遠心管に正確に量り取る。

← アセトン 100mL, 50mL

ホモジナイズ（2分）

遠心分離（6000rpm, 5分, 5℃）

アセトン層（500mLのナス型フラスコ）

減圧濃縮（40℃以下で約20mLに濃縮する）

← 10%塩化ナトリウム 100mL

← 酢酸エチル・n-ヘキサン（1:4）100mL, 50mL

振とう
|
溶媒層
|
溶媒留去 (40℃以下で溶媒留去)
|
← アセトン 4 mL
抽出溶液

<穀類・種実>

試料 20.0g :
汎用天秤を用いて遠心管に正確に量り取る。
|
← アセトニトリル 100mL, 50mL
ホモジナイズ (2分)
|
遠心分離 (6000rpm, 5分, 5℃)
|
アセトニトリル層 (500mLのナス型フラスコ)

|
← アセトニトリル飽和 n-ヘキサン 50mL
振とう
|
下層
|
減圧濃縮 (40℃以下で20mLに濃縮する)
|
← 10%塩化ナトリウム 100mL
酢酸エチル・n-ヘキサン (1:4) 100mL, 50mL

振とう
|
溶媒層
|
溶媒留去 (40℃以下で溶媒留去)
|
← アセトン 4 mL
抽出溶液

シリカゲルカラムによるクリーンアップ

抽出溶液
|
シリカゲルカラム
(下層：乾燥シリカゲル 5g, 上層：無水硫酸ナトリウム 5g) (アセトン-n-ヘキサン混合液 (1:1) で作成)
|
←アセトン:n-ヘキサン混合液 (1:1) 100mL

|
流出液
|
溶媒留去 (40℃以下で溶媒留去)
|
← アセトン 4mL
試験溶液

測定条件

[メチダチオンおよびピラゾホス]

装置：アジレントテクノロジー社製 HP6890
検出器：炎光光度計型検出器 (FPD-GC, Pフィルター)
カラム：DB-5およびHP-5,
長さ 30m, 内径 0.25mm, 膜厚 0.25 μ m
昇温条件：60℃ (2分保持) - 30℃/分昇温 - 180℃ (0分) - 5℃/分昇温 - 230℃ (12分)
キャリアーガス流量：
ヘリウム 2.4mL/min. (コンスタントフローモード)
注入口温度：220℃
検出器温度：250℃ (水素：150mL/min. 空気：100mL/min. メーカーアップガス：17mL/min.)
試料注入量：1 μ L (スプリットレス方式)

[プロパルギット]

装置：アジレントテクノロジー社製 HP6890
検出器：炎光光度計型検出器 (FPD-GC, Sフィルター)
カラム：DB-5およびHP-5,
長さ 30m, 内径 0.25mm, 膜厚 0.25 μ m
昇温条件：60℃ (2分保持) - 25℃/分昇温 - 10℃ (2分) - 10℃/分昇温 - 230℃ (10分)
キャリアーガス：ヘリウム (2.4mL/min.)
カラム圧：25.0psi (コンスタントプレッシャーモード)
注入口温度：220℃
検出器温度：250℃
試料注入量：4 μ L (パルスドスプリットレス方式 パルス圧：35.0psi, 0.2min.)

検量線の作成

メチダチオンは0.2ppm, 0.5ppm, 1.0ppmとなる濃度に、ピラゾホスは1.0ppm, 2.5ppm, 5.0ppmとなる濃度に、またプロパルギットは2.0ppm, 4.0ppm, 5.0ppmとなる濃度にアセトンで調製した標準溶液を用いた。図1および2に標準品のクロマトグラムを示した。ピーク面積法によりメチダチオンの検量線、ピラゾホスの検量線およびプロパルギットの検量線を作成した。相関係数は、メチダチオン $r^2 = 0.99999$, ピラゾホス $r^2 = 0.99999$, プロパルギット $r^2 = 0.99901$ となり、良好な検量線が得られた。また、検出限界をガスクロマトグラフの測定に

よる S/N 比の 5～10 倍とし、メチダチオン 0.02ppm, ピラゾホス 0.1ppm, プロパルギット 0.2ppm に設定した。

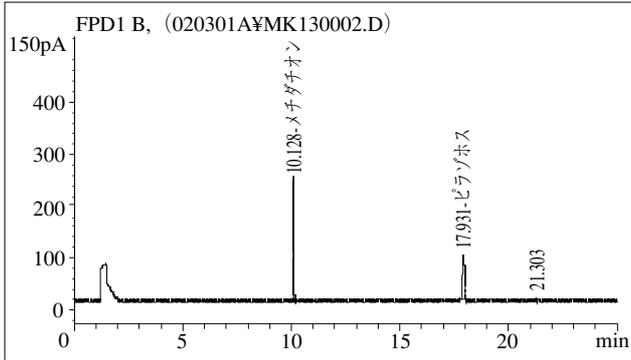


図1 メチダチオンおよびプロパルギット標準品のクロマトグラム

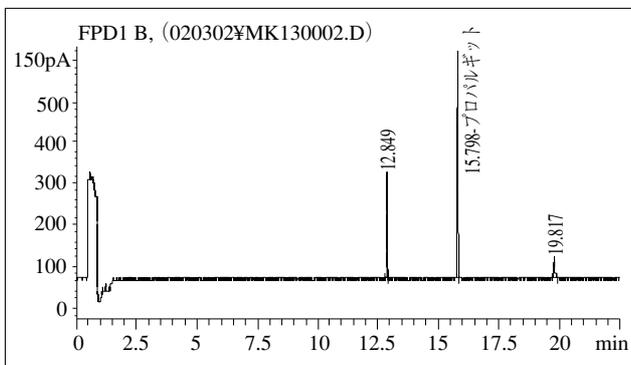


図2 プロパルギット標準品のクロマトグラム

確認試験

ガスクロマトグラフ質量分析計により、検出された農薬の確認試験を行った。

- 装置：アジレントテクノロジー社製 HP6890
- 検出器：日本電子社製 Automass150
- カラム：DB-5
- カラム温度：50℃（2分保持）－20℃/分－280℃（10分保持）
- 注入温度：220℃
- インターフェイス温度：250℃
- イオン源温度：200℃
- イオン化電圧：70eV
- キャリアーガスおよび流量：ヘリウム 1.2mL/分
- 試料注入法：スプリットレス
- 注入量：2μL

図3および4に確認試験における3農薬のクロマトグラムとスペクトルを示した。

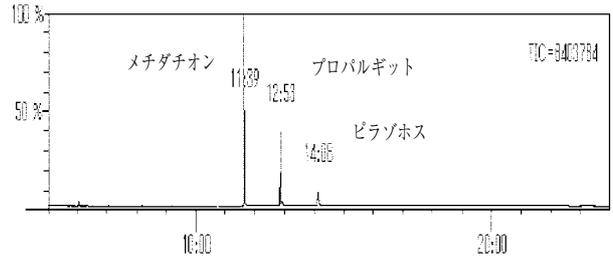


図3 メチダチオン、プロパルギット、ピラゾホス標準品のトータルイオンクロマトグラム

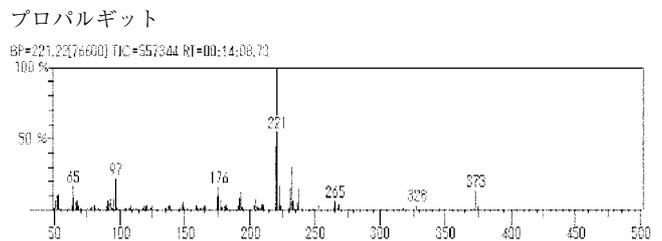
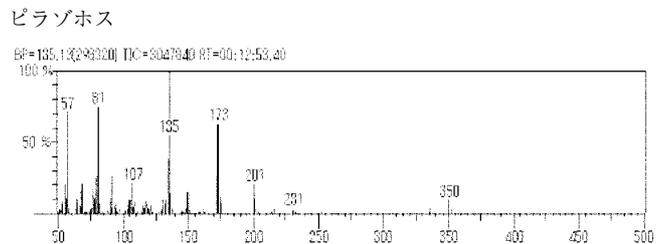
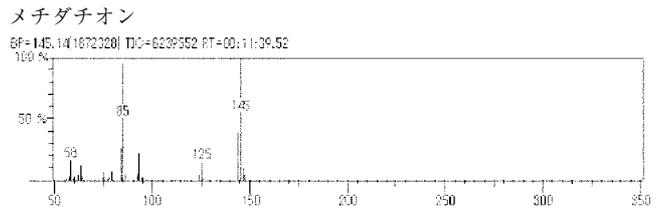


図4 メチダチオン、プロパルギット、ピラゾホスのマススペクトル

結果と考察

試験法の検討

21農産物について、試料20.0gにメチダチオン2μg, ピラゾホス10μg, プロパルギット20μgを添加し、添加回収試験を行った。添加回収率を表1に示した。

メチダチオンでは茶で61.4%, ばれいしよで64.6%, たまねぎで68.5%であったが、その他は80%以上の良好な回収率が得られた。ピラゾホスは、とうもろこしが64.0%, レモンが56.3%, クルミ65.6%, 茶66.2%であったが、その他は70%以上の良好な回収率が得られた。また、プロパルギットでは茶で48.3%となったが、その他は70%以上の良好な回収率となった。

いずれの農薬についても、茶の回収率がやや低かった。茶は食品衛生法の試験法として、その抽出法が熱水抽出

表1 農産物におけるメチダチオン、ピラゾホス、プロパルギットの添加回収率

農産物名	添加回収率 (%)		
	メチダチオン	ピオラゾホス	プロパルギット
小麦	—	81.9	—
とうもろこし	84.8	64.0	72.7
ばれいしょ	64.6	79.2	79.0
キャベツ	98.4	92.4	—
たまねぎ	68.5	76.4	—
トマト	112.8	98.4	70.0
きゅうり	104.0	86.4	111.4
レモン	94.5	56.3	80.0
オレンジ	92.1	73.6	99.7
グレープフルーツ	87.8	85.7	111.9
ライム	89.3	71.9	96.7
マンゴー	90.0	93.6	98.8
バナナ	105.3	92.0	88.2
もも	95.8	90.0	87.4
ブルーベリー	92.3	84.8	92.6
おうとう	106.8	95.7	113.6
クランベリー	115.1	95.9	84.8
ブドウ	96.9	89.6	108.3
アーモンド	79.2	69.6	78.2
クルミ	80.4	65.6	79.4
茶	61.4	66.2	48.3

—未検討

法と直接抽出法の2法が用いられている。本法では直接抽出を用いた。茶は一般に添加回収率が低い傾向にあるため⁶⁾、精度管理における添加回収率のガイドライン(70~120%)を目標とすると、タンニン等の夾雑物による転溶時の抽出効率の低下などについて、さらに検討が必要であった。

以上21農薬について、設定した試験法の適応を検討した結果、モニタリング法として有用であると考えられた。そこで、本法を用いて残留実態調査を行った。

残留実態調査

メチダチオン、ピラゾホスおよびプロパルギットの21農産物、各4検体の残留実態調査の結果を表2に示した。

237検体のうち、マンゴーの4検体中のうちオーストラリア産1検体でメチダチオンが0.04ppm検出された。ピラゾホス及びプロパルギットは、対象となった農産物いずれからも検出されなかった。3農薬は、食品衛生法で基準が設定されていない。FAOによるADI値はメチダチオンは、0.005mg/kg重/日、ピラゾホスは、0.004mg/kg重/日、プロパルギットは、0.15mg/kg重/日である⁴⁾。

表2 農産物におけるメチダチオン、ピラゾホス、プロパルギットの残留調査結果

農産物名	産地	検体数	検出頻度 (検出数/検体数)		
			メチダチオン	ピオラゾホス	プロパルギット
小麦	アメリカ, カナダ, オーストラリア	5	—	0/5	—
とうもろこし	中国, オーストラリア	4	0/4	0/4	0/4
ばれいしょ	アメリカ	4	0/4	0/4	0/4
キャベツ	中国	4	0/4	0/4	—
たまねぎ	オーストラリア, フランス, ニュージーランド, ベルギー	4	0/4	0/4	—
トマト	カナダ, ニュージーランド, オランダ, アメリカ	4	0/4	0/4	0/4
きゅうり	韓国	4	0/4	0/4	0/4
レモン	アメリカ, チリ	4	0/4	0/4	0/4
オレンジ	アメリカ	4	0/4	0/4	0/4
グレープフルーツ	アメリカ, 南アメリカ	4	0/4	0/4	0/4
ライム	メキシコ	4	0/4	0/4	0/4
マンゴー	オーストラリア, フィリピン	4	1/4 ^{*1}	0/4	0/4
バナナ	台湾, メキシコ, 中国, フィリピン	4	0/4	0/4	0/4
もも	韓国	4	0/4	0/4	0/4
ブルーベリー	アメリカ	4	0/4	0/4	0/4
おうとう	アメリカ	4	0/4	0/4	0/4
クランベリー	アメリカ	4	0/4	0/4	0/4
ブドウ	チリ	4	0/4	0/4	0/4
アーモンド	アメリカ	4	0/4	0/4	0/4
クルミ	アメリカ	4	0/4	0/4	0/4
茶	台湾, 中国	4	0/4	0/4	0/4

—未検討

* 1 0.04ppm

検出されたメチダチオンは、マーケットバスケット方式による農薬の摂取量調査において、平成3～10年度の平均1日摂取量が $1.16\mu\text{g}$ と報告されており⁵⁾、また本検出値のADI値に対する割合は0.46%となる。検出例のあったマンゴーについてはさらに市販品を4検体採取し、メチダチオンの分析を行った。再試験を行ったサンプルは、フィリピン産3検体およびタイ産1検体であり、オーストラリア産のマンゴーは入手できなかった。その結果、いずれのサンプルも不検出であった。また、厚生労働省による平成11年度の調査結果では、輸入マンゴー8検体の検査の結果は不検出であった⁵⁾。一方、使用される農薬は農産物の原産国での入手し易さなどによって特定される事から、検出例のみられた農産物については原産国を特定した調査が必要と考えられた。

まとめ

農産物におけるメチダチオン、ピラゾホス、プロパルギットの同時分析法を設定し、21農産物について実態調査を行った。オーストラリア産のマンゴーからADI値の0.46%のメチダチオン0.04ppmが検出された。

(平成15年8月14日受理)

文献

- 1) 農薬環境保全対策研究会編：残留農薬基準ハンドブック，化学工業日報社，948-950，東京，1995
- 2) 農薬残留分析法研究班編：最新農薬の残留分析法中央法規出版，526-528，東京（1955）
- 3) Ambrus et al: General Mehtod for Determination of Pesticide Residues in Samples of Plant Origin, Soil, and Water. III. Gas Chromatographic Analysis and Confirmation, J. Assoc. Off. Anal. Chem. Vol.64, No.3, 749-768 (1981)
- 4) 上杉康彦編：第3版 最新農薬データブック，ソフトサイエンス社（1997）
- 5) 厚生労働省医薬局食品保健部基準課：食品中の残留農薬（13年度版）厚生労働省，東京（2002）
- 6) 佐藤久美子ら：農産物中のシクロプロトリン残留分析法の検討，第38回全国衛生化学技術協議会年会講演集，38-39（2001）

短報

食品中のサイクラミン酸分析法の比較と改良

山田利治, 土屋久世

Comparison and Improvement of Cyclamic Acid Analysis in Foods

Toshiharu YAMADA and Hisayo TSUCHIYA

はじめに

サイクラミン酸は我が国で1969年に禁止されて以来、食品への使用が認められていない。しかし、中国をはじめ台湾、ヨーロッパ諸国では使用を許可されており、サイクラミン酸使用食品が輸入される可能性が高い。当県では毎年輸入加工食品の指定外添加物の行政検査を実施しているが、平成12年には中国産の穀物加工食品からサイクラミン酸0.53g/kgを検出している。

食品中のサイクラミン酸の主な分析法としては衛生試験法・注解¹⁾(以下、衛試法と略)と第2版食品中の食品添加物分析法²⁾(以下、食添法と略)の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた方法がある。当所は1997年4月の食品衛生検査施設の業務管理(GLP)制度導入以後、サイクラミン酸の標準操作手順書(SOP)として衛試法を使用してきた。しかし、検査の信頼性確保のために行う精度管理を実施する際に、回収率の低い食品が見受けられるようになり、その原因を明らかにするために検討を行った。さらに、食添法についても若干検討を加えたので報告する。

実験方法

1. 試料 輸入食品および国内産食品

2. 試薬および標準溶液 サイクラミン酸ナトリウム(シクロヘキシルアミドスルホン酸ナトリウム)は和光純薬製特級品を、アセトニトリル、メタノールは和光純薬製HPLC用を、次亜塩素酸ナトリウム溶液は和光純薬製化学用(有効塩素5.0%以上)を、その他はすべて和光純薬製特級品を使用した。

標準原液: サイクラミン酸ナトリウム112.3mgを正確

に量り、水を加えて溶解し正確に100mL(サイクラミン酸として1000 μ g/mL)とした。

標準溶液: 標準原液10mLをとり、水を加えて正確に100mL(サイクラミン酸として100 μ g/mL)とした。

検量線: 標準溶液0, 1, 2, 10, 20及び50mLを各々正確にとり、水を加えて各々正確に100mL(0, 1, 2, 10, 20及び50 μ g/mL)とし、それぞれ10mLをとり反応操作した後、それらの20 μ LをHPLCに注入し、検量線を作成した。

3. 固相抽出カートリッジ

メガボンドエルートC18 (2g/12cc), バリアン社製

4. HPLC装置及び測定条件

装置: HITACHI L-6000型ポンプ, L-4200UV-VIS検出器, L-5030カラムオープン, D-2520クロマトデータ処理装置及びレオダイン社製7175インジェクター

カラム: Inertsil ODS-3V (粒径5 μ m, 4.6mm i.d.×250mm) ジーエルサイエンス社製, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 移動相: メタノール・水(85:15), 流速: 1.0mL/min, 検出波長: 314nm, 注入量: 20 μ L

5. 試験法

二つの試験法の概略はフローチャートとして以下に示した。

① 衛試法

試料20g

透析チューブに入れ, 透析補助液25mL
透析外液(透析補助液)

全量200mL

24~48h室温, 透析
透析外液25mL

0.1mol/L TBA溶液5mL
リン酸塩緩衝液20mL

C18カートリッジに負荷

水30mLで洗浄

アセトニトリル・水(3:7)混液10mLで溶出
溶出液(分液ロート)

50%硫酸2mL

n-ヘキサン5mL

次亜塩素酸ナトリウム溶液(2倍希釈)1mL
1分間振とう

n-ヘキサン層

5%炭酸水素ナトリウム25mL

1分間振とう

n-ヘキサン層

HPLCに注入

② 食添法

試料 10g
 | 水 30～40mL
 | 水浴上で15分間加温
 水で全量 100mL
 | 遠心分離あるいはろ過
 抽出液 10mL (分液ロート)
 | 50%硫酸 2mL
 | n-ヘキサン 5mL
 | 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (2倍希釈) 1mL
 | 1分間振とう
 n-ヘキサン層
 | 5%炭酸水素ナトリウム 25mL
 | 1分間振とう
 n-ヘキサン層
 |
 HPLCに注入

結果および考察

① 衛試法の検討

厚生省通知 (平成9年4月1日 衛食第117号) の「精度管理の一般ガイドライン」に従って、輸入食品のぶどうジュース 20g にサイクラミン酸 800 μ g を添加し (40 μ g/g), 操作法に従って回収率を求めたところ、平均値 55.7%, 標準偏差 6.1 (n=5) と低い回収率であった。

透析操作をしないで同様に回収率を求めたところ、平均値 55.9%, 標準偏差 4.3 (n=5) とほぼ同様の回収率を示した。精製用溶液を C18 カートリッジに負荷した時の溶出液、水 30ml 洗浄溶液の何れにも反応生成物は溶出されなかった。また、C18 カートリッジを使用しないで反応操作のみを行ったときは、ほぼ 100% の回収率であった。これらの結果から、原因は C18 カートリッジにあることが示唆された。

そこで、ロットの異なるカートリッジを用い、水 5g にサイクラミン酸 100 μ g を添加した溶液 (20 μ g/g) を C18 カートリッジに負荷し、操作を行い反応させて回収率を比較した。表 1 に示したように明らかにロット間に差のあることがわかった。

なお、Lot 070733 を用いてあらためてぶどうジュースへ添加した試験では、平均値 86.4%, 標準偏差 4.2 (n=5) と水に添加したときとほぼ同じ回収率であった。

従って、C18 カートリッジを使用するときは必ずロットごとにバリデーションをとってから使用することが望ましい。

② 食添法の検討

抽出操作が簡便なため、共存物質の多いことが予想さ

表 1 C18 カートリッジのロット差によるサイクラミン酸の回収率

	(%)	
No	Lot 072012	Lot 070733
1	62.0	86.5
2	64.5	82.5
3	64.0	89.5
平均	63.5	86.2
標準偏差	1.3	3.5

れ、反応操作のところでいろいろな妨害が考えられるので各種の食品について添加回収試験を行った。

ソフトさきいかとしば漬けを除いた食品が、反応操作の 1 分間振とう後にエマルジョンを形成した。n-ヘキサン層と水層を分離させるため、フタ付き遠沈管を用い冷却遠心分離 (5℃, 3000rpm, 5min) を行い分離したところ、回収率はぶどうジュース 106.0%, いちごジャム 104.0%, ビスケット 114.5%, プルーン 119.0% など 100% を越える値となり、n-ヘキサンの揮散によることが推定された。そこで、遠心分離操作に替わる方法として、エタノールを使用してエマルジョンを消失させる方法を検討した。エマルジョンの程度に応じてエタノールを 0.5～1.5mL 加えることにより、n-ヘキサン層との分離が容易になった。エタノール自体は水層に移行し、n-ヘキサン層の反応生成物の回収率に影響を与えなかった。

この方法を使用して、回収率を求めた結果を表 2 に示した。また、これらの食品において HPLC のクロマト上に妨害となるピークはみられず良好な結果が得られた。

表 2 各種食品からのサイクラミン酸の回収率

食品名	添加量 (μ g/g)	回収率 (%) *
ぶどうジュース	100	98.9 \pm 1.7
いちごジャム	100	95.8 \pm 2.2
ビスケット	100	99.5 \pm 0.9
プルーン	100	87.8 \pm 3.3
チョコレート	100	98.5 \pm 2.1
ソフトさきいか	100	97.5 \pm 1.8
しば漬け	100	92.5 \pm 1.6
乾燥梅	100	99.3 \pm 1.5
しょう油	100	92.2 \pm 2.4

* 平均値 \pm S.D. (n=3)

まとめ

1. 衛試法は C18 カートリッジの保持力がロット間によって異なるため、使用するときは必ずバリデーションをとったものを使用することが望まれる。

2. 食添法は操作が簡便であるが、反応操作のところでエマルジョンを形成する食品が多いため、エタノールを使ってエマルジョンを消失させ、分離させる方法が有効であることがわかり、良好な回収率が得られた。

3. 回収率，操作時間，経済性等の点から食添法は衛試法に比べ，サイクラミン酸のSOPとして有利と考えられる。

(平成15年8月14日受理)

文 献

- 1) 日本薬学会編,衛生試験法・注解, 金原出版, 323-326 (2000)
- 2) 日本食品衛生協会編, 第2版食品中の食品添加物分析法, 362-365 (2000)

短報

水道原水への内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) 供給源としての 底泥の評価

上村 仁, 辻 清美, 伊藤伸一

The Evaluation of Sediment as Source of Endocrine Disrupters to Raw Water for Water Supply

Hitoshi UEMURA, Kiyomi TSUJI
and Shin-ichi ITOH

はじめに

水道水源となる湖沼の堆積物(底泥)は、湖周辺の土壌粒子、湖沼中の生物やその遺骸が沈殿、堆積したものである。これらの物質は水中を沈降する間に各種の化学物質を吸着し、水中から除去する作用を持っている。その結果として、湖環境において底泥は圧倒的に多量の化学物質を蓄積している。一方、浚渫や洪水時の巻き上がり、底泥表面付近の環境等によっては溶出を起こすことで汚染物質の供給源となる可能性も併せ持つ。水源において溶出が起きた場合、これらの化学物質が取水され、飲料水汚染を引き起こすことが懸念される。

筆者らは水道水源である津久井湖において、湖水中の窒素の65%近くが底泥からの溶出に由来することを窒素安定同位体比を用いることにより推定した^{1) 2)}。内分泌攪乱物質においても窒素と同様に底泥がその供給源として重要な役割を果たしているのかを明らかにすることを目的とした。

対象とした内分泌攪乱物質は、これまで神奈川県が水道原水のモニタリングを行ってきた中で、検出報告のある物質の一部(4-tert-オクチルフェノール、4-tert-ブチルフェノール、4-ノニルフェノール(以上、アルキルフェノール類)、ビスフェノールA、ベノミル)とし、平水時と洪水時における底泥からの溶出を想定した。

方法

1. 試料採取

底泥試料は津久井湖の湖心部よりエクスマンバージ採泥器を用いて採取した。湖水試料は表層水については船上より直接ガラス瓶に採取し、水面下の湖水(水深15mおよび30m)についてはバンドン採水器により採取し、ガラス瓶中に保存した。持ち帰った試料は冷蔵(4℃)にて試験まで保存した。

2. 試薬

4-tert-オクチルフェノール、4-tert-ブチルフェノールは和光純薬製標準品を、ベノミルは分解物であるカルベンダジムの和光純薬製標準品を、ビスフェノールAは関東化学製標準品を、4-ノニルフェノールは関東化学製(化成品)を使用した。塩化ナトリウムは和光純薬製試薬特級を電気炉中で500℃5時間加熱したもの、硫酸、水酸化ナトリウムは和光純薬製特級試薬、塩酸は和光純薬製アミノ酸自動分析用試薬をジクロロメタンで洗浄したものの、カラムクロマトグラフィー用シリカゲルはMalinckrodt社製、n-ヘキサン、酢酸エチル、ジクロロメタン、メタノールは和光純薬製残留農薬試験用(5000倍)、アセトニトリル、蒸留水は和光純薬製高速液体クロマトグラフィー用をそれぞれ使用した。

3. 抽出操作

水試料からのベノミル抽出方法は環境庁(当時)により示された方法³⁾および既報⁴⁾に従った。この方法は条件を変えて3回の抽出を行っており、抽出過程で十分に精製も行われていると考えられた。

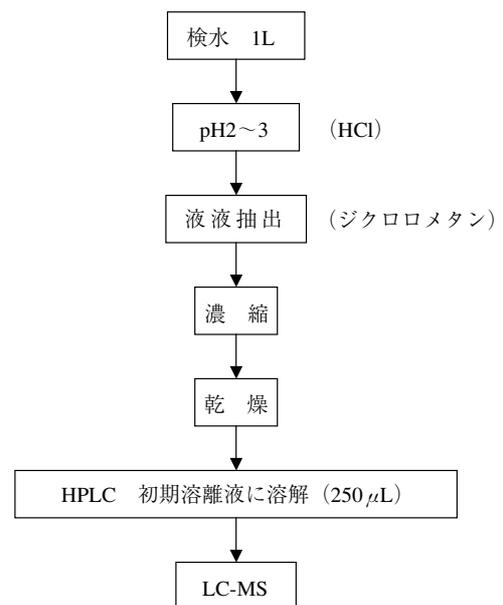


図1 アルキルフェノールおよびビスフェノールA抽出法(従来法)

一方、アルキルフェノール類やビスフェノールAについては従来は図1のような抽出法を用いてきた。この方法では抽出過程に精製操作が含まれていないため、底泥からの溶出物等の溶存物質が多い試料では夾雑物による妨害を受けたり、測定装置を汚染することが懸念された。そこで、抽出後にシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製操作を加え、図2のような抽出法を開発した。微量の目的物質を分画することを考慮し、シリカゲルカラムにおける損失（回収率の低下）を回避するために、カラムサイズの縮小を図った。すなわち、クロマト管にはパスツールピペット（内径約5.5mm）を利用し、少量の石英ウール（500℃程度で加熱して有機物を除去した物）を詰めた後、n-ヘキサンに懸濁した5%含水シリカゲルを50mm程度充填して使用した。このカラムは、n-ヘキサン2mLで溶出する画分にアルカン類が、ジクロロメタン2mLで溶出する画分にアルキルフェノール類が、ジクロロメタン/メタノール（4：1）2mLで溶出する画分にビスフェノールAが出現した。よって、第一画分を廃棄し、第二、第三画分を採取し、溶媒を留去後LC/MSの初期溶離液250μLに溶解して測定溶液とした。なお、各々90%以上の回収率が得られた。

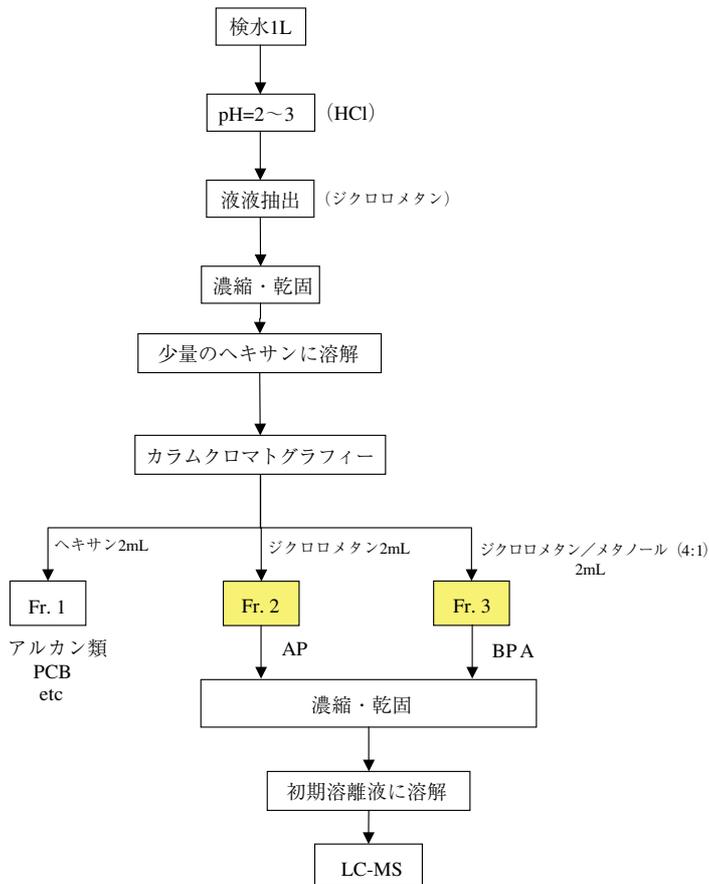


図2 新たに開発したアルキルフェノールおよびビスフェノールA抽出法

4. 測定

抽出後、LC/MSを用いて各物質の濃度を測定した。測定条件は既報^{4) 5)}に若干の修正を加え、以下の通りとした。

<HPLC条件>

- ・高速液体クロマトグラフ：Waters製 2690
- ・カラム：
 - [ペノミル]
 - Waters製Symmetry RP-18 (2.1mm φ×150mm)
 - [アルキルフェノール類およびビスフェノールA]
 - 日本分光製 Crest Pak C18 (2.1mm φ×150mm)
- ・溶離液：
 - [ペノミル]
 - 水/アセトニトリル (9:1) → (20min) → 水/アセトニトリル (2:8) (10min 保持) (直線グラジエント溶出)
 - [アルキルフェノール類およびビスフェノールA]
 - A (100%) → (10min) → B (100%) (10min 保持) (直線グラジエント溶出)
 - A: アセトニトリル/メタノール/水 (40:20:40)
 - B: エタノール
- ・流量：0.2mL/min
- ・注入量：10μL

<MS条件>

- ・質量分析計：Micromass製 Quattro LC
- ・キャピラリー電圧：3kV
- ・desolvation gas：窒素 (350℃)
- ・イオン源温度：130℃
- ・collision gas：アルゴン
- その他のMS条件は表1にまとめた。

5. 溶出実験

洪水時の底泥の巻き上げを想定して溶出実験を行った。1Lのガラス製ねじ口びんに湖水（表層水）を満たし、底泥10gを添加してマグネチックスターラーを用いて25℃の恒温室中で一昼夜激しく攪拌した。その後、底泥を遠心分離し、上清を前述の方法で処理して、溶出実験前後の目的物質の濃度を測定した。なお、試料採取の都合上、溶出用の湖水と鉛直分布調査用の湖水は試料採取日の異なる検体を使用した。

結果

1. 津久井湖における鉛直濃度分布

津久井湖の表層（水深0m）、中層（水深15m）、湖底部（水深30m）における各物質の濃度は図3のような分布を示した。ノニルフェノールと4-tert-ブチルフェノール

表1 質量分析部の測定条件

	イオン化モード	cone電圧	前段四重極 選択質量数	コリジョン エネルギー	後段四重極 選択質量数
ベノミル	ポジティブ	30V	191.9	20eV	159.8
ビスフェノールA	ネガティブ	40V	226.8	18eV	211.8
4-tert-ブチルフェノール	ネガティブ	40V	148.8	8eV	148.7
4-tert-オクチルフェノール	ネガティブ	45V	204.9	24eV	132.7
ノニルフェノール	ネガティブ	45V	218.9	30eV	132.7

ルは下部において濃度上昇が見られ、底泥から湖水への溶出が起きていることをうかがわせた。一方、ベノミルは表層部濃度に比較して中層以下では低濃度になっており、むしろ湖水から底泥への吸着が起きている可能性を示した。ビスフェノールAは顕著な傾向を示さなかった。また、用いた湖水試料からは4-tert-オクチルフェノールは検出されなかった。

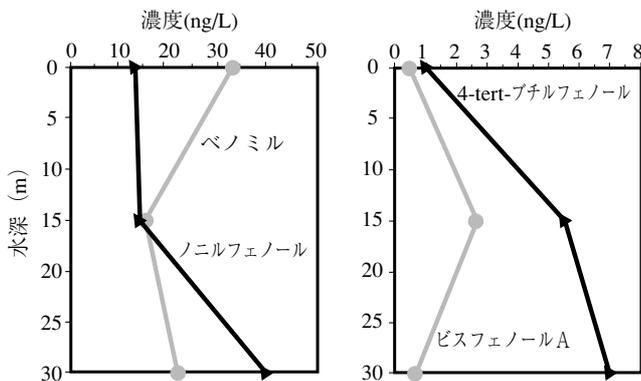


図3 津久井湖水中における濃度の鉛直分布

2. 底泥からの溶出

溶出実験の結果を表2に示した。

ベノミルは溶出実験後の濃度が著しく減少した。ビスフェノールA、4-tert-ブチルフェノール、4-tert-オクチルフェノール濃度は実験後に増加を示した。ノニルフェノールは若干濃度の減少が見られたが、はっきりとした傾向は示さなかった。

表2 各物質の溶出実験前後の濃度

	濃度 (ng/L)	
	溶出前	溶出後
ベノミル	22.36	9.66
ビスフェノールA	1.61	85.47
4-tert-ブチルフェノール	0.11	0.24
4-tert-オクチルフェノール	1.56	8.09
ノニルフェノール	19.29	14.71

考 察

ベノミルは溶出実験の結果、むしろ底泥に吸着されていることが示唆された。これは、津久井湖水中において底層部で低濃度を示す状況と合致する。4-tert-ブチルフェノールは溶出実験において底泥から湖水への溶出傾向を示した。これは、津久井湖水中において底層部で高濃度を示す状況と合致する。

一方、ビスフェノールAは溶出実験では顕著な溶出挙動を示したが、実際の湖中ではこれに合致するような傾向は見られなかった。ノニルフェノールは実際の湖中では底泥から湖水への溶出傾向を示したが、実験室内の溶出実験ではこれを裏付けるような実験結果は得られなかった。このようなモデル実験と実環境における状況の違いは、底泥表層付近の環境（溶存酸素、酸化還元電位等）の違いによる可能性が考えられたが、今後の検討が必要である。

まとめ

ビスフェノールA、アルキルフェノール類について、抽出・精製法を確立した。パスツールピペットをクロマト管として利用した5%含水シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製が可能で回収率も良好であった。ベノミルは実試料、溶出実験のいずれでも湖水から底泥への吸着が示唆された。4-tert-ブチルフェノールは実試料、溶出実験のいずれでも底泥から湖水への溶出が示唆された。ビスフェノールAとノニルフェノールについては実試料における濃度分布と溶出実験における挙動は必ずしも一致せず、溶出挙動の解明にはさらに検討が必要であると考えられた。

ビスフェノールAやアルキルフェノール類については、条件次第では底泥から湖水への溶出が起き、水道原水への環境ホルモン供給源となる可能性は否定できず、今後も引き続き監視や検討が必要であると考えられた。

(平成15年8月14日受理)

文 献

- 1) 上村仁：湖水の富栄養化の機構解明に関する研究一

- 底泥及び沈降物が富栄養化に及ぼす影響に関する研究一，平成11年度科学技術総合研究委託費 地域先端研究 研究成果報告書，pp.39-46 (2000)
- 2) 上村仁：津久井湖水中の窒素起源推定への安定同位体比の利用，水道協会雑誌，**808**, 36-41 (2002)
- 3) 環境庁水質保全局水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（水質，底質，水生生物），平成10（1998）年10月
- 4) 上村仁，節田節子：LC-MS/MSを用いた水中のベノミルの高感度分析，神奈川県衛生研究所研究報告，**29**, 36-38 (1999)
- 5) 上村仁，節田節子：水中のビスフェノールA超微量分析法の検討，神奈川県衛生研究所研究報告，**30**, 11-16 (2000)

資料

ウエストナイルウイルスの
検査体制について

齋藤隆行, 佐藤利明, 古屋由美子, 今井光信

Testing of West Nile Virus

Takayuki SAITO, Toshiaki SATO,
Yumiko FURUYA and Mitsunobu IMAI

ウエストナイルウイルス (WNV) は, フラビウイルス科フラビウイルス属に属し, 主としてイエカ属により媒介され, 脊椎動物の主な宿主はヒト, 馬, 鳥である. 同じ属に日本脳炎ウイルスやセントルイス脳炎ウイルス等が属する. WNVは, 1937年にウガンダのWest Nile地方の女性発熱患者から初めて分離されアフリカ, 中央アジア, ヨーロッパ, 中東, オーストラリアなどの地域にウエストナイル熱を引き起こしている. 1999年には, それまでWNV感染が報告されていなかった米国ニューヨーク州で, WNV感染による脳炎が流行した. その後, 米国各州に流行が拡大しヒト, 馬, 鳥等にWNV感染が確認され, ヒトおよび鳥で多数の死亡が報告されている. 日本ではウエストナイル熱の発生はみられていないが, WNVが日本に入り込む可能性について注意が必要である. このような背景から2002年11月1日よりウエストナイル熱 (ウエストナイル脳炎を含む) が感染症法の四類全数把握疾患に追加された (平成14年10月29日付け「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行規則の一部改正について」健発第1029005号).

神奈川県において, 2002年10月綾瀬市本蓼川の墓園内および周辺地域でカラスの多数死亡事例が発生した. カラスが自然死した場合の死骸はほとんど目に触れることはないが, 時に大量死や毒餌によると思われるような不審死が発見されることがある. ウエストナイル熱はヒトでの流行に先行してカラス等の鳥類に流行が見られることが報告されている¹⁾ ことから, WNVの検査を実施することとなった.

図1に墓園内でのカラスの死骸発見状況および検体の流れを示す. 2002年10月10日から15日にわたり40羽の

カラスの死骸が発見された. 40羽のうち6羽のカラスが衛生研究所に搬入された. 国立感染症研究所 (感染研) に検体を送付すると同時にWNV遺伝子検出用プライマーセットの分与を受け, 感染研と並行してRT-PCR法によるWNV遺伝子の検出を実施した. 脳, 腎臓, 肝臓についてWNV遺伝子の検出を試みたがいずれも不検出 (感染研の結果と一致) であった.

その後, 同墓園内で衰弱していたカラスや死亡カラスについて, 検体の受け入れから結果報告までのシミュレーションを実施し, 7項目 (I 検査の受け入れについて, II 検体の保存・搬入について, III 器具・器材等の準備について, IV 搬入後の検査の進め方, V 検査試料分割の手順について, VI 剖検記録について, VII 書類の作成について) から成る「カラスの不審死に係る検査マニュアル」(案)を作成した.

以下, WNV検査に関する留意事項について述べる.

1999年の米国ニューヨーク州におけるWNV感染によるカラスの衰弱あるいは死亡数調査において, 87.4%が単独で発見されており, 複数 (2~100羽) で発見される場合でも平均は2.8羽であることが報告されている¹⁾. 検査受け入れの際には, 死亡カラスの発見場所の詳細な現場状況調査情報が重要な役割を担う.

WNV遺伝子検査を実施するには, できるだけ新鮮な臓器材料を必要とするため, 死亡後24時間以内と推測され, 腐敗していないカラスが検体として望ましい. また, 発見後速やかに搬入できない場合は, -80℃ (やむを得ない場合は-20℃以下) で凍結保存し, 搬入する.

WNV遺伝子検査材料には脳, 心臓, 腎臓, 肝臓, 脾臓を採取する. 採取できれば血液も検査材料とする. WNVの遺伝子はRNAでRNase等により影響されやすいため, 剖検時これらの臓器の腐敗状況等を注意深く観察することは, 遺伝子検査結果判定の参考になるであろう. また, 臓器を材料とした場合の遺伝子検査においては, 目的外産物が生じやすいので, 検体処理や結果判定を慎重に行う必要がある.

現時点で, 日本においてWNVの侵入は確認されていないが, 飛行機内に紛れてWNVを保有した蚊が入り込んだり, WNVに感染した渡り鳥や輸入鳥の侵入などWNVの日本上陸の可能性が懸念される.

以上の留意事項をふまえて, 今後, WNV遺伝子検査の精度をあげる等WNV検査体制を整備・強化していきたい.

参考として, 現在の神奈川県のカラスのウエストナイル熱に対する対応を図2に示す.

(平成15年8月14日受理)

参考文献

1) Eidson M., Komar N., Sorhage F., Nelson R., Talbot T. and Mostashari F. et.al : Crow deaths as a sentinel

surveillance system for West Nile virus in the northeastern United States, 1999., Emerg. Infec. Dis.,7 (4), 615-620 (2001)

墓園内死亡カラス

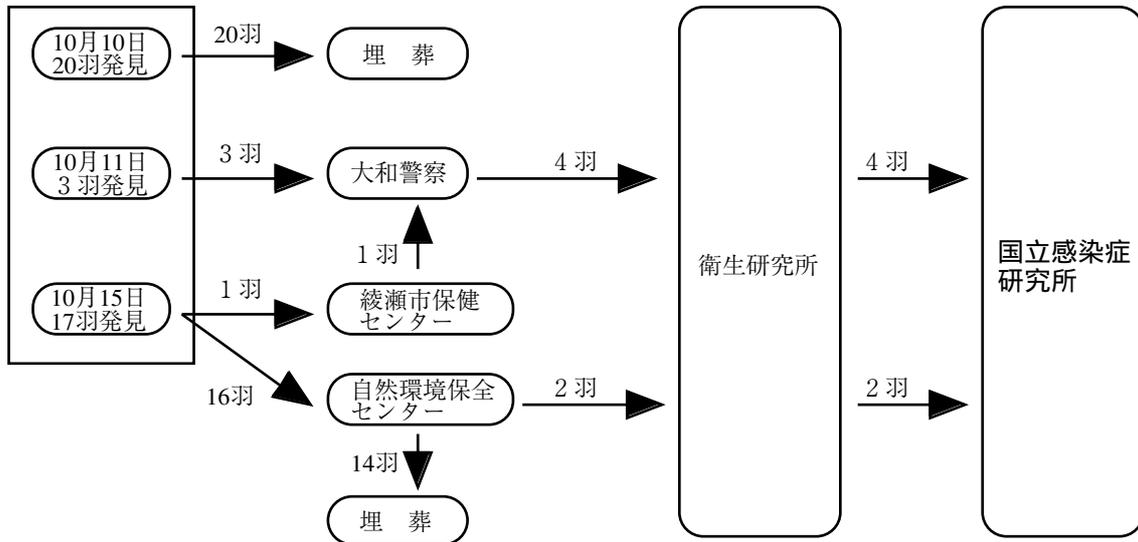


図1 綾瀬市本蓼川墓園内のカラスの死亡状況および検体の流れ

資料

最近10年間に実施した
害虫獣等の検査結果

稲田貴嗣, 竹田 茂

Examination of Noxious
Arthropods and Vertebrates
for the Last Ten Years

Takatsugu INADA and Shigeru TAKEDA

私たちが生活している周りには様々な生物が生息しており、日本では昆虫綱だけでも約29000種が報告されている。それらの中には人や住宅に重大な害を与える生物がいる。また、近年では直接人体に害はないが、不快感を与える虫（不快害虫）が問題になることも多い。そのような虫やネズミ（糞を含む）などが食品中や屋内・庭などの住環境中から見つかったとき、県民（事業所を含む）から直接、または保健福祉事務所（以下、HWC）を介して、何という名の生物で、人体や建材などに害はないか、どう対処すればよいか教えてほしいと当所に検査依頼がくる。今回、そのような検査依頼を受けて実施した平成5年度から平成14年度の10年間の検査結果について報告する。検査件数は報告書を発行した件数で、電話相談のみで終了したケースなどは含まない。

食品（原材料を含む）等への異物混入に関連して受けた検査依頼は10年間に215件（行政依頼：107件、一般依頼：108件）で、節足動物（15目）のほかネズミ、人毛などであった（表1, 2）。例年、行政依頼、一般依頼共に約10件の食品異物に関連する検査依頼があるが、異物混入事件がメディアで大きく取り上げられた12年度は59件（行政依頼：28件、一般依頼：31件）で、事件の影響をうけて急激に増加した。13年度は、一般依頼は平年並みの8件に減少したが、行政依頼は17件と多い状況が続いた。12年度以降は苦情者が企業の回答だけで納得せず、同時にHWCへ検査に持ち込む傾向が見られた。

10年間で混入件数が最も多かった節足動物はチョウ目（鱗翅目）45件（20.9%）、次に甲虫目（鞘翅目）40件（18.6%）、3番目にハエ目（双翅目）39件（18.1%）で、

これら3目で食品に関係する全依頼数の約60%を占めた。ネズミに関する検査は事業者が持ち込むケースが多く（10件）、苦情者がHWCを介して依頼してくるケースは少なかった（2件）。逆に、人毛の混入は苦情者がHWCに届け出るケースが多く（7件）、事業者が持ち込むケースは1件のみであった。

食品への異物混入は、いつ、どこで混入したかが重大な問題となる。しかし、持ち込まれた検体の状態からそれを特定するのは非常に難しい。近年では海外で製造された製品に節足動物などが混入していたケースも見られる。昆虫の仲間は世界中に広く分布している種も多く、混入時期および場所の特定はより難しくなっている。さらに、全く関連が見られないものが混入することがある。例えば、コイの歯（下咽頭歯）が豚肉製品に混入していた事件がありHWCが販売店などを調査したが、それらの接点は見つからなかった。

住環境中に発生した虫などの検査依頼は245件（行政依頼：91件、一般依頼：154件）で、節足動物（20目）とネズミやコウモリ（糞）などが見られた（表3, 4）。それらは、実害にあつて検査に持ち込まれたケースより、人体や住宅に害はないかという不安から持ち込まれたケースが多かった。またメディアの影響を受けて検査依頼が増加したケースも見られた。例えば9年度は横浜でハイロゴゲグモが見つかったことが大きく報じられ、虫に過敏になった人が増えたため依頼検査が増加した。13, 14年度も、12年度におきた食品異物混入事件の影響で、住環境中の虫に対しても過敏に反応する人が増え、さらに苦情者が行政による調査結果を事業者に求める傾向があったため事業者による依頼が特に増加した。

10年間で最も相談が多かったのは甲虫目78件（31.8%）、次にハエ目44件（18.0%）で、これら2目で住環境に関する全依頼数のほぼ半数を占めた。シロアリはほとんどの場合、有翅虫（女王アリ、雄アリ）が持ち込まれた。シロアリの有翅虫は体色が黒く、一般に持つシロアリのイメージと異なることから、アリまたはハエがたくさん窓の外で死んでいたとして相談されることが多かった。また、ミツバチや小型のハチがハエではないかと持ち込まれることも多かった。コウモリ目（糞）は、すべてネズミの糞ではないかと相談を受けたもので、軒下などにまとまって見つかるケースが多かった。

食品の異物混入に関する検査依頼も、住環境に関する検査依頼も、検体の大部分が節足動物であったことから、依頼件数は春から夏、秋にかけて増え、冬に減少する節足動物の活動にほぼ一致した変動を示した（図1, 2）。節足動物がほとんど活動しない冬期でもメイガの越冬幼虫などが見つかることがあり、食品への混入事件は一年

中発生していた。また住環境でも冬期にカメムシが持ち込まれることがあった。これは冬期に孵化するカイガラムシの仲間、他にあまり虫が活動しない時期に庭木などに小さな虫が集団で現れるために目立ち、不快感を与

えたと思われる。また、ハエ目ユスリカ科の仲間には冬期に羽化する種類があり、それらが住宅地に集まったことによって騒動になったケースもあった。

(平成15年8月14日受理)

表1 年度別行政依頼件数（食品異物）

種類	種類	年度										計
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
節足動物	チョウ目	1	3	1	2		1	1	6	5	3	23
	甲虫目	1			1	1	2	4	7	1		17
	ハエ目			2		5	2		7	4	1	23
	ハチ目		1	1					2	2		6
	ゴキブリ目	1	1						1	2	1	6
	カメムシ目				1							1
	その他*1	1				1					1	3
脊椎動物	ネズミ目		1							1		2
	人毛				1			1	3		2	7
	その他*2	1									1	2
その他*3		1	1	4	1		1	1	1	1	11	
不明			2	1		2		1			6	
計		5	9	8	10	7	7	7	28	17	9	107

*1：クモ目，ダニ目，トンボ目；*2：魚類；*3：寄生虫，ナガミミズ目，植物，原材料，繊維

表2 年度別一般依頼件数（食品異物）

種類	種類	年度										計
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
節足動物	チョウ目	2	4	4	3	2		2	4		1	22
	甲虫目		9	1		1	3		8		1	23
	ハエ目			1	5	2	1	2	2	2	1	16
	ハチ目		1						3			4
	ゴキブリ目				1				1		1	3
	カメムシ目			1		1			2			4
	その他*1		1		1		1		2			5
脊椎動物	ネズミ目			1		1	1	1	5	1		10
	人毛									1	1	2
	その他*2				1					1		2
その他*3	1	1		3	1	1	1	4	2		14	
不明				2	1				1		4	
計		3	16	8	16	9	7	6	31	8	4	108

*1：クモ目，カワゲラ目，シロアリ目，チャタテムシ目，バッタ目

*2：動物毛，鳥類；*3：寄生虫，植物，原材料，繊維，菌類，無機物

表3 年度別行政依頼件数（住環境）

種類	種類	年度										計
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
節足動物	甲虫目	4	1	1	2	2		1	3	8	3	25
	ハエ目			1		4	1	1	7	2	1	17
	ハチ目		1	1		2			2	4	2	12
	チョウ目		1			1		2	1	3	2	10
	チャタテムシ目	1				1					1	3
	カメムシ目								1	3	1	5
	ダニ目	2			1	1					2	6
	シロアリ目										1	1
	クモ目					3						3
	トビムシ目										1	1
脊椎動物	その他*1		1	1			2					4
	コウモリ目				1					2		3
その他*2											1	1
計		7	4	4	4	14	3	4	14	22	15	91

*1：アザミウマ目，ゲジ目，シミ目，ノミ目；*2：ウズムシ目

表4 年度別一般依頼件数（住環境）

種類	年度											計
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
節足動物												
甲虫目	1	7	3	2	4	9	2	9	8	8	53	
ハエ目		1		2	6	4		1	5	8	27	
ハチ目					1	1	1	1	2	3	9	
チョウ目				1	2	1	1		1	3	9	
チャタテムシ目		1	1			5	1		2	1	11	
カメムシ目					2				3	1	6	
ダニ目										3	3	
シロアリ目	1	1	1						1		4	
クモ目									1		1	
トビムシ目					1					1	2	
その他*1		1				2	1			1	5	
脊椎動物												
ネズミ目	1		2	1		1	5				10	
コウモリ目						1	2		2		5	
動物毛	1									1	2	
その他*2		2									2	
不明								1		2	2	
計	4	13	7	6	16	24	14	11	27	32	154	

*1：イシムカデ目，オビヤスデ目，カゲロウ目，ミジンコ目；*2：植物

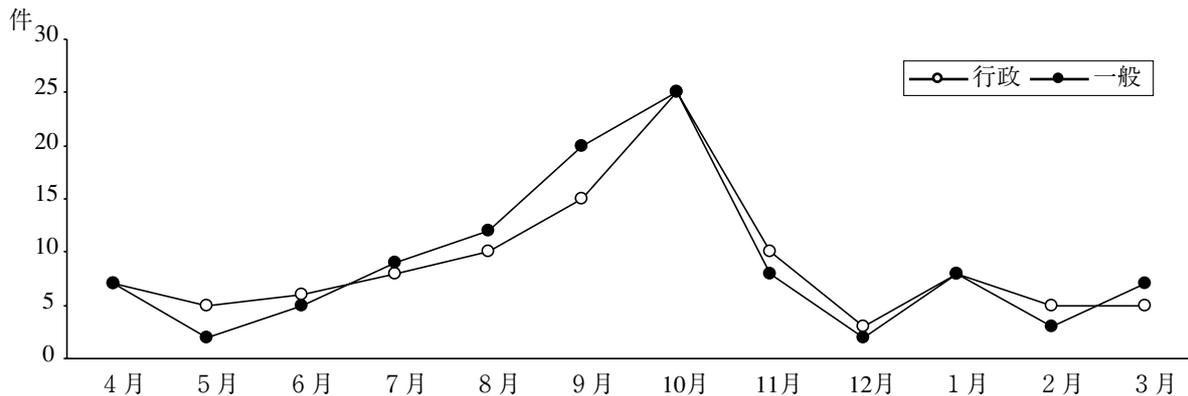


図1 平成5年度から14年度における月別依頼件数（食品異物）

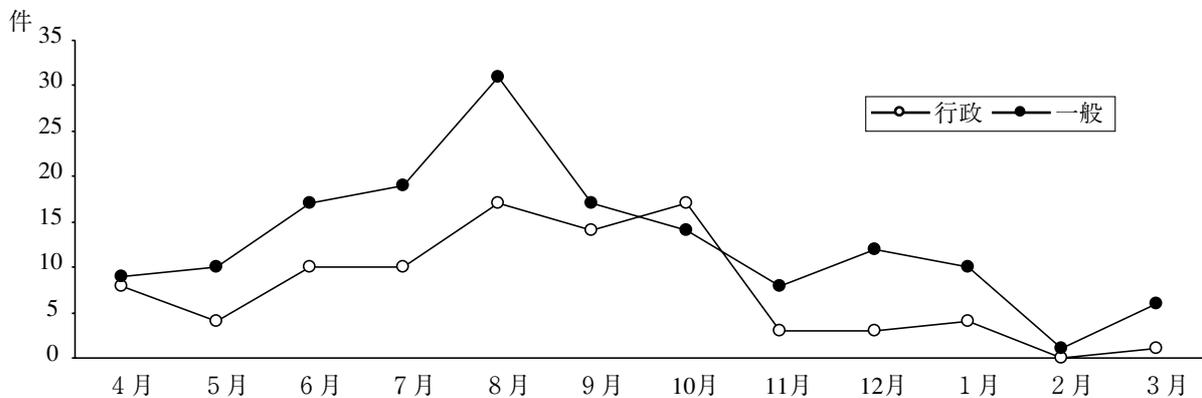


図2 平成5年度から14年度における月別依頼件数（住環境）

資料

食品汚染物残留調査結果
(平成14年度)

渡邊裕子¹, 佐藤久美子¹, 藤巻照久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 (2002)

Hiroko WATANABE¹, Kumiko SATO¹,
Teruhisa FUJIMAKI¹, Michiko KISHI¹,
Shuji SATOH¹ and Kanagawa Pref.
Environmental Health Division²

食品中の残留汚染物質の濃度を監視し、その安全性を確保することを目的として、農薬や動物用医薬品等の環境汚染物質の残留調査を継続的に実施している。引き続き、平成14年度における調査結果について報告する。

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について、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（一日許容摂取量：ADI）に順次審議し、各食品ごとに成分規格として定めている。平成13年4月現在215種の農薬について、残留基準が設定されている。

我々は平成2年度より、輸入農産物を対象にして、産地では収穫後使用農薬（ポストハーベスト農薬）として使用されながら、国内では使用不許可のため、残留基準が未設定の農薬、および残留基準設定の対象となっていない農産物加工食品等について、市場調査を実施している。本年度の調査結果を表1および2にまとめた。

ポストハーベスト農薬等の調査結果を表1に示した。ポストハーベスト農薬等の調査として、中国産緑茶10検体について、EPN、ダイアジノン、フェニトロチオンの3規制農薬を含む有機リン系農薬13種およびトリアゾ

ホス、メタミドホスについて調査を行った。輸入りんご2検体は、EPN、ジクロルボス、ダイアジノン、マラチオン、クロルピリホス、プロチオホス、チオメトンの7規制農薬を含む有機リン系13農薬およびチオファネートメチル、ジフェニルアミンについて調査を行った。中国茶では、トリアゾホスが1検体0.12ppm検出され、またメタミドホスが5検体0.01～0.09ppm検出された。有機リン系農薬であるトリアゾホスおよびメタミドホスは、野菜、穀類、果樹等の殺虫剤として汎用されている¹⁾。いずれもお茶における残留基準は設定されていないが、食品規格におけるADIはトリアゾホスが0.0012mg/kg体重/日、メタミドホスが0.004mg/kg体重/日と設定されている²⁾。お茶を毎日50g摂取したとして、トリアゾホスの検出値のADIに対する割合は10.0%、またメタミドホスの検出値は0.3～2.3%にあたる。輸入りんごは、国産りんごの出荷時期前後の短期間に市販され、本年度はオーストラリア、タスマニア産ふじりんご2検体の調査となった。そのうち1検体でクロルピリホスが0.02ppm検出されたが、りんごの基準値は1.0ppmであることから、食品衛生法上問題となる濃度ではなかった。一方、食品規格におけるADIは、0.01mg/kg体重/日が目安とされている。体重50kgの人が一日に食べる果物の摂取量116g（1998）³⁾から、クロルピリホスの検出値のADIに対する割合を算出すると、5.8%となる。厚生労働省による平成11年度の食品中の残留農薬検査結果⁴⁾では、お茶のトリアゾホスについて検査データはないが、メタミドホスでは輸入品4検体を行い、いずれも検出限界以下であった。また、輸入りんごのクロルピリホスにおいても4検体実施し、いずれも検出限界以下と報告されている。

加工食品の農薬残留調査結果として、ベビーフードの結果を表2に示した。野菜・果実等のペースト15検体、果汁飲料10検体、菓子5検体について、有機塩素系農薬6農薬、有機リン系農薬30農薬、ピレスロイド系農薬6農薬、含窒素系農薬30農薬の調査を行った。アメリカ産ももペーストでベルメトリンが0.03ppm、りんご果汁10検体のうち1検体で、殺菌剤ジフェノコナゾールが0.52ppm、ビスケットでは3検体いずれもクロルピリホスが検出された。殺虫剤として用いられるベルメトリンのものの基準値は2.0ppmで、ADIは0.048mg/kg体重/日となり²⁾、検出値は基準値の1.5%、ADIに対する割合が0.2%となる。一方、ジフェノコナゾールのりんごの基準値は1.0ppm、ADIは0.0096 mg/kg体重/日である。りんご果汁の検出値は、基準値の52.0%、ADIの12.6%となりその割合が高かった。本製品は乳児用であることから、注意が必要と思われた。また、この製品は国内産の

1 神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

2 神奈川県生活衛生課
〒231-8588 横浜市中区日本大通り

表1 輸入農産物のポストハーベスト農薬等残留調査結果

検体名	検体数	検出頻度 (検出数/検体数)			
		有機リン系農薬	チオファネートメチル	トリアゾホス	メタミドホス ジフェニルアミン
中国緑茶	10	0/10	—	1/10* ¹	5/10* ²
輸入りんご	2	1/2* ³	0/2	—	0/2

*1 0.12ppm

*2 0.01, 0.02, 0.03, 0.03, 0.09ppm

*3 クロルピリホス 0.02ppm

— 未測定

有機リン系農薬13種：EPN, ジクロロホス, ジメトエート, ダイアジノン, フェニトロチオン, マラチオン, クロルピリホス, クロルピリホスメチル, ピリミホスメチル, エトプロホス, プロチオホス, トリクロホス, チオメトン

定量限界 チオファネートメチル, トリアゾホス：0.05ppm

クロルピリホスメチル, エトプロホス, ジフェニルアミン：0.005ppm

その他の有機リン系農薬およびメタミドホス：0.01ppm

表2 加工食品（ベビーフード）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)			
		有機塩素系農薬	有機リン系農薬	ピレスロイド系農薬	含窒素系農薬
りんごペースト	2	0/2	0/2	0/2	0/2
にんじんペースト	2	0/2	0/2	0/2	0/2
スイートポテトペースト	2	0/2	0/2	0/2	0/2
ほうれんそうペースト	1	0/1	0/1	0/1	0/1
洋なしペースト	1	0/1	0/1	0/1	0/1
ももペースト	1	0/1	0/1	1/1* ¹	0/1
グリーンピースペースト	1	0/1	0/1	0/1	0/1
かぼちゃペースト	1	0/1	0/1	0/1	0/1
ブルーベリーペースト	1	0/1	0/1	0/1	0/1
いんげんペースト	1	0/1	0/1	0/1	0/1
バナナペースト	1	0/1	0/1	0/1	0/1
白がゆペースト	1	0/1	0/1	0/1	0/1
りんご果汁	10	0/10	0/10	0/10	1/10* ²
ビスケット	3	0/3	3/3* ³	0/3	0/3
コーンスナック	1	0/1	0/1	0/1	0/1
米スナック	1	0/1	0/1	0/1	0/1

*1：バルメトリン 0.03ppm

*2：ジフェノコナゾール 0.52ppm

*3：クロルピリホス 0.026, 0.032, 0.053ppm

有機塩素系農薬6農薬：総BHC, 総DDT, ヘプタクロル (ヘプタクロルエポキシドを含む), ジコホール, デイルドリン, エンドスルファン (エンドスルファンシルフェート)

有機リン系農薬30農薬：EPN, エトプロホス, チオメトン, テルブホス, エチルチオメトン, メチルパラチオン, パラチオン, フェンチオン, クロルピリホス, ジクロロホス, ダイアジノン, フェニトロチオン, マラチオン, サリチオン, シアノホス, クロルピリホスメチル, ピリミホスメチル, トリクロホスメチル, ホスホチアゼート, α , β -クロルフェンビンホス, フェントエート, メチダチオン, プタミホス, プロチオホス, フェンスルホチオン, エチオン, エディフェンホス, ビリダフェンチオン, ホサロン, ピラクロホス

ピレスロイド系農薬6農薬：シハロトリン, バルメトリン, シバルメトリン, フルシトリネート, デルタメトリン, フルバリネート

含窒素系農薬30農薬：EPTC, イソプロカルブ, クロルプロファム, ベンダイオカルブ, ピリミカブ, メトリブジン, アラクロール, エスプロカルブ, エチオフェンカルブ, トリアジメホン, トリアジメノール, ペンディメタリン, ピリフェノックス (Z, E), パクロブダゾール, ヘキサコナゾール, プレチラクロール, キノメチオネート, ミクロブタニル, フルシラゾール, シプロコナゾール, メプロニル, プロビコナゾール, レナシル, テニクロール, ジフルフェニカン, ビリブチカルブ, テブフェンピラド, メフェナセット, ビリダベン, ジフェノコナゾール

定量限界 イソプロカルブ：0.1ppm, ピラクロホス, チオベンカルブ, レナシル：0.05ppm, フルトラニル：0.025ppm, EPN, ホサロン, エディフェンホス, フェンスルホチオン, メチダチオン, α , β -クロルフェンビンホス, ホスチアゼート, ミクロブタニル, シハロメトリン, バルメトリン：0.02ppm

その他の有機リン系農薬, その他の含窒素系農薬, エンドスルファンシルフェート, フェノブカルブ, シバルメトリン, デルタメトリン及びフルバリネート：0.01ppm

クロルピリホスメチル, エトプロホス, テルブホス, エチルチオメトン, ベンダイオカルブ, ピリミカブ, アラクロール, パクロブダゾール, フルシトリネート及びエンドスルファンシルフェート以外の有機塩素系農薬：0.005ppm

表3 食肉中の動物用医薬品残留検査

検体名	検体数	検出頻度 (検出数/検体数)				
		β -トレンボロン	ゼラノール	チアベンダゾール*1	アルベンダゾール*2	スピラマイシン*3
国産牛肉	5	—	—	—	—	0/5
輸入牛肉	4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
輸入豚肉	4	—	—	0/4	0/4	—
国産鶏肉	4	—	—	—	—	0/4
輸入鶏肉	3	—	—	—	0/3	0/3
輸入羊肉	1	—	—	0/1	0/1	—

*1 チアベンダゾールの代謝物である5-ヒドロキシチアベンダゾールを含む

*2 アルベンダゾール代謝物である5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミンを測定

*3 ネオスピラマイシンを含む

— 未測定

定量限界 アルベンダゾール代謝物およびチアベンダゾール代謝物：0.01ppm

チアベンダゾール：0.005ppm

 β -トレンボロン，ゼラノール：0.002ppm

スピラマイシンおよびネオスピラマイシン：0.05ppm

表4 海産魚介類中のTBTO, TPT およびDBT 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
アジ	3	3/3	0.005, 0.005, 0.007	0/3	ND	1/3	0.014
サバ	1	1/1	0.017	0/1	ND	1/1	0.015
ゴマサバ	1	1/1	0.016	0/1	ND	1/1	0.015
カマス	2	1/2	0.006	0/2	ND	0/2	ND
タチウオ	2	2/2	0.017, 0.069	0/2	ND	1/2	0.016
エボダイ	1	1/1	0.048	0/1	ND	0/1	ND
ウルメイワシ	3	1/3	0.006	0/3	ND	1/3	0.015
メバル	1	1/1	0.009	0/1	ND	1/1	0.017
イナダ	1	1/1	0.008	0/1	ND	0/1	ND
タイ	1	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND
イトヨリ	1	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND
赤カレイ	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
紅イカ	1	0/1	ND	0/1	ND	1/1	0.030

検出頻度：検出数/検体数

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）として算出した。

NDはTBTOは0.005ppm, TPTCおよびDBTCは0.010ppm未満とした。

りんごを使用している旨の表示がなされていることから、国内産りんごの残留が懸念された。平成11年度の全国検査の結果、国内産りんご14検体すべて検出限界以下のデータが報告されているが⁴⁾、今後国内産りんごおよびりんご加工品について引き続き調査が必要と思われた。ビスケットについては、小麦由来と考えられるクロルピリホスが3検体いずれからも検出された。クロルピリホスは小麦粉の基準値がなく、小麦の基準値は0.1ppm、ADIは0.01mg/kg体重/日である²⁾。検出値は小麦基準値の26～53%となる。一日の小麦および菓子摂取量を合わせた115g³⁾を摂取量として検出値のADIに対する割合をみると0.6～1.2%となる。クロルピリホスは平成13年度の検査結果においても検出され⁵⁾、また平成11年度全国での検出割合の高い農薬の14位となる

検出頻度の高い農薬であることから⁴⁾、今後とも加工品の幅広い調査が必要と思われた。

② 食肉の動物用医薬品残留検査

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14年4月現在、22品目の残留基準値が設定されている。平成14年度は、神奈川県、青森県、北海道の製造所の鳥肉3検体、および神奈川、山梨、鹿児島、青森県の製造所の牛肉5検体について抗生物質であるスピラマイシンについて検査を行った。輸入食肉では、アメリカ、オーストラリア産の牛肉4検体についてホルモン剤の β -トレンボロン、ゼラノール、内寄生虫剤のチアベンダゾール、アルベンダゾール、およびスピラマイシンについて検査を行った。メキシコ、アメリカ産の

豚肉4検体とニュージーランド産の羊肉1検体はチアベンダゾール、アルベンダゾール、中国、ブラジル産の鶏肉3検体はアルベンダゾール、スピラマイシンについて検査を行った。

その結果、すべての検体において、これらの動物用医薬品の残留は認められなかった。動物用医薬品の残留については、食肉等からの摂取によるヒトの抗生物質の効力の低下や低年齢層に対するホルモン剤の影響が懸念されることから⁶⁾、引き続きその使用実態を踏まえたモニタリングが必要と考えられた。

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の魚介類への汚染が食品衛生上問題とされた昭和60年代からTBTO（トリブチルスズオキシド）とTPT（トリフェニルスズ）の汚染実態調査を行っている。平成6年度以降は代謝産物であるDBT（ジブチルスズ）を調査項目に加えている。平成14年度においても同様に衛乳第20号（平成6年度）試験法に準じて行ったが、分析法の感度が向上したことから、検出限界を下げた調査を実施した。検出限界は、ガスクロマトグラフ装置およびガスクロマトグラフ質量分析計による分析のS/N比の向上により低下することが可能となった。

TBTOはこれまでの4倍、TPTおよびDBTはこれまでの2倍感度が向上した。県内産および県内流通魚介類20検体について調査を行った結果、TBTOは11検体から0.005～0.069ppm検出され、DBTは7検体から0.014～0.030ppm検出された。TPTは不検出であった。

感度の向上によりこれまで痕跡程度であったものを定量する事ができたことから、TBTOの検出率は平成13年度では10%であったものが55%、DBTは15%が35%となった。経年変化をみると、徐々に濃度の減少がみられるが、一方で依然として汚染魚種が多く、汚染が広がっていることが懸念される。また低濃度での有機スズ化合物の生体への影響が未解明であることから、さらにモニタリングを継続する必要があると考えられる。

（平成15年8月14日受理）

文 献

- 1) 第3版 最新農業データブック, p.261, p.407, ソフトサイエンス社, 東京 (1997)
- 2) 食品・食品添加物等規格基準 (抄), 食品衛生学雑誌, Vol.44, No.1 J-83-J148 (2003)
- 3) 五訂 食品成分表 2001, 香川芳子監修 女子栄養大学出版部, 東京, 378-379 (2001)
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部基準課: 食品中の残留農薬 (13年度版), 厚生省, 東京 (2002)
- 5) 藤巻照久, 佐藤久美子, 渡邊裕子, 渡辺貞夫, 岸美智子, 佐藤修二, 生活衛生課: 食品汚染物調査結果 (平成13年度), 神奈川県衛生研究所報告, 32, 113-114 (2001)
- 6) 堀江正一, 中澤裕之: 動物用医薬品の法規制の現状と残留分析法, 食品衛生学会誌, Vol.36, No.3, 329-343 (1995)

資料

遺伝子組換え食品の分析結果 (平成14年度)

大森清美¹, 土屋久世¹, 岸 弘子¹, 山田利治¹
平山クニ¹, 佐藤修二¹, 神奈川県生活衛生課²

Investigation on the Qualitative and Quantitative Analysis of Genetically Modified Foods in Kanagawa Prefecture (2002)

Kiyomi OHMORI¹, Hisayo TSUCHIYA¹
Hiroko KISHI¹, Toshiharu YAMADA¹,
Kuni HIRAYAMA¹, Shuji SATO¹
and Environmental Health Division²

平成13年4月から食品衛生法により、遺伝子組換え(GM)食品の安全性審査と、それに伴う食品の安全性に関わる情報提供としての表示が義務化された。平成13年度はPCR法によるパパイヤ、ジャガイモ、トウモロコシ、ダイズ40検体について定性試験を実施し、いずれの検体からも組換え遺伝子は検出されなかった。平成14年度には遺伝子定量装置が導入されたことから、平成13年度と同様の定性試験に加えて、組換え食品として承認済みのトウモロコシ、ダイズについて、定量試験を実施した。

検体は、平成14年5月から10月に、神奈川県下7カ所の保健福祉事務所により、スーパー及び小売り店舗から収去された70検体である。厚生労働省より平成14年4月30日付食発第0430001号で通知された試験方法に従い、パパイヤ、ジャガイモ、トウモロコシ、ダイズについて、表1に示す検査項目を実施した。なお、豆腐の定量試験については、定量試験法が通知されていないが、ダイズの定量試験法を参考に調査的観点から試験を実施した。機器類は、遺伝子増幅装置にTaKaRa PCR Thermal Cycler SP、電気泳動装置にMupidミニゲル泳動装置、ゲル撮影装置にATTO BIOINSTRUMENT, AE-6905H Image Saver HR、遺伝子定量装置にABI PRISM 7700を使用し

た。

食品70検体についての、組換え遺伝子定性及び定量試験結果を表2及び表3に示した。定性PCRによるパパイヤ5検体、ジャガイモ加工品10検体、トウモロコシ加工品20検体の定性試験(表2)では、コーンスナック菓子2検体を除く33検体で、いずれも組換え遺伝子は不検出であった。コーンスナック菓子2検体(表2, 検体No.25および26, 図1左)については、いずれも内在性遺伝子であるZeinが検出されず(図2), 検査不能であった。加工による遺伝子の分解は、加熱処理よりも加圧処理によって起こりやすいといわれている。Zeinが検出されなかったコーンスナック菓子2検体について、製造会社に製法を問い合わせた結果、いわゆる「ボン菓子」の要領で、加圧加工することにより作られた製品であることが確認された。

定量PCRによるトウモロコシ穀粒及びトウモロコシ半製品15検体、ダイズ穀粒及び豆腐20検体についての定量試験では(表3), いずれの検体からも、5%を越える組換え遺伝子は検出されず、トウモロコシ穀粒12検体全てにおいて、40サイクルでも全く蛍光強度の上昇は認められなかった。一方、トウモロコシ半製品であるコーングリッツ1検体(表3, 検体No.13)及びコーンフラワー2検体(表3, 検体No.14および15)では、35Sの定量下限値(0.5%)未満ではあるものの、0.10~0.26%程度の35Sが検出された。この結果から、粉砕加工した製品については微量ながらも組換え体の混入が起こりやすい原因があるものと考えられた。

定量PCRによるダイズの試験については、ダイズ穀粒3検体(表3, 検体No.16~18)でRRSの定量下限値(0.1%)以上の値(0.13~0.21%)で検出され、それらは、全てアメリカ産であった。アメリカにおける2002年のダイズ組換え体の生産は、全体の75%であり、ダイズはアメリカ国内でも最も組換え体生産比率が高い作物である。このことから、ダイズ穀粒の流通段階において、微量ながらも組換え体の混入が起こりやすいものと考えられた。また、豆腐9検体(表3, 検体No.21~29)については、RRSの定量下限値未満ではあるものの0.04~0.09%のRRSが検出され、そのうち最も高値を示したのは、アメリカ産のダイズを使用して製造された豆腐であった。検体No.26は、日本産ダイズを原料としていることが明記されており、他の6検体については原料ダイズの産地は不明であった。RRSが検出された豆腐8検体中、6検体では「遺伝子組換えでない」の表示があり、検出されたRRSの量も極微量であることから、定量下限値未満で検出された豆腐のRRSは、原料ダイズの流通過程における混入の可能性が考えられた。

1 神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
2 神奈川県生活衛生課

表1 平成14年度 組換え遺伝子検査項目及び試験方法

原料	品目	検体数	項目	試験方法	抽出法	組換え遺伝子	内在性遺伝子
パパイヤ	パパイヤ	5	定性	PCR法	DNeasy Plant Mini	55-1	Papain
ジャガイモ	冷凍ジャガイモ	5	定性	PCR法	DNeasy Plant Mini	New Leaf Y	Pss
	ポテトスナック菓子	5					
トウモロコシ	冷凍トウモロコシ	3	定性	PCR法	Genimic-tip	CBH351	Zein
	トウモロコシ缶詰	4					
	トウモロコシ調理品	1					
	コーンフラワー調理品	1					
	コーンスナック菓子	4	定性	PCR法	CTAB	CBH351	Zein
	ポップコーン	6					
	コーンパフ	1					
	トウモロコシ穀粒	12	定量	PCR法	DNeasy Plant Mini	35S・G21	SSII b
	コーングリッツ	1					
	コーンフラワー	2					
大豆	ダイズ穀粒	5	定量	PCR法	DNeasy Plant Mini	RRS	Le1
	豆腐	15					
	合計	35	定性				
		35	定量				

表2 組換え遺伝子定性検査結果

No.	品目	原料産国	遺伝子	結果	備考
1	パパイヤ	フィリピン	55-1	不検出	
2	パパイヤ	フィリピン	55-1	不検出	
3	パパイヤ	アメリカ (ハワイ)	55-1	不検出	
4	パパイヤ	アメリカ (ハワイ)	55-1	不検出	
5	パパイヤ	アメリカ (ハワイ)	55-1	不検出	
6	冷凍ジャガイモ	アメリカ	New Leaf Y	不検出	
7	冷凍ジャガイモ	アメリカ	New Leaf Y	不検出	
8	冷凍ジャガイモ	アメリカ	New Leaf Y	不検出	
9	冷凍ジャガイモ	アメリカ	New Leaf Y	不検出	
10	冷凍ジャガイモ	アメリカ	New Leaf Y	不検出	
11	ポテトスナック菓子		New Leaf Y	不検出	
12	ポテトスナック菓子		New Leaf Y	不検出	
13	ポテトスナック菓子		New Leaf Y	不検出	
14	ポテトスナック菓子		New Leaf Y	不検出	
15	ポテトスナック菓子		New Leaf Y	不検出	
16	冷凍トウモロコシ	ニュージーランド	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
17	冷凍トウモロコシ	ニュージーランド	CBH351	不検出	
18	冷凍トウモロコシ		CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
19	トウモロコシ缶詰		CBH351	不検出	
20	トウモロコシ缶詰		CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
21	トウモロコシ缶詰		CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
22	トウモロコシ缶詰	アメリカ	CBH351	不検出	
23	トウモロコシ調理品		CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
24	コーンフラワー調理品		CBH351	不検出	コーンフラワー
25	コーンスナック菓子		CBH351	検査不能	遺伝子組換えでない
26	コーンスナック菓子		CBH351	検査不能	遺伝子組換えでない
27	コーンスナック菓子	オーストラリア	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
28	コーンスナック菓子		CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
29	ポップコーン	ドイツ	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
30	ポップコーン	アメリカ	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
31	ポップコーン	アメリカ	CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
32	ポップコーン	アメリカ	CBH351	不検出	
33	ポップコーン		CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
34	ポップコーン		CBH351	不検出	遺伝子組換えでない
35	コーンパフ		CBH351	不検出	

表3 組換え遺伝子定量試験結果

No.	品目	原料産国	遺伝子	結果	遺伝子	結果	備考
1	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S	不検出	G21	不検出	
2	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S	不検出	G21	不検出	
3	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S	不検出	G21	不検出	
4	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S	不検出	G21	不検出	
5	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S	不検出	G21	不検出	
6	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S	不検出	G21	不検出	
7	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S	不検出	G21	不検出	遺伝子組換えでない
8	トウモロコシ穀粒	フランス	35S	不検出	G21	不検出	遺伝子組換えでない
9	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S	不検出	G21	不検出	
10	トウモロコシ穀粒	アメリカ	35S	不検出	G21	不検出	遺伝子組換えでない
11	トウモロコシ穀粒		35S	不検出	G21	不検出	遺伝子組換えでない
12	トウモロコシ穀粒		35S	不検出	G21	不検出	
13	コーングリッツ	アメリカ/カナダ	35S	0.10	G21	不検出	
14	コーンフラワー		35S	0.16	G21	不検出	
15	コーンフラワー		35S	0.26	G21	不検出	
16	ダイズ穀粒	アメリカ	RRS	0.13			
17	ダイズ穀粒	アメリカ	RRS	0.17			IPハンドリング証明書確認
18	ダイズ穀粒	アメリカ	RRS	0.21			
19	ダイズ穀粒	オーストラリア/カナダ	RRS	不検出			
20	ダイズ穀粒	カナダ	RRS	不検出			遺伝子組換えでない
21	豆腐		RRS	0.02			遺伝子組換えでない
22	豆腐		RRS	0.03			遺伝子組換えでない
23	豆腐		RRS	0.03			
24	豆腐		RRS	0.04			遺伝子組換えでない
25	豆腐		RRS	0.04			遺伝子組換えでない
26	豆腐	日本	RRS	0.05			遺伝子組換えでない
27	豆腐		RRS	0.06			遺伝子組換えでない
28	豆腐		RRS	0.07			
29	豆腐	アメリカ	RRS	0.09			遺伝子組換えでない
30	豆腐	日本	RRS	不検出			遺伝子組換えでない
31	豆腐	日本	RRS	不検出			
32	豆腐		RRS	不検出			遺伝子組換えでない
33	豆腐		RRS	不検出			遺伝子組換えでない
34	豆腐		RRS	不検出			遺伝子組換えでない
35	豆腐		RRS	不検出			遺伝子組換えでない

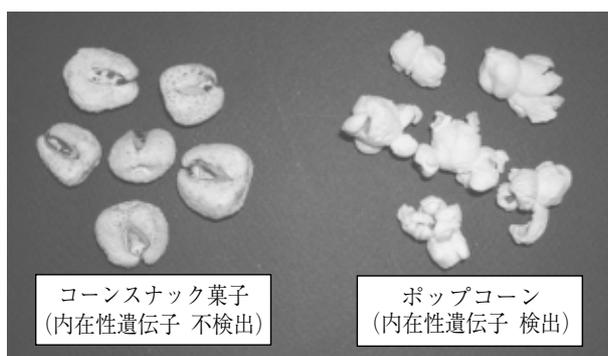


図1 内在性遺伝子が不検出であったコーンスナック菓子と内在性遺伝子が検出されたポップコーン

平成14年度に実施した組換え遺伝子の試験結果では、定性試験については検査不能の2検体を除き全て不検出であった。また定量試験についても、いずれも不検出もしくは意図せざる混入の場合の許容上限値5%を十分に下回る値であった。しかしながら、トウモロコシ半加工品や「遺伝子組換えでない」もしくは「IPハンドリング証明書確認」の表示があるダイズ穀粒及び豆腐について

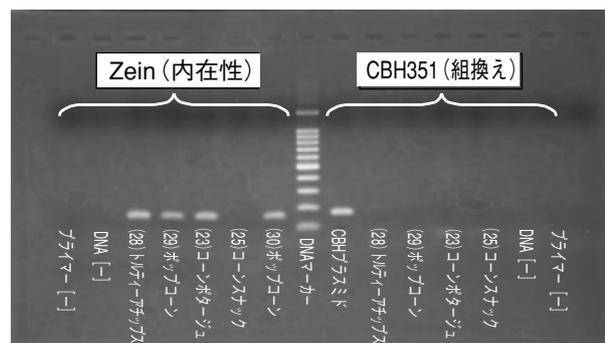


図2 トウモロコシ加工品の電気泳動パターン (): 検体No.

も微量ながら組換え遺伝子が検出され、GM作物の混入が起きていることが明らかになった。GM作物の安全性に対する消費者の不安感は未だ根強く、GM食品の購入を控える傾向が高い。消費者の「選択の権利」をまもるために、GM食品の表示に関する監視は今後も重要なものと考えられた。

(平成15年8月14日受理)

他誌掲載論文抄録

(平成14年4月～平成15年3月)

日本のHIV感染のEpidemiologyと検査体制

今井光信, 須藤弘二, 嶋 貴子, 西澤雅子, 近藤真規子 (神奈川衛研, ウイルス部), 泌尿器外科, 別冊, 156-162 (2003)

日本における新規HIV感染者の報告数は年々増加傾向にある一方, 保健所等の無料検査の受検者数は減少傾向にあり問題となっている. このため, 各検査機関におけるHIV検査結果の解析を行い, 夜間土日の無料検査や各種イベントと連携したHIV無料検査, 民間クリニックと連携した即日検査等の導入が検査数の増加特に検査陽性者の増加に効果的であることを明らかにした.

イムノクロマトグラフィー法と酵素免疫法を組み合わせた原理による新しいインフルエンザ迅速診断キット (エスプライン インフルエンザA & B[®]) の検討

市川正孝 (伊勢原共同病院小児科), 三田村敬子 (川崎市立川崎市立病院小児科), 山崎雅彦 (座間小児科診療所), 木村和弘, 込山修 (伊勢原共同病院小児科), 山本敬一 (川崎市立川崎市立病院小児科), 葦澤真理 (済生会中央病院小児科), 川上千春 (横浜市衛研), 清水英明 (川崎市衛研), 渡邊寿美, 今井光信 (神奈川衛研, ウイルス部), 橋本洋子, 前沢民子, 萩原紀子 (伊勢原共同病院検査室), 菅谷憲夫 (けいゆう病院小児科), 医学と薬学, **49**, 469-478 (2003)

イムノクロマトグラフィー法と酵素免疫法を組み合わせた原理による新しいインフルエンザ迅速診断キットの評価を行った. 本キットは, イムノクロマトグラフィー法の簡便さと酵素免疫法の感度と特異性の高さを併せ持ち, A型とB型の鑑別が可能である. 臨床材料を用いた際の本キットの感度と特異性は, A型では93.1%と90.3%, B型では73.0%と94.4%であった. B型の感度がやや低かったのは, 咽頭拭い液での感度が低かったためと考えられた. 本キットは, A型とB型の鑑別が可能でイムノクロマトグラフィー法を原理とした従来のキットと比較して同等の感度と特異性を備えており, 操作性の簡便さ, 短時間で判定可能な点から, 臨床診断に有用であると考えられた.

Time-dependent Fluctuations in Infrared ν_s CH₂ frequencies in acyl chain membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells

[FT-IR法により観察された*Acholeplasma laidlawii*細胞膜における赤外活性アシル基CH₂の経時的変動]

大村陽子 (神奈川県立衛生短大生化学), 岡崎則男 (神奈川衛研細菌病理部), Vib. Spectrosc., **30**, 227-236 (2002)

脂肪酸としてパルミチン酸のみを含む培地で培養した*Acholeplasma laidlawii*菌体のFT-IRスペクトルの経時的変化を30, 35, 40, 42および46℃で測定した. 40℃以下の温度では, 4次微分スペクトルから得られた2850 cm⁻¹付近のCH₂対称伸縮振動の波数 ν_s CH₂に0.7cm⁻¹程度のバラツキが観察され, 波数決定に明らかなprecisionの低下が見られた. この実験結果は, アシル基コンフォメーションにおけるtransgauche比の時間的揺らぎによるものとして説明される. 従って, 種々のドメインを形成する複雑な生体膜系ではこのようなコンフォメーションの揺らぎに必ずしも不飽和脂肪酸アシル基の存在を必要としないことが示された.

Nobel observation of hot-cold-hot hemolysis exhibited by group B streptococci

[B群レンサ球菌の示すホット・コールド・ホット溶血現象について]

岡崎則男 (神奈川衛研細菌病理部), 大沢 朗 (神戸大学大学院生命科学), 鈴木理恵子, 新川隆康 (神奈川衛研細菌病理部), Robert A. Whaley (ロンドン大学医学部), J. Clin. Microbiol., **41**, 877-879 (2003)

B群レンサ球菌 (GBS) がホット・コールド類似溶血を示すことを見出した. GBSを血液寒天培地に接種し, 37℃18時間培養後, 4℃で6時間放置し, 更に37℃で6時間培養するとコロニー周囲の溶血環が著しく増大する菌株が存在した. この溶血現象はブドウ球菌などが示す既知のホット・コールド溶血とは異なり, 冷却後, 再度37℃にて培養する必要があったことから, ホット・コールド・ホット溶血と称することにした. ホット・コールド・ホット溶血の発現には血清の存在を必要としたことから, 血清成分が何らかの役割を果たしているものと考えられた.

加熱及び凍結損傷黄色ブドウ球菌検出のための選択分離培地の検討

尾上洋一, 新戸理恵 (麻布大学), 寺西 大, 古川一郎, 長谷川幸江, 丸山務 (麻布大学), 食品衛生学雑誌, **43**, 239-242 (2002)

52℃, 20分間の加熱処理を施した黄色ブドウ球菌を用いて加熱損傷菌に対する各種のブドウ球菌分離選択培地の発育指示能を調べた。加熱損傷菌を塗抹したペーパーカー寒天培地 (BP), マンニット食塩寒天培地 (MS), 卵黄加マンニット食塩寒天培地 (MSEY) 及び対照として用いた非選択培地の1%ピルビン酸ナトリウム加ブレインハートインフュージョン寒天培地 (BHIP) の4培地間において出現した集落数はScheffeの多重比較検定においていずれも有意な差が認められた ($p < 0.05$)。この結果, 加熱損傷黄色ブドウ球菌に対する3選択培地の発育指示能はBP, MSEY, MSの順であり, BP培地が加熱損傷菌に対して最も発育指示能が高いことが示された。

−20℃で14日間の凍結処理を施した黄色ブドウ球菌を用いて凍結損傷菌に対するMS培地とBHIP培地の発育指示能を比較した。MS培地とBHIP培地の間には凍結保存後14日後においても有意な差は認められなかった。

Scrub typhus in Japan : Epidemiology and clinical features of cases reported in 1998

[日本における恙虫病：1998年に報告された流行と臨床像]

小川基彦, 萩原敏且, 岸本寿男, 志賀定嗣 (国立感染症研), 吉田芳哉, 古屋由美子 (神奈川衛研, ウイルス部), 海保郁男 (千葉衛研), 伊藤忠彦 (都衛研), 根本治育 (茨城衛研), 山本徳栄 (埼玉衛研), 益川邦彦 (神奈川衛研) Am. J. Trop. Med. Hyg. **67**. 162-165. 2002

調査票により1998年の日本における恙虫病の発生状況を解析した。恙虫病は462件報告された。恙虫病は本州の北部では春と秋に, 本州の中部と九州では秋に発生がみられた。病気の発生は年齢, 性別, 行動により多様化していた。患者の76%は51歳以上であり, 36%は農作業で, 16%は森林作業中に感染した。発熱, 発疹, かさぶたはそれぞれ98%, 93%, 97%にみられた。34名の患者にDICがみられ, この患者の発生地域には差があった。この調査は1998年の日本における恙虫病の状態を示すと同時に診断と予防のための重要な情報を提供する。

Fulminant Japanese spotted fever definitively diagnosed by the polymerase chain reaction method

[PCRで最終的に診断された重篤な日本紅斑熱]

児玉和也, 千波尊教, 山内勇人, 近平佳美 (兵庫県立淡路病院), 片山丘, 古屋由美子 (神奈川衛研), 藤田博己 (大原研究所), 山本正悟 (宮崎衛環研), J. Infect. Chemother. **8**, 266-268. 2002

72歳男性は7日間続いた意識障害, 発熱, 一般的な皮膚の発疹, 重症の衰弱で2002年6月20日緊急に入院した。検査結果はDICと多臓器不全を示していた。ヘパリンと重炭酸ナトリウム管理が行われたが, 呼吸不全の悪化と脳炎による全身けいれんがみられた。人工呼吸器を用いたが, 代謝アシドーシスの悪化により血圧が低下し, 死亡した。血清検査は*Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia Japonica*, *Rickettsia typhi*の抗体は検出されなかった。しかし血液からPCRにより*R. japonica*遺伝子が検出され, 日本紅斑熱と診断された。PCRは重篤な段階で日本紅斑熱の診断を確立するのに有効である。

高周波還元処理による水道水中変異原性物質の低減化

森 康明, 伏脇裕一 (神奈川県衛生研究所), 村上和雄 (東京家政大学家政学部), 後藤純雄 (国立公衆衛生院), 小野寺祐夫 (東京理科大学薬学部), 安全工学, **41**, 101-107 (2002)

高周波還元処理による水道水中の変異原物質の除去効果を検討するため, Ames試験により処理水の変異原性を測定した。水道水の変異原活性は24時間高周波還元処理することで52%減少した。また, 河川水中に存在する4-メチルフェノールと塩素とが反応して生成される強変原物質である2,6-ジクロロ4-ヒドロキシ-4-アアウキルククロヘキサ-2,5-ジエン-1-オン (2,6-DCTQ)の水溶液についても変異原性除去効果を検討した。その結果, 2,6-DCTQの変異原活性は59%低下することが認められた。この除去率は, HPLC測定による化学分析による2,6-DCTQの除去率とほぼ一致した。このことから, 高周波還元処理は, 水中変異原物質の低減化に有用であることが示唆された。

河川水中でのエストロゲン及びその抱合体の生分解性

伊藤伸一, 上村 仁 (神奈川衛研, 生活環境部), 水道協会雑誌, **71** (11), 26-34, (2002)

河川水中のエストロゲン及びその抱合体の動態を把握するために, 河川水を微生物源として用いた生分解試験を行った。 β -エストラジオール (17 β -エストラジオール, E₂)は, 2日間の培養期間中, 経日的に濃度が減少し, それに伴いエストロン (E₁)の生成が認められた。

E₁は培養期間中、濃度の減少が認められず、河川水中では分解されにくい物質と考えられた。硫酸抱合体は、培養期間中、脱抱合反応が認められなかった。グルクロン酸抱合体は、経日的に脱抱合された。E₂のグルクロン酸抱合体からは、E₂及びE₁が生成され、E₁のグルクロン酸抱合体からは、E₁の生成が認められた。

エストロゲン活性が高いE₂及びE₁が、水道原水中に混入した場合を想定して、残留塩素による分解性を検討したところ、E₂及びE₁は速やかに分解され、いずれも分解率は95%以上であった。

ダイエット茶に混入された医薬品成分について

小島 尚, 岸美智子 (神奈川県, 食品薬品部), 関田節子 (国立衛研, 筑波), 佐竹元吉 (薬剤師研修センター) 中毒研究, **15**, 183-185 (2002)

神奈川県では昭和50年代から痩身や強壮強精などを謳った健康食品の効果を高めるため、不当に添加された医薬品成分の有無を調査してきた。近年、情報・物流の国際化や規制緩和により個人輸入が容易になった。しかし、入手された健康食品やサプリメントには国情に違いから医薬品となる生薬などが含有していたり、また、国内では経験のない医薬品成分が混入した事例が報告されている。今回、健康被害防止に役立つよう広く情報を周知するため、我々が経験した過去の事例を中心に、さらに、今後混入が予想される医薬品成分を示した。

Toxicity of the Tributyltin Compound on the Testis in Premature Mice

[性成熟時のマウス精巣におけるトリブチルスズ化合物の影響]

熊坂謙一, 宮澤眞紀, 藤巻照久, 佐藤修二 (神奈川県, 田尾博明, Babu Rajendran RAMASWAMY (独立行政法人産総研), 中澤裕之 (星薬科大), 牧野恒久 (東海大) J. Reprod. Dev. **48**, 591-597 (2002)

防汚剤として船底や魚網に広く使用されていたトリブチルスズ化合物 (TBT) の精巣毒性について検討を行うため、5週齢のICR系マウスに週2回4週間TBTを経口投与した。その結果、精巣重量には影響が見られないものの、精巣内スパームヘッドカウントは30~40%程度有意に減少しており、組織化学的検討では、一部の個体に精細管内でセルトリ細胞の空胞化等の異常が観察されたが、頻度はそれほど高くなかった。また、この時、精巣内の総スズ濃度は投与濃度依存的に上昇していた。これらの結果より、5週齢よりTBTをマウスに曝露させた場合、成熟後の精巣に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。

グルホシネート告示試験法の迅速化及び大豆とトウモロコシへの適用

渡辺貞夫 (神奈川県, 企画指導室) 食衛誌, **43**, 169-172 (2002)

除草剤グルホシネート及びその代謝物MPPAの告示分析法は、非常に煩雑な方法であり、国内での残留実態調査報告例がほとんどない。そこで、日常検査にも使えるように簡略化した。改良点は、迅速かつ再現性に重点を置き、さらに大豆及びトウモロコシなどの高タンパク作物に適用できるようにした。オルト酢酸トリメチルにより誘導体化し、シリカゲルカラムで精製し、GC-FPDで測定する本分析法を大豆及びトウモロコシに適用したところ、いずれも80%以上の回収率で、再現性も良好であった。

Tumor-Promoting Activity of Phthalate Esters Estimated by in Vitro Transformation Using Bhas Cells

(Bhas細胞を用いた形質転換試験法によるフタル酸エステルの発がんプロモーター活性の評価)

Yuichi Fushiwaki (神奈川県, 生活環境部), Tatsuhiro Niino, Tohru Ishibashi (東京顕微鏡院), Ken Takeda, Sukeo Onodera (東京理科大学), Journal of Health Science, **49**(1), 82-87 (2003)

フタル酸モノ-n-ブチル (MBuP) およびフタル酸モノ-2-エチルヘキシル (MEHP) は100~10,000ng/mlでBhas細胞の形質転換を促進させており、発がんプロモーター活性が認められた。しかし、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) およびフタル酸ジ-n-ブチル (DBP) についてはDEHPが微弱ながらプロモーター活性が認められたが、DBPについてはほとんど認められなかった。また、Bhas細胞培養中でDBPおよびDEHPの加水分解によるMBuPおよびMEHPの生成が認められ、生成したMEHPがDEHPの微弱な発がんプロモーター活性に関与していることが示唆された。一方、MBP単独で明らかになっている発がんプロモーター活性はDBPにはほとんど認められなかった。

Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column

(繰返し使用可能なイムノアフィニティーカラムを用いた湖水中のミクロシスチンの測定)

近藤文雄, 伊藤裕子, 岡 尚男, 山田靖治, 宮崎豊 (愛知衛研), 辻 清美 (神奈川県, 芋川 実, 新見康正 (常盤化学工業), 原田健一 (名城大), 上野芳夫 (東京理科大) Toxicol, **40**, 893-899 (2002)

湖水中のミクロシスチン (MC) の精製のため、抗

MC-LRモノクローナル抗体を担体に結合させ、繰り返し使用可能なイムノアフィニティーカラムを作成した。カラムを繰り返し使用した場合の回収率（湖水にMC-LR, -RR, -YRを100ngずつ添加）を求めた。Sep-Pak PS2カートリッジで抽出後、イムノアフィニティーカラムで精製した。イムノアフィニティーカラムは牛血清アルブミン-Tris-HCl緩衝液で洗浄し、カラムを再利用した。回収率は1回目87-88%，2-3回目83-88%，4-5回目63-77%であった。この結果から、3回までは繰り返し使用できることがわかった。湖水を採取し、本法で精製し、HPLC, LC/MSで分析した結果、諏訪湖の湖水からMC-LR,-RRが検出された。

チウラム標準溶液保存時の濃度減少について

上村 仁, 伊藤 伸一 (神奈川県衛生研究所, 生活環境部), 水道協会雑誌, 72 (4), 34-37 (2003)

アンプル中で保存されたチウラムのアセトニトリル溶液 (1mg/L) の濃度が急激に低下する現象が観察された。この現象は容器の密閉時に加熱を伴うアンプルにのみ見られ、使用したアセトニトリルのメーカーやロットに関係なく同一の減少傾向を示した。一旦アンプル中に保存したアセトニトリルを使って希釈したチウラムの濃度が減少することからアセトニトリルの加熱生成物がチウラムの濃度減少に関与していると思われたが、加熱生成物の具体的な特定はできなかった。アンプルはバイアルや共栓試験管等に比較して確実に密閉できるため標準液や試料の保存に用いられることが多いが、分解しやすい化合物を低濃度で保存する際にはあらかじめその容器中における保存安定性を確認することが重要であると考えられる。

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health (Bull. Kanagawa
Ins. of P. H.) is an official periodical on reseach works at Kanagawa
Prefectural Institute of Public Health and is publishued, as
a rule, annually. All communications relating to the
publication should be addressed to the
Editorial Board.

Editorial Board
KANAGAWA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH
1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki 253-0087
JAPAN

Bulletin
of
Kanagawa Prefectural Institute of Public Health
No. 33 (September, 2003)

CONTENTS

Review

- The Current Situation of Diagnostic Technology of the Rickettsiology and Problem.
- Particularly, the Tsutsugamushi Disease -
Yoshiya YOSHIDA ······

Short reports

- Sentinel Surveillance Reports and Isolation of Viruses from Hand, Foot and Mouth Disease
and Herpangina Cases which prevailed in Kanagawa Prefecture from 2000 to 2002
Takako SHIMA, Yuko ISHIDA, Makiko KONDO, Takayuki SAITO,
Sumi WATANABE and Mitsunobu IMAI ······
- Occurrence of Epidemic Gastroenteritis Caused by Viral Agents in Kanagawa Prefecture (2002)
Miyuki HARA, Yumiko FURUYA, Takashi KATAYAMA and Mitsunobu IMAI ······
- Analysis Method for Agricultural Chemicals which are Causes of Wild Bird's Death
Teruhisa FUJIMAKI, Kumiko SATO and Michiko KISHI ······
- Simultaneous Determination of Residual Pesticides ; Methidathion, Pyrazophos
and Propargite in Agricultural Products
Hiroko WATANABE, Kumiko SATO, Teruhisa FUJIMAKI,
Sadao WATANABE and Michiko KISHI ······
- Comparison and Improvement of Cyclamic Acid Analysis in Foods
Toshiharu YAMADA and Hisayo TSUTHIYA ······
- The Evaluation of Sediment as Source of Endocrine Disrupters to Raw Water
for Water Supply
Hitoshi UEMURA, Kiyomi TSUJI and Shin-Ichi ITOH, ······

Data

- Testing of West Nile Virus
Takayuki SAITO, Toshiaki SATO, Yumiko FURUYA and Mitsunobu IMAI ······
- Examination of Noxious Arthropods and Vertebrates for the Last Ten Years
Takatsugu INADA and Shigeru TAKEDA ······
- Investigation on the Residual Levels of Foods Chemical Contamination
in Kanagawa Prefecture (2002)
Hiroko WATANABE, Kumiko SATO, Teruhisa FUJIMAKI, Michiko KISHI,
Shuji SATOH and Kanagawa Pref. Environmental Health Division. ······
- Investigation on the Qualitative and Quantitative Analysis of Genetically Modified Foods
in Kanagawa Prefecture (2002)
Kiyomi OHMORI, Hisayo TSUCHIYA, Hiroko KISHI, Toshiharu YAMADA,
Kuni HIRAYAMA, Shuji SATOH and Kanagawa Pref. Environmental Health Division. ·
- Summary of Added Medicines in Health Foods Advertising Weight Reduction
Kenichi KUMASAKA, Maki MIYAZAWA, Takashi KOJIMA, Kayo DOI
and Shuji SATOH ······

-
- Abstracts of original papers by research staffs (June, 2002 - May, 2003) ······
-